

Diversidad de los rizobios que nodulan la soja en los suelos de la Pampa húmeda e identificación de cepas para la fabricación de inoculantes comerciales

Tesista
MSc Graciela Noemí Pastorino

Directores
PhD Balatti, Pedro A. (Director)
Dra Cabello, Marta (Codirector)

2016



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

El presente Trabajo de Tesis
para optar al grado de
Doctor de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo
ha sido realizado en el
Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE) y cátedra de Microbiología Agrícola
Departamento de Ciencias Biológicas, Fac. de Cs. Agrarias y Forestales
Universidad Nacional de La Plata (UNLP).



Agradecimientos

En este largo camino del doctorado muchas personas participaron, algunas ni saben que fueron ayuda o ánimo, cuando se ponía “escabroso”, pero nunca hubiera llegado sola.

Gracias a mi director PhD Pedro A. Balatti, que siempre estuvo presente con diversos aportes, ideas, sugerencias, materiales y también oído cuando fue necesario. Gracias por las horas dedicadas a la redacción de esta tesis. Gracias por la confianza.....y fundamentalmente paciencia.

Le agradezco a mi Codirectora Dra Marta Cabello que colaboró con su pronta disposición ante todas mis consultas, aportando valiosos consejos, alentándome en todo tiempo.

A la Dra Silvina Y.M. Lopez (o M.Y.?) Gracias!!!!, no hubiera podido sin tu ayuda. Desde el inicio compartiendo protocolos, mates, ensayos, charlas, papers, PCRs, más mates, congresos, cursos y mate con galletitas! Hacemos un equipo de temer!! Gracias por las muchas horas y muchas ganas! Gracias por la generosidad infinita!

Al Dr Mario Saparrat, como compañero de laboratorio, “animador” profesional, con frases celebres: Paz y Ciencia y algunos chistes fúngico-bioquímicos, únicos, por supuesto. Gracias por sus palabras y confianza.

Compañeros de mañanas y tardes en el lab.C, cada uno con su consejo, a veces regando ensayos ajenos o sacando la PCR o autoclavando material o sugerencias de protocolos o discusiones de resultados o simplemente charlas de bueyes (rizobios) perdidos: gracias a Ernesto, a Rocío, a Ines, a Laura W., a Alejandra B.. Algunos otros que están en nuevos rumbos, les debo también mi agradecimiento por su contribución tanto técnica como anímica, a Guillermina H.L, Marta G. y a Sebastián.

A las chicas de Micro, Laura B., Gabriela, Virginia, Gimy, Alejandra L., les agradezco por compartir los tramos difíciles, de la vida y también académicos, y los lindos también. Gracias por el continuo aliento, y por escucharme.

Para mi familia Alejandro, Ayelén, Ana Clara (ahora incluyendo a Olileia y Matías). Gracias! Por el tiempo, por acompañarme, por el intento de desestresarme y..... por el estrés de cocinar para todos.

Para mis hermanas y familia: Suca y Germán (Sebas y Gonza), Claudia y Martín (Santi, Nico, Juli, Vero, Gaby) por el cariño, risas y por darme el empuje necesario.

*A mi papá Hugo y
abuelos Angelita y Martino,
sin ellos
nada hubiera sido posible.....*

Reconocimientos

A la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, de la Universidad Nacional de La Plata por brindarme la oportunidad de estudiar, trabajar y crecer. Por la buena predisposición de todos los que conforman esa gran familia.

Al Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE) por haberme permitido trabajar en sus instalaciones y poder realizar los ensayos, cultivos, análisis,..... y todas las tareas que fueron necesarias para desarrollar este trabajo.

A la Facultad de Ciencias Naturales y Museo, de la Universidad Nacional de La Plata, por darme la posibilidad de realizar los estudios de doctorado, por el excelente trato que siempre he recibido y la buena voluntad para solucionar inconvenientes.

*Porque has sido mi socorro,
Y así en la sombra de tus alas me regocijaré.
Salmo 63 7*

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL	5
Índice de Figuras	10
Índice de Tablas	13
RESUMEN	14
I- INTRODUCCIÓN	19
Importancia del Nitrógeno.	20
Organismos que fijan N ₂	22
Proceso de Fijación Biológica de Nitrógeno	23
Macrosimbionte: la soja. Cultivo en Argentina	25
Microsimbionte: los rizobios.....	28
Bradyrhizobium japonicum.....	30
Simbiosis bradyrizobio – soja	31
Labranzas	38
Población naturalizada y diversidad de los rizobios que nodulan soja	39
Diversificación de los rizobios	42
Inoculantes	45
Hipótesis.....	49
Objetivos	49
II- RECUESTO, AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE RIZOBIOS DE SUELOS CON HISTORIA DE CULTIVO CONOCIDA	50
INTRODUCCIÓN	51
El suelo como ambiente. Labranzas.....	52
Población de rizobios naturalizados.....	58
<i>Características y diversidad fenotípica de los rizobios</i>	59
MATERIALES Y MÉTODOS	62
1. Descripción de los suelos muestreados.....	63
1.1. Toma de muestra	65
1.2. Preparación de las muestras	66

1.3.	Determinación del peso seco y pH -----	66
2.	Recuento de los rizobios de suelos, método del NMP	66
2.1.	Preparación del inóculo -----	66
2.2.	Cultivo de plantas trampa de soja -----	67
2.3.	Sistema de cultivo de plantas-----	67
2.4.	Empleo de <i>MPN calculator</i> -----	69
3.	Aislamiento de rizobios nodulantes de soja.....	69
3.1.	Selección de nódulos -----	70
3.2.	Aislamiento de rizobios. -----	70
3.3.	Conservación de las cepas -----	70
4.	Cultivo de los aislados para las pruebas fisiológicas	70
5.	Tamaño-Consistencia de colonia	71
6.	Prueba acidificación – alcalinización	72
7.	Producción de melanina	72
8.	Tolerancia a alta temperatura.	73
9.	Tolerancia a la salinidad	73
10.	Antibiograma – Resistencia intrínseca a antibióticos	73
11.	Fenograma con características fisiológicas	74
12.	Fijación simbiótica de Nitrógeno	74
12.1	Inóculo	74
12.2	Sistema de cultivo de la plantas	74
12.3	Cosecha y tratamiento de las plantas postcosecha	75
RESULTADOS -----		76
	Determinación de humedad y pH de las muestras de suelo	77
	Recuento de los rizobios de suelos. Método del NMP	77
	Eficiencia de Infección -----	80
	Recuento de nódulos -----	81
	Aislados de los rizobios que nodulan la soja.....	82
	Caracterización fenotípica de los aislados	84

Aspecto de las colonias -----	84
Tamaño de colonia -----	85
Crecimiento de la colonia -----	87
Prueba acidificación – alcalinización-----	88
Producción de melanina -----	88
Efecto de la temperatura sobre el crecimiento -----	89
Tolerancia al NaCl en el medio de cultivo-----	90
Tolerancia a los antibióticos -----	90
Fenograma de características fisiológicas-----	91
Fijación de N ₂	95
Nodulación e impacto en el crecimiento de la soja. -----	96
DISCUSIÓN -----	103
III- CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS DE DIVERSIDAD DE LOS RIZOBIOS AISLADOS-----	112
INTRODUCCIÓN-----	113
MATERIALES Y MÉTODOS -----	123
1. Caracterización molecular	124
2. Técnicas de biología molecular.	124
2.1. Extracción de ADN.-----	124
2.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).-----	125
2.2.1 Reacción de PCR Multiplex -----	125
2.2.2 Reacción de PCR BOX A1R -----	126
2.2.3 Reacción PCR RS α -----	126
2.2.4 Amplificación y Digestión del fragmento <i>nifD</i> -----	127
2.2.5 Amplificación y secuenciación de ITS-----	127
2.3 Electroforesis en geles de agarosa-----	128
3 Diversidad genética	129
4 Selección de aislados para profundizar los estudios	130
RESULTADOS -----	131
Reacción de PCR Multiplex.....	132
Reacción de PCR BOX A1R.....	132

Análisis de los dendrogramas-----	133
Índices de diversidad en base a los dendrogramas resultantes de la amplificación de las secuencias BOX -----	138
Selección de cepas para los estudios posteriores.	138
Reacción de PCR RS α	139
Amplificación del fragmento nifD. Análisis de restricción.	140
Secuenciación de ITS (Intergenic Transcribed Spacer).....	140
DISCUSIÓN -----	144
IV- SUPERVIVENCIA DE LOS RIZOBIOS NATURALIZADOS-----	148
INTRODUCCIÓN-----	149
MATERIALES Y MÉTODOS -----	156
1. Bacterias.....	157
2. Supervivencia sobre semillas.....	157
2.1. Evaluación de la supervivencia de cepas sobre semillas de soja y nodulación ----	158
3. Síntesis de Exopolisacáridos (EPS)	158
4. Formación de biopelícula (biofilm)	159
5. Tolerancia a productos agroquímicos	160
5.1. Ensayo de tolerancia a curasemillas-----	160
5.2. Ensayo de tolerancia a glifosato -----	160
6. Producción de ácido indol acético (AIA).....	161
7. Solubilización de Fósforo (P)	161
RESULTADOS -----	162
Ensayo de supervivencia sobre semillas	163
Supervivencia y nodulación-----	168
Síntesis de Exopolisacáridos (EPS).....	169
Formación de biopelícula (biofilm).....	171
Producción de ácido indol acético (AIA).....	175
Solubilización de fósforo	175
Ensayo de tolerancia a los curasemillas	176

Ensayo de tolerancia al glifosato.....	177
DISCUSIÓN -----	179
V- CONCLUSIONES YCONSIDERACIONES FINALES -----	186
BIBLIOGRAFÍA -----	191

Índice de Figuras

Figura I- 1: Ciclo del Nitrógeno simplificado.	22
Figura I- 2: Reacción de reducción del N ₂ , catalizada por el complejo de la enzima nitrogenasa.	25
Figura I- 3: Estimación de la superficie cultivada con soja en Argentina 2014/2015.	27
Figura I- 4: Etapas de desarrollo de nódulos de leguminosas indeterminados y determinados. ...	37
Figura II- 1: Microagregado del suelo y sus componentes.	52
Figura II- 2: Implementos utilizados en la labranza convencional (LC).	54
Figura II- 3: Sembradora de Siembra directa con reja.	55
Figura II- 4: Soja sembrada por siembra directa (a la izquierda). Maíz sembrado sobre suelo trabajado con labranza convencional (a la derecha).	55
Figura II- 5: Ubicación de la localidad de Runciman, provincia de Santa Fe.	63
Figura II- 6: Secuencia de labranzas realizadas en el lote laboreado bajo labranza convencional (LC): Arado de Disco (1); luego Cincel con Rastra (2) y para cerrar Disco, Rastra de dientes y Rolo (3), de izquierda a derecha.	63
Figura II- 7: Foto aérea del establecimiento ubicado en Runciman.	65
Figura II- 8: Esquema del método de recuento del Número Más Probable de rizobios empleando plantas "trampa" de soja. Extraído de Woomer 1984.	68
Figura II- 9: <i>MPN calculator</i> ,	69
Figura II- 10: Ensayo de Fijación de N ₂ en jarras de Leonard, sustrato vermiculita y solución nutritiva Jensen (Vincent 1970).	75
Figura II- 11: NMP de rizobios. g suelo ⁻¹ , de cada una de las submuestras de suelo bajo SD y LC.	78
Figura II- 12: Log. del NMP de rizobios. g suelo ⁻¹ de las submuestras del suelo SD.	79
Figura II- 13: Log. del NMP de rizobios. g suelo ⁻¹ de las submuestras del suelo LC.	79
Figura II- 14: Plantas noduladas totales.	81
Figura II- 15: Sumatoria de los nódulos producidos en las plantas inoculadas con las diluciones de suelo (1°: dil1 a 6°: dil6).	82
Figura II- 16: Colonias de aislados creciendo sobre medio de cultivo YEM suplementado con rojo Congo. A la izquierda colonia mucosa típica, a la derecha colonia acuosa.	84
Figura II- 17: Morfología de las colonias producidas a las 168 hs de incubación, por los aislados muestra de suelo SD y LC.	85
Figura II- 18: Tamaño de colonias desarrolladas sobre medio de cultivo YEM suplementado con rojo Congo, incubadas a 28 °C durante 7 días.	85
Figura II- 19: Tamaño de las colonias producidas por los aislados de la muestra de suelo SD y LC, a las 168 hs de incubación, sobre medio de cultivo YEM con rojo Congo.	86
Figura II- 20: Porcentaje de colonias según el aspecto-tamaño.	87
Figura II- 21: Evolución del diámetro de las colonias, mediciones realizadas a los 4, 7, 9, 12 y 14 días, de incubación a 28°C.	88
Figura II- 22: Producción de melanina sobre medio TY de las cepas provenientes de suelo SD y LC.	89
Figura II- 23: Comportamiento de cepas provenientes del suelo SD y LC según su tolerancia a la incubación a 37 °C en medio agarizado YEM con rojo Congo:	89

Figura II- 24: Comportamiento de cepas provenientes de suelo LC según su tolerancia a la sal en medio agarizado YEM suplementado con 0,5 % y 2 % de NaCl.....	90
Figura II- 25: Porcentaje de aislados resistentes/sensibles a los antibióticos evaluados.....	91
Figura II- 26: Dendrograma construido con las pruebas fisiológicas de todas las cepas (SD, verdes y LC, anaranjadas) (Coeficiente Dice) con el programa PAST.3 (PAleontological SStatistics Version 3.11).	93
Figura II- 27: Componentes Principales construido con las pruebas fisiológicas de todas las cepas.	94
Figura II- 28: Raíces seleccionadas al azar de plantas inoculadas con aislados, donde se observan nódulos.	95
Figura II- 29: Análisis de regresión: PSA vs PSN de la cepa de referencia <i>B. japonicum</i> E109, obtenidos de los ensayos realizados en invernáculo y en diferentes fechas de siembra.	96
Figura II- 30: Gráfico de dispersión de los datos de PSN y PSA de cada aislado SD, expresado en porcentaje de la producción de la cepa de referencia E109 (circulo celeste).....	97
Figura II- 31: Gráfico de dispersión de los datos de PSN y PSA de cada aislado LC, expresado en porcentaje de la producción de la cepa de referencia E109 (circulo celeste).....	98
Figura II- 32: Contenido de N total de la parte aérea de plantas de soja, por el método Kjeldahl.	99
Figura II- 33: Correlación entre las variables PSN/PSA, PSN/%N, PSA/%N.....	100
Figura II- 34: Gráficos de dispersión de los datos de PSN y PSA de los aislados de la 1° y 6° dilución, de cada suelo (SD y LC), referenciados a la cepa E109.....	102
Figura III- 1: Esquema de generación de patrones de huellas digital genómica (<i>fingerprint</i>) de un organismo específico por rep-PCR.....	117
Figura III- 2: PCR Multiplex.....	132
Figura III- 3: Dendrograma de aislados del suelo SD, en base al perfil de amplificación generado con secuencias BOX, empleando el algoritmo UPGMA y el coeficiente Dice 2 %.	134
Figura III- 4: Dendrograma de aislados del suelo LC, en base al perfil de amplificación generado con secuencias BOX, empleando el algoritmo UPGMA y el coeficiente Dice 2 %.	136
Figura III- 5: Dendrograma generado en base a la amplificación de las secuencias BOX de la totalidad de los aislados, junto con las cepas de referencia:.....	137
Figura III- 6: Índice de Shannon, Margalef y Pielou de los rizobios aislados.	138
Figura III- 7: Amplificación de la región RS α en distintos aislados y controles.	139
Figura III- 8: Amplificación y restricción del gen <i>nifD</i>	140
Figura III- 9: Amplificación del fragmento ITS 16S-23S (1289 pb).	141
Figura III- 10: Dendrograma basado en las secuencias ITS de los aislados, junto con cepas de referencia.	142
Figura III- 11: Porcentaje de cepas identificadas por la secuenciación del fragmento ITS, en cada uno de los suelos bajo SD y LC.....	143
Figura IV- 1: Estructura primaria de EPS de los rizobios <i>B. japonicum</i> (izquierda) y <i>B. elkanii</i> (derecha):	152
Figura IV- 2: Fórmula química del glifosato ((isopropilamina de N-fosfometilglicina).	154

Figura IV- 3: Ensayo de Supervivencia de rizobios sobre semilla.....	163
Figura IV- 4: Conformación de tres grupos de aislados según la Supervivencia:.....	165
Figura IV- 5: Log ₁₀ del Porcentaje de recuperación de rizobios SD supervivientes (%RFP), recuperados de las semillas de soja inoculadas, en cada tiempo de muestreo: 168 hs, 432 hs y 504 hs.....	166
Figura IV- 6: Log ₁₀ del Porcentaje de recuperación de rizobios LC supervivientes (%RFP), recuperados de las semillas de soja inoculadas, en cada tiempo de muestreo: 168 hs, 432 hs y 504 hs.....	167
Figura IV- 7: Número de aislados según la producción de nódulos en plantas de soja, respecto a la cepa de referencia <i>B. japonicum</i> E109.	169
Figura IV- 8: Evaluación colorimétrica de la producción de EPS, por el método de Antrona. ..	169
Figura IV- 9: Log ₁₀ de la Producción de EPS (ppm de glucosa .10 ⁸ bacterias) de las cepas SD (arriba) y LC (abajo), evaluado por el método Antrona, cultivadas en medio de cultivo YEM durante 7 días.....	170
Figura IV- 10: Producción de Biofilm en placa de ELISA.	171
Figura IV- 11: Producción de Biofilm como DO560nm / DO630 nm, cepas SD (arriba) y LC (abajo). Se presentan los aislados con valores mayores a 0.04.	172
Figura IV- 12: Vectores de las variables consideradas para realizar el Análisis de Componentes Principales:	173
Figura IV- 13: Análisis de componentes principales de las variables Supervivencia sobre semilla a las 504 hs, Infectividad a los 28 días ddi., formación de Biopelícula y producción de EPS....	174
Figura IV- 14: Producción de AIA en placas de Petri.....	175
Figura IV- 15: Placa con medio de cultivo MMSFCP-Mg (Mendoza Paredes 2010).	176
Figura IV- 16: Ensayo de tolerancia a agroquímicos.	176
Figura IV- 17: Porcentaje de desarrollo de los aislados en medio conteniendo glifosato relativo a su control (medio YEM).....	177
Figura IV- 18: Porcentaje de aislados, SD o LC, según el efecto del glifosato en el medio de cultivo: estimulante, inhibitorio o sin efecto en el desarrollo.....	178

Índice de Tablas

Tabla 1: Taxonomía de fijadores de N ₂ simbióticos, huéspedes y sitio de aislamiento.	29
Tabla 2: Principales diferencias entre los géneros de rizobios que nodulan soja (Garrity et al. 2005).	31
Tabla 3: Principales diferencias entre labranza convencional y siembra directa.	57
Tabla 4: Historia de los lotes muestreados	64
Tabla 5: Análisis de los suelos muestreados, valores promedios de las submuestras de cada uno, SD y LC.	65
Tabla 6: Cepas empleadas como controles en las distintas pruebas fisiológicas. (INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria; EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria).	71
Tabla 7: Contenido de antibióticos en los monodiscos empleados en el ensayo de resistencia-sensibilidad	74
Tabla 8: Condiciones de humedad (%) y pH de las submuestras de suelo.	77
Tabla 9: NMP de rizobios en el suelo bajo SD y LC.	77
Tabla 10: Denominación de los aislados de nódulos de plantas de soja, según la submuestra de origen.	83
Tabla 11: Cebadores empleados en cada reacción de PCR.	129
Tabla 12: Programa de las reacciones de PCR.	129
Tabla 13: Aislados seleccionados para continuar con la caracterización molecular, 26 de la muestra de suelo SD y 26 de la muestra LC, discriminados según la dilución de suelo de donde se obtuvieron.	139
Tabla 14: Tiempos de muestreo en el ensayo de Supervivencia sobre semillas de soja.	158
Tabla 15: Tratamientos del ensayo de tolerancia a Agroquímicos.	160
Tabla 16: Porcentaje de cepas según la supervivencia (% RFP) sobre semillas de soja.	164

RESUMEN

Las labores culturales, provocan modificaciones de las propiedades físicas, químicas y biológicas de los suelos. Estas se clasifican en: labranza convencional, labranza vertical y siembra directa. Cada tecnología de manejo genera estreses a los que las poblaciones microbianas se adaptan, como resultado de cambios morfológicos, fisiológicos y genéticos.

La inoculación de la soja (*Glycine max* [L.] Merr) es una tecnología que se introdujo en la Argentina junto con el cultivo y por ello los inoculantes fueron el vehículo de ingreso de las cepas exóticas de *Bradyrhizobium*, que una vez incorporadas al suelo, se adaptaron y establecieron dando origen a las poblaciones de rizobios naturalizadas. Lo que condujo a generar diversidad a nivel del genoma de los bradyrizobios.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la diversidad de los simbioses de soja que se encuentran en la población del suelo y el rol que cumple como recurso en la selección de cepas para la producción comercial de inoculantes.

Se evaluaron dos muestras de suelo que durante los últimos 8 años fueron trabajados con siembra directa (SD) y con labranza convencional (LC). Se realizó el recuento y aislamiento de rizobios. Los aislados se caracterizaron fisiológica y genéticamente. La diversidad se evaluó mediante la amplificación de las secuencias BOX A1R. Se seleccionaron 52 aislados que se identificaron amplificando las regiones *RSa* y *nifD* y la secuenciación del fragmento *ITS 16S - 23S rDNA*.

El recuento de rizobios mostró que en el suelo bajo SD y antecesor soja la población fue mayor que en la muestra de suelo bajo LC y antecesor maíz. La caracterización fisiológica de 200 aislados reflejó que los suelos LC contuvieron un mayor número de cepas tolerantes a salinidad y alta temperatura. Además un porcentaje mayor de aislados del suelo LC, respecto del suelo bajo SD, resultó con capacidad de sobrevivencia sobre semilla superior a la cepa control E109. Los aislados además presentaron diferencias en la nodulación y fijación de nitrógeno, en la tolerancia a glifosato y en la producción de ácido indol acético (AIA). Sólo un aislado mostró capacidad de solubilización de fósforo.

El análisis del dendrograma generado con los *fingerprints* BOX A1R, mostró que hay mayor diversidad en los suelos bajo SD.

Sobre los 52 aislados analizados en base a la secuencia del ITS se encontró que el 70 % son *Bradyrhizobium japonicum* y 30 % *B. elkanii*. Se identificaron 4 aislados que comparten características genéticas de ambas especies de *Bradyrhizobium*.

En esta tesis se confirmó que en los suelos con historia de cultivo de soja, manejados bajo distintos sistemas de labranzas, se indujeron cambios a nivel del genoma de las cepas de rizobios que contribuyó a modificar la diversidad de la población.

Las poblaciones naturalizadas son un recurso para la identificación de rizobios con características superiores para la fabricación de inoculantes, sin embargo es necesario profundizar las evaluaciones de la supervivencia, tolerancia, competitividad y promoción del crecimiento vegetal de rizobios naturalizados para emplearlos como bioinoculantes.

SUMMARY

Soil management like conventional tillage, vertical tillage and zero tillage provoke modifications of the physical, chemical and biological characteristics of soils. Each of these technologies generates a stress and soil microbial populations adapt themselves in order to survive and as a result of this morphological, physiological as well as changes at the genome level occur.

Soybean (*Glycine max* [L.] Merrr) inoculation is a technology that was introduced in Argentina together with the crop and because of this imported inoculants was the vehicle used to introduce exotic *Bradyrhizobium* strains to the soils, that latter adapted and established originating in this way populations of allocthonous bradyrhizobia, such process gave rise to diverse organisms at the genetic level.

The purpose of this work was to evaluate the level of diversity of the autochthonous populations of soybean symbionts and their potential role as source of isolates to produce commercial inoculants.

We evaluated soil samples collected from soils that over the last 8 years were manage one with zero tillage and the other one with conventional tillage. We estimated by the most probable number the number of rhizobia, which were isolated and characterized physiologically as well as genetically. Diversity was evaluated by means of the BOX A1R marker. I selected 52 strains that were identified by amplifying *RS α* , *nifD* and the sequence of the *16S rDNA-23S rDNA* ITS.

Soils managed with zero tillage that were cultivated with soybean contained more rhizobia than soils under conventional tillage cultivated with maize. The physiologic characterization of 200 isolates showed that conventional tillage managed soils contained a higher number of isolates that tolerated salt stress and high temperature. In addition to this conventional tillage soils contained a higher percentage of isolates with a higher capacity of survival than zero tillage soils. Whether isolated from one soil or the other, rhizobia differed in their ability to nodulate and fix nitrogen, tolerate glyphosate and produce IAA. Among the 200 isolates, only one solubilized P.

Among 52 isolates whose ITS sequence was analyzed, 70 % were *Bradyrhizobium japonicum* and 30 % *Bradyrhizobium elkanii*. Three isolates presented genetic characteristics of both *B. elkanii* and *B. japonicum*.

In this thesis it was confirmed that in soils with a history of soybean cultivation, soil management, induced changes at the genome of strains of rhizobia that contributed to population diversity.

Naturalized populations of rhizobia are a source for the identification and isolation of rhizobia with improved symbiotic ability to formulate commercial inoculants. However, it is necessary to make thorough studies aimed at evaluating survival, tolerance to stress, competitive ability and plant growth promotion by native rhizobia so that they can be used to formulate bioinoculants.

“Son cosas chiquitas. No acaban con la pobreza, no nos sacan del subdesarrollo, no socializan los medios de producción y de cambio, no expropián las cuevas de Alí Babá. Pero quizá desencadenen la alegría de hacer, y la traduzcan en actos. Y al fin y al cabo, actuar sobre la realidad y cambiarla, aunque sea un poquito, es la única manera de probar que la realidad es transformable”

Eduardo Galeano

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Importancia del Nitrógeno.

El nitrógeno (N) es el sexto elemento más abundante en nuestro sistema solar, después del hidrógeno (H), helio (He), oxígeno (O), carbono (C) y neón (Ne). Cumple un rol clave en la conformación estructural de las células así como en el metabolismo celular, debido a que forma parte de los dos polímeros más importantes de la vida: las proteínas y los ácidos nucleicos (Graham & Vance 2000; Canfield et al. 2010). A pesar de que constituye alrededor del 80 % de la atmósfera, frecuentemente limita el crecimiento y desarrollo de los organismos productores primarios tanto en los ecosistemas marinos como terrestres. Esto se debe a que se encuentra en la forma de nitrógeno molecular (N_2), que es prácticamente inerte y no disponible para la mayoría de los seres vivos. Para que el N_2 atmosférico sea asimilado es necesario que se modifique su estado de oxidación, ello requiere una cantidad de energía para romper el triple enlace de la molécula, de modo que los átomos de N puedan unirse a esqueletos carbonados. Muy pocos organismos tienen la capacidad para realizar la *fijación biológica de Nitrógeno* (FBN), proceso que es de gran importancia ecológica por el aporte de N que representa para la biota.

En el ciclo biogeoquímico del N, el elemento sufre diferentes procesos de reducción-oxidación (redox), algunos de los cuales son mediados por microorganismos (Falkowski 1997) que actúan como sucesiones microbianas generando cadenas tróficas, ya que la actividad de unos aumenta la disponibilidad de distintos nutrientes para otros seres vivos (Bru et al. 2011). Además, el N está sujeto, en menor medida, a transformaciones de largo plazo que se producen a nivel de la geósfera (Berner 2006). Debido a la acción de los microorganismos y en menor grado a procesos fisicoquímicos (como ocurre en las tormentas eléctricas), el N_2 es reducido y así pasa a constituir parte de la materia orgánica que se encuentra en el suelo y agua, de manera que se lo puede encontrar por ejemplo en moléculas orgánicas como quitina, proteínas, peptidoglucano y también, en menor proporción, constituyendo moléculas inorgánicas (NO_3^- , NO_2^- y NH_4^+). La microbiota del suelo cumple un papel fundamental en la transformación de la materia orgánica, a través del proceso de *mineralización*, oxidando los compuestos que contienen N en primer lugar a amonio (*amonificación*) y luego a nitrito y nitrato (*nitrificación*) (Galloway et al. 2004). Sin embargo es importante destacar que el contenido de N inorgánico del suelo, suele ser inestable. El NO_3^- , es soluble en agua y debido a esto es lixiviado a las napas, hecho que genera su contaminación. También, en condiciones de hipoxia, como resultado de la respiración anaeróbica de ciertos microorganismos (proceso de *desnitrificación*) el N se reduce y se pierde del suelo en forma de N gaseoso (NO_x). Alternativamente, el NH_4^+ se volatiliza o se adsorbe al complejo

coloidal de las arcillas. Por último, distintos compuestos nitrogenados presentes en la solución del suelo, pueden ser asimilados por los vegetales o por las células microbianas (*inmovilización*) (Galloway et al. 2004). Es decir, que las plantas para su crecimiento y desarrollo pueden utilizar el N a partir de compuestos inorgánicos de nitrógeno combinado (NO_3^- y NH_4^+), y/o el N_2 atmosférico mediante la FBN (Fig. I-1).

La tasa global de fijación de N_2 en el planeta es de unos 413 millones de toneladas de $\text{N}\cdot\text{año}^{-1}$ (Fowler et al. 2013). La FBN, incluye la fijación biológica terrestre y acuática, procesos que son responsables de alrededor del 60% de la cifra anterior (Galloway et al. 2004; Gruber & Galloway 2008; Canfield et al. 2010). Sin embargo, en los últimos años, la magnitud de las contribuciones humanas a la fijación anual total de N molecular a formas reactivas ya es comparable con la fijación natural. El hombre con su intervención aporta N al sistema dentro de tres áreas: mediante la fijación industrial (principalmente para la producción de fertilizantes nitrogenados por el método Haber-Bosch) con 120 millones de toneladas de $\text{N}\cdot\text{año}^{-1}$, por la utilización de combustibles fósiles con 30 millones de toneladas de $\text{N}\cdot\text{año}^{-1}$ y debido a la fijación biológica asociada a la agricultura (principalmente en cultivos de leguminosas) con 60 millones de toneladas de $\text{N}\cdot\text{año}^{-1}$ (Galloway et al. 2004; Fowler et al. 2013) (Fig. I-1).

El uso masivo de productos químicos en la agricultura, especialmente el uso en exceso de fertilizantes nitrogenados, genera problemas climáticos, de la salud humana y de funcionamiento del ecosistema (Gruber & Galloway 2008; Power 2010; Canfield et al. 2010). Algunos de ellos son la contaminación de aguas por nitratos, nitritos, nitrosaminas, la eutrofización de ecosistemas acuáticos por el crecimiento excesivo de cianobacterias, la destrucción de la capa de ozono y efecto invernadero por la liberación a la atmósfera de óxidos de nitrógeno, y la metahemoglobinemia, que es un trastorno de la sangre donde la hemoglobina no transporta oxígeno a los tejidos corporales.

A diferencia de la agricultura convencional, el concepto de agricultura sostenible, consiste en producir alimentos en un marco económicamente viable (rendimiento sostenido) sin comprometer el futuro de los recursos productivos y del medio ambiente. En este contexto adquieren gran importancia los inoculantes microbianos, como alternativa respetuosa del medio ambiente. La existencia de un equilibrio en el ciclo del nitrógeno es fundamental para la vida en la tierra y esto conlleva al mantenimiento de los ecosistemas microbianos terrestres y acuáticos.

Los efectos benéficos de la FBN se conocen desde hace mucho tiempo, en la antigüedad se empleaban plantas pertenecientes a la familia de las leguminosas porque nutrían al suelo y mejoraban el rendimiento de los cultivos. Así también, en la América precolombina, los incas

realizaban intersembras de poroto y maíz (Mann 2006). Mucho después (siglo XIX) se demostró que la actividad de bacterias que interactuaban específicamente con las raíces de las leguminosas generaba la capacidad de la FBN, aportando N al suelo que queda a disposición de los cultivos sucesivos (Leigh 2004).

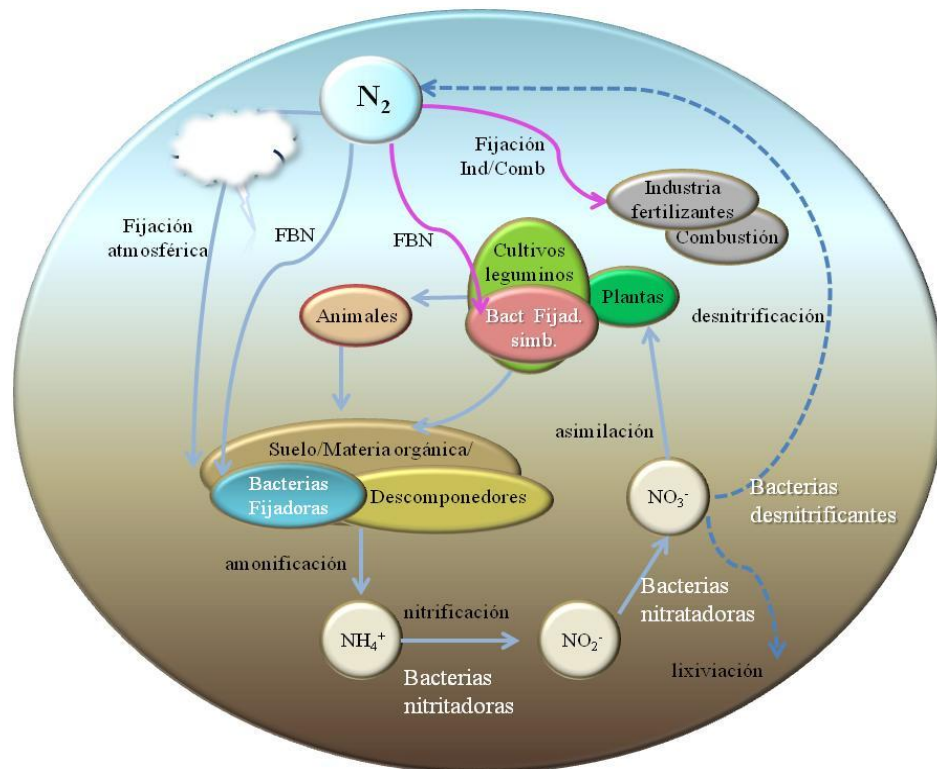


Figura I- 1: Ciclo del Nitrógeno simplificado.

Las flechas violetas indican intervención antropica: FBN de cultivos, Fijación industrial (Haber Bosch), aplicación de fertilizantes y por combustión de combustibles fósiles.

Organismos que fijan N_2

En el proceso conocido como FBN sólo algunos microorganismos, de los Dominios Bacteria y Archea, contienen las vías metabólicas a través de las cuales se reduce el nitrógeno atmosférico (N_2) a amonio, el que se incorpora a cadenas carbonadas constituyendo las moléculas orgánicas (Lloret & Martínez-Romero 2005). Es conocido que las bacterias fijadoras ó diazótrofos se hallan presentes en muy diversos ambientes tanto acuáticos como terrestres. Éstas ocupan nichos ecológicos distintos, por ejemplo algunos fijan N_2 en vida libre y otros lo hacen cuando se establece una asociación simbiótica con determinadas especies vegetales, estos últimos llamados en general “rizobios”.

Los diazótrofos de vida libre suelen ser quimiótrofos o fotótrofos, e incluyen bacterias anaerobias, aerobias y microaerófilas (Parro & Moreno-Paz 2004; Olivares 2006). Algunas de estas bacterias fijadoras son endofíticas, viven en los espacios intercelulares de la raíz de la planta hospedadora como es el caso de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, que se asocia a la

caña de azúcar (Muñoz-Rojas & Caballero-Mellado 2003). *Azospirillum* spp con frecuencia se encuentra en la raíces de muchas gramíneas (Dobbelaere et al. 2001). Recientemente, se ha descrito por primera vez la asociación endofítica entre *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, endosimbionte del trébol y las raíces de arroz (Yanni et al. 1997). Se han aislado también cepas de rizobios del interior de plantas, incluyendo el xilema de raíces de trigo (Matiru & Dakora 2004), maíz (Gutierrez-Zamora & Martinez-Romero 2001), sorgo y de otras no leguminosas (Yanni et al. 2001; Chi et al. 2005). Si bien el impacto de estas interacciones no se conoce, resulta muy interesante el estudio de las combinaciones rizobios/cereales como estrategia para el desarrollo de biofertilizantes para la agricultura sostenible que podría aumentar los rendimientos y la producción (Yanni et al. 2001; Dobbelaere et al. 2001; Matiru & Dakora 2004).

Otro grupo de microorganismos que establece simbiosis son las cianobacterias fijadoras del género *Anabaena* con el helecho *Azolla*, que está ampliamente distribuida en aguas dulces templadas y tropicales donde se cultiva el arroz. Esta interacción realiza un aporte clave para el cultivo de arroz (Peters & Meeks 1989). De la misma manera, los actinomicetes del género *Frankia* establecen simbiosis con un grupo de especies arbóreas xerofíticas, formando las llamadas actinorrizas, que aportan N a los sistemas forestales, que desarrollan y recuperan suelos pobres (Igual et al. 2006). Sin embargo, entre todos los sistemas conocidos que fijan nitrógeno, la simbiosis que se establece entre las leguminosas (Fabaceae) y las bacterias conocidas comúnmente como rizobios es la más estudiada y aquella en la que mayor desarrollo tecnológico se ha alcanzado, debido a su importancia agronómica, económica y social (Velazquez et al. 2010; Somasegaran & Hoben 2012). Los rizobios, como resultado de esta asociación, inducen en las raíces la formación de estructuras llamadas nódulos, en donde fijan el N₂ del aire (Jordan 1984; Willems 2006).

Proceso de Fijación Biológica de Nitrógeno

Los diazótrofos poseen un complejo enzimático conservado que se denomina nitrogenasa. El complejo está formado por dos metaloproteínas, una con Fe y Mo (componente I: ferromolibdoproteína o nitrogenasa propiamente dicha) y otra con Fe (componente II: ferroproteína o nitrogenasa reductasa) como grupos activos. La proteína MoFe, codificada por los genes *nifDK*, es un tetradímero ($\alpha_2\beta_2$). Contiene dos grupos activos, el cofactor homocitrato-hierro-molibdeno (FeMo co) (7Fe- 9S- Mo-x homocitrato) y el grupo (8Fe-7S) o grupo P. La proteína Fe, codificada por el gen *nifH*, es un homodímero que acepta electrones de la ferredoxina o flavodoxina y los transfiere al complejo I. Los genes que regulan la nitrogenasa

son parte de un operón complejo llamado regulón *nif*. Si bien el gen *nifH* es el más conservado muchas veces es claro que se producen recombinaciones entre los genes de dos organismos.

El mecanismo de funcionamiento de la nitrogenasa comprende cuatro pasos (Fig.I- 2) (Olivares 2006):

- 1- formación de un complejo entre la proteína Fe reducida unida a dos moléculas de ATP y la proteína MoFe;
- 2- transferencia de electrones ente las dos proteínas acoplada a la hidrólisis de ATP;
- 3- disociación de la proteína Fe acompañada por reducción e intercambio de ATP por ADP;
- 4- repetición de este ciclo hasta que se hayan acumulado los electrones necesarios (y protones) para que se produzca la reducción de los sustratos.

Los electrones de la ferredoxina (flavodoxina) con un bajo potencial reductor son transferidos a la reductasa de la nitrogenasa. Paralelamente, se produce la hidrólisis de al menos 16 moléculas de ATP (por cada molécula de N₂ que es reducida), así los electrones son transferidos a la nitrogenasa donde ocurre la reducción del dinitrógeno e H⁺ a amoníaco y gas hidrógeno, en el centro activo ocupado por el cofactor Fe-Mo (Fig. I- 2). La nitrogenasa es sensible a altas tensiones de oxígeno, por lo que requiere cierta protección, y ésta es diferente según el ambiente en el que viven los microorganismos. En el caso de los rizobios, cuando el nódulo se encuentra activo, se sintetiza una hemoproteína férrica, leghemoglobina, la cual posee alta afinidad por el oxígeno, de manera que se une reversiblemente a él, facilitando la difusión de este gas en bajas concentraciones, para la respiración de los bacteroides y que al mismo tiempo esté protegida la nitrogenasa (Wittenberg et al. 1974; Lira-ruan et al. 2000; Olivares 2006).

Cuando se produce la FBN, el amonio producido primariamente satisface las necesidades del microorganismo, el que luego ante un escenario de mayor disponibilidad excreta moléculas ricas en N o alternativamente los libera cuando muere, quedando así sustancias nitrogenadas disponibles para el crecimiento y desarrollo de otros organismos. Este proceso, que forma parte del ciclo biogeoquímico del N, es fundamental para mantener una biósfera activa (Fig.I-1).

La capacidad de fijación de nitrógeno es relativamente baja en los fijadores libres, éstos sólo aportan al suelo unos cientos de gramos de N por hectárea y por año que, si bien son suficientes en condiciones naturales, están muy lejos de satisfacer las necesidades de los suelos bajo cultivo (Olivares et al. 2013). Sin embargo, la fijación en los sistemas simbióticos es mucho más eficiente, calculándose que sólo la asociación rizobio-leguminosa puede llegar a aportar entre 100 - 300 Kg de N.ha⁻¹ al año (Herridge et al. 2008). Por ello, en general las leguminosas no se fertilizan con N para incrementar el contenido de proteínas, además contribuyen al

enriquecimiento del suelo en N, que puede ser aprovechado por cultivos asociados o por los sucesivos cultivos posteriores en una rotación (Urzúa 2005).

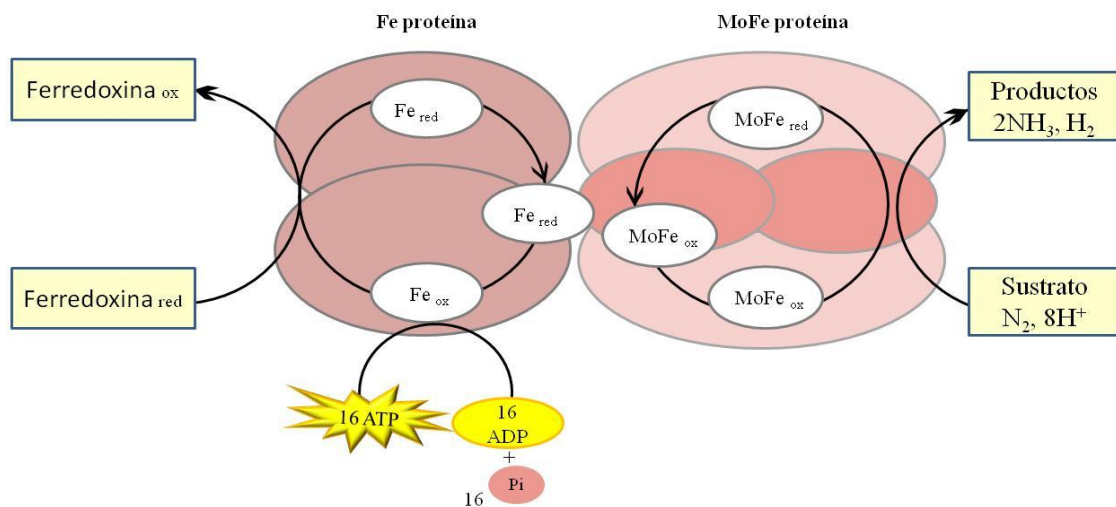


Figura I- 2: Reacción de reducción del N_2 , catalizada por el complejo de la enzima nitrogenasa.

La ferredoxina reduce la Fe proteína. El ATP se une a la Fe proteína y su hidrólisis causa cambios conformacionales que facilitan la reacción redox. La Fe proteína reduce a la MoFe proteína y ésta reduce al N_2 . Esquema adaptado de Taiz y Zeiger (2002).

Macrosimbionte: la soja. Cultivo en Argentina

Las plantas leguminosas pertenecen a la familia Fabaceae (Leguminosae), la tercera más numerosa dentro de las Angiospermas, luego de Orquidaceae y Asteraceae (Polhill & Raven 1981; Doyle & Luckow 2003). Es una familia que tiene una gran diversidad en la morfología, el hábitat y la ecología, abarcando desde plantas anuales árticas a árboles tropicales. Está formada por tres subfamilias: Caesalpinioideae, Mimosoideae y Papilionoideae, las últimas dos contienen la mayor cantidad de géneros que agrupan a las especies que establecen simbiosis con rizobios. Diversas evidencias sugieren que estas dos subfamilias son más evolucionadas ya que la relación simbiótica se desarrolló en una etapa relativamente tardía (van Rhijn & Vanderleyden 1995). La soja (*Glycine max* (L.) Merrill) pertenece a la subfamilia Papilionoideae y tiene su lugar de origen en la región de China y de la misma manera que otras leguminosas, establece simbiosis con los rizobios nativos con los que coevolucionó.

Por la importancia agronómica, económica y social que tiene el cultivo de estas plantas a escala mundial, la simbiosis rizobio-leguminosa ha sido una de las interacciones más estudiadas. La superficie cultivada con leguminosas en el mundo, está en permanente crecimiento debido a que las legumbres son un aporte nutricional tanto en la alimentación humana como en la animal y además porque la fijación de nitrógeno contribuye a una explotación agrícola sustentable. La soja constituye un alimento clave a nivel mundial debido el alto contenido de proteínas (38 %) y

aceite (18 %) de los granos. El 6 % de la tierra cultivable en el mundo está dedicado al cultivo de la soja (100 millones de há), área que es la tercera en tamaño después de los cultivos de trigo, arroz y maíz, 225 y 150 millones de há los dos últimos (Hartman et al. 2011).

Recién hacia 1970 comenzó a extenderse el cultivo de la soja en nuestro país, que fue desplazando a cultivos como el girasol, maíz, sorgo y otros, abarcando además, tierras que antes se dedicaban a la producción ganadera. Entre los factores que condujeron a estos cambios se encuentran los económico-políticos y fundamentalmente los avances tecnológicos en cuanto a la calidad de semillas (transgénicas resistentes al herbicida glifosato), disponibilidad de diversos grupos de maduración (que permiten extender el cultivo a casi todas las regiones del país), el desarrollo de manejos conservacionistas de suelo (siembra directa), que se aplicaron al cultivo de soja, reduciendo fundamentalmente los costos de producción.

En la campaña 2014/15 en la Argentina se sembraron 19,7 millones de hectáreas de soja (Fig. I-3), lo que generó una producción de 61 millones de toneladas de grano. La Argentina es el tercer productor y exportador mundial, después de USA y Brasil, y es el primer exportador de aceite de soja y el segundo exportador de harina de soja (SIIA 2016).

Los altos rendimientos de soja demandan grandes cantidades de N y otros nutrientes. La fuente más económica y ecológica de N es la FBN, se calcula en promedio que el 58 % del N que consume el cultivo puede provenir del aire, y ese porcentaje, según las condiciones del suelo, puede llegar hasta el 90 %. La eficiencia de este proceso depende de muchos factores relacionados con la planta, las bacterias, la simbiosis y el medio ambiente (González 2007; Liu et al. 2011; Salvagiotti et al. 2015).

Empleando técnicas con ^{15}N se ha encontrado que un cultivo de soja en simbiosis con rizobios fija un promedio de 153 Kg de $\text{N}\cdot\text{ha}^{-1}$. La soja debe incorporar 80 kg $\text{N}\cdot\text{ha}^{-1}$ para producir una tonelada de grano (Salvagiotti et al. 2015). Si se efectúa una estimación conservadora, que considere que en la integral de la superficie cultivada, la tasa de aporte de la FBN equivale al 50 % del N acumulado por el cultivo, ésta arroja una cifra de 1,6 millones de toneladas de N ingresadas por esta vía, valor que supera la cantidad de fertilizantes nitrogenados que se comercializa anualmente en la Argentina, que es alrededor de 1,2 millones de toneladas, equivalentes a aproximadamente 0,47 millones de toneladas de N (González 2007).

No hay duda que gran parte de la producción de soja de la Argentina se construye sobre la actividad de los rizobios del género *Bradyrhizobium*, asociados a la soja. Cuando por diversos motivos la simbiosis no es efectiva, la nodulación es pobre, que suele no estar relacionado a un bajo rendimiento, debido a que las plantas compensan la demanda extrayendo más N del suelo,

lo que conduce a su empobrecimiento. Esta forma de explotación de la reserva de N del suelo no es sostenible a lo largo del tiempo. Por ello una estrategia para conservar el N del suelo es cultivar leguminosas optimizando la fijación de N_2 . La tasa de adopción de la técnica de inoculación se puede considerar alta en nuestro país. Una encuesta realizada por empresas privadas establece que el 87 % de la soja se inocula, tanto sea de primera como de segunda y que el 94 % de los productores conoce cuáles son los beneficios de la inoculación; asimismo, pone de manifiesto que el 78 % de los productores elige los inoculantes líquidos, que dominan el mercado argentino (Lodeiro 2015).

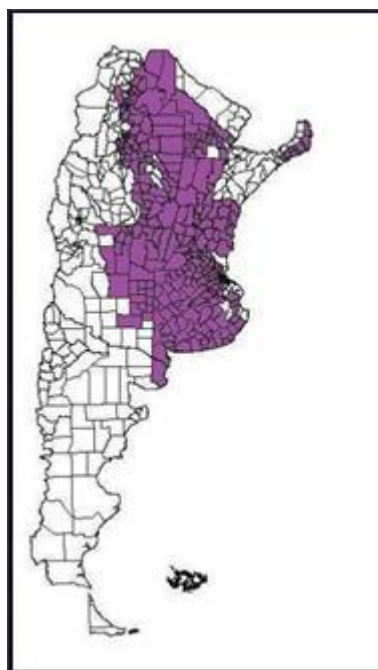


Figura I- 3: Estimación de la superficie cultivada con soja en Argentina 2014/2015. Datos Sistema Integral de Información Administrativa (SIIA) suministrados por el Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca.

Según Martínez (2010) del INTA Oliveros existen dos modelos actuales para el cultivo de soja en la Región Pampeana Norte. Uno es el Modelo Sojero, que ocupa la mayor parte de la zona, entre el 75 y 80 % del área sembrada, donde el cultivo de la soja de I^a ocupa entre el 40 y el 70 % del total. La rotación de cultivos se realiza con trigo/soja II^a, sólo en un 33 % y tiene baja a nula reposición de nutrientes, alcanzando niveles críticos de fósforo (P) para soja o inferiores en amplias zonas. Presenta bajos rendimientos relativos en lento incremento y enmalezamiento con crecientes problemas de compactación. El otro sistema de producción es el Modelo Balanceado, que ocupa como máximo el 25 % de la zona. La superficie dedicada al cultivo de maíz y trigo/soja II^a, es igual o mayor al 50 %. El cultivo de soja de I^a es intercalado entre los anteriores, inclusive maíz-trigo/soja II^a sin soja de I^a. Presenta una tendencia a alcanzar niveles

de reposición de nutrientes adecuados, manteniendo niveles de P superiores a 15-18 ppm de P extractable (método Bray). Presenta rendimientos relativos altos y estables, improbables problemas de malezas y despreciables problemas de compactación.

Microsimbionte: los rizobios.

Los rizobios (del griego *rizo*= raíz y *bios*=vida) son bacterias Gram (-) móviles que habitan el suelo, y tienen forma de bacilo. Este término incluye un grupo heterogéneo de microorganismos que tienen en común la capacidad de sintetizar una enzima nitrogenasa, que reduce el N atmosférico (N₂) y lo convierte en amonio (Jordan 1984; Graham 2008).

Los rizobios que nodulan la soja pertenecen a varios géneros diferentes, *Bradyrhizobium* (*B. canariense*, *B. daqingense*, *B. elkanii*, *B. japonicum*, *B. liaoningense*, *B. yuanmingense*, *B. diazoefficiens*) (Yao et al. 2002; Delamuta et al. 2013; López et al. 2013), *Ensifer* (*E. fredii*, *E. sojae*, *E. xinjiangense*) (Chen et al. 1988), *Mesorhizobium tianshanense* (Chen 1995) y *Rhizobium tropici* (Hungria et al. 2006). Estas bacterias simbiotas se ubican en varias familias dentro del orden Rhizobiales (Kuykendall 2005), que es un conjunto con características fenotípicas y moleculares muy distintas, cuyo agrupamiento se basa únicamente en el análisis de la secuencia del gen *16S rADN* (Tabla 1).

Tabla 1: Taxonomía de fijadores de N₂ simbióticos, huéspedes y sitio de aislamiento.

	Género	Cepa tipo	Hospedador de aislamiento	Lugar de aislamiento
Clase α-Proteobacteria				
Orden Rhizobiales				
		<i>R. etli</i> CFN 42T	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Guanajuato México
		<i>R. galegae</i> HAMB1 540T	<i>Galega orientalis</i>	Finlandia
		<i>R. gallicum</i> R602spT	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Maine et Loire, Francia
		<i>R. giardinii</i> H152T	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Côte d'Or, Francia
		<i>R. hainanense</i> CCBAU 57015T	<i>Desmodium sinuatum</i>	Hainan, China
		<i>R. huautlense</i> LMG 18254T	<i>Sesbania herbacea</i>	Sierra de Huautla, Morelos, México
	<i>Rhizobium</i> *	<i>R. indigoferae</i> CCBAU 71042 T.	<i>Indigofera spp</i>	Meseta de Loess, noroeste de China
		<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> USDA. 2370T	<i>Vicia faba</i>	
		<i>R. loessense</i> CCBAU 7190BT	<i>Astragalus complanatus</i>	Meseta de Loess, China
		<i>R. mongolense</i> USDA 1844T	<i>Medicago ruthenica</i>	Mongolia
		<i>R. tropici</i> CIAT 899T	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Colombia
		<i>R. undicola</i> ORS 992 T	<i>Neptunia natans</i>	Senegal, África
		<i>R. yanglingense</i> CCBAU 71623T	<i>Gueldenstaedtia multijflora</i>	Gansu, Noroeste de China
		<i>S. adhaerens</i> ATCC 33212T		Pensilvania, E.U.A.
		<i>S. americanum</i> CFNEI156T	<i>Acacia acatzensis</i>	Sierra de Huautla, Morelos, México
		<i>S. arboris</i> HAMB1 1552T	<i>Prosopis chilensis</i>	Sudán, África
		<i>S. fredii</i> USDA 205T	<i>Glycine soja</i>	Honan, China
		<i>S. kostiense</i> HAMB1 1489T	<i>Acacia senegal</i>	Sudán, África
	<i>Sinorhizobium (Ensifer)</i> *	<i>S. kummerowiae</i> CCBAU 71714T	<i>Kummerowia stipulacea</i>	Meseta de Loess, China
		<i>S. medicae</i> USDA 1037T	<i>Medicago truncatula</i>	Francia
		<i>S. meliloti</i> USDA1002T	<i>Medicago sativa</i>	
		<i>S. morelense</i> LMG 21331T	<i>Leucaena leucocephala</i>	Sierra de Huautla, Morelos, México
		<i>S. saheli</i> ORS 609T	<i>Sesbania cannabina</i>	Senegal, África
		<i>S. teranga</i> ORS 1009T	<i>Acacia laeta</i>	Senegal, África
		<i>S. xinjiangense</i> CCBAU110T	<i>Glycine max</i>	Xinjiang, China
	<i>Shinella</i> *	<i>S. kummerowiae</i>	Kummerobia	
		<i>M. amorphae</i> LMG 18977T	<i>Amorpha fruticosa</i>	China
		<i>M. chacoense</i> PR5T	<i>Prosopis alba</i>	Chancaní Argentina
		<i>M. ciceri</i> USDA 3383T	<i>Cicer arietinum</i>	España
		<i>M. huakuii</i> CCBAU 2609T	<i>Astragalus sinicus</i>	Nanjing, China
		<i>M. loti</i> USDA 3471T	<i>Lotus tenuis</i>	Nueva Zelanda
	<i>Mesorhizobium</i> *	<i>M. mediterraneum</i> USDA. 3392T	<i>Cicer arietinum</i>	España
		<i>M. plurifarum</i> ORS1032T	<i>Acacia senegal</i>	Senegal, África
		<i>M. septentrionale</i> SDW014T	<i>Astragalus adsurgens</i>	Norte de China
		<i>M. temperatum</i> SDW018T	<i>Astragalus adsurgens</i>	Norte de China
		<i>M. tianshanense</i> CCBAU3306T	<i>Glyzyrrhiza pallidiflora</i>	Xinjinang, China
	<i>Phyllobacterium</i>	<i>P. trifolii</i>	<i>Trifolium</i>	
	<i>Blastobacter</i>	<i>B. denitrificans</i>	<i>Aeschynomene</i>	
		<i>B. betae</i> PL7HG1	<i>Beta vulgaris</i>	España
		<i>B. canariense</i> BTA-1	<i>Chamaecytisus proliferus</i>	
		<i>B. elkanii</i> USDA76T	<i>Glycine max</i>	Maryland, U.S.A.
	<i>Bradyrhizobium</i> *	<i>B. japonicum</i> USDA6T	<i>Glycine max</i>	Japón
		<i>B. liaoningense</i> USDA3622T	<i>Glycine max</i>	Heilongjiang, China
		<i>B. yuanmingense</i> CCBAU 1071T	<i>Lespedeza cuneata</i>	Yuanmingyuan, Pekin, China
	<i>Azorhizobium</i> *	<i>A. caulinodans</i> ORS57 1	<i>Sesbania rostrata</i>	Senegal, África
	<i>Devosia</i>	<i>D. neptuniae</i> J1T	<i>Neptunia natans</i>	India
	<i>Methyllobacterium</i>	<i>M. nodulans</i> ORS2060T	<i>Crotalaria pocarpa</i>	Senegal, África
	<i>Ochrobactrum</i>	<i>O. cytisi</i>	<i>Cytisus</i>	
		<i>O. lupini</i>	<i>Lupinus albus</i>	
Clase β-Proteobacteria				
Orden Burkholderiales				
	<i>Cupriavidus</i>	<i>C. taiwanensis</i> LMG 19424T	<i>Mimosa pudica</i>	Taiwan, China
		<i>B. tuberum</i> STM 678T	<i>Aspalathus camosa</i>	Sudáfrica
		<i>B. sabiae</i>	<i>Mimosa</i>	
	<i>Burkholderia</i>	<i>B. phymatum</i> STM815T	<i>Machaearium lunatum</i>	Guayana Francesa
		<i>B. cepacia</i> complex	<i>Dalbergia</i>	
		<i>B. mimosarum</i>	<i>Mimosa</i>	
		<i>B. nodosa</i>	<i>Mimosa</i>	

Bradyrhizobium japonicum.

El género *Bradyrhizobium* está constituido por bacilos Gram (-), de un tamaño entre 0,5-0,9 x 1,2-3,0 μm , no forman esporas, son móviles por poseer un flagelo polar o subpolar, y son aeróbicos. Por lo general, contienen gránulos de poli- β -hidroxibutirato. Se desarrolla en forma adecuada dentro de los 25-30 °C y a pH 6-7. Son bacterias quimioorganótrofas, que pueden utilizar una amplia variedad de hidratos de carbono y sales de ácidos orgánicos como fuentes de carbono, sin producción de gas. En el medio de cultivo, las células jóvenes de bradyrizobios se observan como bastones cortos, pero las células de más edad o en condiciones de crecimiento adversas, tales como bajas concentraciones de calcio o de magnesio, se presentan comúnmente pleomórficas (forma hinchada y alargada). Al igual que *Rhizobium*, las cepas de *Bradyrhizobium* no absorben el rojo Congo (concentración final 0,0025 %) cuando este se adiciona al medio YEM (*Yeast Extract Mannitol*), en donde las colonias son circulares, opacas, convexas, de color blanco o rosa y tienden a ser de textura granular, mientras que la mayoría de las bacterias del suelo desarrollan colonias de color rojo. Los tiempos de generación varían entre 9 a 18 hs, según las especies, por lo que las colonias no exceden de 1,0 mm de diámetro luego de 5-6 días de incubación a 30 °C. Cuando se cultivan in vitro en medios sintéticos producen reacción alcalina y liberan al medio polisacáridos extracelulares solubles en agua.

Algunas cepas crecen quimiolitotróficamente en presencia de H_2 , CO_2 y a bajos niveles de O_2 . Como fuentes de nitrógeno utilizan sales de amonio, nitratos y algunos aminoácidos. En general, las cepas de *Bradyrhizobium* no crecen en medios que contienen 2 % de NaCl. Tienen la capacidad de realizar el proceso de desnitrificación. Por otro lado cepas, especialmente de *B. elkanii*, fijan nitrógeno en vida libre en condiciones especiales, como medios que contienen fuentes de carbono seleccionadas y un bajo nivel de oxígeno (Kuykendall 2005).

B. japonicum es resistente a trimetoprima (50 mg/L) y a vancomicina (100 mg/L) pero a diferencia de *B. elkanii* es sensible al ácido nalidíxico (50 mg/L), tetraciclina (100 mg/L), estreptomina (100 mg/L), eritromicina (250 mg/L), cloramfenicol (500 mg/L), rifampicina (500 mg/L) y carbenicilina (500 mg/L).

Las especies de bradyrizobios normalmente forman nódulos en las raíces de *Glycine* (soja) y *Macroptilium atropurpureum* (siratiro), donde se comportan como fijadores de nitrógeno. Dentro de los nódulos de la raíz, los bacteroides suelen presentar forma de “Y” ligeramente hinchada no ramificada o como bacilos de mayor tamaño, además contienen inclusiones de polifosfato y poli- β -hidroxibutirato. Algunas cepas tienen actividad hidrogenasa, esto hace que la fijación de

nitrógeno sea más eficiente. Los bacteroides de los nódulos, cuando se siembran en medios de cultivo suelen dar origen a una colonia, lo que sugiere que son viables.

El género *Bradyrhizobium* tiene cierta complejidad en lo que hace a su constitución habiéndose identificado nuevas especies de organismos que interactúan con diversas plantas. Koppell & Parker (2012) sugirieron que la promiscuidad parece ser una característica de los integrantes del género *Bradyrhizobium*. Estas bacterias pertenecen a la familia Bradyrhizobiaceae, que es fenotípica, metabólica y ecológicamente diversa. Esta familia, incluye además de organismos que fijan N₂, organismos fotosintetizadores, con respiración aerobia y/o anaerobia y también bacterias que son patógenos humanos (Garrity et al. 2005).

Como ejemplo de la diversidad de rizobios que son capaces de establecer simbiosis con la soja se presenta un cuadro comparativo, con algunas de sus características (Tabla 2).

Tabla 2: Principales diferencias entre los géneros de rizobios que nodulan soja (Garrity et al. 2005).

