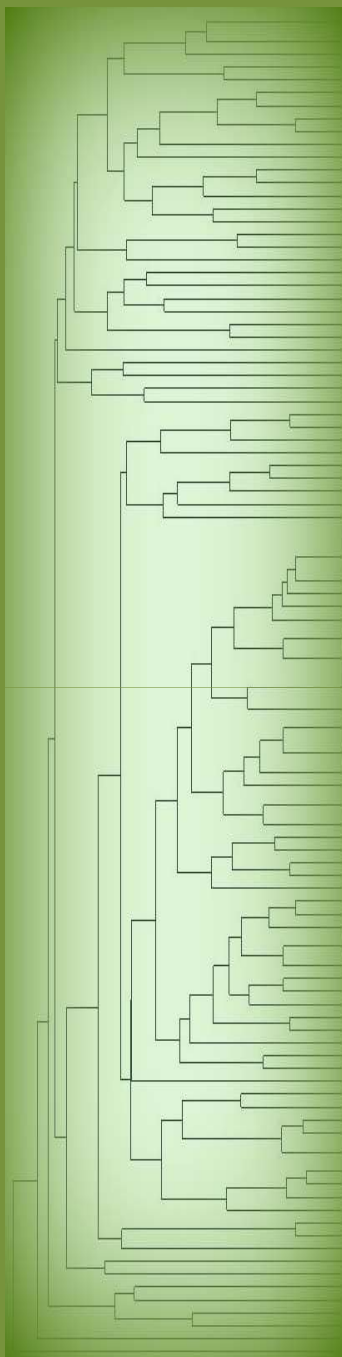
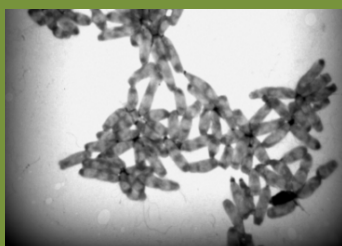


Universidad Nacional de La Plata
Fac. Cs. Exactas – Depto. Cs. Biológicas
Instituto de Biotecnología y Biología Molecular
IBBM - CONICET



Biofertilización con
Bradyrhizobium japonicum
para la agricultura sustentable:
*Aspectos ecofisiológicos
del problema
de la competencia para la
nodulación .*



Tesis Doctoral – 2013

Lic. *Julieta M. Covelli*

Director: *Dr. Aníbal R. Lodeiro*



El presente Trabajo de Tesis
para optar al grado de
Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas
ha sido realizado en el
Instituto de Biotecnología y Biología Molecular
Departamento de Ciencias Biológicas, Fac. de Cs. Exactas
UNLP- CCT- La Plata-CONICET
bajo la dirección del
Profesor Dr. Aníbal Roberto Lodeiro.

A mis padres, *Liliana* y *Miguel*
A mis hermanas, *Daniela* y *M. Eugenia*
A la memoria de mi *abuela*,
mi pilares en la vida.

Mi reconocimiento.

A la Universidad Nacional de Quilmes, por haberme formado a nivel profesional como humano.

A la Universidad Nacional de La Plata, en particular a la Facultad de Ciencias Exactas, por la educación pública y gratuita, que permitió mi formación de postgrado.

A la Universidad Pública de Navarra y al Dr. Cesar Arrese- Igor, por permitirme hacer una estancia en sus instalaciones.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica, CONICET y BARENBRUG Palaversich, por financiar parte de este proyecto y por el otorgamiento de las becas que me permitieron dedicarme en forma exclusiva a este trabajo de Tesis.

Al IBBM, por abrirme las puertas cuando llegue desde la UNQ y por haberme brindado el lugar y todo su equipamiento para desarrollar mi trabajo.

Mis agradecimientos (muchísimos, y necesarios!! sobre todo porque no suelo ser expresativa)

A los R3, simplemente gracias por aceptarme e incluirme desde el primer día que llegue con mi carita de mosqui...Gracias por aguantar a esta pibita del Conu, con sus días buenos y sus días bue...sus días con carelia. Por las bebidas espirituosas y por la buena onda.

A Aníbal, gracias por confiar y darme la oportunidad de empezar lo que tanto quería allá por el 2008, una beca para hacer la Tesis Doctoral. Gracias por ser parte de mi formación, por aconsejarme, acompañarme y por la paciencia (sobretudo esto último, en los últimos tiempos). Por tu dedicación, esfuerzo, generosidad y por haber formado este grupo, que pese a las diferencias tenemos nuestro propio equilibrio y del cual me siento orgullosa de ser parte.

A Pity, gracias por ayudarme en mis primeros pasos con Brady, por haberme brindado tu apoyo desde el principio. Por preocuparte y cuidarme (no solo en lo laboral), todavía me acuerdo como me consolaste aquel día del robo, como una madre!!! Gracias. Por dejarme compartir momentos con la hermosa familia que formaste, con Claudio, Clarita y ahora Ramiro.

A JPG o simplemente J, gracias por las enseñanzas, los consejos y por escucharme, tanto sobre temas académicos como de la vida. No creo que tengas idea lo mucho que escucho tus consejos y aunque no siempre te hago caso, los valoro muchisisisismo. Gracias por el aguante, por estar y por ser incondicional. Por pilas, por la onda, por seguir adelante siempre, cueste lo cueste...y báncate esta: sos un ejemplo for my!! Ahhh y por dejarme ser un poquito niñera de Palomita y espero serlo para el prox baby!

A la Peti, gracias por darme un lugar el mesada, por ayudarme en los primeros pasos en la "movilidad", por los charloteos, por los consejos, por aquel Enero, por ser parte de mis días buenos y días malos...por dejarme ser. Por dejarme gastarte con el "TU" novio y el muick entre otras....

A Florcita, gracias por acompañarme en los primeros años. Por prestarme a la Abu, por alimentarme, por los cuarto de Libra, por lo mejores mates que tome en mi vida. Por nuestras peleas y por nuestras reconciliaciones.

A Nato, gracias por sintonizarme la radio cuando empecé en el IBBM, en el laboratorio con Gasparin (todavía me acuerdo, yo te pedí la Mega y vos clavaste Aspen...diossssss) por la ayuda incondicional, por los piropos, por las risas y los chistes compartidos ahhh y por los consejos acerca de las bondades del ejercicio físico. (Este año juro que empiezo!)

A Eli, por las chistes, los consejos, por la música... y por el boliche. Por estar cada vez que pedí un poco de ayuda.

A Gon, aunque no eras un R3 de pura raza jejeje te incluyo acá! Uffff, gracias por compartir consejos, por ponerme los puntos cada vez que los necesite, por estar, por quemarme la cabeza. Por ser confidente, por ser un amigo! Gracias enano!!! (Ahhhh, acá va un 2X1 en onomatopeya para vos y "TU" novia..... muickkkkkk).

A los técnicos de R3: Ceci y Oberto gracias por los aislamientos y el orden. Naza, gracias por la ayuda con los otros aislamientos, por los chistes y por ser otro de la UNQ.

A los nuevos de R3, gracias por aguantarme aunque sea en mis visitas de medico de los últimos tiempos.

A los chicos de RPS, gracias por darme una mano, una cepa o el flujo cada vez que lo necesite. Gracias a los más antiguos, Angie y Mauri, por la buena predisposición cada vez que pedí algo. A los más nuevitos, Ile y Charly gracias por los chistes, por los mates y los comentarios, siempre sobre ciencia eh! A Pirú y José, gracias por los chistes, por los charlas cuasi filosóficas del flujo, por los cantos... por compartir horas, por las sonrisas y las palabras de aliento.

A Flor, por dedicarme un tiempo cada vez que recurrí a vos. Al Negro, por ser mi maestro cuando empecé en la "docencia", por darme una mano desinteresada y por los consejos. A Tony, por preguntarme como estoy cada vez que nos cruzamos, por el lugarcito en la mesada de RPS aquel invierno en donde R3 era Camboya.

A los Virus Verdes, gracias licenciadaaaaa o ADF por compartir salidas, amigos, consejos y parloteos. Gracias por el verano y la hamaca!!! Por tener la oreja predispuesta cada vez que la pedí!!! Gracias bombón.

Al Gabo por aquellas charlas de Enero, por los consejos, darme ánimos y levantármelo. Por entender el cagazo que tenía. Gracias por la Tía Rosi y por Borja. ¿Qué hubiese sido de mí en Madrid?

A Eli la diosa de los VV, gracias por los parloteos de pasillo, las risas y los comentarios.

A la ex VV... a Vero!!! Por abrirme las puertas del IBBM cuando no tenía lugar en la UNQ y dejarme compartir la mesada con Gasparin. Por llevarme a pasear a la semana de empezar. Por guiarme en los primeros pasos del laboratorio y en la Biología Molecular. Por tu interés en mi vida profesional y personal... Gracias por decirme que me presente a la Beca de Lodeiro (aunque yo no tenía idea quien era, ni cuál era su laboratorio).

A los VA, a los nenes Hasse y Pidre...gracias por los fines de semana compartidos, por hacer el esfuerzo y tomar una cervecita en esos días de calor. Por los cantapaper. Por las charlas de pasillo.

A las nenas, Leti y Caro gracias por la dulzura y la buena predisposición que las caracteriza. A Flor y a Emy, por los cruces en los pasillos que no se salvaron de algun charloteo.

A Mandy y Maia, por ser chicas del Conu y sobretodo de la UNQ!!!

Al resto de nenas, que quisieron ir a vivir conmigo, por haber sido parte de mis años en el IBBM.

A los Bordetellos, gracias por dejarme usar los equipos, darme algún mates y por hacerme subir las escaleras en estos últimos años. A Zurita y Maxi, por las charlas cómplices y por aquella clase que dimos de PCR (que par de instructoras Euge jeje!) A Emi, por su dulzura y risas. A mamá Botte, por tu espíritu práctico y solidario. Por el dpto, mi casa!

A los chicos de diagnóstico, por compartir bromuro y lo que necesite. El resto, por ser parte de mi crecimiento. A Sebas (Dibu) y RRRRRafo te llaman de RRRRumania, gracias por el aguante, mates, algún asadito y alguna levantada de ánimo.

A Dani. H. por dedicarme cada vez que necesite cinco minutos... pero cinco minutos a conciencia y dentro de esa agenda, que de solo mirarla me cansa. No sé de donde sacas pilas!

A Rubencito, por levantarme el ánimo cada mañana que me caí de la cama y llegué temprano.

A los técnicos y personal de apoyo del IBBM, Pau y Sil gracias por aguantarme, ayudarme, escucharme, por dejarme jugar con Mile, por Big Mamma, los mates y la buena onda. A Berna y Abel, por aquella cena, donde conocí la cara oculta de Batman y Robín, por los chistes, la buena onda, los piripopin de pasillo... y por arreglar los equipos!

A Gi, por ayudarme con la papeleta de Coni, por la buena onda y los consejos de moda.

A todos los IBBMeños, por haber compartido aunque sea un minuto de pasillo...

Seguro, que me olvido de gente y mucha... pero no sé si quedo claro... ¡NO ME GUSTA ESCRIBIR!!

A mis amigos... ¿por dónde empezar?

Obvio, por vos amiga, mi cómplice, mi prima! Gracias por regalarme dos cosas hermosas, tu amistad y Rochu. Por aguantarme: mis caras, mis contestaciones, mis desapariciones, mi vida entera!...gracias por todos estos años de estar aun sin estar, pero totalmente incondicionales. No te digo el resto, porque ya sabes...Las quiero!!

Mis amigos de la UNQ que hace años que no veo, pero que están firmes como rulo... a Javi, Je y Eze quien sabe por donde andaran... pero cada vez que pueden me mandan un mail recordando viejos tiempos. Gracias por recordarme.

A Caro, mi compañera desde el primer día hasta el último en la UNQ, otra que hace años que no veo, pero que no dudaste de presentarme a mi compañera de aventuras Pamplonicas. Gracias por la confianza eterna, por los Tipitos, los chistes y la onda hippie.

A mis amigas Platense, la mejor adquisición de los últimos tiempos!!! Celes, legalmente de Neco pero para mí, dado tu desempeño con las diagonales son platense de pura cepa jejeje... ¿qué decirte que no sepas? Gracias por escucharme (hasta cantando), devolverme al camino, que hace años que quiero pero no me atrevía, por escucharme, preocuparte, acompañarme en este último momento, por los consejos que no escuche y que nunca me los reprochaste. Por ponerme los puntos cuando lo necesite. Por estar cada vez que te necesito, por hacerme dar cuenta de que el término "amistad" esta desvalorizado en estos tiempos... por nuestras charlas filosóficas, por preocuparte y ocuparte de mi salud, física y emocional (por las caminatas, por cocinarme!!!) Por ser mi amiga, con todo lo

que implica... por presentarme a mis otras amigas platenses. Car e Ivi, gracias por adoptarme desde el primer momento que aparecí con la cara pintarrajeada en Nativo cuak! Por acompañarme, por estar, por incluirme en absolutamente en todo...por los paseos en el gran K, por las tardes de shopping platense, por las cenas, por preocuparse, por los consejos desinteresados... y Car, me demostraste que sos de fierro!! (te hice laburar eh!) Las quiero chiquis!!!... ahhhh y por el grupo de wasap (que todavía no logro dominar) y por el resto de Ladies.

A Ye y Euge, las maaaaais chiquitas, gracias por hacerme reír hasta que me duele la panza, por los helados, por levantarme el ánimo. Gracias por estar y por avisarme que tengo el fcb conectado jejejeje.

A mis amigos Platenses, poquitos pero muy valiosos. A “él Tano”, Echarri o Verón (sé que me vas a odiar por esto jeje) por compartir buena música, cenas y algún vino, por los consejos y las cagadas a pedo. Por las llamadas, por estar y aguantar a esta loquita. Gracias por amenizarme mi adaptación a la vida platense.

A la foca aunque nunca me cebaste mates y nos peleamos por la sandia, gracias por compartir conmigo tus miedos y entender los míos, por darme ánimos cuando lo necesite y por hacerme plantear que quiero en mi vida. Por empujarme a que me la juegue (aunque no salió bien). Gracias por las risas, la guerra de hielo y de las papitas, por dejarme ver tu otro lado, por la ayuda on-line y porque pese a todo la balanza sigue dando a tu favor se te extraña.

A mis amigos del otro lado del mega charco, a Blanquituuuuur, Aran. Gracias por adoptarme, quererme y aguantarme tres meses! Por las salidas, los pintxos, por los amigos de los amigos. Por considerarme una amiga desde el primer día y por cuidarme. Abel, por los mates individuales, por las malas palabras que te pegue y por compartir los buenos y malos momentos. Por las tardes de películas, por las salidas y por recordarme que la vida es para vivirla!! Por estar, ahí, acá y siempre. Al resto de la pandilla, gracias... gracias por hacerme sentir en casa, por el dulce de leche, el asado y las gominolas.. A Jon, por su amistad sincera y por sacarme la ficha desde el primer momento. A Borja, por llevarme a pasear y por dejarme meterme en su familia. A la tía Rosi, por cuidarme y tratarme casi como una hija. A Joha, que más bien sos de este lado del charco, pero lejitos, gracias por compartir los días laboratoriles y por ponerle un poco de onda a la mesada.

Por último y no por eso menos importante, mi familia:

A mis hermanas por aguantarme y quererme así como soy, con toda mi locura. Por ser lo más lindo ypreciado que tengo. A mis padres, por darme la vida y apoyarme en cada una de las decisiones que tome a lo largo de mi vida, por estar y acompañarme en el camino. Por quererme tal cual, por darme absolutamente todo y mucho más. Gracias.

A Gon, el primo genio!! Gracias por estar cada vez que las papas quemaban y que me mandaba alguna cagadita con la pc, a cualquier hora de tus 36hs diarias!!!...no solo por la asistencia telefónica, paso a paso, sino por la asistencia psicológica, con frases “a todo el mundo alguna vez le paso, no sos la única que borra todos sus archivos importantes”...

A Marian y Abel, por su apoyo incondicional... por las horas de madrugada, por los reclamos, por quererme y por idolatrarme. Gracias!

A Tade, el chiquitín (ya no tan chiquitín), por hacerme chiquita de nuevo!!

A mi madrina y padrino, gracias por compartir la vida conmigo, por apoyándome y por escucharme. En particular a Cris, por el Principito y por sembrarme la semillita de la Biología cuando tenía 8 años Los quiero!

Al resto de la familia, por estar siempre al pie del cañón, por aplaudirme de pie cada uno de mis logros, por sacarle el peso y cambiarle el título a mis derrotas por “experiencia”

A todos los que me estoy olvidando, gracias por ser parte de mi vida

ADN	Acido desoxirribonucleico.
ADP	Adenosinadifosfato.
ANOVA	Análisis de varianza.
Ap	Ampicilina.
ARN	Acido ribonucleico.
ARNm	ARN mensajero.
ATP	Adenosinatrifosfato.
B	Azul.
CA	Castelar.
CC	Capacidad de campo.
Ch	Cicloheximida.
Cm	Cloranfenicol.
CU	Concepción del Uruguay.
DCA	Diseño completamente aleatorizado.
DCBA	Diseño en bloques completamente aleatorizado.
dNTPs	Desoxirribonucleótidos.
DO	Densidad óptica.
DSM	Desvío estándar de la media.
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético.
EPS	Exopolisacárido.
FBN	Fijación biológica de nitrógeno.
FIX	Fijación de nitrógeno.
G	Verde.
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
kDa	Kilo Daltons.
Km	Kanamicina sulfato.
KPS	Polisacárido capsular con Kdo.
LPS	Lipopolisacárido.
MCL	Mayoritariamente de crecimiento lento.
MCR	Mayoritariamente de crecimiento rápido.
MPB	Membrana peribacteroidal.
N	Nódulo.
NJ	Nueve de Julio.
pb	Pares de bases.

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PM	Peso molecular.
PSA	Peso seco de la parte aérea.
PSN	Peso seco del nódulo.
S	Suelo.
SA	San Antonio de Areco.
SBL	Lectina de soja.
Sm	Estreptomicina.
Sp	Espectinomicina.
TBE	Tris-borato-EDTA.
TE	Tris-EDTA.
TFA	Acido trifluoroacético.
VT	Venado Tuerto.
Y	Amarillo.
χ^2	Chi cuadrado.

**CAPITULO I
INTRODUCCIÓN.**

I.1. SOJA: AYER Y HOY EN LA ECONOMÍA ARGENTINA.	2
I.1.1. REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES DE LA SOJA.	5
I.2. EL NITRÓGENO Y LA SIMBIOSIS.	6
I.2.1. EL CICLO DEL NITRÓGENO.	6
I.2.2. FIJACIÓN BIOLÓGICA DE N ₂ (FBN).	7
I.2.2.1. <i>La FBN y la nitrogenasa.</i>	8
I.3. LEGUMINOSAS Y RIZOBIOS: UNA CONVIVENCIA DE DOS LINAJES.	9
I.3.1. LOS RIZOBIOS.	9
I.3.2. BACTERIAS QUE NODULAN SOJA.	11
I.3.3. SIMBIOSIS.	11
I.3.3.1. <i>Adhesión a la superficie radical y colonización.</i>	13
I.3.3.2. <i>El diálogo molecular: reconocimiento simbiótico.</i>	14
I.3.3.3. <i>La invasión de la raíz.</i>	16
I.3.3. ORGANOGÉNESIS E INVASIÓN DEL NÓDULO.	19
I.3.4. DIFERENCIACIÓN DE LAS BACTERIAS A BACTEROIDES Y FBN.	20
I.3.5. MEDICIÓN DE LA FBN.	21
I.3.5.1. <i>Cuantificación de la actividad nitrogenasa.</i>	22
I.3.5.2. <i>Cuantificación del rendimiento.</i>	24
I.3.5.3. <i>Cuantificación del N incorporado.</i>	24
I.4. BIOFERTILIZACIÓN Y AGRICULTURA SUSTENTABLE.	26
I.4.1. LOS INOCULANTES.	26
I.4.1.1 Características relevantes de los inoculantes.	27
I.4.1.2. Métodos de biofertilización.	29
I.4.2. SITUACIÓN DE LOS INOCULANTES EN ARGENTINA.	31
I.4.2.1. <i>Reglamentación de los inoculantes.</i>	31
I.4.2.2. Cepas de rizobios utilizadas en los inoculantes.	31
I.4.2.3. <i>Efectos de la inoculación.</i>	32
I.5. LA COMPETICIÓN PARA LA NODULACIÓN.	34
I.5.1. LOS SUELOS, SU DINÁMICA Y SU BIODIVERSIDAD.	35
I.5.2. LOS INOCULANTES Y LA POSICIÓN DE LOS (BRADI)RIZOBIOS EN EL SUELO.	37

I.5.3. LA INOCULACIÓN EN EL SURCO DE SIEMBRA Y EL MEJORAMIENTO DE LA MOVILIDAD DE <i>B. JAPONICUM</i> PUEDEN INCREMENTAR EL RENDIMIENTO DEL CULTIVO DE SOJA. _____	41
I.6. <i>B. JAPONICUM</i> USDA 110 Y SUS FLAGELOS. _____	42
I.7. MOVILIDAD DEPENDIENTE DE FLAGELOS. _____	44
I.7.1. DESPLAZAMIENTOS EN MEDIOS LÍQUIDOS: NATACIÓN. _____	45
I.7.2. DESPLAZAMIENTOS EN MEDIOS SEMISÓLIDOS: SWARMING. _____	46
I.7.2.1. <i>Visualización del swarming en el laboratorio.</i> _____	47
I.7.2.2. <i>Caracteres morfológicos del swarming.</i> _____	48
I.7.2.3. <i>Fenotipo macroscópico asociado al swarming.</i> _____	50
I.7.2.4. <i>El rol de la quimiotaxis.</i> _____	50
I.7.3. SWARMING EN RIZOBIOS. _____	50
I.8. RESUMEN. _____	51
I.9. OBJETIVOS GENERALES. _____	52

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS.

II.1. MATERIAL BIOLÓGICO UTILIZADO. _____	54
II.1.1. CEPAS BACTERIANAS. _____	54
II.1.2. PLANTAS. _____	54
II.2. MEDIOS DE CULTIVOS PARA (BRADI)RIZOBIOS Y PLANTAS. _____	54
II.2.1. MEDIOS DE CULTIVO Y DE CONSERVACIÓN DE (BRADI)RIZOBIOS. ____	54
II.2.1.1. <i>Medios de mantenimiento y conservación de (bradi)rizobios.</i> _____	54
II.2.1.2. MEDIOS DE CULTIVO DE RIZOBIOS. _____	54
II.2.1.3. <i>Antibióticos.</i> _____	57
II.2.2. SOLUCIONES PARA EL CULTIVO HIDROPÓNICO DE PLANTAS. _____	57
II.3. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS. _____	57
II.3.1. CULTIVOS BACTERIANOS Y PREPARACIÓN DE LOS INÓCULOS. _____	57
II.3.2. ESTIMACIÓN DE LA BIOMASA Y RECUENTO DE CÉLULAS VIABLES. ____	58
II.4. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR. _____	58
II.4.1. OBTENCIÓN DE ADN. _____	58
II.4.1.1. <i>Obtención de ADN total mediante resinas.</i> _____	58
II.4.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR). _____	58

II.4.3. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA. _____	58
II.4.3.1. <i>Revelado de los geles y fotografía.</i> _____	59
II.5. MICROSCOPIA. _____	59
II.5.1. ÓPTICA. _____	59
II.5.2. ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (MET). _____	59
II.6. ENSAYOS BIOLÓGICOS. _____	60
II.6.1. ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS. _____	60
II.6.1.1. <i>Caracterización fenotípica de aislamientos de (bradi)rizobios noduladores de soja.</i> _____	60
II.6.1.2. <i>Caracterización molecular de los aislamientos de (bradi)rizobios noduladores de soja.</i> _____	60
II.6.1.3. <i>Ensayos de movilidad.</i> _____	61
II.6.2. ENSAYOS CON PLANTAS. _____	63
II.6.2.1. <i>Esterilización superficial y germinación de semillas de soja.</i> _____	63
II.6.2.2. <i>Ensayos de competición para la nodulación.</i> _____	63
II.6.2.3. <i>Ensayos de fijación de N₂.</i> _____	63
II.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS Y BIOINFORMÁTICOS. _____	64
II.7.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS. _____	64
II.7.2. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS _____	64

CAPITULO III
CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA
DE (BRADI)RIZOBIOS ALÓCTONOS AISLADOS DE SUELOS CON
HISTORIAL DE CULTIVO DE SOJA.

III.1. OBTENCIÓN DE LA COLECCIÓN DE (BRADI)RIZOBIOS ALÓCTONOS. _____	66
III.2. ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENOTÍPICA. _____	69
III.2.1. TIPIFICACIÓN GENOTÍPICA. _____	69
III.2.2. ANÁLISIS DEL CLADOGRAMA. _____	71
III.3. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA. _____	75
III.3.1. CAPACIDAD DE CRECIMIENTO DE LAS COLONIAS A DISTINTAS TEMPERATURAS. _____	75
III.3.2. EVALUACIÓN DE LA COLORACIÓN DE LAS COLONIAS EN YEM-AGAR CON ROJO CONGO. _____	75
III.3.3. EVALUACIÓN DE LA MODIFICACIÓN DEL PH DEL MEDIO Y LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO. _____	76

III.3.4. ELECCIÓN DE CEPAS PARA CONTINUAR EL ESTUDIO.	77
III.4. EVALUACIÓN DE LA TOLERANCIA A LA ACIDEZ.	77
III.5. EVALUACIÓN DE LA TOLERANCIA AL GLIFOSATO.	80
III.6. RESUMEN Y DISCUSIÓN.	81

CAPITULO IV
CARACTERIZACIÓN SIMBIÓTICA DE CEPAS ALÓCTONAS
AISLADAS DE
SUELOS CON HISTORIAL DE CULTIVO DE SOJA.

IV.1. DISEÑO DEL ENSAYO DE FIJACIÓN DE FBN.	86
IV.2. ANÁLISIS DE PARÁMETROS NODULARES	88
IV.3. ESTIMACIÓN DE LA ACTIVIDAD NODULAR	90
IV.3.1. ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN DE UREIDOS EN HOJAS.	90
IV.3.2. ANÁLISIS DEL PESO SECO DE LA PARTE AÉREA.	90
IV.4. CORRELACIÓN ENTRE DISTINTOS PARÁMETROS.	92
IV.5. COMPETITIVIDAD PARA LA NODULACIÓN.	93
IV.6. RESUMEN Y DISCUSIÓN.	94

CAPITULO V
CARACTERIZACIÓN DEL SWARMINGEN
BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM
USDA 110.

V.1. POSIBLES FENOTIPOS DEL SWARMING.	99
V.2. OBTENCIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA EVIDENCIAR EL <i>SWARMING</i> EN CEPAS DERIVADAS DE <i>B. JAPONICUM</i> USDA 110.	100
V.2.1. OBTENCIÓN DE GRADIENTES EN PLACAS DE PETRI.	102
V.2.2 OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE LOS RIZOBIOS TOMADOS DE COLONIAS DE SWARMING.	104
V.3. ¿GRADIENTE O DEFICIENCIA NUTRICIONAL?	106
V.4. RELACIÓN ENTRE EL SWARMING, LA EXPRESIÓN DE FLAGELOS Y LAS FUENTES DE C.	106
V.4.1. <i>SWARMING</i> EN LAS DISTINTAS FUENTES DE C.	107
V.4.2. TIEMPO DE FORMACIÓN DE COLONIAS DE <i>SWARMING</i> .	107
V.4.3. MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA.	108

V.4.4. MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA. _____	108
V.5. RESUMEN Y DISCUSIÓN. _____	110

CAPITULO VI
ROL DE LOS FLAGELOS EN EL *SWARMING*.

VI.1. EL MOVIMIENTO SOCIAL OBSERVADO EN EL CAPÍTULO ANTERIOR REQUIERE LOS FLAGELOS. _____	115
VI.2. LOS MUTANTES QUE SOLO EXPRESAN EL FLAGELO SUBPOLAR (Δ LAF12) ESTÁN SEVERAMENTE AFECTADOS EN EL <i>SWARMING</i> . _____	116
VI.3. LOS MUTANTES QUE SOLO EXPRESAN EL FLAGELO LATERAL (Δ FLIC1234) ESTÁN MENOS AFECTADOS EN EL <i>SWARMING</i> . _____	117
VI.4. RESUMEN Y DISCUSIÓN. _____	118

CAPITULO VII
MOVILIDAD DE
***B. JAPONICUM* EN EL SUELO.**

V.II.1. EVALUACIÓN DEL <i>SWARMING</i> EN SUELOS HIDRATADOS A DISTINTOS PORCENTAJES DE SU CAPACIDAD DE CAMPO. _____	123
VII.2. RESUMEN Y DISCUSIÓN. _____	126

CAPITULO VIII
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

CONCLUSIONES y PERSPECTIVAS _____	128
-----------------------------------	-----

CAPITULO VII
APENDICE.

APENDICE A _____	136
APENDICE B _____	137
APENDICE C _____	140

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

BIBLIOGRAFIA _____	142
--------------------	-----

INDICE DE TABLAS.