	<i>Ensifer fredii</i>	<i>Mesorhizobium tianshanense</i>	<i>Rhizobium tropici</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
Flagelos	Polar o subpolar, ó 1-3 peritrico	Polar o subpolar, peritico	Peritico o subpolar	Peritico o subpolar
Velocidad de crecimiento	Relativamente rápido	Moderadamente lento a lento	Relativamente rápido	Moderadamente lento a lento
Tiempo de duplicación	< 6 hs	> 8 hs (5-15 hs)	1,6-2 hs	> 8 hs (9-18 hs)
Colonias en mm (días)	2-4 (3 a 5)	1-2 (5 a 7)	2-4 (2 a 4)	1 (5 a 6)
Rango de T° de crecimiento	10 a 35 °C (óptimo 25-30 °C)	4 a 37 °C (óptimo 25-30 °C)	4 a 40 °C (óptimo 20-28 °C)	Hasta 35 °C (óptimo 25-30 °C)
Rango de pH	5-10,5 (óptimo 6-8)	6-8 (no des. en pH ác)	4-10 (optimo pH ác-neutro)	4,5-9 (óptimo 6-7)
Crecimiento con NaCl 1 %	+	+	-	-
Reacción en YEM	ácido	ácido	ácido	alcalino
Plásmido simbiótico	posee	posee	posee	no posee

Simbiosis bradyrizobio – soja

Los rizobios no disponen de mecanismos propios que les permitan crear un ambiente anaeróbico o microaerófilo (a diferencia de otras proteobacterias, como las cianobacterias y las bacterias pertenecientes al género *Frankia*) para que ocurra la fijación de N₂. Se cree que algunos linajes de las bacterias coevolucionaron conjuntamente con las angiospermas estableciendo las bases moleculares de una relación de simbiosis mutualista (Lloret & Martínez-Romero 2005). En el caso de los rizobios, el nitrógeno es fijado dentro de estructuras especializadas, los nódulos,

que se desarrollan en la raíz o raramente en el tallo de las leguminosas. En el interior de los nódulos, los rizobios se diferencian en bacteroides, los cuales están rodeados por una membrana y de esta manera conforman el simbiosoma, que es donde ocurre el proceso de FBN.

Un nódulo es una estructura única y organizada que se desarrolla como resultado de una compleja secuencia de interacciones a nivel molecular entre los rizobios y las leguminosas. La relación entre ambos se puede calificar como rizoendosimbiosis mutualista estricta, ya que, aunque la planta y las bacterias pueden vivir en forma independiente, sólo la interacción, que tiene una marcada especificidad, genera beneficios para cada parte involucrada.

Si bien el establecimiento de la simbiosis sigue una secuencia de pasos, estos pueden agruparse en tres etapas claves que generan características simbióticas:

- Especificidad: interacción específica a nivel molecular entre una bacteria o grupo con un conjunto de plantas, de forma que el rizobio se adhiera a la raíz e induzca en ella la diferenciación del primordio nodular y la deformación del pelo radical.
- Infectividad: proceso en el que los rizobios penetran en el tejido radical de la planta hospedadora por medio de un canal de infección que llega al nódulo, en donde se liberan los rizobios.
- Efectividad: la actividad propia de los bacteroides para reducir el nitrógeno atmosférico (N_2) a amonio en el interior del nódulo.

En las etapas tempranas de la interacción, tanto el macro como el microsimbionte han desarrollado un complejo mecanismo de intercambio de señales moleculares que les permiten reconocerse específicamente, para luego desencadenar el denominado proceso de infección. Varios son los procesos y/o sustancias involucradas en esta primera etapa, entre ellos se pueden mencionar la quimiotaxis, la motilidad de las bacterias, las lectinas, los exudados radicales (van Rhijn & Vanderleyden 1995). Los flavonoides (derivados del 2-fenil-1,4 benzopirona) especialmente y otras sustancias como las betaínas y los ácidos eritrónico y tetrónico, exudados por las leguminosas, actúan como moléculas señal que inician el diálogo entre los rizobios y el hospedante (Perret & Staehelin 2000) (Figura I-4; etapa 1).

El exudado radical determina en parte la especificidad de la relación simbiótica, ya que cada especie de rizobios responde a un conjunto de flavonoides que varían cuali y cuantitativamente entre las plantas (Perret & Staehelin 2000). La mayoría de las especies de rizobios interactúan sólo con un grupo selecto de leguminosas, que coincidentemente producen solo un flavonoide y se ha demostrado que algunos tienen una amplia gama de huéspedes lo que se ha asociado con la

capacidad de la planta para producir una amplia gama de flavonoides (Pueppke & Broughton 1999).

Una de las características de los rizobios es su capacidad de formar agregados y biopelículas para adherirse tanto a la raíz de las plantas como a las partículas de la rizósfera y así evitar ser desplazados de sus nichos ecológicos (Rinaudi & Giordano 2010). Los rizobios que se encuentran en las proximidades de la raíz detectan los flavonoides y otros compuestos exudados por las leguminosas, que actúan como atrayentes quimiotácticos. Se inicia entonces, el proceso de adhesión y posterior colonización de la raíz, mediado por proteínas secretadas al exterior y polisacáridos de superficie de las bacterias (Fauvart & Michiels 2008). Varias proteínas han sido propuestas para participar de este proceso: ricadhesinas, lectinas y flagelinas (De Hoff et al. 2009). Los polisacáridos también se consideran componentes críticos que participan en esta etapa, con implicancia en la competitividad (Sorroche et al. 2012).

Luego de esta primer interacción de los flavonoides, se expresan en los rizobios los genes *nod* (nodulación) (Perret & Staehelin 2000), que conduce a la producción y secreción de un conjunto de lipo-quitto-oligosacáridos cepa específicos, conocidos como factores de nodulación (FN) (Figura I-4; etapa 2). Las diferentes decoraciones de los FN unidos al esqueleto de oligosacárido son también responsables de la especificidad huésped-simbionte. Los FN desencadenan, una serie de respuestas específicas en la planta huésped, en particular en los pelos radicales que se encuentran en activo crecimiento y que son los que pueden diferenciarse, ubicados 1-2 cm por encima del meristema (Gage 2004; Murray 2011; Lodeiro 2015). Se han descrito varios receptores de los FN de naturaleza quinasa (Jones et al. 2007), como la calmodulina que induce la expresión de varios genes denominados *nodulinas tempranas* (ENODS: “*early nodulin genes*”) (Snedden & Fromm 2001; Hirsch et al. 2009). Estas nodulinas provocan las alteraciones en los pelos radicales que finalmente se deforman y enrulan (*hair curling*). La deformación y la curvatura del pelo radical ocurren al estimularse el crecimiento diferencial del extremo apical de manera que adquiere la forma de cayado de pastor (*Shepherd's crook*), donde los rizobios adheridos quedan atrapados (infección primaria). Esta es la primera respuesta microscópicamente visible de la leguminosa tras el contacto con los rizobios. La unión de los rizobios a los pelos radicales estimula su deformación, dentro de las 6 - 8 hs de su emergencia (Bhuvanewari 1981; Gage 2004) (Figura I-4; etapa 3). Simultáneamente, los FN inducen la expresión en la planta de otros genes específicos del proceso simbiótico, encargados de sintetizar las nodulinas que están relacionadas con el incremento de la actividad mitótica en las células de la corteza, lo que finalmente da origen al primordio del nódulo (Ferguson et al. 2010). En el

interior del pelo, ocurren una serie de cambios y comienza la síntesis de nueva pared celular, alrededor de las bacterias, en dirección a las células corticales de la raíz, originando una estructura tubular denominada hilo infectivo o canal de infección. En el caso de la soja los rizobios penetran en sus hospedadores mediante este canal interno. De manera que los rizobios se mueven a través del mismo sin interactuar con el citoplasma de las células de la planta hacia la base del pelo (Gage 2004) (Figura I-4; etapa 4-5). Los rizobios que se encuentran en el extremo del canal son los que se multiplican activamente (Capoen et al. 2010; Ferguson et al. 2010) (Figura I-4; etapas 6-7). Los canales de infección alcanzan las células corticales de la raíz, donde se ramifican y extienden, infectando las capas de células más profundas de la corteza de la raíz, culminando su desarrollo en células diferenciadas de la región subyacente al meristema nodular, en las que el ciclo celular está bloqueado. Simultáneamente, la invasión de los rizobios estimula la división mitótica de las células corticales, lo que da origen al primordio del nódulo (Figura I-4; etapa 8). A continuación los bradyrizobios son liberados en el interior de las células vegetales, y por endocitosis la membrana de estas células rodea a una o unas pocas bacterias, formando estructuras llamadas simbiosomas. Finalmente los rizobios se ubican en el tejido central de los nódulos, en donde se diferencian transformándose en bacteroides, por lo que cada simbiosoma constituye la unidad funcional de fijación de N_2 . La diferenciación de las bacterias en bacteroides, implica cambios morfológicos, bioquímicos, entre los que se encuentran la síntesis del sistema enzimático nitrogenasa que llevará a cabo la reducción del N_2 a amonio, que es asimilado por la planta. En el caso de *Bradyrhizobium* los bacteroides aumentan 4 a 7 veces de tamaño en relación a cuando se encuentran en el suelo (Figura I-4; etapa 9-10). La membrana peribacteroidal que rodea al simbiosoma constituye el límite y funcionalmente establece la unión entre la bacteria y el citoplasma de la célula vegetal, y es la responsable del intercambio de señales y nutrientes entre ambos organismos. En el proceso descrito se produce un silenciamiento o reducción de la mayoría de los procesos metabólicos y un aumento de la expresión de los genes *nif* y síntesis de las enzimas involucradas en la fijación de N_2 y la respiración. Los genes *nif*, codifican las proteínas que conforman el complejo enzimático nitrogenasa.

El amonio que produce la nitrogenasa es asimilado por el sistema GS-GOGAT, formando glutamina y es transportado a la planta de soja, generalmente en forma de alantoína y ácido alantoico. En resumen, como resultado de la interacción los rizobios reciben fotosintatos fijados por la planta y la planta recibe el nitrógeno fijado por la bacteria (Denison & Kiers 2004). El equilibrio en el intercambio de metabolitos entre la planta y el microorganismo resulta vital para

la simbiosis. Una alteración podría conducir a activar hidrolasas y por lo tanto a la muerte del simbiosoma y a la senescencia del nódulo (Denison 2000; Gage 2004). En este contexto vale la pena aclarar que los nódulos de soja (*Glycine max*), son de crecimiento determinado y el aumento del tamaño se basa en la expansión de las células que se generaron en el inicio de la nodulación, en el meristema del nódulo. La morfología de los nódulos es esférica y esto se debe a que el meristema, que no es persistente, genera un aumento en el número de células que luego aumentan de tamaño y se curvan. Las células que invaden los bradyrizobios se encuentran todas en una misma fase de desarrollo (Ferguson et al. 2010). Estos nódulos permanecen activos algunas semanas y cuando senescen pueden despreimirse infecciones preexistentes y formarse nuevos nódulos en la zona de la raíz en crecimiento. En cambio, los nódulos de crecimiento indeterminado, como los que producen *Medicago sativa* (alfalfa), *Pisum sativum* (arveja), *Vicia spp*, entre otros, presentan meristema persistente que produce un desarrollo continuo del nódulo que toma una forma cilíndrica. En este tipo de nódulo coexisten diferentes estadios de desarrollo de los rizobios simultáneamente (Figura I-4, etapa 10).

Si bien los rizobios pueden vivir en forma libre como saprótrofos en el suelo, la simbiosis con las leguminosas ofrece amplias ventajas. Por ello cuando el huésped está presente, unas pocas bacterias (de la gran cantidad de células de rizobios en el suelo) son las que interactúan e infectan las raíces de la planta y de esta manera proliferan y se multiplican en un ambiente protegido como es el hilo infectivo dando así origen a millones de células (Denison & Kiers 2004).

Cuando se produce la senescencia de los nódulos un alto número de células viables (bacteroides de los nódulos determinados y células no diferenciadas de los indeterminados) son liberadas y se distribuyen en el suelo, contribuyendo así al aumento del número de bacterias, lo que compone una futura población que infectará los cultivos que se realicen a posteriori por lo cual pueden pasar a constituir un componente relevante en la microbiota edáfica (Denison & Kiers 2004).

En el suelo los rizobios persisten por períodos variables, que dependen por un lado de características intrínsecas de las cepas, como la capacidad de supervivencia y tolerancia a estrés, por la capacidad para adherirse a las partículas del suelo más o menos firmemente, y por el otro lado a las condiciones del medio, que están dadas por el tipo de agregados del suelo, el efecto rizosférico, el contenido de humedad, pH, temperatura, salinidad. Se ha demostrado que los rizobios pueden sobrevivir en el suelo desde semanas a varios años (Cleyet-Marel et al. 1995; Brutti et al. 1998; Mendes et al. 2004; Vriezen et al. 2007). En base a lo expuesto es claro que las

labores culturales que se emplean en la preparación de los suelos para la siembra, pueden modificar en menor o mayor medida la estructura y composición del suelo, es decir que el ambiente podría afectar la supervivencia de los microorganismos edáficos.

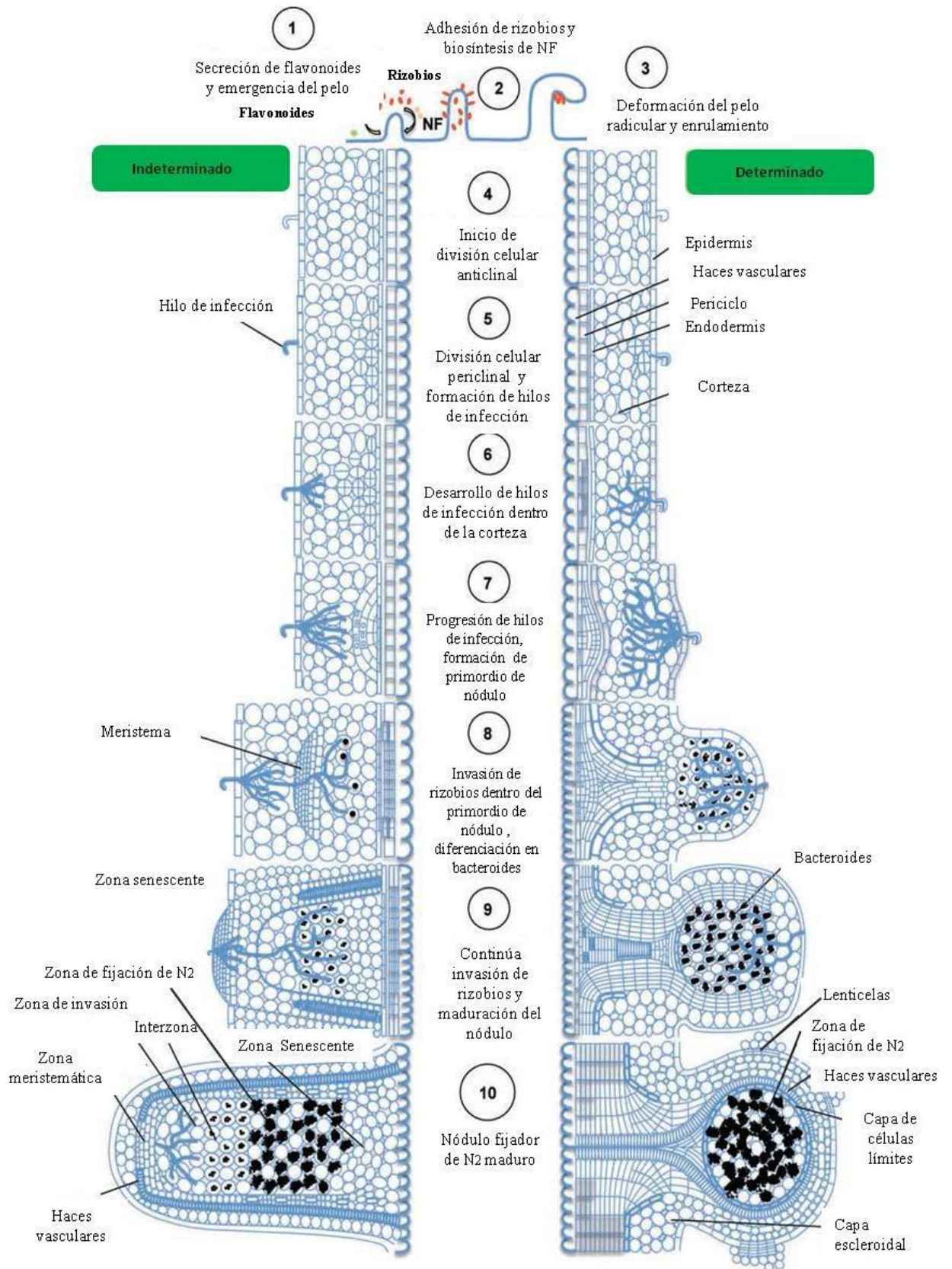


Figura I- 4: Etapas de desarrollo de nódulos de leguminosas indeterminados y determinados. Se ilustran las etapas de desarrollo de nódulos de arvejas (indeterminado; izquierda) y soja (determinado; derecha). Se indican las diversas etapas de desarrollo, tipos de tejidos y zonas de nodulación (Ferguson et al. 2010).

Labranzas

Las labranzas están destinadas a controlar malezas y acondicionar el suelo para la siembra. Esta tarea tiene como objetivo realizar una implantación del cultivo exitosa, para lo cual la emergencia de las plántulas es clave.

Las labores culturales que se utilizan para preparar los suelos para la agricultura, modifican las propiedades físicas, químicas y biológicas de los suelos (Logan et al. 1991; Dorr de Quadros et al. 2012). Se pueden clasificar según el grado de roturación en tres clases: labranza convencional, labranza vertical y siembra directa (labranza cero).

Cuando se inició el cultivo de soja en nuestro país por los años 60's, el laboreo de suelos se realizaba con arado de rejas, como labranza primaria, y se difundió el uso de implementos de labranza secundaria que inducían un refinamiento de los agregados lo que, según el tipo de suelo, producía un gran deterioro del suelo. Este tipo de manejo conforma la labranza tradicional o labranza convencional (LC), que consiste en cortar e invertir total o parcialmente la capa superficial de suelo. De esta manera la erosión hídrica alcanzó a lotes de leve pendiente y se agravó en los de pendiente moderada. Además, se generalizó la quema del rastrojo de trigo para acelerar la preparación del suelo y la siembra de la soja de segunda. Sin embargo, en 1976, el manejo del suelo para el cultivo incorporó una sorprendente innovación: la siembra directa (SD). En este tipo de sistema, denominado conservacionista, se mantiene la cobertura vegetal sobre la superficie del suelo, mejorando sus características físicas y químicas con respecto a sistemas convencionales, constituyendo así una valiosa herramienta para detener la degradación y mantener la calidad ambiental, ya que se reducen las pérdidas por erosión y se facilita la retención del carbono. La adopción del sistema de SD durante 10 años continuos en Hapludoles Típicos, que son suelos similares a los estudiados en esta tesis, generó cambios significativos en las propiedades edáficas, incrementando la materia orgánica, mejorando la estructura, mientras que redujo la compactación (Zanettini et al. 2014), beneficios que no se observaron con otros sistemas de labranza (Diaz Zorita 1999).

Es por ello que desde el surgimiento de la SD, se promovió un paquete de innovaciones técnicas que ofrecen adaptabilidad del cultivo a distintos ambientes, con alta seguridad de cosecha y con facilidad de manejo y cosecha. Esto en la actual situación de precios permite obtener una aceptable rentabilidad. En este contexto es importante elegir prácticas de preparación de la tierra que protejan los recursos naturales y al mismo tiempo mejoren la productividad y reduzcan los costos de protección.

Población naturalizada y diversidad de los rizobios que nodulan soja

Las bacterias que nodulan las raíces de las leguminosas están ampliamente distribuidas en las regiones donde se han realizado cultivos de estas plantas. Se han identificado diferentes sitios de diversificación de las leguminosas y estos coinciden con los sitios de diversificación de los rizobios que son capaces de establecer simbiosis con las leguminosas en cuestión (Martínez-Romero & Caballero Mellado 1996). Por otro lado, la riqueza de los rizobios es mayor en suelos tropicales y subtropicales, que en los templados, como resultado de que en esas zonas las leguminosas prevalecen por sobre otras especies (Yanagi & Yamasato 1993).

Los suelos de Brasil y de Argentina originalmente no contenían rizobios simbiosis de la soja, por lo que al iniciar el cultivo fue necesario importar junto con las semillas las bacterias simbióticas (Ferreira & Hungria 2002; Mendes et al. 2004; Lodeiro 2015). Al realizar la inoculación de la semillas se asegura una temprana colonización de la rizósfera por *B. japonicum*, lo que favorece la nodulación y fijación de N₂, de manera de obtener el mayor potencial de rendimiento del cultivar de soja y además conservar las reservas de N del suelo (Brockwell et al. 1995). La inoculación del cultivo de soja condujo a la introducción en los suelos de estirpes exóticas de rizobios en los que la dinámica poblacional condujo a su naturalización, a tal punto que hoy, tanto en Argentina como en Brasil, es difícil encontrar suelos libres de rizobios. Más aún, en suelos que nunca fueron inoculados, se han aislado rizobios que se cree fueron llevados por el agua y/o el viento (Ferreira & Hungria 2002; Mendes et al. 2004; Lodeiro 2015). La inoculación masiva de suelos brasileños con pocas cepas de *Bradyrhizobium* recomendados para la soja ha resultado en el establecimiento de una población en la mayoría de los suelos sembrados con esta leguminosa (Giongo et al. 2008).

La persistencia de las bacterias en el suelo es una función de la capacidad saprotrófica, de la capacidad de multiplicación y en el caso de las bacterias simbiosis de la presencia de la planta huésped, del ambiente y la promiscuidad (Brockwell & Bottomley 1995).

La dinámica de las poblaciones de rizobios en los suelos, se ve impactada por el efecto que las labores provocan sobre el ambiente del suelo y en definitiva sobre la diversidad (Ferreira et al. 2000), que además está influida por la transferencia horizontal de genes (Suominen et al. 2001; Moulin et al. 2004). La labranza convencional, que consiste en realizar las prácticas tradicionales de arado y rastra para preparar la tierra, conducen a reducir el contenido de materia orgánica del suelo y así se aumenta la erosión, especialmente en la región del trópico (Hungria & Vargas 2000). Alternativamente, la siembra directa resulta en un aumento del contenido de materia orgánica del suelo, lo que mejora la estructura del suelo y el contenido de humedad, además de

proteger al suelo de la erosión (Hungria & Vargas 2000). Asimismo, las condiciones estresantes asociados con la labranza convencional, tales como temperaturas más altas, baja humedad del suelo y bajo contenido de C, podrían tender a seleccionar cepas tolerantes a condiciones de estrés. Por otro lado se han descrito que adicionalmente los sistemas de labranza alteran el tamaño y la diversidad de las poblaciones (Ferreira et al. 2000; Bizarro et al. 2011; Yan et al. 2014). Bizarro y colaboradores (2011) encontraron que la diversidad genética de la población de rizobios fue mayor en suelos bajo siembra directa que en suelos bajo labranza convencional, ya que en el primer caso se mantienen las características físicas, químicas y biológicas de suelo.

En varios trabajos se ha descrito la aparición en los suelos de mutantes naturales como resultado del efecto del estrés sobre los organismos (Gomes Barcellos et al. 2009) lo que es más notable en condiciones ambientales extremas (Hungria & Vargas 2000). Esto fue además confirmado por estudios realizados en suelos bajo condiciones ambientales menos estresantes en donde las poblaciones mostraron menores niveles de variabilidad (Judd et al. 1993; Obaton et al. 2002).

Además de la variabilidad en las capacidades simbióticas, las poblaciones de rizobios, muestran variabilidad morfológica, bioquímica, fisiológica y genética, relacionada con el proceso de adaptación (Hungria & Vargas 2000; Galli-Terasawa et al. 2003; Giongo et al. 2008). La pérdida o ganancia de material genético modela la evolución de los genomas microbianos. Parte de la información genética es indispensable para la supervivencia pero el intercambio de material genético ya sea por pérdida o incorporación, es muy frecuente. La mayoría del material transferido horizontalmente es parte de un paquete genético flexible que contiene genes que son útiles para la adaptación a un determinado medio ambiente y que si bien no son indispensables para la sobrevivencia del procarionte, modifican su capacidad de adaptación al ambiente (Lloret & Martínez-Romero 2005).

Uno de los principales determinantes de la diversidad es la presencia, continua o periódica, de la planta huésped (Kahindi et al. 1997; Ferreira et al. 2000; Yan et al. 2014). Sin embargo es interesante observar que las poblaciones de rizobios del suelo también son afectadas cuanti y cualitativamente por la acidez, contenido de arcilla y materia orgánica, el efecto estacional (temperatura –humedad), la profundidad del muestreo, la historia del uso de la tierra, así como la distribución geográfica y factores como la densidad de gramíneas (Kahindi et al. 1997; Zahran 1999; Ferreira et al. 2000; Catroux et al. 2001; Revellin et al. 1996; Giongo et al. 2008). Los campos que se manejan en base a una fertilidad adecuada (ej. manejo orgánico) y con cultivo de leguminosa huésped, suelen resultar con una población con mayor número de rizobios y más

diversa (Zengeni et al. 2006; Grossman et al. 2011). Por ello, la composición de las poblaciones de rizobios naturalizadas en los suelos, varía notablemente aún en distancias muy cortas (Hungria et al. 1997a).

En cuanto a los recuentos de rizobios realizados en diferentes ambientes se observó que la población varía entre 10^2 a 5×10^3 rizobios.g⁻¹ de suelo de los Cerrados (Ferreira et al. 2000), de 10^3 a 10^7 rizobios.g⁻¹ de suelo de la región tropical (Hungria & Vargas 2000). En suelos del sur brasileño se han reportado 10^5 cel. g⁻¹ (en Londrina), 10^3 cel. g⁻¹ (en Ponta Grossa) (Hungria et al. 2006). En suelos de Francia en los que la soja se inoculó se realizaron recuentos de 80 a $1,5 \times 10^4$ rizobios.g⁻¹ de suelo (Revellin et al. 1996). En la Argentina el tamaño de la población naturalizada se encontró es de $10^2 - 10^5$ rizobios.g⁻¹ de suelo (Tringali et al. 1997; González et al. 1997; Brutti et al. 1998).

El efecto de las poblaciones de rizobios naturalizados en los suelos sobre el rendimiento de la soja se ha descrito que es controvertido. En algunos trabajos se ha reportado que el rendimiento tiene una relación inversa a la presencia de rizobios naturalizados en el suelo (Thies et al. 1991). En Argentina, se encontró que en campos con monocultivo de soja, a pesar de no recibir N ni haber sido inoculados en los últimos 5 años, los rendimientos fueron similares a los obtenidos en soja inoculada con cepas comerciales (Melchiorre et al. 2011). Aunque debido a que los suelos de nuestro país, no siempre contienen una población suficientemente grande de rizobios, la inoculación de cultivos de soja en es una práctica generalizada (González 2007).

En resumen, las condiciones ambientales son factores que limitan el crecimiento y la actividad de los rizobios en el suelo, modificando la composición de las comunidades microbianas. Las poblaciones de rizobios simbioses de la soja naturalizados varían tanto en número de individuos, así como en su capacidad para establecer simbiosis y fijar N₂. Esta es una de las características más relevantes que se investigan en los distintos aislamientos de las bacterias naturalizadas, que ofrecen la ventaja de estar adaptados al ambiente, especialmente cuando éste es estresante como en suelos del trópico (Ferreira et al. 2000; Denison & Kiers 2004). La diversidad de los bradyrizobios suele ser acompañada por alteraciones en la competitividad y capacidad saprotrófica (Mendes et al. 2004). Es decir que el potencial para ser un componente estable de la microbiota del suelo y la estabilidad de las características simbióticas, deben ser objetivos de selección de cepas para la fabricación de inoculantes (Brockwell & Bottomley 1995).

Diversificación de los rizobios

El genoma de *B. japonicum* se secuenció en 2001 (Kaneko et al. 2002). Consta de un cromosoma circular de 9,1 Mb. Se han identificado 8317 posibles genes codificantes de proteínas (ORFs, *Open Reading Frames*), los operones de los genes ARNr y 50 genes de ARNt. Un 52 % de los genes son homólogos a genes descritos en bases de datos y codifican actividades conocidas mientras que el 30 % codifican proteínas hipotéticas, y el 18 % restante no tiene homología con genes conocidos. El 34 % de los genes presentan homología con secuencias encontradas en los genomas de *Mesorhizobium loti* y *Sinorhizobium meliloti*. Se identificaron en el genoma un total de 167 genes que codifican transposasas y 104 copias de secuencias de inserción (IS). La isla simbiótica de *Bradyrhizobium* que contiene los genes para que la bacteria fije nitrógeno en simbiosis con su hospedante, está contenida en un fragmento de 681 kb, curiosamente 100 de las 167 transposasas se encuentran en la isla simbiótica (Kaneko et al. 2002). En relación a esto, la evolución del genoma de las bacterias asociadas a plantas ha estado dirigida por la adquisición de replicones auxiliares, reordenamientos, duplicación y creación de nuevos genes mediada por elementos genéticos móviles, que han jugado un papel clave en la transferencia horizontal de funciones de simbiosis y/o patogénesis (Jimenez-Zurdo et al. 2006).

El genoma de *Bradyrhizobium* es plástico y esto probablemente explique las modificaciones y adaptaciones que sufren las cepas. Estos procesos seguramente son acelerados por la interacción de las bacterias simbiotas con la planta huésped, la adaptación al medio ambiente (Sullivan & Ronson 1998; Hungria & Vargas 2000) y las prácticas agrícolas (Ferreira et al. 2000; Galliterasawa et al. 2003; Kaschuk et al. 2006a; Bizarro et al. 2011; Yan et al. 2014).

Algunos autores sostienen que las poblaciones de bacterias simbióticas son más susceptibles a las perturbaciones ambientales y puede ser un indicador biológico más sensible de la variación ambiental que la presencia de fijadores de vida libre (Depret et al. 2004).

Las modificaciones naturalmente ocurren en el genoma de los rizobios lo que sumado a la transferencia horizontal de material genético que sucede en el suelo, son probablemente las fuentes más importantes de variabilidad genética. Como ejemplo se puede mencionar a la dinámica del genoma observada en *Ensifer fredii* NGR234. Esta estirpe de crecimiento rápido contiene un plásmido simbiótico que está constituido por un 18 % de secuencias de inserción (Perret et al. 1997) y un segundo plásmido que contiene un 40 % de genes homólogos a otras especies bacterianas (Streit et al. 2004), lo que sugiere que existe transferencia horizontal con otros organismos. En esta bacteria se ha demostrado que permanentemente se producen rearrreglos del genoma entre los tres replicones, los dos megaplásmidos y el cromosoma

(Mavingui et al. 2002). Por lo tanto el genoma de las bacterias está sujeto a mutaciones y rearrreglos lo que contribuye aún más a generar diversidad y a la evolución del organismo (Mavingui et al. 2002). Varios autores han descrito la identificación de aislamientos en poblaciones de suelos inoculados que no se agrupan con ninguna cepa parenteral (Loureiro et al. 2007).

El desarrollo de las técnicas moleculares ha aportado herramientas útiles para la identificación de las especies de bacterias que interactúan con las leguminosas (Lopez & Balatti 2012). En *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 se ha generado en base a los marcadores moleculares el mapa físico del genoma (Tomkins et al. 2001) y posteriormente su secuencia completa (Kaneko et al. 2002).

En muchos microorganismos se ha descrito que en el genoma se encuentra un alto número de secuencias de inserción y repetitivas (Kaluzza et al. 1985; Flores et al. 1998; Minamisawa et al. 1998). Los *Bradyrhizobium* contienen regiones repetitivas que se conocen como RS α , RS β y IS1631, que son conservadas y se encuentran dispersas en el genoma (Minamisawa et al. 1998). Estas secuencias no sólo permiten establecer diferencias genéticas entre los aislamientos dentro de una misma especie y en algunos casos identificarlas (Kaluzza et al. 1985; Minamisawa et al. 1998; Sameshima et al. 2003), sino que además intervienen en los rearrreglos del genoma. Sin embargo, estas no son las únicas secuencias involucradas en la identificación de los microorganismos.

El *16S ADNr*, es la molécula que se ha utilizado para la identificación de microorganismos y para realizar estudios evolutivos (Willems et al. 2001; Yanagi & Yamasato 1993). Si bien algunas bacterias tienen varias copias de esta secuencia como *E. fredii*, *B. japonicum* posee una sola copia de *16S ADNr* (Kündig et al. 1995; Kaneko et al. 2002). La diversidad de los aislamientos de *Bradyrhizobium* a nivel morfológico, fisiológico y genético no es reflejada por las diferencias que muestra este gen. Probablemente esto se debe a que el *16S ADNr* es una secuencia muy conservada, y además a que algunos loci son transferidos de un microorganismo a otro por transferencias laterales de genes recurrentes (Qian et al. 2003).

Entre las estrategias para el análisis de la diversidad se ha mencionado también el empleo de otros genes como el *23S ADNr* o la región intergénica 16S-23S, que varía no sólo en la secuencia de bases sino también en el largo, el análisis de la secuencia de genes involucrados en la fijación de nitrógeno como el *nifH* y en la nodulación (*nodA*) (Laguerre et al. 1996; Doignon-Bourcier et al. 2000; Tan et al. 2001; Lloret&Martínez-Romero 2005). El análisis de la diversidad con estos u otros genes, ha permitido detectar secuencias específicas que identifican a especies de rizobios

o a organismos dentro de una misma especie (Hartmann et al. 1996; Sánchez Contreras et al. 2000; Videira et al. 2002; Pastorino et al. 2003). Vinuesa y colaboradores (2005) demostraron incongruencias entre los árboles filogenéticos realizados sobre la base del análisis de secuencias de genes conformacionales (*housekeeping*) y genes de simbiosis, sugiriendo que es muy frecuente la transferencia horizontal de genes entre representantes de *Bradyrhizobium* y que de esta manera las estirpes suelen adquirir genes de resistencia a estreses ambientales. Es decir, que es probable que los rizobios nativos que hacen simbiosis con leguminosas indígenas sean una fuente de diversidad como resultado del efecto de la transferencia horizontal de genes en los rizobios introducidos.

En estudios realizados en suelos de Paraguay, Brasil y Argentina se detectó la presencia de una gran diversidad de rizobios (Santos et al. 1999; Chen et al. 2002; Galli-Terasawa et al. 2003; Zabaloy & Gómez 2005). Los aislamientos descritos presentaron una gran variabilidad que se observó a nivel de las características morfológicas, fisiológicas, serológicas, genéticas y simbióticas (Gomes Barcellos et al. 2007; Batista et al. 2007; Bizarro et al. 2010). Es interesante ampliar las investigaciones realizadas para poder relacionar la variabilidad fenotípica y genotípica con el proceso de adaptación de los microorganismos de los suelos y las implicancias ecológicas.

Todos estos resultados sugieren, entre otras cosas, que es importante conocer la diversidad de las bacterias que se encuentran en los suelos y que interactúan o pueden interactuar con la soja. Esto es más relevante si se considera que los cultivares suelen interactuar diferencialmente con los rizobios del suelo y por lo tanto actúan modificando el número y diversidad de las poblaciones. Más aún algunos rizobios nodulan preferencialmente con ciertos materiales genéticos y por lo tanto el cultivar trampa define la diversidad de rizobios atrapada (Salvucci et al. 2012; López et al. 2013).

La variabilidad en las poblaciones de microorganismos del suelo parece ser el resultado de una combinación de eventos, tales como la dispersión de la cepa, la recombinación genómica, y la transferencia horizontal de genes (Valencia & Gómez 2012). Asimismo puede inferirse que la variabilidad también está relacionada con la adaptación de los organismos al medio, con su capacidad saprotrófica, que está directamente implicada con la competitividad (Gomes Barcellos et al. 2007; Batista et al. 2007).

En los suelos de la Argentina se han identificado cepas de rizobios nativos simbiotes de leguminosas nativas, en poblaciones que presentan altos niveles de diversidad, y que varían en su comportamiento frente al estrés (Melchiorre et al. 2011; Chávez Díaz et al. 2013). Se sabe que

muchas de estas leguminosas desarrollan nódulos en simbiosis con rizobios de crecimiento lento y muy probablemente pertenecientes al género *Bradyrhizobium*. Esto y el hecho de que los bradyrizobios son promiscuos, conducen a pensar que los rizobios simbiosiontes de las especies nativas son potenciales simbiosiontes de soja y por lo tanto serían competidores de los inoculantes comerciales o fuentes de intercambio genético con los rizobios introducidos (López et al. 2013).

Inoculantes

Los primeros países en producir inoculantes fueron EEUU y el Reino Unido en 1895, práctica que luego se extendió a otros países como Brasil, Argentina, Uruguay. La producción y utilización de inoculantes para leguminosas ha evolucionado prácticamente a la par del crecimiento del cultivo en Argentina y Brasil (Ferraris et al. 2005).

El objetivo de los inoculantes es proveer bradyrizobios seleccionados con capacidades simbióticas superiores para mejorar los rendimientos. Las cepas de rizobios seleccionadas para la producción de inoculantes deben formar nódulos eficientes con la planta huésped bajo una amplia gama de condiciones de cultivo. Más aún, como es probable que el suelo a sembrar haya sido cultivado con la leguminosa y por lo tanto contenga rizobios naturalizados, la cepa del inoculante debe ser competitiva (Date 2000).

La tecnología de la inoculación fue evolucionando en el tiempo, registrándose cambios que fueron mejorando la eficiencia del proceso. Los primeros inoculantes se elaboraron en base de turba, luego se mejoró el producto empleando turba estéril, otro avance fue el empleo de los inoculantes líquidos, cuyo uso y manejo es más simple (Gonzalez Anta 2006). Más recientemente se desarrollaron los protectores bacterianos, compuestos que aumentan la hidratación y nutrición celular sobre la superficie de la semilla (Ferraris et al. 2005).

Los programas de selección de cepas de rizobios para la producción de inoculantes tienen varias fases. El aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno a partir de los nódulos de plantas cultivadas a campo, o inoculadas con muestras del suelo; la selección en base a su velocidad de infección, capacidad para desarrollo de nódulos y eficiencia de fijación de N_2 , si bien inicialmente éstas características se evalúan en condiciones controladas, luego se realizan ensayos a campo en condiciones similares a los sitios en que se utilizarán los inoculantes. En este contexto es importante considerar las poblaciones de rizobios alóctonas, que si bien por un lado son una fuente para la selección de nuevas cepas adaptadas a ambientes locales, da como resultado altos niveles de competencia saprotrófica (Zengeni et al. 2006). Además la presencia ubicua de estas poblaciones con frecuencia impide que las cepas de los inoculantes ocupen los

nódulos de soja, aún cuando estos están adheridos a las semillas. Este problema de competencia por la nodulación, se observó en todo el mundo, y también en otros cultivos de leguminosas (Althabegoiti et al. 2008). Este es un reto que debe ser superado por las cepas seleccionadas para la producción del inoculante (Lodeiro 2015). No obstante existen informes de Brasil que demuestran que bradyrizobios alóctonos, cuyo origen fueron los inoculantes, en el suelo se volvieron más competitivos manteniendo el nivel de fijación de N_2 (Alves et al. 2003). El conocimiento de la población del suelo es por lo tanto indispensable para evaluar los beneficios potenciales de una estrategia de inoculación (Catroux et al. 2001; Obaton et al. 2002; Lindström et al. 2010).

Otras características importantes a evaluar son la persistencia de la bacteria en el suelo en ausencia de la planta huésped, la estabilidad genética de la cepa, la compatibilidad con productos agroquímicos y la supervivencia bajo una amplia gama de condiciones físicas y químicas del suelo. El éxito de las cepas introducidas para establecer una relación simbiótica y persistir en un suelo depende de las condiciones locales y la presencia de rizobios alóctonos competitivos (Brockwell et al. 1995; Botha et al. 2004). Sin embargo, finalmente, en el proceso de selección de cepas se confirma la capacidad (eficiencia) de la cepa evaluando el rendimiento del cultivo en un amplio espectro de condiciones ambientales (Antoun & Prevost 2006; Melchiorre et al. 2011; Somasegaran & Hoben 2012). Si bien esto es correcto hay un sinnúmero de efectos que se evalúan a la hora de definir el impacto de la inoculación.

Por otro lado, las cepas seleccionadas deben desarrollar en medios de cultivo industriales, en donde se alcanzan altas densidades celulares, proceso que no debe afectar la sobrevivencia ni la capacidad simbiótica de los rizobios.

El agregado continuo de fertilizantes, fundamentalmente nitrogenados y fosforados, para satisfacer la producción de los cultivos, ha ocasionado la degradación de la calidad de suelos, y ha conducido a la contaminación del aire y el agua. Se estima que en los próximos 40 años se producirá un nuevo período de expansión agrícola tendiendo a cubrir la demanda de alimentos de una población que tendrá mayor poder adquisitivo. Por ello se debe trabajar en reducir el impacto ambiental. Se prevé que en el año 2050, 10^9 hectáreas de ecosistemas naturales se convertirán a la agricultura. El empleo de biofertilizantes no solo permite aumentar los rendimientos sino que es una de las alternativas que junto con otras metodologías colaboran con la producción sustentable. Por lo tanto, es necesario realizar investigaciones científico-tecnológicas destinadas a desarrollar marcos regulatorios y establecer políticas tendientes a disminuir el impacto de la expansión agrícola sobre el ambiente (Tilman et al. 2002). La

necesidad de disminuir el uso de los fertilizantes nitrogenados y la ampliación de la producción sugieren que los sistemas a nivel mundial tenderán a ser más dependiente de la FBN (Herridge et al. 2008). En la medida que el mejoramiento genere cultivares de soja con mayor potencial de rendimiento, la demanda de N del cultivo irá en aumento. Es decir que si la demanda actual del cultivo de soja es de aproximadamente 300 kg de N.ha⁻¹, con rendimientos de hasta 8000 kg.ha⁻¹ la demanda de N se incrementará hasta 1000 kg de N.ha⁻¹ (Hungria et al. 2006). Por ello, es importante estudiar las poblaciones naturalizadas de cada región, con el fin de identificar cepas adaptadas a las condiciones naturales y que fijan N₂ más eficientemente.

Los microbiólogos, ahora con ayuda de herramientas moleculares, continúan estudiando la biodiversidad de los bradyrizobios en el suelo y esperan encontrar cepas de bacterias nodulantes para la soja, adaptadas a cada ambiente, resistentes a algunas de las condiciones extremas, como salinidad, acidez y altas temperaturas. En estos casos, la selección de cepas puede generar progresos importantes, como lo ha hecho el programa de selección de cepas llevado a cabo en Brasil (Santos et al. 1999). En los suelos como los de la región pampeana argentina, que por sus contenidos de materia orgánica y cationes, por sus características de textura y pH resultan con mayor potencial para la naturalización del género *Bradyrhizobium*, la selección de cepas, deberá enfrentar el desafío que impone el fenómeno de competencia que ejerce la flora rizobial naturalizada en el suelo (Gonzalez 2006).

La cepa E109 de *B. japonicum* es una de las rizobacterias más utilizadas en Argentina desde 1970, dado que ha sido la cepa comercial recomendada por el INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria), para emplearla en la formulación de inoculantes por su alta capacidad FBN (Torres et al. 2015). En nuestro país, no existe la obligación de declarar con qué cepa o cepas se formulan los inoculantes. El 46,5% de los productos inscriptos están formulados con *Bradyrhizobium japonicum* E109, 6% con E109 más otra cepa de *Bradyrhizobium*, 8% con E109 más otras dos cepas de *Bradyrhizobium*, 5% con otras estirpes diferentes de E109, 0,5% con E109 más *Azospirillum* y 34 % con cepas no especificadas (Gonzalez 2006).

El futuro depara nuevos desafíos como la coinoculación de *Bradyrhizobium japonicum* con otros microorganismos, selección de cepas más infectivas, competitivas, resistentes al estrés hídrico y con alta capacidad de FBN. Estas son solamente algunas de las líneas de trabajo que en el futuro podremos emplear para mejorar la productividad de los cultivos de soja (Gonzalez Anta 2006).

Por todo lo expuesto se evidencia que el ambiente cumple un rol clave en las variaciones de los rizobios en el suelo ya que impone una presión de selección importante. Probablemente por

ello las poblaciones naturalizadas son diversas fenotípica y genéticamente. Esto sugiere que las poblaciones diversas pueden ser la fuente para la selección e identificación de nuevas cepas para la formulación de inoculantes comerciales.

Hipótesis

En los suelos con historia de cultivo de soja, las labores culturales y el ambiente inducen cambios genéticos en las cepas de rizobios, contribuyendo a aumentar la diversidad de la población.

Objetivos

- Evaluar la diversidad de los rizobios que se encuentran en los suelos.
- Analizar la población del suelo y su diversidad como fuente para el aislamiento de cepas con aptitudes simbióticas superiores a las de las cepas que actualmente se utilizan para fabricar inoculantes comerciales.

CAPÍTULO II

RECuento, AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE RIZOBIOS DE SUELOS CON HISTORIA DE CULTIVO CONOCIDA

INTRODUCCIÓN

El suelo como ambiente. Labranzas.

El suelo es un sistema complejo que permite el desarrollo de la vida en el planeta, aporta nutrientes y cumple una función clave, ya que es el soporte físico de gran parte de los seres vivos. En un suelo agrícola, a capacidad de campo, aproximadamente el 50 % de su volumen está constituido por una matriz sólida, que contiene los minerales y la materia orgánica, que a su vez incluye la macro y microfauna. En tanto que el espacio poroso remanente, se encuentra ocupado con agua en un porcentaje que varía del 40 al 60 %, y el volumen restante lo constituye el aire. Las diferentes partículas del suelo se unen por la acción de los componentes biológicos (materia orgánica, mucílagos) y por acciones de naturaleza físico-química (fuerzas iónicas), de manera que forman en primer lugar microagregados y luego agregados mayores que definen la estructura del suelo, que es una de las cualidades más importantes. El grado de estructuración de un suelo existente afecta la cantidad y tamaño de los poros que influyen considerablemente en el movimiento del agua, la aireación, la actividad de los microorganismos y el desarrollo de las raíces. Es decir que los microorganismos encuentran en los microagregados el hábitat adecuado donde se establecen y desarrollan (Fig. II-1).

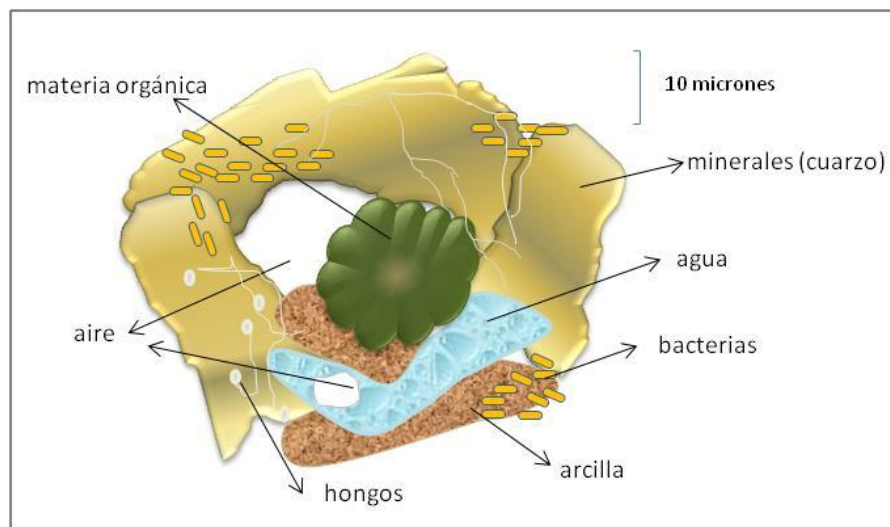


Figura II- 1: Microagregado del suelo y sus componentes.

La biomasa microbiana del suelo está formada por bacterias, hongos, protozoos, virus, actinomicetes y algas, que representa menos del 1 % del volumen total. La microbiota cumple un rol clave en el suelo, en parte por su capacidad para transformar la materia orgánica, y en parte por su capacidad para reciclar nutrientes, comportándose como reservorios de éstos (inmovilización), a partir de lo cual mediante el proceso de mineralización que ocurre en el suelo, los libera al medio. Esta actividad microbiana influye en la calidad del suelo, el

rendimiento de los cultivos y la sostenibilidad del sistema productivo (Dorr de Quadros et al. 2012).

El ecosistema suelo alcanza cierto equilibrio entre el ambiente y los organismos que lo habitan. En tanto que las labores culturales que se utilizan para prepararlos para la agricultura, producen variaciones en la composición y tamaño de los agregados, esto genera profundas modificaciones que alteran el equilibrio (Logan et al. 1991; Dorr de Quadros et al. 2012). Los principales objetivos de la labranza son el control de las malezas, la preparación de la cama de siembra y el acondicionamiento del suelo.

El grado de roturación del suelo define tres tipos de labranzas:

- Convencional: la roturación del suelo es completa.
- Reducida: el suelo recibe mediana roturación o labranza de tipo vertical
- Siembra directa o labranza cero: no se rotura el suelo y se siembra sobre el mismo rastrojo del cultivo antecesor.

En la labranza convencional (LC) se emplean diversas maquinarias para preparar los suelos para la siembra (Fig. II-2). Al trabajar el suelo con estos implementos, se corta e invierte total o parcialmente las capas superficiales que comprenden los primeros 20 cm. El suelo se afloja y airea, lo que facilita el ingreso de agua, la mineralización de nutrientes y la reducción de plagas animales y vegetales en superficie. El rastrojo que se incorpora al suelo se descompone en aerobiosis parcial, lo que conduce a la transformación del NH_4^+ en NO_3^- , que es la forma química en que los cultivos asimilan N. Sin embargo, de esta manera se inhibe el proceso de estructuración de los suelos, debido a que las condiciones ambientales no son adecuadas para la actividad de los microorganismos productores de mucílagos. Además, se reduce la cobertura de superficie, acelerando así los procesos de degradación de la materia orgánica, lo que aumenta los riesgos de erosión (FAO 1992; Six et al. 2002).

En los últimos años, más de 60 millones de hectáreas trabajadas con sistemas de cultivo bajo LC, se comenzaron a manejar con labranza cero o siembra directa (SD) en Estados Unidos, Brasil y Argentina (Derpsch et al. 2010). Estos sistemas, que no remueven el suelo hacen que los residuos permanezcan en la superficie después de la cosecha (Fig. II-3). De manera que resulta en un aumento de la materia orgánica (MO), que se degrada lentamente, acompañada de una lenta liberación de nutrientes y humificación. La presencia de estos residuos contribuye a mantener la bioporosidad del suelo, que no son más que canales generados por las lombrices y las raíces de las plantas que proveen de una adecuada aireación. Estos canales permiten conservar la humedad y reducen la temperatura del suelo en verano (Wang et al. 2011; Taboada

et al. 2013). Adicionalmente, estas tareas resultan en una disminución del empleo de maquinarias pesadas, con lo cual se preservan los agregados del suelo, y mantienen la estructura (Fig. II-4).



1. Arado de Discos, en la imagen se observa el efecto de corte que producen los discos sobre la capa superficial (20 cm) de suelo.
2. Rastra de discos, desmenuza porciones del terreno después de la aradura del suelo.
3. Arado de cinceles: producen un corte vertical del suelo desde 0 a 40 cm de profundidad.
4. Rastra de dientes: se utiliza para aflojar el terreno previamente arado, para retirar malezas del campo, que se enredan en los dientes, para romper capas o costras que se forman en los suelos, cuando éstos son especialmente arcillosos.
5. Rolo: tiene la finalidad de darle una textura más fina al suelo. Es el último implemento que se utiliza previo a la siembra

Figura II- 2: Implementos utilizados en la labranza convencional (LC).



Figura II- 3: Sembradora de Siembra directa con reja.

Detalle del corte que produce la reja en el suelo cubierto por rastrojos y una semilla en el fondo del surco.

El movimiento de suelos prácticamente nulo en SD produce, respecto de otros sistemas de laboreo, una serie de cambios en varias propiedades edáficas. Además, los residuos en superficie reducen la erosión del suelo, ya que lo protegen del impacto de las gotas de lluvia, disminuyendo el escurrimiento del agua, ampliando el tiempo de permanencia, lo que mejora la infiltración. Una de las desventajas que presenta este tipo de manejo es la necesidad de emplear una mayor cantidad de agroquímicos que en la labranza convencional.



Figura II- 4: Soja sembrada por siembra directa (a la izquierda). Maíz sembrado sobre suelo trabajado con labranza convencional (a la derecha).

Abajo detalle de la estructura de los suelos trabajados con los diferentes métodos: macroporos en SD y microporos en LC. (Fuente: Rodolfo Gil INTA Castelar).

Los suelos manejados con SD presentan, en relación a los suelos manejados bajo LC, contenidos significativamente mayores de P, Mg, carbono orgánico total, N total y N mineral

(Dorr de Quadros et al. 2012), incrementando la actividad biológica y enzimática, favoreciendo el aumento de la biomasa de microorganismos del suelo, entre los que se incluye a los rizobios (Powlson&Jenkinson 1981; Hungria et al. 1997a; Silva et al. 2013). Por el contrario, según los autores Dorr de Quadros y colaboradores (2012) en particular la población de bradyrizobios del suelo, no fue modificada por el tipo de labranza, en tanto que se vio afectada de manera significativa por la fertilización nitrogenada y por los cultivos empleados en las rotaciones. Se encontró que la población de rizobios aumentó cuando se incluyeron leguminosas en la rotación.

La Tabla 3 presenta algunas de las principales características de la labranza convencional y de la siembra directa, fundamentalmente en Hapludoles de la región pampeana (Barraco et al. 2004; Zanettini et al. 2014).

Tabla 3: Principales diferencias entre labranza convencional y siembra directa.

	Labranza convencional LC	Siembra directa SD
Contenido de materia orgánica (MO)		Incrementa el contenido de MO en el horizonte superficial. Incrementa el proceso de humificación de la MO en sus formas más estables a través de la formación de complejos órgano – minerales. Conserva y mejora la fertilidad del suelo.
Compactación del suelo	Las maquinarias empleadas aumentan los problemas de compactación, Formación de pisos de arados (densificación subsuperficial). Fragmentado físico y ruptura de la estructura promoviendo al refinamiento del suelo, formación de planchados y costras.	El suelo mantiene sus propiedades físicas (estructura), debido a que el terreno no es removido.
Aireación y la infiltración	Menor infiltración de agua de lluvia, en condiciones subóptimas de aportes hídricos. Disminución del intercambio gaseoso Se mejora sólo en zonas secas y suelos pesados.	La evaporación se reduce gracias a la presencia de la cobertura que impide la acción directa de los rayos solares y determina una mayor infiltración del agua de lluvia. Como consecuencia de esto, se reducen las necesidades de riego y en general los requerimientos de agua. Mejor estructura por la mayor acumulación de materia orgánica y condiciones para la cohesión entre partículas minerales.
Fertilizantes, correctivos y algunos plaguicidas	Se facilita la incorporación. El control de ciertas plagas es por medio del laboreo.	Inconveniente: uso obligado de herbicidas.
Erosión	Mayor susceptibilidad a la erosión tanto hídrica como eólica.	No presenta ningún tipo de erosión. Los residuos presentes en el suelo disipan la energía de las gotas de lluvia evitando así la desagregación y acción erosiva del agua, y también reducen el impacto del viento directamente sobre el suelo.

Población de rizobios naturalizados.

El manejo de los lotes de producción agrícola altera las propiedades físicas y químicas del suelo, lo que afecta directamente a la microbiota (Dorr de Quadros et al. 2012). Cada tecnología de manejo genera estreses a los que ciertos individuos de las poblaciones microbianas se adaptan. Esta adaptación dará lugar a cambios morfológicos, fisiológicos y genéticos de los microorganismos del suelo entre los que se encuentran las cepas de *Bradyrhizobium* que nodulan la soja (Hungria et al. 1996; Boddey & Hungria 1997; Loureiro et al. 2007). Yan et al. (2014) evaluaron la abundancia de bradyrizobios en suelos con diferentes manejos y encontraron que cuando se incluye soja en las rotaciones, las poblaciones de rizobios se mantienen entre 10^5 - 10^6 bacterias.g de suelo⁻¹; mientras que en suelos desnudos o sin la leguminosa se encuentran 10^2 - 10^3 bacterias.g suelo⁻¹.

Estudios realizados en suelos de Brasil, demostraron que las poblaciones de *Bradyrhizobium* fueron modificadas cuantitativa y cualitativamente, por el sistema de labranza y los cultivos empleados en la rotación (Ferreira et al. 2000; Loureiro et al. 2007). Se ha descrito que suelos cultivados con rotaciones soja/maíz, contuvieron poblaciones de 3×10^2 - 5×10^3 rizobios. g de suelo⁻¹, aún cuando éstos no se inocularon durante un largo periodo de tiempo, sugiriendo entonces la persistencia de estas bacterias en los suelos (Triplett et al. 1993). Si bien la rotación con cereales en general incrementó la biodiversidad del suelo (Dorr de Quadros et al. 2012), las comunidades de rizobios se vieron favorecidas por la presencia de la planta huésped (Hungria et al. 1997b; Loureiro et al. 2007; Barthelemy-Delaux et al. 2014). Esto podría deberse al efecto promotor de las raíces (efecto rizosférico) en general y en particular, en el caso de los rizobios, la posibilidad que tienen de establecer simbiosis y vivir dentro de los nódulos, que es una situación ventajosa respecto a la vida en el suelo (Pena-Cabriales & Alexander 1983; Ferreira et al. 2000), ya que la vida saprotrófica está en función de factores ambientales y nutricionales (tipo de suelo, temperatura, humedad, pH, fertilización nitrogenada) que son cambiantes, mientras que el nódulo provee un ambiente más estable (Martinez -Romero & Caballero Mellado 1996; Yang et al. 2001; Albareda et al. 2009; Dorr de Quadros et al. 2012). La diversidad microbiana que surge de la adaptación a las condiciones del ambiente, es una fuente de microorganismos para seleccionar cepas de bradyrizobios que nodulen con mayor eficiencia bajo condiciones de estrés (Santos et al. 1999; Ferreira et al. 2000; Loureiro et al. 2007).

Características y diversidad fenotípica de los rizobios

El fenotipo es la expresión del genotipo influenciado por las condiciones ambientales. Es posible que sólo ciertos genes, y no todos, se expresen en determinado tiempo y ambiente, de manera que el fenotipo refleja parcialmente la información genética de un organismo.

Durante muchos años los organismos se identificaron empleando los métodos clásicos como las características morfológicas y las pruebas fisiológicas y/o bioquímicas y sobre estos criterios se clasificaron. En la actualidad si bien las características descritas siguen siendo de relevancia deben ser acompañadas por otro tipo de análisis fundamentalmente debido a que estas pruebas son variables y dependen de múltiples factores: entre otros, la edad del cultivo bacteriano o la temperatura de incubación, etc. Tanto las características macroscópicas de las colonias (forma, tamaño y color) como las características de las propias células, que se observan con el microscopio óptico (forma, tamaño, presencia de endosporas, flagelos, cuerpos de inclusión, etc.) son de gran utilidad en taxonomía bacteriana. Las pruebas bioquímicas y fisiológicas utilizadas en taxonomía microbiana incluyen el crecimiento del organismo en diferentes rangos de temperatura, pH, salinidad, el crecimiento en presencia de agentes anti-microbianos, producción de diversas enzimas y el crecimiento en presencia de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno. Estas pruebas tienen que ser llevadas a cabo utilizando procedimientos estandarizados para obtener resultados que sean reproducibles dentro y entre laboratorios. Individualmente, muchas de estas características han demostrado ser irrelevantes como parámetros para la relación genética entre microorganismos, aunque en su conjunto, proporcionan información descriptiva que nos permite reconocer a los taxa (Vandamme et al. 1996).

La diversidad fenotípica fue uno de los criterios originales utilizados para clasificar a las cepas. Varios estudios, han evaluado la diversidad de los aislados en base a la morfología de las colonias, la tolerancia a temperatura y salinidad, antibiograma, síntesis de melanina, producción de exopolisacáridos (EPS) y crecimiento en medio LB (Ferreira et al. 2000; Hungria et al. 2001; Camacho et al. 2002).

En Brasil, Hungria y colaboradores (2001) describieron aislamientos de bradyrizobios que presentaron diferentes tipos de colonias en lo que hace al tamaño y su mucosidad, sin embargo esto no se encontró que estuviese asociado al manejo del cultivo, ni a las características de suelo. Fuhrmann (1990) aisló cepas que nodulan soja que difieren en la morfología de sus colonias y definió tres grupos: grandes-mucosas, grandes-acuosas y pequeñas-secas. Se encontró que en la población indígena predominaban las colonias mucosas. Se ha sugerido que las diferencias en la morfología de las colonias podría estar relacionado con el tipo y cantidad de EPS producidos (Fuhrmann 1990; Basit et al. 1991).

Se han propuesto varias técnicas para monitorear el comportamiento de los rizobios, en relación a la asociación simbiótica y a la identificación de las cepas. Los programas de inoculación requieren que se utilicen cepas capaces de establecerse y persistir en los ambientes donde son introducidas. La resistencia intrínseca a antibióticos, como la estreptomycin, puede relacionarse con la capacidad de los rizobios para resistir sustancias antimicrobianas presentes en los suelos (Borges et al. 1990). Las cepas que tienen estas resistencias naturales podrían tener una ventaja de adaptación a las condiciones del suelo, sin comprometer la capacidad de fijación de nitrógeno de la bacteria (Girgis et al. 2007). Otros estudios han revelado que la temperatura tiene una influencia directa sobre la competitividad de los bradyrizobios. Así, Suzuki y colaboradores (2014) demostraron que las cepas tipo de *B. elkanii* ocupan un mayor número de nódulos en condiciones de alta temperatura (34/28 °C), mientras que *B. diazoefficiens* USDA110 ocupa más nódulos en condiciones de más baja temperatura (23/18 °C).

El interés agronómico en la caracterización de los rizobios simbioses de soja se centra fundamentalmente en identificar individuos con capacidades de nodulación y fijación de nitrógeno distintos de manera de lograr un aumento en el rendimiento y calidad de las leguminosas, sin que esto implique una pérdida de nutrientes para el suelo (Melchiorre et al. 2011). Las poblaciones alóctonas de rizobios suelen contener aislados altamente competitivos, que interactúan eficientemente con las raíces de las leguminosas y las infectan, aunque estas simbiosis suelen ser poco eficientes en cuanto a la fijación de N₂ (Denison & Kiers 2004). La variabilidad entre las cepas de rizobios podría ser un factor importante a considerar en la selección y preservación de los cultivos para la producción de inoculantes (Kober & Giongo 2004).

La capacidad de infección y fijación de N₂, se puede determinar por diversos métodos, con parámetros que permiten estimarlos directa o indirectamente (Somasegaran & Hoben 2012; Unkovich et al. 2008; Terpolilli et al. 2012). Algunos de los métodos más empleados para evaluar la actividad nitrogenasa, el rendimiento o el contenido de N incorporado por la fijación son:

- Actividad nitrogenasa: Método de reducción de acetileno, Ensayo de evolución de H₂, Recuento y peso seco de nódulos.
- Rendimiento: Peso seco de la parte aérea, Cuantificación de ureidos.
- Contenido de N incorporado: Métodos isotópicos con ¹⁵N, Método de Kjeldahl.