Tabla II.1. Aislamientos de rizobios utilizados. _____	55
Tabla II.2. Cepas de rizobios utilizados. _____	56
Tabla II.3. Ciclados utilizados en PCR _____	59
Tabla III.1 Principales características de los suelos de donde se obtuvieron los aislamientos de rizobios noduladores de soja. _____	68
Tabla III.2. Caracterización fenotípica y crecimiento a 37 °C de los aislamientos _____	76
Tabla III.3. Crecimiento en YEM-agar al pH indicado, en presencia o ausencia de AlCl ₃ (50 mM) de las cepas representativas de cada clado y de E109. _____	80
Tabla IV.1. Cepas utilizadas para los ensayos simbióticos y de competición para la nodulación, y sus características relevantes _____	87
Tabla IV.2. Análisis de varianza según un DBCA de los datos de peso seco de la parte aérea de las plantas inoculadas _____	87
Tabla IV.3. Competición para la nodulación de cada una de las 10 cepas seleccionadas frente a <i>B. japonicum</i> LP 3018. _____	94
Tabla V.1. Modificación del medio de cultivo YEM agar evaluados para swarming. _____	100
Tabla V.2. Velocidad de expansión de las colonias de swarming en <i>B. japonicum</i> _____	108
Tabla VI.1. Cepas utilizadas y sus características con respecto a la expresión de flagelos y natación. _____	115

INDICE DE FIGURAS

Figura I.1. Esquema de la evolución de superficies sembradas con soja en Argentina desde 2000/2001 hasta la proyección de la cosecha 2012/2013. _____	2
Figura I.2. Producción argentina de granos de soja desde 1970- 2006, en toneladas. _____	2
Figura I.3. Mapa de las principales provincias donde se cosecha soja (2003-2004) _____	4
Figura I. 4. Representación esquemática del flujo de nitrógeno a través del medio ambiente. _____	6
Figura I. 5. Esquema del proceso de infección y formación del nódulo. _____	12
Figura I.6. Estructura del factor Nod sintetizado por <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110. _	15
Figura I.7 Representación esquemática del mapa de las zonas radicales. _____	17

Figura I.8 Representación esquemática de raíces de soja antes y después de la inoculación con rizobios compatibles. _____	17
Figura I.9. Representación esquemática del desarrollo y arquitectura general de un nódulo determinado e indeterminado. _____	20
Figura I.10. Representación esquemática de los factores involucrados y que influyen en la competición para la nodulación. _____	33
Figura I. 11. Evaluación de la influencia del estado nutricional y la posición de los rizobios en la competición para la nodulación. _____	39
Figura I.12. Esquema de la estructura general de un flagelo de bacterias Gram- negativa. _	42
Figura I. 13. Morfología del flagelo de <i>B. japonicum</i> . _____	43
Figura I.14. Representación de los tipos de movimientos realizados por la bacterias mediante la utilización de flagelos (<i>swarming</i> y natación) o pili IV (<i>twitching</i>) _____	46
Figura I.15. Distribución filogenética del <i>swarming</i> en bacterias _____	47
Figura I.16. Representación esquemática de las diferencias en la expresión de flagelos entre natación y <i>swarming</i> en especies con flagelación simple y mixta . _____	49
Figura I. 17. Diferentes fenotipos macroscópicos de <i>swarming</i> . _____	51
Figura II.1. Protocolo para la formación de gradientes de la fuente de carbono en placas de Petri. _____	61
Figura II.2. Esquema general para los ensayos de <i>swarming</i> _____	61
Figura II.3. Esquema general para los ensayos de movilidad con suelo _____	62
Figura III.1. Mapa de la distribución geográfica de los sitios de muestreo de donde se obtuvo la colección de (bradi)rizobios autóctonos noduladores de soja. _____	67
Figura III.2. Perfil de bandas representativo de aislamientos provenientes de Castelar, obtenido con los cebadores Box A1R _____	70
Figura III.3. Evaluación del los porcentajes de tolerancia en el software GelCompar II 4.0. _____	71
Figura III.4. Cladograma de la colección de (bradi)rizobios _____	72
Figura III.5. Histograma de la distribución de los aislamientos entre los clados según su sitio de origen _____	74
Figura III.6. Relación de la distribución de los aislamientos en clados con el nivel de acidez de los suelos de donde se los obtuvieron. _____	78
Figura III.7. Tolerancia a glifosato. _____	81
Figura IV.1. Peso seco de los nódulos por planta _____	89
Figura IV.2. Número de nódulos por planta _____	89

Figura IV.3. Concentración de ureidos en hoja _____	91
Figura IV.4. Peso seco de la parte aérea _____	91
Figura IV.5. Correlaciones entre los distintos parámetros simbióticos. _____	93
Figura IV.6. Fotos representativas de la parte aérea, raíces y nódulos _____	96
Figura V.1. Fenotipo macroscópico de <i>swarming</i> en <i>R. etli</i> CNPAF512. _____	101
Figura V.2. Visualización de los gradientes mediante el empleo de rojo congo en placas de Petri _____	102
Figura V.3. Fenotipo macroscópico de <i>swarming</i> en LP 3008 utilizando placas de Petri con medio Götz con gradiente de manitol como única fuente de C. _____	103
Figura V.4. Fenotipo macro y microscópico (MET) de colonias de LP 3008 en placas de Petri realizando <i>swarming</i> . _____	105
Figura V.5. <i>Swarming</i> de LP 3004 y LP 3008 en placas de Petri con medio de Götz con gradiente en la fuente de C. _____	109
Figura VI.1. Rol de los flagelos en el <i>swarming</i> en relación con la fuente de C: L-arabinosa o extracto de levadura con las mutantes LP 6543 y LP 6544. _____	116
Figura VI.2. Rol de los flagelos en el <i>swarming</i> en relación con la fuente de C: L-arabinosa o extracto de levadura con las mutantes LP 6865 y LP 6866, _____	117
Figura VI.3. Rol de los flagelos en el <i>swarming</i> con relación a la fuente de C: L-arabinosa o extracto de levadura con las mutantes LP 5843 y 5844 _____	118
Figura VII.1. Ensayo de movilidad de <i>B. japonicum</i> en tierra. _____	125

CAPITULO

I

Introducción.

I.1. Soja: ayer y hoy en la economía argentina.

En los últimos 40 años la soja se ha convertido en el mayor protagonista de la economía argentina. Diversos factores han intervenido para que la soja se incorpore en nuestros campos y se posicione como el mayor producto agropecuario de exportación (Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca www.site/agricultura/index.php). Es sorprendente que desde los '70, década en la cual comenzó tímidamente su cultivo masivo, también se haya expandido continuamente su superficie cultivada a la par del aumento de la demanda mundial y de los precios. Es decir, el cultivo de soja creció año a año desde 1970, en donde cada nueva cosecha siempre tuvo compradores dispuestos a adquirir la totalidad de la producción y a un precio siempre en alza. Si comparamos la evolución de la soja desde sus primeras 37.700 ha a las 18.850.000 ha sembradas en la campaña 2011/2012 (Figs. I.1 y I.2.), observamos que la superficie sembrada con este cultivo aumentó unas 500 veces en 40 años. Si bien es cierto que a nivel mundial el denominado mercado de la soja es operado por una gran cantidad de países, solo algunos tienen un rol protagónico y determinante a la hora de fijar la oferta y la demanda. Del lado de la demanda, los mayores compradores son la Unión Europea y el sudeste asiático (en particular China y Japón). Por el lado de la oferta, Argentina se encuentra, junto a Brasil y Estados Unidos, como una de las tres potencias exportadoras del cultivo, que en conjunto aportan más del 80% de la producción mundial (Schvarzer & Tivosnanska 2007). Esto implica que estos tres países tienen el poder de determinar el precio de los granos de este cultivo. Si tenemos en cuenta que en el 2003 el 45 % de la exportación agrícola se correspondía a la cosecha de soja, es entendible que se califique a la Argentina como un país sojero. Sin embargo, para poder entender qué significa el fenómeno de la sojización en nuestro país, es necesario hacer una pequeña revisión de algunos de los factores que hicieron que la soja tenga un rol tan importante en nuestra economía.

Como mencionamos al comienzo, recién hacia 1970 este cultivo comenzó a proyectarse como una opción interesante en nuestra agricultura. Esto en parte se debe a sus orígenes. La soja es una especie de la familia de las leguminosas, Fabaceae, originaria del Este de Asia, especialmente China, y en particular las especies más importantes son *Glycine soja* y *Glycine max*, siendo ésta la especie cultivada. Su mayor particularidad radica en que los granos de esta leguminosa presentan altos contenidos de proteínas y aceite, por ello también pertenece al grupo de las oleoginosas. En nuestro país es conocida desde 1862, pero recién en 1909 se iniciaron los primeros cultivos en la Estación Experimental

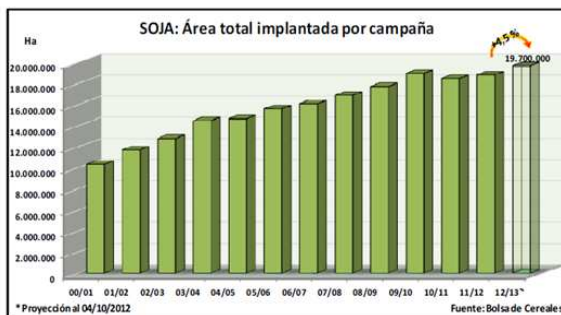


Figura I.1. Esquema de la evolución de superficies sembradas con soja en Argentina desde 2000/2001 hasta la proyección de la cosecha 2012/2013.
Fuente: Bolsa de cereales. (www.bolcereales.com.ar)

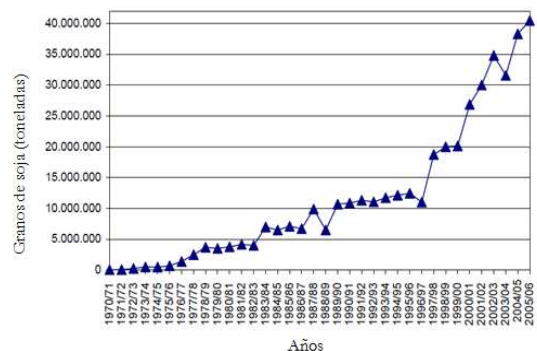


Figura I.2. Producción argentina de granos de soja desde 1970- 2006, en toneladas.
Fuente: Base de datos de MLAGyP (www.site/agricultura/index.php)

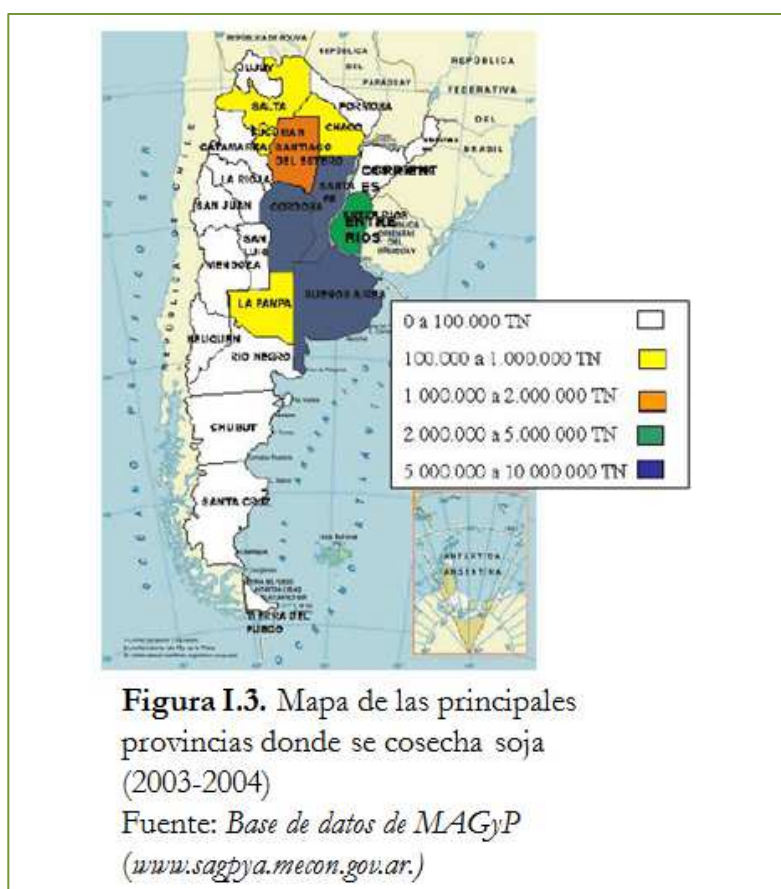
Agronómica de Córdoba, en donde se evaluó su posible utilización como forrajera y la factibilidad técnica y económica de su cultivo. Estas prácticas experimentales siguieron su cauce lentamente y en 1924, el Ministerio de Agricultura introdujo nuevas variedades de semillas, las cuales fueron difundidas en distintas regiones para evaluar su adaptación a diversas zonas del país, siendo este el primer impulso para su difusión. No obstante, recién en 1940 comienza el registro estadístico de la cantidad de hectáreas ocupadas por la leguminosa, no superando las 1.000 ha. A su vez, algunos productores privados comienzan a evaluarla como posible opción para la industria aceitera, ya que sus semillas contienen un 18 % de aceite. Sin embargo, las condiciones climáticas, las variedades de semillas utilizadas, el desconocimiento sobre el manejo del cultivo, la baja demanda externa y el apoyo a otros cultivos de leguminosas, fueron algunas de las variables que hicieron que el cultivo de soja permaneciera casi ignorado hasta mediados de la década del '50. Hasta ese entonces, la soja era vista como una especie de leguminosa exótica y su cultivo era tomado como una especie de abono verde, lo que la convertía en un cultivo marginal.

A partir de 1960, la soja comienza su etapa como grano de exportación y, ya en la década del '70, factores externos e internos terminan de definir el rumbo de la soja en nuestro país. Por un lado, luego de la Segunda Guerra Mundial el mercado europeo comienza a demandar una mayor producción de suplementos alimentarios para la producción ganadera. Por otro lado, se registra en esa época una fuerte caída de la oferta de harina de pescado, que hasta entonces era utilizada como fuente de proteínas por la industria de los alimentos balanceados. Estos dos factores condicionan el aumento de la demanda de los granos de soja como fuente proteica en la industria ganadera. Además, su creciente precio en alza y su fuerte demanda estimularon a algunos productores a volcarse al cultivo de soja. Por último, en 1973 se produce una caída de la exportación de soja desde Estados Unidos, lo cual da la oportunidad a Argentina y Brasil para insertarse en el mercado mundial como grandes productores de soja. A partir de allí, la región pampeana comienza a expandirse como productora de soja, desplazando los cultivos de girasol y luego la producción ganadera, de la mano de los precios internacionales siempre en alza.

El verdadero auge de la soja comienza en la década de los '90, cuando los cultivos de esa leguminosa para ese entonces ya ocupan la misma superficie que el total de los cereales. Dos factores internos terminan de determinar el salto de Argentina como potencia mundial. Por un lado, la estimulación de los productores mediante políticas de apoyo a la soja y por otro lado, un fuerte cambio a nivel técnico, caracterizado por la introducción de distintas variedades de semillas transgénicas resistentes a glifosato, pertenecientes a diversos grupos de madurez. Este cambio permitió la adopción de la siembra directa y la extensión del cultivo desde la región pampeana hacia diversas zonas incluyendo el NEA y el NOA. Además, impulsó el desarrollo de nuevas maquinarias para la siembra directa, que a su vez contribuyeron a una mayor reducción de costos. Así, la rápida expansión territorial y el aumento de la productividad son los dos factores clave que explican el crecimiento exponencial de la producción de soja en nuestro país. De esta forma, Argentina logró convertirse en el tercer productor mundial de grano de soja, el primer exportador mundial de aceite de soja y el segundo de harina de soja, generando una gran incidencia en el producto bruto agropecuario y por ende impactando significativamente en la generación de divisas.

Actualmente el cultivo de soja se centra en la región pampeana, sobre todo en las provincias de Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe, y luego se expande con una menor producción a las regiones del NOA y NEA, en donde las provincias que más aportan son Entre Ríos, Santiago del Estero, Chaco, Salta y Tucumán. (Fig. I.3.)

Aunque el rol de la soja como generadora de divisas en nuestro país parece ser indiscutible, este aumento en la producción, y en la expansión territorial del cultivo, también traen aparejada una serie de efectos negativos, entre los cuales el régimen de producción con arrendamiento de la tierra favorece la tendencia a la práctica del monocultivo (Martínez et al. 2002). Como mencionamos, la introducción de nuevas tecnologías como la siembra directa y la utilización de semillas transgénicas, indirectamente favorecieron el desplazamiento de otros cultivos o de la actividad ganadera por parte de la soja. Cabe mencionar que actualmente Argentina es el único país que utiliza casi en su totalidad semillas transgénicas (Schvarzer & Tavosnanska 2007), por lo que el herbicida glifosato es de uso rutinario y extendido a la casi totalidad de la zona de cultivo de soja (Teubal 2007). Si bien este herbicida es considerado como de baja toxicidad y se cree que afecta solamente a las plantas, se han reportado efectos adversos en animales (Benachour & Séralini 2009, Paganelli et al. 2010) y en los casos donde se ha utilizado en exceso cerca de centros urbanos se han registrado varios problemas sanitarios (Cámara Civil y Comercial de Santa Fe, Sala 2ª, (2009). Al presente no existe un conocimiento amplio acerca de cómo este herbicida puede afectar a los microorganismos del suelo y cómo estos efectos pueden impactar en el agroecosistema.



A nivel general, podemos mencionar que uno de los problemas de la tendencia al monocultivo a nivel económico es que la condición del mercado que favoreció y sigue favoreciendo la expansión de la soja puede verse modificada a corto o mediano plazo, como sucedió en su momento con la producción de otros cultivos, cuyo valor o interés en el mercado mundial de repente cae o es suplantado. Pero más allá de su vulnerabilidad económica, el problema del monocultivo impacta a un nivel más profundo y complejo sobre el incremento de las enfermedades y plagas, como así también sobre la pérdida de sustentabilidad de los suelos, favoreciendo su compactación, desbalance nutricional, pérdida de materia orgánica, acidificación y alteraciones en su macro y microbiota. En este punto cabe destacar que Argentina casi no comercializa la soja en su mercado interno, por lo que la exportación de la cosecha de cada hectárea sembrada se traduce en una continua extracción y exportación de nutrientes, que va depletando la fertilidad de nuestros suelos. Esto podría resolverse mediante la rotación de cultivos y/o mediante la utilización de fertilizantes.

I.1.1. Requerimientos nutricionales de la soja.

Las distintas variedades de semillas de soja hoy en día difieren de las primeras utilizadas en el siglo pasado, permitiendo disponer de distintos grupos de madurez y tolerancia a glifosato. Además, esta leguminosa acumula una alta concentración de proteínas en la semilla, y por ello es tan atractiva para su utilización en la alimentación del ganado. Sin embargo, ese alto contenido de proteínas viene acompañado de una alta demanda de nitrógeno (N). Es por ello que el N es el nutriente más crítico para el cultivo, pudiendo estimarse que se requieren 80 kg de N para producir un tonelada de soja (González 2007). Si a ese valor lo correlacionamos con la estimación de que una hectárea de soja produce aproximadamente 3.000 kg de grano (González 2007), nos da que la demanda de N de este cultivo ronda los 240 kg/ha. La proyección de la campaña sojera 2012/2013 estima que en nuestro país se cosecharán unas 19.700.000 ha de soja (Informe Pre-Campaña 2012/2013, Bolsa de Cereales, <http://www.bolcereales.com.ar/>), que implicarían una demanda de 4.728.000 toneladas de N. Si este requerimiento nutricional por parte de la soja fuera satisfecho solamente con N del suelo, la reposición de todo ese N tendría un costo extremadamente alto, no solamente en divisas, sino fundamentalmente en términos de contaminación ambiental. Si por el contrario, este elemento no fuera repuesto de manera eficiente, año a año la fertilidad del suelo decaería, disminuyendo así su productividad. Por lo tanto, el cultivo de soja puede resultar en un expoliador de la fertilidad. Una manera de revertir dicha situación es con la utilización de fertilizantes. La fertilización se puede llevar a cabo mediante la utilización de los denominados fertilizantes químicos, sin embargo estas sustancias presentan una contraparte negativa. La producción de fertilizantes químicos requiere el consumo de una gran cantidad de combustible fósil y produce emisiones de CO₂ y NO₂ que favorecen el efecto invernadero. Además, la utilización rutinaria de los fertilizantes químicos produce alteraciones de la materia orgánica, desbalances nutricionales y frecuentemente la acidificación de los suelos, favoreciendo la liberación de iones como aluminio, que resultan fitotóxicos cuando están presentes en altas concentraciones (Bohn et al. 2001). Como opción a la fertilización química, se puede utilizar una característica biológica presente en las leguminosas. Estas plantas pueden asociarse de manera simbiótica con bacterias denominadas en su conjunto rizobios, las cuales pueden tomar el dinitrógeno (N₂) del aire y reducirlo a amoníaco (NH₃) que luego es incorporado en moléculas de aminoácidos o ureidos, asimilables por la leguminosa. De esta manera la leguminosa aporta un medio favorable y fuentes de energía para el rizobio y éste a cambio suministra los requerimientos de N de la planta. La

inoculación de los rizobios a las leguminosas para su empleo como fuente indirecta de fertilización nitrogenada es la denominada biofertilización. El insumo clave de la biofertilización es el inoculante preparado con cepas seleccionadas de rizobios, siendo uno de los productos biotecnológicos en los cuales se viene trabajando desde hace años para optimizar su performance en los diversos cultivos.

I.2. El nitrógeno y la simbiosis.

I.2.1. El ciclo del nitrógeno.

Uno de los componentes clave en el desarrollo y crecimiento de todos los organismos es el N. Este elemento forma parte de biomoléculas como proteínas, ácidos nucleicos y vitaminas, esenciales para el desarrollo de la vida. El mayor reservorio de N se encuentra en la atmósfera en forma de N_2 , constituyendo un 79 % de su composición gaseosa. Sin embargo, el N_2 es inerte desde el punto de vista químico y la mayoría de los organismos multicelulares son incapaces de acceder a él de forma directa para utilizarlo en sus procesos metabólicos.

El ciclo del N hace referencia a dos grandes procesos que permiten el reciclaje constante del N en la Tierra (Fig. I.4). Estos procesos son: la fijación de N_2 atmosférico, que permite incorporar este elemento a la biósfera para su utilización por los organismos vivos, y la desnitrificación, que permite devolver el N a la atmósfera. A su vez, la fijación de N_2 comprende la conversión del mismo a formas reducidas del N, principalmente a NH_3 , su oxidación, principalmente a nitratos (NO_3^-), y la asimilación de ambos compuestos por los organismos vivos. Las formas oxidadas del N, NO_3^- o nitritos (NO_2^-), son las más utilizadas por los vegetales para incorporar este elemento. En cambio, la desnitrificación solo hace referencia al pasaje de las formas oxidadas del nitrógeno, como NO_2^- a N_2 gaseoso, que es nuevamente devuelto a la atmósfera. La primera etapa del ciclo y la más interesante desde el punto de vista de la incorporación de N a los organismos para el desarrollo de la vida, es la de la fijación de N_2 . Este proceso puede ser llevado a cabo de tres maneras independientes:

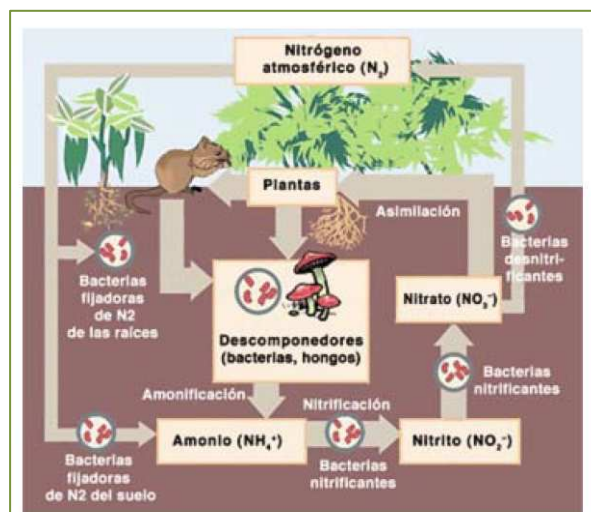


Figura I. 4. Representación esquemática del flujo de N a través del medio ambiente. La importancia de las bacterias en el ciclo del N es inmediatamente reconocida como un elemento clave en estos procesos, produciendo diferentes formas de compuestos de nitrógeno asimilables por los organismos superiores.

- Combustión o también denominada fijación espontánea: es la que ocurre mediante la actividad natural de descargas eléctricas sobre el N_2 de la atmósfera. Sin embargo, esta reacción es muy lenta y dificultosa. Por este medio se logra fijar aproximadamente unos 30 millones de toneladas de N por año (Socolow 1999).
- Fijación industrial: es la asociada al proceso incorporado en el siglo XX, por Haber – Bosch en el cual se acelera la fijación espontánea de N_2 mediante el uso de altas temperaturas (400 – 500 °C) y presiones (150 – 300 atmósferas). Este proceso es utilizado para obtener amoníaco en formas industriales, y también para la producción de fertilizantes nitrogenados. Por este medio se logra incorporar aproximadamente 95 millones de toneladas de N al año. Este proceso, si bien es el más eficiente y el más utilizado, tiene su contracara, por un lado asociada a un alto gasto de consumo de combustible fósil y polución atmosférica, y por otro lado a la contaminación ambiental asociada a la utilización de los fertilizantes químicos en sí, los cuales como ya mencionamos generan la polución del agua debido a la eutrofización de la desembocadura de cursos de agua que recogen los excesos de NO_3^- provenientes de los campos.
- Fijación biológica de N_2 (FBN): es la asociada a la capacidad metabólica de algunos procariontes, denominados diazótrofos, que logran fijar N_2 mediante su reducción a NH_3 , a costas de la utilización de adenina trifosfato (ATP). La FBN aporta aproximadamente 45 millones de toneladas anuales de N. Si bien esta forma de fijar N_2 es menos eficiente con respecto a la industrial, no genera contaminación, por lo tanto los microorganismos asociados a la FBN cumplen un rol fundamental en el reciclado y el mantenimiento de niveles constantes de N en el suelo. De forma análoga, la FBN es un factor importante desde el punto de vista de la conservación de los suelos y de la productividad agropecuaria (Peoples & Craswell 1992).

I.2.2.Fijación biológica de N_2 (FBN).

Hace unos 3.700 millones de años, a partir del enfriamiento de la corteza de la Tierra primitiva, comienza el ensamblaje de las primeras formas de vida. Este periodo es el denominado Eon Arqueano, también conocido como la edad de la anaerobiosis, dado que todos los procesos que ocurrieron se llevaron a cabo dentro de una atmósfera libre de oxígeno (O_2) (Awramik et al. 1983). Probablemente en esa misma época ocurrieron los primeros procesos metabólicos como la fotosíntesis anaeróbica, la fijación de dióxido de carbono (CO_2) y la fijación de N_2 , como así también la aparición de las primeras biomoléculas, como los ácidos nucleicos y las proteínas. Podemos entender así que la FBN o diazotrofia es un proceso muy antiguo y esencial para la vida. Actualmente este proceso es exclusivo de los procariontes. La diazotrofia está ampliamente distribuida entre los procariontes, encontrándose en diversos grupos parafiléticos, como en diferentes estilos de vida y metabolismos que incluyen: aerobios, anaerobios, autótrofos, heterótrofos, en vida libre y en simbiosis (Raymond et al. 2001). La FBN es realizada por miembros de los dominios Arquea y Bacteria. En Arquea la FBN solo ocurre en el reino Euryarchaeota, en sus divisiones Methanosarcinales, Methanobacteriales, Halobacteriales y Methanococcales. En cambio, en Bacteria ocurre en seis de los más de 50 *phyla* descriptos hasta el momento (Lloret & Martínez-Romero 2005). Entre ellos se encuentran las bacterias verdes del azufre, las cianobacterias, las Gram-positivas de alto y bajo contenido G+C, las Spirochaetes, los Firmicutes y las Proteobacteria, siendo esta última la división bacteriana la más abundante y

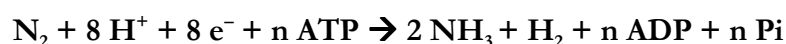
a la cual pertenecen los rizobios. Como mencionamos más arriba, dependiendo de la forma en que llevan a cabo la FBN, podemos distinguir a los diazotrófos en dos grupos:

- FBN en vida libre: como lo indica su nombre, hace referencia a la capacidad de algunos procariontes de realizar la FBN sin necesidad de asociarse a un organismo vivo de otra especie. Algunas cianobacterias presentan esta característica.
- FBN en simbiosis: este caso hace referencia a que el microorganismo lleva a cabo la FBN asociado a una planta. Dentro de este tipo de asociación podemos distinguir tres grupos de interacciones:
 - ✓ Los heterocistos de las cianobacterias, que ocupan tejidos de hepáticas, helechos, cícadas y dicotiledóneas.
 - ✓ Los actinomicetos, representados por *Frankia*, que realizan simbiosis con plantas de varias familias no leguminosas que incluyen a los géneros *Alnus* y *Prusia*.
 - ✓ Los que realizan simbiosis con muchas leguminosas y excepcionalmente con una no leguminosa, *Parisponia*, miembro de la familia Ulmaceae. A estos diazotrófos se los denomina en su conjunto como rizobios.

1.2.2.1. La FBN y la nitrogenasa.

Independientemente de las agrupaciones que realicemos, todos los organismos capaces de realizar la FBN lo hacen gracias al complejo enzimático de la nitrogenasa (Raymond et al. 2004). Esta enzima presenta la peculiaridad de ser inactiva en presencia de O_2 . Se cree que las primeras nitrogenasas debieron haberse originado antes de que la condición reductora de la atmósfera primitiva cambie a su forma oxigénica actual por la acumulación de O_2 como producto final de la fotosíntesis. A su vez, la nitrogenasa pudo originalmente ser parte de algún proceso respiratorio análogo a la reducción de sulfatos que se observa en bacterias reductoras de sulfato. En ese ambiente reductor, también era necesario gastar ATP para asegurar la expulsión de hidrógeno (H_2), por lo que es probable que la nitrogenasa también surgiera como un mecanismo de disipación del poder reductor. Dado que las primeras plantas terrestres aparecieron aproximadamente hace 400 millones de años, posiblemente la FBN en simbiosis con plantas apareció mucho tiempo después de los primeros diazotrófos, como una forma de protección de la atmósfera oxigénica (Lloret & Martínez-Romero 2005).

La reacción catalizada por la nitrogenasa para la reducción de N_2 en NH_3 es:



donde *Pi* significa fosfato inorgánico, e^- electrones y *n* el número de moles.

A diferencia del proceso de Haber – Bosch, la nitrogenasa logra catalizar la reacción a temperatura ambiente y a presión atmosférica, utilizando una gran cantidad de ATP para romper el triple enlace del N_2 . El consumo de ATP va a depender de las condiciones del flujo de protones, así, $n \geq 16$. Cuanto más limitantes sean las condiciones del flujo de protones ese gasto de ATP aumentará (Halbleib & Ludden 2000).

Cuando mencionamos la nitrogenasa, en realidad estamos haciendo referencia a un complejo multienzimático, formado por la *dinitrogenasa reductasa* o proteína Fe y la *dinitrogenasa* o proteína FeMo. Ambas son metaloproteínas con centros redox Fe-S, pero en el caso de la dinitrogenasa la presencia adicional del cofactor Mo, hace que la enzima sea desnaturalizada en presencia de O₂, por lo tanto el complejo nitrogenasa se inactiva, no logrando la reducción de N₂ (Shaw & Brill 1977). Es por ello que se cree que los diazotrófos desarrollaron diversas estrategias a lo largo de su evolución para proteger a la nitrogenasa del O₂. Entre ellas podemos encontrar, como en el caso de *Azobacter*, la secreción de polisacáridos que no permiten el ingreso de O₂ a la célula (Parker & Scutt. 1960). En cambio, en cianobacterias, esto se logra con la formación de una estructura especializada, llamada heterocisto (Lloret & Martínez-Romero 2005). Finalmente, los rizobios realizan simbiosis con leguminosas, asociándose de forma estrecha con las raíces de la planta dentro de una estructura muy especializada llamada nódulo (Young 1992). En la simbiosis rizobio-leguminosa, la planta es la encargada de proteger a la nitrogenasa, ya que por un lado el nódulo posee una capa celular exterior que lo envuelve formando una barrera de protección a la difusión del O₂ de la atmósfera del suelo (Davis 1984, Kondorosi & Schultze 1998, Jones et al. 2007, Terpolilli et al. 2012), y por otro lado, dentro del nódulo se produce una proteína llamada *leghemoglobina* –por su homología a la hemoglobina animal– (Kundu et al. 2003) la cual es capaz de unir y transportar O₂ con gran afinidad, reduciendo su concentración dentro del nódulo unas 10⁴ – 10⁵ veces (Jones et al. 2007, Downie 2005).

I.3. Leguminosas y rizobios: una convivencia de dos linajes.

Al comienzo de este capítulo hemos hablado del rol económico de la soja en nuestro país, como así también de su requerimiento nutricional, haciendo hincapié en su alta demanda de N. Más tarde mencionamos que, dentro de los procesos que permiten fijar el N₂ atmosférico, se encuentra la FBN por parte de los rizobios. El hecho remarcable es que para llevarla a cabo estos microorganismos se asocian con leguminosas como la soja en una simbiosis mutualista, para lo cual ambos socios coevolucionaron durante cientos de millones de años. Como resultado, dos linajes ampliamente separados en el árbol de la vida pueden convivir para beneficio mutuo, gracias a una serie de adaptaciones especiales desarrolladas a lo largo de la optimización evolutiva del proceso simbiótico. A continuación describiremos las características principales de esta interacción, comenzando por la descripción de los rizobios y continuando con el estudio de la infección y posterior integración de estos microorganismos a las funciones de la planta.

I.3.1. Los Rizobios.

Los rizobios son bacterias diazotróficas que se caracterizan por su exclusiva capacidad de formar estructuras fijadoras de N₂ denominadas nódulos en determinados hospedadores. Las primeras descripciones de nódulos en plantas fueron realizadas en 1586 por Delechamps y posteriormente en 1679 por Malpighi, quienes en aquel entonces asociaron estas estructuras en las raíces a tumores, pero ya en 1858 Lachmann observó que estas deformaciones de las raíces eran producto de la presencia de bacterias. Años más tarde, en 1888, Beijerinck fue el primero en aislar bacterias desde el nódulo de una raíz de leguminosa, y las llamó *Bacillus radicumicola*, por su forma bacilar y su origen radical. Sin embargo, un año más tarde se propuso su nombre actual *Rhizobium* y en 1912, Zipfel concluyó, en base a estudios de aglutinación, que las bacterias fijadoras de N₂ provenientes de distintas leguminosas no eran aislamientos de la misma especie, y describió seis grupos

distintos. Dos años más tarde los rizobios fueron divididos en tres grupos, basados en su velocidad de crecimiento y en la leguminosa huésped. De esta forma, en un grupo se encontraban los rizobios de crecimiento lento, cuyas bacterias presentan flagelos y colonias pequeñas no muy elevadas, y que son capaces de nodular *Vigna*, *Acacia* y soja. En un segundo grupo se encontraban los rizobios de crecimiento más rápido, con colonias opacas o perladas y que son capaces de nodular *Melilotus*, *Medicago* y *Trigonella*. En el tercer grupo, se incluyó las de muy rápido crecimiento, cuyas colonias eran semitraslúcidas y que son capaces de nodular *Vicia*, *Pisum*, *Lens*, *Lathyrus*, *Trifolium*, *Phaseolus* y *Stylosanthes*. Ya en 1929, se habían determinado especies de *Rhizobium* según la leguminosa que nodularan: *R. leguminosarium*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. meliloti*, *R. japonicum* y *R. lupini*, basadas en la creencia de que cada especie de rizobio era específica de una especie de leguminosa. Sin embargo, Wilson en 1944 reportó que un gran número de rizobios nodulaban más de una leguminosa. Más tarde, en 1964, se sugirió modificar la taxonomía, basándola en caracteres fenotípicos. Ya en 1974, se realizó una gran división basada en la velocidad de crecimiento en placas de Petri conteniendo medio de cultivo extracto de levadura-manitol (YEM): por un lado se clasificó a los rizobios de crecimiento lento –a los que llamaremos bradirrizobios– como *Bradyrhizobium* y por otro a los rizobios –de crecimiento rápido– se los denominó *Rhizobium*. (Fabra et al. 2007). Con un criterio similar, se creó un género aparte para los que muestran una velocidad de crecimiento intermedia –mesorrizobios– a los que se denominó *Mesorhizobium*.

Con el advenimiento de la Biología Molecular, nuevamente se modificó la clasificación filogenética de las bacterias, basándosela ahora en comparaciones de secuencias de ADN, como por ejemplo la del gen que codifica el ARNr 16S (Gutell et al. 1984, Olsen et al. 1986). Al presente, Proteobacteria es la división más grande y diversa dentro del dominio Bacteria, su filogenia agrupa cinco linajes designados como subdivisiones nombradas por las letras del alfabeto griego: α , β , γ , δ y ϵ . Los rizobios, bradirrizobios y mesorrizobios se encuentran agrupados en las subdivisiones α - y β -proteobacterias (Lloret & Martínez-Romero 2005). Dentro de las α -proteobacterias se encuentran 80 especies distribuidas en siete géneros: *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Methylobacterium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*, siendo los cuatro últimos los que cuentan con el mayor número de especies descritas. En cambio, en las β -proteobacterias solo se encuentran tres especies, pertenecientes a dos géneros: *Wautersia* y *Burkholderia*.

Independientemente del género al que pertenezcan los bradirrizobios, mesorrizobios o rizobios, todos son bacterias Gram-negativas, con forma bacilar no esporulantes, aeróbicos y/o microaeróbicos (Jordan 1984) Se los puede encontrar en vida libre en el suelo o asociados simbióticamente a las raíces de las leguminosas, y dependiendo de ello, su morfología y su metabolismo varían. En vida libre su hábitat es el suelo, pudiendo persistir ya sea en forma independiente o planctónica, o bien formando biopelículas como bacterias sésiles sobre sustratos bióticos o abióticos. Las formas planctónicas suelen ser móviles, presentando flagelación polar, peritrica o ambas, mientras que las formas sésiles no poseen flagelos (Quispel 1974). Además, todas estas formas de vida libre pueden utilizar diversas fuentes de carbono (C) para su metabolismo y en este estado son incapaces de fijar N_2 . En simbiosis con plantas se los encuentra formando parte de estructuras denominadas nódulos, dentro de los cuales se diferencian a bacteroides (Oke & Lon 1999). Estas formas no son móviles, solo son capaces de utilizar malato o succinato como fuente de C y tienen la capacidad de fijar N_2 . Un hecho que también los diferencia del resto de los diazotrófos, es que cuando están en simbiosis no utilizan el producto de la

fijación de N₂ para satisfacer sus propias necesidades de N, ya que el bacteroide utiliza tanto la fuente de C como la de N que le suministra la planta (Oldroyd et al. 2011).

I.3.2. Bacterias que nodulan soja.

Dado el origen asiático de la soja, el mayor reservorio genético de bradirrizobios, mesorrizobios y rizobios que la nodulan se encuentra en el Lejano Oriente. Por lo tanto, se puede decir que Asia es uno de los centros de diversificación de bacterias noduladoras de soja. Sin embargo, se cree que a lo largo de los intercambios comerciales de semillas, las mismas pueden haber transportado estas bacterias adheridas a sus tegumentos, introduciéndolas así en otros suelos, donde posteriormente pueden haberse naturalizado como poblaciones alóctonas. Alternativamente, tales suelos también podrían poseer bacterias simbiotes de otras leguminosas que eventualmente podrían adquirir la capacidad de nodular soja. En ese contexto, y teniendo en cuenta que se ha planteado que los organismos que interactúan entre sí tienden a coevolucionar, es probable que países como Argentina, Brasil o Estados Unidos se hayan convertido también en reservorios de la diversidad de bacterias noduladoras de soja.

Si bien originalmente se creía que *B. japonicum* era el único simbiote de soja (Jordan 1984), con el desarrollo de nuevas técnicas moleculares y de aislamientos en diversas aéreas del mundo se logró definir otras dos especies de bradirrizobios capaces de nodular soja. De esta manera podemos decir que hasta el momento existen tres especies de *Bradyrhizobium* que nodulan soja, de los cuales *B. japonicum* (Fred et al. 1932) y *B. elkanii* (Kuykendal et al. 1991) son de crecimiento lento y *B. liaoningense* (Xu et al. 1995) de crecimiento extra lento. Por otro lado, también se identificaron rizobios capaces de nodular soja como *Ensifer* (previamente *Sinorhizobium*) *fredii*, (Keyser et al. 1982), *E. xinjiangensis* (Chen et al. 1988) y un mesorrizobio, *M. thianshanense* (Chen et al. 1995). Además, se observó que *Rhizobium* sp. NGR234 es capaz de nodular soja (Saldaña et al. 2003). Cabe mencionar que esta cepa es uno de los rizobios de comportamiento más promiscuo, ya que es capaz de nodular a 232 leguminosas sobre 452 probadas (Lloret & Martínez-Romero 2005). Así, hasta el momento podemos decir que la soja puede ser nodulada por tres especies de bradirrizobios, tres de rizobios y una de mesorrizobios. Sin embargo, esta última tiene muy escasa importancia, por lo cual nos referiremos en conjunto a las bacterias noduladoras de soja como (bradi)rizobios.

Con respecto a los bradirrizobios, que parecen constituir el grupo más importante en la interacción con soja, se considera que USDA 110 y USDA 76 son cepas representativas de *B. japonicum* y *B. elkanii* respectivamente, con lo cual suelen utilizarse como referencia para clasificar nuevos aislamientos (Balatti 2007).

I.3.3. Simbiosis.

El término *simbiosis* fue acuñado por el botánico alemán Anton de Bary en 1873, para describir la estrecha relación que se establece en ocasiones entre dos o más individuos de distintas especies. Así, la palabra simbiosis (de origen griego), significa literalmente “convivir”, y se trata de una relación que puede durar un periodo de tiempo prolongado o toda la vida. El término también hace referencia a que por lo menos uno de sus integrantes o simbiotes logran un beneficio a costas del otro. En el caso particular de la simbiosis (brady)rizobio-soja, ambos simbiotes pueden vivir de forma independiente, pero cuando

se asocian, ambos se ven favorecidos, de ahí que se trate de una simbiosis mutualista. Sin embargo, en suelos ricos en N la soja no forma nódulos (Gibson & Harper 1985). Este hecho no ha de sorprender si recordamos el gasto energético necesario para que la nitrogenasa pueda catalizar la fijación de N_2 . Cuando hay suficiente N disponible en el suelo, la planta, por razones de economía energética, privilegia la incorporación del N edáfico por sobre el derivado de la atmósfera (Peticari et al. 2007). De esta forma, el establecimiento de una simbiosis efectiva requiere que exista una deficiencia de N en el suelo, al menos en el ambiente de cercanía a la raíz, y que se produzca una serie de eventos concatenados que consisten en la percepción de señales, su transducción y la respuesta. Estos procesos finalizan con la formación del nódulo, un nuevo órgano en las raíces de la leguminosa, en donde el (bradi)rizobio se va a diferenciar a la forma capaz de fijar N_2 . Como es de esperarse, este proceso de desarrollo y diferenciación necesita un control preciso en tiempo y espacio, el cual está gobernado en gran parte por una serie de genes regulatorios implicados en el desarrollo de la simbiosis (Schlaman et al. 1998).

El proceso y las etapas previas a la simbiosis han sido muy bien caracterizados y se lo puede dividir en cinco acontecimientos principales: (Fig. I.5.)

- Adhesión de los rizobios a la superficie de las raíces y colonización.
- Reconocimiento del par simbiótico.
- Invasión de la raíz.
- Organogénesis del nódulo.
- Diferenciación de las bacterias a bacteroides y fijación de N_2 .

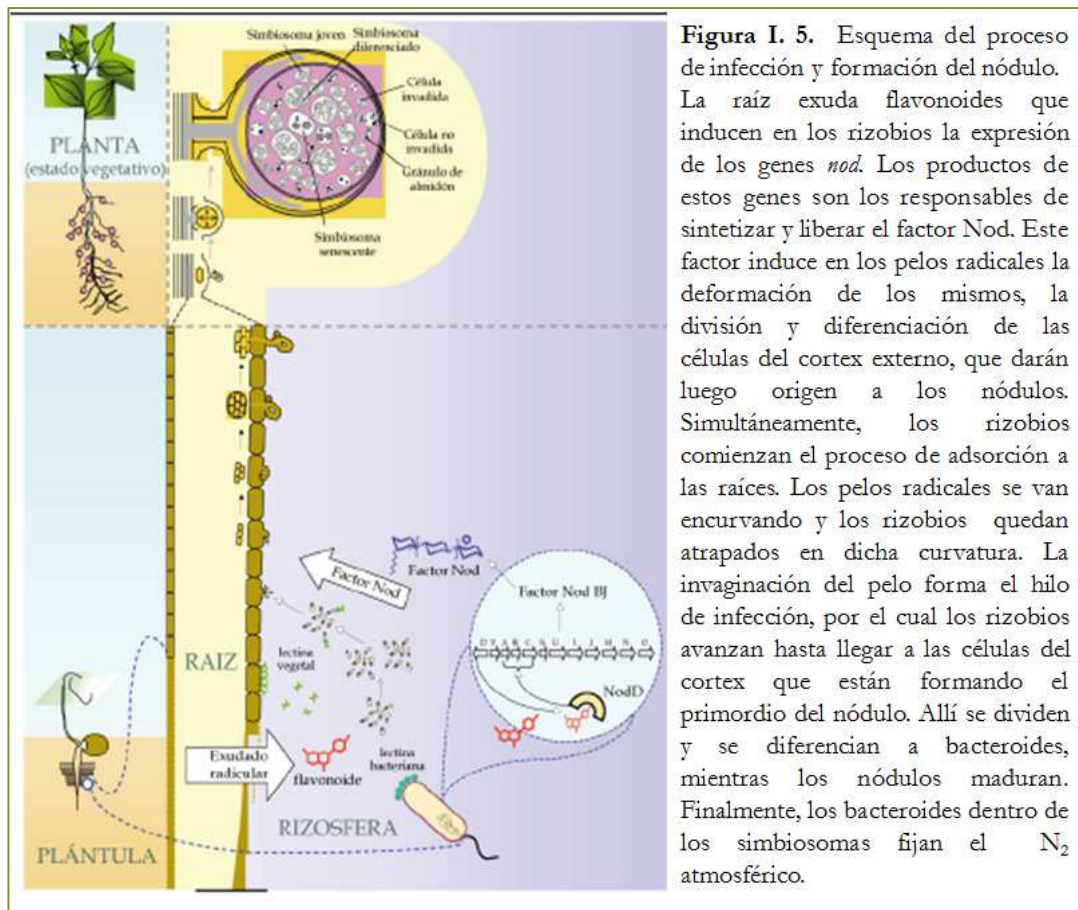


Figura I. 5. Esquema del proceso de infección y formación del nódulo.

La raíz exuda flavonoides que inducen en los rizobios la expresión de los genes *nod*. Los productos de estos genes son los responsables de sintetizar y liberar el factor Nod. Este factor induce en los pelos radicales la deformación de los mismos, la división y diferenciación de las células del cortex externo, que darán luego origen a los nódulos. Simultáneamente, los rizobios comienzan el proceso de adsorción a las raíces. Los pelos radicales se van encorvando y los rizobios quedan atrapados en dicha curvatura. La invaginación del pelo forma el hilo de infección, por el cual los rizobios avanzan hasta llegar a las células del cortex que están formando el primordio del nódulo. Allí se dividen y se diferencian a bacteroides, mientras los nódulos maduran. Finalmente, los bacteroides dentro de los simbiosomas fijan el N_2 atmosférico.

1.3.3.1. Adhesión a la superficie radical y colonización.

La rizósfera, espacio contiguo a las raíces, es un microhábitat rico en nutrientes con respecto al suelo circundante. Este microhábitat puede ser colonizado por diversos microorganismos que generalmente forman biopelículas sobre la superficie de la raíz (Fuqua et al. 2004). La rizósfera presenta tales características dado que las plantas pueden secretar como exudados entre un 5 a 20 % de los productos finales de la fotosíntesis, los que pueden ser utilizados por la microbiota para establecerse y proliferar. En tal sentido, la mayoría de las bacterias edáficas, incluidos los (bradi)rizobios, poseen diversos mecanismos de adhesión a las raíces. Cabe hacer hincapié, en que la mayoría de esas bacterias edáficas comparten algunos mecanismos de adhesión con los (brady)rizobios, con lo cual pueden interferir con la unión de los mismos a sitios de infección sobre la raíz, y así impedir su posterior entrada a la leguminosa. Por otro lado, dentro de esas bacterias edáficas con capacidad de adherirse, encontramos las denominadas bacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPR, por sus siglas en inglés (plant growth promoting rhizobacteria) (Sowinski et al. 2007). Entre estas bacterias, que tienen la capacidad de permanecer toda su vida adheridas a las raíces, podemos destacar a *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas spp.*, *Bacillus subtilis* B2 y *Enterobacter* (Fabra et al. 2007). Varias de estas especies han sido incluidas en diversas formulaciones biotecnológicas desarrolladas a nivel industrial para mejorar el crecimiento y desarrollo de los cultivos (Nelson 2004).

Durante el proceso de adhesión no solo actúan moléculas secretadas por parte de la planta, sino también por parte del microsimbionte. Por el lado de la planta, se ha puesto de manifiesto el rol de ciertas macromoléculas, entre ellas las lectinas, (glico)proteínas capaces de unir selectivamente ciertos carbohidratos, y que suelen acumularse en las puntas de los pelos radicales (Dazzo & Hubbell 1975). Por su parte, los microsimbiontes secretan moléculas denominadas conjuntamente como adhesinas, que incluyen polisacáridos de superficie, aglutininas, fimbrias, fibrillas de celulosa (Rhijin & Vanderleyden 1995) y hasta algunos autores han propuesto que los flagelos podrían tener un rol como adhesinas (Croes et al. 1993, Merino et al. 2006). Se ha sugerido que la adhesión puede tener cierto grado de especificidad, reconociendo uniones específicas y no específicas (Lodeiro et al. 1995). Sin embargo, no está claro si esta especificidad tiene alguna relación con el reconocimiento simbiótico o si simplemente se debe a que distintas especies de (brady)rizobios poseen diferentes adhesinas y por lo tanto, se unen de diferentes maneras a la raíz (Mongiardini et al. 2008). A partir de estudios con *R. leguminosarium bv viciae*, *R. leguminosarium bv trifoli* y *B. japonicum*, se ha caracterizado el rol de las lectinas, tanto de origen vegetal (Dazzo & Hubbell 1975, Lodeiro et al. 2000) como bacteriano (Mongiardini et al. 2008) y de los polisacáridos de superficie (Becker & Pühler 1998) en la etapa inicial, reversible, de la adhesión. Esta etapa, que se completa en pocas horas, es seguida por una segunda etapa irreversible, que requiere más de 12 horas, donde las bacterias son ancladas a la raíz por fibrillas de celulosa (Smit et al. 1992, Rhijin & Vanderleyden 1995). En concordancia con los tiempos requeridos por cada una de estas etapas, se ha determinado que en general las adhesinas involucradas en la etapa inicial son las que influyen sobre la nodulación, a diferencia de las involucradas en la etapa irreversible. Pese a todos los trabajos realizados en el tema, los conocimientos sobre la adhesión todavía siguen siendo escasos, dado que en el ambiente rizosférico, en el que se promueve la adhesión, influyen diversas variables que son difíciles de emular en el laboratorio.

1.3.3.2. El diálogo molecular: reconocimiento simbiótico.

Si bien el diálogo molecular entre simbiote y hospedante no está diferenciado temporalmente, podemos proponer que éste comienza con la secreción de moléculas fenólicas, llamadas flavonoides, en el exudado radical de la leguminosa (Perret et al. 2000). Estas moléculas van a disparar la activación específica de factores transcripcionales que controlan la expresión de los genes de nodulación en los rizobios, denominados *nod*, *noe* y *nol*. Cada uno de estos genes se hallan ubicados en operón (Perret et al. 2000) y codifican las proteínas que van a catalizar la síntesis de un quitolipooligosacárido denominado factor Nod, el cual es clave en el desarrollo del nódulo (Mergaert et al. 1997, Fujishige et al. 2008, Streng et al. 2011). Esta molécula es secretada por los rizobios y constituye una señal para la planta, induciendo el inicio de la simbiosis a varios niveles. Entre los procesos que responden a la presencia del factor Nod se encuentran la deformación y enrulado del pelo radical mediante la reorganización de su citoesqueleto, y el inicio de la actividad mitogénica en las células (sub)corticales de la raíz para dar origen al primordio del nódulo (Brenic & Winans 2005). Estas conclusiones fueron obtenidas a partir de estudios realizados con rizobios mutantes incapaces de sintetizar factores Nod, frente a los cuales los pelos radicales no manifiestan reacción alguna (Rélic et al. 1993), y experimentos con plantas inoculadas con factor Nod purificado, las que, en respuesta, desarrollan nódulos en ausencia de rizobios (Truchet et al. 1991). De esta manera, podemos observar que los flavonoides, en conjunto con los factores Nod, constituyen las primeras moléculas-señal intercambiadas por ambos simbioses. Si bien estas moléculas son las más estudiadas, no son las únicas producidas por ambos simbioses que participan del evento de intercambio de señales: del lado de la planta podemos mencionar betaínas, ácidos aldónicos, xantonas y jasmonatos, todas ellas también inductores de los genes *nod* (Kiers et al. 2003, Cooper 2007), mientras que del lado de los (bradi)rizobios podemos mencionar polisacáridos de superficie, proteínas de secreción del tipo I, II y IV, acil-homoserina-lactonas (AHL), hopanoides y ácido indol acético, que actúan como reguladores del crecimiento vegetal (Cooper 2007). Dado que los flavonoides y los factores Nod son las moléculas más estudiadas y caracterizadas, a continuación haremos un breve resumen de sus propiedades más relevantes.

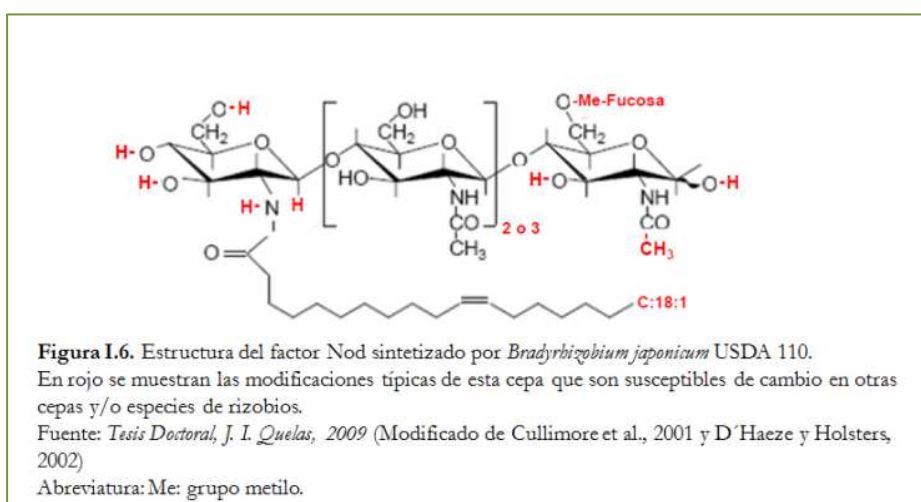
1.3.3.2.1. Flavonoides.

Actualmente se conocen 4.000 tipos de flavonoides distintos, aislados a partir de plantas vasculares, de ellos aproximadamente 30 han sido caracterizados como inductores de genes *nod* (Brenic & Winans 2005). Todos los flavonoides consisten en dos anillos de benceno unidos por un heterociclo de pirano o piranona. Las sustituciones específicas en los anillos de esa estructura básica dan como resultado calchonas, flavonas, flavononas, flavonoles e isoflavonoides entre otros. En particular, los isoflavonoides producidos por soja, daidzeína y genisteína, son inductores específicos de los genes *nod* en *B. japonicum* (Subramanian et al. 2006) e inhiben la expresión de los genes *nod* en *E. meliloti*, cuyos genes *nod* son inducidos por luteolina (Peters 1986). En base a este tipo de observaciones se ha sugerido que cada planta produce una mezcla distinta de estas moléculas, la cual es específica para su simbiote. A su vez la cantidad, aunque siempre del orden nanomolar a micromolar, y el espectro de flavonoides pueden variar con la edad y el estado fisiológico de la leguminosa (Shaw et al. 2006). Curiosamente, este tipo de moléculas también actúan como señales en las respuestas de defensa de la planta frente a patógenos, lo cual está de acuerdo con la idea de que durante su evolución, la simbiosis rizobio-leguminosa habría reclutado sistemas de transducción de

señales de respuestas a patógenos, y hoy sería una patogénesis atenuada (Perret et al. 2000, Lodeiro et al. 2004, Brennic & Winans 2005).

1.3.2.2.2. Factores Nod.

El primer trabajo sobre el factor Nod se publicó en 1990, en base a la caracterización de dicha molécula en *E. meliloti* (Maillet et al. 1990). Tan solo seis años después ya se habían caracterizado los factores Nod de al menos 13 especies, lo que permitió poner en evidencia que esta molécula presenta una estructura básica codificada por los genes *nodABC*, presentes en todos los ejemplos estudiados hasta el momento (Mergaert & Montagu 1997). La estructura básica del factor Nod está constituida por un tetra o pentasacárido de N-acetil- β -D-glucosamina sustituido en el C2 de su extremo no reductor por una cadena de ácido graso insaturado. Además puede contener otros sustituyentes, tanto en su extremo reductor como en su extremo no reductor (Mergaert et al. 1997, Brennic & Winans 2005, Cooper 2007). Diferentes especies sintetizan diferentes tipos de factor Nod, los cuales son distinguibles por el grado de saturación de su cadena de ácido graso y los sustituyentes que presentan en sus extremos (Mergaert & Montagu 1997). *B. japonicum* produce factores Nod cuya estructura básica puede estar constituida por tetrámeros o pentámeros de N-acetil- β -D-glucosamina, presentando como sustituyentes ácidos grasos 18:1, 16:0 o 16:1 en su extremo no-reductor y O-metilfucosa, fucosa o glicerol en su extremo reductor (Sanjuán et al. 1992). En la Fig. I.6 se muestra el factor Nod sintetizado por *B. japonicum* USDA 110. De la mano de estos resultados, en un principio se propuso, de forma análoga a lo observado con los flavonoides, que los factores Nod también poseerían especificidad simbiótica (Kondorosi & Schultze 1998). Sin embargo, hasta el momento no se ha podido dilucidar por qué dos especies que nodulan distintos hospedadores expresan un mismo factor Nod. Tal es el caso de *R. etli* y *M. loti*, quienes si bien sintetizan un mismo tipo de factor Nod, nodulan distintas especies: *P. vulgaris* y *Lotus japonicus*, respectivamente (Perret et al. 2000). De manera adicional, también se ha observado que rizobios pertenecientes al mismo género, capaces de nodular la misma especie, presentan distintas sustituciones en la estructura base del factor Nod (Broughton et al. 2000). En base a estas observaciones, actualmente se ha puesto en duda la idea de que la especificidad simbiótica esté determinada solamente por la estructura del factor Nod.