El recuento y peso seco de nódulos (PSN) es un indicador indirecto de la capacidad de fijación de N₂. Se considera que los rizobios que son más infectivos y eficientes son aquellos que forman pocos nódulos y de mayor tamaño, y que se encuentran ubicados en la zona del cuello de

la raíz. Estos deben presentar una coloración interna rojiza, que indica la presencia de la leghemoglobina (Vincent 1970). Por otro lado, los rizobios poco eficientes producen un gran número de nódulos de pequeño tamaño, frecuentemente distribuidos en las raíces secundarias. Este parámetro permite realizar una estimación de la eficiencia e infectividad de los rizobios.

La determinación del peso seco de la parte aérea (PSA) se emplea para estimar la actividad de FBN. La biomasa de la planta refleja de manera indirecta esta actividad, fundamentalmente porque la producción de materia seca es una función directa de la disponibilidad de N. Este parámetro se evalúa en cultivos realizados sin el agregado de N en el sustrato, de manera que el desarrollo de la planta dependa exclusivamente de la actividad de la nitrogenasa.

En síntesis, los sistemas de labranza alteran los suelos y esto impacta directamente sobre la dinámica de las poblaciones que lo habitan, entre ellas las poblaciones de rizobios. La cantidad de estas últimas también es una función de la historia de cultivo del lote. Esa población naturalizada de rizobios es diversa a nivel de características fenotípicas, bioquímicas y genéticas. Por ello se plantearon los siguientes objetivos para este capítulo:

- realizar el recuento y aislamiento de simbioses de soja de suelos con historia de cultivo conocida.
- caracterizar fisiológicamente los aislados y analizar la diversidad fenotípica.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Descripción de los suelos muestreados

Para cumplir los objetivos planteados se seleccionaron suelos de un establecimiento agropecuario de la localidad Runciman, provincia de Santa Fe (Fig. II-5). Se muestrearon dos lotes, uno de ellos fue manejado en los últimos 8 años con LC (labranza convencional) (Fig. II-6), en tanto que el otro suelo, durante el mismo período, fue manejado con SD (siembra directa). Al momento de la toma de las muestras, el suelo trabajado bajo LC tenía como cultivo antecesor al maíz y soja cuando se muestreó el lote bajo SD (Tabla 4).



Figura II- 5: Ubicación de la localidad de Runciman, provincia de Santa Fe.



Figura II- 6: Secuencia de labranzas realizadas en el lote laboreado bajo labranza convencional (LC): Arado de Disco (1); luego Cincel con Rastra (2) y para cerrar Disco, Rastra de dientes y Rolo (3), de izquierda a derecha.

Tabla 4: Historia de los lotes muestreados

Año	Lote SD (60 Ha)		Lote LC (46 Ha)	
	Cultivo	Laboreo	Cultivo	Laboreo
1	Pastura		Maíz	Labranza Convencional
2	Maíz	Labranza Convencional	Pastura	Labranza Convencional
3	Trigo-Soja	Siembra Directa	Pastura	Labranza Convencional
4	Maíz	Siembra Directa	Maíz	Labranza Convencional
5	Soja 1°	Siembra Directa	Trigo-Soja	Labranza Convencional
6	Trigo-Soja	Siembra Directa	Maíz	Labranza Convencional
7	Maíz	Siembra Directa	Soja 1°	Labranza Convencional
8	Soja 1°	Siembra Directa	Trigo-Soja	Labranza Convencional
9	Trigo-Soja 2°	Siembra Directa	Maíz	Labranza Convencional



Toma De Muestra

Los suelos muestreados son Hapludoles típicos serie Santa Isabel. Estos se caracterizan por ser suelos con horizontes no muy desarrollados, con secuencia A-B2-B3-C. Presentan textura relativamente liviana (franco), o con textura franco arcillo arenosa, con una proporción media, entre los 0-20 cm, de 16 % arcilla, 43 % limo, 41 % arena. Este tipo de suelo tiene una buena capacidad de retención de humedad debido a la presencia de una mayor proporción de materiales finos (arcilla y limo) (SAGYP- INTA 1989).

En la Tabla 5 se presentan los datos que surgen del análisis físico químico de las muestras de suelo. Se observa que poseen un pH levemente ácido, un contenido de NO_3^- y SO_4^{-2} alto en tanto que el P extractable es bajo en el lote SD (11.2 ppm) y adecuado en el lote LC (23.6). El % de MO es bueno en ambos lotes aunque un 10 % mayor en el LC. La importancia de la presencia de MO radica fundamentalmente en que, además de nutrientes, aporta estabilidad a los agregados del suelo, debido a su fuerte poder cementante o de agregación, entre las partículas primarias, arcilla, limo y arena, permitiendo una buena estructura.

Tabla 5: Análisis de los suelos muestreados, valores promedios de las submuestras de cada uno, SD y LC.

Muestra	Parámetro			
	NO ₃ ⁻ (ppm)	P (ppm)	MO (%)	SO ₄ ⁻² (ppm)
SD	42.0	11.2	3.08	16.2
LC	51.96	23.6	3.36	16.1

1.1. Toma de muestra

Se extrajeron cinco submuestras de suelo, cada una aproximadamente de 1 kg, de los tratamientos lote bajo SD (SD1 al SD5) y lote bajo LC (LC6 al LC10). En la foto aérea se señala la ubicación de los puntos de muestreo (Fig. II-7).

Las submuestras se tomaron a una profundidad de 0-20 cm con una pala que se desinfectó con alcohol 96° y se flameó, previo a cada extracción. Las submuestras se mantuvieron como tales e identificadas a lo largo de todo el estudio. Una vez en el laboratorio, las muestras de suelo fueron conservadas a 4 °C, no más de 72 hs, hasta su procesamiento.



Figura II- 7: Foto aérea del establecimiento ubicado en Runciman. Se señalan los sitios de donde se tomaron las diez muestras de suelo (SD, siembra directa y LC, labranza convencional).

(Google Earth, <https://www.google.com/maps/place/Runciman,+Santa+Fe,+Argentina/@-33.8952943,-61.8305066,1234m/data=!3m1!1e3!4m2!3m1!1s0x95c7d893f7fdf72d:0xf855f3af1d328b47>)

1.2. Preparación de las muestras

Las muestras de suelo fueron oreadas a temperatura ambiente entre 3-6 hs para eliminar el exceso de humedad, luego fueron tamizadas utilizando primero una malla de 5 mm y luego una de 2 mm. Los tamices se desinfectaron, con alcohol 96° y se flamearon antes de tratar cada submuestra con el fin de evitar contaminaciones.

1.3. Determinación del peso seco y pH

Una fracción de 100 g de cada una de las submuestras se secó en estufa a 70 °C para determinar el peso seco de suelo.

Para establecer el pH de cada submuestra de suelo, se pesaron 10g y se mezclaron con 25 mL de agua destilada y se empleó la metodología utilizada por Díaz-Zorita y colaboradores (2004).

2. Recuento de los rizobios de suelos, método del NMP

Las poblaciones de rizobios de los suelos se estimaron por la técnica del Número Más Probable (NMP), que es una estrategia eficiente de valoración de densidades poblacionales especialmente cuando una evaluación cuantitativa de células individuales no es factible (Woomer 1994). Para realizar el recuento de rizobios nodulantes de soja se inocularon semillas de soja con diluciones de suelo, según se detalla en la Fig. II-8.

2.1. Preparación del inóculo

Se prepararon, para cada submuestra, series de diluciones 1:5 (Fig. II-8). En erlenmeyers conteniendo 400 mL de una solución salina estéril, constituida por: 0,125 g K_2PO_4 y 0,05 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ en 1000 mL de agua destilada, se incorporaron 100 g de suelo de cada submuestra. La mezcla se agitó durante 20 minutos a 150 rpm, en agitador orbital con el objetivo de que se dispersen los agregados de suelo y las bacterias queden en suspensión. De esta manera se obtuvo la *dilución 1*. A continuación se realizaron una serie de diluciones para lo cual se tomaron 5 mL de la primera dilución que se adicionaron a 20 mL de la solución salina (*dilución 2*), se agitó por 1 min y se repitió el proceso hasta lograr la *dilución 6* (Fig. II-8). Se emplearon alícuotas de cada dilución como inóculo para las plantas de soja que se utilizaron como “plantas trampa”.

2.2. Cultivo de plantas trampa de soja

Semillas de soja (*Glycine max* [L.] Merr.) de la variedad DM 4800, provistas gentilmente por el semillero DONMARIO (RN7, 6740 Chacabuco, Buenos Aires) se esterilizaron superficialmente lavando con alcohol 96° al 50 % durante 5 min, y luego con hipoclorito de sodio al 30 % (v/v) por 5 min, agitando para facilitar el contacto de la solución con todas las semillas. Posteriormente se lavaron con agua corriente, para eliminar totalmente el hipoclorito de sodio. Las semillas se pregerminaron en placas de Petri conteniendo agar agua 1 % (p/v), durante 48 hs a 28 °C en oscuridad. Las semillas con radículas de 0,5 a 1 cm de largo se sembraron en cada jarra de Leonard.

2.3. Sistema de cultivo de plantas

Las jarras de Leonard de 500 cm³ de capacidad, se prepararon utilizando como sustrato vermiculita estéril hidratada con solución nutritiva de Jensen (solución Jensen 5X (g.L⁻¹): CaHPO₄ 1; K₂HPO₄ 0,2; MgSO₄.7H₂O 0,2; NaCl 0,2; FeCl₃ 0,1; agua hasta 1000 mL) (Vincent 1970).

Dos plántulas de soja fueron trasplantadas a cada jarra de Leonard, y luego cada una fue inoculada con un (1) mL de cada dilución (Fig. II-8). Se realizaron cuatro réplicas de cada dilución. En el momento de emergencia y establecimiento de las plantas se realizó un raleo dejando una planta por jarra. Las plantas se mantuvieron en invernáculo, en condiciones semi controladas con un fotoperiodo de 16 h y temperaturas de 27 ± 3 °C durante el día y 20 ± 3 °C por la noche.

Al cabo de 45 días se cosecharon las plantas de soja. Las raíces fueron lavadas cuidadosamente con agua corriente. Se registró como positivo (+) o negativo (-), la presencia o ausencia de nódulos en cada planta, respectivamente y se confeccionó una tabla en la que se identificó el número de plantas noduladas por tratamiento (Woomer 1994). Además se contaron y extrajeron todos los nódulos de cada planta, para luego realizar el aislamiento de los microorganismos.

El trabajo se organizó inoculando las plantas con las submuestras en grupos, para facilitar la manipulación del material y la cosecha.

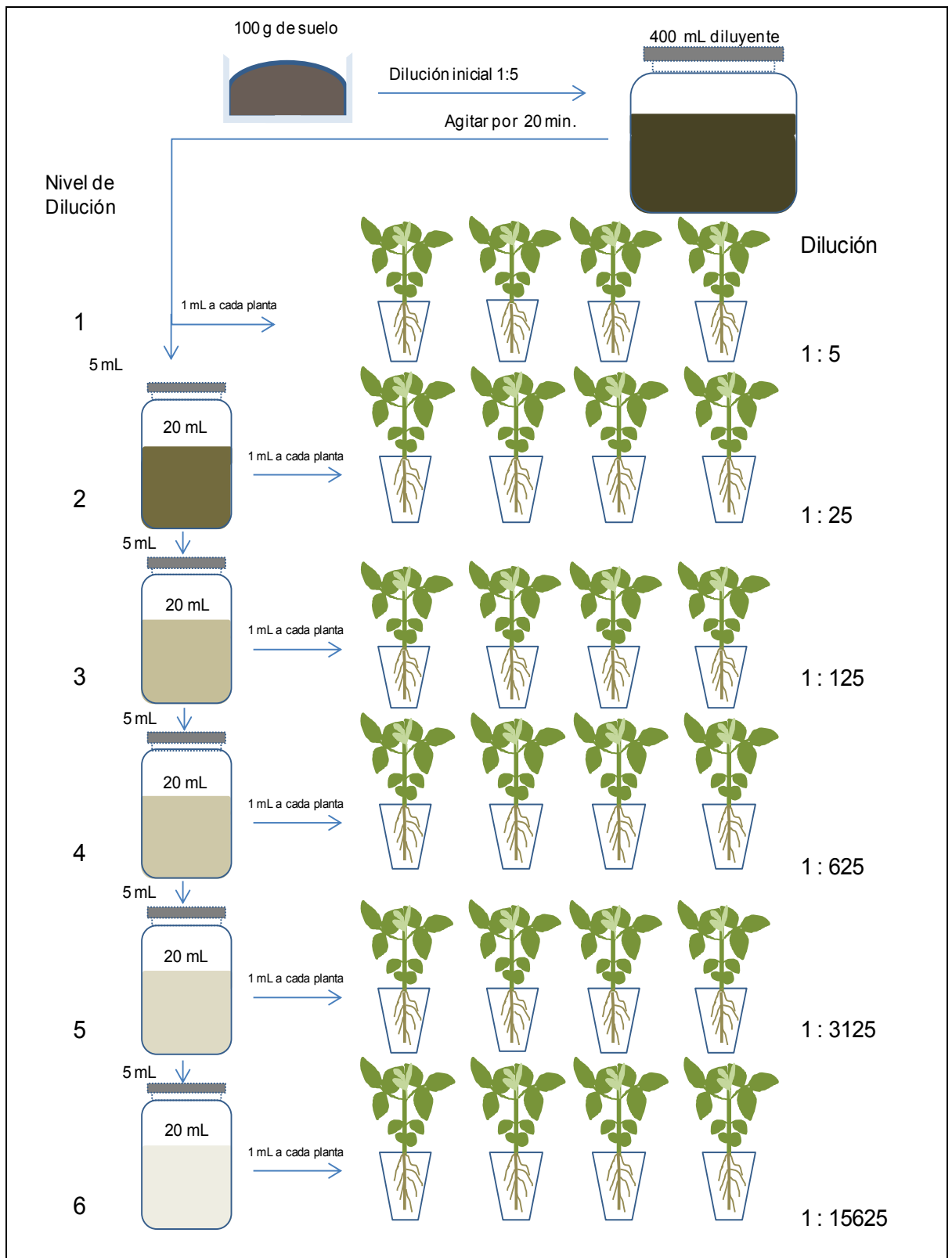


Figura II- 8: Esquema del método de recuento del Número Más Probable de rizobios empleando plantas "trampa" de soja. Extraído de Woomer 1984.

2.4. Empleo de *MPN calculator*

El programa *MPN calculator* permite relacionar el número de plantas noduladas por dilución (Número clave) con el número más probable (NMP) de rizobios por gramo de suelo (Fig.II-9). Deben ingresarse los datos de las diluciones empleadas y los números de plantas noduladas por dilución (Número clave) obtenidos en el ensayo, con los cuales el programa calcula los valores más probables (NMP) de rizobios.g de suelo⁻¹, junto con los valores mínimos y máximos posibles con 95 % de confianza.

Mediante el programa Statistica se aplicó el análisis ANOVA para evaluar los resultados del NMP de rizobios.g suelo⁻¹ de cada submuestra.

Grams per test	Tests	Positive tests
0.2	4	4
0.04	4	4
0.008	4	4
0.0016	4	3
0.00032	4	3
0.000064	4	2

MPN/Gram	95% CI LL	95% CI UL
2100	790	5600

Figura II- 9: *MPN calculator*,

Se indican los datos de diluciones aplicadas (*Grams por test*), réplicas (*tests*) y resultados obtenidos (*Positive tests* = plantas noduladas), el programa calcula el NMP (Número Más Probable) de rizobios.g suelo⁻¹ (*MPN/Gram*). (<http://www.i2workout.com/mcuriale/mpn/index.html>).

3. Aislamiento de rizobios nodulantes de soja

Las cepas bacterianas para este estudio se extrajeron de los nódulos producidos en las raíces de las plantas cultivadas para obtener el NMP de rizobios.

Los nódulos de cada planta fueron desinfectados superficialmente por lavados con alcohol al 50 % (v/v) e hipoclorito de sodio al 50 % (v/v), por 3 min cada uno, luego se los enjuagó con 6 lavados de agua destilada estéril y se almacenaron en glicerol al 10 % a -70 °C hasta el momento de realizar el aislamiento de los rizobios.

3.1. Selección de nódulos

Con el objetivo de obtener los aislados para trabajar se seleccionaron de cada submuestra de suelo aproximadamente 10 nódulos de las plantas inoculadas con la dilución mayor (dil.6) y 10 nódulos de plantas inoculadas con la menor dilución (dil.1).

3.2. Aislamiento de rizobios.

Cada nódulo seleccionado fue colocado en un tubo *Eppendorf* conteniendo 100 μL de agua destilada estéril y fue macerado para liberar los rizobios, formando una suspensión de bacterias. A partir de estas suspensiones, se realizó el aislamiento mediante la técnica de estrías por agotamiento sobre el medio de cultivo diferencial YEM (Extracto de levadura-manitol) (Componentes en g.L^{-1} : extracto de levadura 0,4; manitol 10; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2; K_2HPO_4 0,5 y NaCl 0,1, agar 18; y solución de rojo Congo para una concentración final de 0,0025 %; pH a 6,9). La esterilización del medio y de las placas de Petri se realizó en autoclave, a 121 °C durante 20 minutos (Vincent 1970). Las placas sembradas se incubaron a 28 °C por 7 días. Luego de la incubación se observó el desarrollo de las estrías (aspecto, coloración, velocidad de crecimiento) y aquellas colonias aisladas que se correspondieron a las características descritas para los bradyrizobios (Vincent 1970) fueron repicadas a otra placa con medio YEM para disponer de cultivos puros.

3.3. Conservación de las cepas

Los cultivos puros se mantuvieron en pico de flauta con medio YEM a 4 °C, para su empleo cotidiano. En tanto que para conservar las cepas por un período prolongado, se prepararon cultivos líquidos en caldo YEM. Cuando estos alcanzaron la fase logarítmica tardía (aproximadamente 7 días), se fraccionaron los cultivos, se adicionó a cada fracción una solución de glicerol estéril como crioprotector (10 % volumen final) y luego se congelaron rápidamente con N_2 líquido y fueron almacenados a -70 °C (Vincent 1970).

4. Cultivo de los aislados para las pruebas fisiológicas

Los aislados se cultivaron durante 5-7 días en caldo YEM. Alternativamente se realizaron cultivos también en caldo TY (Tryptona-Yeast extract) (ver el ítem Producción de melanina) en agitación continua (150 rpm).

El número de bacterias en el caldo de cultivo se estimó por densidad óptica con un espectrofotómetro SHIMADZU Modelo UV 160, realizando lecturas de absorbancia a 625 nm (Densidad óptica a DO_{625}). Previamente se realizó un ensayo en el que se correlacionó la DO_{625}

con recuentos de unidades formadoras de colonias (UFC) de las suspensiones celulares. Dando como resultado la siguiente equivalencia:

$$\text{Valor de absorbancia} = 1, \text{ representa } 1,2 \times 10^9 \text{ bacterias.mL}^{-1}$$

A continuación se describen las pruebas fisiológicas que fueron realizadas en medio sólido con agar y por triplicado.

Se empleó como cepa de referencia a *Bradyrhizobium japonicum* E109, que es un aislado derivado de *B. japonicum* USDA138, provista por el banco de cepas IMyZA-INTA. Esta cepa es la más empleada en la formulación de inoculantes comerciales en el país. Los controles empleados según los distintos ensayos se enumeran en la Tabla 6.

Tabla 6: Cepas empleadas como controles en las distintas pruebas fisiológicas. (INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria; EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria).

Especie	Cepa	Referencia
<i>B. japonicum</i>	E109	INTA
	SEMIA5079	EMBRAPA
<i>B. diazoefficiens</i>	SEMIA5080	EMBRAPA
<i>B. elkanii</i>	SEMIA5019	EMBRAPA
	SEMIA587	EMBRAPA
<i>Ensifer fredii</i>	HH103	Dowdle & Bohlool (1985)

5. Tamaño-Consistencia de colonia

Se realizaron diluciones decimales de los cultivos de cada cepa crecidos en caldo YEM. Luego se sembraron 100 μ L de la dilución correspondiente para obtener entre 30 y 300 UFC sobre una placa con medio YEM suplementado con rojo Congo (0,0025 %). Las placas fueron incubadas en estufa a 28 °C y se realizaron observaciones diarias, hasta ver la aparición de colonias típicas de bradyrizobios (Coutinho et al., 1999; Ferreira & Hungria, 2002; Loureiro et al. 2006).

Se registró el diámetro para todos los aislados a los 7 días de incubación.

Con ayuda de un ansa se determinó la mucosidad (consistencia) de las colonias en base a la descripción de Fuhrmann (1990) modificado:

- Mucosa: colonias que producen un mucus más o menos elástico, que queda adherido al ansa.
- Acuosa: colonias con consistencia acuosa no adherente, que con el tiempo de incubación se escurren en el agar inclinado.

- Intermedia: colonias con consistencia mucosa-cremosa que se desprenden fácilmente del ansa.
- Seca: colonias sin ningún tipo de exudado.

Se determinó la variación en el tamaño de las colonias en el tiempo de un grupo de 15 aislados representativos de cada tipo de colonia identificada. Para tal fin se registraron los diámetros a los 4, 7, 9, 12 y 14 días de cultivo.

6. Prueba acidificación – alcalinización

Placas de Petri con medio YEM adicionado con el indicador de pH Bromotimol azul (25 mg.L⁻¹, solución de Bromotimol azul: 0.5 % (p/v) en alcohol etílico 96°) se dividieron en 9 celdas en las que se sembraron, en cada una, 3 µL de cultivo líquido de cada cepa (1x10⁶ células.mL⁻¹). Se incubaron a 28 °C por 7 días. La determinación se realizó observando la variación de color del indicador alrededor de cada colonia: pH menor a 6,5 color amarillo, pH 7 color verde, pH superior a 7,5 color azul (Ferreira & Hungria 2002).

Se incluyeron como controles internos *Ensifer fredii* HH103 como cepa que se ha demostrado acidifica el medio de cultivo y *B. japonicum* E109 cepa que alcaliniza, y una celda sin inocular se consideró como control negativo (Somasegaran & Hoben 1985, Camacho et al. 2002).

7. Producción de melanina

Se aplicó la metodología descrita por Cubo y colaboradores (1988). Se cultivaron los aislados en tubos con 3 mL de caldo TY (Componentes en g.L⁻¹: peptona o triptona 5; extracto de levadura 3; CaCl₂ 0.6; agar 18; pH 7). Se realizaron diluciones decimales para ajustar la concentración de células a 10⁴.mL⁻¹. Luego se sembraron 3 µL de cada cepa en placas divididas en 16 celdas, con medio TY agar adicionado con L-tirosina (600 mg.L⁻¹ de medio, solución stock: 30 mg. mL⁻¹, autoclavada a 0,7 atm durante 7 min) y SO₄Cu₂ (40 mg.L⁻¹ de medio, solución stock: 10 mg. mL⁻¹, autoclavada). La incubación se realizó a 28 °C por 7-10 días.

La determinación se realizó agregando 0,05 mL de SDS al 10 % sobre cada colonia (solución stock: 10 g en 100 mL de buffer TBE, pH 8,3 (stock TBE 5x: 54 g de base Tris y 27,5 g de ácido bórico en 900 ml de agua desionizada, 20 ml de 0,5 M EDTA (pH 8,0) y volumen final de 1 L). Se dejó en incubación 24 horas a T° ambiente.

La producción de melanina se evidenció por la aparición de un color marrón oscuro en la colonia. También en este caso se incluyeron como controles internos una cepa de *Ensifer fredii* HH103 como control positivo y *B. japonicum* E109 como control negativo.

8. Tolerancia a alta temperatura.

Placas con medio YEM fueron divididas en 24 celdas. Se sembró en cada una 3 μL de cultivo líquido de cada aislado con una concentración de 10^6 bacterias. mL^{-1} y luego se cerraron con film de manera de evitar la desecación del medio de cultivo. Las placas se incubaron a tres temperaturas, 28 °C, 37 °C y 40 °C. A los 4, 7 y 15 días de la inoculación se realizó la evaluación que consistió en determinar el diámetro de las colonias, estableciendo siempre una relación con el tamaño alcanzado por la colonia a 28 °C utilizado como control. Se consideró crecimiento positivo cuando la colonia alcanzó al menos 50 % del diámetro respecto al control. Como referencia se utilizó la cepa *B. japonicum* E109 (Ferreira & Hungria, 2002).

9. Tolerancia a la salinidad

Se evaluó la tolerancia a salinidad incorporando al medio de cultivo YEM 0,5 % (p/v) (0,08 M) y 2 % (p/v) (0,3 M) de NaCl. El control consistió en una placa con medio YEM, que contenía 0,01 % (p/v) (0,0016 M) de NaCl. A los 10 días de incubación a 28 °C se determinó el diámetro de las colonias, el cual se comparó con el de las colonias desarrolladas en la placa control con medio YEM con 0,01 % de NaCl (Ferreira & Hungria, 2002). Los aislados se sembraron y evaluaron de igual manera que en la prueba de tolerancia a alta temperatura.

10. Antibiograma – Resistencia intrínseca a antibióticos

Se prepararon placas con medio YEM con un espesor de 4 mm. Se sembraron sobre las superficies de cada una alícuotas de 100 μL de los cultivos de los aislados en caldo YEM, con una concentración de 10^3 células. mL^{-1} . Luego se dispersó el inóculo con una varilla de vidrio estéril y se depositaron 5 discos de papel embebidos en los antibióticos enumerados en la Tabla 7. Las placas se incubaron a 28 °C en oscuridad durante un período de 15 días realizándose dos observaciones, a los 7 y 15 días (Madrzak et al., 1995; Rodríguez-Navarro et al., 2000; Chen et al., 2002). El diámetro del halo de inhibición que se desarrolla alrededor de los discos es directamente proporcional a la sensibilidad del microorganismo al antibiótico. La resistencia a los antibióticos se determinó por la ausencia del halo alrededor del disco de papel.

Tabla 7: Contenido de antibióticos en los monodiscos empleados en el ensayo de resistencia-sensibilidad.

Antibiótico	Contenido de cada disco (µg):
cloramfenicol	30
rifampicina	5
eritromicina	15
ácido nalidixico	30
tetraciclina	30

11. Fenograma con características fisiológicas

En base a los resultados obtenidos con las pruebas fisiológicas se empleó el programa PAST.3 (PAleontological STatistics Version 3.11) para generar un fenograma.

12. Fijación simbiótica de Nitrógeno

Se procedió a evaluar la eficiencia simbiótica, capacidad infección y de fijación de N₂, de los 200 aislados en condiciones controladas. Para ello se inocularon semillas de soja con cada uno y se mantuvo el cultivo en invernáculo.

12.1 Inóculo

Erlenmeyers de 250 ml conteniendo 50 ml de medio YEM líquido se inocularon mediante un ansa con rizobios provenientes de picos de flauta mantenidos en heladera a 4 °C. Los cultivos se incubaron a 28 °C durante 5 días en agitador orbital rotatorio a 150 rpm. Al finalizar el período de incubación se estimó la concentración celular determinando la Densidad Óptica a 625 nm(DO₆₂₅) para estimar el número de bacterias.

12.2 Sistema de cultivo de la plantas

Las semillas de soja del cultivar A3731 RG Nidera se esterilizaron superficialmente por inmersión en etanol al 50 % y luego en hipoclorito de sodio al 30 %, durante 5 min en cada solución. Los residuos de hipoclorito se eliminaron lavando con agua corriente hasta la desaparición de vapores de hipoclorito. Las semillas se pregerminaron en agar agua al 1 % (p/v) y se incubaron a 28 °C durante 48 hs. Las jarras de Leonard, con una capacidad total de 500 mL, se prepararon empleando como sustrato vermiculita que se regó por capilaridad con solución nutritiva Jensen (libre de nitrógeno). Una vez armadas, se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 1 hora. Se trasplantaron dos plántulas a cada una, las que se inocularon adicionando 1 mL de una suspensión bacteriana conteniendo 1×10^7 bacterias (Fig.II-10).

Las jarras se mantuvieron en el invernáculo bajo condiciones controladas de temperatura ($25^{\circ}\text{C} \pm 2$) y fotoperiodo (8 hs/16 hs, noche/día, respectivamente). Se realizó un raleo en el momento en que las plántulas desarrollaron el primer par de hojas. El número de réplicas fue de 4 plantas por cepa y se incluyeron controles con plantas sin inocular y controles con plantas inoculadas con la cepa de referencia *B. japonicum* E109. Periódicamente se repuso el nivel de líquido en la parte inferior de las jarras con agua destilada (Vincent 1970).



Figura II- 10: Ensayo de Fijación de N_2 en jarras de Leonard, sustrato vermiculita y solución nutritiva Jensen (Vincent 1970).

12.3 Cosecha y tratamiento de las plantas postcosecha

A los 45 días de cultivo, fase de crecimiento V5 (quinto nudo) (Fehr & Caviness 1977), se descalzaron las plantas. Se separó la parte aérea (tallo y hojas) y los nódulos, con el fin de obtener el peso seco de nódulos (PSN) y el de la parte aérea de la planta (PSA), se secaron en estufa a 70°C hasta peso constante, aproximadamente 96 hs.

Un grupo de plantas fue seleccionado para evaluar el contenido de N total (%) por el método de Kjeldahl (Horneck & Miller 1998)

Los datos fueron analizados por ANOVA, comparando las medias mediante el Test de Tukey y LSD con $p < 0,05$, mediante el programa *Statistics*.

RESULTADOS

Determinación de humedad y pH de las muestras de suelo

Se midió el porcentaje (%) de humedad y el pH de cada submuestra de suelo. Los resultados se indican en la Tabla 8.

Tabla 8: Condiciones de humedad (%) y pH de las submuestras de suelo.

Submuestras	Humedad (%)	pH
SD1	20	5.89
SD2	20	5.71
SD3	21	5.47
SD4	21	5.45
SD5	23	5.28
LC6	21	5.28
LC7	21	5.22
LC8	21	5.14
LC9	21	5.2
LC10	21	5.80

Recuento de los rizobios de suelos. Método del NMP.

Las diez submuestras de suelo, cinco del tratamiento SD y cultivo antecesor soja y cinco del suelo LC y cultivo antecesor maíz, contuvieron rizobios (Fig. II-11). Las submuestras del suelo SD presentaron un recuento de rizobios.g de suelo⁻¹ que en promedio fue $8,12 \times 10^3$ (Fig. II-12) y el suelo bajo LC contuvieron menos rizobios, $5,81 \times 10^2$ rizobio.g suelo⁻¹ (Fig. II-13). Estos resultados indicaron que el número de rizobios simbioses de la soja en el suelo SD fue 14 veces mayor que en el suelo LC (ANOVA aplicado mostró diferencias significativas entre ambos tratamientos, SD y LC (Fig. II-13).

Los números del recuento de las submuestras SD variaron entre $2,62 \times 10^3$ (SD1) y $2,7 \times 10^4$ (SD2) (Tabla 8), es decir que en los distintos sectores del suelo manejado con SD, las poblaciones de rizobios variaron en un orden de magnitud (Fig. II-11 y II-12). Entre las submuestras LC el recuento de rizobios presentó una mayor variabilidad. La submuestra con mayor contenido de rizobios, LC6 ($1,4 \times 10^3$ rizobios.g suelo⁻¹) respecto a la submuestra con el menor contenido, LC10 (25 rizobios.g suelo⁻¹) presentó un número 56 veces mayor (Tabla 9). El resto de las submuestras LC7, LC8 y LC9, variaron entre $1,9 \times 10^2$ y $8,7 \times 10^2$ rizobios.g suelo seco⁻¹.

Tabla 9: NMP de rizobios en el suelo bajo SD y LC.

El “Número clave” es el número de plantas noduladas de cada dilución. El número de rizobios de cada submuestra se expresa como el NMP por g de suelo seco⁻¹, también se indican los límites superior e inferior del número de rizobios con 95% de confianza que calcula el *NMPCalculator*.

Submuestra	Labranza-antecesor-h	Número clave	NMP de rizobios.g de suelo seco ⁻¹	95% de confianza inferior/ superior		Promedio del NMP rizobios. g de suelo ⁻¹
SD1	SD soja (109 m)	444332	2.62x10 ³	790	5600	8.12 x10³
SD2	SD soja (104 m)	444443	2.75 x10 ⁴	1100	8000	
SD3	SD soja (108 m)	444332	2.65 x10 ³	790	5600	
SD4	SD soja (111 m)	444430	4.05 x10 ³	1200	8800	
SD5	SD soja (110 m)	444334	3.76 x10 ³	1100	8000	
LC6	LC maíz (112 m)	444222	1.40 x10 ³	410	2900	5.81 x10²
LC7	LC maíz (113 m)	433411	1.90 x10 ²	54	390	
LC8	LC maíz (109 m)	444032	8.70 x10 ²	250	1900	
LC9	LC maíz (102 m)	443220	4.20 x10 ²	130	860	
LC10	LC maíz (97 m)	312211	2.50 x10 ¹	7.4	52	



Figura II- 11: NMP de rizobios.g suelo⁻¹, de cada una de las submuestras de suelo bajo SD y LC.

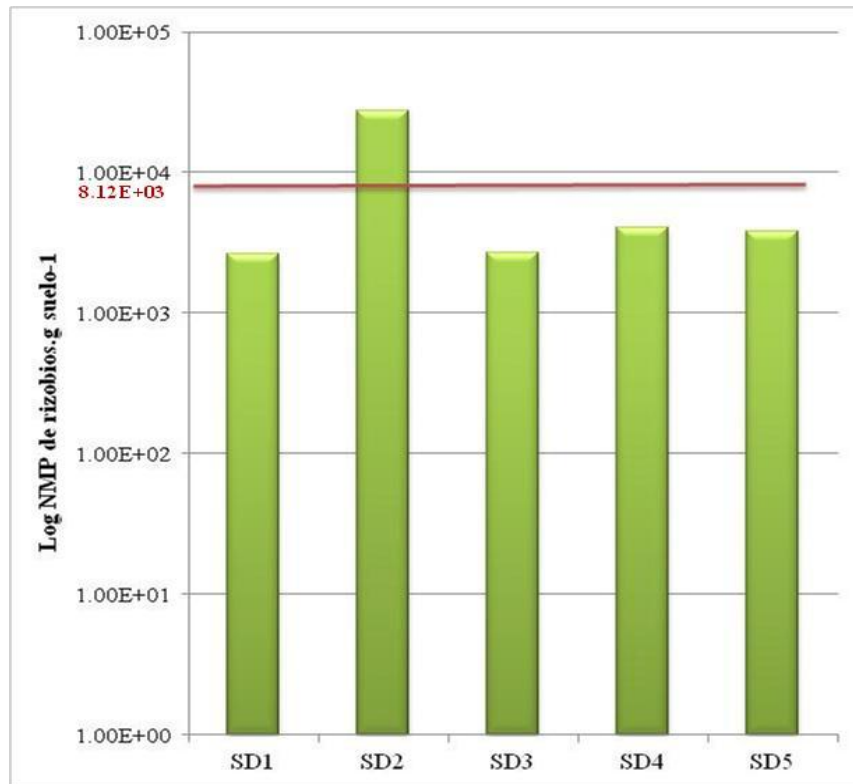


Figura II- 12: Log. del NMP de rizobios.g suelo⁻¹ de las submuestras del suelo SD. La línea roja representa el promedio: $8,12 \times 10^3$ rizobios.g de suelo⁻¹.

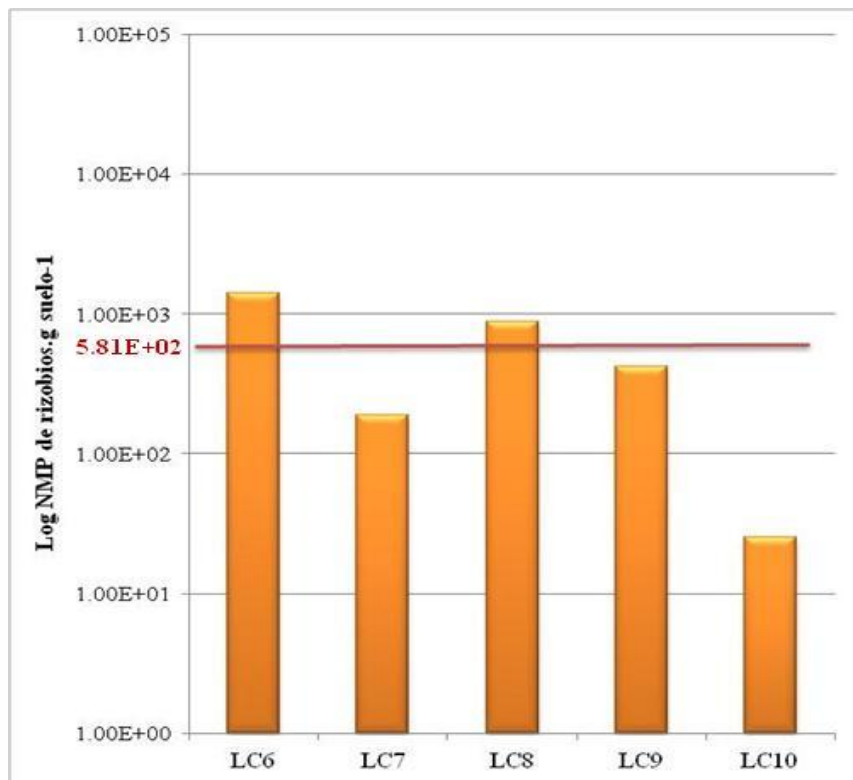


Figura II- 13: Log. del NMP de rizobios.g suelo⁻¹ de las submuestras del suelo LC. La línea roja representa el promedio: $5,81 \times 10^2$ rizobios.g de suelo⁻¹.

Eficiencia de Infección

Se evaluó el porcentaje de plantas que desarrollaron nódulos cuando estas fueron inoculadas con las diluciones (1° a 6°) de las muestras SD y LC. Para el análisis se han considerado las submuestras SD1, SD2, SD3, SD4 y SD5 como una muestra única de SD, de la misma manera para el suelo LC se incluyeron las submuestras LC6, LC7, LC8, LC9 y LC10.

Se observó que aún las plantas inoculadas con la mayor dilución de suelo (6°, 1:15625) desarrollaron nódulos, aunque como era de esperar, en la medida que la dilución fue mayor el número de plantas noduladas disminuyó.

Cuando se inoculó con la menor dilución (1°: 1:5) del suelo LC, el 95 % de las plantas presentaron nódulos, en cambio cuando se empleó la mayor dilución (6°, 1:15625) noduló sólo el 25 % de las plantas (Fig. II-14).

La muestra SD contuvo simbiontes que nodularon el 100 % de las plantas inoculadas con la 1°, 2° y 3° dilución. Con las diluciones 4° y 5°, nodularon el 80 %, y con la mayor dilución (6°) sólo el 50 % de las plantas. Lo que confirma que los suelos bajo labranza mínima (SD) contuvieron más rizobios que aquellos bajo LC. Estas diferencias en el porcentaje de plantas noduladas con muestras de suelo bajo SD o LC, se relacionan directamente con el número de rizobios presentes en cada muestra. El coeficiente de correlación entre plantas noduladas y número de rizobios LC inoculados por planta fue igual a 0,70. En tanto que para el suelo SD, cuando se consideraron todas las diluciones, el coeficiente de correlación fue igual a 0,50, pero si no se consideran las dos primeras diluciones (que tiene un alto número de rizobios, que se estima, podrían haber nodulado un número diez veces mayor de plantas) el coeficiente de correlación es igual a 0,83.

El suelo SD presentó un número mayor en el recuento inicial de rizobios, así es que la dilución 3° de este suelo tuvo un número de bacterias similar al de la 1° dilución del suelo bajo LC (Fig. II-14). Las plantas inoculadas con estos tratamientos presentaron un alto porcentaje de plantas noduladas que además fue similar (100-95 %). La 5° dilución del suelo SD presentó un número de bacterias del mismo orden que la 3° dilución de LC y cuando plantas de soja se inocularon con ellas el porcentaje de plantas noduladas fue del 80 %, para ambos suelos. Por último la 6° dilución de SD y la 4° de LC que presentaron un número de rizobios similar produjeron la nodulación en el 50 % de plantas (Fig. II-14).

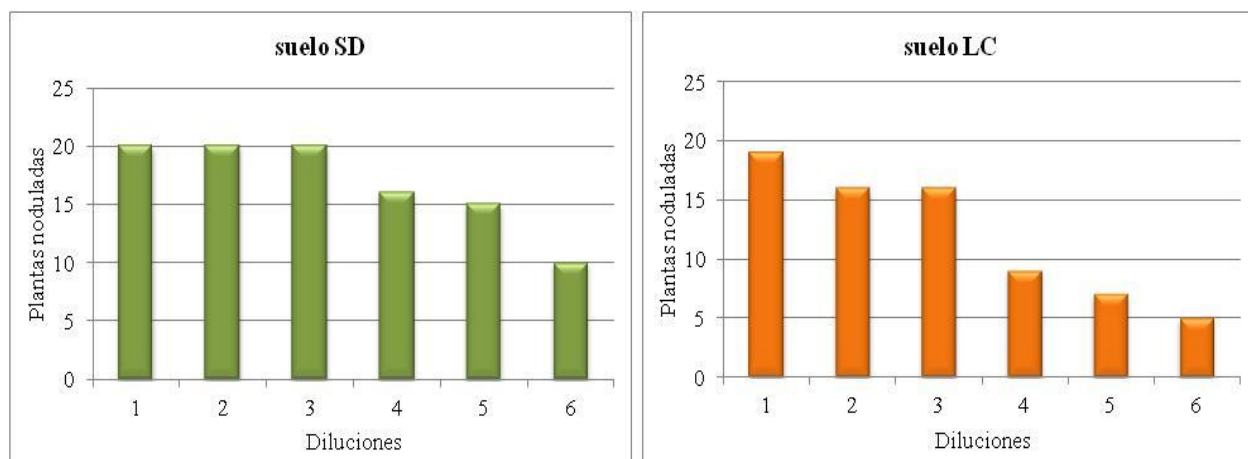


Figura II- 14: Plantas noduladas inoculadas con cada dilución. Suelo SD y LC, según las diluciones empleadas: dil.1, 1:5; dil.2, 1:25; dil.3, 1:125; dil.4, 1:625; dil.5, 1:3125; dil.6, 1:15625.

Recuento de nódulos

El método del NMP empleado para estimar el número de rizobios no considera el número de nódulos producidos en cada planta, por ello se analizó este dato con el fin de evaluar el impacto del número de rizobios del suelo sobre la cantidad de nódulos que desarrolla la planta. Entre el N° de nódulos y el NMP de rizobios se obtuvo un coeficiente de correlación positivo, tanto en las muestras provenientes del lote bajo SD (0,88) como aquellas provenientes del lote con LC (0,76).

Las plantas (n=120) inoculadas con cada una de las submuestras del suelo bajo SD produjeron un total de nódulos que fue igual a 1578, en tanto que de las plantas inoculadas con las submuestras de los suelos bajo LC se obtuvieron 623 nódulos, un valor 2,5 veces menor (Fig. II-15). Se puede observar que, en general el número de nódulos producidos, sigue la misma tendencia que en el porcentaje de plantas noduladas que se analizó en la sección anterior.

La comparación de la sumatoria de nódulos producidos por las plantas inoculadas con cada submuestras SD, para cada una de las seis diluciones, mostró que las primeras dos diluciones (1° y 2°), presentaron las plantas con mayor número de nódulos, entre 68-75 y se diferenciaron de las plantas inoculadas con la mayor dilución (6°), en este caso las plantas desarrollaron alrededor de 20 nódulos.

Las plantas inoculadas con diluciones realizadas con las submuestras del lote bajo LC produjeron un menor número de nódulos, más aún las submuestras se diferenciaron entre sí. Mientras que la primera dilución indujo, en promedio, la formación de 40 nódulos, las plantas inoculadas con las dos últimas diluciones (5° y 6°) produjeron un número apenas superior a 10 nódulos (Fig. II-15).

Los diferentes números de rizobios son altamente eficientes para interactuar con la planta, porque el mayor número de bacterias se refleja en más nódulos por planta.

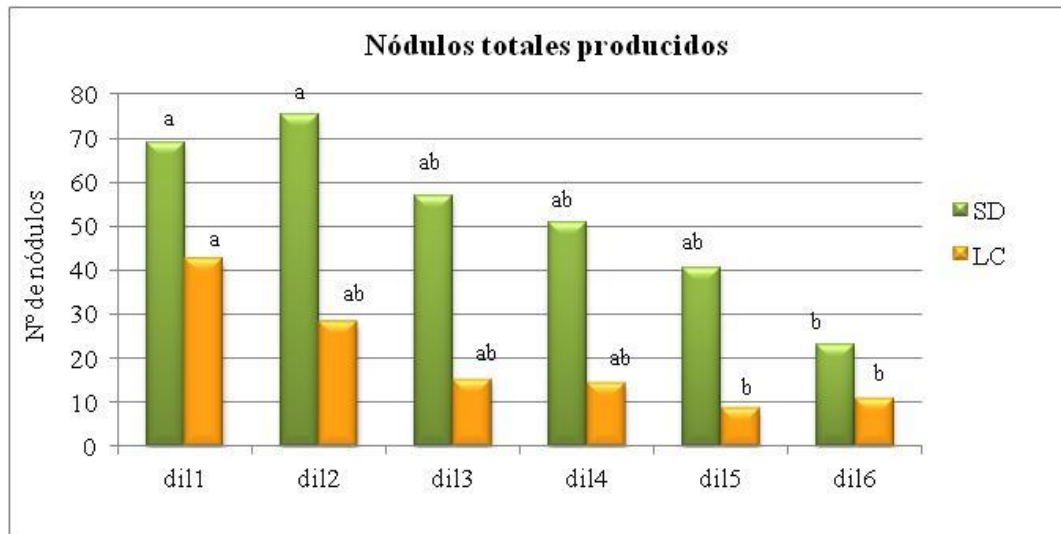


Figura II- 15: Sumatoria de los nódulos producidos en las plantas inoculadas con las diluciones de suelo (1°: dil1 a 6°: dil6). Columna verde, suelo SD. Columna naranja, suelo LC. Letras iguales sobre columnas de igual color de diferencias no significativas para test de Tukey, $p < 0,05$.

Aislados de los rizobios que nodulan la soja

De las 240 plantas de soja inoculadas con las diluciones y muestras de suelo se extrajeron 2200 nódulos. Se procedió a realizar aislamientos a partir de los nódulos, de cada submuestra de suelo, para lo cual se seleccionaron entre 10-20 nódulos de las plantas inoculadas con la dilución mayor (6°) y menor (1°) dilución. Así se obtuvieron 200 aislados, de los cuales 186 cuando se reinocularon en plantas de soja desarrollaron nódulos. Es decir que sobre un total de 200 aislados; se descartaron 14 que no indujeron la formación de nódulos y/o no sobrevivieron luego de sucesivos repiques, de manera tal que el número final de cepas con las que se iniciaron los ensayos fue de 186 (Tabla 10).

La denominación de los aislados se definió con tres cifras: número de submuestra (1-5 muestras de SD y 6-10 muestras de LC) – nivel de dilución (1- 6) – número de orden (1-20). Ejemplo: cepa 215, corresponde a un aislado de la submuestra 2 (SD), dilución 1, número de aislamiento 5; cepa 1061, corresponde a un aislado de la submuestra 10 (LC), dilución 6, número de aislamiento 1; cepa 958, corresponde a un aislado de la submuestra 9 (LC), dilución 5, número de aislamiento 8. En la Tabla 10 se presentan las cepas según el suelo de origen y la correspondiente denominación, las cepas con asterisco (*) son las que se descartaron.

Tabla 10: Denominación de los aislados de nódulos de plantas de soja, según la submuestra de origen.
(*) Cepas que no sobrevivieron repiques y/o no nodularon en el ensayo de fijación y que fueron descartadas.

SD - cultivo antecesor soja				
Submuestras				
SD1	SD2	SD3	SD4	SD5
111	211	311	415	511*
112	212	313*	416	512
113	213	316	417	514
114	214	317	418	516
115	215	318	419	517
116	216	319	4110*	518
117	218	3111	4115	519
1110	219	3120	4118	5111
1111	2110*	363	4120	5113
1112	2112	364	451	561
161	2113	365	453	563
162	2115	366	454	565
163	269	367	455	566
164	2610	368	456	567
165	2611	369	457	5610
166	2612*	3610	458	5611
167	2613	3611*	459*	5619
168	2614		4510	5620
169	2615			5621*
1610	2616			5623
1613*	2618			5624
	2619			
	2620			

LC - cultivo antecesor maíz				
Submuestras				
LC6	LC7	LC8	LC9	LC10
611	711*	811	911	1011
614	712	813	912	1012
615	713	814	913	1013
616*	716	816	914	1014
618	717	817	916	1019
619	718	818	917	10110
6110	719*	8110	919	10112
6111	7111	8113	9110	10114
6113	7112	861	9111	10115
6115	7117	862	941	10116
6116	7118	863	942	10118
661	764	864	943	1041
662*	766	865	951	1043
663	769	866	952	1044
664	7610	867	953	1045
665	7612	868	954	1046
666	7615	869*	955	1047
667	7616	8610	956	1051
668			957	1052
669			958	1061
6610				1062
6611				1063
				1064

Caracterización fenotípica de los aislados

Aspecto de las colonias

Se encontraron colonias cuyo aspecto se ajustó a los fenotipos descritos por Fuhrmann (1990), colonias mucosas, acuosas, intermedias y secas. En la Fig. II-16 se muestran dos tipos de colonias diferentes, mucosas y acuosas, que desarrollaron cuando se cultivaron en medio YEM con rojo Congo, incubado a 28 °C en la oscuridad durante 7-10 días.

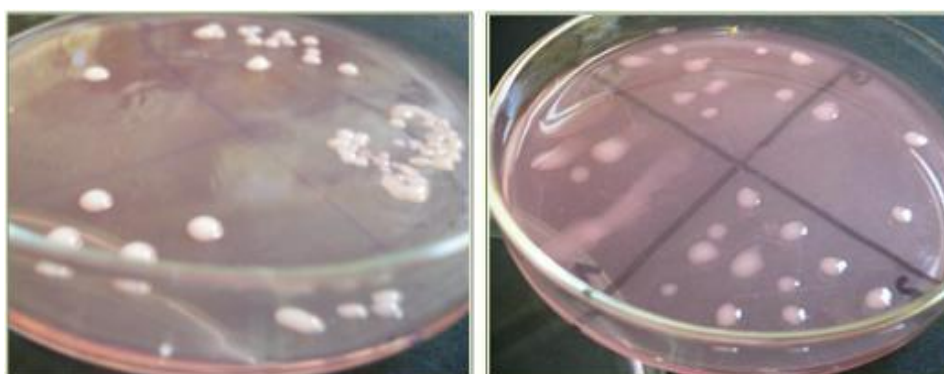


Figura II- 16: Colonias de aislados creciendo sobre medio de cultivo YEM suplementado con rojo Congo.

A la izquierda colonia mucosa típica, a la derecha colonia acuosa.

Un alto porcentaje de los inoculantes para soja en Argentina se producen con la cepa E109 de *B. japonicum*, cuya colonia presenta aspecto mucoso. Esta bacteria cuando es cultivada en oscuridad a 28 °C, alcanza un tamaño de colonia de (1) mm de diámetro a las 168 hs (7 días). Otras cepas que han sido empleadas en nuestro país y que actualmente se utilizan en Brasil son las cepas SEMIA587, SEMIA5019, SEMIA5079 y SEMIA5080. Las dos primeras estirpes son representantes de *B. elkanii*, éstas en medio YEM, formaron colonias con aspecto acuoso y alcanzaron en un período de incubación de 168 hs un tamaño de 0,5 mm y 1 mm, respectivamente. Las últimas dos cepas son representantes de *B. japonicum* y *B. diazoefficiens*, respectivamente, el cultivo de estas cepas en el mismo medio y período, conduce al desarrollo de colonias de aspecto mucoso, diámetro de 1,5mm, de tonalidad rosada.

En ambas muestras, las provenientes del suelo bajo labranza convencional y siembra directa, se encontró que el porcentaje de aislados que desarrollaron colonias mucosas, similar al inoculante comercial (*B. japonicum* E109), fue equivalente, 30 % para SD y 36 % para LC. El resto de los aislados presentaron colonias con aspecto intermedio, acuoso o seco en diferentes proporciones según la muestra de suelo.

En el suelo SD un 42 % de las colonias presentaron una morfología intermedia, mientras que 21 % presentaron aspecto acuoso. Sólo el 7 % tuvieron aspecto seco (Fig. II-17). Sin embargo, un 56 % de los aislados de suelos bajo LC, presentaron una apariencia acuosa y sólo el 7 % presentó colonias intermedias y de la misma manera que en el suelo SD, muy pocas colonias mostraron aspecto seco (1 %) (Fig. II-17).

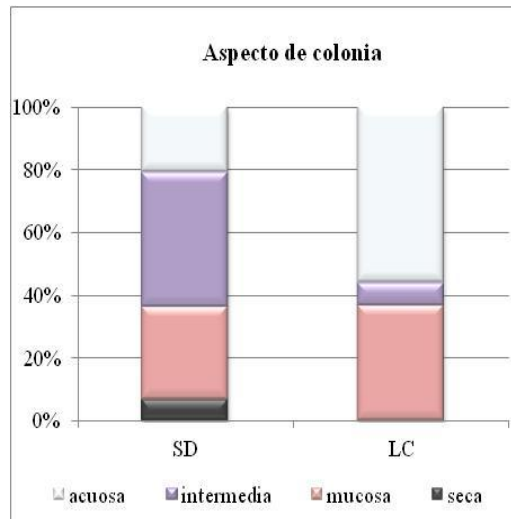


Figura II- 17: Morfología de las colonias producidas a las 168 hs de incubación, por los aislados muestra de suelo SD y LC

Tamaño de colonia

Cuando los aislados se cultivaron en medio YEM suplementado con rojo Congo y se incubaron durante 168 hs a 28 °C, presentaron diversos tamaños, con diámetros que variaron entre 0,5 mm y 2 mm (Fig. II-18).

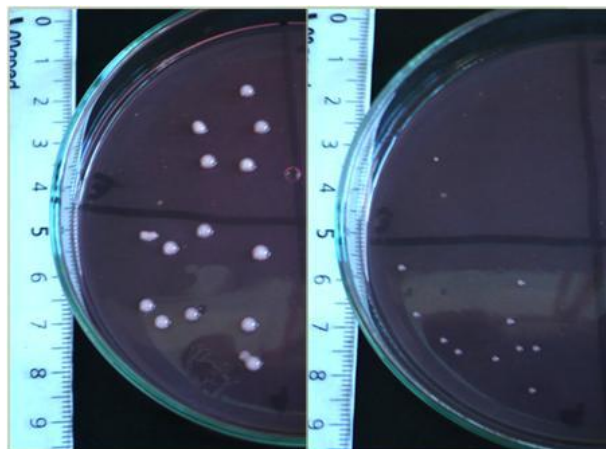


Figura II- 18: Tamaño de colonias desarrolladas sobre medio de cultivo YEM suplementado con rojo Congo, incubadas a 28 °C durante 7 días.

A la izquierda colonias de 1,5 mm de diámetro, a la derecha colonias de 0,5 mm.

Entre los aislados provenientes de SD se encontraron colonias con diámetros de 0,5 mm, 1 mm y 1,5-2 mm en porcentajes similares, 29 %, 32 % y 28 % respectivamente (Fig. II-19). En cambio en los suelos bajo LC la mayor proporción de aislados, un 54 %, produjeron colonias con diámetros de 0,5 mm, mientras que el resto de los rizobios formó colonias de 1 mm de diámetro (26 %) y de 1,5-2 mm de diámetro (20 %) (Fig. II-19).

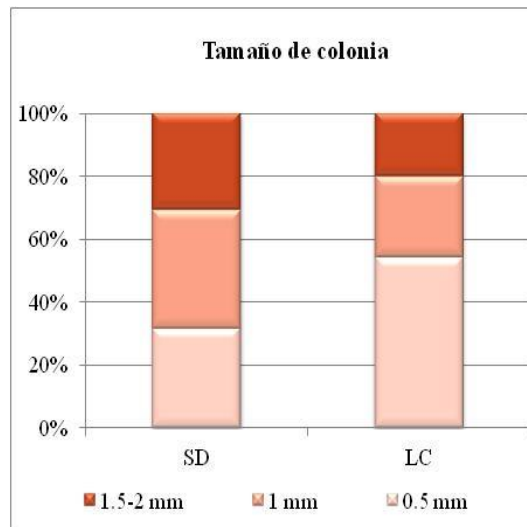


Figura II- 19: Tamaño de las colonias producidas por los aislados de la muestra de suelo SD y LC, a las 168 hs de incubación, sobre medio de cultivo YEM con rojo Congo.

La evaluación realizada combinando la morfología y el tamaño de las colonias, de la totalidad de las cepas (n=186), luego de 168 hs de incubación en medio YEM, mostró que entre los rizobios aislados del suelo bajo SD predominaron las colonias con aspecto mucoso a intermedio y de tamaño igual o mayor a 1 mm (grandes), 30 % mucosas grandes (Mg) y 24 % intermedias grandes (Ig) respectivamente (Fig. II-22). Mientras que entre los aislados del suelo bajo LC un porcentaje mayoritario de los aislados presentó colonias mucosas grandes (Mg) similares al suelo SD (33 %), pero el 43 % de las cepas presentaron aspecto acuoso y colonias pequeñas (menor a 1 mm) (Ap) (54 %) (Fig. II-20)

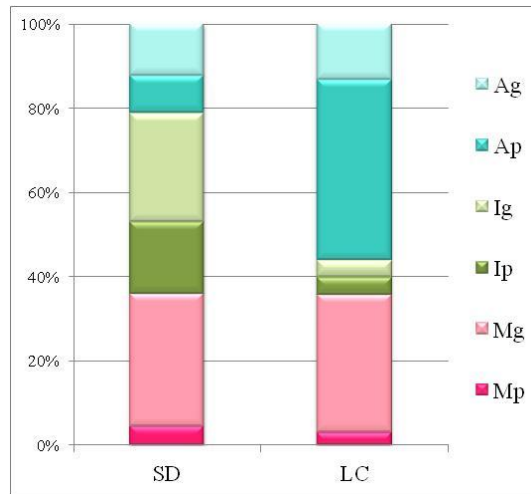


Figura II- 20: Porcentaje de colonias según el aspecto-tamaño.

Aspecto: A: acuosa, I: intermedia, M: mucosa. Tamaño: diámetro a los 7 días de incubación: g: igual o mayor a 1mm, p: menor a 1 mm.

Crecimiento de la colonia

Se estimó el crecimiento en función del tiempo en un grupo de 15 aislados durante un periodo más prolongado, para esto se determinó el diámetro de las colonias a los 4, 7, 9, 12 y 14 días de cultivo.

Se observó que las cepas mostraron diferente velocidad de crecimiento. Las cepas se agruparon en tres conjuntos (Fig. II-21, *a*, *b* y *c*). Un grupo comprendió tres aislados del suelo LC (769, 10118 y 1061) y uno de SD (2620), todas estas desarrollaron colonias de 1 mm de diámetro en 7 días, al igual que la cepa de referencia E109 (Fig. II-21, *a*). Otro grupo, conformado por cuatro aislados del tratamiento SD (cepas 162, 367, 416, 561 y cuatro aislados de LC (cepas 618, 7118, 7612 y 952), cuyas colonias alcanzaron 1 mm de diámetro a los 9 días de incubación (Fig. II-21, *b*). Por último las colonias de dos cepas SD (3120 y 512), y una LC (814), alcanzaron 1 mm de diámetro entre los 10-14 días de incubación (Fig. II-21, *c*).

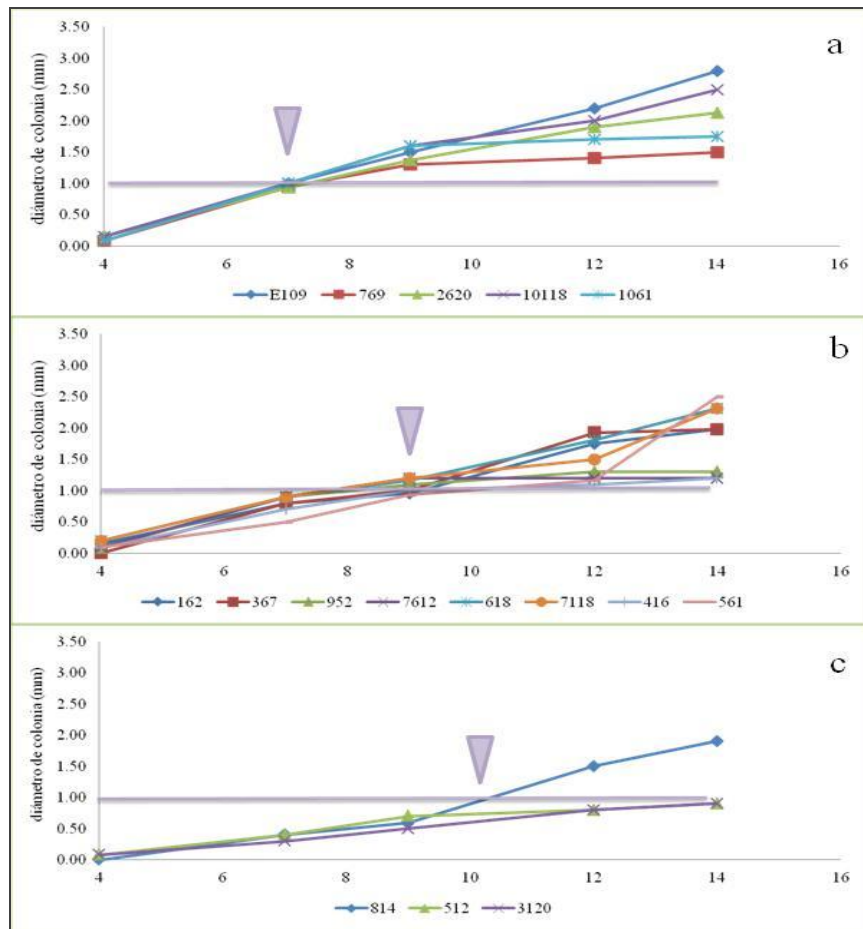


Figura II- 21: Evolución del diámetro de las colonias, mediciones realizadas a los 4, 7, 9, 12 y 14 días, de incubación a 28°C.

La flecha indica el momento en el que alcanzan 1 mm de diámetro.

a: Rizobios que alcanzan 1 mm de diámetro a los 7 días.

b: Rizobios que alcanzan 1 mm de diámetro a los 9 días.

c: Rizobios que alcanzan 1 mm de diámetro luego de 10 días.

Prueba acidificación – alcalinización

Todas las cepas alcalinizaron el medio de cultivo con el indicador bromo timol azul, lo que sugiere que pertenecerían al género *Bradyrhizobium* (Garrity et al. 2005).

Producción de melanina

Sólo un aislado del suelo LC y 8 del suelo SD sintetizaron melanina, en tanto que aproximadamente sobre el total de los aislados el 7 % de las cepas no desarrolló en medio TY (Fig.II-22).



Figura II- 22: Producción de melanina sobre medio TY de las cepas provenientes de suelo SD y LC.

Efecto de la temperatura sobre el crecimiento

Los aislados no desarrollaron cuando se incubaron a 40 °C, lo que también ocurrió con los controles de *B. japonicum*, *B. diazoefficiens* y *B. elkanii* (Fig. II-23).