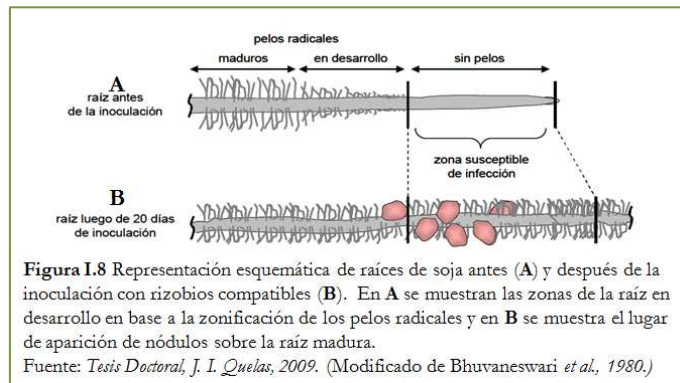
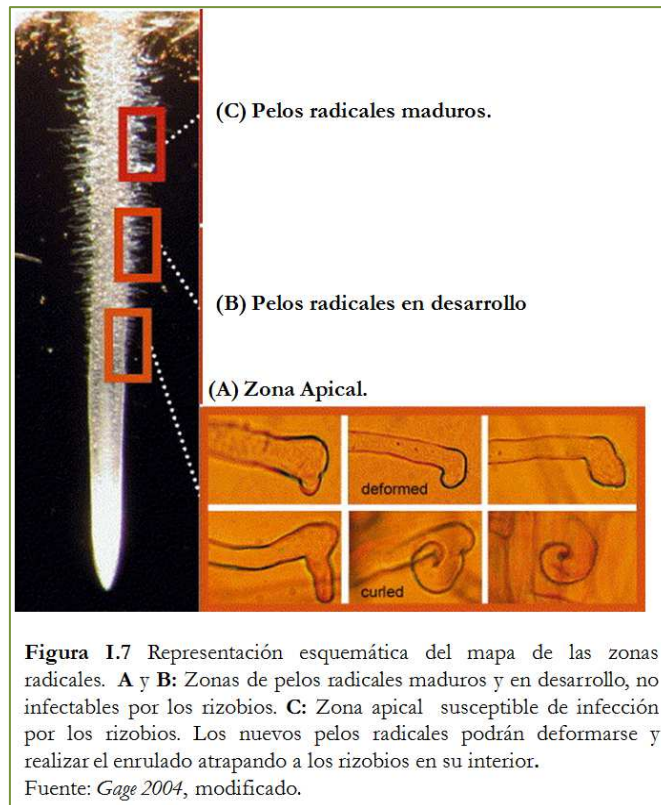


La biosíntesis y secreción del factor Nod son procesos complejos, que están codificados en varios genes, conocidos como genes de nodulación. Los genes de nodulación comunes *nodABC* codifican la biosíntesis y el ensamblaje de las unidades de N-acetil- β -D-glucosamina y la unión de la cadena de ácido graso –presentes en todas las especies de bradirrizobios, mesorrizobios y rizobios– mientras que los genes de nodulación específicos, *nol* y *noe* codifican las enzimas que catalizan la “decoración” del factor Nod con diferentes sustituyentes en sus extremos (Masson-Boivin et al. 2009). Además de esos genes, también se han observado genes cuyos productos cumplen funciones activadoras, como *nodD*, *nodVW* o *yrM*, los que detectan a los flavonoides y como respuesta activan la expresión de los otros genes *nod*. De forma análoga también se han reportado reguladores negativos como *nolA*, que son antagonistas de los genes activadores en respuesta a señales de percepción del quórum (Wisniewski & Downie, 2002). Se cree que esta última función permite inhibir la expresión de los genes de nodulación una vez que se dispararon las señales de desarrollo del nódulo y que las bacterias se encuentran dentro de la raíz (Loh & Stacey, 2003).

1.3.3.3. La invasión de la raíz.

A partir del trabajo de Fåhraeus (1957) se conocen las etapas de la infección de las raíces de las principales especies de leguminosas, entre las que se encuentra la soja. Fåhraeus observó que los pelos radicales muestran una deformación denominada “enrulado del pelo radical”, que atrapa a las bacterias simbióticas en la curvatura interior. Estas bacterias posteriormente penetran a la raíz formando un canal característico llamado hilo de infección, que se desarrolla longitudinalmente en dirección a las células (sub)corticales de la raíz. El hilo de infección se forma por una invaginación de la pared celular del pelo radical que engloba a las bacterias, las que de esta manera, avanzan permaneciendo siempre en el espacio exterior de la célula vegetal (Gage 2004). En otras especies de leguminosas, las bacterias penetran por hendiduras dejadas por raíces laterales emergentes, en un proceso que se conoce como “crack entry” (Boogerd & Van Rossum 1997). En ambos casos, hilos de infección y crack entry, las bacterias quedan encerradas en vesículas limitadas por la membrana vegetal, las cuales son descargadas en el citoplasma de las células (sub)corticales en división, donde se está formando el nódulo (Gage 2004, Boogerd & Van Rossum 1997).

Posteriormente a los trabajos iniciales de Bhuvaneswari et al. (1980) realizaron mapas de las zonas radicales donde se van formando los nódulos a medida que la raíz crece y se desarrolla, y a partir de esa información, determinaron qué zonas de la raíz son infectables y durante cuánto tiempo. Así, distinguieron tres zonas de la raíz, diferentes en cuanto a su arquitectura y a su crecimiento (Fig. I.7): la primera de ellas, a continuación del hipocótilo, es la zona de pelos maduros, la siguiente es la zona de pelos radicales en desarrollo y la tercera, llegando al ápice, es la denominada zona apical, donde se encuentran los pelos radicales emergentes (Bhuvaneswari et al. 1980, Gage 2004). En tal sentido, Bhuvaneswari et al. (1980) observaron que los pelos radicales maduros (la primera zona) no pueden ser infectados, induciendo la idea que para que haya enrulado es necesario que los pelos radicales se encuentren en pleno crecimiento polar, ya que el enrulado ocurre por un crecimiento desigual de las paredes celulares longitudinales del pelo. Además propusieron que la infección de una zona particular de la raíz de soja debe ocurrir dentro de las seis horas de la inoculación, ya que luego de ese tiempo, los pelos radicales de esa zona maduraron y ya no son más infectables (Bhuvaneswari et al. 1980). (Figs. I.7 y I.8)



Como señalamos más arriba, las deformaciones de los pelos radicales son inducidas por el factor Nod. Esto tiene lugar en periodos de tiempo mucho más cortos: se demostró que luego de tres a seis minutos de adicionar factor Nod purificado sobre la zona de pelos emergentes en las raíces ocurren cambios en el citoesqueleto de los pelos radicales asociados con una depolimerización de los filamentos de actina (Allen 1996, Cárdenas 1998). Sin embargo, trabajos más recientes proponen que la deformación del pelo radical requiere del receptor del factor Nod (Amoret 2003, Radutoiu 2003) pero no de la vía de transducción de señales que éste estimula (Esseling 2003, Miwa 2006).

Una vez enrollado el pelo radical e iniciado el hilo de infección, en general una sola célula bacteriana penetra y da origen a una progenie clonal que es la que completa el avance e invade el nódulo en formación. De este modo, a menudo cada nódulo contiene un único

clon de bacterias. Sin embargo, en ocasiones más de una bacteria es atrapada durante el enrulado, y si poseen distintos genotipos, es posible observar que dos bacterias diferentes van a formar parte del hilo de infección (Gage 2004). En estos casos, menos frecuentes, un único nódulo puede estar ocupado por más de un clon (es extremadamente raro que haya más de dos), lo que suele ser referido como “doble ocupación” de un nódulo.

Ya que el crecimiento del hilo de infección es ante todo una invasión de los tejidos de la planta por parte de un microorganismo, la planta naturalmente dispara respuestas de defensa similares a las que utiliza frente a la invasión de un microorganismo patógeno (Frayssé et al. 2003). Sin embargo, en el caso de la simbiosis, la planta debe atenuar estas respuestas, permitiendo que ingresen las bacterias simbióticas en división y que no sean tratadas como parásitos. Para ello, los polisacáridos superficiales parecerían tener un rol crucial (Frayssé et al. 2003). En correspondencia con ello se observó que mutantes delecionales del gen *exoB* en *B. japonicum*, afectados en la producción del exopolisacárido (EPS), son incapaces de invadir e infectar raíces de soja y solo forman nódulos vacíos (desprovistos de bacterias o bacteroides) (Quelas et al. 2010). Por su parte, *E. meliloti*, que expresa dos tipos de EPS: el succinoglicano o EPSI y el galactoglucano o EPSII, necesita solo uno de ellos para producir una infección normal, pese a las diferencias estructurales entre ambos, pero puede prescindir de los dos si posee intactos el polisacárido capsular (KdoPS) y el lipopolisacárido (LPS) (Hozbor et al. 2004, Jones et al. 2007).

Las lectinas de la planta, ya mencionadas por su rol en la adhesión, también juegan un papel en la infección, aunque el mismo no ha sido aclarado. Estas conclusiones se basan en trabajos que han demostrado que plantas de trébol expresando la lectina de arveja pueden ser noduladas por *R. leguminosarum* *bv. viciae* (Díaz. 1989), en tanto que plantas de *L. japonicus* llevando la lectina de soja son noduladas por *B. japonicum* (van Rhijn et al. 1998). Sorprendentemente, en ambos casos cada especie de bacteria produjo su propio factor Nod, lo que indica que la presencia de la lectina heteróloga de alguna manera relajó la exigencia de la planta hospedadora para el reconocimiento simbiótico mediante el sistema de transducción de señales que desencadena el factor Nod. Dado que el EPS parece ser el receptor de las lectinas vegetales, se ha observado que no hay desarrollo del hilo de infección cuando plantas transgénicas de *L. japonicus* son inoculadas con *B. japonicum* alterados en la síntesis del EPS (van Rhijn et al. P 1998). En ese caso, los autores proponen que el reconocimiento del EPS mediado por la lectina estaría vinculado a la entrada de los rizobios a la raíz vía el hilo de infección. Por lo tanto, es probable que la lectina vegetal actúe como socia del EPS en la atenuación de la respuesta de defensa (Pérez-Giménez et al. 2012).

El sistema de defensa de la planta también estaría involucrado en la regulación de la cantidad de nódulos que puede formar la leguminosa. Se cree que la respuesta al factor Nod es antagonizada por hormonas de la planta como etileno o ácido jasmónico (Sun et al. 2006), los cuales, aplicados en exceso, promueven que se aborten los hilos de infección (Vasse 1993). Además de estos sistemas de defensa de la planta, se ha propuesto que existen otros que permiten la regulación del número de nódulos que pueden formarse. Esta respuesta se conoce como autorregulación de la nodulación y está regulada por un ciclo donde intervienen kinasas y fosfatasa que perciben una señal producida por la raíz y que a su vez induce la producción de un inhibidor en la parte aérea. Este inhibidor se traslada a las raíces e impide nueva nodulación cuando el número de nódulos en funcionamiento allí ya es suficiente como para satisfacer las necesidades de asimilación de N en la parte aérea

(Reid et al. 2011). Como mencionamos al principio, la nodulación solo ocurre cuando la leguminosa crece en un suelo deficiente en N. Si a una planta que ya comenzó con su proceso de nodulación se le adiciona una fuente alternativa de N, en particular NO_3^- , ésta inhibe la continuidad del proceso de nodulación. Luego, una vez desarrollados los nódulos, el agregado de una fuente alternativa de N inhibe la fijación de N_2 . Estas reacciones, sumadas a la reciente observación de que plantas crecidas en NO_3^- restringen la adhesión (Perez-Gimenez et al. 2013), indican que la inhibición de la simbiosis por la presencia de fuentes alternativas de N ocurre a varios niveles yuxtapuestos. Esto es razonable, ya que para una planta que dispone de fuentes alternativas de N en abundancia, la presencia de los (bradi)rizobios dentro de sus tejidos radicales se asemeja más a un parasitismo que a un mutualismo. Sin embargo, aún falta aclarar mejor cómo se regulan e interconectan estos procesos, y cuál es su relación con los sistemas de defensa de la planta.

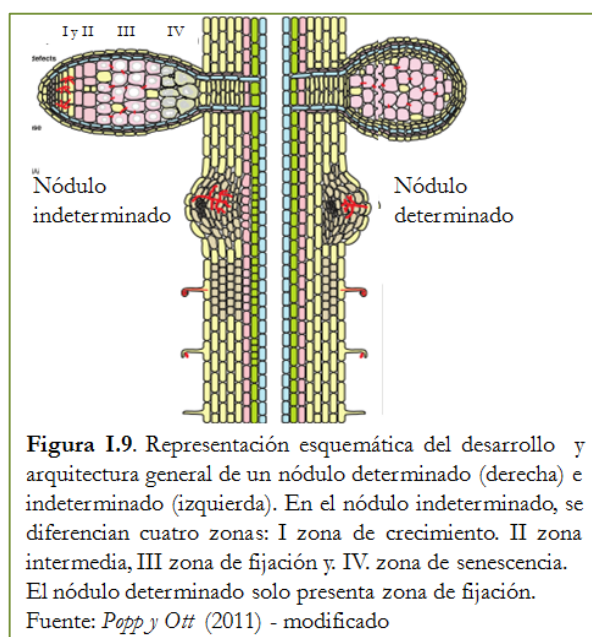
I.3.3. Organogénesis e invasión del nódulo.

En la etapa final del avance por el hilo de infección, los (brady)rizobios alcanzan la corteza interior de la raíz, donde se observa que las bacterias son internalizadas por las células vegetales corticales. Esta internalización ocurre por medio de una endocitosis, en donde una o unas pocas bacterias quedan englobadas por la membrana vegetal oriunda del hilo de infección formando una vesícula que ingresa al citoplasma de la célula infectada. Una vez endocitadas, estas vesículas constituyen el denominado simbiosoma, y la membrana que las rodea se denomina membrana peribacterial, MPB. (Rivilla & Bonilla. 2004). Durante el proceso de infección y formación de los simbiosomas, el primordio del nódulo se va desarrollando y comienza a poblarse de células infectadas. En paralelo, los (bradi)rizobios comienzan una diferenciación que va a concluir con su transformación en bacteroide, el cual puede comenzar a fijar N_2 . Dependiendo del genotipo de la leguminosa, el primordio del nódulo se puede formar en alguna de las tres capas de células de la corteza radical. Si se desarrollan en la corteza media o externa, dan lugar a los denominados nódulos determinados, en cambio si lo hacen en la corteza interna, se forman los denominados nódulos indeterminados (Patriarca et al. 2004). Ambos tipos de nódulos no solo difieren por la capa de células donde se desarrollan, sino que también difieren en su crecimiento y organización histológica. Si bien actualmente no se conoce por qué se forman dos tipos de nódulos, sí es sabido que este hecho depende de la leguminosa y no del tipo de (bradi)rizobio que la invade (Limpens 2005). Por ejemplo, *Rhizobium tropici* forma nódulos determinados en *P. vulgaris* e indeterminados en *Leucaena leucocephala*, pero cada una de estas especies vegetales, que puede ser nodulada por una gran variedad de rizobios, sólo forma nódulos ya sea determinados (*P. vulgaris*) o indeterminados (*L. leucocephala*).

Los nódulos determinados poseen un aspecto esferoide y albergan las células más jóvenes en la periferia, mientras que hacia el centro se encuentran las células maduras y luego las senescentes. Por lo tanto, la actividad fijadora de N_2 es mayor en las capas intermedias y menor en el centro. Estos nódulos son típicos de las leguminosas de origen tropical, entre las cuales se encuentran *G. max* (soja), *L. japonicus*, *P. vulgaris* (poroto) y especies de *Vicia* (Popp & Ott 2011). (Fig. I.9.)

Por su parte, los nódulos indeterminados poseen forma alargada, debido a que en su extremo apical mantienen un meristema que es fuente permanente de nuevas células nodulares. Esto los distingue de los nódulos determinados, en los cuales no hay células meristemáticas. En un corte histológico longitudinal se pueden diferenciar cuatro zonas: la

zona de infección (zona I), donde se encuentran las células jóvenes, una zona intermedia (Zona II), una zona de fijación (zona III), con células maduras, y la zona de senescencia (zona IV), que sería equivalente a la zona central de los nódulos determinados. La zona I puede ser infectada continuamente por rizobios que ya se encuentran dentro del nódulo. Las leguminosas originarias de zonas templadas como *M. sativa* (alfalfa), *P. sativum* (arveja) y *Trifolium* (trébol), forman nódulos de este tipo (Fig. I.9.).



I.3.4. Diferenciación de las bacterias a bacteroides y FBN.

La última etapa de la infección implica la diferenciación de los (brady)rizobios a formas capaces de fijar N_2 . Durante esta diferenciación ocurren cambios morfológicos y metabólicos en la bacteria en su pasaje a la forma bacteroidal. A nivel morfológico, el (brady)rizobio pierde el/los flagelos, se divide unas pocas veces y comienza a expresar la enzima nitrogenasa, para dar comienzo a la fijación de N_2 . En esta etapa diversos genes son regulados de manera tanto positiva como negativa, ya sea por el tejido radical de la planta (Gyorgyey et al. 2000) o por la bacteria (Brechenmacher et al. 2008, Oldroyd et al. 2011).

Se ha observado que, en el estado de bacteroide, los genes relacionados con el metabolismo del ADN están regulados negativamente, lo cual concuerda con la baja tasa de división celular de los bacteroides, mencionada más arriba. En cambio, los genes regulados positivamente están relacionados con la fijación del N_2 (Bhuvaneshwari et al. 1980, Oldroyd et al. 2011). En tal sentido, se ha observado que el ambiente reductor dentro del simbiosoma, dado por la baja tensión del O_2 , podría estar disparando la regulación de varios genes en el bacteroide (Prell & P. Poole 2006, Brechenmacher et al. 2008). En *E. meliloti*, la baja tensión de O_2 es detectada por un sensor que activa una cascada de señales que culmina con la activación de reguladores transcripcionales, entre los cuales se encuentran NifA, FixL y FixJ, que son imprescindibles para la expresión diferencial de genes que culminarán en el patrón de diferenciación y metabolismo típico de los bacteroides (Jones et al. 2007). Si bien el O_2 parecería ser una señal clave en la diferenciación, no debe ser la única.

El bacteroide utiliza fuentes de C y energía provenientes de la planta en forma de ácidos dicarboxílicos, en particular malato y succinato (Prell & P. Poole 2006). Estos esqueletos carbonados ingresan al bacteroide mediante la proteína integral de transporte de ácidos dicarboxílicos, DctA (por sus siglas en inglés *CA-dicarboxylic acid transport protein*). Además, la actividad de la enzima málica dependiente de NAD^+ que produce piruvato directamente desde malato, es requerida para la fijación de N_2 (Prell & P. Poole 2006). Este hecho sugiere que la producción de acetil-CoA a partir de malato usando la enzima málica y la enzima piruvato dehidrogenasa son importantes para la alimentación del ciclo de los ácidos tricarboxílicos en los bacteroides. Una vez que ingresan al bacteroide, estas fuentes de C son utilizadas en el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa para la generación de ATP, que será utilizado posteriormente por la nitrogenasa. A cambio de estas fuentes de C, el bacteroide cede completamente el producto de la fijación de N_2 . Para que esto ocurra el bacteroide inhibe su propia vía de asimilación, para tal fin se ha observado que en bacteroides tanto la glutamina sintetasa (GS) y la glutamato sintasa (GOGAT) están inhibidas. De este modo, todo el NH_3 producido por la nitrogenasa sale del bacteroide y es asimilado por la célula vegetal, por medio de la GS y la asparagina sintetasa (Larrainzar et al. 2009, Oldroyd et al. 2011). Dependiendo del tipo de nódulo formado por la leguminosa, ésta exportará distintos productos nitrogenados al xilema, para transportarlos al resto de la planta. En particular, los nódulos determinados exportan ureidos, como alantoína o ácido alantoico, mientras que la asparagina o glutamina son las formas comunes con la que se transporta el N en nódulos indeterminados (Oldroyd et al. 2011).

I.3.5. Medición de la FBN.

Una de las características deseables de los (bradi)rizobios es que posean una buena actividad fijadora de N_2 , lo cual se conoce como su efectividad. Por lo tanto, existe un gran interés en medir apropiadamente la actividad nitrogenasa, tanto para el mejoramiento de las cepas de rizobios a utilizar en los inoculantes, como para el mejoramiento de las leguminosas.

De acuerdo con lo expuesto y dependiendo el tipo de leguminosa y el rizobio a evaluar podemos clasificar a los algunos de los métodos más utilizados en base a:

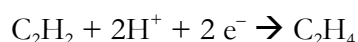
- Cuantificación de la actividad nitrogenasa.
 - ✓ Directos:
 - Método de reducción de acetileno.
 - Ensayo de evolución de H_2
 - ✓ Indirectos: Cuantificación y visualización de la nodulación.
- Cuantificación de Rendimiento.
 - ✓ Cuantificación de peso seco de la parte aérea.
 - ✓ Cuantificación de ureidos.
- Cuantificación del N incorporado.
 - ✓ Métodos isotópicos con ^{15}N .
 - ✓ Cuantificación del N total por el método de Kjeldahl.

A continuación, haremos un breve resumen de cada uno haciendo hincapié en sus utilidades, ventajas y desventajas (para una revisión más detallada: Unkovich & Pate. 2000, Grageda-Cabrera et al. 2003, Terpolilli et al. 2012).

1.3.5.1. Cuantificación de la actividad nitrogenasa.

1.3.5.1.1. Ensayo de reducción de acetileno.

Se cree que en la atmósfera primitiva la función ancestral de la enzima nitrogenasa estaba más relacionada con la detoxificación de derivados del ácido cianhídrico (HCN) que con la reducción de N₂, ya que la FBN asociada a la simbiosis con plantas ocurrió mucho tiempo después (Silver & Posgate 1973). Por otro lado también se cree que dicha función permitía la disipación del poder reductor, mediando la expulsión de H₂. Esta creencia se basa en que la enzima nitrogenasa reduce además de nitrógeno molecular, otros sustratos como acetileno (C₂H₂), azidas y HCN (Lloret & Martínez-Romero 2005). Esto sucede debido a que la enzima reconocería como sustrato a los dobles o triples enlaces presentes en dichas moléculas (Halbleib & Ludden 2000). En tal sentido uno de los métodos directos de la cuantificación de la actividad nitrogenasa se basa en la medición de la reducción de C₂H₂ a etileno (C₂H₄), catalizada por dicha enzima. Particularmente, tanto la membrana vegetal como así también la del bacteroide son permeables al C₂H₂ y al C₂H₄, y por lo tanto, su medición puede resultar muy sencilla (Halbleib & Ludden 2000). La reacción catalizada por la nitrogenasa es la siguiente:



Este ensayo –también denominado ARA por sus siglas en inglés, acetylene reduction assay– es utilizado desde 1968 (Hardy et al. 1968). Sus mayores ventajas consisten que el C₂H₄ producido es muy fácil de cuantificar, el C₂H₂ es un sustrato de bajo costo y el ensayo es rápido: solo se necesita tener la planta crecida y al momento de realizar la medida debe encerrársela herméticamente para la inyección del C₂H₂ y posterior recuperación del C₂H₄. Sin embargo, presenta una serie de desventajas que hacen que actualmente no sea el más apropiado para medir la actividad nitrogenasa (Witty & Minchin 1998, Grageda-Cabrera et al. 2003). La primera de ellas es la suposición de que ni el reemplazo de N₂ por C₂H₂, ni el cambio del producto de NH₃ a C₂H₄ modifican la actividad de la nitrogenasa, ni su afinidad por uno u otro sustrato. Se ha observado que en tiempos cortos el C₂H₂ no sólo es un sustrato de la nitrogenasa, sino que también puede actuar como inhibidor, además, en presencia de este compuesto la tasa de respiración disminuye considerablemente. Por otra parte, en algunas especies de *Azobacter* se ha determinado que el K_M de la nitrogenasa por el C₂H₂ es de 0,4-1,2 mM en comparación con el valor de 0,1 mM por el N₂, indicando que la nitrogenasa posee menor afinidad por el C₂H₂. Estos efectos, en su conjunto, se traducen en una subestimación de la actividad reductora de N₂ de la nitrogenasa (Peoples & Craswell 1992, Witty & Minchin 1998).

1.3.5.1.2. Ensayo de evolución de H₂.

Un método alternativo al ensayo de ARA, es medir uno de los subproductos de la reacción de reducción de N₂, en este caso la evolución de H₂ (Grageda-Cabrera et al. 2003, Witty & Minchin 1998, Hunt & Layzell 1993) Este ensayo también es conocido por ANA por sus siglas en inglés (apparent nitrogenase assay). Básicamente, este ensayo cuantifica el H₂ liberado por la nitrogenasa. La medida de la evolución del H₂ en el aire es una medida aparente de la nitrogenasa porque representa solo una porción del flujo total de electrones

de dicha enzima. Si se quisiera cuantificar la actividad total, se debería adicionar una medida que incluya la incubación de las plantas noduladas en un ambiente carente de N_2 como podría ser una mezcla de argón/oxígeno. Sin embargo, esta mezcla, a tiempos largos, puede disminuir la actividad nitrogenasa (Hunt & Layzell 1993).

Como en el caso anterior, sus grandes ventajas son el bajo costo, su practicidad y su rapidez, dado que solo se requiere una mezcla conocida de N_2 (79% de N_2 y 21% de O_2), H_2 (para calibrar el equipo), un detector de H_2 , es decir un electrodo amperométrico y un software que permita convertir la señal de diferencia de voltaje a ppm. Además, al no ser invasivo, se pueden hacer determinaciones a lo largo del desarrollo de la leguminosa y no introduce un inhibidor de la nitrogenasa. Como desventaja, a nivel metodológico se observa que en cada medición se debe realizar una calibración del equipo. Además este tipo de mediciones suelen tener una baja sensibilidad ($\pm 0,01$ ppm) por lo cual dependiendo las condiciones del ensayo, puede ser desaconsejado (Witty & Minchin 1998, Arrese-Igor et al. 2011). No obstante, la mayor desventaja que posee es que no puede ser utilizado en aquellas bacterias que realizan el proceso de reciclaje de hidrógeno, que en el caso de los bradirrizobios que nodulan soja son mayoría (Grageda-Cabrera et al. 2003).

Los (bradi)rizobios que expresan la actividad hidrogenasa, Hup (por sus siglas hydrogen uptake), son capaces de re-oxidar el H_2 liberado por la nitrogenasa y utilizarlo para obtener energía por fosforilación oxidativa, este hecho se traduciría en una mejor eficiencia energética de la simbiosis (Ruiz Argueso et al. 2000, Brito et al. 2005). Por lo tanto, los nódulos o bien no desprenden H_2 o bien lo hacen a muy baja concentración. Es sorprendente el hecho de que esta función metabólica no esté ampliamente distribuida dentro del género *Rhizobium*. Es más, en algunos casos se han encontrado los genes *hup*, pero no se ha observado la expresión de los mismos (Maier & Triplett 1996). En base a ciertas observaciones, parecería que la actividad Hup estaría mayormente presente en los bradirrizobios, pero no es una propiedad del género. Es decir, no todos los (bradi)rizobios que contengan los genes *hup* van a presentar actividad hidrogenasa, a su vez no todos los rizobios van a ser Hup⁻, ni todos los bradirrizobios, Hup⁺ (Ruiz Argueso et al. 2000). En base a estos conocimientos, el ensayo de ANA va a estar confinado solo a aquellos (bradi)rizobios que hayan sido previamente demostrados como Hup⁻.

1.3.5.1.3. Cuantificación y visualización de la nodulación.

Una manera indirecta de medir la eficiencia de la actividad nitrogenasa es evaluar la nodulación. Se supone que los (bradi)rizobios que presenten una eficiente tasa fijación de N_2 presentarán pocos nódulos de tamaño mediano o grande, distribuidos mayoritariamente sobre la raíz principal (Appleby 1984). A su vez, estos nódulos presentarán un color rojo intenso en su interior, debido a la presencia de leghemoglobina (Appleby 1984, Arrese-Igor et al. 2011, Terpolilli et al. 2012). Contrariamente, los (bradi)rizobios deficientes producirán una mayor cantidad de nódulos de tamaño pequeño, mayormente distribuidos en las raíces secundarias. Estos nódulos no presentarán altos contenidos de leghemoglobina y por lo tanto su interior será de color blanco (Somasegaran & Hoben 1985). Así, la determinación del peso seco de los nódulos (PSN), su número y la visualización de su ubicación en la raíz, nos permiten realizar una estimación cualitativa de la actividad FBN total en la planta. La mayor desventaja que presenta este método es que no mide la actividad de la nitrogenasa, a su vez estos parámetros no son indicadores fiables de la eficiencia de la cepa. Sin embargo, puede resultar un indicador práctico sobre el desempeño del cultivo cuando se toman

muestras en el campo. Este tipo de medición se recomienda realizarla en complementación de ensayos de cuantificación del rendimiento o de la tasa de N incorporado (Somasegaran & Hoben 1985, Grageda-Cabrera et al. 2003).