La incubación a 37 °C, resultó en el desarrollo de colonias sólo en el 12 % de los aislados provenientes de los suelos manejados bajo LC. Por otro lado, entre un 20-25 % de los aislados provenientes del lote bajo SD y LC respectivamente, que no desarrollaron a 37 °C, formaron colonias al ser transferidas a 25 °C (tolerantes). Las estirpes de *Bradyrhizobium* control se encontraron dentro de este último grupo.

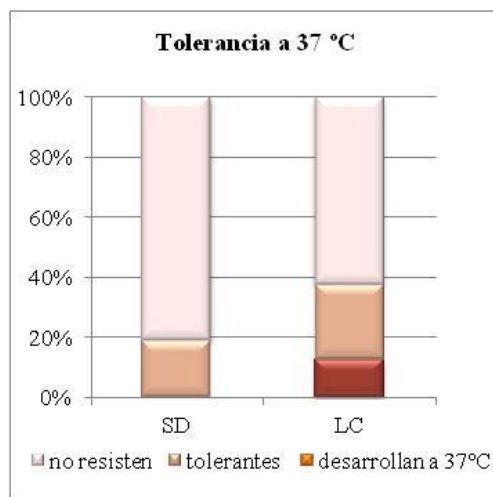


Figura II- 23: Comportamiento de cepas provenientes del suelo SD y LC según su tolerancia a la incubación a 37 °C en medio agarizado YEM con rojo Congo:

desarrollan a 37 °C: forman colonias de al menos 50% del tamaño de la cepa control; *tolerantes*: no desarrollan a 37 °C pero transferidas a 25 °C desarrollan; *no resisten*: no desarrollan en ninguna de las dos condiciones anteriores.

Tolerancia al NaCl en el medio de cultivo

En los suelos bajo SD no se encontraron aislados que desarrollen en presencia de alta concentraciones iónicas (Fig. II- 24). En cambio, alrededor del 20 % de los aislados de los suelos bajo LC crecieron en concentraciones de sal del 0,5 %, mientras que dos aislados desarrollaron en presencia de tenores de sal aún más altos como el 2 % de NaCl.

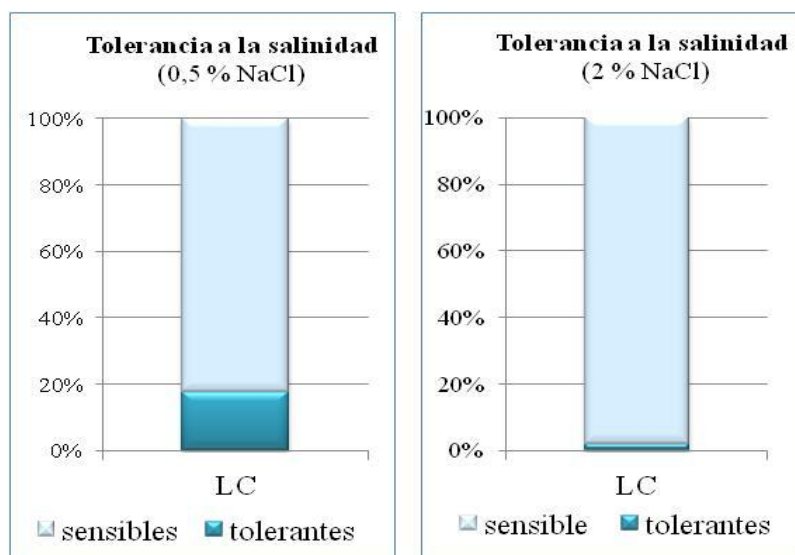


Figura II- 24: Comportamiento de cepas provenientes de suelo LC según su tolerancia a la sal en medio agarizado YEM suplementado con 0,5 % y 2 % de NaCl.

Tolerancia a los antibióticos

Los aislados presentaron resistencia intrínseca a los antibióticos en las concentraciones empleados en el ensayo. Todas las cepas fueron tolerantes al cloranfenicol (30 µg) y la eritromicina (15 µg). Entre los aislados del suelo SD se encontraron 20 % de rizobios sensibles a rifampicina (5µg), 8 % sensibles al ácido nalidíxico (30 µg) y sólo 3 % sensibles a tetraciclina (30 µg). En tanto que las cepas de suelos LC presentaron menor porcentaje de rizobios sensibles, sólo el 8 % fue sensible a rifampicina (5 µg) y dos cepas (4%) fueron sensibles al ácido nalidíxico (30 µg) y sólo una cepa a tetraciclina (30 µg) (Fig. II-25).

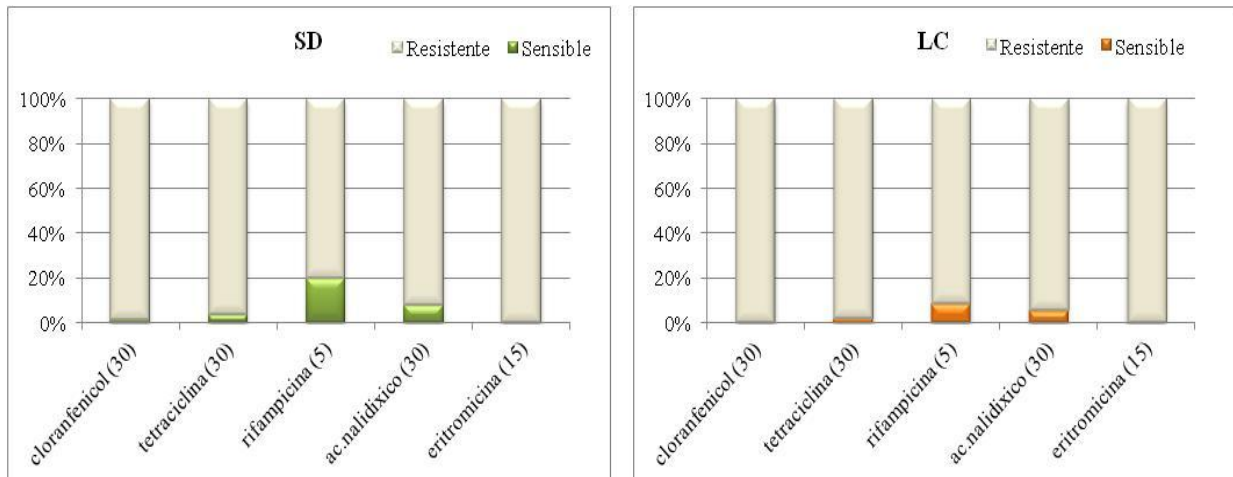


Figura II- 25: Porcentaje de aislados resistentes/sensibles a los antibióticos evaluados. El ensayo se realizó con antibióticos en monodiscos de papel, sobre medio YEM agarizado. La concentración de cada antibiótico figura entre paréntesis al final del nombre en µg.

Los aislados obtenidos de la 1° y 6° dilución difirieron en el predominio de ciertas características fenológicas. La mayor dilución (dil.6°) de ambos suelos, SD y LC, contuvo una mayor proporción (40 %) de cepas con colonia mucosa que la menor dilución (dil.1°) (20 %). Además, en el suelo bajo LC, las cepas que desarrollaron colonias pequeñas (0,5 mm) prevalecieron sólo en la dil.1° (70 %), ya que en la dilución mayor, estas colonias representaron el 40 % de los aislados. Los aislados del suelo bajo SD, mostraron un comportamiento parecido, ya que la recuperación de cepas con colonias pequeñas (0,5mm) en la dil.1° fue del 35 % y en la dil.6° del 30 %. La mayor proporción de cepas tolerantes a 37 °C se aislaron de la 1° dilución, es decir que son más frecuentes las cepas sensibles a las altas temperaturas, y por ello predominaron en las diluciones 5°-6°.

En el resto de los parámetros evaluados, producción de melanina, tolerancia a antibióticos y a la salinidad, sólo el 5 % de las cepas presentaron diferencias entre las diluciones.

Fenograma de características fisiológicas

Con las características fisiológicas: diámetro de colonia a las 168 hs (0,5 mm,0; entre 0,5 -1 mm, 1; mayor a 1 mm, 2), aspecto de colonia (intermedia,1; seca, 2; mucosa,3; acuosa, 4), tolerancia a 0,5 % NaCl (no desarrolla, 0; desarrolla, 1), tolerancia a 2 % NaCl (no desarrolla, 0; desarrolla, 1), tolerancia a 37 °C (no resisten, 0; desarrolla, 1; tolerantes, 2), síntesis de melanina (no sintetiza, 0; sintetiza, 1; no desarrolla en el medio de cultivo, 2), sensibilidad a antibióticos: cloranfenicol, eritromicina, tetraciclina, rifampicina, ác. nalidixico (resistente, 0; formación de

halo menor a 3 mm, 1; formación de halo mayor a 3 mm, 2) (Camacho et al. 2002), se construyó una matriz fenotípica. Con ésta se generó un fenograma en donde se identifican tres clados principales. El grupo A, con 70 % de similitud, contuvo el 27 % del total de aislados, entre estos la mayoría (n=35) provienen de los suelos bajo LC y el resto de los suelos bajo SD (n=15) y a las cinco cepas de referencia. El grupo B, con 60 % de similitud, contuvo el 60 % de las cepas, aislados del suelo bajo SD (n=58) y del suelo bajo LC (n=53). Por último el grupo C, también con 60 % de similitud, agrupó sólo el 12 % de los aislados totales (n=16 SD y 7 LC). Sólo una cepa LC (814) no se agrupó en ninguno de los clados (Fig. II-26).

El análisis de los Componentes Principales, permite observar que el agrupamiento de los aislados obedece en primer lugar al aspecto de la colonia y a la tolerancia a 37 °C, estas características explican el 41 % y 22 % de la variabilidad, respectivamente. Otras características que influyeron fueron el diámetro de la colonia (tamaño) (14 %) y la sensibilidad a la rifampicina (10 %) (Fig. II-27). Los fenogramas y Componentes Principales (Fig. II-27) que resultaron al seleccionar los aislados de cada suelo (SD-LC) o de cada dilución (1°- 6°) independientemente, no mostraron un patrón de agrupamiento diferencial. Es decir que mediante las pruebas fisiológicas empleadas y las características de la colonia, no es posible discriminar los aislados según su origen, ni según la especie.

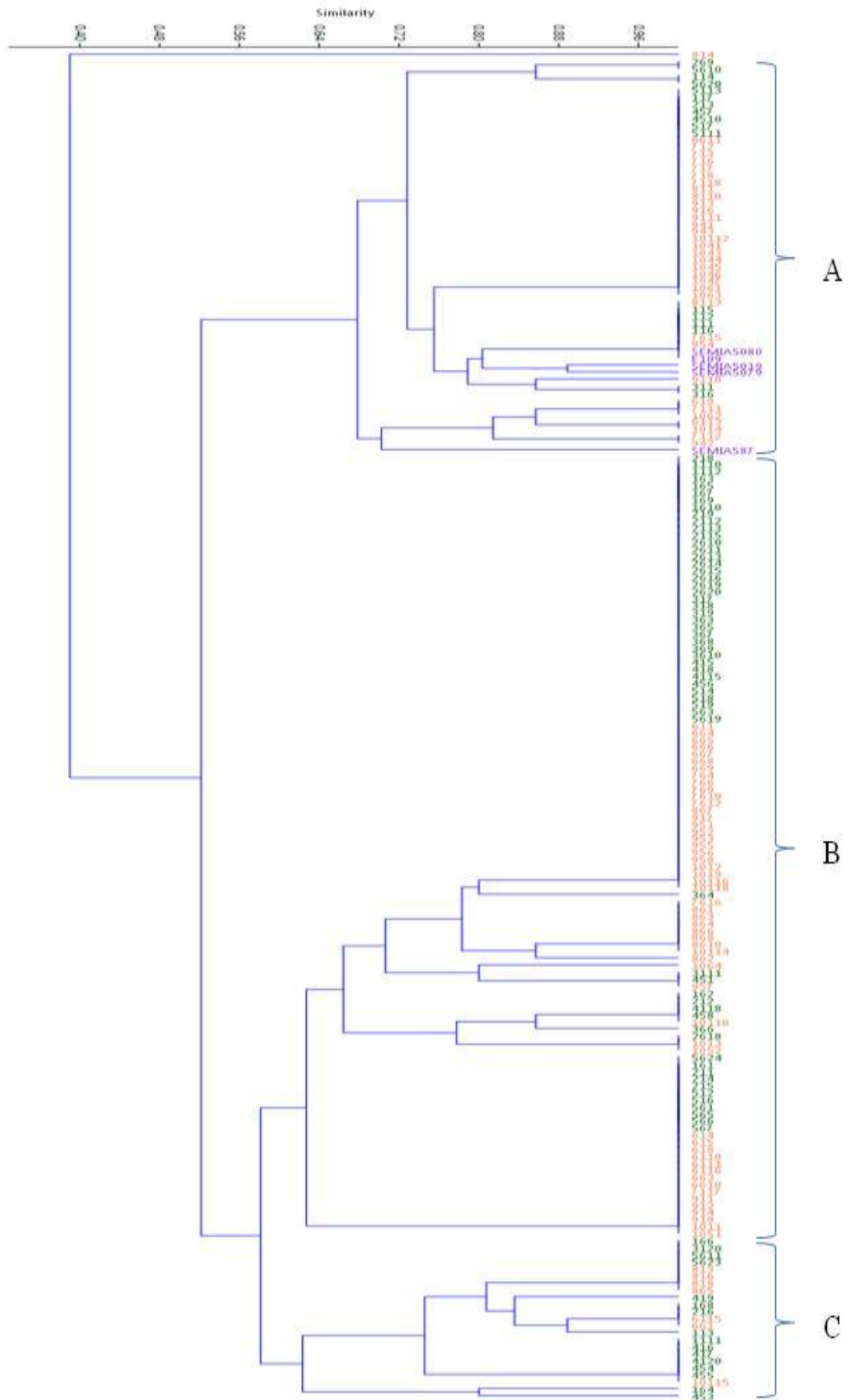


Figura II- 26: Dendrograma construido con las pruebas fisiológicas de todas las cepas (SD, verdes y LC, anaranjadas) (Coeficiente Dice) con el programa PAST.3 (PAleontological STatistics Version 3.11).

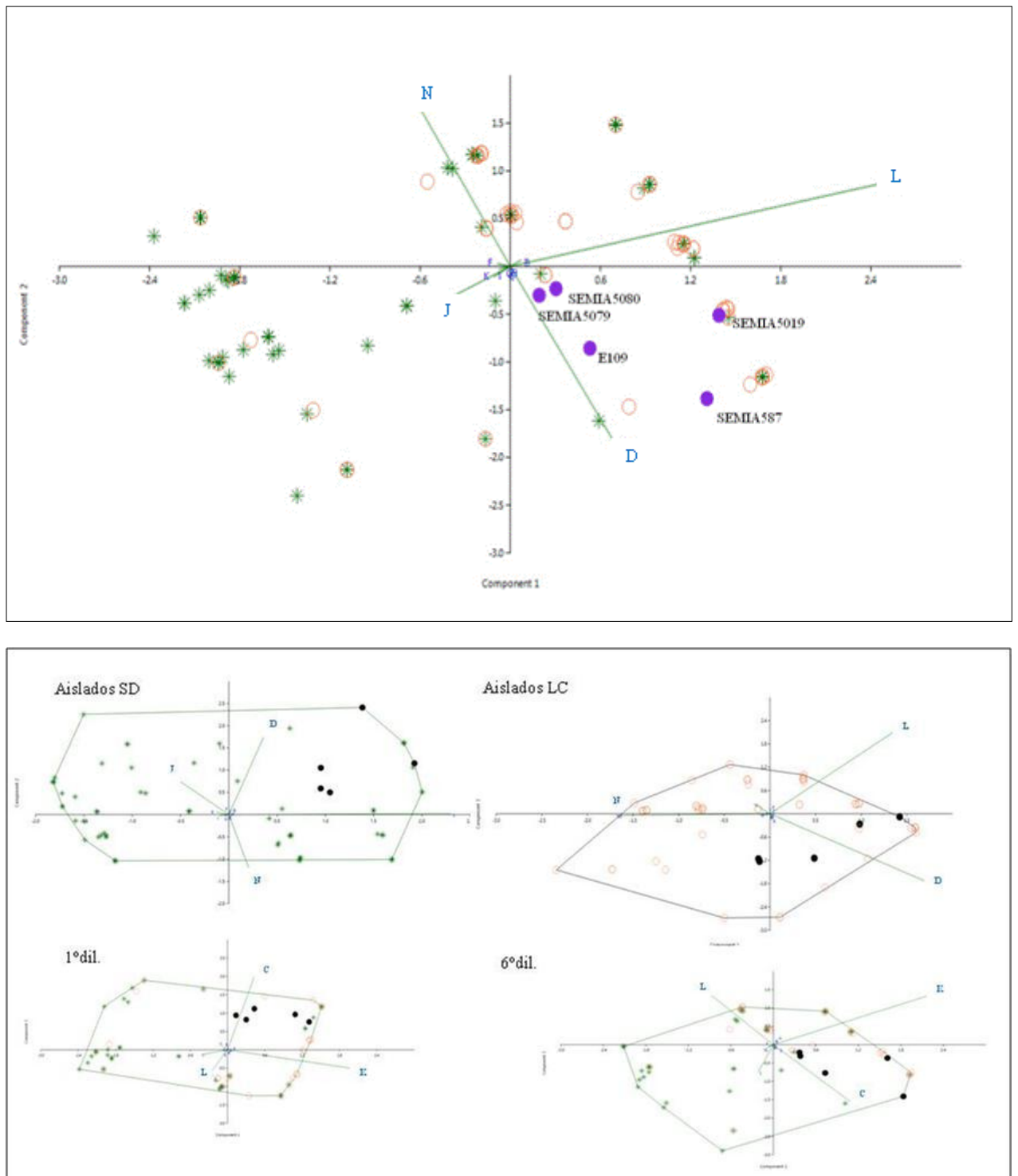


Figura II- 27: Componentes Principales generado con los resultados de las pruebas fisiológicas.

SD: * verdes y LC: o anaranjadas. Ejes: C: tolerancia a sal 2 %; D: tolerancia a 37 °C; J: sensibilidad a rifampicina; K: sensibilidad a ác. Nalidíxico; L, Aspecto; N: tamaño de colonia.

Fijación de N₂

Se evaluó el peso seco de la parte aérea (PSA) y el peso seco de los nódulos (PSN) de cada planta. En primer lugar se verificó que los testigos sin inocular (T) de cada ensayo no presentaran nódulos, luego de lo cual se procesaron las plantas del resto de los tratamientos (Fig. II-28).

El total de los aislados se evaluó en varios ensayos consecutivos a lo largo del año, en cada ensayo se incluyó a la cepa control E109. En los ensayos se observó un marcado efecto del ambiente, ya que el PSN y PSA del control fueron afectados por la fecha de siembra, aún cuando las plantas se mantuvieron en cámara de cultivo bajo condiciones controladas de luz-temperatura. Con el fin de poder comparar los tratamientos de los ensayos entre sí, todos los datos se normalizaron respecto del control positivo *B. japonicum* E109.



Figura II- 28: Raíces seleccionadas al azar de plantas inoculadas con aislados, donde se observan nódulos.

A la izquierda planta Testigo sin inocular, sin nódulos.

El coeficiente de correlación entre los parámetros PSN y PSA obtenidos de plantas inoculadas con la cepa comercial, fue alto y positivo ($r = 0.80$) resultados que concuerdan con los reportados por Unkovich y colaboradores (2008) y Salvucci y colaboradores (2012). El análisis de regresión lineal arroja un $R^2 = 0,76$ lo que sugiere que la biomasa de nódulos estaría explicando el 76 % de la biomasa aérea y que el restante 24 % está determinado por otras variables (Fig. II-29).

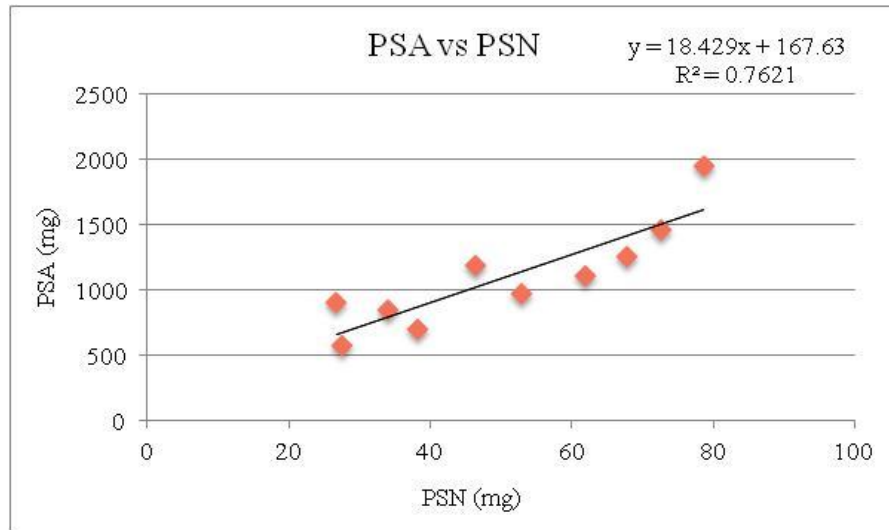


Figura II- 29: Análisis de regresión: PSA vs PSN de la cepa de referencia *B. japonicum* E109, obtenidos de los ensayos realizados en invernáculo y en diferentes fechas de siembra. Los datos se relacionan en forma positiva y se ajustan a una recta. Promedios de cuatro replicados.

Nodulación e impacto en el crecimiento de la soja.

Entre los aislados del suelo bajo SD, se observó que el 82 % produjo una biomasa de nódulos similar a la que indujo la cepa de referencia E109, en tanto el 18 % presentó una tendencia a producir entre 30 % y 100 % más de biomasa nodular (Fig.II-30). Ninguna cepa produjo biomasa de nódulos inferiores a E109.

Entre las cepas de LC, casi el 85 % tuvo un comportamiento similar a E109 en cuanto a la producción de nódulos, 14 % de los aislados produjeron una biomasa de nódulos entre un 40 % y 100 % mayor, y sólo un 1% produjo menor PSN (-52%) (Fig. II- 31).

Cuando se analizó el parámetro PSA de la planta se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. Si bien la mayoría de las cepas, 83 % SD y 88 % LC, mostraron un comportamiento similar al de la cepa E109, un 6 % de las cepas SD y un 2 % de las cepas de LC indujeron en las plantas inoculadas un mayor PSA, que superaron al control positivo en un rango del 35-60 %.

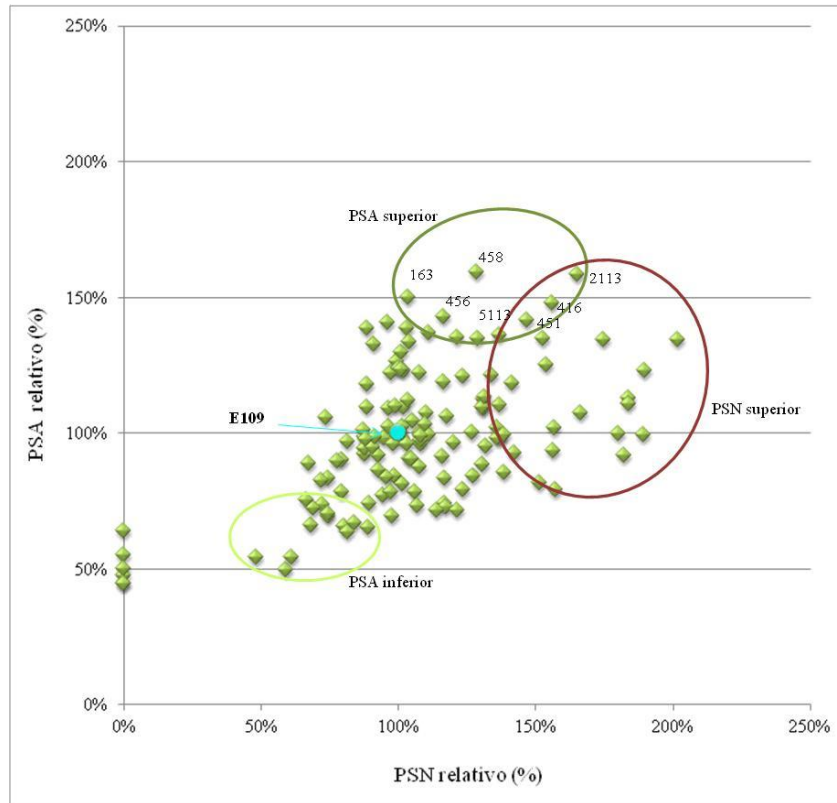


Figura II- 30: Gráfico de dispersión de los datos de PSN y PSA de cada aislado SD, expresado en porcentaje de la producción de la cepa de referencia E109 (círculo celeste).

Por otro lado es importante mencionar que alrededor del 10 % de aislados de cada suelo, SD y LC, produjeron entre 50-70 % menos biomasa aérea que la cepa control (Fig. II-30 y II-31).

De estos ensayos, se desprende que 7 cepas naturalizadas SD (163, 456, 5113, 458, 2116, 416 y 451) fueron altamente eficientes en fijación de N_2 en las condiciones ensayadas, evidenciado por el PSA que superó entre un 40 y 60 % al control E109. Además, entre los siete aislados descritos, las cuatro primeras (163, 456, 5113, 458) produjeron PSN similar a la cepa de referencia y las últimas tres (2113, 416, 451) formaron mayor masa nodular que la cepa control (Fig. II-30 intersecciones de círculos PSA superior y PSN superior). En cambio en los suelos bajo labranza convencional sólo los aislados LC, 862 y 953, generaron un mayor crecimiento en las plantas evidenciado por un aumento en la acumulación de biomasa aérea del 29 % y 34 %, respectivamente, en relación a la estirpe E109. Vale la pena destacar que los aislados presentaron un PSN similar a la de las plantas inoculadas con la cepa control E109 (Fig. II-31). Entre el resto de los aislados que produjeron un PSN superior ninguna produjo un PSA superior a la estirpe control E109 (Fig. II-30). Del grupo de cepas aisladas de los suelos bajo LC que produjeron más nódulos (Fig. II-31, PSN superior), ninguna fue más eficiente que la cepa control, es decir que la fijación de N_2 de esa masa nodular no produjo mayor PSA.

Las cepas 1044 y 1046, si bien su inoculación hizo que las plantas tuvieran un PSN más alto, éstas no crecieron más, con lo cual probablemente no dispusieron de más nitrógeno para la planta (Fig. II-31).

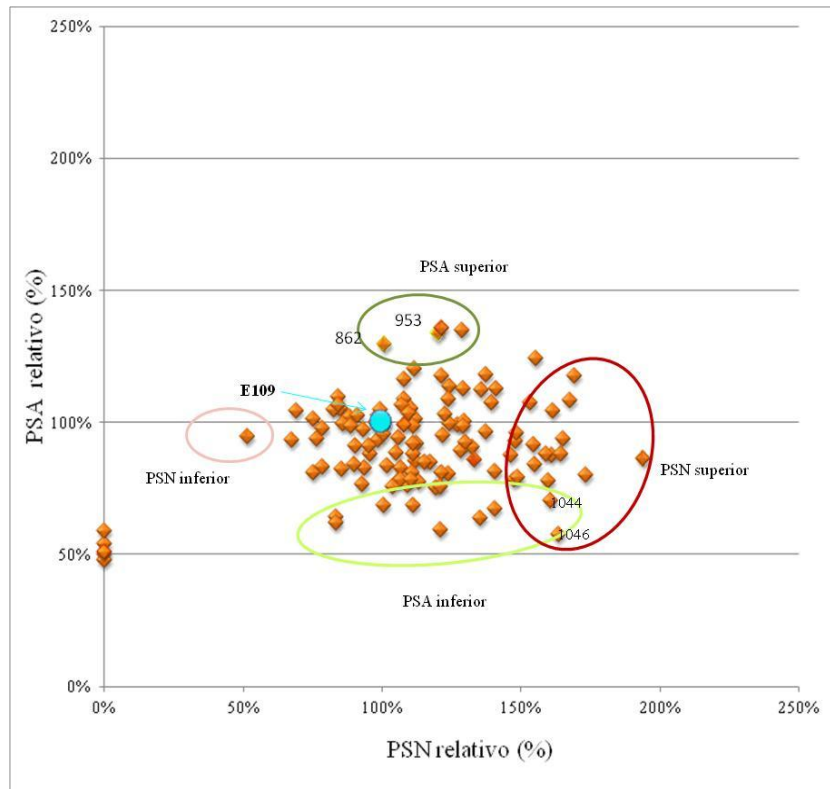


Figura II- 31: Gráfico de dispersión de los datos de PSN y PSA de cada aislado LC, expresado en porcentaje de la producción de la cepa de referencia E109 (circulo celeste).

Se observó que las hojas de las plantas control no inoculadas (T) fueron de color verde claro a amarillenta (clorosis), que seguramente es el resultado de una baja disponibilidad de nitrógeno. Sin embargo, esto último no se reflejó en un menor PSA en todas las plantas T. Por ello se determinó el contenido de N total (método Kjeldahl) de una muestra representativa de plantas inoculadas con cepas de alta y baja capacidad de fijación de N_2 junto con plantas inoculadas con la cepa de referencia y plantas testigo sin inocular (Fig. II-32). Se calculó, el contenido de N total tomando como parámetro de comparación las plantas del tratamiento T. Se determinó que el aporte de la FBN fue del 20 % para las plantas inoculadas con las cepas naturalizadas de menor eficiencia (114 y 311), lo que aumentó a 40 % cuando las plantas fueron inoculadas con las cepas más eficientes o con eficiencia similar a la cepa control E109 (aislados 712 y 5113).

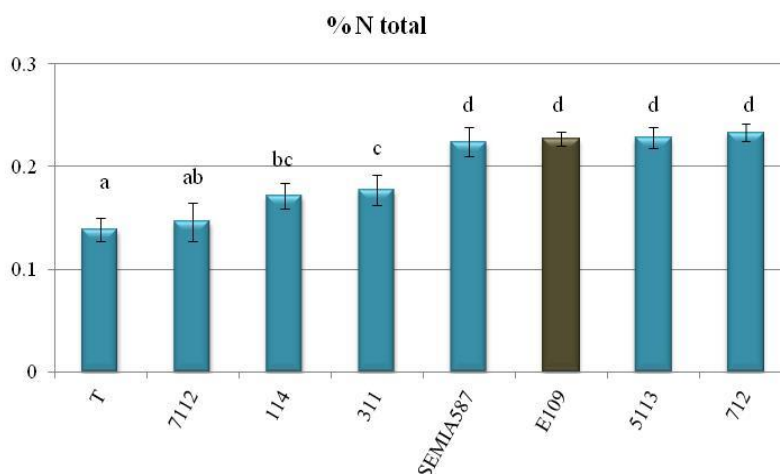


Figura II- 32: Contenido de N total de la parte aérea de plantas de soja, por el método Kjeldahl. T: testigo sin inocular, cepas de referencia: *B. japonicum* E109 y *B. elkanii* SEMIA587, aislados naturalizados: 7112, 114, 311, 712, 5113. Letras distintas representan diferencias significativas (ANOVA) test de Tukey, $p < 0,05$.

Para conocer la influencia de la nodulación (PSN) sobre los otros parámetros (PSA y Contenido de N total) y la interacción, se determinó la correlación estadística entre ellos:

1. PSN / PSA
2. PSN / Contenido de N total
3. PSA / Contenido de N total

Las correlaciones se calcularon en base a todos los datos del ensayo incluidas las plantas sin inocular. En la Fig. II-33, se observa que existió una pendiente positiva. El coeficiente de correlación de Pearson (r) dio valores entre 0,52 y 0,68 indicando una correlación estadísticamente significativa y positiva con $p < 0,0001$ entre los tres pares de variables analizadas.

Al calcular el coeficiente de correlación de Pearson para los pares de parámetros PSN/PSA y PSN/%N, sin incluir el Testigo sin inocular, el coeficiente mostró una correlación positiva ($r = 0.70$ y $0,55$, respectivamente) aunque se observó claramente que, tal cual era de esperar, el contenido de N total (% N) estuvo en función de la biomasa nodular. El contenido de N de las plantas sin inocular (T) probablemente provino de las reservas de la semilla, del sustrato y/o de los pequeños aportes de la materia orgánica que se encuentra en el proceso de degradación, por ello a pesar de no tener rizobios que fijen N_2 , en períodos de cultivo cortos frecuentemente la biomasa formada no difiere de aquellas plantas con mayor contenido de N.

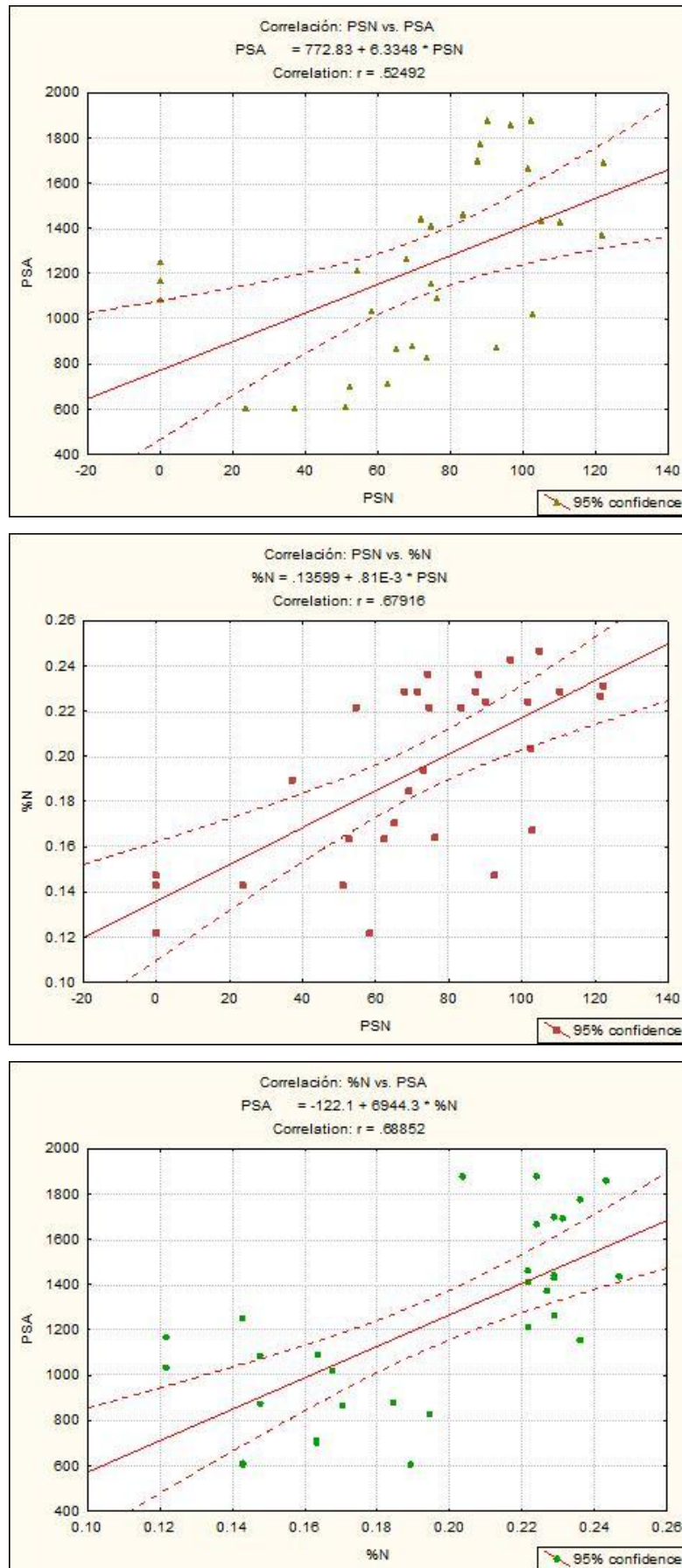


Figura II- 33: Correlación entre las variables PSN/PSA, PSN/%N, PSA/%N. Coeficiente de Pearson: 0,52; 0,67 y 0,68, respectivamente.

En síntesis los resultados en este capítulo muestran que los rizobios aislados son diversos en la morfología de las colonias, la tolerancia al estrés, temperatura y salinidad, capacidad para infectar y fijar N₂, tanto estos provengan de suelos bajo labranza convencional como de siembra directa. Si bien los aislamientos compartieron las características fenotípicas, el manejo de los suelos generó bacterias con comportamientos distintos.

Se observaron diferencias entre los aislados SD provenientes de la menor y mayor dilución de suelo en sus características simbióticas. Se encontró que al diluir el inóculo (suelo) SD, disminuyó el porcentaje de aislados capaces de producir PSN mayor, es decir que las cepas que inducen más nódulos o nódulos más grandes son menos frecuentes, por ello en la 6^o dilución hay un número muy bajo de rizobios con estas características simbióticas y se refleja en pocas plantas con PSN alto, la variación fue del 24 % al 9 %. Sólo se aislaron dos cepas con alto PSN y PSA, una de la dil. 1^o (cepa 416) y otra de dil. 6^o (451).

En la muestra SD, dentro de los aislados con mayor PSN que la cepa E109 (triángulo rojo en Fig. II-34), la 1^o dilución de suelo contuvo cepas que producían entre 50 a 100 % más de PSN que E109, en cambio en la 6^o dilución, las cepas más frecuentes fueron sólo las que produjeron alrededor de 90 % más PSN que E109. El parámetro PSA no mostró diferencias entre los aislados de la 1^o y 6^o dilución. En LC, en cambio, al diluir el suelo, se mantuvo el porcentaje de cepas que produjeron al menos 50 % más PSN que E109, pero se observa que hay una tendencia a producir PSN mayores (hasta 100 % más que E109) (Fig. II-34).

Los aislados que se diferencian del resto por su alto PSN (encerrados en el triángulo rojo, Fig. II-34) son diversos genéticamente según el análisis de la amplificación de la reacción BOX A1R (ver Cap. III). De los 13 y 11 aislados de la 1^o dil. de los suelos SD y LC, respectivamente, sólo se encontraron 2 y 3 aislados con similitud del 50 % en la 6^o dil. Además un aislado de 1^o dil. LC (717) presentó similitud del 50 % con un aislado 6^o dil. de SD (1610).

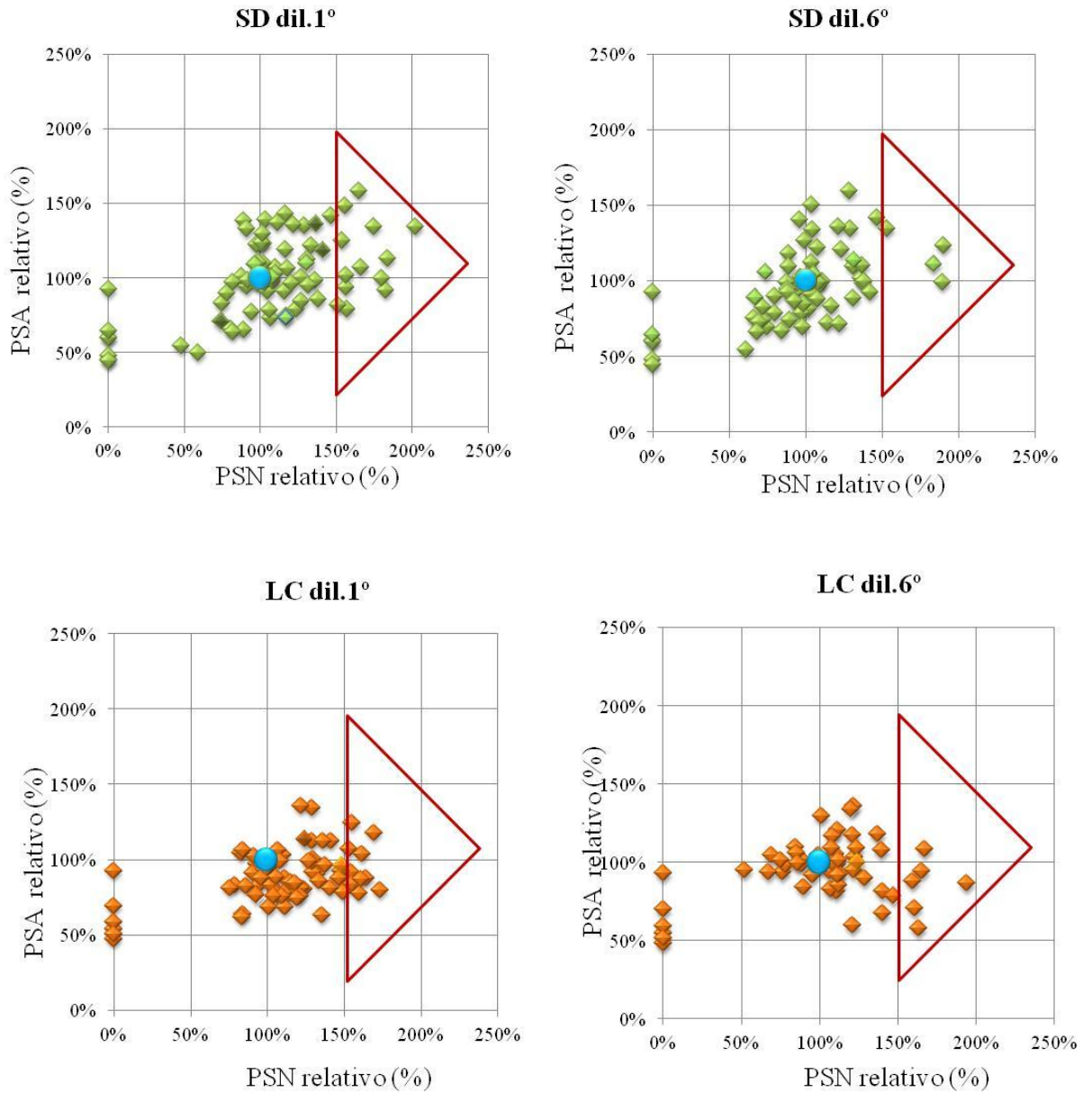


Figura II- 34: Gráficos de dispersión de los datos de PSN y PSA de los aislados de la 1° y 6° dilución, de cada suelo (SD y LC), referenciados a la cepa E109. El triángulo rojo encierra los aislados con producción de PSN mayores al 50 % del PSN de E109.

DISCUSIÓN

En los suelos en donde periódicamente se cultiva soja, con la inoculación que se realiza en el momento de cada siembra, se incorpora una biomasa de rizobios que se multiplican durante el período del cultivo y son liberados al suelo cuando los nódulos senescen. Debido a esto el cultivo de leguminosas conduce al aumento de la población de simbioses en el suelo, que luego se naturalizan (Reyes & Schmidt 1979; Batista et al. 2007; Gomes Barcellos et al. 2007; Melchiorre et al. 2011). Se ha descrito que el suelo rizosférico de plantas de soja es colonizado por 10^4 - 10^6 rizobios (Reyes & Schmidt 1979; Barthelemy-Delaux et al. 2014), población que además se modifica según la etapa del cultivo (Reyes & Schmidt 1979). En nuestro país, la población de rizobios naturalizados en los suelos varía según las áreas de cultivo, entre 10^2 a 10^5 rizobios.g suelo⁻¹ (Tringali et al. 1997; Brutti et al. 1998). En este trabajo las poblaciones de los suelos muestreados fueron del orden de $8,12 \times 10^3$ rizobios.g suelo⁻¹ en SD y $5,81 \times 10^2$ rizobios.g suelo⁻¹ en LC, valores que coinciden con los descritos en el país.

Los suelos estudiados tuvieron una historia de manejo distinta. Tal como se describió, en los últimos ocho años los lotes fueron sembrados con soja en diferentes momentos por lo que el impacto de la inoculación seguramente es diferente. En base a esto, en el momento en que se tomaron las muestras los suelos SD tuvieron como cultivo antecesor soja, es decir 100 días previos al muestreo recibieron una cantidad de rizobios provenientes del inoculante, de manera que los suelos bajo LC con el maíz como cultivo antecesor, fueron inoculados con rizobios un año antes. La población de rizobios de la muestra LC, probablemente provienen de esa inoculación y de otras previas, por lo tanto son rizobios que han sobrevivido saprotróficamente en el suelo, al menos durante un año, considerando que ese suelo permaneció en barbecho durante un período de aproximadamente 7 meses a lo que le siguió un periodo de 160 días con cultivo de maíz. Es posible que esto fuera uno de los factores que condujo a que el número de rizobios en las submuestras de suelo trabajado con SD fuese mayor que en el suelo bajo LC.

Los estudios realizados sobre el suelo Hapludol Típico manejado con siembra directa durante diez años, muestran que este tipo de laboreo tiene efectos de conservación y/o recuperación de las concentraciones de materia orgánica total (MO) dependiendo de la profundidad y el uso que tuvo el suelo originalmente. Por otro lado, existen reportes que indican que además el suelo manejado bajo SD, conservaría más humedad y mantendría una temperatura más estable. Por ello este manejo de suelo promueve el desarrollo de la biomasa microbiana, incluidos los rizobios, que en el suelo en forma libre se comportan como organismos saprótrofos heterotróficos (Hungria et al. 1997a; Dorr de Quadros et al. 2012; Silva et al. 2013). Todos estos factores podrían considerarse relacionados a las diferencias en las poblaciones encontradas en ambos suelos (SD y LC). Sin embargo, el más alto número de rizobios encontrados en los suelos

bajo SD de este trabajo, no pueden explicarse por el contenido de MO debido a que no fueron superiores al suelo bajo LC. Este último tuvo 3,36 % de MO, en tanto que el suelo bajo SD contenía de 3,08 %. La diferencia podría atribuirse a que mientras en el suelo LC el cultivo antecesor fue maíz, en el suelo SD fue soja, y estos dos cultivos aportan cantidades significativamente distintas de biomasa de rastrojo que dejan luego de la cosecha (Zanettini et al. 2014), momento en el que se tomó la muestra. En este caso, la mayor población de rizobios en suelo bajo SD, podría deberse al tipo de agregados del suelo que se forman en el manejo SD, y que genera microhabitats que pueden proporcionar mejores condiciones ambientales y nutricionales para los microorganismos (Kaschuk et al. 2006a; Silva et al. 2013). Además del efecto de las labranzas sobre la cantidad de rizobios que forman parte de la población microbiana del suelo, probablemente influyan también un conjunto de otros factores, como la presencia de la planta huésped, momentos de la toma de la muestra en relación al tiempo en que ingresaron rizobios al suelo y características físico químicas del suelo (Batista et al. 2007; Graham 2008; Dorr de Quadros et al. 2012; Yan et al. 2014).

Según varios autores, cuando la planta huésped estuvo presente el tamaño de la población se mantuvo a pesar de las condiciones ambientales adversas (sequía), debido a que las plantas liberan en sus exudados una variedad de hidratos de carbono y otras moléculas pequeñas. Estas moléculas, además de las raíces y nódulos en sí mismos, pudieron haber protegido físicamente a las bacterias, lo que permite una mayor supervivencia (Barthelemy-Delaux et al. 2014).

Se ha encontrado que el pH influye en la diversidad genética de los rizobios (Giongo et al. 2008) y en el tamaño de la población (Barthelemy-Delaux et al. 2014), aunque otros autores no encontraron esa correlación (Alberton et al. 2006). En el presente estudio se trabajó con muestras de suelo que difirieron en casi un punto de pH (5,14-5,89) y no se encontró relación entre el pH de cada submuestra y el número de rizobios. Probablemente esto se deba a que los bradyrizobios sobreviven mejor en suelos levemente ácidos que alcalinos (Albareda et al. 2009), pero además el rango de pH de las muestras se mantuvo en un nivel de acidez moderada.

Las plantas trampa empleadas para realizar el aislamiento de los rizobios probablemente condicionaron también el número y la diversidad de las bacterias atrapadas. Es conocido que el genotipo de la planta cumple un rol clave en la interacción rizobio-leguminosa (Salvucci et al. 2012). Por otro lado, es posible que existan, dentro de la población del suelo, rizobios no nodulantes que en base al procedimiento realizado no fueron considerados (Boddey & Hungria 1997; Denison & Kiers 2004; Appunu et al. 2008).

Los aislamientos que se seleccionaron para estudiar en esta tesis se realizaron a partir de las plantas inoculadas con la menor (1°) y mayor (6°) dilución. Algunos autores encontraron que la

dilución de suelo con que se inocula, condiciona la variabilidad de bradyrizobios (Bala et al. 2001; Alberton et al. 2006). La población naturalizada de *Bradyrhizobium* de soja se compone de pocas cepas que se han introducido como inoculantes en los últimos 50 años. Es posible que las cepas más competitivas, sumado a la naturaleza más específica de la planta huésped (soja), logren ocupar la mayoría de los nódulos, aunque con la dilución del suelo hayan disminuido su número (Bala et al. 2001; Alberton et al. 2006). Aunque, algunos genotipos que sean más abundantes en la población de rizobios tendrían mayor probabilidad de ser atrapados bajo diluciones mayores. Contrariamente a lo que sucede con rizobios nativos de poroto (*Phaseolus vulgaris*) y dado la naturaleza promiscua de esta planta, en diluciones menores las cepas más competitivas colonizaron las raíces, lo que implica diversidad genética inferior. Por otra parte, al aumentar la dilución del suelo resultó en una disminución de la proporción de las cepas más competitivas, lo que permitió a las cepas menos competitivas, nodular la planta huésped (Alberton et al. 2006). Esto explicaría los resultados encontrados en los ensayos de fijación y nodulación, donde la dilución mayor de los suelos bajo SD (dil.6°) condujo a aislar menos rizobios con capacidad de nodulación mayor (PSN superior) a la cepa E109, estos rizobios disminuyeron del 11 al 5 %. Esto sugeriría que las cepas más infectivas que inducen una mayor cantidad de nódulos, se encuentran en bajo número y al diluir no alcanzaron a infectar, o son menos competitivas.

La soja desarrolla nódulos con rizobios de crecimiento rápido, lento y extra lento, lo que está vinculado a la capacidad competitiva de las bacterias. Somasegaran & Hoben (1985) clasificaron a los rizobios como de crecimiento rápido cuando las colonias aparecen entre los tres y cinco días y además acidifican el medio de cultivo. Los rizobios de crecimiento lento o bradyrizobios desarrollan colonias a los 5-7 días de cultivo y alcalinizan los medios de cultivo. Recientemente se ha descrito que hay diversas especies de rizobios que nodulan la soja como por ejemplo *Ensifer fredii*, *E. sojae*, *E. xinjiangense* (Chen et al. 1988), *Mesorhizobium tianshanense* (Chen 1995), *Rhizobium tropici* (Hungria et al, 2006), además de varias especies del género *Bradyrhizobium* (*B. canariense*, *B. elkanii*, *B. japonicum*, *B. liaoningense*, *B. yuanmingense*), entre ellas hay de crecimiento rápido y de crecimiento lento. Todos los aislados estudiados en este trabajo fueron de crecimiento lento, aún cuando estos presentaron ciertas diferencias en la velocidad de crecimiento, todas alcalinizaron el medio de cultivo.

En esta tesis se demostró que los suelos muestreados sólo contuvieron rizobios de crecimiento lento y en base a las características fenotípicas descritas, probablemente derivan de estirpes de *B. elkanii* y *B. japonicum*, incorporados con las semillas inoculadas con formulaciones comerciales.

Muchos trabajos han descripto el aislamiento y análisis de la diversidad de las cepas de los suelos y han expresado esta diversidad como el reflejo de modificaciones morfológicas, fisiológicas y genéticas (Hungria et al. 1996; Santos et al. 1999; Ferreira & Hungria 2002; Batista et al. 2007; Bizarro et al. 2010; Melchiorre et al. 2011). Un alto porcentaje de rizobios aislados (alrededor del 65 %) (Fig. II-20) presentaron un aspecto y tamaño de las colonias diferente a la cepa comercial inoculada (*B. japonicum* E109) lo que sugiere que los ambiente en donde sobreviven inducen cambios en las características morfológicas de las cepas en los suelos bajo SD o bajo LC. Las diferencias morfológicas de las colonias están relacionadas, entre otras cosas, con el tipo y cantidad de exopolisacáridos producidos (Fuhrmann 1990; Basit et al. 1991). En estudios realizados en suelos de los Cerrados en Brasil, se encontró que, en condiciones ambientales estresantes, las cepas que se adaptaron o sobrevivieron aumentaron la síntesis de moléculas que contribuyen al aspecto mucoso de las colonias (Batista et al. 2007). Estos autores demostraron que en el proceso de adaptación al medio la composición de los polisacáridos sufrió modificaciones (da Costa Coutinho et al. 1999) pero también se afectó la cantidad (Girgis et al. 2007). Los polisacáridos son compuestos que protegen a los rizobios frente a condiciones adversas, como predadores, sustancias tóxicas, desecación, salinidad. Presumiblemente los cambios en la superficie de los rizobios obedecen a que los aislados desarrollan en un ambiente estresante. En los Cerrados de Brasil la presión de selección en *B. japonicum*, generó mutaciones o cambios en genes relacionados a la síntesis de polisacáridos (da Costa Coutinho et al. 1999).

Los diversos aspectos de las colonias de los aislados del suelo bajo SD, sugieren que entre la inoculación del cultivo de soja y la toma de muestras de suelo (100 días), se produjeron en la población de rizobios cambios morfológicos que están relacionados con cambios metabólicos. Alternativamente, es probable que los rizobios naturalizados hayan sufrido cambios que aumentaron la eficiencia con que estos infectan las plantas trampa, al menos comparados con la cepa E109. En el suelo bajo LC, el tiempo transcurrido desde la inoculación del cultivo de soja y el muestreo fue mayor, y también presentó una población de rizobios que desarrollaron colonias diversas a la cepa inoculada. En estos suelos los bradyrizobios que predominaron fueron los que formaron colonias de aspecto acuoso en el medio de cultivo. Girgis y colaboradores (2007) encontraron que los rizobios que forman colonias acuosas toleraron mejor la salinidad y los antibióticos. Vale la pena aclarar que en este suelo además del tiempo transcurrido también influyó el ambiente edáfico generado por la labranza convencional.

El análisis de la morfología de las colonias, discriminando los aislados según la dilución del suelo de origen, permitió observar que hay diferencias entre las cepas obtenidas de la menor dilución (1°) y de la mayor (6°). Se encontró que al diluir la muestra, independientemente del

manejo del cultivo, el número de rizobios que forman colonias mucosas aumentó, por lo que se podría inferir que las mismas son más competitivas, ya que infectan las plantas cuando el número de los rizobios presentes en la muestra disminuyó como resultado del efecto de la dilución.

Si bien el aspecto de las colonias es un carácter subjetivo del observador, el tamaño es un parámetro objetivo y es importante destacar que las colonias de los suelos bajo LC desarrollaron un menor tamaño, lo que indicaría un crecimiento más lento. En contraposición con esto algunos autores afirmaron que el tipo de colonia estaría relacionado al sitio de aislamiento y que el tamaño no se relaciona con la velocidad de crecimiento (Chen et al. 2002).

Kober (2004) demostró que las cepas de rizobios empleadas como inoculantes pueden variar en el suelo y en consecuencia se alteran no sólo la morfología de las colonias sino también el comportamiento simbiótico. Si bien se ha encontrado que en bradyrizobios, el aspecto de la colonia no está directamente asociado con la capacidad de fijación de N_2 y por lo tanto no está vinculado a la eficiencia para fijar N_2 .

Los suelos trabajados con LC contuvieron un mayor número de cepas tolerantes a alta temperatura, que los suelos SD. Además, sólo en el suelo LC se pudieron aislar rizobios con tolerancia a la salinidad, aunque el número de cepas tolerantes no superó el 20 %, de manera similar a lo hallado por Ferreira & Hungria (2002) y Nóbrega y colaboradores (2004), en estudios realizados con simbiontes de soja aislados de suelos brasileros. Estos resultados sugieren que los suelos bajo LC, que están desnudos durante un tiempo y contienen menos humedad, exponen a los microorganismos, entre ellos a los rizobios naturalizados presentes, a temperaturas más altas y otras condiciones de estrés, generando así un mayor número de microorganismos adaptados a temperaturas extremas.

La dilución de las muestras de suelo, tanto de SD como LC, condujo a una reducción de los aislados tolerantes, lo cual es lógico considerando que el número de rizobios resistentes al estrés es bajo y al diluir el suelo tienen menos posibilidades de nodular, ya sea por su bajo número o por su menor capacidad competitiva. Los suelos bajo LC sufren una mayor alteración ya que están expuestos a cambios extremos de temperatura, humedad, exposición al sol y viento (Ferreira et al. 2000; Dorr de Quadros et al. 2012). Todo esto genera una presión de selección que conduce al desarrollo de cepas tolerantes a condiciones adversas de temperatura y salinidad (Batista et al. 2007). En el suelo cultivado bajo SD el ambiente es más estable, lo que favorece a que en la población de rizobios prevalezcan cepas menos tolerantes a estreses.

La salinización es un problema creciente que degrada el recurso suelo. Las sales reducen el potencial de agua y las plantas, al igual que los diazótrofos simbióticos, difieren en su capacidad

para tolerar la sal (Graham 1992). En los rizobios, la sal, fundamentalmente provoca un estrés por la concentración del ión Cl^- más que por el efecto osmótico, ya que inhibe enzimas específicas (Elsheikh 1998). En este contexto, NaCl es considerado un buen indicador de la tolerancia de las bacterias al estrés salino (Abdelmoumen et al. 1999). La búsqueda de estirpes tolerantes a la salinidad dependerá del potencial para crecer y persistir en esas condiciones, y junto con la selección de cultivares de soja adaptadas a salinidad, permitirá aumentar el desempeño de la simbiosis y mantener la productividad vegetal. Así, los estudios preliminares *in vitro* permiten seleccionar cepas para estudios posteriores en el campo (Nóbrega et al. 2004). En este trabajo se determinó que los suelos bajo labranza convencional más frecuentemente albergan rizobios resistentes al estrés.

En el ensayo de nodulación y eficiencia realizado con el grupo de 200 aislados, se encontró que las cepas difieren en su capacidad para nodular y fijar N_2 , procesos que además están bajo la influencia del efecto ambiental. El proceso de fijación de N_2 es dependiente de la radiación fotosintética que varía a lo largo del año, pero también de la temperatura del aire y del suelo. Se ha demostrado que la temperatura del suelo ejerce cierto efecto sobre la nodulación de las leguminosas (Liu et al. 2011). En soja, se ha reportado que la temperatura óptima para la formación y desarrollo de los nódulos es 20-25 °C, las bajas (15 °C) o altas (30 °C) temperaturas pueden provocar el retraso o inhibición de la nodulación, en todas las etapas desde el intercambio de señales, deformación de los pelos radicales, formación del hilo de infección, desarrollo de nódulos y actividad nitrogenasa (Liu et al. 2011). Algunas de las diferencias encontradas en la nodulación podrían explicarse por el mayor número de rizobios adaptados a las altas temperaturas (37 °C), que se aislaron del suelo bajo LC.

La mayor parte de los aislados (más del 80 % recuperados con las plantas trampa de cada suelo), inoculados en las plantas de soja generan valores de PSA y PSN similares a la cepa de referencia E109. Esto indicaría el predominio de rizobios con buena infectividad y eficiencia para fijar N_2 . Las plantas leguminosas sancionan a las cepas de rizobios ineficientes, limitando su multiplicación (Graham 2008) de manera que la presencia de soja en las sucesivas rotaciones de cultivos (soja/maíz/pastura) que se realizaron en los suelos estudiados, probablemente resultó en una selección de rizobios eficientes. Por otro lado, el uso de plantas trampa es una estrategia que no permite incluir en el estudio a los rizobios no nodulantes presentes en el suelo. Se ha descrito que los suelos suelen contener poblaciones de rizobios que pierden la capacidad para nodular (Kiers et al. 2013).

Las seis cepas con características más eficientes, en relación a la cepa de referencia *B. japonicum* E109, evidenciado por mayor PSA en relación al PSN, provinieron en general, de la

mayor dilución (dilución 5° ó 6°), dos de LC (953 y 862), tres de SD (163, 456, 458) y una cepa SD de la menor dilución (1°) (5113). Si bien esto indica que estas cepas mejoraron la capacidad para fijar N₂, son competitivas e infectivas aún en bajo número, ya que interaccionan e infectan a la raíz cuando debido al efecto de la dilución disminuye el número de potenciales competidores (Alberton et al. 2006).

Por otro lado, algunos rizobios formaron una mayor masa nodular por planta que no se relacionó con un mayor PSA, si bien la inducción de estos procesos podría ser más lento, es posible que la nodulación y la FBN tardía no permitieron detectar diferencias en la biomasa aérea en el corto periodo del ensayo (Kiers et al. 2013). Esto explicaría que no se observaran diferencias en la biomasa aunque el PSN es similar o superior a la cepa control. Alternativamente otra posible explicación a considerar es que el costo energético para la leguminosa sea superior a los beneficios que le otorga la fijación de N₂. ¿Es posible que en un período mayor de cultivo, las plantas inoculadas pudieran desarrollarse mejor y aumentar las diferencias en el contenido de N total, para finalmente expresar el mejor estado nutricional en mayor rendimiento en granos? ¿La velocidad de la nodulación y una mayor biomasa de nódulos es una característica deseable o la eficiencia de fijación una característica más relevante? (Kiers et al. 2013). En cualquier caso vale la pena mencionar que la infectividad está en función no solo del potencial de la cepa, sino del potencial del cultivar de soja y de la interacción de los dos genomas (Somasegaran & Hoben 1985). Por otro lado, no se puede descartar que algunas de las cepas que establecen simbiosis poco eficientes o relaciones de tipo parasitarias, cuando interactúan con las plantas producen aún más nódulos pero una menor biomasa aérea (Denison & Kiers 2004).

En síntesis, los resultados sugieren que, los rizobios adaptados a los suelos cultivados con labranza convencional y maíz como cultivo antecesor en el último período, presentan una capacidad para fijar N₂ similar a los aislados de suelos manejados con siembra directa y cultivo antecesor soja. Un mayor porcentaje de aislados LC tienden a producir valores de PSA inferiores al de la cepa de referencia E109. Lo que está de acuerdo con el hecho de que en estos suelos están expuestos a estreses mayores para sobrevivir. Y entre las características que se asocian a la supervivencia está la capacidad de nodular (dado que el nódulo es un ambiente “protector”), pero no así la eficiencia de fijación que no hace a la supervivencia de la bacteria en sí (Denison & Kiers 2011). En tanto una proporción mayor de los aislados SD tienden a producir PSA igual o superior a la cepa E109. Es decir que los cambios de ambientes provocados por los sistemas de labranza podrían ser responsables de la variabilidad encontrada en la FBN. Aún así, estos suelos

albergan una considerable diversidad de rizobios que podrían ser la fuente de nuevos aislamientos para la formulación de inoculantes (Melchiorre et al. 2011).

La amplia diversidad de rizobios naturalizados es un recurso importante que asegura una fuente sostenible de bacterias que puedan emplearse como inoculantes, en reemplazo de las cepas actualmente comerciales. Por ello es clave continuar aislando y caracterizando rizobios, para identificar nuevas cepas para mejorar la FBN, adaptados a las diversas regiones geográficas de donde provienen (Lindström et al. 2010; Melchiorre et al. 2011).