1.3.5.2. Cuantificación del rendimiento.

1.3.5.2.1. Cuantificación del peso seco de la parte aérea.

Si hay una buena actividad de fijación de N_2 , ésta se reflejará directamente con un aumento en el rendimiento. Por lo tanto, la cuantificación de la biomasa vegetal puede ser utilizada como un parámetro indirecto de dicha actividad. Así, el peso seco de la parte aérea (PSA, que incluye tallo y hojas) en la etapa de iniciación floral de las leguminosas inoculadas con (bradi)rizobios es un criterio generalmente aceptado para estimar la eficiencia de la FBN, en particular cuando se trata de cultivos hidropónicos que crecieron sin el agregado de otras fuentes de N, ya que en este caso, la diferencia de PSA frente a testigos sin inocular reflejará directamente la actividad nitrogenasa acumulada a lo largo del crecimiento de la planta. Nuevamente, la mayor desventaja es que no se realiza una medición directa de la actividad nitrogenasa y en particular se mide un parámetro vegetal, el cual puede estar condicionado por otras variables independientes de la actividad nitrogenasa (Somasegaran & Hoben 1985, Grageda-Cabrera et al. 2003).

1.3.5.2.2. Cuantificación de ureidos.

Este método se basa en la capacidad de las leguminosas de nódulos determinados de exportar el N fijado al resto de los tejidos vegetales en forma de los ureidos alantoína y ácido alantoico. Al medir el contenido de ureidos en la parte aérea, se obtiene un reflejo de la actividad fijadora de N_2 total y por ende resulta en un parámetro del rendimiento. Cabe mencionar que este método también puede utilizarse para medir de forma indirecta la actividad nitrogenasa, sin embargo, cuando se lo utiliza en esta modalidad, dicha medición debe realizarse en el xilema (McNeil & Larue 1984, Shigeyuki et al. 2004, Todd et al. 2006). La gran ventaja de este método es que la técnica utilizada se basa en una reacción colorimétrica, la cual es muy sencilla, barata y rápida (Trijbels & Vogels 1966). Como desventaja, al igual que el ensayo de ANA, solo se puede realizar en un determinado grupo, en este caso el ensayo no se puede realizar en leguminosas con nódulos indeterminados. En algunos casos se ha observado que la concentración de estos compuestos puede verse afectada por las condiciones ambientales (McNeil & Larue 1984).

1.3.5.3. Cuantificación del N incorporado.

La actividad fijadora de N_2 acumulada a lo largo del cultivo de la leguminosa puede medirse a partir de la determinación de la incorporación de N en los tejidos de la planta. En estos métodos se utiliza la comparación entre plantas inoculadas y plantas testigo sin inocular, lo cual nos provee una medida indirecta de la actividad nitrogenasa durante el tiempo de cultivo de las plantas inoculadas. Asimismo, suelen incluirse en estos ensayos a plantas fertilizadas con N inorgánico para estimar la incorporación máxima de N, aunque esta última estimación no es del todo exacta, ya que las rutas de asimilación son diferentes a lo largo del ciclo del cultivo, y la planta puede responder de manera diferencial a una y otra fuente de N.

1.3.5.3.1. Métodos isotópicos con ^{15}N .

Los métodos descriptos anteriormente solo pueden llevarse a cabo en laboratorio, dado que en los campos no es posible asegurar que los suelos no contengan N. Una manera de realizar este tipo de mediciones a campo, es utilizar el isótopo pesado no radioactivo ^{15}N . Básicamente se pueden hacer dos tipos de mediciones, una de ellas es incorporar directamente al suelo un fertilizante con ^{15}N y luego medir el contenido de este isótopo en los tejidos vegetales (Unkovich & Pate 2000, Grageda-Cabrera et al. 2003, Peticari et al. 2007). Al realizar esto, se supone que una parte del N incorporado será debido a la FBN y por lo tanto poseerá solamente ^{14}N y el resto se deberá a la incorporación de la fuente nitrogenada del fertilizante y por lo tanto contendrá una proporción predecible de ^{15}N . La mayor desventaja de este tipo de medición es que se está agregando N al sistema y por lo tanto se perturba la FBN, que como mencionamos anteriormente es inhibida en presencia de fuentes nitrogenadas en el medio.

La segunda opción se basa en que algunos suelos presentan una abundancia natural del ^{15}N algo mayor que la encontrada en la atmósfera. De esta forma, lo que se mide es la abundancia relativa de ^{15}N en el cultivo que se quiere analizar y se la compara con la de cultivos que no realizan FBN (Unkovich & Pate 2000).

La mayor desventaja de estos dos métodos es que se requiere contar con variedades de leguminosas que sean incapaces de nodular para utilizarlas como plantas testigos que no fijen N_2 (Unkovich & Pate 2000).

Una variedad dentro de los métodos de cuantificación de nitrógeno con ^{15}N es utilizar N_2 gaseoso marcado con el isótopo (Molero et al. 2011). De esta forma, el ^{15}N medido en los tejidos vegetales corresponderá al fijado por la nitrogenasa. Sin embargo, este ensayo solo puede ser realizado en el laboratorio e implica contar con sistemas herméticamente cerrados que pueden modificar la tasa de FBN debido al estrés y la medida será dependiente del momento del día en que se la realice.

Por último, la gran desventaja que presentan los métodos con ^{15}N , es que se requiere un espectrómetro de masa o de emisión para poder cuantificarlo. Estos equipos no suelen estar presentes en la mayoría de los laboratorios y suelen ser costosos.

1.3.5.3.2. Cuantificación del N total por el método de Kjeldahl.

Entre las técnicas más utilizadas en el laboratorio para medir N podemos mencionar al método de Kjeldahl (Somasegaran & Hoben 1985, Grageda-Cabrera et al. 2003). Básicamente, consiste en realizar una digestión ácida del material a analizar y luego convertir todo el N en hidróxido de amonio (NH_4OH), el cual se determina por titulación. Como no se utilizan isótopos del ^{14}N , este método solo puede ser empleado en ensayos de laboratorio con plantas que no reciban fuentes alternativas de N. Así, la comparación del N total en material vegetal de plantas inoculadas en relación con testigos sin inocular da una idea de la FBN total a lo largo del ciclo de crecimiento que se haya analizado. Si bien este método es sencillo y económico, posee como desventajas una baja sensibilidad y que es una medida indirecta.

I.4. Biofertilización y agricultura sustentable.

Al inicio de este capítulo hemos planteado que el cultivo de soja actualmente posee un rol protagónico en nuestra economía. Sin embargo, esta leguminosa posee un alto requerimiento de N, y por ende es capaz de extraer una gran cantidad de este nutriente del suelo, poniendo en riesgo su fertilidad y sustentabilidad. El concepto de sustentabilidad hace referencia al uso de un recurso –en este caso el suelo– de tal manera que no se alteren sus propiedades y pueda estar así disponible para generaciones siguientes. La agricultura actual requiere una muy alta productividad para satisfacer la demanda mundial de alimentos, con lo cual alcanzar el criterio de sustentabilidad del suelo es de por sí una meta ambiciosa. Para lograrlo, no solo se debe mantener la fertilidad del mismo, sino que también debe prestarse atención al empleo de prácticas agrícolas conservacionistas, como podrían ser la rotación de cultivos y la siembra directa. Nosotros en particular hemos hecho hincapié sobre la utilización de la biofertilización como herramienta “amigable” con el ecosistema, ya que este método aprovecha la capacidad de los (bradi)rizobios para realizar FBN cuando se encuentran en simbiosis con la leguminosa, disminuyendo la necesidad de la planta de sustraerlo del suelo.

El insumo principal para la biofertilización es el inoculante, una preparación de (bradi)rizobios vivos formulados de tal manera que puedan transportarse y almacenarse sin pérdida de viabilidad, para luego ser aplicados a los cultivos. En esta sección describiremos las características que deben poseer los inoculantes para ser utilizados en cultivos de leguminosas, y luego nos enfocaremos en la situación de los inoculantes para soja en Argentina.

I.4.1. Los inoculantes.

La utilización de (bradi)rizobios para conservar el nivel de N de los suelos puede considerarse como un desarrollo biotecnológico que ha registrado un importante avance en las últimas décadas, inducido por el incremento de la productividad agrícola a nivel mundial y la búsqueda de nuevas opciones no contaminantes para las tecnologías de producción. Sin embargo, el empleo de esta técnica, aunque no su comprensión, se remonta al siglo XIX, y mucho antes diversos autores habían realizado observaciones del impacto de las leguminosas sobre la fertilidad del suelo. Así, entre los presocráticos, el filósofo Teofrasto de Efeso (371 – 287 a.c.) describía en su libro *Historia de las Plantas*, que “*las habas son las que más vigorizan el suelo*”. Posteriormente, el romano Lucius Junius Moderatus (4- 70 d.c.) afirmaba que “*la alfalfa abona la tierra*”. Ya entrados en el siglo XIX, en el trabajo de Fred (1832) se menciona el hecho de que la práctica de transferir suelos “productivos” (suelos donde se había realizado un cultivo de leguminosas) de un campo a otro, permitía incorporar las bondades presentes en el primero al segundo, lo cual se ponía de manifiesto con un aumento en el rendimiento de los cultivos. Teniendo en cuenta esta práctica, en el trabajo liminar de Hellriegel en 1886 se propone utilizar esta transferencia de suelos como método de inoculación a leguminosas. Luego de la propuesta de Hellriegel, este método fue sucesivamente mejorado pasando de un “método seco” a un “metodo húmedo” en donde se realizaba una pasta de suelos “productivos” con agua que permitía mejorar la adherencia de la “productividad” a las semillas antes de iniciar el cultivo (Smith 1992).

Tan solo ocho años después del primer aislamiento de rizobios obtenido por Beijerinck, en Estados Unidos se publicaba la primera patente que describía cómo obtener cultivos puros de (bradi)rizobios, bajo el nombre de Nitragin. Así Nobbe y Hiltner (1886)

no solo obtuvieron la patente sobre el producto, sino que también marcaron el inicio de la comercialización de los (bradi)rizobios como inoculantes de leguminosas. Por su parte, esta patente también permitió que Estados Unidos no solo comenzara a liderar el mercado de la soja sino que también encabezara a nivel mundial la producción de inoculantes. En 1930 ya se reportaban en ese país 23 empresas de inoculantes, los cuales se utilizaban por lo menos en 20 estados (Smith 1992).

Desde aquel momento hasta la actualidad, los inoculantes evolucionaron y seguirán evolucionando, para mejorar no solo el rendimiento de las leguminosas, sino también para afrontar nuevos desafíos, como puede ser su adaptación a nuevas tecnologías de distribución (p. ej. inoculación en línea de siembra), compatibilidad con fungicidas e insecticidas, estabilidad en diversas condiciones (temperatura, pH, estrés hídrico), mejoramiento en la conservación y transporte, etc.

1.4.1.1 Características relevantes de los inoculantes.

Hoy en día, la técnica de biofertilización se basa en adicionar el inoculante a la semilla o a su entorno en el momento de la siembra. Por su parte, el concepto de inoculante hace referencia a la utilización de cultivos de rizobios, en alta concentración, llevados por un soporte o carrier. A su vez, los inoculantes pueden contener diversos aditivos que van a permitir la conservación de la viabilidad de los (bradi)rizobios desde su producción hasta su utilización en el campo, como así también mejorar su eficiencia simbiótica. Por último y no menos importante, todas estas características deben poder mantenerse en un envase adecuado para su posterior transporte, conservación y utilización (Peticari et al. 1994).

Dado que existen muchas formas de cultivar a los (bradi)rizobios y diversos soportes posibles, las distintas combinaciones entre ellos abren un abanico de posibilidades en las formulaciones de los inoculantes. Además, la elección de un inoculante va a determinar en parte el método de su aplicación al cultivo. Por todo esto, a continuación haremos un breve resumen de los componentes de los inoculantes.

1.4.1.1.1. Cultivos de (bradi)rizobios.

De las 80 especies conocidas de bacterias simbiotes de leguminosas solo se utiliza comercialmente un número muy reducido, siendo las más importantes *B. japonicum*, *B. elkanii*, *R. etli*, *R. leguminosarum* y *E. meliloti* (Peticari et al. 1994). En la primera etapa de la producción se requiere alcanzar una concentración celular de por lo menos 10^{10} bacterias por ml de cultivo en batch, la cual además debe lograrse en un gran volumen. La obtención de estos cultivos a escala industrial no solo va a estar influenciada por los requerimientos microbiológicos propios de la cepa que se quiere hacer crecer, sino también por el nivel tecnológico de escala de cultivo, distribución y aplicación. En tal sentido y a manera de asegurar un éxito industrial se deben tener en cuenta los siguientes aspectos.

- Requerimientos nutricionales de cada tipo de microorganismo.
- Influencia del pH, presión osmótica, temperatura, aireación, biomasa.
- Cambios de escala.
- Equipos de fermentación.

A nivel de los requerimientos nutricionales, la industria puede utilizar tanto los medios de cultivos recomendados en diversos manuales, como Vincent, (1970) o Somesaragan y Hoben (1985) o los que recomiendan los distintos organismos relacionados con el desarrollo agropecuario. En nuestro país, dicha función la desempeña el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), que no solo provee dicha información sino también asistencia técnica, tanto sobre la producción como sobre el manejo de los inoculantes.

Como es de esperar, los requerimientos nutricionales van a estar relacionados directamente con la cepa seleccionada para utilizar en el inoculante. La selección de la cepa va a tener en cuenta su capacidad simbiótica, su adaptabilidad al agroecosistema donde se la utilizará y su capacidad de competir por la nodulación en suelos con poblaciones de (bradi)rizobios autóctonos. Estos tres puntos son de gran interés en los inoculantes ya que se relacionan directamente con su eficiencia final para producir un aumento en el rendimiento del cultivo. En la mayoría de los países con historial de cultivo de leguminosas y de utilización de inoculantes, existen colecciones de cepas de (bradi)rizobios caracterizadas desde el punto de vista simbiótico y ecológico. Estas colecciones están tanto a disposición de investigadores como de empresas de inoculantes. En este punto, cabe destacar que como Estados Unidos fue uno de los pioneros en explotar el potencial de las leguminosas como cultivo de exportación y el primero en patentar un inoculante, no es de sorprender que este país posea una de las mayores colecciones de (bradi)rizobios. Estas cepas presentan una denominación que comienza con USDA (debido a su origen), seguido de un número, y son ampliamente utilizadas a nivel mundial. Particularmente, USDA 110 es la cepa de referencia de *B. japonicum* para la mayoría de las investigaciones, y su genoma ya ha sido secuenciado (Kaneko et al. 2002). En nuestra región esta tarea es llevada a cabo por INTA en Argentina, Embrapa en Brasil y CIAT en Colombia.

1.4.1.1.2. Los soportes.

Se entiende como soportes a las sustancias que permiten proveer un medio adecuado para la supervivencia de los (bradi)rizobios en condiciones infectivas durante un tiempo prolongado, es decir desde que salen del biorreactor y se comercializan hasta que son utilizados en la biofertilización del cultivo de leguminosas. El soporte también debería aumentar la eficiencia de unión de los (bradi)rizobios a las semillas o a la dispersión del inoculante en el suelo. En tal sentido, el primer inoculante patentado contenía gelatina como soporte (Smith 1992). Actualmente los soportes disponibles en el mercado se dividen en soportes líquidos, ya sean acuosos u oleosos y en soportes pulverulentos, como turba, dolomita, o vermiculita. El uso de estos soportes da origen así a los inoculantes líquidos, oleosos o granulados (Perticari et al.1994). Además de las características mencionadas, los soportes deben poseer, entre otras:

- Alta capacidad de retención de agua.
- Uniformidad física y química.
- Biodegradabilidad e inocuidad ambiental.
- Carencia de reactividad biológica (en lo posible, esterilidad).
- Capacidad para admitir suplementos de nutrientes y aditivos.

- Facilidad de manejo, tanto durante la fabricación, como en la administración del inoculante.
- Facilidad de obtención.
- Bajo costo.

Una vez procesados, deben agregarse los rizobios de forma tal que se distribuyan de manera uniforme en la mezcla. A excepción de los inoculantes con soportes líquidos, que suelen ser el mismo caldo de cultivo, el resto de los soportes son esterilizados directamente en el envase comercial y luego se inyectan los (bradi)rizobios, previamente crecidos en un medio líquido, a través de una pequeña perforación, la cual es sellada inmediatamente. Esto logra que se eviten posibles contaminaciones del inoculante, aumentando su duración sin perjudicar la calidad del mismo.

1.4.1.2. Métodos de biofertilización.

Uno de los puntos clave para aprovechar el potencial de los inoculantes es poder lograr una aplicación práctica y de forma adecuada. Esto significa contar con métodos de aplicación del inoculante que de manera sencilla lo distribuyan de forma homogénea ya sea en la semilla o en el surco de siembra, manteniendo el número adecuado de bacterias vivas. De esta forma podemos mencionar tres metodologías, cada una con sus propias ventajas y desventajas en ambos sentidos mencionados más arriba.

- Sobre la semilla.
- Directo.
- Pelletizado.
- Pre-inoculación.
- En línea de siembra.
- En cobertura.

1.4.1.2.1. Directo sobre la semilla.

Este es el método más común de aplicación en los inoculantes. Básicamente consiste en poner a la semilla en contacto con el inoculante antes de realizar la siembra y permitir la adhesión de los rizobios a la superficie del tegumento. Este método, desde el punto de vista práctico, es muy sencillo de utilizar y no requiere maquinarias especiales. Sin embargo, la efectividad con que los rizobios se adhieren a las semillas depende en gran medida del soporte utilizado y de las condiciones en que se realiza la inoculación. En este sentido, se plantea un cierto compromiso en el tiempo de exposición de la mezcla de semilla, adhesivo e inoculante: por un lado se la debe dejar un tiempo lo suficientemente largo para que se produzca la adhesión efectiva, pero lo suficientemente corto como para evitar una excesiva mortandad de los (bradi)rizobios y el secado del adhesivo, que da como resultado una distribución heterogénea de las semillas inoculadas.

1.4.1.2.2. Semillas pelletizadas.

Este método es muy similar al primero pero en vez de realizar la adhesión de las bacterias a las semillas inmediatamente antes de sembrarlas, se realiza un pelletizado sobre las semillas con cal o con sulfato de calcio, de manera tal de generar una cubierta donde las bacterias pueden permanecer viables por períodos más prolongados, protegiéndolas de la acidez o la desecación. Sin embargo, este método enfrenta las mismas desventajas que el anterior.

1.4.1.2.3. Semillas con pre-inoculación.

Teniendo en cuenta que muchas veces el fracaso de la biofertilización se debía a los problemas de la deficiente aplicación del inoculante, el Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA) del INTA-Castelar desarrolla en 1989 el denominado sistema de preinoculación o inoculación anticipada. Esta metodología se basó en desarrollos previos de aplicaciones de curasemillas, que permiten distribuir comercialmente semillas con los agroquímicos ya aplicados, listas para sembrar. Así, el objetivo fue obtener semillas de leguminosas que pudieran almacenarse y distribuirse con el inoculante ya aplicado, lo cual garantiza una uniforme distribución de los (bradi)rizobios por semilla. Además de la ventaja de una aplicación más uniforme del inoculante sobre las semillas, este método no involucra un costo mayor a la inoculación convencional y le ahorra tiempo al agricultor durante la operación de siembra. (Peticari et al. 1994, González 2007).

1.4.1.2.4. Inoculación en el surco de siembra.

Una alternativa al revestimiento de las semillas con el inoculante es realizar la biofertilización directamente en el suelo. Una de las ventajas que presenta este método es que los (bradi)rizobios pueden quedar ubicados en el lugar por donde van a pasar las raíces en crecimiento, con lo cual su llegada a los sitios de infección se ve favorecida con respecto a las otras metodologías. Adicionalmente, presenta la ventaja de que la aplicación del inoculante no se interfiere con la de ciertos agroquímicos que se colocan sobre las semillas y que podrían alterar la viabilidad y/o infectividad de los (bradi)rizobios. Para este tipo de método, los inoculantes líquidos y los granulados son los más propicios, aunque aquellos que contengan como soporte turba también pueden distribuirse de esta manera previa suspensión en agua. Este tipo de inoculación ha demostrado en general mejores respuestas de la nodulación, la FBN y el rendimiento en suelos sin poblaciones alóctonas (Smith, 1992). Este comportamiento también podría esperarse en suelos con poblaciones alóctonas, ya que de esta manera se permite una mejor distribución de los (bradi)rizobios del inoculante, lo que les podría permitir una mejor competitividad para nodular (López-García et al. 2002, 2009, Althabegoiti et al. 2008).

La mayor desventaja de esta metodología es que requiere varias operaciones adicionales al momento de la siembra y, en el caso particular de los inoculantes líquidos o con base en turba, requieren el transporte de grandes volúmenes de agua, lo cual puede ser contraproducente en cultivos extensivos como la soja.

1.4.1.2.5. Inoculación en cobertura.

Este método se basa en distribuir los (bradi)rizobios mediante la utilización de equipos de riego. Si bien no es un método ampliamente difundido, se han reportado aumentos en el rendimiento cuando se lo utilizó como refuerzo en aplicaciones post-siembra (Danso et al. 1990). Su contracara es que su aplicación requiere de inoculantes

líquidos ya que de otro modo pueden quedar partículas en suspensión (procedentes de los soportes sólidos) que obstruyan los conductos de los equipos de riego.

I.4.2. Situación de los inoculantes en Argentina.

Desde su expansión en la década del '70, se consideró necesaria la incorporación de *B. japonicum* o *B. elkanii* a los campos con cultivo de soja. Dado que en su momento esta leguminosa era foránea, no existían (bradi)rizobios noduladores de soja en nuestros suelos. Estos dos hechos favorecieron la obtención de aumentos del rendimiento en respuesta a la biofertilización, haciendo que los productores rápidamente incorporaran esta técnica en sus cultivos. En nuestro país, se puede considerar que la adopción de la técnica de inoculación en los campos con soja es alta. En el 2004 se estimaba que el 87 % de los campos con cultivo de soja eran inoculados y que el 94 % de los productores conocía los beneficios relacionados con dicha técnica, como así también que la mayoría de ellos prefería los inoculantes líquidos.

I.4.2.1. Reglamentación de los inoculantes.

En nuestro país, el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) se encarga de regular y aprobar los nuevos productos utilizados como inoculantes.

Según los registros de ese organismo, disponibles hasta 2006, existen por lo menos 176 marcas comerciales de inoculantes para soja registradas por 75 empresas productoras habilitadas para tal fin. El 70% de dichos productos se corresponden a inoculantes líquidos acuosos y un 20% con sustrato sólido (González 2007).

Sin embargo, un hecho que llama la atención es que no existe la obligación de declarar con qué cepa o cepas se formulan los inoculantes (Anexo A). En tal sentido, desde los comienzos del auge de la soja en nuestro país, el INTA ha tenido un rol determinante, no solo asesorando al productor, sino también llevando a cabo estudios sobre las cepas de rizobios a utilizar en nuestros suelos.

I.4.2.2. Cepas de rizobios utilizadas en los inoculantes.

De la mano de la expansión de la soja, el INTA comenzó en 1980 un programa de selección de cepas, tarea que fue llevada a cabo por el IMYZA. Se postuló que la cepa seleccionada para las formulaciones de nuestros inoculantes debía ser infectiva, efectiva y capaz de adaptarse a nuestros suelos. Si bien tanto *B. japonicum* como *B. elkanii* son las especies más ampliamente utilizadas en la mayoría de los inoculantes comerciales a nivel mundial, sobre todo porque han mostrado eficiencia y efectividad para nodular especies de soja mejoradas (Kuykendall et al. 1992), algunos autores han propuesto que *B. japonicum* es más eficiente para la FBN que *B. elkanii* (Boddey & M. A. Hungria 1994). Por otro lado, se ha observado que *E. fredii* parecería tener un comportamiento dependiente de la región. Por ejemplo, algunos trabajos indican que en China esta especie posee baja eficiencia de FBN (Keyser et al. 1982), sin embargo en España ha demostrado mayor eficiencia de nodulación y FBN cuando se la compara con *B. japonicum* (Buendía-Clavería et al. 1994). Teniendo en cuenta estos trabajos, en 1994 el IMYZA, en conjunto con el INTA-Santa Fe y el Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE) de la UNLP, realizaron una evaluación comparativa de la nodulación y la eficiencia de la FBN de cepas de *B. japonicum*, *B. elkanii* y *E. fredii* inoculadas

sobre distintos cultivares en el área de Reconquista (Santa Fe). Como cepas tipo de *B. japonicum* se utilizó: E109, E109B (variante de laboratorio), CPAC1809, CPAC5118 y SEMIA 5080, de *B. elkanii*: SEMIA 5079, de *E. fredii*: SM-12, H102 y H103. Los resultados indicaron una alta capacidad de nodulación para las cepas de *B. japonicum* y *B. elkanii*, siendo E109B y SEMIA 5080 las más eficientes. En cambio, las cepas de *E. fredii* mostraron una buena eficiencia de nodulación, pero no así de la FBN. Esta evaluación indica que por el momento *E. fredii* no sería apropiada para utilizar en los inoculantes de soja en Argentina.

Dado que *B. japonicum* E109 muestra resultados coincidentes con trabajos anteriores, permanece como cepa recomendada para los inoculantes (Peticari et al. 1996). A partir de ese momento, el INTA comenzó a recomendar la cepa E109 para los inoculantes comerciales. Actualmente se estima que alrededor del 46,5 % de los inoculantes están formulados con E109 y un 19,5 % con E109 más otro/s microorganismos (González 2007).

1.4.2.3. Efectos de la inoculación.

Las estimaciones relacionadas con los niveles de rendimiento indican que, en condiciones ideales, la soja inoculada con (bradi)rizobios podría fijar hasta 450 kg de N por ha (Peticari et al. 2007). Sin embargo, las estimaciones del 2006 indicaron que la FBN aportó un 50 % del total requerido por el cultivo en nuestro país. Además, en regiones como de Concepción del Uruguay o Tucumán, el aporte de la FBN rondó entre 26 y 70 % respectivamente (Gonzalez et al. 2007). Estos resultados pueden estar relacionados con el historial del cultivo de soja en dichas zonas de cultivo.

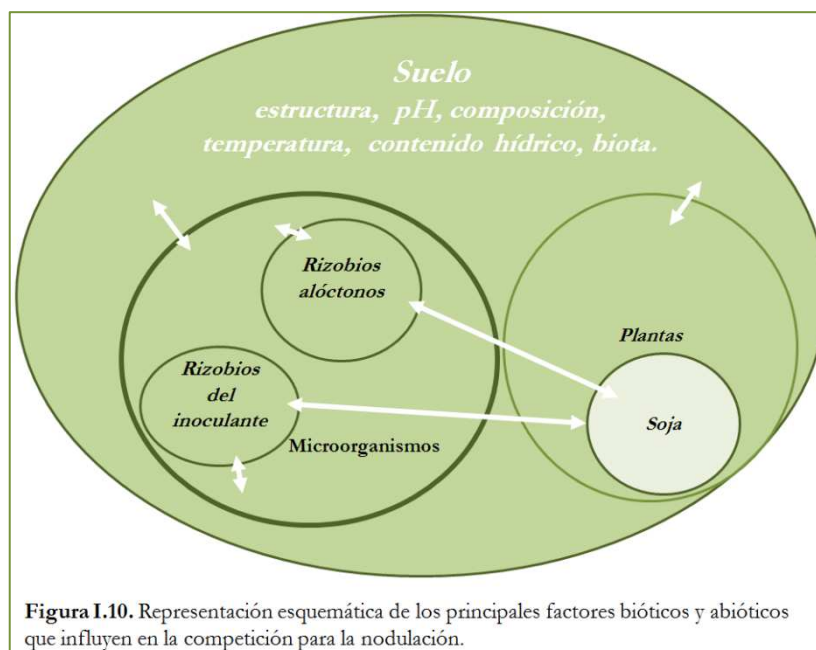
Cuando los niveles de N del suelo son bajos y no hay limitaciones nutricionales, se esperan aumentos del rendimiento mínimos del 50 % gracias a la biofertilización, pero si los suelos presentan historial de cultivo de soja e inoculación, dichas respuestas a la biofertilización resultan muy variables (Peticari et al. 2007). La pregunta que se desprende de esto es ¿a qué se deben las diferencias en la respuesta del rendimiento?

1.4.3.3.1. Limitaciones de la simbiosis (bradi)rizobio-leguminosa.

Para comenzar, debemos tener en cuenta que la simbiosis (bradi)rizobio-leguminosa es un proceso biológico, y por lo tanto, posee dos actores principales: la soja y el inoculante, relacionados entre sí por el ambiente edáfico. Así, podemos clasificar a los factores que van a estar influenciando dicho proceso en tres grandes grupos:

- Relacionados con las características del inoculante.
- Relacionados con las características de la soja.
- Relacionados con la influencia del ambiente edáfico sobre el par soja-inoculante.