CAPÍTULO III

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS DE DIVERSIDAD DE LOS RIZOBIOS AISLADOS

INTRODUCCIÓN

La identificación de las especies microbianas y el estudio de la interacción entre la planta, el medio y los microorganismos, se realiza utilizando diversas metodologías biotecnológicas. Entre éstas se destacan las herramientas que aportan la Biología Molecular, la Inmunología, la tecnología de las Fermentaciones, la Química biológica, entre otras. Las técnicas moleculares han provisto a la Microbiología de herramientas para conocer las modificaciones genéticas de los microorganismos, luego de que estos fueren introducidos en los ecosistemas por medio de la inoculación. Es así que en la actualidad, los estudios sobre ecología microbiana se han intensificado puesto que con técnicas moleculares es posible evaluar con precisión la dinámica de los microorganismos, la diversificación y evolución en ambientes tan complejos como el suelo.

Con el fin de realizar estudios sobre la diversidad de organismos que componen las comunidades microbianas, inferir sobre relaciones filogenéticas e identificar a los microorganismos, se han desarrollado diversos marcadores moleculares. Éstos permiten realizar una caracterización más integral y precisa que el uso exclusivo de metodologías bioquímicas (Lindström et al. 2010). Entre los métodos biotecnológicos la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) se ha convertido en una herramienta eficaz y sencilla que amplifica, en más de un millón de veces, un fragmento del genoma mediante oligonucleótidos sintéticos, llamados cebadores universales o *primers*, que actúan como iniciadores de la amplificación de ADN. Los cebadores constan de una secuencia de 15-20 nucleótidos complementarios a las zonas flanqueantes de la región que se busca amplificar. La reacción es catalizada por la enzima *Taq* polimerasa, que es estable a altas temperaturas (95 °C).

La reacción de PCR consiste en repeticiones de 25 a 40 ciclos, cada uno de los cuales incluye tres etapas:

- 1- Desnaturalización: las hebras de ADN se separan, exponiéndolas a una temperatura de 90-95 °C durante un tiempo corto, esto provoca la ruptura de los puentes de hidrógeno que une las dos cadenas.
- 2- Hibridación (*annealing*): el material genético desnaturalizado se incuba a una temperatura entre 40 °C y 60 °C, en estas condiciones los *primers* se unen a las secuencias homólogas que encuentran en el ADN.
- 3- Extensión: la *Taq* polimerasa trabaja a 72 °C, incorpora nucleótidos en el extremo 3' del cebador utilizando como molde la cadena de ADN.

La reacción en cadena de la polimerasa es probablemente la metodología que más se ha difundido como herramienta para estudiar la diversidad genética de las poblaciones bacterianas,

se suele emplear con diferentes tipos de cebadores, y/o combinada con otras herramientas moleculares:

- RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*), Amplificación aleatoria de ADN polimórfico.

Consiste en amplificar ADN con cebadores de 10 nucleótidos de secuencias aleatorias. Este método amplifica al azar y sin tener un conocimiento previo del genoma, múltiple bandas de ADN de diferentes regiones del ADN bacteriano y por lo tanto produce diferentes patrones de bandas para cada individuo o conjunto de aislados. Los RAPDs pueden ser empleados en el estudio de biodiversidad, ya que con ellos se logra mostrar las diferencias intraespecíficas o entre individuos (Abaidoo et al. 2000).

- RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), Análisis de fragmentos de restricción con longitud polimórfica.

Permite identificar polimorfismos en individuos que conforman una población de la misma especie. Esta técnica consiste en digerir el ADN genómico de un organismo con enzimas de restricción. Cuando los cambios que ocurren en la secuencia afectan los sitios de reconocimiento de las enzimas, se genera la alteración de patrón de bandas del ADN digerido. Los fragmentos obtenidos se separan por electroforesis en un gel de agarosa (Li et al. 2011).

- AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*)

Resulta de la combinación de la PCR con los RFLP con el fin de detectar polimorfismos debidos a modificaciones en secuencias del ADN que comprenden los sitios de corte de las enzimas de restricción. Se realiza, en un primer paso, la restricción del ADN genómico y luego la amplificación de algunos de los fragmentos producidos.

- DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*).

Se fundamenta en el comportamiento diferencial del ADN, en función de la secuencia de nucleótidos del mismo, en un gel de poliacrilamida en presencia de cantidades crecientes de agentes desnaturizantes como úrea y formamida. Se suele llevar a cabo con fragmentos de PCR del *16S rADN*. Esta técnica permite detectar las variaciones en la secuencia de un fragmento de ADN de hasta un nucleótido. Se emplea para el estudio de la dinámica de poblaciones microbianas, en la detección de mutaciones específicas en estudios de enfermedades y en la separación de alelos por secuenciación directa (Miller et al. 1999).

- ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*)

Combina la técnica PCR con el uso de enzimas de restricción (Laguerre et al. 1994). Se suelen utilizar los genes *16S* y *23S rADN* o partes de ambos, con o sin la región espaciadora. Los

fragmentos se amplifican con oligonucleótidos cuya secuencia está localizada en la región conservada de dichos genes. En una fase posterior el producto de la PCR es cortado con enzimas de restricción generándose patrones de bandas específicos.

- Rep-PCR (*Fingerprint*) (De Bruijn 1992).

La huella digital genómica o perfil de ADN, conocido como *fingerprint* REP, se genera empleando cebadores complementarios a fragmentos de regiones repetitivas que aparecen intercaladas a lo largo del genoma bacteriano, en ambas orientaciones. Dichas regiones se caracterizan por ser relativamente cortas (generalmente <500 pb), no codificantes. Los tres cebadores que habitualmente se emplean son: REP (*Repetitive Extragenic Palindromic*), ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) y BOX (*Enterobacterial Repetitive Sequences*). Las secuencias consenso como REP, ERIC y BOX, son secuencias intergénicas repetitivas altamente conservadas en los genomas de bacterias Gram negativas (De Bruijn 1992; Judd et al. 1993; Versalovic et al. 1994). Estos *primers*, dependiendo del objetivo y nivel de información que se desea obtener, pueden ser utilizados de forma individual (Chen et al. 2000) o en conjunto (Hungria et al. 2006; Batista et al. 2007). En este último caso la técnica recibe el nombre de rep-PCR. El conjunto de amplicones de ADN generados, luego de realizada la electroforesis en gel de agarosa, genera un perfil de ADN. El método es simple y altamente reproducible (Menna & Hungria 2011) (Fig.III-1).

Los métodos descriptos se han utilizado para estudiar la diversidad en los ecosistemas y han sido también una herramienta útil para caracterizar las poblaciones alóctonas de bacterias que inducen la formación de nódulos fijadores de N₂ en las leguminosas. Las secuencias rep-PCR también han sido empleadas para la diferenciación intraespecífica de *B. japonicum* (Laguerre et al. 1994; Loureiro et al. 2007; Batista et al. 2007; Menna et al. 2009; Angelini et al. 2011). Más aún, la amplificación por PCR de las secuencias repetidas tipo BOX, tienen una alta capacidad discriminatoria. Por lo tanto, esta metodología ha demostrado ser una herramienta útil para identificar y confirmar la identidad de rizobios aislados así como la de cepas de inoculantes (Ferreira&Hungria 2002; Kaschuk et al. 2006b; Giongo et al. 2008; Grossman et al. 2011; Lopez&Balatti 2012). Además, este tipo de método, utilizado en forma conjunta con el análisis de secuencias que codifican al *16S rADN*, o de genes como *nodC*, *nifH*, *glnA*, *glnII*, *recA*, *dnaK*, permite identificar y establecer las relaciones filogenéticas de las cepas (Lloret&Martínez-Romero 2005; Fedorov et al. 2008; Ribeiro et al. 2009).

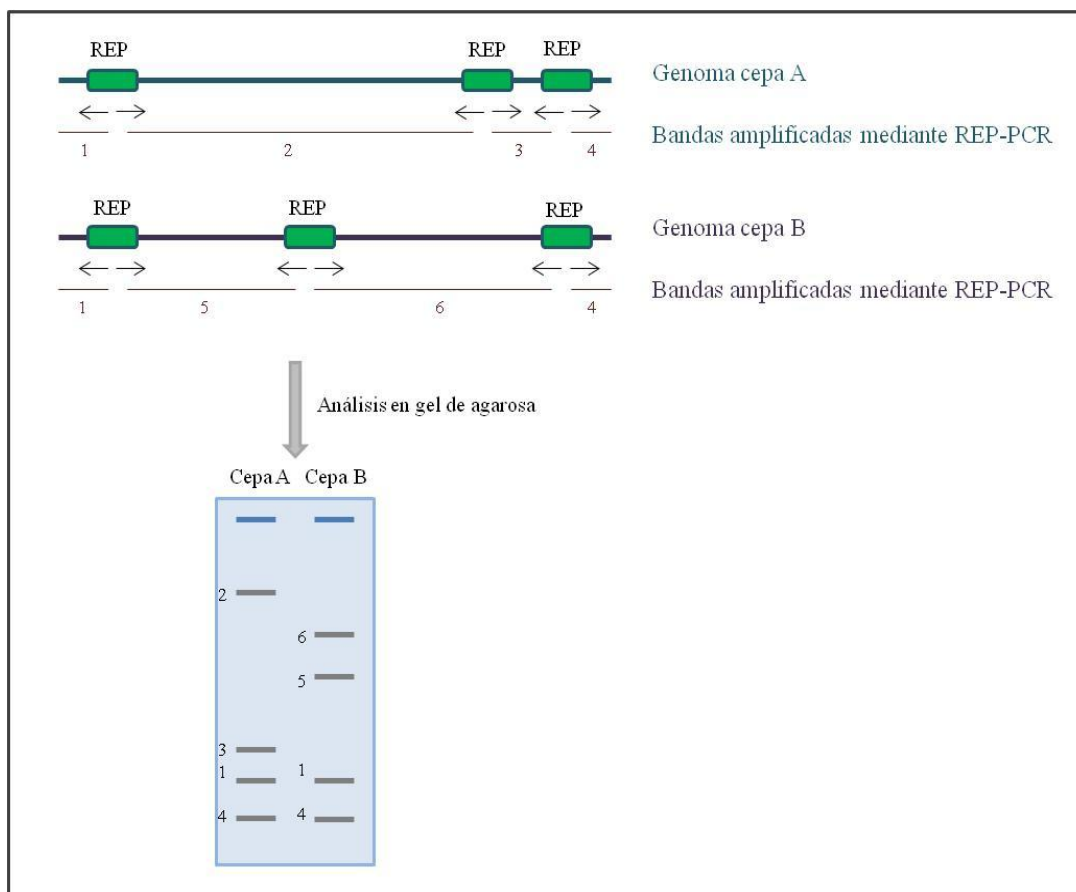


Figura III- 1: Esquema de generación de patrones de huella digital genómica (*fingerprint*) de un organismo específico por rep-PCR.

Se representa la distribución hipotética de las secuencias REP en una región de los genomas de dos microorganismos A y B. Utilizando iniciadores que reconocen las secuencias REP, se amplifican las regiones espaciadoras extragénicas. Los fragmentos de DNA generados, se separan en un gel de agarosa y se comparan los patrones de bandas entre los aislados.

Adaptado de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S1315-25562009000100003&script=sci_arttext

Los rizobios son organismos plásticos que se adaptan a ambientes muy diversos, este proceso adaptativo conduce a la aparición de linajes que toleran mejor las características específicas de cada suelo (Batista et al. 2007; Koppell&Parker 2012). Se ha encontrado que en regiones en las que *B. japonicum* y *B. elkanii* comparten ambientes, en general, *Bradyrhizobium* cambia su 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 (Tian et al. 2012), tal cual se describió que ocurrió en los suelos de la China (Zhang et al. 2011; Li et al. 2011; Tian et al. 2012). Las poblaciones de rizobios de los suelos de diversas regiones representan un importante recurso de la biodiversidad, la colección de materiales a partir de estas fuentes ha dado lugar a la presencia de colecciones de distintos países, muchas de ellas de importancia local y regional. Es a partir de los estudios de diversidad que es posible evaluar la

capacidad de respuesta de las especies y poblaciones a los cambios ambientales, conocer la riqueza genética y distribución geográfica, y plantear estrategias de aprovechamiento de los recursos genéticos disponibles (Lindström et al. 2010).

La plasticidad de los genomas de rizobios es mucho más grande de lo que se pensaba; eventos de recombinación genómica complejos, incluyen la transferencia horizontal de genes entre la cepa inoculante y cepas naturalizadas, la delección e inserción de varios elementos de ADN, mutaciones y reordenamientos, todos los cuales en conjunto han llevado a la amplia variabilidad que existe entre los aislados de los rizobios (Batista et al. 2007; Gomes Barcellos et al. 2007). Presumiblemente, la variabilidad genética se explica entre otras cosas por la presencia en los genomas de los rizobios de secuencias de inserción, que son fragmentos discretos de ADN que se transponen en el genoma (Minamisawa et al. 1998). Estos elementos de transposición (Tn) suelen contribuir al reordenamiento de genes simbióticos sobre todo cuando se encuentran próximos en el genoma (Kaluza et al. 1985). Estas modificaciones constituyen estrategias bacterianas destinadas a obtener ventajas ecológicas porque se aumenta la capacidad de adaptación de las cepas al medio (Galli-Terasawa et al. 2003; Gomes Barcellos et al. 2007; Tang et al. 2012). Este proceso adaptativo es el que condujo a la formación de las poblaciones de rizobios naturalizados. La dimensión de la diversidad de la población de rizobios simbiotes de soja, se pone de manifiesto en que, sólo entre el 6 % y el 25 % de los aislados de nódulos corresponden al perfil genético de las cepas parentales (Batista et al. 2007; Bizarro et al. 2010; Tang et al. 2012). La variabilidad genética parece estar asociada principalmente con la adaptación, la capacidad para vivir saprotróficamente y la competitividad, mientras que no se encontró una relación directa con la capacidad para establecer simbiosis (efectividad simbiótica) (Batista et al. 2007).

En diversos trabajos se ha demostrado que las interacciones entre la planta huésped y los rizobios, las prácticas agrícolas, las características edáficas y el clima impactan en la diversidad de las poblaciones de rizobios que se naturalizan en los suelos (Ramos et al. 2001; Kaschuk, et al. 2006a; Loureiro et al. 2007; Gomes Barcellos et al. 2007; Bizarro et al. 2010; Grossman et al. 2011). En estudios realizados en suelos de Brasil se encontró que las poblaciones de los simbiotes de soja introducidos en los Cerrados (Mato Grosso) son diversas. En esta región geográfica el ambiente es estresante, ya que se caracteriza por un tipo edáfico de sabana tropical con suelos ácidos, toxicidad por aluminio, altas temperaturas, y condiciones de sequía (Santos et al. 1999; Galli-Terasawa et al. 2003; Gomes Barcellos et al. 2007; Loureiro et al. 2007). De manera que los rizobios inoculados en estos suelos deben adaptarse a las condiciones de estrés

del ambiente, lo que resulta en la ocurrencia de modificaciones a nivel morfológico, fisiológico, simbiótico y genético.

Varias características del suelo influyen en la diversidad de los rizobios, como la textura, el contenido de materia orgánica (MO) y el pH. Hay evidencias de que un suelo con alto contenido de arcilla afecta la diversidad, fundamentalmente por causa de una pobre aireación (Loureiro et al. 2007). De todas maneras se ha observado que el pH, en el caso de los *Bradyrhizobium*, es el factor que afecta en mayor medida la diversidad, que aumenta cuando el pH varía en un rango de valores bajos a valores cercanos a la neutralidad (Giongo et al. 2008).

Por otro lado, estudios desarrollados en Sudamérica mostraron una fuerte correlación entre la variabilidad genética de los rizobios y la gestión conservacionista del suelo, comparado con la labranza convencional (LC) (Hungria&Vargas 2000; Ferreira et al. 2000; Kaschuk et al. 2006a; Bizarro et al. 2010). Es decir que el manejo puede conducir al cambio de parámetros del suelo, que puede resultar en una mejora de su estructura, modificando la proporción del espacio poroso como ocurre con el agregado de materia orgánica en la labranza cero o conservacionista (Siembra Directa – SD).

La SD genera cambios en el suelo que probablemente crean un ambiente favorable, para la supervivencia y diversificación de los rizobios. Eventualmente las condiciones del suelo bajo manejo conservacionista son más homogéneas que las que se encuentran bajo el sistema de LC, incluyendo menor oscilación en la temperatura del suelo, en el contenido de humedad y un aumento en la disponibilidad de C y N (Loureiro et al. 2007; Giongo et al. 2008; Bizarro et al. 2010). Grossman y colaboradores (2011) compararon la diversidad de poblaciones de rizobios nodulantes de soja en suelos con manejo conservacionista orgánico y LC. Se encontró que los campos trabajados de manera convencional fueron dominados por rizobios genéticamente similares y relacionados al inoculante. En contraste, los suelos manejados con labranza conservacionista, menos perturbados, contuvieron poblaciones de rizobios más diversas. Esta diversidad resultó más distante de las características genéticas de la cepa ingresada por el inoculante comercial. Se atribuyó como causas de las diferentes poblaciones encontradas, al impacto de la aplicación de fertilizantes y el control de plagas utilizados en cada sistema de producción, así como al aumento de la recombinación genética, que fue influenciada por la diversidad de cultivos de leguminosas (trébol y soja incluidos en las rotaciones) en los suelos bajo labranza conservacionista (Grossman et al. 2011). Es decir que en los suelos bajo labranza conservacionista se encontró una mayor diversidad bacteriana la cual se naturalizó en un ambiente más homogéneo y equilibrado.

Sin embargo, en el caso de los microsimbiontes de crecimiento rápido que nodulan la soja, en un ambiente como es el sistema de gestión de labranza mínima (SD), formaron poblaciones en las que predominaron rizobios con características simbióticas superiores, que fijaron N_2 eficientemente (Hungria et al. 2001). En tanto que las oscilaciones diarias de temperatura y humedad del suelo, y la menor disponibilidad de materia orgánica en el sistema de LC, probablemente promovieron una mayor diversidad, debido a que los individuos deben sobrevivir en una gama más amplia de condiciones ambientales, pero resultaron con menor capacidad de fijación de N_2 . Además, el uso de las fuentes de C y N que hacen los rizobios de crecimiento rápido en suelos bajo LC y SD, condujo a un agrupamiento en función del suelo de origen. Mientras las cepas provenientes de LC fueron utilizando casi todas las fuentes de C y N ensayadas, las cepas de los suelos bajo SD utilizaron vías metabólicas específicas, probablemente debido a la mayor disponibilidad de C y fuentes de N (Hungria et al. 2001). Estos resultados confirman que la adaptación al medio ambiente y a las condiciones de cultivo, generan cambios en los bradyrizobios que contribuyen a la diversidad. Este efecto es aun más notable en condiciones ambientales estresantes, como son las de los suelos de los Cerrados en Brasil, en donde probablemente las altas temperaturas fueron los estímulos disparadores de los eventos de recombinación a nivel del genoma (Batista et al. 2007), en contraposición con la menor diversidad observada en USA y Francia bajo condiciones menos severas (Hungria&Vargas 2000; Judd et al. 1993; Grossman et al. 2011).

Estudios realizados sobre las poblaciones de rizobios de suelos de América del Norte, demostraron que la recombinación ha sido el mecanismo genético que ha generado diversidad (Streeter 1994; van Berkum & Fuhrmann 2009). Esto además es acompañado por la influencia de las leguminosas nativas que se asocian a los rizobios, que favorece la diversificación de los linajes de bacterias, con independencia de la práctica de la inoculación recurrente (Tang et al. 2012). En base a lo dicho, es claro que los rizobios simbiotes de las leguminosas nativas también actúan como fuente de diversidad en el suelo, ya que con frecuencia por medio de mecanismos de transferencia horizontal, incrementan la diversidad de las estirpes inoculadas y por lo tanto generan rizobios competidores de los inoculantes comerciales. Anteriormente, otros autores determinaron que la historia de cultivo del lote, la presencia de leguminosas y en especial de la planta huésped, afectan a la población de rizobios y su diversidad, sobre todo debido al efecto rizosférico (Ferreira et al. 2000). Por otro lado, no sólo en el suelo ocurren modificaciones genéticas. Hay estudios realizados con cepas de inoculantes, en cultivo puro y ambiente controlado, que demuestran que la diversidad fisiológica y genética de una cepa de bradyrizobio

se modificó aún sin entrar en contacto con otros individuos. Es decir ocurriría una recombinación genética intrapoblacional, probablemente como resultado de reordenamiento genómico que da lugar a individuos distintos (Torres et al. 2012).

Torres y colaboradores (2012) encontraron cepas derivadas de los inoculantes comerciales que nodularon todas las plantas satisfactoriamente, muchas de las cuales mostraron una mejor capacidad simbiótica que sus progenitores. La creciente diversidad de *Bradyrhizobium* es una clara indicación de que la simbiosis de soja forma parte del proceso evolutivo a nivel genético, si bien es un carácter estable. Estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de una evaluación continua de cultivos bacterianos con el fin de identificar las simbiosis más efectivas. Más importante aún, sugieren que es posible mejorar los inoculantes comerciales mejorando la capacidad simbiótica de los rizobios mediante el *screening* de cepas dentro de la propia población para encontrar individuos con una mayor capacidad fijación de N₂ (Torres et al. 2012).

En este trabajo se analizó la diversidad genotípica mediante el método de huella digital de ADN con los cebadores BOX A1R, técnica que ha sido utilizada exitosamente por diversos autores para analizar la diversidad de poblaciones (Loureiro et al. 2007; Batista et al. 2007; Gomes Barcellos et al. 2007; Menna et al. 2009; Bizarro et al. 2010; Melchiorre et al. 2011).

Además, se estimó la diversidad aplicando índices que han sido propuestos en numerosos estudios sobre diversidad de rizobios (Alberton et al. 2006; Kaschuk et al. 2006b; Loureiro et al. 2007; Giongo et al. 2008; Nievas et al. 2012). Se determinó el Índice de Margalef (Margalef 1958) que permite medir la riqueza, que es la forma más sencilla de evaluar la biodiversidad, ya que se basa únicamente en el número de especies presentes, que en este trabajo se aplicó a perfiles BOX. El Índice de equitabilidad o uniformidad de Pielou (Pielou 1969), se aplicó para analizar la abundancia de los perfiles BOX en una muestra, es decir la frecuencia de individuos en la población microbiana del suelo. Existen índices que combinan tanto la riqueza como la equitabilidad en un solo valor, se denominan índices de diversidad, como el Índice de Shannon-Weaver (Shannon & Weaver 1949), que se emplea para cuantificar la diversidad dentro de una población. Se representa normalmente como H' y se expresa con un número positivo, que en la mayoría de los ecosistemas naturales varía entre 0,5 y 5, valores inferiores a 2 se consideran bajos y superiores a 3 son altos. La ventaja de este tipo de índice es que no es necesario identificar las especies presentes; basta distinguir unas de otras para realizar el recuento de individuos de cada una de ellas y el recuento total.

Los métodos moleculares y el conocimiento de los genomas de los organismos han provisto de las herramientas que nos permiten hacer análisis más complejos de la diversidad de los

organismos. En este trabajo se realizó la caracterización genética de los aislados por medio de una reacción Multiplex, con secuencias repetitivas RSa y el gen *nifD*.

Parker y colaboradores (2002) encontraron diferencias en el gen estructural *nifD*, que codifica para la subunidad α de la enzima nitrogenasa, en 38 cepas de *Bradyrhizobium*. Las diferencias fueron correlacionadas con el lugar de origen de las cepas, Norte América, Australia, América Central o Asia. Estos resultados sugieren que es frecuente en el suelo la ocurrencia de procesos de transferencia horizontal de genes de fijación de nitrógeno como el gen *nifD*, como consecuencia, en general ocurre un aumento en su homogeneidad en cada una de las diferentes regiones geográficas. El gen *nifD* se relaciona con la habilidad para fijar N_2 (Fedorov et al. 2008).

En este trabajo se secuenció el fragmento ITS (*Intergenic Transcript Sequence*) de un grupo de aislados representativos, cuya identidad fue confirmada. La importancia de analizar las secuencias ITS radica en el hecho de que si bien contienen partes conservadas, suelen acumular mutaciones, a diferencia del 16S *rADN*, y por lo tanto reflejan las relaciones filogenéticas (van Berkum & Fuhrmann 2000).

El objetivo de este capítulo fue analizar la diversidad genética de la colección de aislados nodulantes de la soja provenientes de las muestras de suelo SD y LC, y relacionar el nivel de diversificación con el laboreo y dilución de suelo empleados.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Caracterización molecular

Se realizó la caracterización molecular de los 186 aislados simbiotes de soja caracterizados fisiológicamente en el Cap. II.

Todas las reacciones de caracterización molecular se realizaron amplificando fragmentos de ADN por medio de la reacción de cadena de la polimerasa (PCR - *Polimerase Chain Reaction*).

Se incluyeron como controles positivos a las cepas E109, SEMIA5079 de *B. japonicum*, SEMIA5080 de *B. diazoefficiens* y las cepas SEMIA587 y SEMIA5019 de *B. elkanii*.

2. Técnicas de biología molecular.

2.1. Extracción de ADN.

La extracción de ADN genómico se realizó según la metodología descrita por Kaschuk y colaboradores (2006a). Las bacterias se cultivaron en 15 mL de YEM modificado (manitol 5 g.L⁻¹), durante 7 días, a 28 °C y luego se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y el pellet se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5 mL, se lavó tres veces con solución salina (NaCl al 0,85 %) y una vez en PBS (NaCl 150 mM; NaH₂PO₄ H₂O 2,6 mM; Na₂HPO₄. 12 H₂O 7,6 mM). Luego se resuspendió en TE 50:20 (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; EDTA Na₂ 20 mM, pH 8,0) para ajustar a una concentración de 10⁹ células.mL⁻¹, y 1,4 mL de la suspensión fue transferida a otro tubo Eppendorf. Se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se descartó y el sedimento se resuspendió en 400 µL de TE 50:20. Luego se adicionaron 50 µL de SDS (dodecil sulfato sódico) al 10 % en agua (P/V), 5 µL de proteinasa K (20 mg. mL⁻¹), 10 µL de lisozima (5 mg. mL⁻¹), 2 µL de RNAsa (10 mg. mL⁻¹, disuelta en Tris-HCl 10 mmol.L⁻¹ pH 7,5; NaCl 15 mmol.L⁻¹) a continuación la mezcla se incubó a 37 °C durante 1 hora. Las muestras se pasaron tres veces a través de jeringas luego de lo cual se adicionó NaCl y NaAcO (acetato de sodio) a concentraciones finales de 250 y 300 mmol.L⁻¹, respectivamente. Posteriormente se homogeneizó cada una y se dejó durante 1 hora a 4 °C, luego de lo cual se centrifugó a 12.000 rpm durante 15 min. A cada sobrenadante (300 µL) se le adicionó 600 µL de etanol frío al 95 % y se incubó a -20 °C. Luego, las muestras se centrifugaron a 12.000 rpm durante 15 min., se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó con 400 µL de etanol frío al 70 %, que después de centrifugar se descartó. Los precipitados se dejaron secar a temperatura ambiente durante aproximadamente 3 horas. Por último, cada precipitado se resuspendió en 50 µL de TE pH 8.

Todas las soluciones usadas para la extracción de ADN se esterilizaron previamente en autoclave a 121 °C x 15 min. La pureza y la cantidad del ADN se determinaron haciendo una corrida electroforética del ADN total en un gel de agarosa (ver apartado 2.3. Electroforesis en geles de agarosa).

2.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Los aislados fueron caracterizados en la reacción Multiplex y BOX AIR, que se describen en el siguiente punto. A partir de las relaciones establecidas en base a estos marcadores, se seleccionaron aislados sobre los cuales se profundizó la caracterización con las reacciones: RS α , *nifD*, ITS.

Todas las amplificaciones de fragmentos de ADN fueron realizadas empleando un termociclador *MiniCycler Hot Bonnet* PTC-150 (MJ. Research. Watertown, MA, USA).

El análisis de la reacción se realizó luego de observar el resultado de la electroforesis (ver apartado 2.3. Electroforesis en geles de agarosa).

2.2.1 Reacción de PCR Multiplex

La reacción Multiplex consiste en una reacción de amplificación que se realiza con los *primers* SAR y SAL, homólogos a los extremos 3' y 5' de la región RS α que sólo se encuentra en *B. japonicum* y *B. elkanii* (Hartmann et al. 1996), el otro par está formado por los primers nol 2041 y nol 3259, que son homólogos a la secuencia del locus *nolXWBTUV*, específicos de *S. fredii* (Heron et al. 1989; Meinhardt 1993) (Tabla I). Combinando estos dos pares de *primers* es posible identificar en una sola reacción si el aislado pertenece a los bradyrizobios o a los rizobios de crecimiento rápido (Pastorino et al. 2003).

La reacción se realizó en un volumen final de 15 μ L conteniendo: 1,5 mM MgCl₂; 0,375 μ M de cada cebador nol 2041 y nolB3259; 0,125 μ M de los cebadores SAR y SAL; 200 μ M de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 U de T- Plus ADN polimerasa (*Taq*) (*Highway Molecular Biology*) en *buffer* de reacción 1X (tampón 10X Highway), 10-20 ng de ADN molde, y agua hasta alcanzar el volumen final.

El programa para realizar la amplificación consistió en 30 ciclos de desnaturalización, hibridación y extensión de las hebras de ADN. Los tiempos y temperaturas utilizados se detallan en la Tabla II. Al finalizar cada reacción de PCR, los productos de las mismas fueron separados por electroforesis en geles de agarosa (ver apartado 2.3. Electroforesis en geles de agarosa y Revelado de los geles).

2.2.2 Reacción de PCR BOX A1R

El *fingerprint* del genoma de los aislados se generó con el cebador BOX A1R (Versalovic et al. 1994), que amplifica regiones intergénicas a partir de las regiones repetitivas del genoma (Tabla 11).

La reacción se realizó en un volumen final de 15 μL , conteniendo 3 mM MgCl_2 ; 3 μM del cebador BOX A1R; 200 μM de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 U de T- Plus ADN polimerasa (*Taq*) (*Highway Molecular Biology*) en *buffer* de reacción 1X (tampón 10X Highway), ADN total de 50-100 ng como ADN molde y agua hasta alcanzar el volumen final.

El ciclado se realizó respetando el esquema básico de una desnaturalización inicial; 35 ciclos de desnaturalización, hibridación y extensión y por último una extensión final. Los tiempos y temperaturas utilizados se detallan en la Tabla 12.

Al finalizar cada reacción de PCR, los productos de las mismas fueron separados por electroforesis en geles de agarosa (ver apartado 2.3. Electroforesis en geles de agarosa y Revelado de los geles). La cepa E109 de *B. japonicum*, fue incluida en cada reacción como control interno.

La huella digital de ADN (*fingerprint*) generada para cada aislado sobre la base de las regiones BOX permitió evaluar la variabilidad genómica de los aislados. Cada gel de agarosa fue foto-documentado en el analizador de imágenes *Syngene*. Luego se inició el análisis de las fotos, que consistió en considerar la presencia o ausencia de cada banda observada, de manera que se construyeron patrones de bandas que fueron evaluados con el software *GeneSnap* y su aplicación *GeneTools* (*SynGene*, Cambridge, UK). Como resultado del agrupamiento mediante la técnica de ligamiento promedio no ponderado (UPGMA) se obtuvo un dendrograma. Se ajustaron los parámetros denominados tolerancia y posición, que hacen referencia a los límites del software para interpretar que dos bandas son diferentes. Se seleccionaron los porcentajes entre 1 y 5 % como valor de tolerancia (Batista et al. 2007; Loureiro et al. 2007).

2.2.3 Reacción PCR RS α

La amplificación del fragmento RS α se realizó para los aislados seleccionados (ver apartado 4-Selección de aislados) mediante dos reacciones en tándem. En primer lugar se amplificó una secuencia de 900 pb de la región RS α , con la mezcla de reacción y el programa descriptos para la reacción Multiplex, empleando en este caso sólo los cebadores SAR y SAL.

La segunda reacción se realizó en un volumen final de 15 μL , que contenía 1,5 mM MgCl_2 ; 0,4 μM de cada cebador 17 y 18; 200 μM de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 U de T-

Plus ADN polimerasa (Taq) (Highway Molecular Biology) en buffer de reacción 1X (tampón 10X Highway), 2,5 µL del producto de la primera reacción (Multiplex) como ADN molde y agua hasta alcanzar el volumen final. (Tabla I) (Lopez & Balatti 2012).

El programa empleado para amplificar la región RS α se detalla en la Tabla II. Los productos de PCR se resolvieron por electroforesis horizontal en geles de agarosa (1,5 %) (ver apartado 2.3. Electroforesis en geles de agarosa).

2.2.4 Amplificación y Digestión del fragmento *nifD*

Se amplificó para los aislados seleccionados (ver apartado 4-Selección de aislados), un fragmento del gen *nifD* (1170 pb) con los cebadores NifD-1f y NifD-1r. La secuencia *nifD* se ubica en el genoma de *B. diazoefficiens* USDA110 en las posiciones 1907825 – 1909327 pb (Fedorov et al. 2008) (Tabla 11).

La reacción se realizó en un volumen final de 15 µL conteniendo 1,5 mM MgCl₂; 0,26 µM de cebadores NifD-1f y NifD-1r; 200 µM de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 U de T- Plus ADN polimerasa (Taq) (Highway Molecular Biology) en buffer de reacción 1X (tampón 10X Highway), 10-20 ng de ADN molde, y agua hasta alcanzar el volumen final. Las condiciones de la reacción se detallan en la Tabla 12.

Se realizó la siembra de 3µL del producto de la reacción en agarosa 1 %. Una vez confirmada la amplificación se procedió a precipitar el ADN mediante el agregado de 1 volumen de alcohol isopropílico y 10 % de acetato de sodio 3M. Se dejó *over night* a -20 °C. Luego se lavó con etanol al 70 % y se secó a temperatura ambiente. Se resuspendió el precipitado en 10 µL de agua miliQ.

La digestión del fragmento *nifD* se realizó empleando la enzima *EcoRV* (ECO 32I) 1U/µg ADN a digerir, buffer 1X 1,5 µL, ADN (producto de la amplificación) 5 µL, agua miliQ hasta volumen final de 15 µL. Se incubó a 37 °C, *over night*. La digestión se resolvió en un gel de agarosa 2,5 %.

2.2.5 Amplificación y secuenciación de ITS

Con el fin de confirmar la identidad de las cepas seleccionadas (ver apartado 4-Selección de aislados) se procedió a realizar la amplificación de la secuencia intergénica *16S-23S rADN* (ITS) (Laguerre et al. 1996).

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 30 µL, conteniendo: 1,5 mM MgCl₂; 0,5 µM de cebadores R16-1 y R23-3R -r; 200 µM de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 U

de T- Plus ADN polimerasa (*Taq*) (*Highway Molecular Biology*) en buffer de reacción 1X (tampón 10X Highway), 20-30 ng de ADN molde y agua hasta alcanzar el volumen final.

Sólo 3 μ L de los productos de cada reacción se sembraron en agarosa 1 %. Una vez confirmada la amplificación de un fragmento de 1300 pb, se procedió a precipitar el ADN mediante el agregado de 1 volumen de alcohol isopropílico y 10 % de acetato de sodio 3M. Se dejó *over night* a -20 °C. Luego se lavó con etanol al 70 %, se secó a temperatura ambiente. Los fragmentos de ADN conteniendo las secuencias ITS fueron secuenciadas en MacroGen Inc, mediante el método de Sanger (Sanger et al. 1977). Los resultados se analizaron utilizando como herramienta el algoritmo BLAST[®] (*Basic Local alignment Search Tool*). Se publicaron las secuencias completas en la base de datos NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) disponible en la página web del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

2.3 Electroforesis en geles de agarosa

El producto de cada reacción de PCR se resolvió por electroforesis horizontal en geles de agarosa en soportes de 20 cm x 24 cm.

La concentración de agarosa se ajustó considerando el tamaño de los productos que se buscaban resolver: gel de agarosa 0,7 % (p/v) en buffer TBE (Tris 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM pH: 8,0) para observar ADN total; agarosa 1 % (p/v) en buffer TBE, para la reacción Multiplex; agarosa 1,5 % (p/v) en buffer TBE, para la reacción BOX y RS α .

En todos los casos se adicionó a la solución de agarosa 0,5 μ g. mL⁻¹ de bromuro de etidio, para observar los fragmentos de ADN con un transiluminador con luz ultravioleta (longitud de onda = 260 nm) en un procesador de imágenes SynGene (Cambridge, UK) con el que se fotodocumentaron los geles. Las muestras previo a la siembra en el gel, se mezclaron con una solución 6X (sacarosa 40 % (p/v) y azul de bromofenol 0,25 % (p/v) en TBE) para su carga en el gel.

Las corridas se realizaron a voltaje constante, entre 80 y 100 volts, durante 1 a 6 horas, utilizando como solución tampón TBE 1X.

Las imágenes fueron capturadas con el software *GeneSnap* y evaluadas mediante el analizador de imágenes *GeneTools* (*SynGene*, Cambridge, UK). A fin de estimar el tamaño y/o masa molecular de los fragmentos observados se utilizó un marcador de peso molecular DNA *ladder* (100-1000 pb) (INBIO-Highway, Tandil, Argentina).

Tabla 11: Cebadores empleados en cada reacción de PCR.

Cebador	Secuencia (5' - 3')	Gen de referencia	Fragmento amplificado	Referencia
noI 2041	TGGGCAAGCGACGCTGCCGG	<i>noI</i> XWBTUV	728 pb	Pastorino et al. 2003
noIB 3259	CGCTCTTGCAACTGGGTATA			
SAR 1	GGCTCGGCTCTGTCTGTTGTATGC	RSa	900 pb	Hartmann et al. 1996
SAL 1	AGCGGGCGCGGATAGTTCTGTTG			
BOX 1 AR	CTACGGCAAGGCGACGCTGACG	Regiones repetitivas	Múltiples fragmentos	De Bruijn 1992
RS-17	ACGCATACAACGACAGAGCC	RSa	<i>B. japonicum</i> : 900 pb+780 pb <i>B. elkanii</i> : 900 pb:	Minamisawa et al. 1998
RS-18	TCAAATCGCGCTGCAACGTC			
NifD-1f	GIGGITGCGCYTAYGCMGG	<i>nifD</i>	1169 pb	Fedorov et al. 2008
NifD-1r	CCCAIGARTGCATYTGICGGAA			
R16-1	CTTGACACACCGCCCGTCA	ITS 16S-23S	1289 pb	Soon-Wo Kwon, 2005
R23-3R -r	GGTACTTAGATGTTTCAGTTC			

Tabla 12: Programa de las reacciones de PCR.

Reacción	Multiplex	BOX	Rsa (Segunda reacción)	<i>nifD</i>	ITS
Número de ciclos	30 ciclos	35 ciclos	25 ciclos	30 ciclos	30 ciclos
Desnaturalización inicial	95°C -3 min	94°C -7 min	95°C -4 min	94°C -3 min	95°C -3 min
Desnaturalización	95°C -45seg	94°C -1 min	94°C -1 min	94°C -5 seg	94°C -1 min
Hibridación	65°C - 1 min	53°C -1 min	55°C -1 min	52°C -20 seg	63°C -1min
Extensión		65°C -8 min	72°C -1 min	72°C -1min 30 seg	72°C -1 min 30seg
Extensión final	72°C - 4 min	65°C -16min	72°C -5 min	72°C -5 min	72°C -5 min

3 Diversidad genética

En base a la amplificación de las regiones repetitivas del ADN de los aislados con el primer BOX A1R, se generó un fenograma mediante el algoritmo UPGMA (método par-grupo no ponderado, con media aritmética) y el coeficiente Dice con una tolerancia del 2 %.

Para comparar la **diversidad** en la población de rizobios de los suelos se empleó el índice Shannon (Shannon & Weaver 1949) en función del número de aislamientos pertenecientes a cada grupo de perfiles en BOX A1R.

$$\text{Índice Shannon: } H' = \Sigma[(n_i/n) \ln (n_i/n)]$$

Donde: n_i es el número de aislados en cada grupo y n es el número de aislados en todos los grupos.

Para evaluar la **riqueza**, se utilizó el índice de Margalef (Margalef 1958) que estima la biodiversidad de una comunidad en base a la distribución numérica de los individuos de las diferentes especies en función del número de individuos existentes en la muestra analizada. El mínimo valor que puede adoptar es cero, y ocurre cuando solo existe una especie en la muestra.

$$R_1 = (S - 1) / \ln (n)$$

Donde S es el número de grupos y n es el número de aislados en todos los grupos (individuos).

Como una medida de **uniformidad** o equitabilidad se utilizó el índice de Pielou (Pielou 1969). Si todas las especies en una muestra presentaran la misma abundancia, el índice usado para medir la equitabilidad debería ser máximo y, por lo tanto, debería decrecer tendiendo a cero a medida que las abundancias relativas se hagan menos equitativas.

Matemáticamente se define como una medida de la biodiversidad que cuantifica la igualdad de la comunidad e indica si existen poblaciones dominantes.

$$E_1 = H' / \ln (S)$$

Donde H' es el índice de Shannon y S es el número de grupos.

4 Selección de aislados para profundizar los estudios

De la colección de 186 aislados de rizobios nodulantes de la soja que amplificaron con el primer BOX A1R, 90 obtenidos de muestras de suelos manejados con siembra directa (SD) y 96 con Labranza convencional (LC), se seleccionaron 52 cepas para profundizar la caracterización molecular y análisis de la diversidad. Se obtuvieron representantes de los principales clados del dendrograma resultante de la amplificación de las secuencias BOX, a un nivel de similitud del 40 %.

Las 52 cepas seleccionadas se caracterizaron molecularmente en base a las secuencias: $RS\alpha$, *nifD*, ITS (descriptas en el ítem Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), apartados 2.2.3 al 2.2.5).

RESULTADOS

Reacción de PCR Multiplex

La PCR Multiplex amplifica regiones específicas del genoma que identifican a los rizobios de crecimiento lento (*Bradyrhizobium*) o rápido (*Ensifer (Sinorhizobium)*). Mientras que en los primeros se amplifica un fragmento de 900 pb, en los segundos genera un fragmento de 730 pb (Fig.III- 2).

El ADN molde de las 186 aislados amplificaron la banda de 900 pb característica del género *Bradyrhizobium*. Es decir que dentro del grupo de rizobios aislados no se encontraron cepas de crecimiento rápido. Además, las cepas que no amplificaron en la reacción Multiplex tampoco nodularon las plantas de soja cuando fueron reinoculadas, probablemente se trató de endófitos no nodulantes (Li et al. 2008), por lo que fueron descartadas para los estudios posteriores.

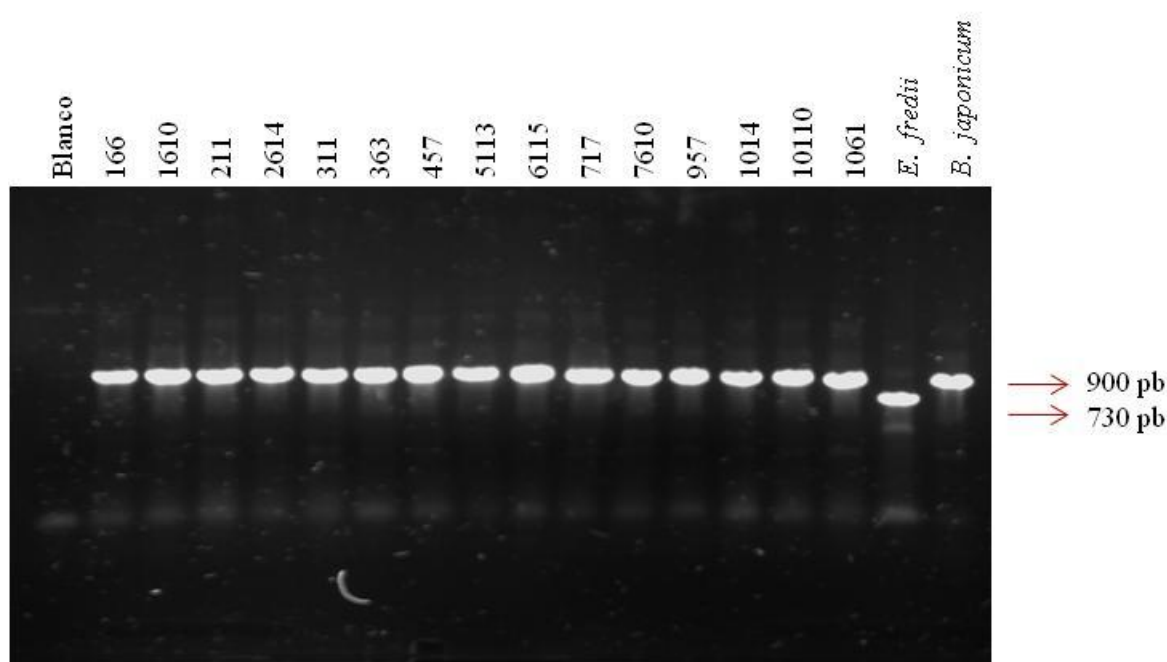


Figura III- 2: PCR Multiplex.

Amplificación del fragmento RS α de 900pb característico de *Bradyrhizobium* en los simbioses de soja aislados de los suelos.

Reacción de PCR BOX A1R

La reacción con el primer BOX A1R amplificó fragmentos de tamaños que variaron entre 190 pb y 1200 pb. Se observó alto polimorfismo en las bandas generadas. Sólo un aislado (517) no amplificó con el primer BOX A1R, lo que ha sido descrito por otros investigadores (Kaschuk et al. 2006b).

Las cepas de referencia *B. japonicum* y *B. diazoefficiens*, produjeron 12-13 bandas en el gel de agarosa, en tanto que las cepas de referencia *B. elkanii* 7-8 bandas.

Sobre la base de la amplificación BOX de cada aislado se realizaron tres dendrogramas empleando el algoritmo UPGMA y el coeficiente Dice 2 %, considerando el total de los aislados y las cepas según el suelo de donde fueron aisladas (SD o LC). En cada uno se incluyeron las cepas controles de las especies *B. japonicum* (E109, SEMIA 5079), *B. diazoefficiens* (SEMIA5080) y *B. elkanii* (SEMIA587 y SEMIA 5019) (Fig.III-3, 4, 5).

Análisis de los dendrogramas

El análisis de los *fingerprints* generados para los aislados provenientes de la muestra de suelo SD (n=90) dio como resultado un dendrograma con cuatro grandes clados agrupados con un 27 % de similitud (A, B, C y D). En el clado A se incluyeron las cepas de referencia *B. japonicum*, *B. diazoefficiens* y 59 aislados; en el clado B se agruparon los controles *B. elkanii* y 6 aislados; y en los clados C y D sólo se agruparon 12 y 13 aislados, respectivamente (Fig.III-3). El mayor número de aislados agrupados correspondió al clado A, que incluyó el 66 % de las cepas del suelo bajo SD.

Dentro del clado A, a un nivel de similitud del 35 %, se observaron 5 subclados (I, II, III, IV y V), siendo el subclado V el que agrupó a las 3 cepas controles con un 40 % de similitud entre E109 y las cepas SEMIA, y a un nivel de similitud del 75 % entre SEMIA5079 y SEMIA5080. El clado B reunió sólo el 6,7 % de los aislados del suelo bajo SD, dentro del cual las cepas controles de *B. elkanii* SEMIA587 y SEMIA5019 se agruparon con un nivel de similitud del 94 % (Fig.III-3).

En el dendrograma a un nivel de similitud del 70 % se definieron 69 perfiles diferentes, de los cuales 35 son perfiles únicos.

El análisis de los perfiles genómicos de las 96 cepas del sistema de labranza convencional (LC), generaron un dendrograma en el que se observó que las cepas controles, al igual que en el árbol anterior, se separaron por especie agrupándose con los aislados de suelo a un nivel de similitud del 20 % (Fig. III-4).

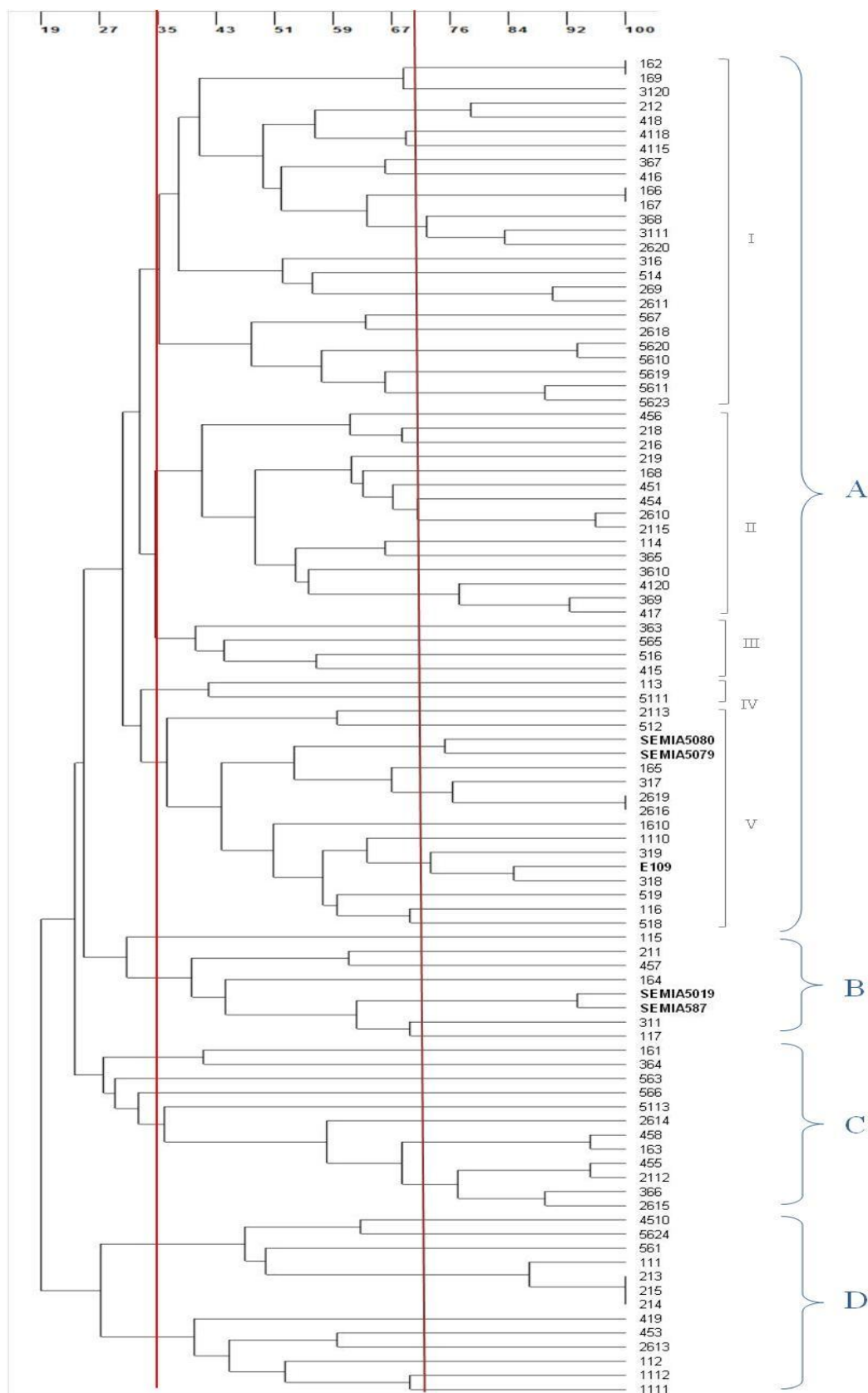


Figura III- 3: Dendrograma de aislados del suelo SD, en base al perfil de amplificación generado con secuencias BOX, empleando el algoritmo UPGMA y el coeficiente Dice 2 %.
Cepas de referencia: *B. japonicum* (E109 y SEMIA5079), *B. diazoefficiens* (SEMIA5080) y *B. elkanii* (SEMIA587 y SEMIA5019).

Es posible distinguir dos grandes clados, A y B en los que se agruparon las cepas controles de *B. japonicum* y *B. diazoefficiens* en el primero, y *B. elkanii*, en el segundo. A este nivel también se observan los clados C y D que sólo incluyeron aislados de suelo y ninguna cepa de referencia. Dentro del clado A, que agrupó al 64 % de los aislados de suelo ($n = 61$) a un nivel de similitud del 35 %, se observaron 6 subclados (I, II, III, IV, V y VI), siendo el subclado VI el que agrupó a las 3 cepas controles de *B. japonicum* (E109, SEMIA5079), *B. diazoefficiens* (SEMIA5080) con un 55 % de similitud. El clado B reunió al 19 % de los aislados LC, dentro del cual las cepas controles de *B. elkanii* SEMIA587 y SEMIA5019 se agruparon con un nivel de similitud del 70 %. Los clados C y D agruparon el 15 % y 2 % de los aislados de suelo LC, respectivamente (Fig. III-4). En tanto que el análisis del dendrograma a un nivel de similitud del 70 %, permite agrupar las cepas LC en 47 perfiles diferentes. De los cuales, 29 grupos pertenecen al clado A, 9 en el clado B, 7 en el clado C y 1 en el clado D.

El dendrograma generado a partir de la amplificación de los fragmentos BOX, aunque puede considerarse, en cierto modo, como divisiones y subdivisiones arbitrarias, en todos los casos se tomaron líneas de corte con porcentajes de similitud inferiores a la similitud necesaria para considerar que dos aislados pertenecen a la misma cepa. En efecto, se considera que huellas digitales de ADN pertenecen a la misma cepa cuando las similitudes son iguales o mayores al 70 % (Alberton et al. 2006; Kaschuk et al. 2006; Loureiro et al. 2007). En consecuencia de los 186 rizobios empleados en la reacción BOX A1R se pueden considerar como cepas diferentes a 105 de ellas.

Por último, el dendrograma integrado con la totalidad de los aislados y las cepas de referencia, los agrupó en seis clados principales (A, B, C, D, E y F) con un bajo nivel de similitud de 26% (Fig. III-5). Las cepas de referencia *B. japonicum* y *B. diazoefficiens* se agruparon con el 58 % de los aislados (clado A), un grupo menor (15%) se reunió con las cepas de referencia *B. elkanii* (clado B) y el resto de los aislados se distribuyeron 3%, 7%, 7% y 10% en los clados C, D, E y F, respectivamente.

El tipo de suelo (SD-LC) o dilución empleada (1° o 6° dil.) no se vio reflejado en el agrupamiento de los aislados (Fig. II-5).

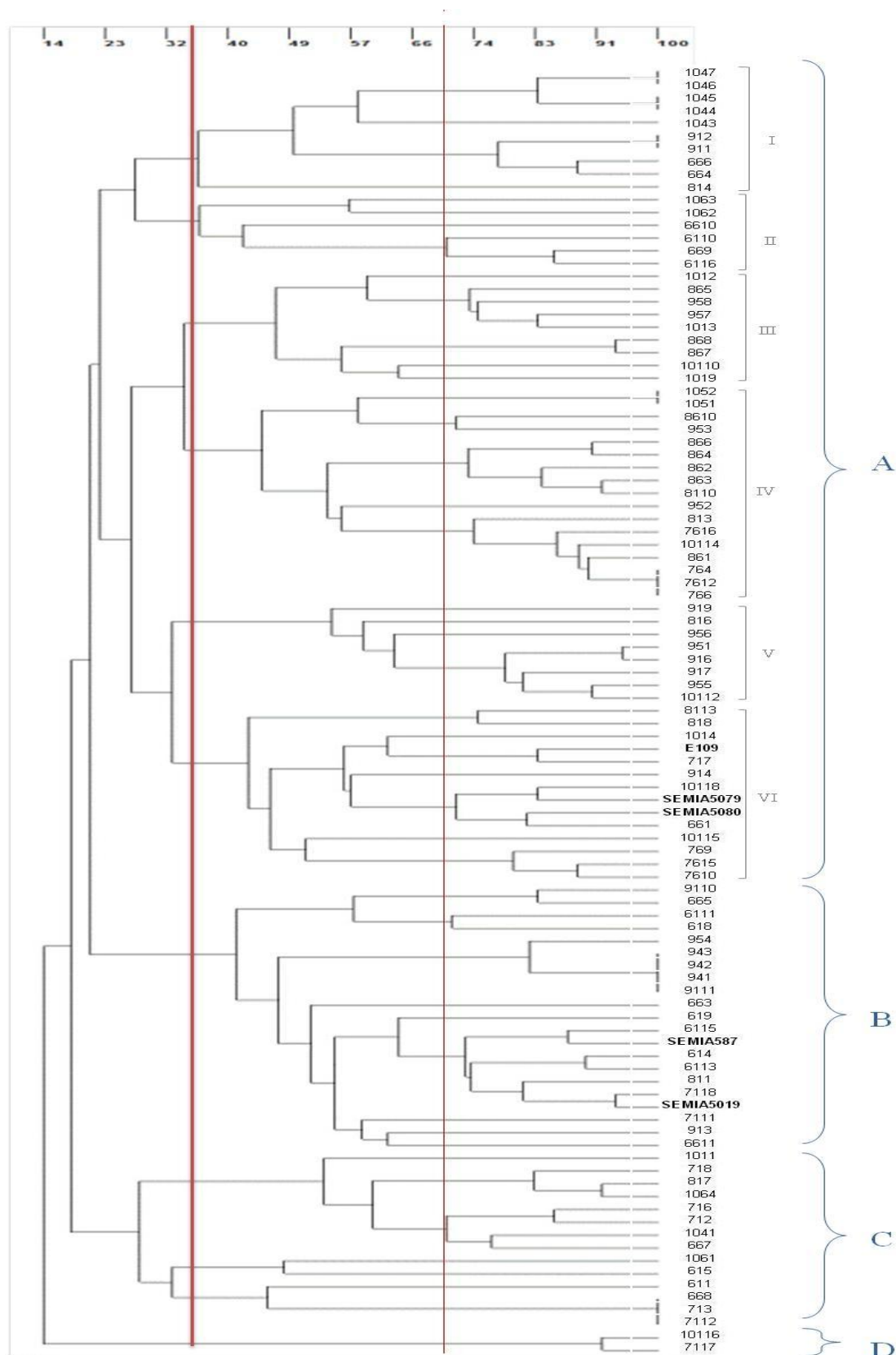


Figura III- 4: Dendrograma de aislados del suelo LC, en base al perfil de amplificación generado con secuencias BOX, empleando el algoritmo UPGMA y el coeficiente Dice 2 %.
Cepas de referencia: *B. japonicum* (E109 y SEMIA5079), *B. diazoefficiens* (SEMIA5080) y *B. elkanii* (SEMIA587 y SEMIA5019).

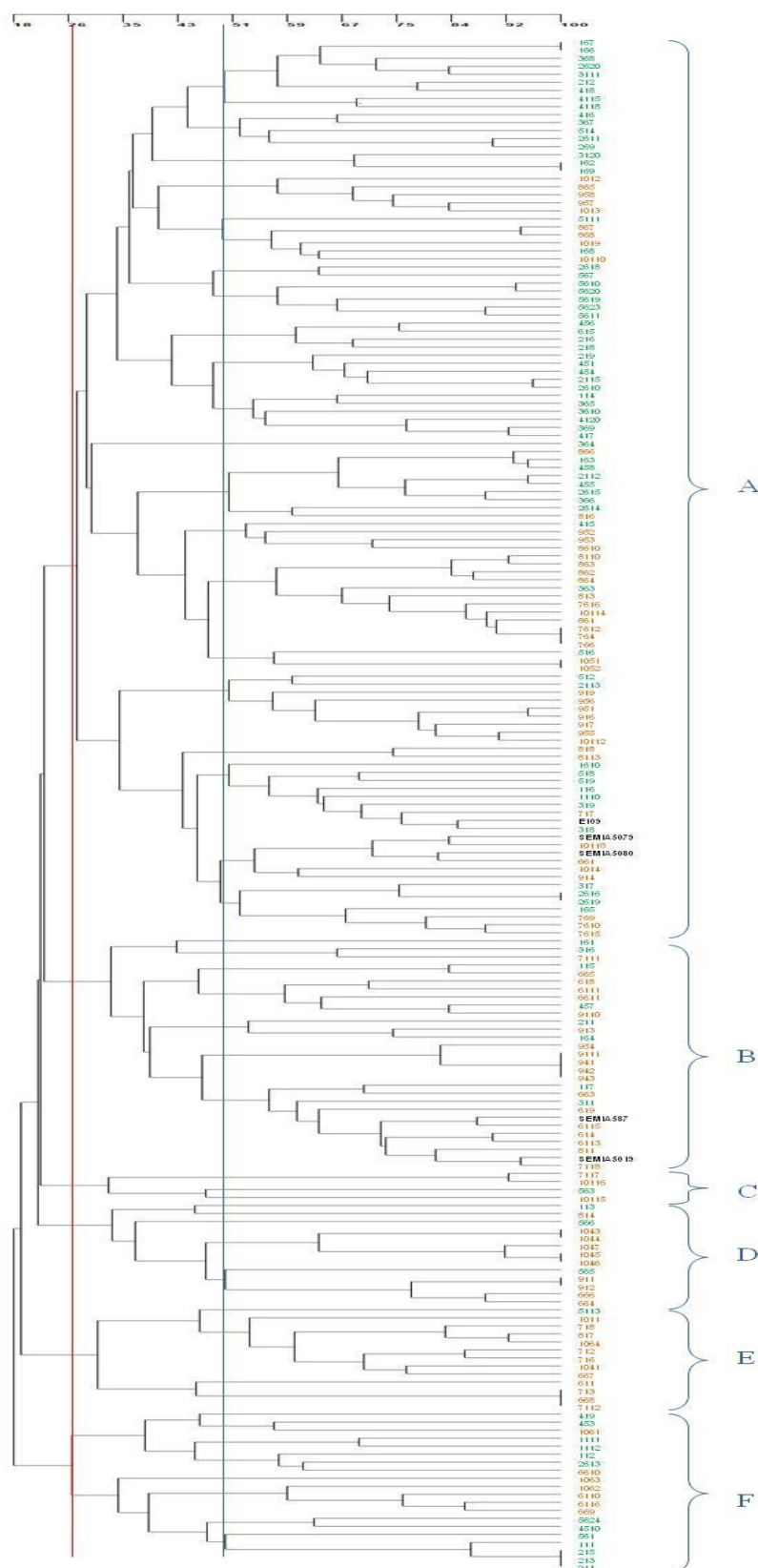


Figura III- 5: Dendrograma generado en base a la amplificación de las secuencias BOX de la totalidad de los aislados, junto con las cepas de referencia: *B. japonicum* (E109, SEMIA5079), *B. diazoefficiens* (SEMIA5080) y *B. elkanii* (SEMIA587 y SEMIA5019), empleando el algoritmo UPGMA y el coeficiente Dice 2 %.