Como veremos más adelante, este último grupo, que posee un peso muy significativo, es frecuentemente ignorado en los estudios de laboratorio. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la simbiosis no ocurre como un proceso aislado, determinado por las características intrínsecas de sus dos socios, sino que más bien es la conjunción de los tres aspectos, es decir que es un proceso complejo que depende de diversas variables interrelacionadas entre sí (Fig. I.10.). Con respecto a las características del inoculante, los



bradirrizobios presentes en el mismo han sido seleccionados de forma tal de ser eficientes y efectivos en la FBN. Por su parte, las variedades de soja utilizadas para los cultivos también han sido mejoradas genéticamente, aunque su capacidad de asociarse con los bradirrizobios para la FBN no suele ser un carácter tomado en cuenta especialmente en los planes de mejoramiento. Esto puede resultar serio, ya que la vía metabólica de asimilación del N a partir de ureidos está catalizada por un conjunto de enzimas diferente al de la vía de asimilación del N a partir de NO_3^- , con lo cual los alelos seleccionados en programas de mejoramiento donde las plantas se hayan cultivado en suelos ricos y/o con el aporte de fertilizantes nitrogenados pueden no ser de utilidad para asimilar eficientemente el N proveniente de la FBN.

A nivel de las condiciones edáficas, uno de los factores que limitan la FBN en soja es la presencia de formas combinadas de N en el suelo. En particular, la disponibilidad de formas combinadas de N como NO_3^- van a retardar el inicio de la nodulación y/o van a inhibir el funcionamiento de la nitrogenasa (Lett et al. 1998). En tal sentido, los suelos de la región central y Sureste de Buenos Aires, presentan altas concentraciones de materia orgánica y altas tasas de mineralización (Echeverría & Bergonzi, 1995), con lo cual las concentraciones de esta forma de N combinado podrían ser significativas. Otro aspecto que limita y condiciona la simbiosis es el pH del suelo (Nápoles et al. 2000). Se ha observado una relación inversa con los valores de este parámetro y las concentraciones de Al^{3+} y Mn^{2+} en el suelo. En particular se ha observado que los (bradi)rizobios, más allá de sus niveles de tolerancia a la acidez, los cuales varían entre especies y aún entre cepas de la misma especie, son sensibles a aquellos iones, siendo los rizobios en general más sensibles que los bradirrizobios. También se ha observado que a pH ácidos el proceso de simbiosis es alterado, disminuyendo la tasa de simbiosis exitosa (Zahran 1999). Nuestros suelos, dependiendo de la región, tienen valores de pH con tendencia a la acidez, lo cual podría tener cierta influencia en la FBN y su impacto en el rendimiento.

Por último, en suelos con historial de cultivo de soja y biofertilización, se observa que a lo largo de las sucesivas biofertilizaciones se desarrollan poblaciones de (bradi)rizobios naturalizados, denominados (bradi)rizobios alóctonos. Estos (bradi)rizobios

representan ahora una tercer variable —biótica— dentro del proceso biológico de la simbiosis inoculante-soja, que nuevamente está relacionada con el ambiente edáfico. Las altas tasas de FBN son más bien una necesidad humana que una característica evolutivamente determinante para la sobrevivencia de los (bradi)rizobios en el suelo o en simbiosis, análogamente a otros caracteres de interés agronómico, como la alta producción de granos o las uniformidades en la altura de planta o la fecha de floración, que no son seleccionados favorablemente en las poblaciones de plantas silvestres. Por ello, no es de sorprender que los rizobios alóctonos presenten una tasa de FBN heterogénea. Pero por otro lado, la capacidad de nodular, sí resultaría un rasgo adaptativo, dado que el nódulo puede verse como un ambiente protector. Así, al introducir poblaciones de (bradi)rizobios año a año con la repetida biofertilización, se van introduciendo al suelo bacterias que logran naturalizarse, pudiendo perder sus altas tasas de FBN pero conservando una infectividad alta. Esto llevaría a que en cada nueva biofertilización los (bradi)rizobios del inoculante encuentren una población alóctona cada vez más eficiente para ocupar los limitados sitios de infección en las raíces y por lo tanto, al ocupar una proporción de nódulos cada vez menor, la aplicación del inoculante no siempre produzca un aumento del rendimiento (Thies et al. 1991, González 2007, Peticari et al. 2007, Pérez-Giménez et al. 2010). Dada la importancia de este fenómeno como un problema relacionado directamente con la falta de respuesta del rendimiento a la biofertilización, se lo ha denominado “el problema de la competencia para la nodulación”. Este fenómeno ha cobrado vital importancia como cuello de botella para el éxito de la biofertilización, dado que actualmente la mayoría de los suelos en donde se cultiva soja presentan una dilatada historia previa de cultivo con esa leguminosa. Como el problema de la competencia para la nodulación depende de diversas variables relacionadas entre sí, en la siguiente sección haremos una descripción detallada del mismo.

I.5. La competencia para la nodulación.

En la sección anterior mencionamos solo algunas de las variables que condicionan la respuesta del rendimiento de los cultivos de soja a la biofertilización. Como pudo apreciarse, se trata de muchas variables que además interactúan entre sí, con lo cual analizar su influencia en el rendimiento es muy complejo. Sin embargo, pudimos poner énfasis en una de las variables: la presencia de (bradi)rizobios alóctonos del suelo que van a competir por la nodulación con la nueva cepa introducida al realizar la biofertilización, ya que esta limitante ocurre en todos los suelos con historial de cultivo de soja, independientemente del resto de las variables edáficas, ya sea bióticas o abióticas. Esta idea subyace desde hace años, debido a que en suelos con historial de cultivo de soja, se observa sistemáticamente que solo entre un 5 a 20 % de los nódulos totales son ocupados por la cepa del inoculante (McDermott & Graham 1989). Si recordamos, por un lado, que los nódulos constituyen un ambiente favorable para los (bradi)rizobios y por otro lado, que solo uno de cada mil (bradi)rizobios de los que colonizan la rizósfera puede penetrar en un nódulo, se comprende que la competencia que se genera entre los (bradi)rizobios individuales por abrirse paso hacia ese ambiente protector es muy intensa. Así, podemos definir al problema de la competencia para la nodulación como la interacción competitiva entre dos o más genotipos de (brady)rizobios por penetrar los limitados sitios de infección de las raíces y alcanzar exitosamente las zonas (sub)corticales para colonizar al nódulo en formación, en un ambiente edáfico particular, cuyas características pueden influir dicha competencia. Por lo tanto, una manera de realizar un acercamiento a la comprensión de la problemática es evaluar por un lado qué características intrínsecas posee cada una de las poblaciones en

competencia y por otro lado, qué condiciones del ambiente las pueden poner en ventaja a una sobre otra. De la mano de esta comprensión, se podría mejorar la calidad de las cepas de los inoculantes, no solo desde el punto de vista de su eficiencia y efectividad, sino también de su competitividad. A continuación nos centraremos en las características principales que pueden estar influenciando o aventajando la competencia para la nodulación.

I.5.1. Los suelos, su dinámica y su biodiversidad.

El suelo puede verse como uno de los ecosistemas más complejos y diversos, con una estructura que lo caracteriza. Un suelo está compuesto por partículas minerales de distintos tamaños, que se clasifican en arcilla (menos de 2 μm), limo (entre 2 y 50 μm) y arena (entre 50 μm y 2 mm). Así, las proporciones relativas de cada tamaño de partícula que conforman el suelo definen su textura, que en consecuencia puede clasificarse a grandes rasgos en arcillosa, limosa y arenosa. Además, el suelo posee materia orgánica con distintos grados de descomposición, llegando hasta las sustancias húmicas, que cumplen funciones cementantes de las partículas minerales del suelo. Así, con cada textura se forman estructuras estables, que pueden visualizarse como terrones, dentro de las cuales existen distintos tipos y tamaños de poros que determinan la capacidad de retención de agua y la aireación del suelo.

Los tipos de organismos presentes en el suelo presentan una gran diversidad, cuya magnitud depende de las condiciones del suelo, las especies vegetales presentes, como así también el historial de cultivos realizados en el mismo (Watt et al. 2006). En un suelo agrícola típico, las raíces representan la mayor fracción del material biológico. De esa fracción una porción corresponde a raíces muertas, ya sea de plantas vivas o de remanentes de cultivos anteriores, pero todas ellas van a estar formando parte de la rizósfera, que es un ambiente mucho más rico que el suelo no rizosférico (cf. I.3.2.1).

Los organismos presentes en la rizósfera dependerán en gran medida de las condiciones del suelo y de las especies vegetales, pero a grandes rasgos las bacterias y los hongos constituyen la fracción de biomasa más grande, incluyendo (bradi)rizobios, bacterias filamentosas, solubilizadoras de fósforo, fijadoras de N_2 de vida libre y micorrizas. Las densidades de la población bacteriana pueden variar en hasta tres órdenes de magnitud, dependiendo del ambiente. En el suelo también se encuentra una microfauna, como protozoos y nematodos, que van a estar interactuando con las poblaciones de microorganismos (Gupta 1994). Por su parte, la mesofauna del suelo está formada por lombrices, colémbolos y artrópodos como ácaros, termitas y hormigas, todos los cuales cumplen un papel importante en el movimiento de las partículas del suelo, la formación de poros y la dispersión de la microbiota. La porosidad del suelo influye no solamente en el crecimiento de las raíces, sino que resulta esencial para el establecimiento de las poblaciones bacterianas.

La biota del suelo condiciona la evolución del mismo, de acuerdo con la composición y tasa de degradación de la materia orgánica que genera, lo cual a su vez puede modificar el pH y la composición iónica del suelo y en último término, la propia biodiversidad. Es decir, el suelo es un ambiente vivo y dinámico, razón por la cual es muy complejo y cambiante en tiempo y espacio. Por lo tanto, las poblaciones (bradi)rizobianas presentes dependerán en parte del tipo de suelo donde se encuentren. Sin embargo hay

ciertas características de los (bradi)rizobios que se mantienen independientemente del tipo de suelo.

Diversos trabajos han demostrado que los rizobios pueden persistir en vida libre durante largos periodos de tiempo (McLoughlin et al. 1990, Sadowski & Graham, 1998). En particular, pueden adherirse a todo tipo de superficies vivas o inertes, como podrían ser superficies de raíces o restos celulares. Muchas veces, la persistencia de los rizobios puede relacionarse con la capacidad de formar biopelículas, microcolonias estructuradas dentro una matriz de polímeros extracelulares –entre los que predominan los EPS– con microcanales por donde circulan agua y nutrientes (Parsek & Fuqua 2004, Danhorn & Fuqua 2007). Se ha observado que las bacterias Gram-negativas son mucho más resistentes en las biopelículas que en el estado planctónico frente a una diversidad de agresiones, como por ejemplo antibióticos, luz ultravioleta, desecación y predadores. (Stoodley et al., 2002). En el caso de *B. japonicum*, la formación de biopelículas se ve favorecida por la lectina de soja bajo condiciones de laboratorio, pero podría suponerse que en el suelo, los restos de raíces de soja podrían liberar lectina y actuar como núcleos de formación de biopelículas en las zonas donde anteriormente hubo rizósferas de soja. Dado que la lectina de soja es una proteína extraordinariamente estable, esto podría beneficiar la persistencia del bradirrizobio en el medio edáfico, especialmente en microambientes que previamente hayan sido moldeados de alguna manera por la simbiosis (Pérez-Giménez et al. 2009). Por otro lado, se ha observado que en situaciones de escasez de N, *B. japonicum* aumenta la síntesis de EPS (López-García et al. 2001). Este hecho nuevamente pondría de manifiesto que *B. japonicum* podría formar biopelículas para sobrevivir durante largos periodos en suelos pobres en N.

Aparte de la interacción con las leguminosas, se ha observado que los (bradi)rizobios interactúan con otros organismos que forman parte del ecosistema en el suelo. Madsen y Alexander (1982) han observado que las lombrices del suelo son agentes muy activos en la dispersión de los bradirrizobios. Posteriormente, Horiuchi et al. (2005) han registrado un comportamiento similar con los nematodos. También se ha observado que los microorganismos con actividad promotora del crecimiento (PGPR) interactúan con los (bradi)rizobios de manera beneficiosa, promoviendo la simbiosis (Nelson 2004).

Las poblaciones de (bradi)rizobios son en general muy diversas. Se estima que en suelos con cultivos de soja estas poblaciones se encuentran en un rango de entre 10^5 y 10^7 bacterias por gramo de suelo en las proximidades de la raíz (Pérez-Giménez et al. 2010). Diversos trabajos han mencionado que en suelos con historial de cultivo de soja la diversidad de (bradi)rizobios es mayor a la que podría esperarse (Hungria et al. 2006, M. Loureiro et al. 2006, Gomes Barcellos et al. 2007, Melchiorre et al. 2010) así por ejemplo en Mato Grosso, Brasil, se observó que en suelos que no presentaban (bradi)rizobios, luego de 18 años de inoculación se observaron nueve perfiles genéticos distintos a las cepas de los inoculantes (Loureiro et al. 2006). Para explicar estos niveles de diversidad, algunos autores han propuesto que aunque un determinado genotipo inicialmente se encuentre con una baja frecuencia, podría aumentar rápidamente si consigue invadir de manera eficiente los nódulos de la leguminosa (Provorov & Vorobyov 2000). Así, la capacidad de competir eficientemente por la nodulación podría ser heredada en poco tiempo desde unos pocos individuos hacia una población mucho mayor. Esta adaptación podría perfeccionarse por medio de transferencia horizontal de material genético, lo cual permitiría la dispersión de la capacidad competitiva de la mano de una alta diversidad genotípica. También se ha reportado que los rizobios alóctonos podrían tener un comportamiento muy competitivo

pero deficiente para la fijación de N_2 , con respecto a las cepas de los inoculantes, sobre la base de estudios realizados con aislamientos de suelos del medio-oeste de Estados Unidos (Sadowsky & Graham 1998). De manera análoga, en suelos de Hawái se ha observado que la presencia de 10 a 100 rizobios noduladores por gramo de suelo resulta suficiente para impedir el efecto de la biofertilización sobre el rendimiento de cultivos de poroto (Thies et al. 1991). Sin embargo, ambas observaciones han sido realizadas en Estados Unidos con (brady)rizobios de suelos con características distintas a los nuestros, por lo cual no necesariamente debería ocurrir lo mismo en Argentina. En nuestro país se ha observado que en provincias del NOA, como Salta y Tucumán, se encuentran cepas autóctonas que promueven mayores rendimientos en cultivos de soja con respecto a *B. japonicum* E109 (Peticari et al. 1998). Por otro lado Melchiorre et al. (2011) han observado una alta diversidad en poblaciones autóctonas de bradirrizobios noduladores de soja aislados de 10 zonas con historial de cultivo de esta leguminosa, en algunas de las cuales había poca representatividad de E109 y una tasa de FBN similar a la de esta cepa.

I.5.2. Los inoculantes y la posición de los (bradi)rizobios en el suelo.

Según la resolución del SENASA (Apendice A), los inoculantes deben contener por lo menos una concentración de 10^8 (bradi)rizobios vivos por ml o g a la fecha de vencimiento. Sin embargo, una semilla bien inoculada puede contener entre 10^5 y 10^6 bacterias y se estima que aproximadamente el 80 % de ellas mueren dentro de las primeras dos horas transcurridas después de la inoculación (Streeter 2007). Además, mencionamos que muchas de ellas quedan adheridas a los tegumentos de los cotiledones por lo cual, al desarrollarse la plántula y emerger los cotiledones de la superficie, las llevan consigo fuera del suelo. Por lo tanto, si consideramos todos los eventos desde la inoculación hasta que se inicia el enraizamiento, las bacterias del inoculante quedarían en desventaja competitiva frente los (bradi)rizobios autóctonos, que para ese momento ya están distribuidos en el perfil de suelo que va a ser ocupado por la rizósfera, en una concentración aproximada de 10^5 a 10^7 (bradi)rizobios por gramo de suelo. Es decir que los (bradi)rizobios autóctonos ya están presentes en las cercanías de las posibles zonas de infección de las raíces que, debemos recordarlo, se mantienen en el estado infectable durante un periodo muy estrecho. De este modo, solo una muy rápida movilidad permitiría a las pocas bacterias del inoculante remanentes en los alrededores del cuello de la raíz llegar a las zonas infectables antes que los (bradi)rizobios de la población autóctona. Esta exigencia se hará tanto más intensa a medida que las raíces crezcan, llevando las zonas de los pelos emergentes cada vez más lejos del cuello de la raíz.

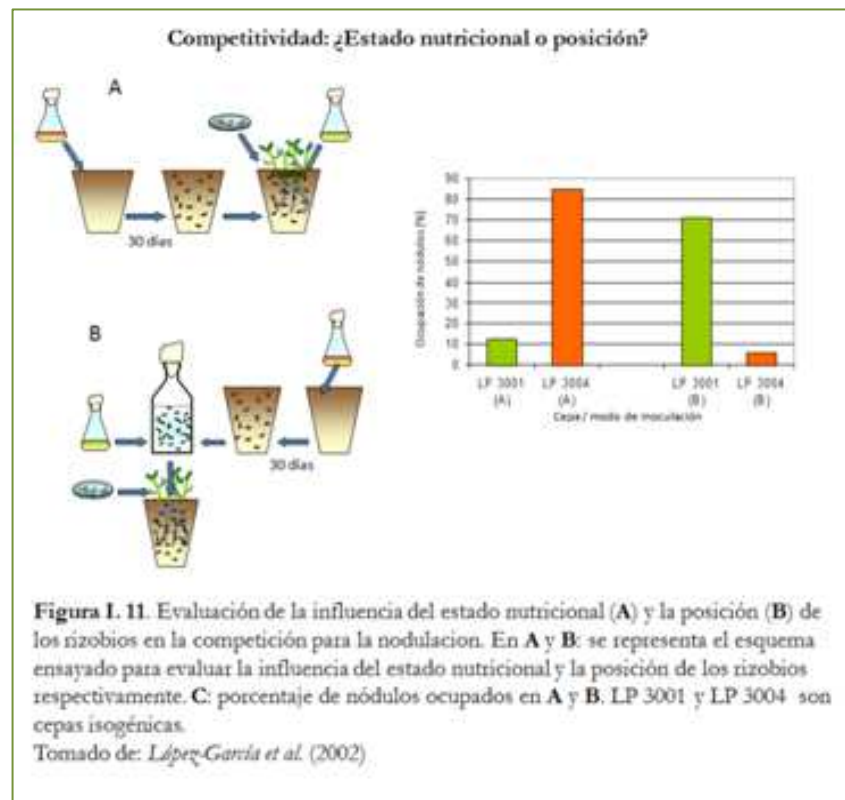
Los (bradi)rizobios son bacilos móviles, y responden quimiotácticamente a diversas sustancias como las que son exudadas por las raíces a la rizósfera (Caetano-Anollés et al. 1988, Barbour et al. 1991, Kurdish 2002, Brencic & Winans 2005). Estas propiedades han llevado a la creencia de que los (bradi)rizobios son capaces de moverse hacia las raíces atraídos por los exudados de las mismas a una velocidad lo suficientemente alta como para que esa movilidad efectivamente los lleve desde la zona del cuello de la raíz hasta los sitios de infección en la zona de los pelos emergentes. Esta hipótesis se apoya en diversos trabajos, entre ellos que mutantes defectivos en la movilidad son incapaces de realizar la colonización radical disminuyendo la tasa de nodulación (Caetano Mellor et al. 1981), observaciones microscópicas de bacterias vivas dirigiéndose hacia la zona de los pelos emergentes (Gulash et al. 1984) mediciones de dispersión rizobiana en forma horizontal en las capas superficiales del suelo (Lowther & Patrick 1993), o la incapacidad de mutantes alterados en quimiotaxis para competir por la nodulación (Yost et al. 2003). De esta

manera, durante años se ha postulado que tanto la quimiotaxis como la movilidad de los (bradi)rizobios juegan un rol determinante a la hora de posicionarlos de manera más eficiente en los sitios de infección. Así, los (bradi)rizobios con deficiente movilidad deberían ser poco competitivos comparados con las cepas móviles (González & Marketon 2003, Yost et al. 2003, Fujishige et al. 2006). Sin embargo, el defecto común que presentan estos trabajos es que se llevaron a cabo en medios líquidos, o con raíces sobre superficies de agar, o en el mejor de los casos, en medios porosos saturados de agua. Estas condiciones no representan al medio edáfico, el cual, como veremos enseguida, tiene profundas diferencias con un medio líquido homogéneo. Por lo tanto, si bien no podemos negar que los rizobios se mueven y que en efecto responden a los quimioattractantes, esto no es suficiente como para concluir que las propiedades que determinan la movilidad y la quimiotaxis en medios líquidos también rijan el posible acercamiento de los (bradi)rizobios a las raíces en el suelo.

Por otra parte, se ha propuesto que la desventaja en la competición para la nodulación podría estar relacionada con diferencias en el estado fisiológico entre las bacterias del inoculante y las autóctonas. Por un lado se supone que las bacterias autóctonas se encuentran en un estado nutricional deficiente con respecto a las de los inoculantes, las que provienen de un medio de cultivo rico, necesario para llegar a la concentración antes mencionada. De esta manera, se supone que las primeras están en algún estado de inanición y por lo tanto tienen mayor voracidad para colonizar la rizósfera e infectar las raíces. Esta propuesta se fundamenta en aumentos observados en la adhesividad e infectividad de (bradi)rizobios incubados en solución mineral o con limitaciones de nutrientes (Lodeiro & Favelukes 1999). De manera correspondiente, se ha observado que bradirrizobios crecidos con limitación en la fuente de N aumentan la expresión de *nodC* (López-García et al. 2001). Sin embargo, también se ha reportado la existencia de genes como *nfe* (por sus siglas en inglés de “nodule formation efficiency”) que codificarían funciones relacionadas con la competitividad intrínseca de las bacterias. Estos genes se relacionarían con la eficiencia en la nodulación y competición pero no jugarían un papel para establecer el proceso simbiótico (Toro 1996).

En 2002, López García et al. pusieron a prueba estas propuestas. Inocularon macetas con vermiculita con una cepa de bradirrizobios, a la que incubaron durante 30 días en ausencia de plantas, con el fin de simular el establecimiento de una “población autóctona”. Dado que durante todo ese tiempo estos bradirrizobios solo recibieron solución mineral libre de fuentes de C y N, la incubación condujo a un estado de inanición de la población. Finalizado el periodo de incubación, en una parte de las macetas sembraron soja inoculada en las semillas con una cepa isogénica y de la otra parte de las macetas extrajeron la “población autóctona”, la que fue mezclada en forma homogénea en medio líquido con las bacterias del “inoculante” y con esa mezcla regaron macetas nuevas en las que se sembró soja sin inocular (Fig. I.11.). Cultivaron las plantas para permitir la nodulación, y observaron que cuando el inoculante era colocado sobre las semillas, casi no ocupaba nódulos, tal como se esperaría de acuerdo con la hipótesis de que la inanición de la “población autóctona” la volvía más competitiva. Sin embargo, esto no se confirmó en el otro grupo de macetas, donde las bacterias del “inoculante” ocuparon casi el 90 % de los nódulos cuando estuvieron distribuidas homogéneamente en la maceta, al igual que la “población autóctona” hambreada (Figura I.11.). De este experimento se desprende que fue la posición de los bradirrizobios respecto de las raíces, y no su estado nutricional, la que jugó el rol determinante en la competición para la nodulación. Como corolario, estos

resultados estuvieron de acuerdo con la hipótesis de que la movilidad vertical de los bradirrizobios en un medio poroso no saturado de agua es escasa, la cual se apoya en el trabajo de Madsen y Alexander (1982), donde los autores reportaron que el desplazamiento de los bradirrizobios en el suelo a capacidad de campo se logra por un transporte pasivo sobre las lombrices o arrastrados por el agua luego de un riego o por la misma acción de la labranza, el trabajo de Mc Dermott y Graham (1989), quienes observaron que la población de *B. japonicum* inoculado sobre semillas disminuye a lo largo de la raíz a medida que aumenta la distancia desde el punto de inoculación, el trabajo de Liu et al. (1989) quienes observaron que mutantes no móviles de *B. japonicum* compitieron eficazmente por la nodulación frente a la cepa salvaje en un suelo a capacidad de campo, y el trabajo de Horiuchi et al. (2005), donde se demuestra que *E. meliloti* no se desplaza en un suelo a capacidad de campo a menos que sea llevado en forma pasiva sobre la superficie o dentro del tracto intestinal de los nematodos. Estos resultados plantean, entonces ¿cómo llegan los rizobios a las raíces?



A priori podemos proponer dos hipótesis no mutuamente excluyentes. La primera de ellas implica el hecho conocido de que a medida que la planta se desarrolla las raíces también lo hacen en busca de nuevos nutrientes, así podríamos plantear que a medida que las raíces se desplazan en el suelo van “barriendo” microcolonias de (bradi)rizobios que se encontraban distribuidas como pequeñas biopelículas, de las cuales, aquellas que por casualidad entren en contacto con la zona infectable de la raíz podrían liberar (bradi)rizobios que comiencen la infección de inmediato. La segunda hipótesis se relaciona

con la posible movilidad de los (bradi)rizobios hacia las raíces, lo cual, como ya vimos, en el suelo solo podría ocurrir en distancias cortas y a baja velocidad.

Si recordamos la estructura de un suelo, en el mismo existen poros de distintos diámetros. Estos poros permiten distintos niveles de retención de agua luego de una lluvia o riego, como así también la constitución de distintos nichos. A grandes rasgos podemos mencionar que cuanto más chico sea el diámetro del poro, mayor será su retención del agua, permitiendo clasificarlos en poros capilares, cuyo tamaño oscila entre 0,1 y 6 μm en los cuales el agua es retenida con mayor fuerza que la gravedad, y poros no capilares de donde el agua gravitacional drena fácilmente. De esta manera se esperaría que los poros capilares formen hábitats favorables para las bacterias y que presenten pequeños canales discontinuos por dentro de los cuales las mismas podrían desplazarse (Bohn et al. 2001). Sin embargo, el camino de las bacterias por estos poros es muy tortuoso. Puede estimarse que, a la velocidad que nada *B. japonicum* (Kanbe et al. 2007) una bacteria que recorra poros capilares se irá encontrando y chocando con la superficie de una partícula de suelo cada menos de un segundo. Dado que el sistema de quimiotaxis le permite a estas bacterias nadar en línea recta en un líquido durante tres o cuatro segundos cuando son atraídas por un quimioattractante pero no permite el nado en línea recta por más de un segundo cuando el quimioattractante está ausente, es difícil imaginar cuál puede ser la utilidad de este sistema para desplazarse en el suelo, si es que pretendemos extrapolar el comportamiento en medio líquido al comportamiento en el suelo. Los trabajos realizados en medios porosos indican que aquí la quimiotaxis no juega un papel tan importante, siendo más determinante la capacidad de las bacterias para cambiar de dirección (Barton & Ford 1995, Liu & Ford 2009). Estos cambios de dirección serían los que le permitirían a la bacteria ya sea esquivar las partículas de suelo o bien salir de su superficie después de haber chocado con ellas (Liu & Ford 2009, Jimenez-Sanchez et al. 2012). Si bien los cambios de dirección también están gobernados por el sistema de quimiotaxis, en este contexto no cumplirían el rol de responder a la “atracción” que las sustancias “quimioattractantes” ejercerían sobre la bacteria.

En este sentido, Althabegoiti et al. (2011) realizaron un experimento que podría dar un indicio de la extensión de cada uno de los movimientos antes mencionados: la raíz hacia los bradirrizobios o los bradirrizobios hacia la raíz. Los autores coinocularon plantas de soja con dos cepas de *B. japonicum*: una cepa salvaje y otra mutante derivada de la primera, que no poseía flagelos y por lo tanto, no era móvil. Cuando se midió la competición para la nodulación entre estas dos cepas en macetas con vermiculita a capacidad de campo, prácticamente no hubo diferencias en los porcentajes de ocupación de nódulos por parte de una y otra, pese a que una era completamente móvil y quimiotáctica y la otra no. Sin embargo, cuando el experimento se realizó en paralelo con macetas que se mantuvieron inundadas durante todo el ensayo, la cepa salvaje ocupó más del 85 % de los nódulos. Estos resultados indicaron que solo bajo condiciones de total anegamiento la movilidad de los bradirrizobios hacia la raíz jugó un papel importante en la competición para la nodulación, sin embargo, en condiciones de capacidad de campo el movimiento de las raíces hacia los rizobios parece haber sido el más determinante. Volveremos sobre este punto más adelante, ya que parte del trabajo de esta Tesis estará dirigido a plantear un modelo de cómo estos movimientos podrían estar ocurriendo en el suelo y cómo esto puede condicionar la competitividad para nodular frente a poblaciones alóctonas.

I.5.3. La inoculación en el surco de siembra y el mejoramiento de la movilidad de *B. japonicum* pueden incrementar el rendimiento del cultivo de soja.

De acuerdo con los resultados de los experimentos en medios porosos no saturados, en nuestro laboratorio se planteó la posibilidad de que el método de inoculación en semillas no sería el más apropiado para la biofertilización cuando el suelo donde se va a implantar el cultivo contiene una población autóctona de bacterias noduladoras. Entonces, en la campaña 2002/2003 se realizó un ensayo en Marcos Juárez donde en un suelo con población autóctona se comparó la inoculación en semilla con la inoculación en el surco de siembra, en ambos casos con un inoculante líquido, ya que la inoculación en el surco de siembra permitiría una mejor distribución de los bradirrizobios en el suelo. Como resultado, se observó que la inoculación en el surco de siembra permitió duplicar el porcentaje de ocupación de nódulos por parte del inoculante, lo cual fue acompañado por un aumento en el rendimiento (Tesis Doctoral, López García, SL. 2004.)