Índices de diversidad en base a los dendrogramas resultantes de la amplificación de las secuencias BOX

Se calcularon los Índices Shannon, Margalef y Pielou, considerando los dendrogramas confeccionados con los *fingerprint* BOX de los aislados según el suelo de procedencia. Se consideran como individuos diferentes aquellos que presentan nivel de similitud menor al 70 % (Alberton et al. 2006; Kaschuk et al. 2006; Loureiro et al. 2007).

Se encontró que la mayor diversidad (Índice Shannon) ocurre en el suelo SD, respecto al suelo LC, con valores de 4,1 y 3,5 respectivamente. De la misma manera los índices Margalef y Pielou son mayores en el suelo SD (15 y 0,91, respectivamente) que en el suelo LC (9 y 0,78, respectivamente) (Fig. III-6).

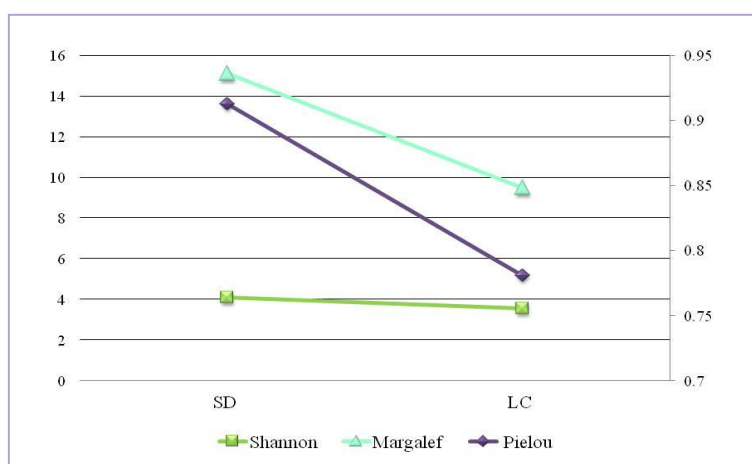


Figura III- 6: Índice de Shannon, Margalef y Pielou de los rizobios aislados. Calculados en base al dendrograma generado por la amplificación de las secuencias BOX, a un nivel de similitud del 70%. SD: Siembra Directa, LC: Labranza Convencional.

Selección de cepas para los estudios posteriores.

Sobre la base del análisis de los perfiles de secuencias BOX se seleccionaron 52 cepas que representaron los diferentes patrones observados, se buscó incluir aislados de cada una de las 10 submuestras de suelo (1 al 10), de la mayor y menor dilución de las que se realizó el aislamiento de los rizobios (Cap. II). En la Tabla 13 se presentan los aislados seleccionados y los clados en donde se ubican en el dendrograma generado con las secuencias BOX (Fig. III-5).

Tabla 13: Aislados seleccionados para continuar con la caracterización molecular, 26 de la muestra de suelo SD y 26 de la muestra LC, discriminados según la dilución de suelo de donde se obtuvieron. Se indica el clado en donde se ubican en el dendrograma generado con la amplificación de las secuencias BOX realizados con la totalidad de las cepas (Fig.: III-5).

SD				LC			
Dilución menor (1°)		Dilución mayor (6°)		Dilución menor (1°)		Dilución mayor (6°)	
Cepa	Clado	Cepa	Clado	Cepa	Clado	Cepa	Clado
116	A	162	A	614	B	661	A
117	B	164	B	618	B	663	B
211	B	166	A	6113	B	665	B
216	A	1610	A	6115	B	6611	B
219	A	2610	A	717	A	769	A
2112	A	2614	A	7118	B	7612	A
311	B	2615	A	811	B	952	A
3111	A	2618	A	814	D	953	A
3120	A	2620	A	818	A	957	A
416	A	363	A	913	B	1052	A
518	A	366	A	914	A	1061	F
5113	E	367	A	1013	A		
		457	B	1014	A		
		5620	A	10110	A		
				10115	C		

Reacción de PCR RS α

La amplificación de la región RS α , produjo en alrededor del 79 % de los aislados seleccionados (n = 41) las bandas de 900 pb y 780 pb típicas de *B. japonicum*. En tanto que el 21 % de las cepas (n = 11) amplificaron sólo el fragmento de 900 pb característico de las cepas *B. elkanii* (Fig. III - 7).

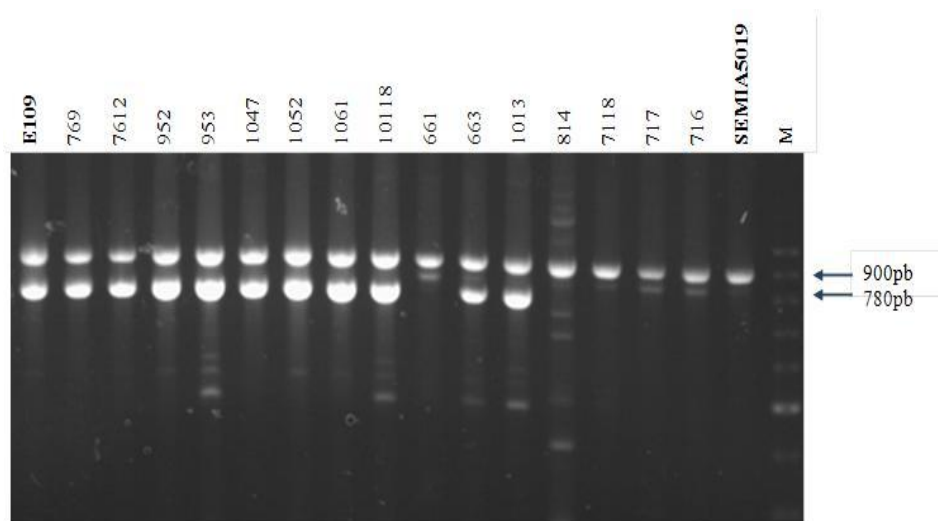


Figura III- 7: Amplificación de la región RS α en distintos aislados y controles. Bandas características de *B. japonicum* (E109): 900pb + 780pb; *B. elkanii* (SEMIA587 y SEMIA5019): 900pb. M, marcador de peso molecular 100-1000 pb.

Amplificación del fragmento nifD. Análisis de restricción.

La PCR con *primers* NifD-1f y NifD-1r, homólogos a *nifD*, generó un fragmento de 1170 pb (Fig. III-8). Se realizó un análisis de restricción del fragmento *nifD* con *EcoRV*. Para la cepa tipo de *B. japonicum* los sitios de corte se ubican en las posiciones 192 y 312 del fragmento, por lo que se originó un patrón de tres bandas de 858, 192 y 120 pb. Mientras que la cepa tipo de *B. elkanii* no tiene sitio de corte, por lo que presentó la banda de 1170 pb (Fig. III-8). Sobre la base de estos dos perfiles los aislados se agruparon en *B. japonicum* y *B. elkanii*. De la totalidad de las cepas seleccionadas (n = 52), 41 aislados presentaron el patrón de bandas de *B. japonicum* y 11 aislados presentaron las bandas características de *B. elkanii*. Esta misma agrupación de cepas también se obtuvo cuando se analizaron los patrones de amplificación RS α .

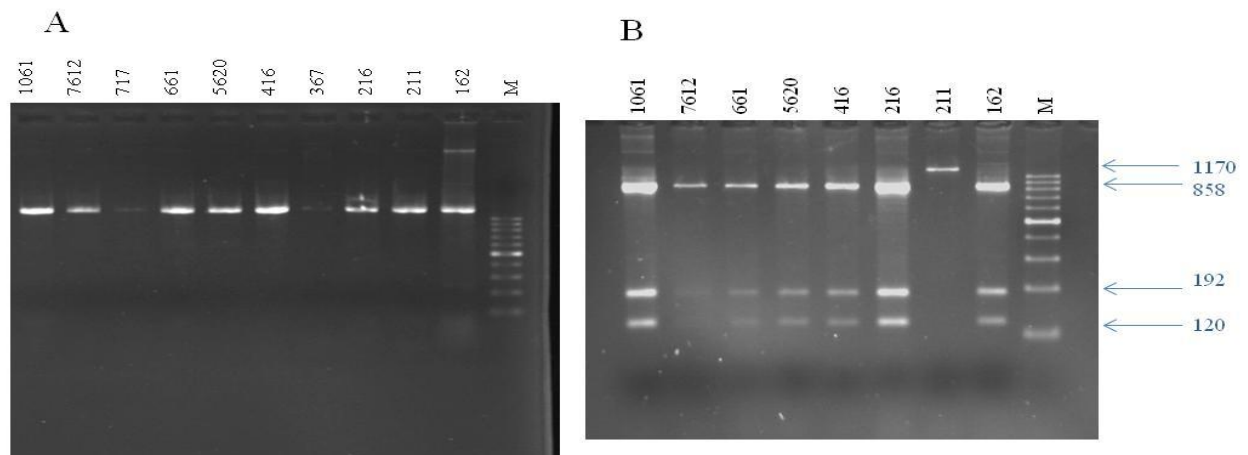


Figura III- 8: Amplificación y restricción del gen *nifD*.

A- Amplificación del fragmento *nifD* de 1170 pb, de rizobios aislados del suelo. B- Digestión del fragmento *nifD* con la enzima de restricción *EcoRV*. Bandas características de *B. japonicum*: 858, 192 y 120 pb, y de *B. elkanii*: 1170pb.

Secuenciación de ITS (Intergenic Transcribed Spacer)

Con el fin de identificar con mayor precisión a los aislados se procedió a amplificar el ITS de los 52 aislados seleccionados, de 1289 pb (Fig. III-9), que fue secuenciado.

Los aislados 116, 162, 166, 1013, 1014, 1052, 1061, 1610, 216, 219, 2112, 2610, 2614, 2615, 2618, 2620, 3111, 3120, 363, 366, 367, 416, 518, 5113, 5620, 661, 717, 769, 7612, 814, 818, 914, 952, 953, 957, 10110 y 10115 son *B. japonicum* y las cepas 117, 164, 211, 311, 457, 614, 618, 663, 665, 6113, 6115, 6611, 7118, 811, 913 son *B. elkanii* (GenBank *accession numbers*: KC460219.1, KC460213.1, KU298506.1 a KU298579.1)

Las secuencias 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 mediante la huella digital realizada por la reacción BOX A1R, en dos grandes clados (Fig.III-10) que incluyeron cada uno a las cepas de referencia *B. japonicum* y *B. elkanii*.

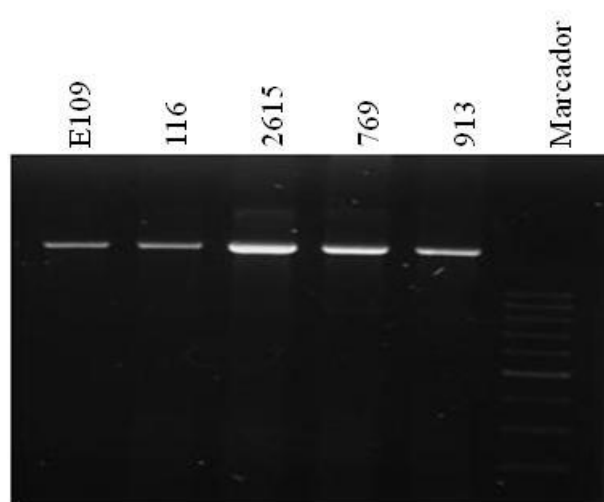


Figura III- 9: Amplificación del fragmento ITS 16S-23S (1289 pb).

El 94 % de los aislados pudieron identificarse por el conjunto de reacciones aplicadas, reacción BOX A1R, restricción del fragmento *nifD*, amplificación del fragmento RS α y secuenciación el fragmento ITS. Sólo cuatro cepas (311, 457, 811 y 913) presentaron divergencias, dado que amplificaron las bandas características de *B. japonicum* en la reacción RS α y en la restricción del fragmento *nifD*, pero según la amplificación de los fragmentos BOX A1R y la secuenciación del ITS resultaron identificadas como *B. elkanii*.

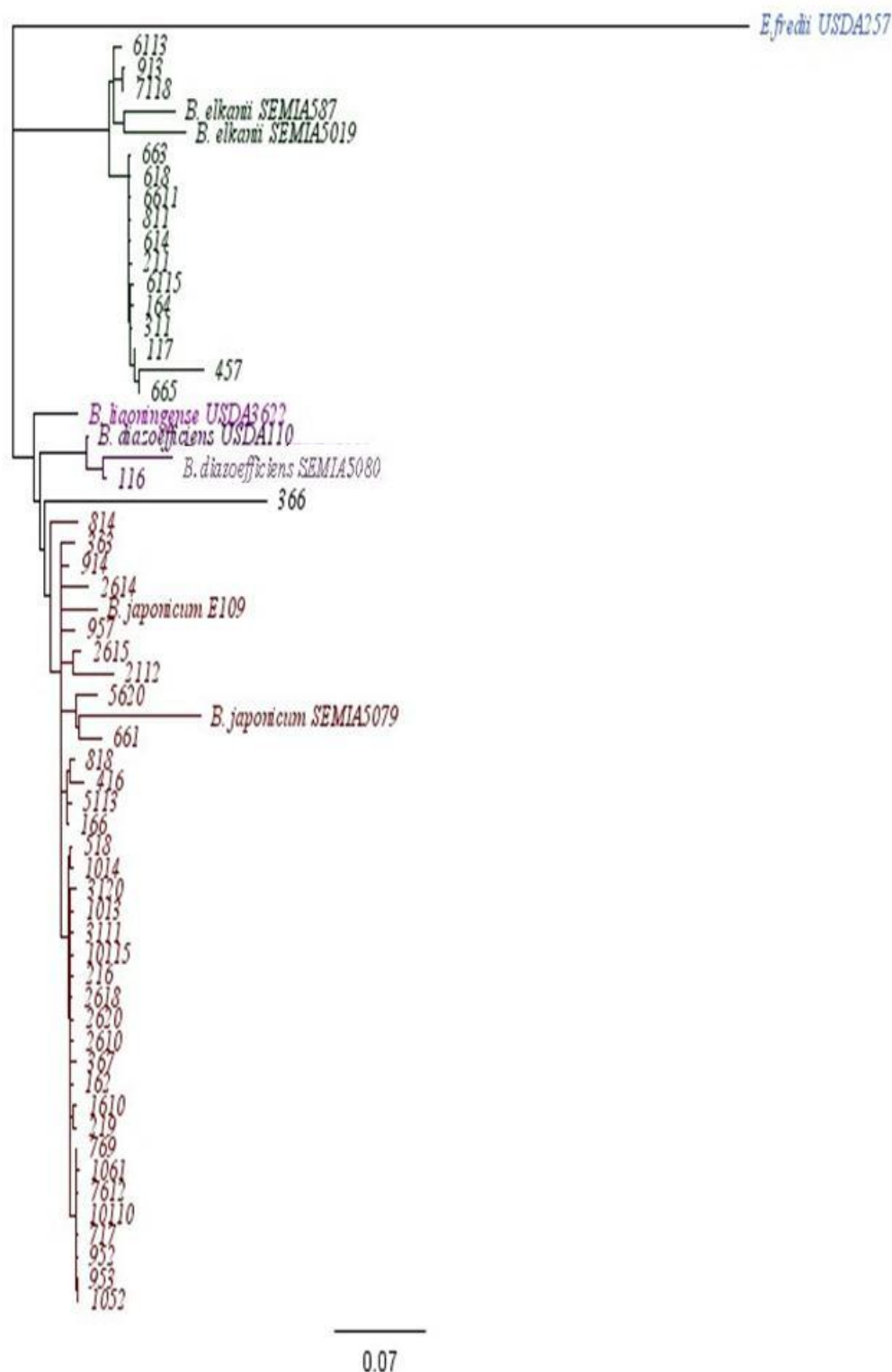


Figura III- 10: Dendrograma basado en las secuencias ITS de los aislados, junto con cepas de referencia. *B. japonicum* E109 (JQ809361.1), SEMIA5080 (JQ809365.1) y SEMIA5079 (JQ809364.1); *B. elkanii* SEMIA587 (JQ809360.1) y SEMIA5019 (JQ809363.1); *B. diazoefficiens* USDA110 (BA000040.2) y *B. liaoningense* USDA3622 (AB100759.1); considerando como *outgroup* a *E. fredii* USDA257 (NC018000.1). Entre paréntesis figuran los números de acceso en el *Genbank*.

En síntesis, el 81 % y 62 % de los aislados en los suelos bajo SD o LC respectivamente, fueron *B. japonicum*. En el suelo bajo LC el porcentaje de las cepas identificadas como *B. elkanii* fue casi el doble (38 %) que en el suelo SD (Fig. III-11).

Cuando se discriminó la identificación de las cepas según la dilución del suelo de origen se encontraron diferencias entre los suelos. Sólo el 25% de las cepas SD recuperadas de las plantas inoculadas con la 1° dilución del suelo resultaron *B. elkanii*, este porcentaje disminuyó al 14 % al emplear la dilución mayor (6°). Un efecto similar ocurrió entre los rizobios recuperados del suelo LC, pero con porcentajes mayores 47 y 27 %, en la 1° y 6° dilución, respectivamente.

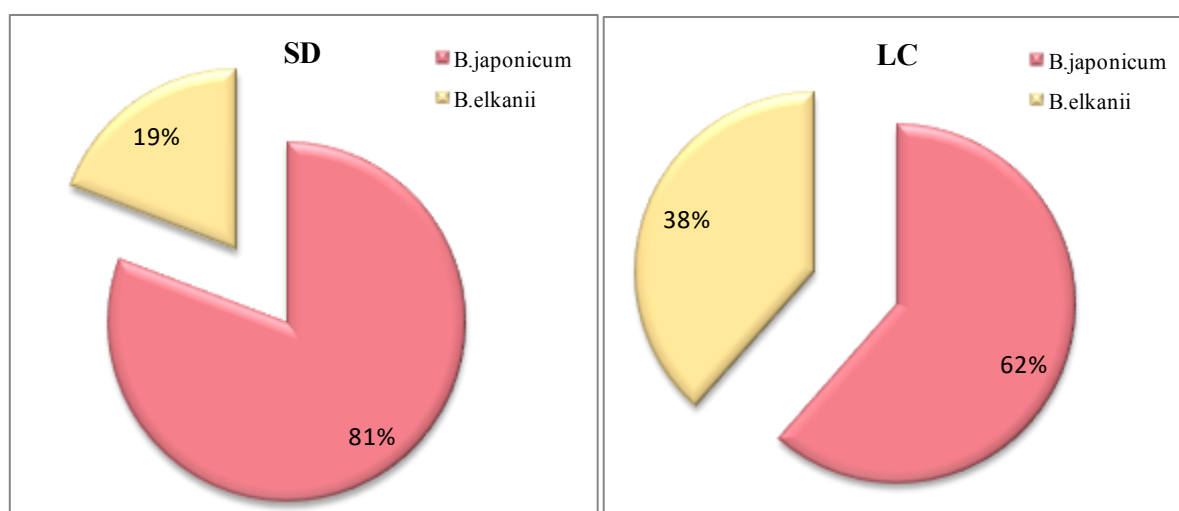


Figura III- 11: Porcentaje de cepas identificadas por la secuenciación del fragmento ITS, en cada uno de los suelos bajo SD y LC.

DISCUSIÓN

El objetivo de esta parte del trabajo fue evaluar la diversidad genética de los aislados simbioses de soja obtenidos de suelos con diferente manejo SD (siembra directa) y LC (labranza convencional) e identificarlos.

Se ha demostrado que los cultivos y el laboreo del suelo pueden afectar a la biomasa y actividad microbiana, de los microorganismos en general y en particular de los rizobios (Kaschuk et al. 2006a). La presencia de *pooles* de bacterias provenientes de diversas especies de leguminosas nativas y aún las estirpes naturalizadas, que se incorporaron con los inoculantes comerciales (Mendes et al. 2004), son fuente de genes que, a través de la transferencia lateral y la recombinación, pueden contribuir a generar nuevas estirpes incorporando genes de otras especies. La diversidad es probable se incremente a través de intercambios genéticos entre las cepas de *Bradyrhizobium* exóticas y las cepas autóctonas que nodulan leguminosas nativas. La transferencia horizontal de genes entre los rizobios en condiciones de campo parece jugar un papel importante en los Cerrados de Brasil (Galli-Terasawa et al. 2003; Batista et al. 2007; Loureiro et al. 2007). La reacción Multiplex confirmó que contienen regiones típicas características del género *Bradyrhizobium* (Pastorino et al. 2003). Este resultado era previsible considerando que los inoculantes empleados desde los años 70' se formularon en base a cepas de *B. japonicum* y *B. elkanii* (Santos et al. 1999; González 2007). La soja es exótica en la Argentina y por ello no se esperaba encontrar poblaciones de las otras especies de rizobios que nodulan la soja como *E. fredii*, *B. liaoningense*, además de los *Bradyrhizobium*.

Las amplificaciones de las secuencias RSa, *nifD*, BOX y la secuenciación del fragmento ITS, agruparon los aislados en estirpes con homología a *B. japonicum* o *B. elkanii*. Sólo cuatro cepas (311, 457, 811 y 913), presentaron marcadores típicos de las dos especies. Trabajos realizados para estudiar la relación entre el gen ribosomal *16S rADN* y el gen de fijación *nifD*, mostraron que cepas con genes *rADN* idénticos, presentaban variaciones en la secuencia *nifD*, pero se encontró homogeneidad en la secuencia dentro de cada población regional de rizobios, atribuyendo esas diferencias a eventos de transferencia horizontal. Por lo tanto, se encontraron cepas *B. elkanii*, al igual que en esta tesis, que parecen ser mosaicos genéticos, con genes derivados de dos áreas ancestrales distintas por transferencia lateral de material genético como ha sido demostrado anteriormente (Parker et al. 2002; Qian et al. 2003). La plasticidad del genoma de los rizobios ha sido estudiada por diversos autores que observaron inestabilidad y diversidad genética debido a intercambio genético y recombinación homóloga dentro del genoma (Rodríguez-Quñones et al. 1992). El análisis del alineamiento de las secuencias ITS dio lugar a más pruebas de que los miembros existentes del género *Bradyrhizobium* probablemente son

producto de recombinaciones a partir de dos progenitores diferentes, como demostraron van Berkum & Fuhrmann (2009). Por otro lado es evidente que el análisis de la diversidad de los aislados con los índices descritos refleja la diversidad.

Los valores del índice Shannon calculados en este trabajo fueron de 3,5 para suelos LC y 4 para suelo SD. Estos resultados están en línea con lo reportado en otros suelos del cono sur, los valores variaron según el manejo del suelo y la región, entre 1,8 y 6, mientras que valores superiores a 3 fueron calculados para rizobios nativos (Alberton et al. 2006; Loureiro et al. 2007; Giongo et al. 2008). Trabajos realizados con rizobios simbioses de porotos (*Phaseolus vulgaris*) arrojaron resultados similares, en estos se concluyó que el ambiente de la labranza cero brinda mayor estabilidad, lo que conduce a una disminución en el número de especies, en donde predominan las que son más exitosas en interactuar con las plantas, aunque sin embargo la diversidad intraespecífica es mayor (Kaschuk et al. 2006b). Se considera como diversidad alta los valores del índice superiores a 3. Dado que en los suelos que se estudiaron en esta tesis solo se encontraron dos especies, *B. japonicum* y *B. elkanii*, el análisis de la diversidad se refiere a la variabilidad intraespecífica. La diversidad fue alta en ambos suelos y ligeramente superior en el marco del manejo de siembra directa o labranza cero (SD) cuando se lo comparó con el sistema labranza convencional (LC).

El índice de equitabilidad o uniformidad de Pielou mostró una mayor uniformidad en la abundancia de las cepas en el suelo SD. En tanto, que el índice de Margalef mostró una mayor riqueza de cepas para el suelo bajo SD respecto de la muestra LC. Es decir, que en el suelo bajo labranza mínima (SD) no hay predominio de algún grupo particular de cepas, sino que presenta una distribución de genotipos más uniforme que en el suelo bajo LC, donde hay ciertas cepas que predominan por sobre otras, probablemente se trate de rizobios con características de mejor supervivencia o tolerancia frente a situaciones de estrés, a las que son sometidas periódicamente por la forma de manejo de suelo (Hungria & Vargas 2000; Ramos et al. 2001; Batista et al. 2007).

Se ha encontrado que tanto el muestreo como las diluciones que se emplean para realizar estudios de diversidad, de ciertas poblaciones naturales de rizobios, pueden afectar los resultados (Bala et al. 2001; Alberton et al. 2006). Se observó que la diversidad disminuyó cuando se aumentó la dilución del suelo con que se inocularon las plantas trampa. En suelos de Brasil se demostró que algunas de las cepas adaptadas a los suelos serían más competitivas que otras (Mendes et al. 2004), de manera que el realizar diluciones de suelo, con frecuencia las cepas más competitivas y compatibles con el genotipo de la planta ocupan la mayoría de los nódulos. En este trabajo se encontró que los representantes de *B. elkanii* mostraron menor capacidad para

nodular, de manera que en la 6° dilución se recuperaron entre un 13 y 20 % menos rizobios de esta especie, en SD y LC respectivamente, es decir que en los suelos estudiados la especie *B. elkanii* fue menos frecuente.

La ecología de los rizobios exóticos después introducidos en nuevas áreas de cultivo representa un primer paso hacia el establecimiento de mejores estrategias de inoculación, que a su vez puede dar lugar a la sostenibilidad y a superiores rendimientos de cultivos (Loureiro et al. 2007).

La diversidad de las características microbiológicas y simbióticas puede representar una fuente de variabilidad para mejorar la sostenibilidad agrícola. Desde el punto de vista de la planta, podría ser deseable una menor diversidad con una mayor abundancia de cepas de rizobios más específicas, eficientes y competitivas (Mendes et al. 2004). Sin embargo, el aumento de diversidad también puede considerarse como un indicador positivo de la calidad del suelo y la productividad (Ferreira et al. 2000; Kaschuk et al. 2006a) o podría garantizar un efecto de amortiguación, y posibilitar la fijación biológica de N₂, incluso bajo condiciones ambientales variables y estresantes (Loreau 2010).

En este trabajo se encontró que el suelo bajo siembra directa estudiado es un ambiente que protege a los microorganismos, donde se generaron niveles de diversidad mayores que en los suelos bajo labranza convencional, debido a que este último tipo de manejo, se generan estreses puntuales que ejercerían cierta presión de selección favoreciendo el predominio de algunas estirpes adaptadas a condiciones adversas, pero que probablemente provocan una disminución en la diversidad.

CAPÍTULO IV

SUPERVIVENCIA DE LOS RIZOBIOS NATURALIZADOS

INTRODUCCIÓN

El inicio de cualquier programa de mejoramiento que incluya a la FBN implica entre otras cosas, la selección de cepas con capacidades simbióticas superiores a las cepas comerciales conocidas, principalmente la capacidad para inducir la formación de nódulos (infectividad) y para fijar N_2 (efectividad). Otros de los criterios básicos a considerar en el proceso de selección son la supervivencia sobre la superficie de las semillas y en el suelo, la adaptación o tolerancia a situaciones de estrés, la estabilidad genética, como así también la capacidad de crecimiento en las condiciones de producción de los inoculantes. Además, hoy también interesa identificar rizobios que promuevan el crecimiento vegetal en base a mecanismos accesorios a la FBN, como son la producción de fitohormonas y/o sideróforos, y la capacidad para solubilizar fósforo (Yagi et al. 2000; Fischer & Jofré 2010).

En los últimos años el volumen de semilla de soja preinoculada que se siembra en el país se ha incrementado. Esto se debe entre otras cosas, a que con frecuencia en los establecimientos agropecuarios, debido a la falta del equipamiento adecuado o por la falta de personal calificado, es complejo realizar convenientemente la práctica de inoculación. Por ello, es útil disponer de semilla preinoculada, y para esto es clave contar con rizobios que se destaquen por la supervivencia en la cubierta de las semillas (Roughley et al. 1993; Brockwell et al. 1995; Penna et al. 2011).

Diversos estudios demuestran que el efecto del estrés provocado por la falta de agua es la principal causa de muerte de las bacterias inoculadas en las semillas (Davidson & Reuszer 1978; Temprano et al. 2002; Streeter 2003; Vriezen et al. 2007). Algunas bacterias acumulan, en condiciones de estrés osmótico, trehalosa (disacárido de glucosa), lo que protege a las células del estrés de calor y de la falta de agua (deshidratación) (Streeter 2003). Se ha demostrado que la supervivencia de *B. japonicum* sobre las semillas estaría relacionado al aumento de la síntesis de trehalosa (Streeter 2007).

La capacidad de los rizobios para sobrevivir tanto en los formulados comerciales (inoculantes) como sobre semillas preinoculadas depende de las características de la formulación, como el tipo de vehículo sólido (*carrier*), el contenido de humedad, la temperatura de almacenamiento, la presencia de otros microorganismos, entre otras; pero también depende de las características intrínsecas de la cepa de rizobios seleccionada. La supervivencia de los rizobios en la superficie de la semilla es generalmente menor que en los formulados comerciales debido al estrés de agua, a la alta temperatura, y/o compuestos tóxicos que suelen desprenderse de la cubierta de la semilla. En trabajos realizados con inoculantes formulados en base a turba, se encontró que cuando el sustrato se esteriliza y se conserva con 50 % de humedad relativa, se logra un alto número de rizobios supervivientes, luego de 6 meses de almacenamiento

(Temprano et al. 2002). En nuestro país, la legislación vigente establece que un inoculante debe garantizar un mínimo de 80.000 bacterias viables por semilla, en el momento de la inoculación y para productos recién elaborados sobre base no estéril, esta cantidad debe ser superior a 1×10^9 por gramo de producto (SAGyP, Resolución 310/1994).

Un cambio importante en la tecnología de inoculación fue el desarrollo de los “protectores bacterianos” que se aplican junto con el inoculante. Estos contribuyen a adherir los rizobios a las semillas, favoreciendo así el contacto con la raíz emergente, lo que conduce al desarrollo más temprano de los nódulos. En general, son polisacáridos que protegen a las bacterias de la desecación y que además pueden eventualmente cumplir una función nutritiva.

Es conocido que la ocurrencia de estrés (hídrico o térmico) en los primeros días de implantación del cultivo condicionará el número de células viables y las cepas de rizobios que formarán los nódulos (Melchiorre et al. 2011). Esto además, definirá la distribución de los nódulos en las raíces que a su vez, afectará la eficiencia del sistema de FBN (Davidson & Reuszer 1978; Ferraris et al. 2005). Diversos autores han demostrado la importancia de agregar aditivos de protección para las células bacterianas, que prolongan la vida de los rizobios por un período de tiempo de hasta 90 días (Penna et al. 2011; Lodeiro 2015). Los resultados de diversos estudios realizados sobre recuentos de rizobios a partir de semillas inoculadas varían, lo que probablemente se deba al tipo de adherente o protector (solución de azúcares, aceites, goma arábica, productos de recubrimiento comerciales) utilizado. En experimentos en que se realizaron recuentos a partir del momento de la inoculación, se observó una brusca disminución del número de bacterias viables en las primeras horas después de la inoculación. En aproximadamente 3 semanas el número de células viables recuperadas fue de sólo 1 al 5 % (Davidson & Reuszer 1978).

La mayor supervivencia de los rizobios se ha encontrado que guarda relación con la producción de exopolisacáridos (EPS), matriz sacárida que contribuye a aumentar la resistencia a la desecación (Osa Afiana & Alexander 1982; Streeter 2007). El estudio de la producción de EPS *in vitro*, es complejo ya que depende del medio de cultivo empleado (Streeter 2007). Los EPS junto con los lipopolisacáridos y polisacáridos capsulares de los rizobios, juegan un rol clave en el establecimiento de la simbiosis, fundamentalmente en la formación del hilo infectivo y el desarrollo de nódulos activos (Girgis et al. 2007). Aunque la participación de los EPS es crítica para la formación de nódulos indeterminados (p.ej. simbiosis de *S. meliloti* en alfalfa), no lo es para los nódulos determinados (p.ej. simbiosis de *B. japonicum* en soja), en donde se ha demostrado que sólo participan en la inhibición de los mecanismos de defensa que las plantas activan al interactuar con microorganismos (Fraysse et al. 2003).

Los EPS producidos por los rizobios son muy diversos, variando en el tipo de azúcar, en las uniones moleculares, en el tamaño de las unidades repetidas y en el grado de polimerización, así como en las decoraciones (Bomfeti et al. 2011). En el caso de *B. japonicum*, los EPS están compuestos por manosa, galactosa, glucosa y ácido galacturónico, en una proporción 1:1:2:1; mientras que *B. elkanii* sintetiza EPS conteniendo sólo ramnosa y ácido galacturónico en proporción 3:1 (Fig. IV-1).

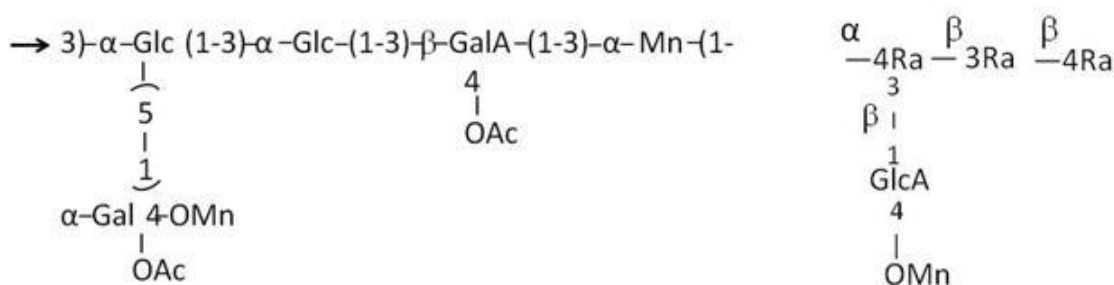


Figura IV- 1: Estructura primaria de EPS de los rizobios *B. japonicum* (izquierda) y *B. elkanii* (derecha): Glc: glucosa, Gal: galactosa; GlcA: ácido glucurónico; GalA: ácido.

Otra característica que afecta marcadamente la supervivencia y es clave para la colonización de la rizósfera es la formación de biopelículas. La rizósfera es una zona rica en nutrientes, puesto que contiene sustancias que libera la planta, allí los microorganismos encuentran un ambiente predisponente para el desarrollo (Bogino et al. 2013). Las bacterias dentro de las biopelículas mantienen una relación estable con la superficie de las raíces que colonizan, también las protege de la falta de agua y de las sustancias antibacterianas (Bogino et al. 2013).

Las biopelículas o biofilms se definen como comunidades de células que se adhieren reversiblemente a una superficie inerte o biótica, que además se encierran en una matriz polimérica extracelular de EPS, producida por las mismas bacterias (Costerton et al. 1995; Bais et al. 2014). Estas comunidades microbianas a menudo se componen de múltiples especies que interactúan entre sí y con su entorno. Esas biopelículas contienen canales por donde ocurre el intercambio de agua, nutrientes, enzimas y también desechan metabolitos tóxicos (Costerton et al. 1995; Rinaudi & Giordano 2010). Entre los componentes de la superficie bacteriana, particularmente los EPS, los lipopolisacáridos, las ciliadas y los flagelos, son cruciales para la formación de biopelículas (Rinaudi & Giordano 2010; Sorroche et al. 2012). La adhesión de las bacterias a diferentes superficies pueden ser modulada por la regulación de la síntesis de EPS (Sorroche et al. 2012). La calidad y cantidad del EPS, afectan la adhesión a la raíz y a superficies inertes. Ciertos polisacáridos son requeridos para que la bacteria se adhiera a la raíz pero no son

necesarios para adherirse a superficies inertes, por ejemplo la adhesina RapA1 (Pérez-Giménez et al. 2009).

Se ha demostrado que las moléculas de superficie bacterianas (EPS) y/o de las plantas (lectinas) están involucradas en la formación de las biopelículas y adhesión de los *Bradyrhizobium* sobre las raíces de leguminosas (Pérez-Giménez et al. 2009), aunque no estarían directamente vinculadas a los procesos de la infección y la nodulación (Pérez-Giménez et al. 2009).

Se estima que la formación y maduración del biofilm ocurre en un período relativamente largo y el pelo radical es susceptible de ser infectado sólo durante algunas horas (Pierce & Bauer 1983; Pérez-Giménez et al. 2009). La formación de biofilm es una característica clave para la supervivencia de las bacterias en los suelos y probablemente de la fijación simbiótica (Sorroche et al. 2012). Hay evidencia que *Sinorhizobium meliloti* dentro de los pelos radiculares curvados forma pequeños agregados de tipo biopelícula que podrían proporcionar inóculos para la invasión de la raíz (Rinaudi & Giordano 2010), lo cual proporciona una ventaja competitiva.

En la producción agrícola actual es frecuente el empleo de agroquímicos que constituyen otro factor de estrés a los que están expuestas las bacterias inoculadas en las semillas. Los fungicidas, insecticidas o la combinación de ambos, forman parte del paquete tecnológico desarrollado para proteger a las semillas de las enfermedades y plagas que pueden atacarlas en los primeros estadios del cultivo. La aplicación de estos productos es una práctica que se encuentra ampliamente difundida en los sistemas de producción de soja en Argentina, Brasil y Uruguay. Los agroquímicos suelen afectar la supervivencia de los rizobios, y como resultado de esto también afectan la nodulación y fijación de N₂ (Zilli et al. 2009; Ahemad & Khan 2013). Además, muchos de estas sustancias suelen acumularse en los suelos, en donde también modifican la supervivencia y actividad de la microbiota del suelo (Ahemad & Khan 2011). Varios estudios han demostrado diversos grados de toxicidad de ciertos fungicidas sobre los rizobios, como Carbendazim o Carboxin combinados con Thiram lo que resultó en una reducción de la nodulación en soja (Tu 1977; Zilli et al. 2009). También varios insecticidas, Lindano y Clorpirifos, inhibieron la supervivencia de *B. japonicum* (Tu 1977; Lodeiro 2015).

Por otro lado, estos compuestos contribuyen a modificar las condiciones del medio inhibiendo o promoviendo el desarrollo de ciertos microorganismos, debido al aporte de sustancias que pueden ser empleadas como nutrientes. En este sentido es importante evaluar la tolerancia de las cepas de rizobios a las dosis habituales de aplicación del glifosato, que es uno de los herbicidas más empleado en el cultivo de la soja. En nuestro país, cerca del 100 % del área sembrada utiliza soja transgénica, que admite la aplicación de glifosato en varios momentos del cultivo,

procedimiento que es rutinario y que se ha extendido a casi la totalidad de la zona cultivada con soja (Vitta et al. 2004). Las formulaciones de glifosato se encuentran registradas en más de cien países, siendo utilizado en más de sesenta cultivos, en manejo de bosques sometidos a intervención para su conservación, y en sistemas de cultivos diferentes incluidos el mantenimiento de los jardines.

El glifosato es un herbicida, no selectivo, de amplio espectro, que actúa inhibiendo la enzima EPSP (5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato sintasa, EC 2.5.1.19) (Moorman et al. 1992). Es una molécula formada por una fracción de glicina y un radical aminofosfato que sustituye a uno de los hidrógenos del grupo α -amino (Fig. IV-2). Por la naturaleza de sus propiedades físicas y químicas, el glifosato es un plaguicida de acción sistémica que se aplica por vía foliar, cuyo efecto es de corta duración, ya que se inactiva rápidamente con la formación de complejos de óxido de hierro y aluminio que precipitan (Morillo et al. 2000).

La molécula de glifosato es degradada, principalmente por acción de los microorganismos del suelo, que tienen la habilidad de romper el enlace C-P del ácido fosfórico, para liberar el grupo fosfato (Zablotowicz & Reddy 2004). Sin embargo, a pesar de los beneficios que genera la utilización del glifosato en lo que hace a aumentos en la producción, éste tiene efectos colaterales indeseados, ya que se ha demostrado que modifica la microbiota en general y a los simbiontes de soja en particular (Zablotowicz & Reddy 2004; Kremer & Means 2009; Druille et al. 2015).

El glifosato puede ser tóxico para algunas cepas de rizobios según las concentraciones empleadas (Druille et al. 2015), y esto se atribuye principalmente a que inhibe la síntesis de EPSP sintasa lo que resulta en la inhibición de la síntesis de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano). La falta de síntesis de estos aminoácidos puede ser el motivo de la acción tóxica de este herbicida sobre los microorganismos (dos Santos et al. 2005; Seminoti Jacques et al. 2010).

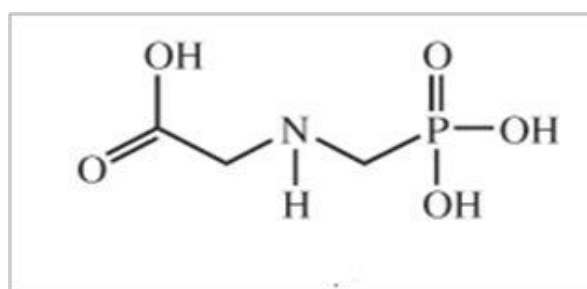


Figura IV- 2: Fórmula química del glifosato ((isopropilamina de N-fosfonometilglicina).

La industria química, continuamente lanza al mercado nuevos principios activos, de manera que la tolerancia de los rizobios a estos productos se debe evaluar permanentemente. En consecuencia, es necesario un trabajo integrado entre investigadores, productores, semilleros, fabricantes de inoculantes y agroquímicos de manera que se alcance el objetivo deseado: cultivos sanos con alto rendimiento, que no impacten en el agroecosistema.

Se ha considerado que una de las características de las poblaciones alóctonas es que suelen estar adaptadas al ambiente en el que se encuentran, por lo que presentarían mayor tolerancia al estrés y mayor supervivencia, lo que de alguna manera va en desmedro de la fijación de N₂ (Kaschuk et al. 2006a), y serían competidores de las cepas inoculadas en las semillas, pudiendo afectar el éxito de la nodulación. Los rizobios naturalizados, es probable que difieran en su capacidad para sobrevivir y tolerar agroquímicos, puesto que están influenciados por el ambiente del que provienen, en el caso de este trabajo sería el suelo bajo labranza convencional o bajo siembra directa y cultivo antecesor maíz o soja. Por ello resulta interesante evaluar las características mencionadas en las poblaciones naturalizadas, tanto para conocer los microorganismos que compartirán el ambiente con la cepa inoculada, como para encontrar estirpes con mejores características que puedan seleccionarse para la fabricación de nuevos inoculantes.

En este capítulo se plantearon los siguientes objetivos:

- Identificar, entre los aislados simbiotes de la soja, cepas con capacidad para sobrevivir sobre semilla, tolerar agroquímicos, solubilizar fósforo y producir AIA.
- Relacionar el ambiente, tipo de labranza y cultivo antecesor, de la población naturalizada de rizobios con la capacidad de supervivencia, tolerancia a agroquímicos, solubilización de fósforo y producción de AIA.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Bacterias

Se emplearon los 52 aislados seleccionados en el Capítulo III, provenientes de los estudios de diversidad descriptos, que fueron además identificados según la secuencia ITS *16S-23S rADN*. En todos los ensayos se incluyeron las cepas de referencia *B. japonicum* (E109, SEMIA5079), *B. diazoefficiens* (SEMIA5080) y *B. elkanii* (SEMIA587, SEMIA5019).

2. Supervivencia sobre semillas.

Se evaluó la supervivencia de los rizobios sobre la superficie de las semillas de soja inoculando una muestra de 50 g de semillas (aproximadamente 320 semillas) cultivar A3731 RG de Nidera con cada aislado. El inóculo consistió en un volumen determinado de cultivo bacteriano, en una concentración final de 1×10^6 bacterias. semilla⁻¹. Al caldo de inoculación se le adicionaron 300 μ L de Premax, adherente-protector bacteriano comercial (Rizobacter). Las semillas inoculadas se colocaron en recipientes plásticos, en cuya tapa se realizó un orificio al que se le adicionó algodón, para permitir el intercambio gaseoso. Así los recipientes se mantuvieron en oscuridad a 21 °C. Cada tratamiento (cepa) se realizó por duplicado.

Se realizaron cuatro muestreos (Tabla 14) y en cada uno se tomaron 10 semillas que se colocaron en tubos de 30 mL conteniendo 9 mL de agua estéril. Los tubos se agitaron durante 30 minutos, con el fin de facilitar la liberación de los rizobios adheridos a la semilla. Luego se realizaron diluciones decimales y se sembraron alícuotas por el método de la gota (Hoben & Somasegaran 1982). La placa se dividió en cuatro sectores, en donde se sembraron 10-30 μ L de las diluciones decimales de los cultivos en cada cuadrante. La siembra se realizó en el medio de cultivo YEM, suplementado con fungicida MAXIM (35 μ L cada 100 mL de medio), para evitar el desarrollo de contaminantes fúngicos. Las placas se incubaron a 28 °C durante 7 días. El recuento de rizobios se calculó en base al recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por semilla y aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Bacterias . mL}^{-1} = \text{UFC} * 1/D * 1/A$$

D: dilución, A: alícuota sembrada (mL).

Con los datos obtenidos se calculó el Porcentaje de Recuperación (% RFP, *Recovery Factor Percentages*) de cada aislamiento, en cada muestreo, considerando como valor de referencia el primer recuento realizado a las 2 hs después de la inoculación (ddi) (Penna et al. 2011).

$$\text{RFP (\%)} = R_n [\text{ufc.semilla}^{-1}] * T [\text{ufc.semilla}^{-1}]^{-1} * 100$$

Rn: número de rizobios recuperados de la semilla al n tiempo de almacenamiento. T: número de rizobios de referencia

Las cepas estudiadas se dividieron en conjuntos de cinco-ocho cepas cada uno, para facilitar el manejo del material. Estas evaluaciones independientes se estandarizaron incluyendo, para tal fin en todos los ensayos, la cepa control *B. japonicum* E109.

Tabla 14: Tiempos de muestreo en el ensayo de Supervivencia sobre semillas de soja.

	Muestreo			
	1	2	3	4
Horas desde la inoculación (ddi)	2	168	432	504

2.1. Evaluación de la supervivencia de cepas sobre semillas de soja y nodulación

Se sembraron dos semillas, provenientes de los potes del ensayo de supervivencia, a los 7 y 28 días de almacenamiento, en conos plásticos (espildings) de 20 cm de largo y 250 cc de capacidad, con vermiculita como sustrato. Cuando las plantas desarrollaron la primera hoja se raleó dejando una sola planta por recipiente. Cada tratamiento (cepa) se realizó con 6 repeticiones, que se agruparon en una bandeja para facilitar el riego, que se hizo por capilaridad agregando periódicamente agua destilada en cada una. El primer riego se realizó con solución nutritiva de Jensen libre de nitrógeno (solución Jensen 5X (g.L⁻¹): CaHPO₄ 1; K₂HPO₄ 0,2; MgSO₄.7H₂O 0,2; NaCl 0,2; FeCl₃ 0,1; agua hasta 1000 mL) (Vincent 1970). Las plantas se cultivaron en condiciones controladas de luz (16 hs / 8 hs, día/noche) y temperatura (25 °C día / 18 °C noche ± 2 °C) en cámara de cultivo. Veinte días después, las plantas se descalzaron y se efectuó el recuento de nódulos ubicados en el cuello de la raíz, considerando un cilindro imaginario con eje central en la raíz principal, un diámetro de 2,5 cm y una altura de 2,5 cm. (Técnica Burton modificada, SENASA).

3. Síntesis de Exopolisacáridos (EPS)

La cuantificación de EPS se realizó por el método que utiliza el reactivo antrona (Gerhardt et al. 1994). Este método colorimétrico no es interferido por otros componentes celulares. Consiste en una digestión con ácido sulfúrico mediante la cual se hidrolizan los polisacáridos y deshidratan los monómeros. Luego las pentosas y hexosas se convierten en furfural y

hidroximetilfurfural respectivamente. La antrona, que es un compuesto fenólico, reacciona con los productos de digestión y da un compuesto coloreado. La cantidad de EPS en la muestra se mide a través de la lectura de la absorbancia de la solución resultante. La cantidad de EPS extraída de cada muestra se estimó con una curva estándar de glucosa.

Cada aislado se cultivó en caldo YEM y a los 7 días de incubación se colocó una alícuota del cultivo en tubos *ependorfs*. Estos se centrifugaron durante 15 min. a 10.000 rpm. Una alícuota de 400 μL del sobrenadante se transfirió a otro tubo al que se le adicionaron 1000 μL de alcohol 96° (proporción 1:2,5), mezcla que se incubó a -20 °C toda la noche. Posteriormente, se centrifugó 15 min. a 10.000 rpm, el sobrenadante se descartó y el pellet se disolvió en 330 μL de agua. Luego, se agregaron 660 μL de la solución de antrona 0,2 % (antrona 0,2 g en 100 mL de H_2SO_4 concentrado), se mezcló por inversión y se incubó durante 5 minutos en hielo, luego de lo cual se midió la absorbancia a 630 nm. La producción de EPS se estimó interpolando los valores obtenidos con los valores de una curva patrón de glucosa (0, 50, 100, y 200 mg/L) en agua (Gancel & Novel 1994).

4. Formación de biopelícula (biofilm)

La formación de biopelículas se determinó en base a un ensayo cuantitativo en placas de microtitulación de 96 pocillos, en las que los biofilms se tiñeron con cristal violeta (CV) (Sorroche et al. 2012; Bais et al. 2014).

Las bacterias se cultivaron en 2 mL de medio TY (componentes en g.L^{-1} : triptona 5,0; extracto de levadura 3,0; CaCl_2 1,0) durante 7 días, los cultivos se diluyeron con medio fresco hasta una DO_{625} de 0,1. En cada pocillo se añadió una alícuota de 100 μL del cultivo luego de lo cual las placas se incubaron sin agitación durante 5 días a 28 °C. Al final del período se cuantificó el crecimiento bacteriano midiendo la DO_{625} . Luego, se eliminó el líquido de los pocillos invirtiendo la placa y se añadió en cada celda 180 μL de una solución acuosa de CV (0,1 %, p/v) y se dejó en reposo durante 15 min. Cada pocillo teñido con CV se enjuagó repetidamente con agua, se secó a temperatura ambiente durante 1 hora, luego de lo cual se solubilizó el colorante adicionando 150 μL de etanol 95 % (v/v).

La DO_{570} de la solución alcoholica de cada pocillo se midió con un MicroELISA Reader Auto (serie 700 lector de microplacas; Cambridge Technology). Los controles consistieron en pocillos con medio TY sin microorganismos, tratados de la misma manera.

5. Tolerancia a productos agroquímicos

5.1. Ensayo de tolerancia a curasemillas

Se empleó el método Bauer- Kirby (Bauer et al. 1966), para lo cual se esterilizaron discos de papel de filtro de 0,5 cm de diámetro, a los que se adicionó 5 μL (volumen final) de las mezclas de agroquímicos correspondientes a los 6 tratamientos (Tabla 15). Las mezclas se formularon de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

Un volumen de cultivo líquido de cada cepa con una concentración de 1×10^6 bacterias, se distribuyó sobre placas en medio de cultivo YEM. Sobre la película de bacterias se colocaron los discos de papel de filtro separadas entre si por la misma distancia. Se realizaron triplicados de cada placa, se incubaron a 28 °C durante 7-10 días. La evaluación se realizó considerando como cepa sensible o tolerante, de acuerdo al desarrollo de un halo de inhibición alrededor de cada disco de papel.

Tabla 15: Tratamientos del ensayo de tolerancia a Agroquímicos. Volúmenes de distintos agroquímicos aplicados sobre cada disco de papel.

Agroquímicos	Tratamientos					
	1	2	3	4	5	6
Cruiser 60 FS (60 %)		0,6 μL	0,6 μL	0,6 μL		
Apron Maxx Advanced (19 %)		1 μL	1 μL	1 μL		
Cruiser advanced					1 μL	1 μL
Sedaxane (50 %)				0,01 μL		0,01 μL
Apron maxx RFC (6,25 %)		1 μL				
Agua	5 μL	3,4 μL	3,4 μL	3,4 μL	4 μL	4 μL

5.2. Ensayo de tolerancia a glifosato

Se evaluó el crecimiento bacteriano en caldo YEM, suplementado con 21,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$ del ingrediente activo glifosato (*Rundup full 2*), equivalente a la dosis de 6 L.ha^{-1} de la formulación comercial, 36 % de ácido equivalente. Como control se empleó el caldo YEM sin agregados.

Cada cepa fue inoculada a razón de 1×10^6 bacterias. mL^{-1} , por triplicado. Se incubó a 28 °C en agitador orbital (150 rpm) por 7 días. Luego se midió la biomasa producida por densidad óptica ($\text{DO}_{625 \text{ nm}}$) de cada cultivo (Seminoti Jacques et al. 2010)

6. Producción de ácido indol acético (AIA)

La producción de AIA, se evaluó cualitativamente por el método colorimétrico descrito por Bric y colaboradores (1991). Sobre una placa de Petri con medio YEM al que se le adicionó, luego de la esterilización por autoclave, 5 mM de L-triptófano (solución stock: 5% (p/v), esterilizada a 0,7 atm durante 7 minutos), se sembraron alícuotas del cultivo de cada cepa en caldo YEM. Cada placa inoculada se cubrió con una membrana de nitrocelulosa esterilizada. Se incubaron durante 7 días a 28 °C. Luego se retiró cada membrana de las placas y se las trató sumergiéndolas en una solución del reactivo de Salkowski (0,01 M de FeCl₃ en 35% de HClO₄). Las cepas productoras de AIA adquieren una coloración rosa a púrpura, dentro de las 2 hs de realizada la reacción, a temperatura ambiente.

Cada cepa se dispuso por duplicado. Se empleó como control positivo a *B. elkanii* SEMIA 587, cepa productora de AIA (Boddey & Hungria 1997).

7. Solubilización de Fósforo (P)

La evaluación de la capacidad para solubilizar P se realizó en medio de cultivo sólido. Se ensayaron tres medios de cultivos:

– Medio Sperberg, componentes en g.L⁻¹: glucosa:10; SO₄Mg.7H₂O 1; NaCl 1; CINH₄ 5; (PO₄)₂Ca₃ 5; Agar 20; agua destilada hasta 1000mL, pH 7,2 (Sperber 1958).

– Medio NBRIP (*National Botanical Research Institute's Phosphate growth*), componentes en g.L⁻¹: glucosa 10; MgSO₄.7H₂O 0.25; (NH₄)₂SO₄ 0.1; Ca₃(PO₄)₂ 5; KCl 0.2; MgCl₂.6H₂O 5; Agar 18; agua destilada hasta 1000mL, pH 7 (Nautiyal 1999).

– Medio MMSFCP-Mg (Medio Mínimo para Solubilización de Fosfato Colegio de Postgraduados con MgCl), componentes en g.L⁻¹: glucosa 10; (NH₄)₂SO₄ 1; Ca₃(PO₄)₂ 5; extracto de levadura 0.5; MgCl₂.6H₂O 3; Agar 18; agua destilada hasta 1000mL, pH 7 (Mendoza Paredes 2010).

En primer lugar se sembraron las cepas de referencia *B. japonicum* (E109, SEMIA5079), *B. diazoefficiens* (SEMIA5080) y *B. elkanii* (SEMIA587, SEMIA5019) en forma de estrías sobre los medios agarizados con fósforo insoluble que se incubaron durante 7 días a 28 °C. Así se confirmó que el medio NBRIP es adecuado para el desarrollo de los bradyrizobios. Por eso se seleccionó para evaluar la capacidad solubilizadora de los aislados. Para ello cada placa de Petri fue dividida en 16 celdas, donde se sembraron las distintas cepas en forma de estrías. La formación de un halo transparente alrededor de las colonias se consideró como indicador de la capacidad de solubilización del P (Nautiyal 1999).

RESULTADOS

Ensayo de supervivencia sobre semillas

El recuento de rizobios sobrevivientes sobre la superficie de semillas inoculadas mostró que, salvo una cepa del suelo bajo LC (cepa 811), que no sobrevivió ni en el primer recuento a las 2 hs ddi., el resto de los aislados mostró una capacidad de supervivencia variable a lo largo de las 504 hs ddi. (21 días) que se extendió el ensayo (Fig. IV-3). Un análisis general del ensayo, muestra que durante las primeras horas se produjo una reducción importante en el número de bacterias y a partir de ese momento el número de células viables continuó cayendo a una tasa menor.

Para los cálculos de supervivencia se consideró al recuento realizado a las 2 hs ddi. como recuento de partida (referencia).

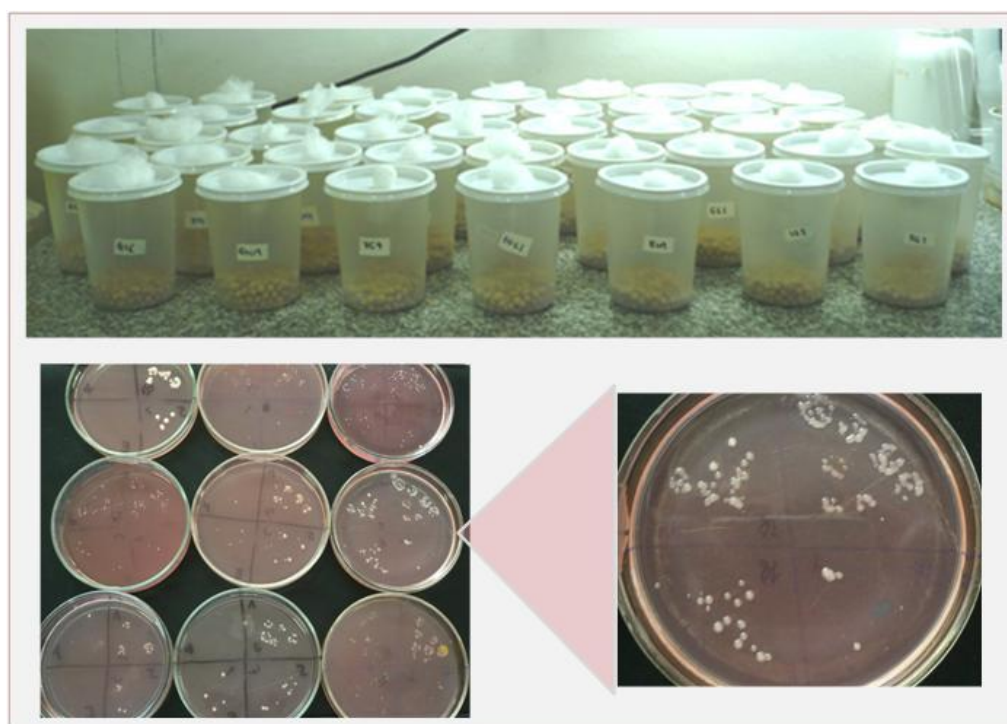


Figura IV- 3: Ensayo de Supervivencia de rizobios sobre semilla.

Arriba: Potes con tapa perforada y filtro de algodón conteniendo semillas inoculadas. Abajo: colonias de rizobios sobre placas con medio YEM adicionado con Maxim, por el método de la gota (Hoben & Somasegaran 1982).

La cepa control E109, que fue la cepa de referencia en todos los experimentos, presentó variaciones en el número de rizobios recuperados de la superficie de la semilla en cada uno de los grupos de cepas evaluadas. En general, se observó una disminución de células sobrevivientes en cada recuento, de manera que a las 2 hs ddi. el número de rizobios.semilla⁻¹ se redujo a casi un tercio, es decir que de 1×10^6 bacterias se recuperaron, en promedio, 6×10^5 UFC. semilla⁻¹. A las 168 hs sólo se recuperó el 20 % de los rizobios, lo que representó alrededor de $1,2 \times 10^5$ UFC.

semilla⁻¹. En el muestreo realizado a las 432 hs ddi. se recuperó entre un 5-12% de los rizobios viables inoculados ($3,5 \times 10^4$ UFC. semilla⁻¹ en promedio) y por último a las 504 hs ddi. (21 días) se recuperó un número aún más bajo, que estuvo entre el 2-5 % del total de bacterias recuperadas en el inicio del experimento 2 hs ddi, que en promedio fue de $1,3 \times 10^4$ UFC. semilla⁻¹.

Debido a que el número de UFC de *B. japonicum* E109 de la superficie de las semillas en cada ensayo presentó cierta dispersión se procedió a estandarizar los recuentos. Se calculó para cada una de las cepas y muestreo, el Porcentaje de Recuperación (% RFP) de rizobios supervivientes relativo a la cepa de referencia E109.

Se observó que, entre el 58 y el 77 % de las cepas presentaron un % RFP similar al de la cepa de referencia *B. japonicum* E109, en los tres tiempos de muestreo. Mientras que el número de los aislados con supervivencia inferior fue mayor en los suelos bajo SD, en cambio los suelos bajo LC presentaron, en términos relativos, un porcentaje más alto de aislados que sobrevivieron en mayor número (supervivencia superior) (Tabla 16, Fig. IV- 4).

Tabla 16: Porcentaje de cepas según la supervivencia (% RFP) sobre semillas de soja.

(*) Las diferencias significativas respecto a la cepa control E109 se indican como Inferior / Superior, para cada tiempo de recuento: 168, 432 y 504 hs ddi. (ANOVA, test de Tukey $p < 0,05$).

% RFP respecto a E109	Supervivencia respecto al control.					
	Porcentaje (%) de cepas según comportamiento sobre semilla					
	168 hs		432 hs		504 hs	
	SD	LC	SD	LC	SD	LC
Inferior *	19	15	27	12	38	8
Igual	77	62	62	69	58	73
Superior *	4	23	11	19	4	19

El número de cepas provenientes de los suelos bajo SD que sobrevivieron menos que la cepa E109, aumentó en la medida en que se extendió el período de almacenamiento. En el muestreo de las 168 hs ddi. cinco aislados (19 %) mostraron menor supervivencia, este número subió a 7 (27 %) y 10 (38 %) aislados cuando el período de almacenamiento fue mayor (Fig. IV-4). Las cepas que tuvieron este comportamiento durante todo el ensayo fueron la 117, 2112 y 367; el resto de las cepas que presentaron menor supervivencia en alguno de los muestreos, en otros resultaron sin diferencias a la cepa de E109, estas fueron: 166, 219, 2614, 2620 3111, 363 y 5620

(Fig. IV-5). En cambio, las cepas que tuvieron supervivencia superior en al menos uno o dos de los recuentos realizados fueron sólo tres: 416, 1610 y 518 (Fig. IV-5).

Analizando el comportamiento de los aislados del suelo bajo LC, se encontró un mayor número de aislados (6, 5 y 5, para cada recuento sucesivo) con número de bacterias que sobrevivieron por encima de E109, que en los suelos bajo SD. Sólo tres cepas (663, 6611 y 10115) mostraron en todos los ensayos, una mayor capacidad de supervivencia que la cepa control (Fig. IV-6).

Los rizobios aislados de los suelos bajo LC presentaron un % RFP de rizobios entre 5 y 50 veces mayor del de la cepa E109 a las 504 hs ddi., mientras que las mejores cepas provenientes de SD tuvieron % RFP de rizobios sólo 5 veces superior.

Considerando la dilución de suelo de procedencia de los aislados, se observó que las características de supervivencia, no estuvieron en función de la dilución empleada ya que se encontraron porcentajes de supervivencia parecidos, tanto en los aislados provenientes de la menor (1°) y mayor dilución (6°), en los tres grupos (Inferior, Igual y Superior) conformados según el comportamiento en supervivencia (Fig. IV- 4).