Posteriormente, Althabegoiti et al. (2008) pudieron obtener una cepa con movilidad aumentada a partir de *B. japonicum* USDA 110 gracias a un proceso de selección artificial. Esta cepa, llamada LP 3008, presenta una mayor movilidad en agar semisólido con respecto a su cepa parental. Al evaluar esta cepa, los autores observaron que presenta una cinética de crecimiento igual a su parental, con lo cual la generación de halos de movilidad de mayor diámetro no puede atribuirse a una diferencia de crecimiento. Su quimiotaxis hacia manitol y aminoácidos, y su capacidad de adhesión e infectividad a raíces de soja en medios líquidos fueron mayores que en la parental, pero no así su movilidad sobre las raíces en tubos con vermiculita a capacidad de campo.

Para evaluar su comportamiento a campo, se comparó la competencia para la nodulación de LP 3008 y la cepa salvaje en cuatro localidades diferentes, es decir frente a distintas poblaciones autóctonas, tanto con inoculación en semilla como con inoculación en el surco de siembra. Si bien las dos cepas ocuparon más nódulos cuando fueron inoculadas en el surco de siembra que cuando fueron inoculadas en semillas, en general LP 3008 fue la que ocupó más nódulos. Además, el rendimiento en grano de estos cultivos experimentales se incrementó significativamente, en forma correlacionada con el aumento de ocupación de los nódulos por la cepa inoculada (Althabegoiti et al. 2008, López García et al., 2009). Por lo tanto, el aumento de la movilidad en LP 3008 no solo impactó positivamente en la competitividad para nodular a campo, sino que este aumento de competitividad para nodular se tradujo en un aumento del rendimiento en grano del cultivo de soja gracias a la simbiosis, lo cual es el objetivo final de todos estos trabajos de mejoramiento microbiológico. Estas capacidades de LP 3008 se vieron favorecidas por la inoculación en el surco de siembra.

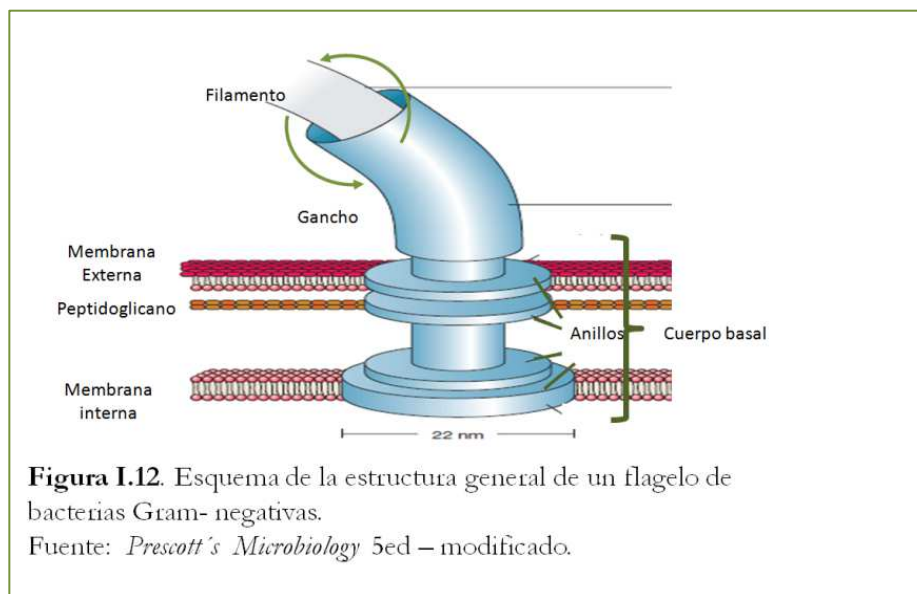
Estos resultados vuelven a poner de manifiesto la complejidad del sistema edáfico, donde se han realizado muy pocos estudios vinculando la movilidad de los (bradi)rizobios y la simbiosis. Es posible que los (bradi)rizobios se movilicen en los cortos periodos de anegamiento luego de las lluvias y que ello contribuya a su distribución en el suelo para favorecer su encuentro con las raíces en crecimiento. Sin embargo, no es sencillo disectar estos fenómenos, no solamente por la complejidad del sistema edáfico, sino también porque los (bradi)rizobios pueden moverse de distintas maneras (no solamente mediante el conocido movimiento de natación), con lo cual deben considerarse los otros movimientos que el inoculante podría realizar. Por lo tanto, en las próximas secciones realizaremos una

descripción del sistema locomotor de *B. japonicum* USDA 110, como así también cuáles podrían ser los tipos de movimiento que realice esta cepa teniendo en cuenta las características del suelo.

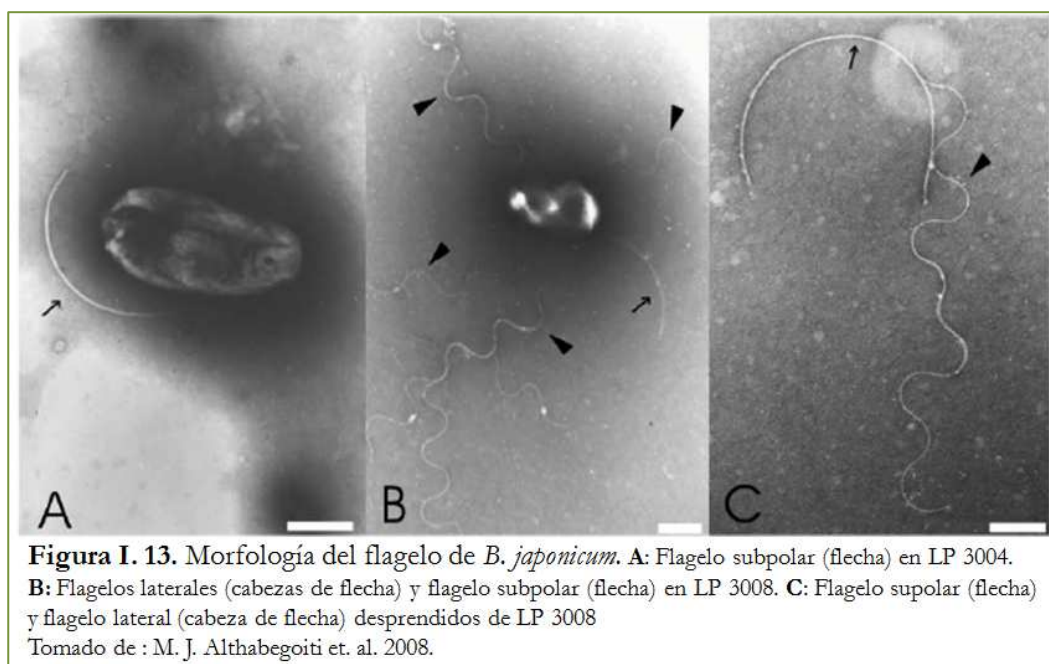
I.6. *B. japonicum* USDA 110 y sus flagelos.

Al igual que otros (bradi)rizobios, *B. japonicum* USDA110 comparte la mayoría de las características de vida libre y simbiosis que sus pares, sin embargo esta cepa posee una particularidad que la distingue del resto, y es que presenta flagelación mixta (Kanbe et al. 2007, Althabegoiti et al. 2011). Esta característica la comparte con un grupo muy reducido de bacterias de otras especies, como *Vibrio parahaemolyticus* (Shinoda & Okamoto, 1977), *Vibrio alginolyticus* (Kawagishi et al., 1995), *Aeromonas spp.* (Shimada et al., 1985), *Azospirillum brasilense* (Tarrand et al., 1978, Hall & Krieg, 1983), *Rhodospirillum centenum* (McClain et al., 2002), *Helicobacter mustelae* (O'Rourke et al., 1992) y *Plesiomonas shigelloides* (Inoue et al., 1991) (Merino et al. 2006, Merino & Tomas 2009). La flagelación mixta observada en *B. japonicum* implica que cada uno de los flagelos posee una estructura y un sistema de control de la expresión independiente del otro (Kanbe et al. 2007, Althabegoiti et al. 2011).

Los flagelos son las estructuras de locomoción más ampliamente distribuidas en bacterias y arqueas (McCarter 2004), en su construcción y movimientos participan más de 40 proteínas diferentes, codificadas en genes estrictamente regulados (McCarter 2006). La estructura general de los flagelos presenta tres partes bien definidas: el cuerpo basal, que es la parte que se inserta en las membranas celulares y que posee un motor que es el que va a permitir el movimiento de giro, el filamento, que es la estructura más externa y visible, y el gancho, que es la conexión entre el cuerpo basal y el filamento (Fig. I.12). Este filamento está formado por la polimerización de miles de moléculas de flagelina, una proteína cuyo tamaño molecular en general es de alrededor de 30 kDa, pero que puede llegar a tener más de 70 kDa en algunas especies.



Es decir que la unidad estructural del filamento es la flagelina. Así, se suele clasificar a los flagelos en simples o complejos, dependiendo del número de flagelinas distintas que los constituyen. En *B. japonicum* ambos flagelos son complejos. Uno de los flagelos está formado por cuatro flagelinas, conocidas como FliC1, FliC2, FliC3 y FliC4 (Kanbe et al. 2007), cada una de las cuales poseen una masa molecular de 65 kDa y se encuentran codificadas por los genes *bll5843*, *bll5844*, *bll5845* y *bll5846* respectivamente según la nomenclatura del genoma definida por Kaneko *et al.* (2002). Este flagelo tiene una ubicación subpolar y una forma relajada cuando se lo observa al microscopio electrónico de transmisión (MET). El otro flagelo está formado por dos tipos de flagelinas codificadas por los genes *bll6866* y *bll6865*, cuya masa molecular es de 33 kDa cada una. Estas proteínas fueron denominadas por Kanbe et al. (2007) FliCI y FliCII, basados en el modelo de *Salmonella* (Kanbe et al. 2007). Sin embargo, estos flagelos son inducibles, y al realizar observaciones al MET, se observa que presentan ubicación lateral o peritrica y una forma más sinusoidal (Fig. I.13.), por lo cual nosotros proponemos renombrarlas LafA1 y LafA2 respectivamente, de acuerdo a la definición dada por Merino y Tomás (S. Merino & Tomás 2009). Los genes que codifican tanto las flagelinas subpolares como las laterales, son, en todos los casos, monocistrónicos (Tesis Doctoral, M. J. Althabegoiti 2011). Un análisis bioinformático realizado en nuestro laboratorio permitió concluir que los genes que codifican los componentes y los reguladores del flagelo subpolar presentan similitud con los de *Caulobacter crescentus*, en cambio los que codifican estas funciones para el flagelo lateral presentan similitud con *Brucella melitensis*, por lo cual podría hipotetizarse que *B. japonicum* USDA 110 presenta una regulación independiente en cada uno de sus flagelos, la cual se asemejaría a la de cada una de estas bacterias (Mongiardini, com. pers.). Cabe destacar que hasta el momento no hay trabajos acerca de la regulación de la expresión de los flagelos en nuestro sistema. También, con relación a lo observado en otras especies con flagelación mixta, se puede hipotetizar que el motor del flagelo subpolar podría funcionar por medio de la diferencia del potencial iónico, en particular de Na^+ , y que en cambio el flagelo lateral obtendría su energía por medio de la fuerza protón-motriz (Atsumi et al. 1996, Mc Clain et al. 2002, McCarter 2001, McCarter 2004). Kanbe et al. (2007) intentaron analizar esto mediante el uso de ionóforos que disipan cada uno de estos potenciales y reportaron que el



flagelo subpolar parece moverse gracias a una fuerza protón-motriz, aunque los resultados se presentan de una forma semicuantitativa sin aclarar la relación entre la dosis de ionóforo y la movilidad. Por su parte, los resultados que reportan para el flagelo lateral se basan en muy pocas observaciones, con lo cual no pueden considerarse concluyentes.

Como mencionamos al principio, *B. japonicum* se diferencia del resto de los (bradi)rizobios por poseer flagelación mixta, pero también se diferencia dentro de las bacterias con este tipo de flagelación dado que nuestra cepa también presenta la característica de que su flagelo lateral presenta expresión diferencial dependiendo la fuente de carbono (Tesis Doctoral, M. J. Althabegoiti 2011). En particular en nuestro laboratorio hemos observado que *B. japonicum* expresa el flagelo lateral en medios de cultivo líquidos con gluconato de Na o arabinosa, pero no así en aquellos con manitol o extracto de levadura como únicas fuente de C (Althabegoiti et al. 2011). Si bien se ha reportado que muchas de las especies con flagelación mixta presentan expresión diferencial del flagelo lateral, esta expresión se relaciona con diferencias en la viscosidad del medio, pero no ha sido reportado previamente que dicha expresión dependa de la fuente de carbono (Atsumi et al. 1996, McCarter 2004, Merino et al. 2006). Por otro lado el flagelo subpolar o grueso presenta una expresión constitutiva.

El análisis de los tamaños moleculares de las flagelinas indica una discrepancia entre los tamaños de LafA1 y LafA2 observados en electroforesis desnaturalizante y los respectivos tamaños predichos a partir de sus secuencias de aminoácidos (Althabegoiti et al. 2008). Por análisis bioinformático hemos detectado potenciales sitios de glicosilación tanto en estas flagelinas como en FliC1, FliC2, FliC3 y FliC4, con lo cual es probable que ambos filamentos estén glicosilados, aunque todavía no lo hemos comprobado.

Por último, Althabegoiti et al. (2011) observaron que los dos flagelos no solo difieren por su estructura y patrón de expresión, sino también por el tipo de rotación de sus motores. El flagelo subpolar puede rotar en sentidos horario y antihorario. Por su parte el flagelo lateral o fino solo puede rotar en dirección antihoraria y en este caso una bacteria mutante que solo expresa el flagelo lateral realiza cambios de dirección más frecuentes que la del tipo silvestre (Althabegoiti et al. 2011).

En vista de las características de los flagelos de *B. japonicum* y el posible rol de la movilidad en la competición para la nodulación, es inevitable preguntarnos para qué tiene dos flagelos distintos y si esto le confiere algún tipo de ventaja en el ambiente edáfico.

I.7. Movilidad dependiente de flagelos.

Los procariontes, a lo largo de su evolución, adquirieron diversas estrategias que les permitieron desplazarse sobre diferentes superficies. Así, existen en estos microorganismos distintos tipos de movimiento que pueden implicar la utilización de aparatos locomotores externos como flagelos o pili, internos como la organización del citoesqueleto o la utilización de vesículas con gases, como así también extensiones de la membrana citoplasmática formando “pseudo-piernas” que en el caso de los Mycoplasmas le van a permitir “caminar” (Jarrell & McBride 2008). Independientemente del tipo de maquinaria utilizada para desplazarse, los microorganismos utilizan sistemas sensoriales complejos que le van a permitir controlar sus desplazamientos en respuesta a estímulos, en el caso de las bacterias, la quimiotaxis estaría cumpliendo dicha función (Wolfe & Berg 1989, Lux & Shi 2001, McCarter 2004, Baker et al. 2006, Zhao et al. 2007, Caiazza et al. 2007, Partridge &

Harshey 2013). Actualmente existen tantas clasificaciones como tipos de movimiento observados en las bacterias. Así, los movimientos se pueden clasificar en sociales o individuales, activos o pasivos, en función del tipo de motor que utilizan, en función de la superficie en donde se realizan, etc. (Jarrell & McBride 2008). Cabe destacar que ya en 1972, Henrichsen (1972), describía y clasificaba a cinco tipos de movimiento que ocurrían sobre superficies semisólidas: *swarming*, *twitching*, *gliding*, *sliding* y *darting*, y un tipo de movimiento que ocurría en medios líquidos: *swimming* o natación. Tanto la natación como el *swarming* utilizan los flagelos como aparato locomotor, en cambio el *twitching* y el *gliding* social utilizan el pili tipo IV y el resto de los movimientos: *gliding* individual, *sliding* y *darting*, no dependen de aparatos locomotores y en el caso de los dos últimos se trataría de movimientos pasivos. (Fig. I.14)

Si bien desde aquella época se los conoce y se los ha descrito, los movimientos dependientes de flagelos son por lejos los más estudiados y en particular la natación ha sido muy bien caracterizada en diversos procariontes. El ejemplo más claro lo constituyen *Escherichia coli* y *Salmonella*, que no solo han servido de modelo para describir la natación, sino también la expresión y regulación de sus flagelos y su relación con el aparato quimiotáctico. Hoy en día los modelos del aparato de quimiotaxis están basados en los estudios realizados en dichas bacterias (Baker et al. 2006, Kentner & Sourjik 2006).

Teniendo en cuenta las características de los flagelos de *B. japonicum* USDA 110, esta cepa podría desplazarse tanto con natación como con *swarming* en el ambiente edáfico. Hasta la fecha de la realización de este trabajo de Tesis, el *swarming* no había sido descrito en esta especie y sólo existían unos pocos reportes en rizobios.

I.7.1. Desplazamientos en medios líquidos: natación.

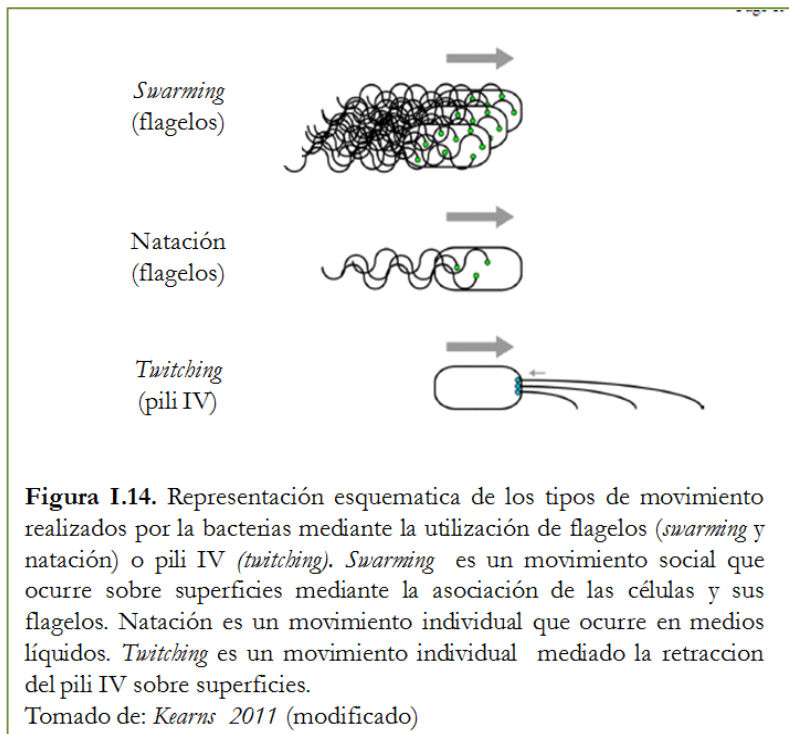
La natación ha sido ampliamente estudiada en diversas bacterias y se la define como el desplazamiento de bacterias en medios líquidos de forma individual, dependiente de flagelos (Harshey 2003, Bardy 2003, Armitage 2006, Jarrell & McBride 2008). El número de flagelos y su disposición va a depender del tipo de especie estudiada, así, en especies con un solo tipo de flagelo se ha observado que se pueden utilizar tanto los flagelos peritricos como en el caso de *E. coli* y *S. entérica serovar Typhimurium* o los flagelos subpolares, como *P. aeruginosa*. A su vez, la dirección del movimiento va a estar sujeta a la quimiotaxis, lo cual va a motivar que el flagelo rote en sentido horario o antihorario. Se cree que todas las bacterias flageladas pueden realizar natación con unos pocos flagelos, y que para producir el movimiento de *swarming* se requiere una diferenciación morfológica que involucra la producción de un gran número de flagelos. Por su parte, en bacterias con flagelación mixta, se ha propuesto que el flagelo subpolar y de expresión constitutiva es el encargado de realizar este movimiento (Henrichsen 1972, Harshey 2003, Jarrell & McBride 2008)

En nuestro laboratorio, Althabegoiti et al. (2011) caracterizaron la natación de *B. japonicum* USDA 110, y su derivada con aumentada movilidad, LP 3008. Para ello, obtuvieron mutantes desprovistos de cada uno de los flagelos o de ambos, en cada uno de los dos acervos genómicos mencionados. La natación puede visualizarse en el laboratorio mediante el empleo de cajas de Petri con medio de cultivo semisólido, con un porcentaje de agar de generalmente 0,3% p/v. Estas cajas, al observarlas tangencialmente, deben mostrar una migración por debajo del agar, es decir por dentro de los canales de agua formados entre la malla de agar. De esta forma se logró caracterizar la natación en USDA 110, encontrando que independientemente de las fuentes de carbono utilizadas (extracto de

levadura, manitol, gluconato de sodio y arabinosa), LP 3008 siempre presenta un fenotipo de mayor movilidad, observado como un halo de dispersión de mayor diámetro en la placa de Petri con respecto a su cepa parental. A su vez, los mutantes desprovistos de ambos flagelos son incapaces de realizar desplazamientos, confirmando que se trata de un movimiento dependiente de flagelos. En cambio, los mutantes desprovistos de uno u otro flagelo, generan halos de menor diámetro. Por lo tanto, *B. japonicum* USDA 110 podría utilizar ambos flagelos para realizar natación, pero el flagelo lateral tendría un rol mayor en dicho desplazamiento. (Althabegoiti et al. 2011). Este resultado nos resultó curioso, dado que contradecía a lo propuesto por Kanbe *et al.* (2007), quienes, mediante la utilización de mutantes de la misma índole habían planteado que el flagelo subpolar era el utilizado para natación, tal como se postula para bacterias con flagelación mixta.

I.7.2. Desplazamientos en medios semisólidos: *swarming*.

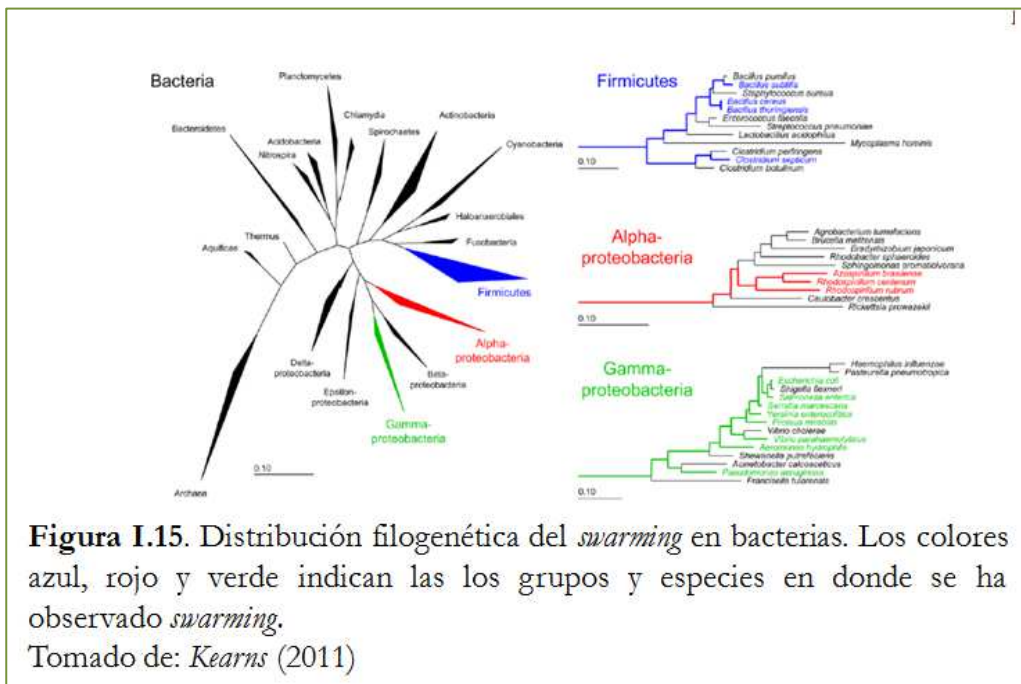
A diferencia de la natación, el *swarming* hasta el momento ha sido observado en pocas especies bacterianas, particularmente en algunas Gram-positivas como firmicutes o en Gram-negativas como, α - y γ -proteobacterias (Partridge & Harshey 2013, Harshey 2003, Kearns 2011) (Fig. I.15). A este desplazamiento se lo define como un movimiento social, que ocurre sobre superficies húmedas, en donde las bacterias se diferencian aumentando el número de flagelos, secretan sustancias con actividad surfactante, como así también sustancias relacionadas con la percepción del quórum, todo lo cual les permite organizarse y poder traslocarse en masa (Harshey 2003). Este movimiento ha sido observado, la mayoría de las veces, en bacterias patógenas como *Proteus mirabilis*, *Serratia liquifaciens*, *Clostridium septicum*, y *Bacillus cereus*, por lo cual se cree que este tipo de desplazamiento permite colonizar nuevas superficies (Harshey 2003, Kearns 2011, Partridge & Harshey 2013). Aunque su definición es muy sencilla, el fenotipo asociado y las condiciones necesarias para ponerlo de manifiesto dependerán de cada especie.



Para realizar este movimiento las bacterias sintetizan un gran número de flagelos. (Fig. I.16.) En aquellas bacterias que solo expresen un tipo de flagelo, bastará con hiperflagelarse (Harshey 2003, Jarrell & McBride 2008, Partridge & Harshey 2013) pero en especies con flagelación mixta, se observa que el flagelo lateral o peritrico es inducido diferencialmente para ser utilizado en el *swarming* (Harshey 2003, McCarter 2004, Merino et al. 2006, Merino & Tomas 2009, Jarrell & McBride 2008, Verstraeten et al. 2008, Kearns 2011). Sin embargo, como toda regla tiene su excepción, en *R. centenum* se ha reportado que es necesaria la presencia del flagelo polar para realizar *swarming* (Mc Clain et al. 2002). Al ser un movimiento que se realiza sobre superficies, algunos autores han propuesto que este tipo de desplazamiento permite que las bacterias migren en búsqueda de nuevos sitios de colonización promoviendo la simbiosis ya sea mutualista o patogénica con plantas o animales (Harshey 2003, McCarter 2004, Kaiser 2007).

A diferencia de la natación, los requerimientos para visualizar el *swarming* son mucho más específicos y dependientes de cada cepa. De hecho, la mayoría de las publicaciones sobre *swarming* solo se limitan a visualizarlo y caracterizarlo en diferentes condiciones, pero muy pocas lo estudian en base a la función que podría tener este tipo de movilidad para colonizar nuevos nichos.

En este punto, vale la pena aclarar que muchas veces en la literatura se confunde el desplazamiento de *swarming* con la natación o en otros casos se hace referencia a “zonas de *swarming*” para indicar “zonas de desplazamiento”, como ya observaba Henrichsen en su trabajo de 1972 (Henrichsen 1972). Sin embargo, este tipo de confusiones todavía ocurren, como así también una cierta falta de rigor en el apego a la definición con respecto a las características que deberían observarse en cepas que realizan *swarming*. De hecho, algunos autores proponen que el *swarming* también puede ser realizado sin flagelos, por medio de la utilización del pili tipo IV (Kaiser 2007), lo cual, a nuestro entender, y de acuerdo a las definiciones dadas más arriba, podría tratarse de un tipo de *gliding* social. A continuación, haremos un breve resumen de las características más importantes del *swarming*.



1.7.2.1 Visualización del swarming en el laboratorio.

Como primera aproximación a este movimiento se debe tener en cuenta que ha sido reportado que algunas cepas de uso rutinario en el laboratorio no presentan *swarming* (Kearns & Losick 2003, Patrick & Kearns 2009). Sin embargo, esta imposibilidad podría estar relacionada con el proceso de domesticación y variación de fase. Así, se observó que cepas de *B. subtilis* adaptadas al laboratorio son incapaces de realizar *swarming*, mientras que cepas sin domesticar logran realizar el movimiento de forma robusta (Kearns & Losick 2004, Patrick & Kearns 2009).

Como se mencionó anteriormente, el *swarming* es un movimiento social en superficie, la cual debe estar húmeda para que las células puedan trasladarse. Una superficie que cumple idealmente con estos requisitos es la del agar, que es donde Henrichsen realizó sus observaciones (Henrichsen 1972). Por lo tanto, la concentración de agar requerida en las placas de Petri es crítica, ya que no debe ser demasiado blando como para que las bacterias migren por debajo de la superficie haciendo natación, ni demasiado dura como para que no fluya la suficiente humedad a la superficie. Diversos autores plantean que por encima de 0,3 % p/v se restringe la natación, y se fuerza a la bacteria, si es posible, a realizar *swarming*. Sin embargo, la máxima concentración recomendada depende del autor y la especie bacteriana. Así, Kearns (2011), Tambalo et al. (2010) y Kim y Surette (2004), plantean que por encima de 1 % p/v el desplazamiento ya no puede realizarse debido a una muy alta tensión superficial, por otro lado, Butler et al. (2010), Verstraeten (2008) y Harshey (2003) plantean que la concentración óptima ronda entre 0,5 y 0,7 % p/v de agar, denominándolo *swarming* en agar blando, pero que algunas especies como *Proteus*, *Vibrio*, *Rhodospirillum* y *Azospirillum* pueden realizar el desplazamiento en “agar duro” con concentraciones de entre 1,5 %–2 %, dado que estas especies son capaces de sintetizar y secretar sustancias con buena capacidad surfactante que les permiten disminuir la tensión superficial del medio. En el caso de los pocos rizobios en los que se ha caracterizado el *swarming*, este porcentaje rondó entre 0,6 y 0,75 % para cepas de *E. meliloti*, *R. leguminosarum* y *R. etli* (Soto et al. 2002, Braeken et al. 2008, Tambalo et al. 2010).