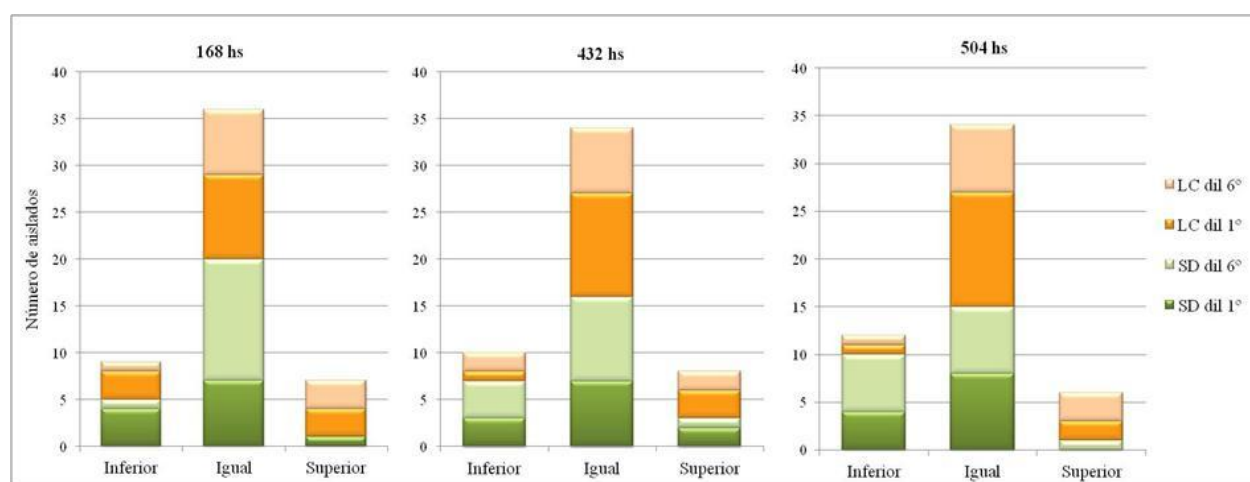


Figura IV- 4: Conformación de tres grupos de aislados según la Supervivencia: Inferior, Igual o Superior, relativo a la cepa E109, discriminado por muestreo (168, 432 y 504 hs ddi.), suelo (SD y LC), dilución (1° y 6°).

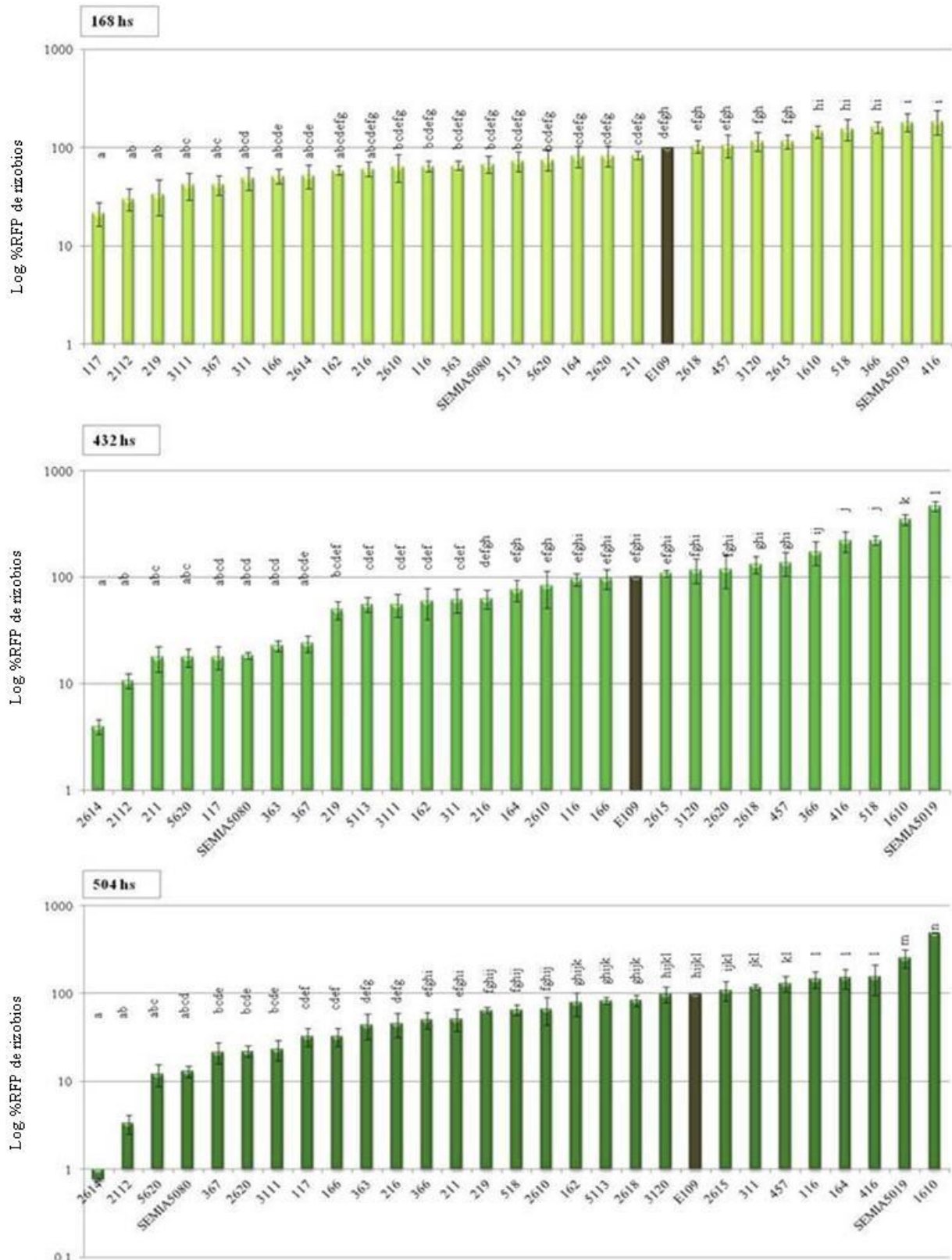


Figura IV- 5: Log₁₀ del Porcentaje de recuperación de rizobios SD supervivientes (%RFP), recuperados de las semillas de soja inoculadas, en cada tiempo de muestreo: 168 hs, 432 hs y 504 hs. Se referenció a la cepa control E109. Las letras distintas sobre las barras representan diferencias significativas para el ANOVA, test de Tukey p<0,05.

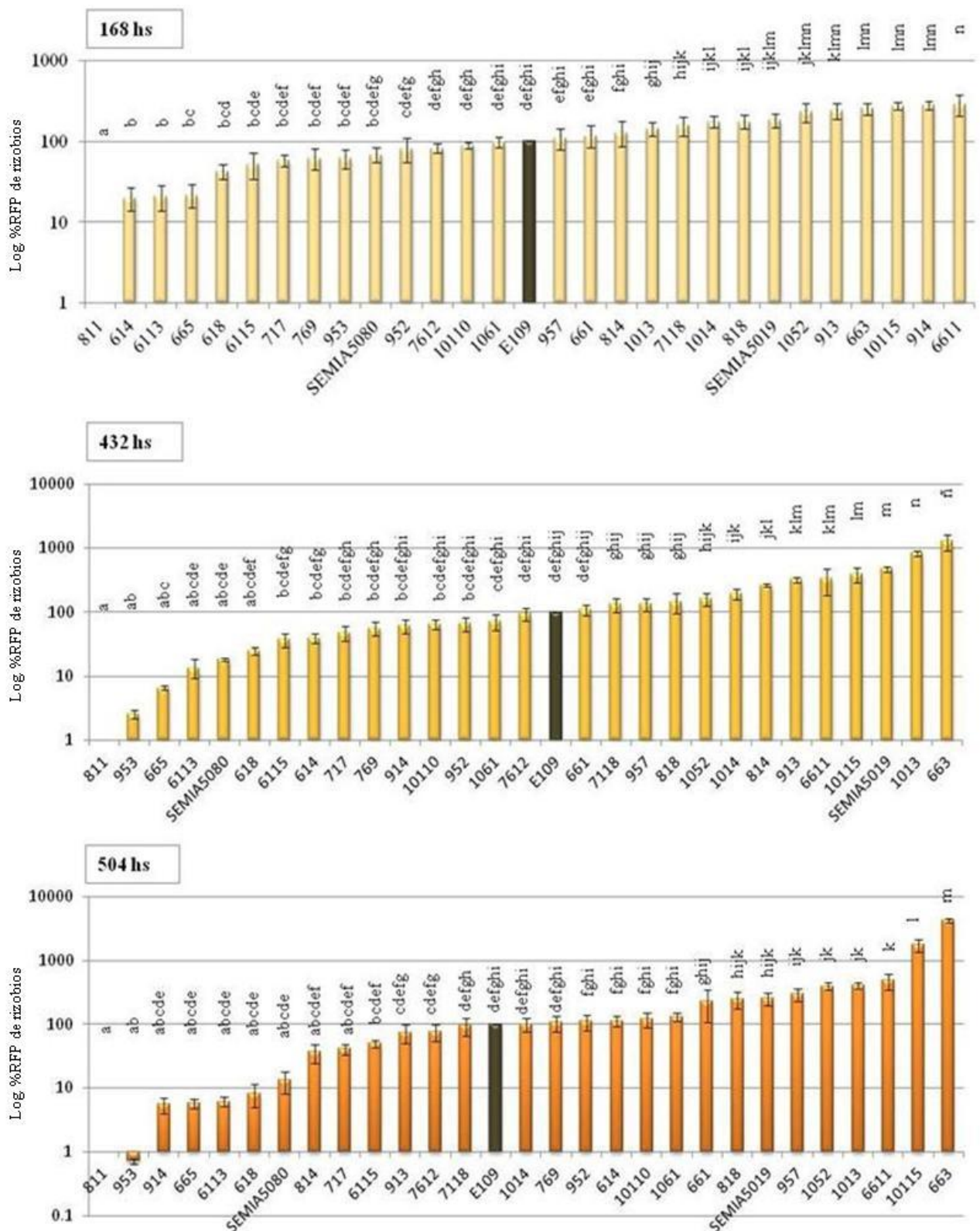


Figura IV- 6: Log₁₀ del Porcentaje de recuperación de rizobios LC supervivientes (%RFP), recuperados de las semillas de soja inoculadas, en cada tiempo de muestreo: 168 hs, 432 hs y 504 hs. Se referenció a la cepa control E109. Las letras distintas sobre las barras representan diferencias significativas para el ANOVA, test de Tukey p<0,05.

Supervivencia y nodulación

Las semillas inoculadas y almacenadas durante 7 días (168 hs) y 28 días (672 hs) ddi. se sembraron para evaluar la capacidad de nodulación de los rizobios que sobrevivieron sobre la superficie seminal.

Todos los aislados indujeron la formación de nódulos, con ambos tiempos de almacenamiento, excepto la cepa 811, de la cual no se recuperaron bacterias viables en los recuentos y la cepa 6113, que aunque se obtuvo recuento de bacterias sobrevivientes en todos los tiempos de muestreo, no noduló las plantas cuando se sembraron a los 28 días ddi.

Dos cepas (116 y 457) aisladas del suelo bajo SD, indujeron el desarrollo de un mayor número de nódulos.planta⁻¹ que la cepa de referencia E109, 92 y 99% más nódulos respectivamente, cuando las semillas inoculadas se sembraron 7 días (168 hs) luego de la inoculación. Una cepa (3120) produjo nódulos que representaron un 30 % de la nodulación de la cepa E109 y resultó ser la única con un número de nódulos significativamente menor a la cepa control. En tanto ocho cepas del suelo bajo LC (618, 663, 717, 7118, 814, 913, 953 y 10110) formaron menor número de nódulos.planta⁻¹, entre el 34 y 68 % de la cepa control. Ninguna cepa del suelo bajo LC resultó con mayor nodulación que la cepa de referencia, en este ensayo.

Es de destacar que de las diez cepas con nodulación menor a la producida por la cepa de referencia E109, nueve de ellas fueron aisladas del suelo bajo LC y ocho se obtuvieron de plantas inoculadas con la menor dilución (dil.1°).

Cuando las semillas se sembraron luego de 28 días de almacenamiento, 13 aislados (25 %) nodularon más que E109. Entre los aislados recuperados de los suelos bajo SD, las cepas 457, 1610, 2614, 216, 366, 416 y 5113 indujeron entre el 85 y el 200 % más nódulos que la cepa E109. Las cepas 219, 367 y 2112, en cambio, fueron las que produjeron la menor cantidad de nódulos, la primera sólo produjo un 27 % de la nodulación de E109, y las otras dos cepas un 48 %. Entre las cepas de los suelos bajo LC, los aislados 914, 76112, 1014, 10110, 10115 y 1061 nodularon entre 50 a 170 % más que E109. En tanto que 618, 6115, 814 y 913 fueron los que indujeron menos nódulos que E109 (además de los aislados 6113 y 811 que no produjeron nódulos), con valores de nodulación entre 23 y 44 % de la cepa control (Fig. IV-7).

Se observó que las cepas SD 219, 367 y 2112, que en el ensayo de Supervivencia sobre semilla, habían presentado bajo % RFP a las 504 hs ddi. (Fig. IV-5), formaron menos nódulos, al igual que las cepas LC 618, 6113 y 811. En tanto que las cepas 1610, 416 y 457 de SD, 10115 y 914 de LC de las cuales se recuperó un alto número de bacterias, tal cual era de esperar indujeron una mayor nodulación que el control. Pero el análisis conjunto de los aislados mostró que la

capacidad de nodulación de los rizobios no se correlacionó, en todos los casos, con el número de células viables sobrevivientes obtenidas en los recuentos de UFC.

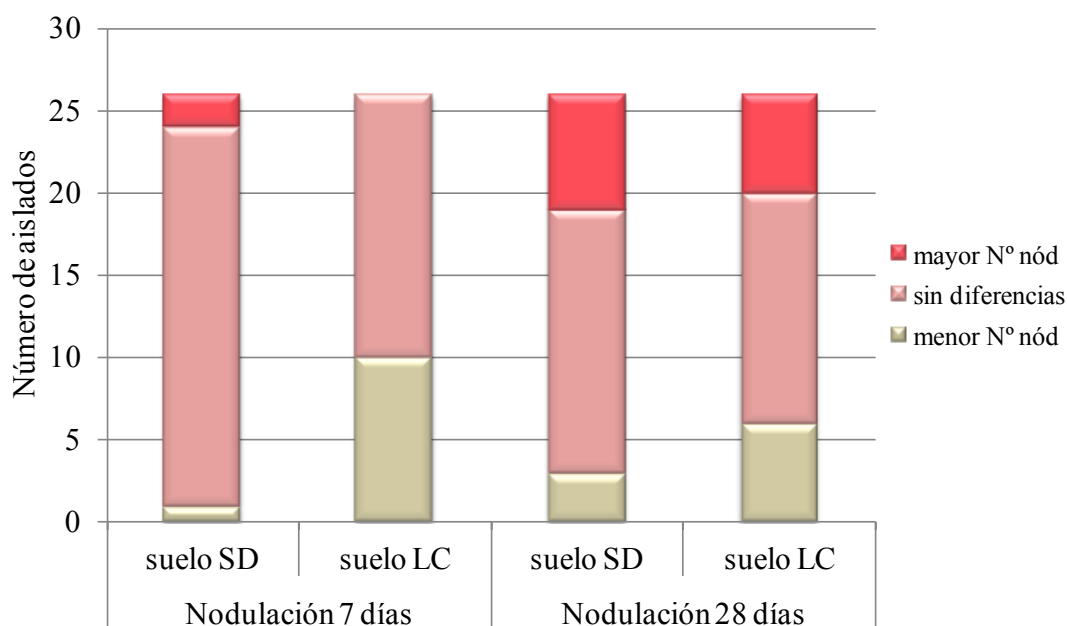


Figura IV- 7: Número de aislados según la producción de nódulos en plantas de soja, respecto a la cepa de referencia *B. japonicum* E109.

Las semillas fueron inoculadas y almacenadas por 7 y 28 días antes de la siembra. Diferencias significativas, según Anova, test de LSD, $p < 0,05$.

Síntesis de Exopolisacáridos (EPS)

Los aislados también se caracterizaron en base a su capacidad para producir EPS (Fig. IV-8). El 34 y 30 % de las cepas de los suelos bajo SD y LC respectivamente, produjeron mayor cantidad de EPS que la cepa control *B. japonicum* E109.

La producción de EPS fue un carácter que varió entre el 7% (cepa 367) y el 1000% (cepa 117) en los aislados de SD, y entre el 7% (cepa 814) y el 2000% (cepa 811) para las cepas aisladas de suelos LC (Fig. IV-9), respecto a la cepa de referencia E109.

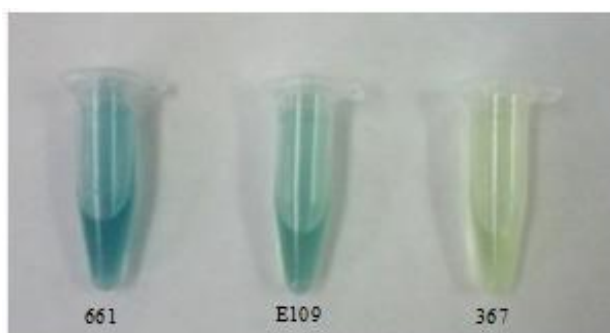


Figura IV- 8: Evaluación colorimétrica de la producción de EPS, por el método de Antrona. Cepas 661, E109 y 367, de izquierda a derecha, mayor a menor ppm de glucosa determinada.

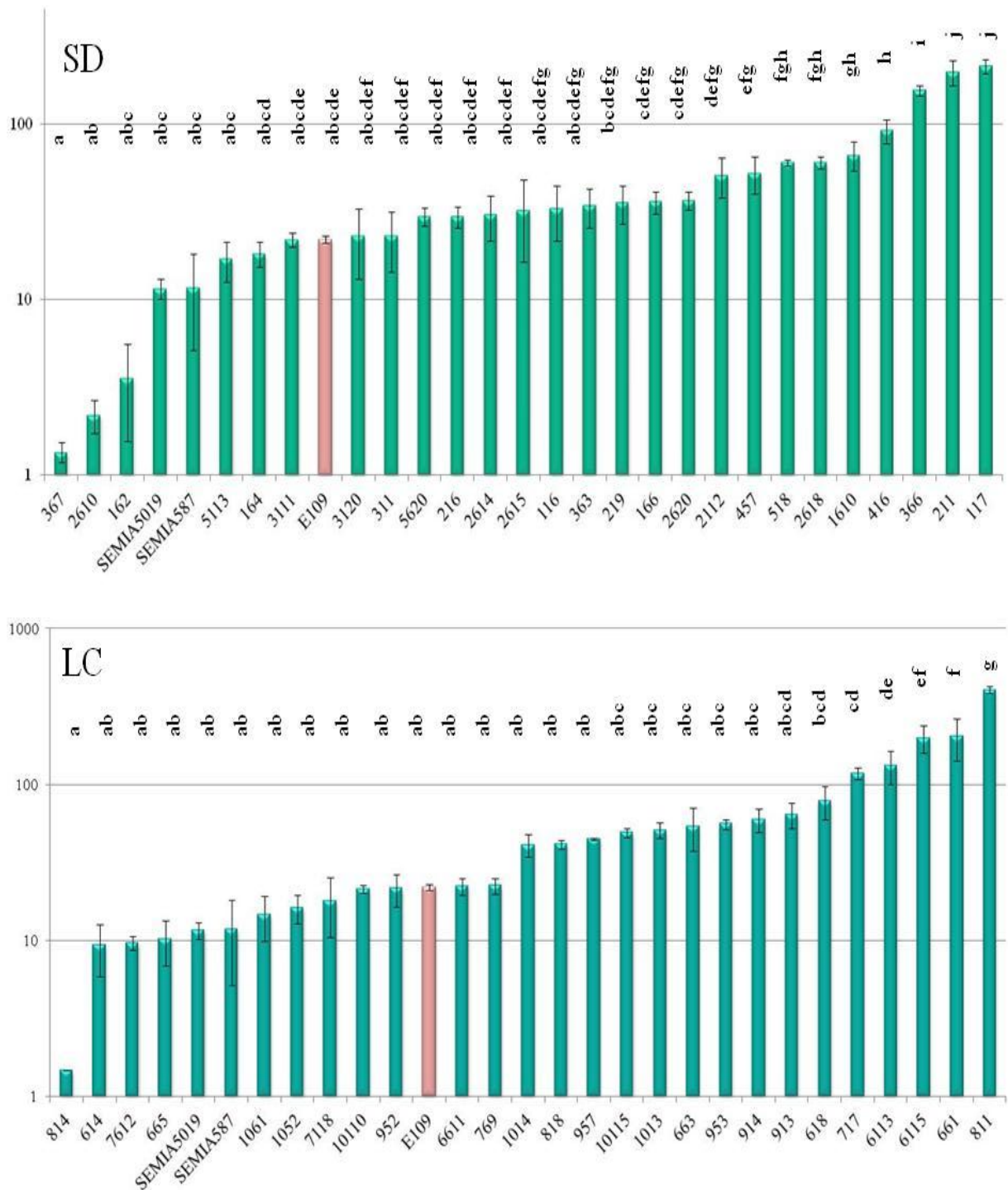


Figura IV- 9: Log₁₀ de la Producción de EPS (ppm de glucosa .10⁸ bacterias) de las cepas SD (arriba) y LC (abajo), evaluado por el método Antrona, cultivadas en medio de cultivo YEM durante 7 días. Las letras distinta indican diferencias con la cepa de referencia E109 por ANOVA, test Tukey, p<0,05.

Formación de biopelícula (biofilm)

La producción de biofilm, presentó, en general, valores bajos respecto a las cepas de referencia (Fig. IV-10). Las cepas comerciales SEMIA y la cepa E109 mostraron la misma capacidad para generar biofilm. Sólo las cepas 1052 ($DO_{570}/DO_{630} = 1,8$), y 1061 (2,6) pertenecientes a los aislados del suelo LC, presentaron valores similares a la cepa E109 (2,2) (Fig. IV-11). Entre el resto de las cepas de los suelos bajo LC, un grupo de siete aislados produjeron entre 10 y 20 % de biofilm del valor de la cepa E109 y 17 cepas formaron biopelícula con valores aún menores al 10 % de la cepa control (Fig. IV-11). Del total de aislados del suelo SD, diez produjeron entre 10 y 25 % del biofilm producido por la estirpe de referencia E109 y seis presentaron entre 0 y 10 % (Fig. IV-11). Ninguna cepa aislada de los suelos bajo SD produjo biopelícula en un nivel similar a las cepas de referencia.

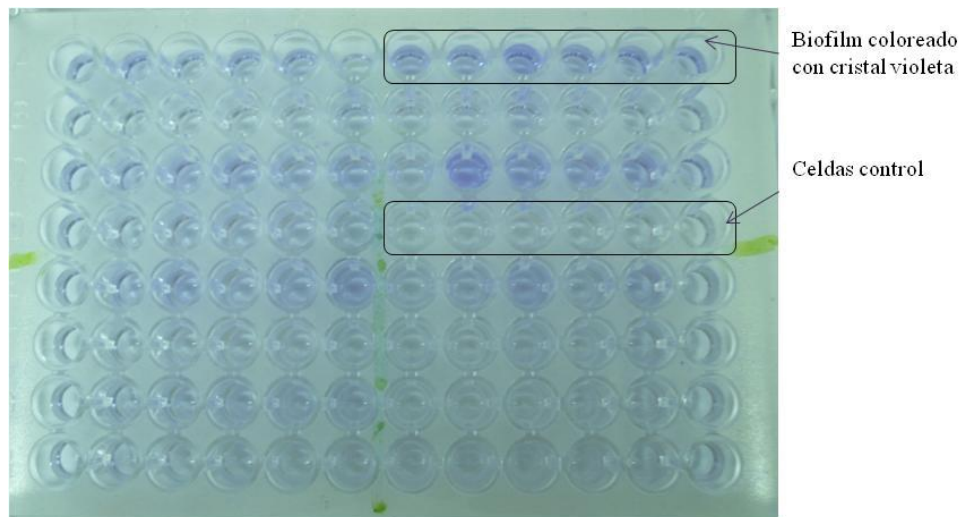


Figura IV- 10: Producción de Biofilm en placa de ELISA.

El cristal violeta tiñe el biofilm. El lector registra el color a DO 560 nm. Las celdas control se generan empleando medio de cultivo sin inocular.

Se realizó un análisis de componentes principales que incluyó los parámetros Supervivencia sobre semilla a las 168 hs, 432 hs y 504 hs, Infectividad a los 7 y 28 días ddi, formación de biofilm y producción de EPS. Las variables que contribuyeron a explicar el 60 % de la variabilidad encontrada fueron la Supervivencia sobre semilla a las 504 hs, Infectividad a los 28 días ddi, formación de biofilm y producción de EPS (Fig. IV-12).

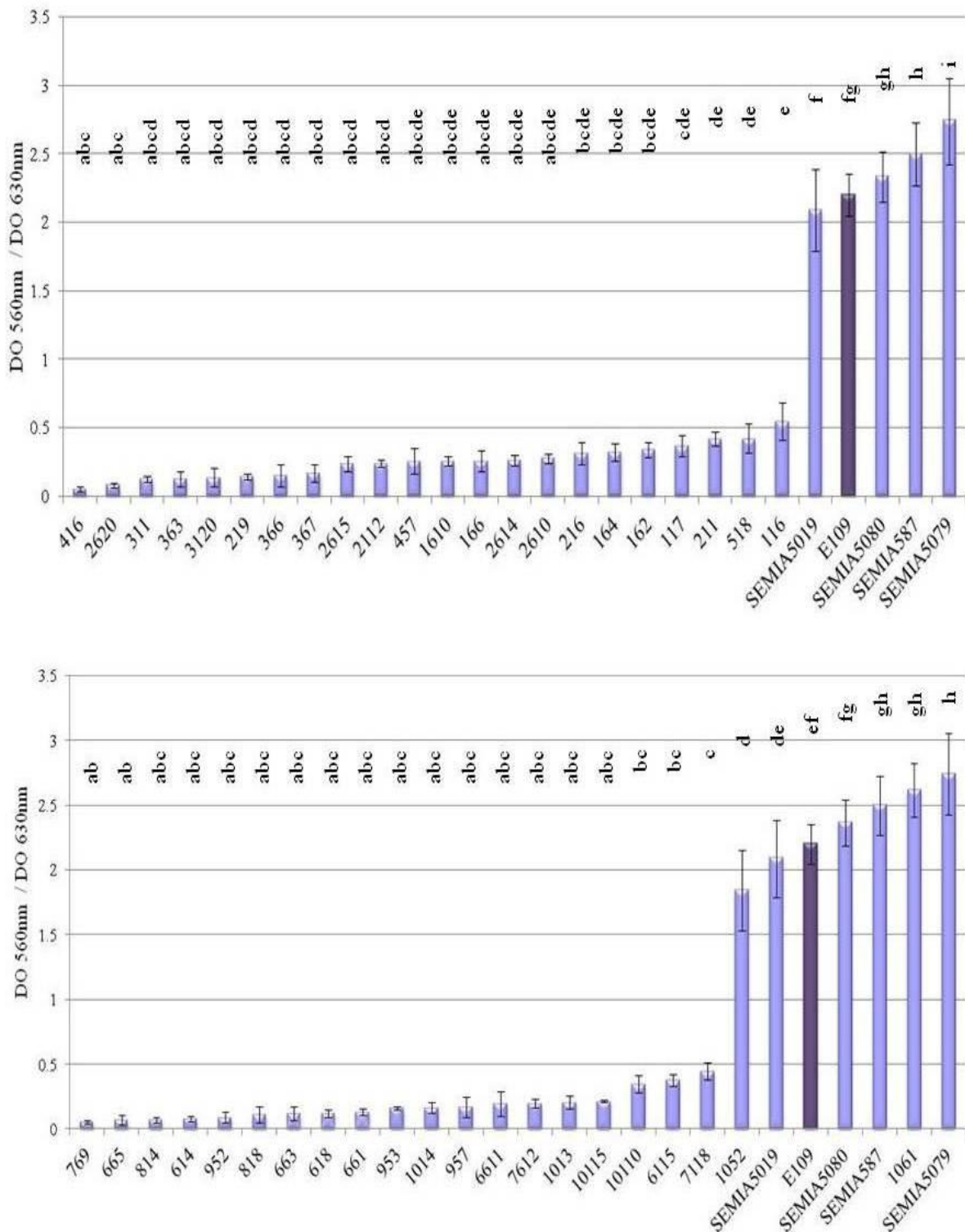


Figura IV- 11: Producción de Biofilm como DO560nm / DO630 nm, cepas SD (arriba) y LC (abajo). Se presentan los aislados con valores mayores a 0.04.

Entre los aislados de SD y LC se encontró un patrón similar, en donde se observaron dos conjuntos que agrupan el 80 % de los aislados. Por un lado, las cepas con mayor producción de EPS que mostraron menor Supervivencia sobre semillas a las 504 hs (Fig. IV-13, óvalo marrón)

(52 % de los aislados) y por otro lado la formación de Biopelícula que estuvo relacionada positivamente con la Infectividad a los 28 días (ddi.) (Fig. IV-13, óvalo azul) (29 % de los aislados).

Por otro lado se observó que la Supervivencia a las 504 hs se relacionó positivamente con la producción de Biopelícula. Los aislados LC presentaron una relación muy estrecha entre la Infectividad a los 28 días y la producción de Biopelícula, que se observa por la misma orientación de los vectores en ambas componentes. En cambio, los aislados del suelo SD no mostraron esa relación tan directa.

Se encontró que alrededor del 30 % de los aislados no se agruparon en ninguno de los conjuntos descritos anteriormente, ocho cepas de suelo bajo SD y sólo dos de los aislados del suelo bajo LC se ubicaron con características intermedias entre ellos.

La distribución de los aislados en los gráficos (Fig. IV-13) indicaría que el ambiente del suelo bajo SD conduce a una mayor diversificación, y por ello sobreviven en estos ambientes microorganismos que bajo estrés no podrían sobrevivir.

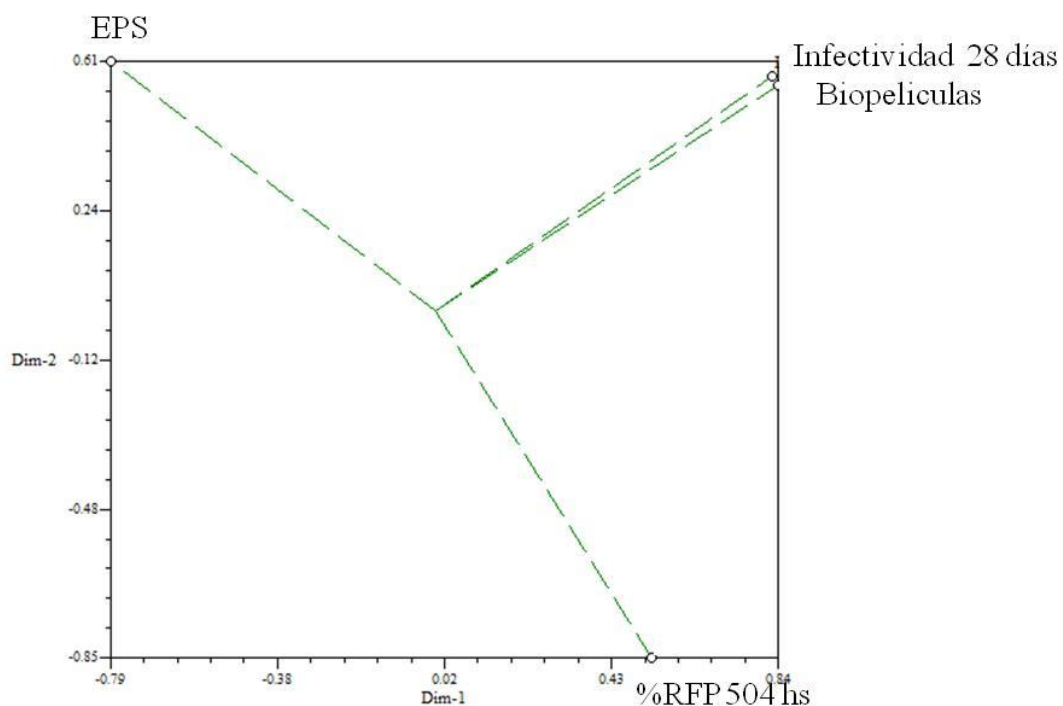


Figura IV- 12: Vectores de las variables consideradas para realizar el Análisis de Componentes Principales:

Supervivencia sobre semilla a las 504 hs, Infectividad a los 28 días ddi, formación de Biopelícula y producción de EPS.

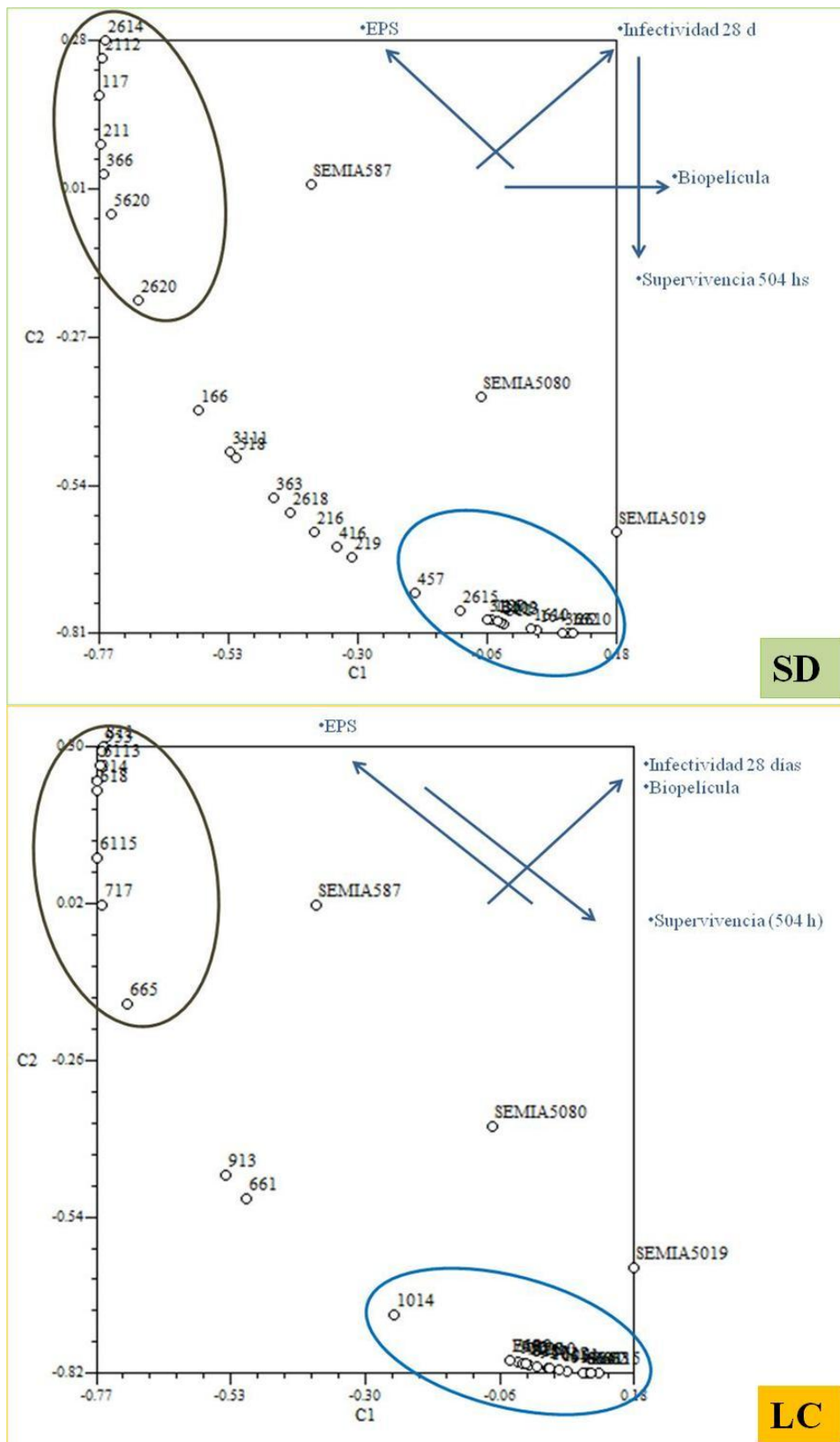


Figura IV- 13: Análisis de componentes principales de las variables Supervivencia sobre semilla a las 504 hs, Infectividad a los 28 días ddi., formación de Biopelícula y producción de EPS. Arriba: aislados del suelo bajo SD. Abajo: aislados del suelo bajo LC.

Producción de ácido indol acético (AIA)

La producción de AIA, se evaluó cualitativamente por el método colorimétrico descrito por Bric et al. (1991). Las reacciones se realizaron en placa de Petri, y resultaron positivos sólo seis aislados del suelo bajo SD: 1610, 216, 219, 311, 518 y 5620 y seis del suelo bajo LC: 663, 712, 713, 1013, 10110, 1047. Se observó que mayoritariamente (70%) fueron aislados de la primera dilución de suelo (dil.1°) (Fig. 14).

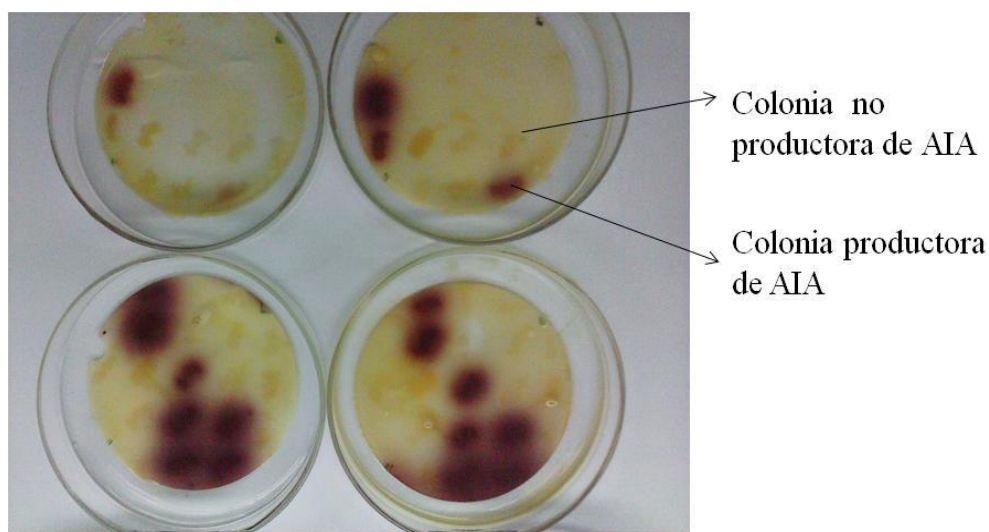


Figura IV- 14: Producción de AIA en placas de Petri.
Las colonias de color rojizo intenso indican producción de AIA.

Solubilización de fósforo

Ninguna de las cepas de referencia solubilizó P, aunque todas desarrollaron en los medios NBRIP y MMSFCP-Mg, pero no en el medio Sperberg. La capacidad de solubilización de los aislados se evaluó en el medio MMSFCP-Mg, debido a que dentro de sus componentes se encuentra el extracto de levadura que aporta vitaminas, micronutrientes, aminoácidos y otros compuestos que podrían ser necesarios para alguno de los rizobios naturalizados. Todas las cepas desarrollaron en el medio seleccionado. Sin embargo sólo la cepa 1610, proveniente del suelo SD soja, formó alrededor de las colonias un pequeño halo transparente sobre el fondo blanquecino del medio con fosfato insoluble (Fig. IV-15). Esto prueba la capacidad de la cepa para solubilizar fósforo. Es decir que sólo un aislamiento entre los evaluados solubilizó P *in vitro*.

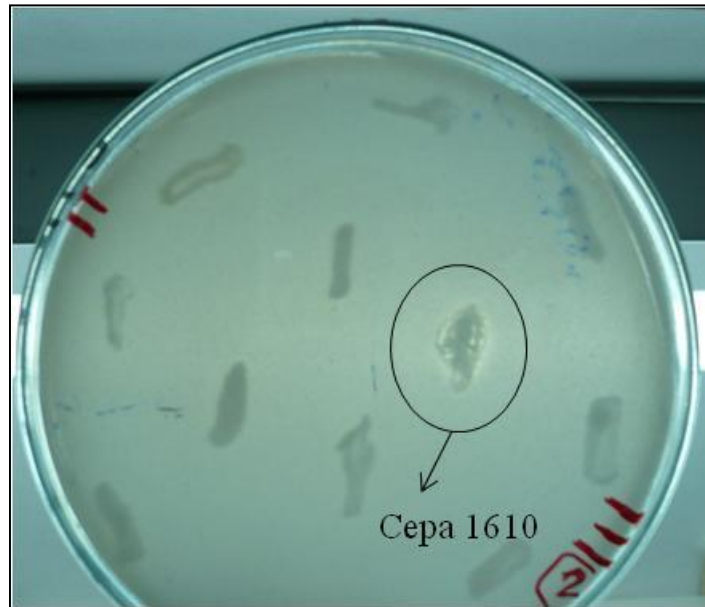


Figura IV- 15: Placa con medio de cultivo MMSFCP-Mg (Mendoza Paredes 2010). Se observan 16 cepas que desarrollaron y el halo de solubilización alrededor de la cepa 1610.

Ensayo de tolerancia a los curasemillas

Los agroquímicos (Cruiser 60 FS, Apron Maxx Advanced, Cruiser Plus, Sedaxane, Apron maxx RFC) en las dosis empleadas, no afectaron la supervivencia de las cepas en estudio, lo que se puso en evidencia por la ausencia de halos en las zonas adyacentes a los discos de papel conteniendo los productos (Figura IV-16).

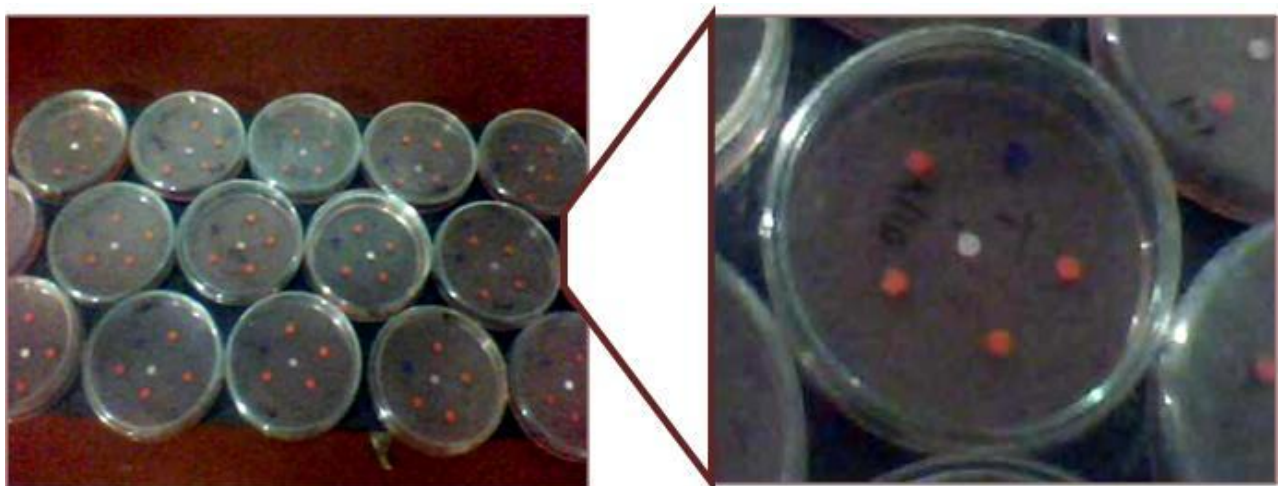


Figura IV- 16: Ensayo de tolerancia a agroquímicos. Placas con medio YEM sembradas con cada cepa, sobre la superficie se observan los discos de papel embebidos en los diferentes curasemillas ensayados (Bauer et al. 1966). El disco color blanco es el control (papel embebido en agua estéril) que se ubicó en el centro de la placa.

Ensayo de tolerancia al glifosato

Se evaluó el desarrollo de las cepas en medio líquido en presencia de glifosato y se determinó la densidad óptica (DO_{625nm}) del cultivo, contrastándolo con el caldo YEM como control.

El crecimiento del 65 % de las cepas (16 de SD y 17 de LC) no fue afectado por la presencia de glifosato en el medio.

El glifosato inhibió el crecimiento de 13 cepas (5 de SD y 8 de LC) que representaron el 12 % de los aislados. El crecimiento de dichas cepas fue inhibido entre 10 y 50%. El aislado 811 (LC) fue el único que no desarrolló con glifosato. En tanto la cepa E109, 5 cepas SD y sólo una cepa LC (Fig. IV-17 y 18) crecieron más con el herbicida, entre 12 y 67%. La cepa de referencia *B. elkanii* SEMIA5019 (cepa comercial en Brasil) fue afectada por el glifosato que redujo su crecimiento alrededor de un 16%, pero el ANOVA resultó con diferencias no significativas.

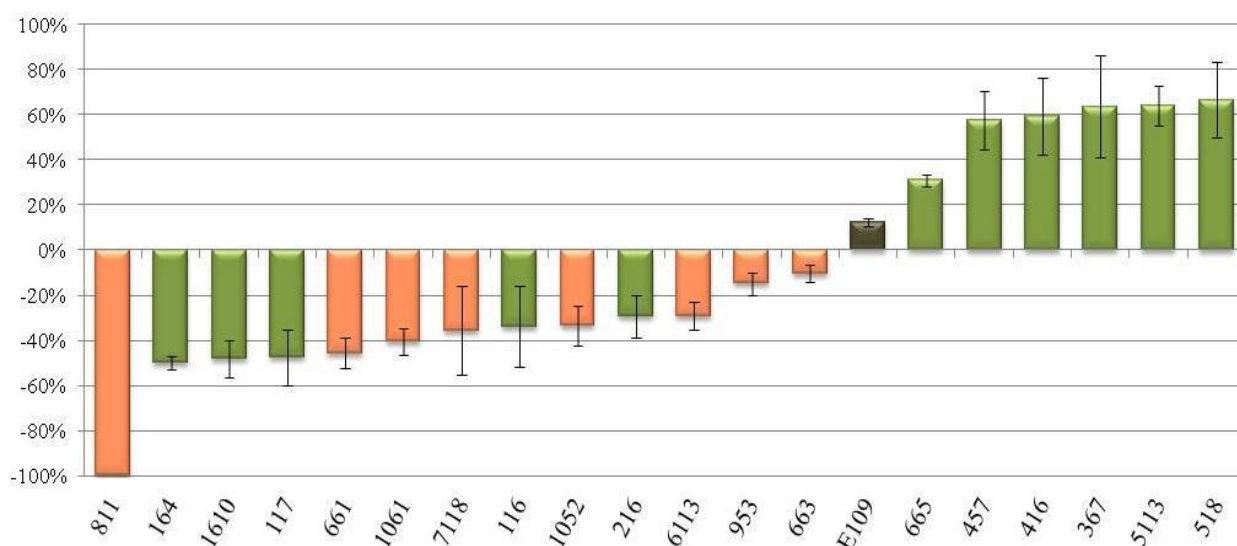


Figura IV- 17: Porcentaje de desarrollo de los aislados en medio conteniendo glifosato relativo a su control (medio YEM).

Se presentan las cepas que resultaron con diferencias significativas (ANOVA, test de Tukey, $p < 0.05$).

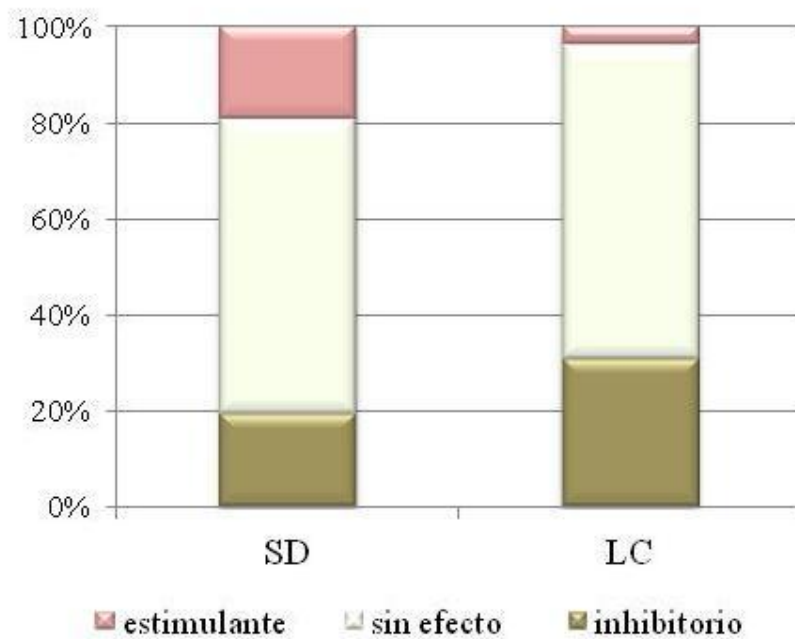


Figura IV- 18: Porcentaje de aislados, SD o LC, según el efecto del glifosato en el medio de cultivo: estimulante, inhibitorio o sin efecto en el desarrollo.

DISCUSIÓN

En las últimas décadas se han demostrado los beneficios de la siembra directa (o labranza mínima) sobre la labranza convencional, sobre todo en determinadas condiciones de suelo y ambiente. Así, se concluyó que la siembra directa contribuye a mantener los macro y microagregados del suelo lo que conduce a reducir los procesos de erosión, favoreciendo además la conservación de la humedad y materia orgánica (mejora la fertilidad), de manera que los microorganismos encuentran un ambiente más adecuado para su desarrollo (Ferreira et al. 2000; Six et al. 2002; Babujia et al. 2010).

La adaptación de los microorganismos a diversos ambientes, cada uno de los cuales genera condiciones de estrés, como puede ser el suelo bajo LC, requiere una amplia gama de respuestas rápidas y adecuadas. Los microorganismos son plásticos y responden a las variaciones ambientales con cambios fisiológicos y bioquímicos. En casos más extremos, el estrés ambiental genera cambios genéticos. De cualquier manera todas estas modificaciones permiten que estos microorganismos colonicen nichos contrastantes en cuanto a sus condiciones ambientales (Ramos et al. 2001) predominando en la población de la microbiota del suelo (Babujia et al. 2010). En relación a esto, Zahran (1999) sugirió que es posible identificar organismos con mayor supervivencia seleccionando cepas de las poblaciones de organismos del suelo.

Cuando se analizó la respuesta de los rizobios aislados en el marco de este trabajo en lo que hace a la sobrevivencia sobre la semilla y la tolerancia a agroquímicos se encontró un considerable nivel de variabilidad. Uno de los estreses que tiene un gran impacto en la viabilidad de las células bacterianas es la falta de agua (Streeter 2007; Vriezen et al. 2007). Considerando ésto, es evidente que la preinoculación de la semilla con rizobios demanda disponer de bacterias que tengan la capacidad de sobrevivir en ausencia de agua, y por otro lado de tecnologías para prolongar la vida de las bacterias sobre la superficie de la semilla. Adicionalmente, es claro que dos factores ambientales como la temperatura y la humedad, son claves durante el almacenamiento ya que estos alteran la supervivencia de los rizobios (Temprano et al. 2002; Streeter 2007; Vriezen et al. 2007). Como prueba de esta relación, Streeter (2007) demostró que la hidratación de la cubierta de las semillas mejoró la supervivencia de los rizobios inoculados.

Entre los procesos fisiológicos que ocurren en respuesta a la falta de agua en el medio se encuentra la síntesis y la acumulación intracelular de trehalosa, que al formar enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua de los lípidos mantienen el estado de gel de las membranas (Ramos et al. 2001). Este disacárido fue identificado entre los factores que afectan la supervivencia de *Bradyrhizobium* sobre la semilla de soja. Streeter (2007) demostró que la adición de extracto de levadura, trehalosa y/o sal (NaCl) en el medio de cultivo, favorece la síntesis de trehalosa mejorando además la supervivencia de las células.

El ensayo de supervivencia mostró que ésta es una característica ampliamente distribuida entre los rizobios y que excepto un aislado recolectado del suelo LC (cepa 811), todos mostraron capacidad de sobrevivencia.

En general, los aislados fueron afectados marcadamente por el estrés inicial que se produce luego de la inoculación de la semilla, ya que una semana después de la inoculación, el número de rizobios viables descendió aproximadamente un orden. A partir de este momento el número de células bacterianas viables continuó descendiendo sostenidamente, comportamiento que fue similar al descrito por Davidson & Reuszer (1978) y Temprano y colaboradores (2002) para rizobios de crecimiento rápido y lento.

Vale la pena destacar que algunos autores atribuyen la pérdida inicial de bacterias al inoculante no adherido a las semillas más que a la muerte de bacterias (Temprano et al. 2002; Deaker et al. 2007). En este trabajo se adicionó protector bacteriano y esto probablemente hizo que los rizobios se adhieran a la semilla y contribuyó a proteger a las bacterias de la falta de agua durante el almacenamiento. Esto explicaría el alto número de aislados viables recuperados de la cubierta de las semillas a las 2 hs ddi, que fue casi doble que el encontrado en los trabajos descriptos.

Los aislados estudiados, tanto de los suelos bajo SD como LC, mostraron diversidad en su capacidad para sobrevivir al ser inoculados sobre semillas. Por un lado, se encontró que el mayor porcentaje (más del 50 %) sobrevivió de la misma manera que la cepa E109. En los suelos bajo LC se encontró un mayor número de aislados que sobrevivieron más que la cepa control E109, esto es entre 5 y 50 veces en el factor de recuperación (% RFP). Estos resultados coinciden con los descriptos por Ferreira et al. 2000, Streeter 2007 y Babujia et al. 2010 que encontraron que un suelo bajo labranza convencional, el ambiente estresante favoreció el desarrollo de poblaciones tolerantes a las condiciones adversas. Por ejemplo, podrían encontrarse rizobios tolerantes a la falta de agua, que podrían ser interesantes como parte de recursos para la fabricación de inoculantes comerciales (Ferreira et al. 2000; Streeter 2007; Babujia et al. 2010).

Aún cuando el número de células viables de la cepa de referencia *B. japonicum*, tanto en este trabajo como en el de Temprano y colaboradores (2002), se redujo hacia el final del ensayo a las 504 hs de almacenamiento, las células bacterianas que sobrevivieron interactuaron con la soja, la infectaron y desarrollaron nódulos. De la misma manera, todas las semillas preinoculadas con los aislados y almacenadas durante 28 días ddi., cuando se sembraron y cultivaron, desarrollaron nódulos, independientemente del número de rizobios viables recuperados, excepto la cepa 6113, que no produjo nodulación. Es decir, que aún las bacterias con menor capacidad de sobrevivencia presentaron un número de células suficiente para inducir la nodulación de las

plantas. Estos resultados confirman que las cepas naturalizadas suelen ser infectivas e interactúan eficientemente con su hospedante (Lodeiro et al. 2003, Gonzalez 2007).

El almacenamiento de semillas inoculadas con aislados de suelo bajo SD, por un periodo corto (7 días), no alteró la capacidad de nodulación de las cepas, que en general se comportaron igual o mejor que la cepa control E109. En cambio, en el mismo periodo de tiempo, 38 % de las cepas del suelo bajo LC, desarrollaron menos nódulos en las semillas inoculadas y ninguna fue superior al control. Es decir que evidentemente las labranzas generan cambios en el ambiente que favorecen alteraciones que se reflejan en la capacidad simbiótica.

El escenario fue distinto cuando el periodo de almacenamiento de la semilla fue más largo. En este caso en los suelos bajo LC y SD el porcentaje de aislados que nodularon más o igual que la estirpe E109 fue el mismo. De hecho, el análisis de los Componentes Principales confirma la relación entre los parámetros supervivencia a 504 hs y nodulación, para los aislados LC. En tanto que para los aislados SD, si bien se observó la misma tendencia, dentro del grupo de los que formaron mayor número de nódulos (mayor infectividad) se encontraron cepas que difirieron en su capacidad de supervivencia. Esto estaría indicando que el suelo SD, es un ambiente estable, respecto a la disponibilidad de nutrientes y de humedad. Así esta población de rizobios, se diversificaría más y contendría un número mayor de simbioses ineficientes al momento de interactuar con el huésped. Es decir que, en particular este grupo de rizobios, estarían mejor adaptados a la vida saprotrófica, lo cual es posible le otorgue una ventaja cuando las bacterias se almacenan por largo tiempo.

Los rizobios, en ambientes desfavorables como en el caso del suelo LC, presentarían una mayor capacidad de supervivencia, si bien es posible sean más ineficientes para nodular. Por otro lado la dilución del suelo, que favorece a los rizobios poco frecuentes, permitió aislar simbioses que presentaron alta eficiencia en la interacción con las raíces de soja.

Los resultados indican que un mayor número de cepas naturalizadas provenientes del suelo bajo SD y cultivo antecesor soja nodulan más eficientemente, a pesar de que el número de rizobios supervivientes fue similar a la cepa control. La mayor diversidad de los aislados de SD también se vio reflejada en los parámetros de supervivencia, de forma tal que no fue posible definir dos grupos en base a su comportamiento, que reunieran la mayoría de las cepas, como se realizó con las cepas LC.

La supervivencia de los rizobios además, está relacionada con la capacidad de cada aislado para sintetizar polisacáridos, los que suelen variar en cantidad y calidad, y esto es particularmente notable en condiciones de estrés por falta de agua. Los mecanismos a través de los cuales los polisacáridos protegen a las bacterias del estrés se conocen solo parcialmente, se

han mencionado, entre otros, a la exclusión de compuestos tóxicos, difusión de O₂ y retención de moléculas de agua (Potts & Webb 1994). En esta tesis se encontró que un porcentaje similar de aislados (34% SD y 30% LC) produjeron cantidades de EPS significativamente superiores a la cepa E109. Sin embargo, contrariamente a lo esperado, el aislado 811 de LC, que produjo la mayor cantidad de EPS resultó ser el que presentó menor capacidad de supervivencia.

Si bien, muchas investigaciones han relacionado la producción de EPS con la capacidad para tolerar estrés por desecación (Streeter, 2007), aunque los resultados no son concluyentes, los datos de este trabajo sugieren una relación inversa. Sin embargo, también es importante destacar que probablemente la sobrevivencia esté más relacionada con la capacidad de producción de exopolisacáridos en medios con limitantes nutricionales, fundamentalmente de C, lo que podría estar más cercano a las condiciones naturales en que se desenvuelven las bacterias.

La supervivencia durante un período de estrés de agua (como fue el almacenamiento de las semillas inoculadas), también depende del proceso de rehidratación que puede convertirse en otro estrés de importancia. El daño en el material genético que se produce durante el periodo de estrés de agua debe ser reparado eficientemente, capacidad que varía entre los distintas cepas (Ramos et al. 2001).

Se ha demostrado que los EPS también juegan un rol clave en la capacidad para infectar y nodular, así como en la interacción simbiótica. Si bien aún hay muchos signos de interrogación en cuanto a los roles que cumplen (Frayse et al. 2003), los EPS de muchas bacterias estimulan o inhiben los mecanismos de defensa de las plantas (Quelas et al. 2006). Además, el ambiente tiene una gran influencia sobre la producción de EPS, mientras que en un medio pobre en N, los bradyrizobios tienden a sintetizar EPS, en un medio rico en N, estos suelen acumular polihidroxi butirato (Quelas et al. 2006). En este trabajo, no se encontró una correlación positiva entre la producción de EPS y la capacidad para inducir la formación de nódulos de los aislados recuperados en los diferentes tipos de labranza.

La producción de biopelículas es clave en el momento de la colonización de las raíces por las bacterias y ofrece una ventaja competitiva ya que así la sobrevivencia de los rizobios aumenta, además obtienen los nutrientes de los exudados radicales, conservando humedad. Si bien los EPS afectan la adhesión a la raíz así como a superficies inertes, una alta producción de EPS no garantiza la formación de biofilm (Pérez-Giménez et al. 2009). Ciertos polisacáridos claves en lo que hace a la adhesión de los rizobios a la raíz probablemente no son requeridos para adherirse a superficies inertes como la placa de microtitulación empleada en los ensayos. Por otro lado, la formación de biopelículas es un proceso lento en comparación con la infección de la raíz realizada por los rizobios (Pérez-Giménez et al. 2009).

Las biopelículas ofrecen ambientes protegidos y son ventajosos en términos de supervivencia (Bogino et al. 2013), son ampliamente reconocidas como estructuras de resistencia a factores como la desecación, la depredación, la antibiosis, o radiación UV (Rinaudi & Giordano 2010), todos los cuales se producen en el suelo desnudo después de la cosecha de los cultivos.

Las lectinas de soja son proteínas muy estables que favorecen la producción del biofilm. Algunos autores han sugerido que los restos de la planta en el suelo durante el cultivo de soja o incluso después de la cosecha, pueden ser una fuente de lectinas que podría permanecer activa durante largos períodos de tiempo, generando así sitios de nucleación para facilitar la formación de biopelículas por *B. japonicum*, y mejorar la supervivencia, así se mantienen viables durante el intervalo de una generación de soja a la siguiente (Pérez-Giménez et al. 2009).

La mayor parte de los aislados (85%) de los suelos bajo los dos sistemas de labranza formaron biopelículas, aunque sólo dos (cepas 1052 y 1061) obtenidas del suelo bajo LC, presentaron valores similares a las cepas control *B. japonicum* y *B. elkanii*. Estas cepas provinieron del ambiente considerado más estresante como es el del suelo bajo LC. El comportamiento de estos dos aislados en los ensayos de supervivencia sobre semilla y en nodulación (infectividad) a los 28 días de almacenamiento, fue similar o superior a la E109. En cualquier caso, sobre la base del análisis del comportamiento de todos los aislamientos es claro que la capacidad de formación de biofilm no fue determinante pero afectó la supervivencia y la infectividad.

En el grupo de cepas estudiadas en esta tesis un solo aislado de un total de 52 cepas solubilizó P en el medio sólido, lo que confirma que entre los bradyrizobios esta capacidad es poco frecuente. Sin embargo, diversos trabajos establecen que la solubilización de P es un carácter ampliamente distribuido en los rizobios, pero entre las cepas del género *Bradyrhizobium*, esta característica no es tan común, sólo entre 0,5-5% de las cepas evaluadas (Antoun et al. 1998; Alikhani et al. 2006).

Los curasemillas que se emplearon en los ensayos, al menos en las dosis evaluadas no inhibieron el crecimiento de los aislados. Las concentraciones empleadas fueron las sugeridas por el fabricante, y serían adecuadas para aplicar sobre semillas ya que no afectaron la supervivencia de los rizobios. Estudios futuros deberían ampliarse al estudio del efecto de los agroquímicos en las etapas de infectividad y efectividad para garantizar una adecuada aplicación.

En cuanto a la tolerancia de los aislados al glifosato, se observaron en otros trabajos diversas respuestas que además estuvieron asociados a la dosis utilizada (Seminoti Jacques et al. 2010; Druille et al. 2015). El glifosato es un herbicida que se aplica sobre el cultivo y en el suelo es retenido fuertemente por las partículas sólidas. Es por esto que no sería un compuesto tóxico que podría afectar a los rizobios inoculados. Sin embargo, las bacterias podrían verse perjudicadas

por la liberación de los residuos del herbicida en el suelo. El glifosato en la planta es transportado por el floema con los asimilados a los nódulos y es tóxico para los *Bradyrhizobium* que tienen la enzima EPSPS (5-enolpiruvil shikimato 3-fosfato sintetasa) que es sensible a ese herbicida (Zablotowicz & Reddy 2004).

Si bien la dosis del herbicida empleada en esta tesis, fue relativamente alta, una gran proporción de aislados (63%) toleraron la presencia del herbicida en el medio de cultivo lo que sugiere que las bacterias difieren en sus caminos metabólicos, algunos de los cuales detoxifican el herbicida. Aún así, los resultados muestran que las cepas del suelo SD con cultivo antecesor soja en general, tienden a ser más tolerantes al herbicida que los aislados de los suelos bajo LC. Probablemente esto se debió a que en SD la aplicación de glifosato se hace en más de una oportunidad, en cambio en LC no se repiten las aplicaciones. Más aún, varios aislados en el medio de cultivo, vieron estimulado su crecimiento por la presencia de glifosato. Esto podría deberse a que como lo han sugerido diversos autores, el herbicida es probable actúe como una fuente de C y/o P (Zablotowicz & Reddy 2004; Zabaloy & Gómez 2005).

Como conclusión general de esta parte del trabajo es claro que en los dos suelos, SD y LC, se identificaron potenciales competidores de las bacterias que se adicionan 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 incorporaron con los inoculantes comerciales, son fuente de genes que a través de la transferencia lateral y la recombinación pueden contribuir a generar nuevas estirpes incorporando genes de otras especies por transferencia lateral. Es probable que esté ocurriendo una suerte de evolución de grupos de bradyrizobios diferenciados por sus capacidades simbióticas y de supervivencia, 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 y si estos se estructuran geográficamente.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES

En las últimas décadas se han demostrado los beneficios de la siembra directa (SD) sobre la labranza convencional (LC), sobre todo en determinadas condiciones de suelo y ambiente. Así se concluyó que la siembra directa contribuye a mantener los macro y microagregados del suelo lo que reduce los procesos de erosión, favoreciendo la conservación de la humedad y materia orgánica del suelo, lo que redundará en una mejora de la fertilidad, de manera que los microorganismos encuentran un ambiente más adecuado para su desarrollo. La adaptación de los microorganismos a diversos ambientes, cada uno de los cuales genera condiciones de estrés, como puede ser el suelo bajo LC, requiere una amplia gama de respuestas rápidas y adecuadas. Los microorganismos son plásticos y responden a las variaciones ambientales con cambios fisiológicos y bioquímicos. En casos más extremos, el estrés ambiental puede generar cambios genéticos.

La población de rizobios en suelo bajo SD fue mayor y más diversa, probablemente porque los agregados que se producen en suelos con este tipo de manejo generan microhabitats con mejores condiciones ambientales y nutricionales para los microorganismos. Por otro lado no se descarta la influencia de otros factores, como la presencia de soja en las rotaciones de cultivo, el momento de la toma de la muestra, las diluciones de suelo empleadas para inocular las plantas trampa y las características físico-químicas del suelo como por ejemplo el pH. El pH influye en la diversidad genética de los rizobios y en el tamaño de las poblaciones. Sin embargo en este trabajo el pH de cada submuestra, no estuvo relacionado con el número de rizobios. Esto probablemente se debió a que los bradyrizobios se adaptan y sobreviven mejor en suelos levemente ácidos y todas las submuestras tuvieron un pH menor a 6 y el rango de variación fue estrecho (5-6). Futuras investigaciones deberían orientarse a profundizar con estudios más específicos que permitan evaluar el impacto de cada uno de los factores mencionados sobre las poblaciones de rizobios y/o bradyrizobios que se naturalizan en los suelos. En este trabajo, según se demostró, debe tenerse en cuenta que la metodología de aislamiento y en particular las diluciones que se emplean, son aspectos claves a considerar ya que influyen directamente en los resultados de la caracterización de las cepas.

La población naturalizada de *Bradyrhizobium* seguramente se originó de unas pocas cepas las que se incorporaron a los suelos con los inoculantes que se aplicaron en los comienzos del desarrollo del cultivo de la soja en el país y también durante los últimos 50 años. El uso continuo de inoculantes ha hecho que los suelos argentinos contengan importantes poblaciones naturalizadas de rizobios que nodulan soja, en los que prevalecen los representantes de *Bradyrhizobium japonicum* por sobre *B. elkanii*; que por otro lado, como se demuestra en este trabajo, son los únicos simbiontes de soja recuperadas en los suelos muestreados. Estos rizobios

naturalizados, aún cuando se encuentran en bajo número, son competitivos, de manera que las raíces de la soja son colonizadas, infectadas y noduladas eficientemente, por lo que son fuente de nuevas cepas. Esta capacidad infectiva se ha visto en numerosos ensayos a campo en donde los controles suelen desarrollar nódulos.

Todos los aislados estudiados fueron de crecimiento lento y alcalinizaron el medio de cultivo. Es decir que los suelos muestreados sólo contuvieron rizobios de crecimiento lento, tal cual era de esperar en función de la historia descrita. Se demostró que si bien las poblaciones naturalizadas pertenecen al género *Bradyrhizobium*, específicamente a *B. japonicum* o *B. elkanii*, presentan un considerable nivel de diversidad, que seguramente es el resultado de procesos de transferencia horizontal de genes y mutaciones. Trabajos futuros deberían orientarse a dimensionar cual es el impacto de cada uno de los procesos que generan variabilidad genética en la población de los rizobios del suelo.

Los ambientes en donde sobreviven los rizobios inducen cambios en las características morfológicas de las cepas en los suelos bajo SD o bajo LC. Las colonias de los aislados del suelo bajo SD, presentaron colonias mucosas, intermedias y acuosas, esto sugiere que existen cambios morfológicos los que seguramente están relacionados con cambios metabólicos. En este trabajo se demostró que los suelos bajo SD generan ambientes en los que prevalecen aislados menos tolerantes al estrés. Sin embargo, en la población de rizobios del suelo bajo LC, si bien existieron aislados con diversos tipos de colonias, predominaron las cepas con colonias acuosas, que han sido citadas como más tolerantes a condiciones adversas. Las colonias de los suelos bajo LC fueron en su mayoría más pequeñas, lo que podría indicar que crecen más lentamente. Estos rizobios además, fueron más tolerantes a temperatura y salinidad. Se puede decir que en los suelos desnudos, al estar los microorganismos expuestos a temperaturas más altas y otras condiciones de estrés, se induce la generación de individuos que se adaptan a estos ambientes. En la muestra bajo LC ocurren cambios extremos de temperatura, humedad, exposición al sol y viento que probablemente condujeron al desarrollo de cepas tolerantes a condiciones adversas como las que se describieron en este trabajo. Se debería profundizar en la identificación o selección de rizobios resistentes al estrés a partir de suelos bajo manejos que generen condiciones de crecimiento contrastantes.

La supervivencia es una característica clave y ampliamente estudiada en los rizobios. Esta capacidad es importante debido a que las bacterias deben tener la capacidad de sobrevivir en la superficie de las semillas, sobre todo considerando que la semilla preinoculada es una tecnología extensamente utilizada. Entre las cepas que mostraron una supervivencia superior a la cepa control E109, la mayor proporción provinieron de los suelos bajo LC. Como se dijo

anteriormente, el ambiente generado en estos suelos, ejerció una presión de selección que favoreció el desarrollo de poblaciones mejor adaptadas a situaciones de estrés, como es la falta de agua, condición que se produce cuando se inoculan las semillas. Estos rizobios, que además de tolerar condiciones de estrés fueron capaces de nodular soja, serían una buena fuente para el aislamiento de nuevas cepas.

El suelo bajo SD es en comparación con el suelo bajo LC un ambiente más estable, en lo que hace a la disponibilidad de nutrientes y de humedad. Así es probable que la población de rizobios SD se diversifique más y contenga, además de rizobios eficientes para nodular, un número considerable de cepas que no están presionadas para establecer simbiosis con la soja como estrategia de supervivencia, y estarían mejor adaptados a la vida saprotrófica. Futuros estudios deberían orientarse a determinar la importancia relativa de la población de rizobios saprotróficos en la nodulación de la soja en los suelos bajo siembra directa y labranza convencional.

Diversos autores describieron que la supervivencia de los rizobios en estrés de agua está relacionada con la capacidad del aislado para sintetizar exopolisacáridos (EPS), sin embargo esto no se puso en evidencia en este trabajo. Una posible explicación sería que la condición ambiental en que se determinó la producción de EPS no está relacionada a una situación de estrés o a que sería un carácter típico de algunas especies de rizobios y no un carácter general del género.

Otro factor que podría influenciar la capacidad de supervivencia es la formación de biopelículas. Las biopelículas generan un ambiente en el que las bacterias están protegidas y por ello sobreviven más, tal es así que son reconocidas como estructuras de resistencia a factores como la desecación, la depredación, la antibiosis, o radiación UV, todos los cuales se producen en el suelo desnudo después de la cosecha de los cultivos. Cuando en la rotación se incluye soja, las lectinas producidas por la planta podrían favorecer la producción del biofilm y la supervivencia de los bradyrizobios, incluso luego de la cosecha. Si bien la formación de biopelículas fue un carácter común de los aislados de los dos sistemas de labranza, los valores determinados en este trabajo para los aislados estuvieron muy por debajo a la capacidad de la cepa E109, salvo dos aislados provenientes de los suelos LC. Aún así el análisis del comportamiento de los aislados mostró que la capacidad de formación de biofilm si bien no fue determinante, afectó la supervivencia y la infectividad.

La capacidad de sobrevivir de los rizobios puede verse modificada por agentes químicos como los curasemillas y herbicidas empleados. En este trabajo se encontró que las cepas del suelo SD con cultivo antecesor soja, en general, mostraron mayores niveles de tolerancia al glifosato que los aislados de los suelos bajo LC, probablemente debido a que en SD la aplicación de herbicida se hace con mayor frecuencia y tal cual se ha sugerido podría actuar como una

fuente de C y/o P. Estudios futuros deberían enfocarse a evaluar el efecto de los agroquímicos en las etapas de infectividad y efectividad para garantizar una adecuada aplicación.

Otro aspecto relevante en la búsqueda de nuevos aislados es la capacidad de promoción del crecimiento vegetal por diversos mecanismos como la solubilización de P, que en este trabajo no fue una capacidad ampliamente distribuida entre los rizobios, y la síntesis de AIA que si fue una característica más frecuente entre las cepas.

La eficiencia de FBN de los rizobios de este trabajo se mantuvo dentro de un rango que fue similar, independientemente del manejo de suelo. Es decir que si bien los cambios ambientales provocados por los sistemas de labranza afectan los procesos biológicos y podrían ser responsables de la variabilidad encontrada en la FBN, aún así ambos suelos estudiados albergan una considerable diversidad de rizobios y por ello podrían ser la fuente de nuevos aislamientos para la formulación de inoculantes.

En los dos suelos, SD y LC, se identificaron potenciales competidores de las bacterias que se adicionan al suelo a partir de los inoculantes. La presencia de pools de bacterias naturalizadas, son fuente de nuevos organismos o genes. Es decir que la evolución de las poblaciones de rizobios que ocurre en los suelos conduce a la aparición de bradyrizobios que se diferencian por sus capacidades simbióticas y de supervivencia, que no son más que el reflejo de de variaciones a nivel genético. Futuros trabajos deberán orientarse a muestreos sistemáticos de diversas áreas de cultivo para analizar las poblaciones de rizobios de la soja y si éstas se estructuran geográficamente.

Por todo lo expuesto en este trabajo se concluye que los suelos contienen una dotación de rizobios naturalizados diversos y estos son un recurso sostenible de bacterias para formular inoculantes comerciales, reemplazando así a las actuales cepas comerciales.

Para esto es necesario desarrollar herramientas que sean indicadoras de aislados con alta capacidad de fijación de N_2 . Por ello es clave, por un lado, poder identificar en etapas tempranas, aislados con aptitudes para desarrollar simbiosis efectivas con la soja y que además estarían adaptadas a las diversas regiones geográficas de donde provienen.

Así de esta manera se confirma la hipótesis planteada de que los suelos con historia del cultivo de soja, manejados bajo distintos sistemas de labranzas, se indujeron cambios a nivel del genoma de las cepas de rizobios que contribuyó a modificar la diversidad de la población. Si bien son potenciales competidoras de las cepas que se inoculan, podrían ser fuentes de cepas que en base sus las características evaluadas podrían tener un mayor potencial biotecnológico.

BIBLIOGRAFÍA

- Abaidoo, R.C., Keyser, H.H. & Singleton, P.W., 2000. Bradyrhizobium spp . (TGx) isolates nodulating the new soybean cultivars in Africa are diverse and distinct from bradyrhizobia that nodulate North American soybeans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, pp.225–234.
- Abdelmoumen, H., Neyra, M. & Belabed, A., 1999. Effect of high salts concentrations on the growth of rhizobia and responses to added osmotica. *Journal of Applied Microbiology*, 86, pp.889–898.
- Ahemad, M. & Khan, M.S., 2011. Plant-Growth-Promoting Fungicide-Tolerant Rhizobium Improves Growth and Symbiotic Characteristics of Lentil (*Lens esculentus*) in Fungicide-Applied Soil. *Journal of Plant Growth Regulation*, 30(3), pp.334–342.
- Ahemad, M. & Khan, M.S., 2013. Pesticides as Antagonists of Rhizobia and the Legume-Rhizobium Symbiosis: a Paradigmatic and Mechanistic Outlook. *Biochemistry & Molecular Biology*, 1(4), pp.63–75.
- Albareda, M., Rodríguez-Navarro, D.N. & Temprano, F.J., 2009. Soybean inoculation: Dose, N fertilizer supplementation and rhizobia persistence in soil. *Field Crops Research*, 113(3), pp.352–356.
- Alberton, O., Kaschuk, G. & Hungria, M., 2006. Sampling effects on the assessment of genetic diversity of rhizobia associated with soybean and common bean. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(6), pp.1298–1307.
- Alikhani, H.A., Antoun, N. & Saleh-Rastin, H., 2006. Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. In E. V. zquez and C. Rodríguez-Barrueco, ed. *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*. Springer, pp. 35–41.
- Althabegoiti, M.J. et al., 2008. Strain selection for improvement of Bradyrhizobium japonicum competitiveness for nodulation of soybean. *FEMS microbiology letters*, 282(1), pp.115–23.
- Alves, B.J.R., Boddey, R.M. & Urquiaga, S., 2003. The success of BNF in soybean in Brazil. *Plant and Soil*, 252, pp.1–9.
- Angelini, J. et al., 2011. A study on the prevalence of bacteria that occupy nodules within single peanut plants. *Current microbiology*, 62(6), pp.1752–9.
- Antoun, H. et al., 1998. Potential of Rhizobium and Bradyrhizobium species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes : Effect on radishes (*Raphanus sativus* L .). *Plant and Soil*, 204, pp.57–67.
- Antoun, H and Prevost, D., 2006. Root Nodule Bacteria and Symbiotic Nitrogen Fixation. In M. R. C. y E. T. Gregorich, ed. *Soil Sampling and Methods of Analysis, Second Edition*.
- Appunu, C.C. et al., 2008. Variation In Symbiotic Performance Of Bradyrhizobium Japonicum Strains And Soybean Cultivars Under Field Conditions. *Journal Central European of Agriculture*, 9(1), pp.169–174.

- Babujia, L.C. et al., 2010. Microbial biomass and activity at various soil depths in a Brazilian oxisol after two decades of no-tillage and conventional tillage. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(12), pp.2174–2181.
- Bais, H.P., Fall, R. & Vivanco, J.M., 2014. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against Infection of *Arabidopsis* Roots by *Pseudomonas syringae* Is Facilitated by Biofilm Formation and Surfactin. *Plant Physiol*, 134, pp.307–319.
- Bala, A., Murphy, P. & Giller, K.E., 2001. Genetic diversity of rhizobia from natural populations varies with the soil dilution sampled. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(6), pp.841–843.
- Barraco, M., Alvarez, C. & Díaz-Zorita, M., 2004. Ensayo de labranzas de larga duración en un hapludol del Noroeste bonaerense : efectos en el suelo y los rendimientos de maíz y soja. *Publicación Técnica. INTA Centro Regional Buenos Aires Norte*, 40, p.17.
- Barthelemy-Delaux, C. et al., 2014. Effect of drought on *Bradyrhizobium japonicum* populations in Midwest soils. *Plant and Soil*, 382(1-2), pp.165–173.
- Basit, H.A. et al., 1991. Phenotypic Diversity among Strains of *Bradyrhizobium japonicum* Belonging to Serogroup 110 Mississippi Illinois Wisconsin. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(5), pp.1570–1572.
- Batista, J.S.S. et al., 2007. Variability in *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* seven years after introduction of both the exotic microsymbiont and the soybean host in a cerrados soil. *Microbial ecology*, 53(2), pp.270–84.
- Bauer, A. et al., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45, p.493.
- Berner, R.A., 2006. Geological nitrogen cycle and atmospheric N₂ over Phanerozoic time. *Geology*, 34(5), p.413.
- Bhuvanewari, T. V, 1981. Transient Susceptibility of Root Cells in Four Common Legumes to Nodulation by Rhizobia '. *Plant Physiology*, 68, pp.1144–1149.
- Bizarro, M.J. et al., 2011. Genetic variability of soybean bradyrhizobia populations under different soil managements. *Biology and Fertility of Soils*, 47(3), pp.357–362.
- Boddey, M. & Hungria, L.H., 1997. Phenotypic grouping of Brazilian *Bradyrhizobium* strains which nodulate soybean. *Biology and Fertility of Soils*, 55, pp.407–415.
- Bogino, P.C. et al., 2013. The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(8), pp.15838–59.
- Bomfeti, C.A. et al., 2011. Exopolysaccharides produced by the symbiotic nitrogen-fixing bacteria of Leguminosae. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, (1), pp.657–671.
- Borges, A.C. et al., 1990. Resistance of *Bradyrhizobium japonicum* strains to selected antibiotics. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 6(3), pp.340–2.

- Botha, W.J. et al., 2004. Effect of soil bradyrhizobia on the success of soybean inoculant strain CB 1809. *Microbiological research*, 159(3), pp.219–231.
- Bric, J.M., Bostock, R.M. & Silverstone, S.E., 1991. Rapid in situ assay for indoleacetic Acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(2), pp.535–8.
- Brockwell, J. & Bottomley, P.J., 1995. Recent advances in inoculant technology and prospects for the future. *Soil Biology and Biochemistry*, 27(4-5), pp.683–697.
- Brockwell, J., Bottomley, P.J. & Thies, J.E., 1995. Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: A critical assessment. *Plant and Soil*, 174, pp.143–180.
- Bru, D. et al., 2011. Determinants of the distribution of nitrogen-cycling microbial communities at the landscape scale. *The ISME journal*, 5(3), pp.532–42.
- Brutti, L. et al., 1998. Persistence of Bradyrhizobium japonicum in arable soils of Argentina. *Applied Soil Ecology*, 10, pp.87–94.
- Camacho, M. et al., 2002. Soils of the Chinese Hubei province show a very high diversity of Sinorhizobium fredii strains. *Systematic and Applied Microbiology*, 25(4), pp.592–602.
- Canfield, D.E., Glazer, A.N. & Falkowski, P.G., 2010. The evolution and future of Earth's nitrogen cycle. *Science (New York, N.Y.)*, 330(6001), pp.192–6.
- Capoen, W., Oldroyd, G. & Goormachtig, S., 2010. Minireview Sesbania rostrata: a case study of natural variation in legume nodulation. *New Phytologist*, 186, pp.340–345.
- Catroux, G., Hartmann, A. & Revellin, C., 2001. Trends in rhizobial inoculant production and use. *Plant and Soil*, 230, pp.21–30.
- Chávez Díaz, L. et al., 2013. Diversity and stress tolerance in rhizobia from Parque Chaqueño region of Argentina nodulating Prosopis alba. *Biology and Fertility of Soils*, 49(8), pp.1153–1165.
- Chen, W., Yan, G. & Li, J. L., 1988. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that Rhizobium fredii be assigned to Sinorhizobium gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 38(4), 392-397.
- Chen, X. & Li, Y., 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. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45(1), 153-159.
- Chen, L. S. et al., 2000. Genetic Characterization of Soybean Rhizobia in Paraguay. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(11), pp.5099–5103.
- Chen, L. et al., 2002. Diversity and symbiotic effectiveness of rhizobia isolated from field-grown soybean nodules in Paraguay. *Biology and Fertility of Soils*, 35(6), pp.448–457.

- Chi, F. et al., 2005. Ascending Migration of Endophytic Rhizobia , from Roots to Leaves , inside Rice Plants and Assessment of Benefits to Rice Growth Physiology. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, pp.7271–7278.
- Cleyet-Marel, J.C., Crozat, Y. & Pinochet, X., 1995. Ability of two Bradyrhizobium japonicum strains to persist in soil and nodulate soybeans after dual inoculation. *Biology and Fertility of Soils*, 20(4), pp.289–293.
- Costerton, J.W. et al., 1995. Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*, 49, pp.711–45.
- Coutinho, H.L.C. et al., 1999. Evaluation of the diversity of rhizobia in Brazilian agricultural soils cultivated with soybeans. *Applied Soil Ecology*, 13, p.159±167.
- Cubo, M.T. et al., 1988. Melanin production by Rhizobium strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(7), pp.1812–1817.
- Da Costa Coutinho, H.L. et al., 1999. Molecular evidence for shifts in polysaccharide composition associated with adaptation of soybean Bradyrhizobium strains to the Brazilian cerrado soils. *Microbiology*, 1(5), pp.401–408.
- Date, R.A., 2000. Inoculated legumes in cropping systems of the tropics. *Field Crops Research*, 65(December 1999), pp.123–136.
- Davidson, F. & Reuszer, H.W., 1978. Persistence of Rhizobium japonicum on the Soybean Seed Coat Under Controlled Temperature and Humidity. *Applied and Environmental Microbiology*, 35(1), pp.94–96.
- Deaker, R., Roughley, R.J. & Kennedy, I.R., 2007. Desiccation tolerance of rhizobia when protected by synthetic polymers. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(2), pp.573–580.
- De Bruijn, F.J., 1992. 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, pp.2180–2187.
- De Hoff, P.L., Brill, L.M. & Hirsch, A.M., 2009. Plant lectins: the ties that bind in root symbiosis and plant defense. *Molecular genetics and genomics : MGG*, 282(1), pp.1–15
- Delamuta, J.R.M. et al., 2013. Polyphasic evidence supporting the reclassification of Bradyrhizobium japonicum group Ia strains as Bradyrhizobium diazoefficiens sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(Pt 9), pp.3342–3351.
- Denison, R.F., 2000. Legume Sanctions and the Evolution of Symbiotic Cooperation by Rhizobia. *The american naturalist*, 156(6), pp.567–576.
- Denison, R.F. & Kiers, E.T., 2004. Lifestyle alternatives for rhizobia: mutualism, parasitism, and forgoing symbiosis. *FEMS microbiology letters*, 237(2), pp.187–93.

- Denison, R.F. & Kiers, E.T., 2011. Life histories of symbiotic rhizobia and mycorrhizal fungi. *Current biology : CB*, 21(18), pp.R775–85.
- Depret, G. et al., 2004. Long-term effects of crop management on *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* populations. *FEMS microbiology ecology*, 51(1), pp.87–97.
- Derpsch, R. et al., 2010. Current status of adoption of no-till farming in the world and some of its main benefits. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 3(1), pp.1–25.
- Diaz Zorita, M., 1999. Efectos de seis años de labranzas en un Hapludol de noroeste de Buenos Aires, Argentina. *Ciencia del Suelo*, 17(1), pp.31–36.
- Díaz-Zorita, M., Barraco, M. & Alvarez, C., 2004. Efectos de doce años de labranzas en un Hapludol del noroeste de Buenos Aires, Argentina. *Ciencia del Suelo*, 22(1), pp.11–18.
- Dobbelaere, S. et al., 2001. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Australian Journal of Plant Physiology*, 28, pp.871 – 879.
- Doignon-Bourcier, F. et al., 2000. Genotypic Characterization of Bradyrhizobium Strains Nodulating Small Senegalese Legumes by 16S-23S rRNA Intergenic Gene Spacers and Amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprint Analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9), pp.3987–3997.
- Dorr de Quadros, P. et al., 2012. The Effect of Tillage System and Crop Rotation on Soil Microbial Diversity and Composition in a Subtropical Acrisol. *Diversity*, 4(4), pp.375–395.
- Dos Santos, J.B. et al., 2005. Tolerance of Bradyrhizobium strains to glyphosate formulations. *Crop Protection*, 24(6), pp.543–547.
- Doyle, J.J. & Luckow, M.A., 2003. Update on Phylogeny The Rest of the Iceberg . Legume Diversity and Evolution in a Phylogenetic Context 1. *Plant Physiology*, 131(March), pp.900–910.
- Druille, M. et al., 2015. Glyphosate vulnerability explains changes in root-symbionts propagules viability in pampean grasslands. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 202, pp.48–55.
- Elsheikh, E.A.E., 1998. Effect of salt on rhizobia and bradyrhizobia : A review . *Annals Applied Biology*, 132, pp.507–524.
- Falkowski, P.G., 1997. Evolution of the nitrogen cycle and its influence on the biological sequestration of CO₂ in the ocean. *Nature*, 367(5429), pp.272–275.
- FAO, 1992. *Manual de sistemas de labranza para América Latina Volume 66 of Boletín de suelos de la FAO* Food & Agriculture Organization of the United Nations, ed., Roma, Italia.
- Fauvert, M. & Michiels, J., 2008. Rhizobial secreted proteins as determinants of host specificity in the rhizobium-legume symbiosis. *FEMS microbiology letters*, 285(1), pp.1–9.

- Fedorov, D.N. et al., 2008. A new system of degenerate oligonucleotide primers for detection and amplification of nifHD genes. *Microbiology*, 77(2), pp.247–249.
- Fehr, WR, & Caviness, C., 1977. Stages of soybean development. In A. : I. S. University, ed. *Special report / Agriculture and Home Economics Experiment Station*. Agriculture and Home Economics Experiment Station, Iowa State University of Science and Technology., pp. 1–12.
- Ferguson, B.J. et al., 2010. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of integrative plant biology*, 52(1), pp.61–76.
- Ferraris, G.N., González Anta, G. & Díaz-Zorita, M., 2005. Aportes actuales y futuros de tratamientos biológicos sobre la nutrición nitrogenada y producción de soja en el cono sur. In *Mercosoja*. pp. 1–4.
- Ferreira, M.C. et al., 2000. Tillage method and crop rotation effects on the population sizes and diversity of bradyrhizobia nodulating soybean. *Soil Biology & Biochemistry*, 32, pp.627–637.
- Ferreira, M.C. & Hungria, M., 2002. Recovery of soybean inoculant strains from uncropped soils in Brazil. *Field Crops Research*, 79(2-3), pp.139–152.
- Fischer, S. & Jofré, E., 2010. El futuro de los inoculantes: Hacia el desarrollo de consorcios microbianos para una agricultura sustentable. In M. L. Puente, J. E. García, & A. Peticari, eds. *Uso Actual y Potencial de Microorganismos para Mejorar la Nutrición y el Desarrollo en Trigo y Maíz*. Buenos Aires. AR: Ediciones INTA, pp. 67–75.
- Flores, M. et al., 1998. Three Replicons of Rhizobium sp . Strain NGR234 Harbor Symbiotic Gene Sequences. *Journal of Bacteriology*, 180(22), pp.6052–6053.
- Fowler, D. et al., 2013. The global nitrogen cycle in the twenty- first century. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 368, pp.1–13.
- Frayse, N., Couderc, F. & Poinso, V., 2003. Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. *European Journal of Biochemistry*, 270(7), pp.1365–1380.
- Fuhrmann, J., 1990. Symbiotic effectiveness of indigenous soybean bradyrhizobia as related to serological, morphological, rhizobitoxine, and hydrogenase phenotypes. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(1), pp.224–9.
- Gage, D.J., 2004. Infection and Invasion of Roots by Symbiotic , Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes Infection and Invasion of Roots by Symbiotic , Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes. , 68(2).
- Galli-Terasawa, L.V., Glienke-Blanco, C. & Hungria, M., 2003. Diversity of a soybean rhizobial population adapted to a Cerrados soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(9), pp.933–939.

- Galloway, J.N. et al., 2004. Nitrogen cycles : past , present , and future. *Biogeochemistry*, 70, pp.153–226.
- Gancel, F. & Novel, G., 1994. Exopolysaccharide Production by *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* Cultures. 1. Conditions of Production. *Journal of Dairy Science*, 77(3), pp.685–688.
- Garrity, G., Bell, J. & Lilburn, T., 2005. Family VII. Bradyrhizobiaceae. In G. M. Garrity et al., eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Michigan, USA: Springer, pp. 438–443.
- Gerhardt, P. et al., 1994. *Methods for general and molecular bacteriology* ASM, ed., Washington DC: Washington : American Society for Microbiology.
- Giongo, A. et al., 2008. Evaluation of genetic diversity of bradyrhizobia strains nodulating soybean [*Glycine max* (L .) Merrill] isolated from South Brazilian fields. *Applied Soil Ecology*, 38, pp.261–269.
- Girgis, M.G.Z., Sharaf, M.S. & Khalil, H.M.A., 2007. Differentiation Between Bradyrhizobium Isolates by Colony Type , Exopolysaccharides and Streptomycin Resistance. *Journal of Applied Sciences Research*, 3(12), pp.1997–2008.
- Gomes Barcellos, F. 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(8), pp.2635–43.
- Gomes Barcellos, F. et al., 2009. Genetic differences between Bradyrhizobium japonicum variant strains contrasting in N(2)-fixation efficiency revealed by representational difference analysis. *Archives of Microbiology*, 191(2), pp.113–22.
- Gonzalez Anta, G., 2006. Desarrollos del mercado de inoculantes en el Mercosur. In AcSoja, ed. *3º Congreso de Soja del Mercosur*. Rosario. Argentina, pp. 129–130.
- Gonzalez, N., 2006. Fijación de nitrógeno en soja situación actual y perspectivas en la argentina. In *3º Congreso de Soja del Mercosur, Conferencia Plenaria*. Rosario, Argentina., p. 376 pp.
- González, N., 2007. Fijación de nitrógeno en soja inoculantes: situación actual y perspectivas en la Argentina. In C. Thuar, A, Cassan, F, & Olmedo, ed. *De la Biología del Suelo a la Agricultura*. Río Cuarto: INTA, pp. 161– 173.
- González, N. et al., 1997. Nutrición nitrogenada. In L. M. Giorda & H. E. J. . Baigorri, eds. *El cultivo de la soja en Argentina*. INTA, Centro Regional Córdoba. EEA Marcos Juárez-EEA., pp. 188–198.
- Graham, P.H., 2008. Ecology of root-nodule bacteria of legumes. In W. E. Dilworth, M.J. James, E.K., Sprent, J.I., Newton, ed. *Nitrogen fixing. Leguminous Symbioses*. p. 419.
- Graham, P.H., 1992. Stress tolerance in Rhizobium and Bradyrhizobium , and nodulation under adverse soil conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, 38(6), pp.475–484.

- Graham, P.H. & Vance, C.P., 2000. Nitrogen fixation in perspective : an overview of research and extension needs. *Field Crops Research*, 65, pp.93–106.
- Grossman, J.M. et al., 2011. Diversity of rhizobia in soybean [*Glycine max* (Vinton)] nodules varies under organic and conventional management. *Applied Soil Ecology*, 50, pp.14–20.
- Gruber, N. & Galloway, J.N., 2008. An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature*, 451(7176), pp.293–6.
- Gutierrez-Zamora, M. L. & Martinez-Romero, E., 2001. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). *Journal of biotechnology*, 91, pp.117–126.
- Hartmann, A. et al., 1996. Repeated sequence RSa is diagnostic for *Bradyrhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium elkanii*. *Biology and Fertility of Soils*, 23, pp.15–19.
- Hartman, G.L., West, E.D. & Herman, T.K., 2011. Crops that feed the World 2. Soybean—worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests. *Food Security*, 3(1), pp.5–17.
- Heron DS, et al., 1989. Nodulation mutants of *Rhizobium fredii* USDA257. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 2 (1), pp 4–10.
- Herridge, D.F., Peoples, M.B. & Boddey, R.M., 2008. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant and Soil*, 311(1-2), pp.1–18.
- Hirsch, S. et al., 2009. GRAS proteins form a DNA binding complex to induce gene expression during nodulation signaling in *Medicago truncatula*. *The Plant cell*, 21(2), pp.545–57.
- Hoben, H.J. & Somasegaran, P., 1982. Comparison of the Pour , Spread , and Drop Plate Methods for Enumeration of *Rhizobium* spp . in Inoculants Made from Presterilized Peat. *Applied and Environmental Microbiology*, 44, pp.1246–1247.
- Horneck, D. A., & Miller, R.O., 1998. Determination of total nitrogen in plant tissue. In Y. Kalra, ed. *Handbook of reference methods for plant analysis*,. Washington, pp. 75–83.
- Hungria, M. et al., 1996. Comparison between parental and variant soybean *Bradyrhizobium* strains with regard to the production of lipo-chitin nodulation signals, early stages of root infection, nodule occupancy, and N₂ fixation rates. *Plant and Soil*, 186(2), pp.331–341.
- Hungria, M., Andrade, D.S., Balota, E.L., Colozzi-Filho, A., 1997a. Importância do Sistema de Semeadura Direta na População Microbiana do Solo. *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Centro Nacional de Pesquisa de Soja*, 56, pp.1–9.
- Hungria, M., Andrade, D.S., Colozzi-Filho, A., Balota, E.L., 1997b. Interação entre microrganismos do solo, feijoeiro e milho em monocultura ou consórcio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 32, pp.807–801.
- Hungria, M. & Vargas, M.A.T., 2000. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics , with an emphasis on Brazil. *Field Crops Research*, 65, pp.151–164.

- Hungria, M. et al., 2001. Preliminary characterization of fast growing rhizobial strains isolated from soyabean nodules in Brazil. *Soil Biology & Biochemistry*, 33, pp.1349–1361.
- Hungria, M. et al., 2006. Nitrogen nutrition of soybean in Brazil : Contributions of biological N₂ fixation and N fertilizer to grain yield. *Canadian Journal of Plant Science*, pp.927–939.
- Igual, J.M. et al., 2006. La simbiosis actinorrícica. In S. E. de F. de Nitrógeno, ed. *Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones*. pp. 232–243.
- Jimenez-Zurdo, J.I. et al., 2006. Genómica de endosimbiontes diazotróficos. In *Fijación de Nitrógeno: fundamentos y aplicaciones*. pp. 53–63.
- Jones, K.M. et al., 2007. NIH Public Access. , 5(8), pp.619–633.
- Jordan, D.C., 1984. Family III. Rhizobiaceae Conn 1938. In N. Krieg & R. G. Holt, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: The Williams & Wilkins Co, pp. 234–235.
- Judd, A.K. et al., 1993. Use of Repetitive Sequences and the Polymerase Chain Reaction Technique To Classify Genetically Related Bradyrhizobium japonicum Serocluster 123 Strainst. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(6), pp.1702–1708.
- Kahindi, J.H.P. et al., 1997. Agricultural intensification, soil biodiversity and ecosystem function in the tropics: the role of nitrogen-fixing bacteria. *Applied Soil Ecology*, 6(1), pp.55–76.
- Kaluza, K., Hahn, M. & Hennecke, H., 1985. Repeated sequences similar to insertion elements clustered around the nif region of the Rhizobium japonicum genome. *Journal of Bacteriology*, 162(2), pp.535–42. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=218881&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Kaneko, T. et al., 2002. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium Bradyrhizobium japonicum USDA110 (supplement). *DNA research: an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*, 9(6), pp.225–56.
- Kaschuk, G., Hungria, M., Santos, J.C.P., et al., 2006a. Differences in common bean rhizobial populations associated with soil tillage management in southern Brazil. *Soil and Tillage Research*, 87(2), pp.205–217.
- Kaschuk, G., Hungria, M., Andrade, D.S., et al., 2006b. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. *Applied Soil Ecology*, 32(2), pp.210–220.
- Kiers, E., Ratcliff, W. & Denison, R., 2013. Single strain inoculation may create spurious correlations between legume fitness and rhizobial fitness. *New Phytologist*, 198, pp.4–6.
- Kober, M.D.V. & Giongo, A., 2004. Characterization of variants of Bradyrhizobium elkanii and B . japonicum and symbiotic behaviour in soybeans. *Ciencia Rural Santa María*, 34, pp.1459–1464.

- Koppell, J.H. & Parker, M. a, 2012. Phylogenetic clustering of Bradyrhizobium symbionts on legumes indigenous to North America. *Microbiology*, 158(Pt 8), pp.2050–2059.
- Kremer, R.J. & Means, N.E., 2009. Glyphosate and glyphosate-resistant crop interactions with rhizosphere microorganisms. *European Journal of Agronomy*, 31(3), pp.153–161.
- Kündig, C. et al., 1995. A Single rRNA Gene Region in Bradyrhizobium japonicum. *Journal of Applied Bacteriology*, 177(17), pp.5151–5154.
- Kuykendall, L., 2005. Bradyrhizobium Jordan 1982, 137 VP. In *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. pp. 438–443.
- Kwon, S.-W. et al., 2005. Phylogenetic analysis of the genera Bradyrhizobium, Mesorhizobium, Rhizobium and Sinorhizobium on the basis of 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequences. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(Pt 1), pp.263–70.
- Laguerre, G. et al., 1994. Rapid Identification of Rhizobia by Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified 16S rRNA Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(26), pp.56–63.
- Laguerre, L.E. et al., 1996. Typing of Rhizobia by PCR DNA Fingerprinting and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Chromosomal and Symbiotic Gene Regions : Application to Rhizobium leguminosarum and Its Different Biovars. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(6), pp.2029–2036.
- Leigh, G.J., 2004. *The World's Greatest Fix : A History of Nitrogen and Agriculture: A History of Nitrogen and Agriculture* U. Oxford University Press, ed., Oxford.
- Li, J.H. et al., 2008. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(1), pp.238–246.
- Li, Q.Q. et al., 2011. Diversity and biogeography of rhizobia isolated from root nodules of Glycine max grown in Hebei Province, China. *Microbial ecology*, 61(4), pp.917–31.
- Lindström, K. et al., 2010. The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia. *Research in Microbiology*, 161(6), pp.453–463.
- Lira-ruan, K., Sarath, G. & Klucas, R. V, 2000. Characterization of Leghemoglobin from a mimosoid legume, Leucaena esculenta. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 12(1), pp.37–44.
- Liu et al., 2011. Models of biological nitrogen fixation of legumes . A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 31, pp.155–172.
- Lloret, L. & Martínez-Romero, E., 2005. Evolución y filogenia de Rhizobium. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 47, pp.43–60.

- Lodeiro, A., 2015. Interrogantes en la tecnología de la inoculación de semillas de soja con *Bradyrhizobium* spp. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(3), pp.261–273.
- Logan, T.J., Lal, R. & Dick, W.A., 1991. Tillage systems and soil properties in North America. *Soil and Tillage Research*, 20(2-4), pp.241–270.
- López, S. et al., 2013. Los rizobios que nodulan la soja en sitios con ambientes nativos y cultivados de la Argentina. In A. S. Albanesi, ed. *Microbiología agrícola. Un aporte de la Investigación en Argentina*. Tucumán: Magna Publicaciones,, pp. 237–252.
- Lopez, S.M.Y. & Balatti, P.A., 2012. Closely Related Strains Of *Bradyrhizobium* Contained In Commercial Inoculates Of Soybean Are Identified By A Set Of PCR Reactions. *Genetic Engineering and Biotechnology Journal*, 2011, pp.1–8.
- Loreau, M., 2010. Linking biodiversity and ecosystems: towards a unifying ecological theory. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 365(1537), pp.49–60.
- Loureiro, M.D.F. et al., 2007. Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] rhizobial diversity in Brazilian oxisols under various soil, cropping, and inoculation managements. *Biology and Fertility of Soils*, 43(6), pp.665–674.
- Madrzak, C.J. et al., 1995. Diversity among Field Populations of *Bradyrhizobium japonicum* in Poland. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(4), pp.1194–200.
- Mann, C.C., 2006. *1491, New Revelations of the Americas Before Columbus* second. 2006 Knopf Doubleday Publishing Group, ed., New York.
- Margalef, D.R., 1958. Information Theory in Ecology. *General Systematics*, 3, pp.36–71.
- Martínez, F., 2010. Crónica de la soja en la región pampeana argentina . *INTA EEA Oliveros*, 45, pp.141–146.
- Martinez-Romero, E. & Caballero Mellado, J., 1996. Rhizobium Phylogenies and Bacterial Genetic Diversity. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 15, pp.113–140.
- Matiru, V.N. & Dakora, F.D., 2004. Potential use of rhizobial bacteria as promoters of plant growth for increased yield in landraces of African cereal crops. , 3(January), pp.1–7.
- Mavingui, P. et al., 2002. Dynamics of Genome Architecture in *Rhizobium* sp. Strain NGR234. *Journal of Bacteriology*, 184(1), pp.171–176.
- Meinhardt, L.W. et al., 1993. Molecular cloning and characterization of a sym plasmid locus that regulates cultivar-specific nodulation of soybean by *Rhizobium fredii* USDA257. *Molecular microbiology*, 9(1), pp.17-29.
- Melchiorre, M. et al., 2011. Evaluation of bradyrhizobia strains isolated from field-grown soybean plants in Argentina as improved inoculants. *Biology and Fertility of Soils*, 47(1), pp.81–89.

- Mendes, I.C., Hungria, M. & Vargas, M.A.T., 2004. Establishment of *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* strains in a Brazilian Cerrado oxisol. *Biology and Fertility of Soils*, 40(1), pp.28–35.
- Mendoza Paredes, M., 2010. *Aislamiento y caracterización bioquímica de metabolitos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfatos*. instituto de enseñanza e investigación en Ciencias agrícolas. Montecillo, Edo de Mexico.
- Menna, P., Barcellos, F.G. & Hungria, M., 2009. Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of *Bradyrhizobium* strains based on multilocus sequence analysis of the 16S rRNA gene, ITS region and *glnII*, *recA*, *atpD* and *dnaK* genes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(Pt 12), pp.2934–50.
- Menna, P. & Hungria, M., 2011. Phylogeny of nodulation and nitrogen-fixation genes in *Bradyrhizobium*: supporting evidence for the theory of monophyletic origin, and spread and maintenance by both horizontal and vertical transfer. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61(Pt 12), pp.3052–67.
- Miller, K.M. et al., 1999. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE): A Rapid and Sensitive Technique to Screen Nucleotide Sequence Variation in Populations Research Report. *BioTechniques*, 27(5), pp.1016–1030.
- Minamisawa, K. et al., 1998. New *Bradyrhizobium japonicum* strains that possess high copy numbers of the repeated sequence RS alpha. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(5), pp.1845–51.
- Moorman, T.B. et al., 1992. Production of Hydroxybenzoic Acids by. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, pp.289–293.
- Morillo, E. et al., 2000. Glyphosate adsorption on soils of different characteristics . Influence of copper addition. *Chemosfere*, 40, pp.103–107.
- Moulin, L. et al., 2004. Phylogenetic analyses of symbiotic nodulation genes support vertical and lateral gene co-transfer within the *Bradyrhizobium* genus. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30(3), pp.720–32.
- Muñoz-Rojas, J. & Caballero-Mellado, J., 2003. Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth. *Microbial ecology*, 46(4), pp.454–64.
- Murray, J.D., 2011. Invasion by invitation: rhizobial infection in legumes. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 24(6), pp.631–9.
- Nautiyal, C.S., 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170(436), pp.265–270.
- Nievas, F. et al., 2012. Genotypic analysis of isolated peanut-nodulating rhizobial strains reveals differences among populations obtained from soils with different cropping histories. *Applied Soil Ecology*, 53, pp.74–82.

- Nóbrega, R.S.A. et al., 2004. Tolerance of diazotrophic symbiotic bacteria to salinity. *Ciência e Agrotecnologia*, 28(4), pp.899–905.
- Obaton, M. et al., 2002. Are Bradyrhizobium japonicum stable during a long stay in soil? *Journal Plant and Soil*, 245(2), pp.315–326.
- Olivares, J., 2006. Nitrogenasa. Enzima clave en la fijación. In SEFIN, ed. *Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones*. Granada, pp. 29–34.
- Olivares, J. et al., 2013. Biological Nitrogen Fixation in the Context of Global Change. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(5), pp.486–494.
- Osa Afiana, L.O. & Alexander, M., 1982. Differences Among Cowpea Rhizobia in Tolerance to High Temperature and Desiccation in Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 43(2), pp.435–439.
- Parker, M.A. et al., 2002. Conflicting phylogeographic patterns in rRNA and nifD indicate regionally restricted gene transfer in Bradyrhizobium. *Microbiology*, 148(2002), pp.2557–2565.
- Parro, V. & Moreno-Paz, M., 2004. Nitrogen fixation in acidophile iron-oxidizing bacteria: the nif regulon of Leptospirillum ferrooxidans. *Research in microbiology*, 155(9), pp.703–709.
- Pastorino, G.N., Martínez Alcántara, V. & Balatti, P.A., 2003. Identification of fast and slow growing rhizobia nodulating soybean (Glycine max [L .] Merr) by a multiplex PCR reaction. *FEMS microbiology letters*, 229, pp.153–158.
- Pena-Cabriales, J.J. & Alexander, M., 1983. Growth of Rhizobium in Unamended Soil. *Soil Science Society of America Journal*, 47(1), p.81.
- Penna, C. et al., 2011. A simple method to evaluate the number of bradyrhizobia on soybean seeds and its implication on inoculant quality control. *AMB Express*, 1(1), p.21.
- Pérez-Giménez, J. et al., 2009. Soybean Lectin Enhances Biofilm Formation by Bradyrhizobium japonicum in the Absence of Plants. *International journal of microbiology*, 2009, p.719367.
- Perret, X. & Staehelin, C., 2000. Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(1), pp.180–201.
- Perret, X., Viprey, V. & Freiberg, C., 1997. Structure and Evolution of NGRRS-1 , a Complex , Repeated Element in the Genome of Rhizobium sp . Strain NGR234. *Journal of Bacteriology*, 179(23), pp.7488–7496.
- Peters, G.A. & Meeks, J.C., 1989. The Azolla-Anabaena Symbiosis: Basic Biology. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40(1), pp.193–210.
- Pielou, E.C., 1969. *An Introduction to Mathematical Ecology*. W.-I. J. Wiley & Sons, eds.,
- Pierce, M. & Bauer, W.D., 1983. A Rapid Regulatory Response Governing Nodulation in Soybean. *Plant Physiol.*, 73, pp.286–290.

- Polhill, R.M. & Raven, P.H., 1981. *Advances in Legume Systematics Royal Botanic Gardens*, Kew, UK.
- Potts, M. & Webb, S.J., 1994. Desiccation Tolerance of Prokaryotes. *Microbiological reviews*, 58(4), pp.755–805.
- Power, A.G., 2010. Ecosystem services and agriculture: tradeoffs and synergies. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 365(1554), pp.2959–71.
- Powlson, D.S. & Jenkinson, D.S., 1981. A comparison of the organic matter, biomass, adenosine triphosphate and mineralizable nitrogen contents of ploughed and direct-drilled soils. *The Journal of Agricultural Science*, 97(03), p.713.
- Pueppke, S.G. & Broughton, W.J., 1999. Rhizobium sp . Strain NGR234 and R . fredii USDA257 Share Exceptionally Broad , Nested Host Ranges. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12(4), pp.293–318.
- Qian, J., Kwon, S.-W. & Parker, M. a, 2003. rRNA and nifD phylogeny of Bradyrhizobium from sites across the Pacific Basin. *FEMS Microbiology Letters*, 219(2), pp.159–165.
- Quelas, J.I. et al., 2006. Effects of N-starvation and C-source on Bradyrhizobium japonicum exopolysaccharide production and composition, and bacterial infectivity to soybean roots. *Archives of microbiology*, 186(2), pp.119–28.
- Ramos, J.L. et al., 2001. Responses of Gram-negative bacteria to certain environmental stressors. *Current Opinion in Microbiology*, 4, pp.166–171.
- Revellin, C. et al., 1996. Influence of soil properties and soya bean cropping history on the Bradyrhizobium japonicum population in some French soils. *European Journal of Soil Science*, 47(4), pp.505–510.
- Reyes, V.G. & Schmidt, E.L., 1979. Population Densities of Rhizobium japonicum Strain 123 Estimated Directly in Soil and Rhizospheres. *Applied and Environmental Microbiology*, 37(5), pp.854–858.
- Ribeiro, R.A. et al., 2009. Multilocus sequence analysis of Brazilian Rhizobium microsymbionts of common bean (Phaseolus vulgaris L.) reveals unexpected taxonomic diversity. *Research in microbiology*, 160(4), pp.297–306.
- Rinaudi, L. V. & Giordano, W., 2010. An integrated view of biofilm formation in rhizobia. *FEMS microbiology letters*, 304(1), pp.1–11.
- Rodriguez-Navarro, D.N. et al., 2000. Characterization of Rhizobium spp. bean isolates from South-West Spain. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(11-12), pp.1601–1613.
- Rodriguez-Quñones, F. et al., 1992. Hyperreiterated DNA Regions Are Conserved among Bradyrhizobium japonicum Serocluster 123 Strainst. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(6), pp.1878–1885.

- Roughley, R.J. et al., 1993. The number of Bradyrhizobium SP. (Lupinus) applied to seed and its effect on rhizosphere colonization, nodulation and yield of lupin. *Soil Biology and Biochemistry*, 25(10), pp.1453–1458.
- SAGYP- INTA. 1989. Mapa de Suelos de la Provincia de Buenos Aires. Castelar: SAGYP-INTA. Proyecto PNUD ARG 85/019. 472 p.
- Salvagiotti, F. et al., 2015. El aporte de la fijación biológica de nitrógeno en el cultivo de soja en Argentina. *Informaciones Agronómicas de Hispanoamérica*, 20, pp.7–11.
- Salvucci, R.D. et al., 2012. Nodulation Capacity of Argentinean Soybean (Glycine max [L.] Merr) Cultivars Inoculated with Commercial Strains of Bradyrhizobium japonicum. *American Journal of Plant Sciences*, 2012(January), pp.130–140.
- Sameshima, R. et al., 2003. Phylogeny and distribution of extra-slow-growing Bradyrhizobium japonicum harboring high copy numbers of RSalpha, RSbeta and IS1631. *FEMS microbiology ecology*, 44(2), pp.191–202.
- Sánchez Contreras, M. et al., 2000. PCR Use of Highly Conserved DNA Regions for Identification of Sinorhizobium meliloti. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), pp.3621–3623.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), pp 5463–5467.
- Santos, M., Vargas, M. & Hungria, M., 1999. Characterization of soybean Bradyrhizobium strains adapted to the Brazilian savannas. *FEMS microbiology ecology*, 30(3), pp.261–272.
- Seminoti Jacques, J.R. et al., 2010. Sensibilidade de estirpes de Bradyrhizobium ao glyphosate. *Revista Ceres, Viçosa*, 57, pp.28–33.
- Shannon, C.E. & Weaver W., 1949. The Mathematical Theory of Communication. *University Illinois Press, Urbana, IL*.
- SIIA, 2016. (http://www.siiia.gov.ar/_apps/siiia/estimaciones/estima2.php). *Sistema Integrado de Información Agropecuaria*, p.estimaciones.
- Silva, A.P. et al., 2013. Bacterial Diversity Under Different Tillage and Crop Rotation Systems in an Oxisol of Southern Brazil. *The Open Agriculture Journal*, pp.40–47.
- Six, J. et al., 2002. Review article Soil organic matter , biota and aggregation in temperate and tropical soils – Effects of no-tillage. *Agronomie*, 22, pp.755–775.
- Snedden, W.A. & Fromm, H., 2001. Calmodulin as a versatile calcium signal transducer in plants. *New Phytologist*, 151(125), pp.35–66.
- Somasegaran, P. & Hoben, H.J., 1985. *Methods in Legume-Rhizobium Technology*, University of Hawaii NifTAL.

- Somasegaran, P. & Hoben, H.J., 2012. *Handbook for rhizobia: methods in legume-Rhizobium technology*. S. S. & B. Media., ed.,
- Sorroche, F.G. et al., 2012. A positive correlation between bacterial autoaggregation and biofilm formation in native *Sinorhizobium meliloti* isolates from Argentina. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(12), pp.4092–101.
- Sperber, J., 1958. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. *Australian Journal of Agricultural Research*, 9(6), p.778.
- Streeter, J.C., 1994. Failure of inoculant rhizobia to overcome the dominance of indigenous strains for nodule formation. *Canadian Journal of Microbiology*, 40(7), pp.513–522.
- Streeter, J.G., 2003. Effect of trehalose on survival of *Bradyrhizobium japonicum* during desiccation. *Journal of Applied Microbiology*, 95(3), pp.484–491.
- Streeter, J.G., 2007. Factors affecting the survival of *Bradyrhizobium* applied in liquid cultures to soya bean [*Glycine max* (L.) Merr.] seeds. *Journal of Applied Microbiology*, 103(4), pp.1282–90.
- Streit, W.R. et al., 2004. An Evolutionary Hot Spot : the pNGR234 b Replicon of *Rhizobium* sp . Strain NGR234. *Journal of Bacteriology*, 186(2), pp.535–542.
- Sullivan, J. & Ronson, C., 1998. Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(April), pp.5145–5149.
- Suominen, L. et al., 2001. Identification and structure of the *Rhizobium galegae* common nodulation genes: evidence for horizontal gene transfer. *Molecular Biology and Evolution*, 18(6), pp.907–16.
- Suzuki, Y. et al., 2014. Effects of temperature on competition and relative dominance of *Bradyrhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium elkanii* in the process of soybean nodulation. *Plant and Soil*, 374(1-2), pp.915–924.
- Taboada, M., Casas, R. & Sasal, M.C., 2013. Siembra Directa . La elegida para conservar el suelo. *RIA, Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 39, pp.118–123.
- Tang, J. et al., 2012. Microevolution of symbiotic *Bradyrhizobium* populations associated with soybeans in east North America. *Ecology and evolution*, 2(12), pp.2943–61.
- Temprano, F. et al., 2002. Survival of several *Rhizobium/Bradyrhizobium* strains on different inoculant formulations and inoculated seeds. *International Microbiology*, 5(2), pp.81–86.
- Terpolilli, J.J., Hood, G. a & Poole, P.S., 2012. What determines the efficiency of N(2)-fixing *Rhizobium*-legume symbioses? R. K. Poole, ed. *Advances in Microbial Physiology*, 60, pp.325–89.

- Thies, J.E., Singleton, P.W. & Bohlool, B.B.E.N., 1991. Influence of the Size of Indigenous Rhizobial Populations on Establishment and Symbiotic Performance of Introduced Rhizobia on Field-Grown Legumes. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(1), pp.19–28.
- Tian, C.F. et al., 2012. Comparative genomics of rhizobia nodulating soybean suggests extensive recruitment of lineage-specific genes in adaptations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(22), pp.8629–34.
- Tilman, D. et al., 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*, 418(August), pp.671–677.
- Tomkins, J.P. et al., 2001. A marker-dense physical map of the Bradyrhizobium japonicum genome. *Genome research*, 11(8), pp.1434–1440.
- Torres, A.R. et al., 2012. Genetic variability in Bradyrhizobium japonicum strains nodulating soybean [Glycine max (L.) Merrill]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 28(4), pp.1831–5.
- Torres, D. et al., 2015. Genome Sequence of Bradyrhizobium japonicum E109 , One of the Most Agronomically Used Nitrogen-Fixing Rhizobacteria in Argentina. *Genome Announcements*, 3(1), pp.1–2.
- Tringali, L., Gonzalez, N. & Andreoli, Y., 1997. Naturalización y supervivencia saprofítica de dos cepas de Bradyrhizobium japonicum en suelos Argiudoles de Balcarce. *Ciencia del Suelo*, 14, pp.28–32.
- Triplett, E.W., Albrecht, K.A. & Oplinger, E.S., 1993. Crop rotation effects on populations of Bradyrhizobium japonicum and Rhizobium meliloti. *Soil Biology and Biochemistry*, 25(6), pp.781–784.
- Tu, C.M., 1977. Effects of pesticide seed treatments on Rhizobium japonicum and its symbiotic relationship with soybean. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 18(2), pp.190–199.
- Unkovich, M., Herridge, D. & Peoples, M., 2008. *Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems* Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems P. Unkovich, M.;Herridge, D.;Peoples, M.;Cadisch, G.;Boddey, B.;Giller, K.;Alves, B.;Chalk, ed., Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR).
- Urzúa, H., 2005. Beneficios de la Fijación Simbiótica de Nitrógeno en Chile. *Ciencia e investigación agraria: revista latinoamericana de ciencias de la agricultura*, 32, pp.133–150.
- Valencia, R. & Gómez, L., 2012. Caracterización molecular de las cepas de Bradyrhizobium japonicum protocolos rep-PCR. *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 13, pp.196–200.
- Van Berkum, P. & Fuhrmann, J., 2000. Evolutionary relationships among the soybean bradyrhizobia reconstructed from 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region

- sequence divergence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, pp.2165–2172.
- Van Berkum, P. & Fuhrmann, J., 2009. Evidence from internally transcribed spacer sequence analysis of soybean strains that extant Bradyrhizobium spp. are likely the products of reticulate evolutionary events. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(1), pp.78–82.
- Vandamme, P. et al., 1996. Polyphasic Taxonomy , a Consensus Approach to Bacterial Systematics. *Microbiological reviews*, 60(2), pp.407–438.
- Van Rhijn, P. & Vanderleyden, J., 1995. The Rhizobium-plant symbiosis. *Microbiological reviews*, 59(1), pp.124–42.
- Velazquez, E., R. Silva, L. & Peix, A., 2010. Legumes: A Healthy and Ecological Source of Flavonoids. *Current Nutrition & Food Science*, 6(2), pp.109–144.
- Versalovic, J. et al., 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Method in Molecular and Cellular Biology*, 5, pp.25–40.
- Videira, L.B. et al., 2002. Sinorhizobium fredii isolates can be specifically identified by a 260 bp fragment from the nolXWBTUV locus. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(2-3), pp.265–9.
- Vincent, J.M., 1970. *A manual for the practical study of root-nodule bacteria* Blackwell Scientific, ed., Oxford: International Biological Programme.
- Vinuesa, P. et al., 2005. Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and recombination in Bradyrhizobium species cohesion and delineation. *Molecular phylogenetics and evolution*, 34(1), pp.29–54.
- Vitta, J., Tuesca, D. & Puricelli, E., 2004. Widespread use of glyphosate tolerant soybean and weed community richness in Argentina. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 103(3), pp.621–624.
- Vriezen, J. a C., de Bruijn, F.J. & Nüsslein, K., 2007. Responses of rhizobia to desiccation in relation to osmotic stress, oxygen, and temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(11), pp.3451–9.
- Wang, Y. et al., 2011. Long-term impact of farming practices on soil organic carbon and nitrogen pools and microbial biomass and activity. *Soil and Tillage Research*, 117, pp.8–16.
- Willems, A. et al., 2001. Comparison of sequence analysis of 16S – 23S rDNA spacer regions , AFLP analysis and DNA – DNA hybridizations in Bradyrhizobium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, pp.623–632.
- Willems, A., 2006. The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant and Soil*, 287(1-2), pp.3–14.
- Wittenberg, J.B. et al., 1974. Facilitated Oxygen Diffusion: The Role of Leghemoglobin in Nitrogen Fixation by Bacteroids Isolated from Soybean Root Nodules. *The Journal of Biological Chemistry*, 249, pp.4057–4066.

- Woomer, P.L., 1994. Most Probable Number Counts. In R. W. Bottomley, P.S; Angle, J.S. and Weaver, ed. *Methods of Soil Analysis. Part 2—Microbiological and Biochemical Properties*. pp. 59–79.
- Yagi, K. et al., 2000. Isolation and Characterization of Low-indole-3-acetic Acid-producing Mutants from *Bradyrhizobium elkanii*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 64(7), pp.1359–1364.
- Yan, J. et al., 2014. Abundance and diversity of soybean-nodulating rhizobia in black soil are impacted by land use and crop management. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(17), pp.5394–5402.
- Yanagi, M. & Yamasato, K., 1993. Phylogenetic analysis of the family Rhizobiaceae and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer. *FEMS Microbiology Letters*, 107(1), pp.115–120.
- Yang, S.S. et al., 2001. Effect of pH and soybean cultivars on the quantitative analyses of soybean rhizobia populations. *Journal of biotechnology*, 91(2-3), pp.243–55.
- Yanni, Y.G. et al., 1997. Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. *Plant and Soil*, 194, pp.99–114.
- Yanni, Y.G. et al., 2001. The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii with rice roots. *Australian Journal of Plant Physiology Plant Physiology*, 28, pp.845–870.
- Yao, Z.Y. et al., 2002. Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(Pt 6), pp.2219–30.
- Zabaloy, M.C. & Gómez, M.A., 2005. Diversity of rhizobia isolated from an agricultural soil in Argentina based on carbon utilization and effects of herbicides on growth. *Biology and Fertility of Soils*, 42(2), pp.83–88.
- Zablotowicz, R.M. & Reddy, K.N., 2004. Impact of Glyphosate on the *Bradyrhizobium japonicum* Symbiosis with Glyphosate-Resistant Transgenic Soybean: A Minireview. *Journal of Environmental Quality*, 33, pp.825–831.
- Zahran, H.H., 1999. *Rhizobium* -Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(4), pp.968–989.
- Zanettini, J. et al., 2014. Cambios en un hapludol típico luego de diez años de siembra directa. In *XXIV Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo y II Reunión Nacional “Materia Orgánica y Sustancias Húmicas.”* Bahía Blanca: INTA EEA General Villegas, pp. 68–71.
- Zengeni, R., Mpeperekwi, S. & Giller, K.E., 2006. Manure and soil properties affect survival and persistence of soybean nodulating rhizobia in smallholder soils of Zimbabwe. *Applied Soil Ecology*, 32(2), pp.232–242.

-
- Zhang, Y.M. et al., 2011. Biodiversity and biogeography of rhizobia associated with soybean plants grown in the North China Plain. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(18), pp.6331–42.
- Zilli, J.É. et al., 2009. Influence of fungicide seed treatment on soybean nodulation and grain yield. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 23, pp.917–923.



*Antes de ser lo que ahora,
yo era un pequeño gusano
que escondido en un manzano
pasaba alegre las horas.
Cuando el invierno llegó
teji con mucho cuidado
un cestito bien formado
que cariñoso me abrigó.
Al llegar la primavera
abrí mis alas primeras
y comencé a volar.....*

Angela