Como todo movimiento, el *swarming* requiere energía, pero muchas veces, las células no deben estar demasiado alimentadas, como para que tengan el estímulo de explorar otros ambientes. Por lo tanto, el medio de cultivo y los requerimientos nutricionales también son bastante específicos, y dependen de la especie. Así, *B. subtilis* podría realizar *swarming* en casi cualquier medio lo suficientemente rico, sin embargo *S. enterica* parecería requerir glucosa en el medio y *R. etli*, medios de cultivo mínimos (Braeken et al. 2008, Kearns 2011).

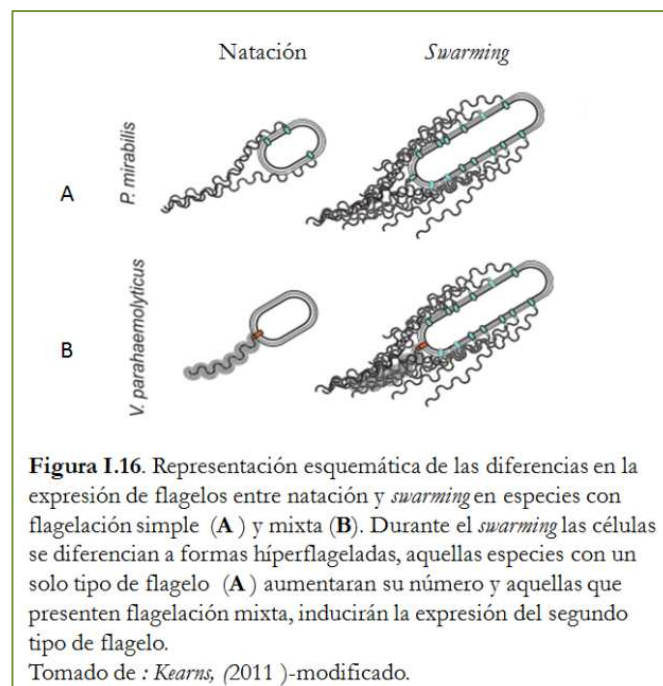
1.7.2.2. Caracteres morfológicos del swarming.

Uno de los rasgos más comunes del *swarming* es que las bacterias se diferencian a un estado hiperflagelado. Se cree que, en microorganismos con flagelación mixta, el flagelo subpolar con expresión constitutiva tiende a rotar con dificultad en un medio de alta viscosidad como podría ser la placa de Petri, lo cual resultaría en un aumento de la fuerza de torque. Este aumento se traduciría en la des-represión de la síntesis del flagelo lateral, lo que conduciría a la hiperflagelación. Sin embargo el mecanismo que termina de desencadenar esta respuesta todavía no se ha dilucidado (Atsumi et al. 1996, McCarter 2004, Wilhelms et al. 2012). Por otro lado, esta hipótesis no sería aplicable a bacterias con un solo tipo de flagelo, que también presentan hiperflagelación durante el *swarming* (Patrick & Kearns 2012). Algunos autores proponen que en ciertos casos, como podría ser el de *P.*

aeruginosa, que presenta un solo tipo de flagelo polar, las bacterias sintetizan un motor alternativo para realizar el swarming, el cual les va a permitir desplazarse en medios viscosos (Kearns 2011).

Una vez hiperflageladas, las bacterias deben asociarse entre sí y coordinar la rotación de sus flagelos. Este hecho cobra vital importancia en el denominado *swarming* en “agar duro”, donde las bacterias deben generar una mayor fuerza de torque para poder desplazarse. Así, se ha planteado que las mismas deben aumentar su superficie de contacto de manera tal de favorecer la unión longitudinal entre células. Este comportamiento no sería necesario en aquellas bacterias que realicen *swarming* en “agar blando”, tal como se observa en los rizobios en los que dicho movimiento ha sido caracterizado (Soto et al. 2002, Braeken et al. 2008, Kearns 2011). En *P. mirabilis*, que fue la primer bacteria en donde se estudió el *swarming*, se observó que para que las células obtengan una mayor superficie de contacto, éstas deben adquirir una especie de forma filamentosa y por ello se las ha observado multinucleadas. Aunque este comportamiento se ha sugerido como general, solo se ha observado fehacientemente en dicha especie y estaría más relacionado a una deficiente septación que al *swarming* (Kearns 2011).

Algunas bacterias son capaces de sintetizar y secretar sustancias con actividad surfactante, de manera tal de disminuir la tensión superficial y permitir el desplazamiento. La presencia de surfactantes se suele observar en el frente de desplazamiento de la colonia (Kearns 2011). A su vez, la presencia de surfactantes se relaciona con la percepción del quórum, el cual podría estar regulando la organización entre las células (Daniels et al. 2004). La naturaleza del surfactante va a depender de la especie bacteriana, por ejemplo *B. subtilis* y *Serratia liquefaciens* secretan lipopéptidos denominados surfactina y serrawettina respectivamente (Daniels et al. 2004, Kearns 2011). Por su parte, *P. aeruginosa* secreta rhamnolípidos (dos azúcares unidos a un ácido graso) (An et al. 2006, Butler et al. 2010). En cambio, *E. coli* y *S. enterica* no secretan surfactantes, pero en compensación utilizan el LPS para disminuir la tensión superficial (Burkart et al. 2000). Por lo tanto, se cree que la percepción del quórum no es un requisito fundamental para realizar el *swarming*.



Por último, en *B. subtilis* se ha observado que existe un intervalo de tiempo denominado “*swarming lag*”, en el cual las bacterias se diferencian y se adaptan para pasar de un medio líquido a un medio semisólido, antes de comenzar a realizar el desplazamiento (Kearns & Losick 2003). Este tiempo puede ser disminuido si una nueva placa de *swarming* es inoculada con bacterias que ya vienen de placas de dicho movimiento, dado que de esta forma ya se encuentran diferenciadas y listas para desplazarse (Kearns 2011).

1.7.2.3. Fenotipo macroscópico asociado al swarming.

Aquí vale la pena hacer la mención de que el fenotipo asociado al *swarming* no solo va a depender de la especie evaluada sino también de las condiciones en las cuales se desarrolla la colonia de *swarming* (Fraser & Hughes 1999, Tambalo et al. 2010). Por lo tanto, pueden observarse tantos fenotipos como especies y condiciones se evalúen, sin embargo, a grandes rasgos las colonias de *swarming* pueden enmarcarse dentro de tres posibles patrones. El primero de ellos es el observado en *P. mirabilis*, donde el fenotipo asociado forma anillos concéntricos dado que esta bacteria se desplaza en ciclos. El segundo patrón es el observado en *P. aeruginosa*: esta bacteria forma colonias de *swarming* con bordes irregulares, similares a dendritas. El tercer patrón es el denominado desplazamiento en vortex observándose bordes irregulares, como en oleadas (Kearns 2011). En este patrón suelen encajar los fenotipos de *swarming* observados en *R. etli*, *R. leguminosarium* y *E. meliloti* (Soto et al. 2002, Braeken et al. 2008, Tambalo et al. 2010). En la Fig. I.17 se observan los patrones descriptos.

1.7.2.4. El rol de la quimiotaxis.

A diferencia de la natación, en donde es necesario el direccionamiento continuo de las bacterias en el medio líquido, en el *swarming* parecería la quimiotaxis no tendría un rol determinante. En particular, en *E. coli* se ha observado que el sistema quimiotáctico es necesario para realizar el *swarming*, pero no la quimiotaxis en sí (Burkart et al. 1998). En base a esta observación, algunos autores proponen que el aparato quimiotáctico es necesario para mantener la rotación de los flagelos, pero no para orientar a la célula. A su vez, también proponen que algunas de las proteínas de dicho sistema estarían involucradas en la expresión diferencial del flagelo lateral. Sin embargo estas hipótesis todavía no han sido demostradas y por lo tanto actualmente no se comprende cuál es el rol de la quimiotaxis en el *swarming* (Kearns 2011).

1.7.3. Swarming en rizobios.

Como hemos mencionado a lo largo de esta sección, son pocos los rizobios en los cuales se podido evidenciar el *swarming*. El primero en donde se describió fue en una cepa de *E. meliloti*, llamada RM1021, que presenta una mutación en el gen *fadD*. La proteína codificada en este gen se relaciona con la síntesis de ácidos grasos y parecería que en su ausencia se disparan las señales para dar comienzo al desplazamiento (Soto et al. 2002). En este trabajo solo pudieron caracterizar el *swarming* en la mutante pero no en la cepa salvaje. Recién ocho años más tarde del primer trabajo con este mutante *fadD*, el mismo grupo realiza una transcriptómica de las células que hacen *swarming*, y es en este trabajo donde pueden mostrar el *swarming* por parte de la cepa salvaje (Nogales et al. 2010). Los autores sugieren que en la cepa salvaje es necesaria la síntesis de un sideróforo para que se realice el *swarming*, lo cual no es necesario en el mutante. Por último, en un trabajo posterior plantean que si bien la expresión del EPS no es necesaria para el *swarming*, si está presente facilita la traslocación (Nogales et al. 2012).

Otros autores observaron en 2008 que mutantes delecionados en el sistema de percepción del quórum son incapaces de realizar el desplazamiento (Hoang et al. 2008). Más tarde, también se realizaba una caracterización de los patrones de *swarming* según las condiciones de cultivo en *R. leguminosarum viciae* en las cepas 3841 y VF39SM (Tambalo et al. 2010). Por último, en *R. etli* también se ha observado y caracterizado el *swarming*. En este caso, hasta la fecha solo se reportaron dos trabajos en los cuales se ha demostrado, a partir de mutantes, que en esta especie es necesario el metabolismo de aminoácidos y poliaminas, como así también la percepción del quórum, y la síntesis y secreción de los EPS, como posibles surfactantes (Braeken et al. 2008). Como hemos visto, la mayoría de estos trabajos solo realizaron la caracterización del movimiento en cajas de Petri, estudiando los requerimientos genéticos o de cultivo, dada la complejidad que requiere poner en evidencia el *swarming* en el laboratorio. Sin embargo, ninguno de ellos hace referencia al posible rol de este movimiento en el ambiente edáfico.

Por otro lado, estos rizobios presentan un solo tipo de flagelos, en donde *E. meliloti* presenta flagelación peritrica y en cambio *R. leguminosarum* y *R. etli* presentan flagelos subpolares. Por lo tanto, las observaciones del *swarming* en estos rizobios no necesariamente serían aplicables a *B. japonicum*. Sin embargo, si buscamos en la bibliografía reportes acerca del *swarming* en *Brucella* o en *Caulobacter*, dada la similitud de los flagelos de nuestra cepa con los estas dos especies, observamos que en la primera especie hasta el momento no hay reportes, mientras que en la segunda solo hay uno, donde caracterizan el *swarming* en relación con el ciclo de vida (Lin et al. 2010).

I.8. Resumen.

En este capítulo hemos hecho mención a la importancia que tiene el cultivo de soja en nuestro país. Sin embargo, esta leguminosa requiere un aporte importante de N para obtener buenos rendimientos, el cual, si se quiere promover la agricultura sustentable a largo plazo, no debería salir exclusivamente de la fertilidad del suelo, ni aún siendo suplementado por fertilizantes químicos. Una manera de abastecer N de forma sustentable y económica para lograr altos rindes podría ser la utilización del potencial de los rizobios fijadores de N_2 . Así, la biofertilización ha sido la técnica utilizada desde los comienzos de este cultivo, como una forma de mantener los niveles de N en el suelo. Sin embargo, en suelos con historial de cultivo de soja, a lo largo de las sucesivas biofertilizaciones se va perdiendo la respuesta del rendimiento. Este hecho se observa dado que las

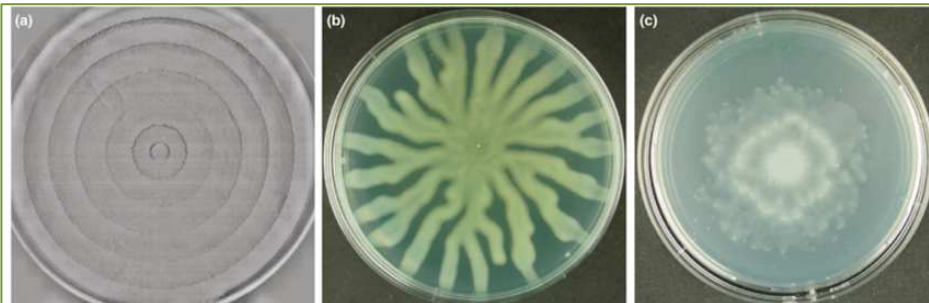


Figura I. 17. Diferentes fenotipos macroscópicos de *swarming*. El patrón observado va depender de la especie estudiada y de las condiciones evaluadas. Estos patrones se pueden clasificar en: **A.** *Swarming* en forma de anillos concéntricos, este tipo de fenotipo se observa en *P. mirabilis*. **B.** *Swarming* en forma dendrítica. Este patrón es el observado en *P. aeruginosa*. **C.** *Swarming* en forma de vortex, observándose bordes irregulares, como en oleadas. Este fenotipo es asociado a *R. etli*.

Tomado de: Verstraeten et. al. (2008) -modificado.

biofertilizaciones facilitan el desarrollo de poblaciones de bacterias noduladoras de soja en el suelo, las cuales pueden adaptarse a las condiciones edáficas, formando las denominadas poblaciones autóctonas. Estas poblaciones, en algunos casos, se han señalado como poblaciones de (bradi)rizobios muy competitivas para la nodulación pero deficientes en la FBN, por lo cual impedirían el ingreso a los nódulos de los bradirrizobios inoculados durante la biofertilización. Esto, a su vez, explicaría por qué no se obtienen respuestas en el rendimiento luego de la biofertilización. A este fenómeno se lo ha denominado “el problema de la competición para nodulación”, el cual, por su extensión geográfica y ubicuidad en distintos agroecosistemas, constituye uno de los puntos clave de la mala performance general de la biofertilización. Por lo tanto, es necesario conocerlo y encarar mejoras para evitarlo. Como todo proceso biológico, la competición para la nodulación depende de diversos factores, entre ellos podemos mencionar las características propias de la población bacteriana del suelo y otros inherentes a la cepa inoculada, como así también factores ambientales y la posición de los (bradi)rizobios en el suelo. Con respecto al último punto, la movilidad de los (bradi)rizobios suele ser un punto en discusión y no está claro hasta qué punto este factor influye en la competitividad para nodular. *B. japonicum*, la especie utilizada generalmente en los inoculantes para soja, posee flagelación mixta, por lo cual es de esperar que los dos sistemas de flagelos tengan algún rol dentro del ciclo de vida de este microorganismo en el ambiente edáfico. En nuestro laboratorio ya se ha caracterizado la natación de esta cepa, pero dadas las condiciones del medio edáfico es posible que este bradirrizobio utilice allí un tipo de desplazamiento caracterizado por ser en superficie, el *swarming*. A partir de estos interrogantes se plantean los objetivos de esta Tesis.

I.9. Objetivos generales.

Profundizar nuestra comprensión de las variables que condicionan y determinan el fenómeno de la competición para nodulación.

Objetivos específicos.

- Evaluar las poblaciones autóctonas de (bradi)rizobios noduladores de soja presentes en suelos argentinos en base a su genotipo, su capacidad simbiótica, competitiva y de adaptación a su medio de origen.
- Observar el *swarming* en *B. japonicum*, caracterizarlo en laboratorio y averiguar si este tipo de movilidad es el utilizado en el medio edáfico.

CAPITULO

II

Materiales y Métodos

II.1. Material biológico utilizado.

II.1.1. Cepas bacterianas.

Las cepas bacterianas utilizadas durante esta Tesis se detallan en las Tablas II.1 (aislamientos de suelos) y II.2 (cepas de laboratorio), junto con sus principales características (Althabegoiti et al. 2008, 2011; López-García et al. 2002).

II.1.2. Plantas.

Se trabajó con *Glycine max* (L.) Merr. (soja), variedad DonMario 4800, provista por el Ing. Agr. Alejandro Peticari del IMYZA-INTA (Castelar, Pcia. de Buenos Aires) o por Barenbrug-Palaversich S.A. (Pergamino, Pcia. de Buenos Aires).

II.2. Medios de cultivos para (bradi)rizobios y plantas.

II.2.1. Medios de cultivo y de conservación de (bradi)rizobios.

II.2.1.1. Medios de mantenimiento y conservación de (bradi)rizobios.

Para mantener las cepas de (bradi)rizobios, se utilizó el medio de cultivo extracto de levadura-manitol (YEM) agarizado cuya composición (en g.l⁻¹) se detalla a continuación: extracto de levadura 0,4; manitol 10; NaCl 0,1; MgSO₄.7H₂O 0,2; K₂HPO₄ 0,5; agar 15; rojo congo 2,5.10⁻⁵ (Vincent 1970). Los cultivos así preparados se mantuvieron a 4 °C durante un máximo de 60 días para su uso rutinario. Para su conservación a largo plazo las bacterias fueron cultivadas en el medio YEM líquido sin rojo congo hasta fase logarítmica tardía, se suplementaron con glicerol estéril 25 % (v/v) o 50 % (v/v) y se almacenaron a – 80 °C o –20 °C, respectivamente.

La esterilización de los medios y las soluciones stock se realizó durante 20 minutos a 121 °C en autoclave.

II.2.1.2. Medios de cultivo de rizobios.

Para los experimentos de velocidad de crecimiento, modificación del pH y tolerancia a la acidez y al aluminio, se modificó el medio adicionando el indicador de pH azul de bromotimol 2,5.10⁻⁵ g.l⁻¹ en sustitución del colorante rojo congo (Somasegaran & Hoben 1985). Cuando fue necesario, el medio YEM-agar fue modificado llevando su pH a 4,8 con HCl 1 N y/o incorporando AlCl₃ 6,67.10⁻³ g.l⁻¹. Los estudios de tolerancia a glifosato se llevaron a cabo utilizando el medio mínimo MSR (Moorman et al. 1992), cuya composición (en g.l⁻¹) se detalla a continuación: HEPES 1,3; MES 1,1; manitol 10; glutamina 0,29; biotina 2.10⁻⁵; tiamina-HCl 2.10⁻⁵; riboflavina 2.10⁻⁵; ácido p-aminobenzoico 2.10⁻⁵; piridoxina 2.10⁻⁵. La mezcla de HEPES, MES y manitol fue esterilizada durante 20 minutos en autoclave a 121 °C. Las soluciones de vitaminas y de glutamina fueron preparadas por separado y esterilizadas por filtración por membrana de 0,22 µm y luego agregadas al resto del medio esterilizado, una vez enfriado. En caso de ser necesario se incorporó al medio glifosato (isopropilamina de N-fosfometilglicina) 0,42 g.l⁻¹. La solución stock de glifosato fue preparada a una concentración de 8,4 g.l⁻¹ utilizando el medio MSR como solvente y esterilizada por filtración por membrana de 0,22 µm.

Tabla II.1. Aislamientos de rizobios utilizados.

Sitio de Procedencia	INTA Castelar (Bs. As.)		INTA C. concepción del Uruguay (Entre Ríos)		INTA 9 de Julio (Bs. As.)		INTA San Antonio de Asuco (Bs. As.)		Est. "Kilgrunan" Cavanagh (Córdoba)	
	Cepa	Tipo de muestreo	Cepa	Tipo de muestreo	Cepa	Tipo de muestreo	Cepa	Tipo de muestreo	Cepa	Tipo de muestreo
Qca. Cecilia Cimino	CA06N	Nódulo	CU04N	Nódulo	NJ02N	Nódulo	SA07S	Suelo	VT01S	Suelo
	CA06S	Suelo	CU05N	Nódulo	NJ12N	Nódulo	SA12N	Nódulo	VT02S	Suelo
	CA120S	Suelo	CU07N	Nódulo	NJ27S	Suelo	SA16S	Suelo	VT04S	Suelo
	CA12S	Suelo	CU08N	Nódulo	NJ28.1N	Nódulo	SA17S	Suelo	VT05N	Nódulo
	CA149S	Suelo	CU19S	Suelo	NJ28N	Nódulo	SA18S	Suelo	VT06N	Nódulo
	CA14S	Suelo	CU22S	Suelo	NJ29S	Suelo	SA21S	Suelo	VT09.04N	Nódulo
	CA158N	Nódulo	CU23S	Suelo	NJ33N	Nódulo	SA23N	Nódulo	VT09S	Suelo
	CA15N	Nódulo	CU27S	Suelo	NJ36N	Nódulo	SA24S	Suelo	VT10S	Suelo
	CA19S	Suelo	CU31S	Suelo	NJ37S	Suelo	SA24S	Suelo	VT11N	Nódulo
	CA20N	Nódulo	CU33N	Nódulo	NJ39S	Suelo	SA25S	Suelo	VT12N	Nódulo
	CA21S	Suelo	CU37N	Nódulo	NJ41S	Suelo	SA26N	Nódulo	VT16S	Suelo
	CA24S	Suelo	CU42S	Suelo	NJ59N	Nódulo	SA26S	Suelo	VT18S	Suelo
	CA31N	Nódulo	CU43S	Suelo	NJ63N	Nódulo	SA28N	Nódulo	VT27S	Suelo
	CA32N	Nódulo	CU44N	Nódulo	NJ67S	Suelo	SA35N	Nódulo	VT29S	Suelo
	CA34S	Suelo	CU48S	Suelo	NJ68S	Suelo	SA37S	Suelo	VT30S	Suelo
	CA37N	Nódulo	CU52N	Nódulo	NJ72S	Suelo	SA44N	Nódulo	VT32S	Suelo
	CA61N	Nódulo	CU53S	Suelo	NJ73S	Suelo	SA44N	Nódulo	VT38S	Suelo
	CA69S	Suelo	CU61N	Nódulo	NJ79S	Suelo	SA45N	Nódulo	VT40S	Suelo
	CA73N	Nódulo	CU62N	Nódulo	NJ81S	Suelo	SA47N	Nódulo	VT43S	Suelo
	CA84N	Nódulo	CU70N	Nódulo	NJ85S	Suelo	SA60S	Suelo	VT44N	Nódulo

Tabla II.2. Cepas de rizobios utilizados.

Especie	Cepa	Características Relevantes	Referencia/Fuente
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	E109	Cepa salvaje, denominación anterior USDA138. Nod ⁺ , Fix ⁺	IMYZA, INTA, Argentina.
	LP 3018	Cepa derivada de E109 Nod ⁺ , Fix ⁺	López- García <i>et. al.</i> , 2009.
	USDA 110	Cepa salvaje, Cm ^r , Nod ⁺ , Fix ⁺	Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA).
	LP 3004	Cepa derivada de USDA 110 Cm ^r , Sm ^r , Nod ⁺ , Fix ⁺	López- García <i>et.al.</i> , 2002
	LP 5843	Cepa derivada de LP 3004 Cm ^r , Sm ^r , Km ^r	Althabegoiti <i>et.al.</i> , 2011
	LP 6865	Cepa derivada de LP 3004 Cm ^r , Sm ^r , Sp ^r	Althabegoiti <i>et.al.</i> , 2011
	LP 6543	Cepa derivada de LP 3004 Cm ^r , Sm ^r , Sp ^r , Km ^r	Althabegoiti <i>et.al.</i> , 2011
	LP 3008	Cepa derivada de LP 3004 Cm ^r , Sm ^r , Nod ⁺ , Fix ⁺	Althabegoiti <i>et.al.</i> , 2008
	LP 5844	Cepa derivada de LP 3008 Cm ^r , Sm ^r , Km ^r .	Althabegoiti <i>et.al.</i> , 2011
	LP 6866	Cepa derivada de LP 3008 Cm ^r , Sm ^r , Sp ^r , Km ^r	Althabegoiti <i>et.al.</i> , 2011
	LP 6544	Cepa derivada de LP 3008 Cm ^r , Sm ^r , Sp ^r , Km ^r	Althabegoiti <i>et.al.</i> , 2011
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	E104	Denominación anterior SEMIA 587. Sm ^r , Sp ^r , Nod ⁺ , Fix ⁺	IMYZA, INTA, Argentina.
	E110	Denominación anterior 29W. Nod ⁺ , Fix ⁺	IMYZA, INTA, Argentina.
<i>Ensifer fredii</i>	USDA 205	Sm ^r , Sp ^r , Nod ⁺ , Fix ⁺	IMYZA, INTA, Argentina.

Abreviaturas y símbolos: Cm, cloranfenicol; Fix, fijación de N₂; Nod, nodulación; Km, kanamicina; Sm, estreptomycin; Sp, espectinomycin. Los superíndices r y +, denotan resistencia al antibiótico y actividad positiva respectivamente.

Para los ensayos de *swarming*, se utilizaron el medio AG (Sadowsky et al. 1987) y el medio mínimo de Götz et al. (1982). El medio AG contiene (en g.l⁻¹): Na₂HPO₄ 0,125; Na₂SO₄ 0,25; NH₄Cl 0,32; MgSO₄·7 H₂O 0,18; FeCl₃ 0,004; CaCl₂·2H₂O 0,0013; HEPES 1,3; MES 1,1; extracto de levadura 1; L-arabinosa 1; gluconato de sodio 1. Las soluciones de NH₄Cl, MgSO₄ y CaCl₂ se esterilizaron individualmente en autoclave durante 20 minutos a 121 °C, y la solución de FeCl₃ se esterilizó por filtración por membrana de 0,22 µm. Todas estas soluciones se agregaron luego de autoclavar el medio. La composición del medio de Götz (en g.l⁻¹) es: manitol 5,0; K₂HPO₄ 1,06; KH₂PO₄ 0,53; MgSO₄ 0,25; (NH₄)₂SO₄ 0,13; CaCl₂ 0,015; NaCl 5,85·10⁻³; Na₂MoO₄ 2,42·10⁻⁴; FeSO₄·7H₂O 2,8·10⁻⁴; biotina 2·10⁻⁵; tiamina-HCl 2·10⁻⁵; riboflavina 2·10⁻⁵; ácido paminobenzoico 2·10⁻⁵; piridoxina 2·10⁻⁵. La solución basal de manitol, fosfatos, sulfato de amonio, cloruro de sodio y molibdato de sodio fue esterilizada en autoclave 20 minutos a 121 °C. Las soluciones de calcio y magnesio fueron esterilizadas en forma separada también por calor húmedo, en cambio la mezcla de vitaminas y la solución de sulfato ferroso fueron esterilizadas por filtración por membrana de 0,22 µm. Estas soluciones se agregaron a la solución basal una vez enfriada. En algunos ensayos se utilizó como fuente de C L-arabinosa, gluconato de sodio o extracto de levadura a la misma concentración que el manitol. Para obtener el medio semisólido se agregó agar Oxoid 5 g.l⁻¹.

II.2.1.3. Antibióticos.

Los antibióticos se prepararon en agua bidestilada a excepción de la espectinomina, que fue preparada en metanol. En todos los casos se prepararon a una concentración 1.000 X y se esterilizaron por filtración por membrana de 0,22 µm. Las concentraciones finales en los medios de cultivo fueron las siguientes: kanamicina sulfato (Km) 0,15 mg.l⁻¹, estreptomina (Sm) 0,40 mg.l⁻¹, espectinomina (Sp) 0,20 mg.l⁻¹, cloranfenicol (Cm) 0,02 mg.l⁻¹ y cicloheximida (Ch) 0,02 mg.l⁻¹.

II.2.2. Soluciones para el cultivo hidropónico de plantas.

Para los ensayos con plantas se utilizó la solución de Fåhraeus modificada libre de nitrógeno (Lodeiro et al. 2000), la misma contiene (en g.l⁻¹): CaCl₂·2H₂O 0,11; MgSO₄·7H₂O 0,12; K₂HPO₄ 0,20; KH₂PO₄ 0,17; NaCl 0,06; citrato férrico 0,005 y los siguientes micronutrientes (en mg.l⁻¹): KCl 3,73; H₃BO₃ 1,55; MnSO₄·H₂O 0,85; CuSO₄·5 H₂O 0,13; ZnSO₄·7 H₂O 0,58; (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4 H₂O 18; pH 7,0. Las soluciones de fosfatos, cloruro de sodio, citrato férrico y micronutrientes se esterilizó en autoclave por 20 minutos a 121 °C. Una vez enfriada se le agregaron las sales de calcio y magnesio previamente esterilizadas en autoclave.

II.3. Métodos microbiológicos.

II.3.1. Cultivos bacterianos y preparación de los inóculos.

Para la mayoría de los ensayos los cultivos se iniciaron a partir de stocks en YEM-agar a 4 °C o bien a partir de cultivos conservados en glicerol a -20°C. Las bacterias se hicieron crecer en medio YEM a 28 °C con agitación rotatoria a 180 rpm hasta saturación. Luego se diluyeron 1:100 en medio de cultivo fresco y su cultivo se continuó por otros tres días más, con el fin de que todas las células alcanzaran la fase de crecimiento exponencial. A partir de este cultivo iniciador se realizaron diluciones 1:50 en los medios a ser estudiados y se continuó su cultivo en las mismas condiciones hasta la fase de crecimiento deseada.

II.3.2. Estimación de la biomasa y recuento de células viables.

La biomasa se estimó por lecturas de densidad óptica a 500 nm (DO_{500}). En los ensayos de competición para la nodulación, adicionalmente se estimó el número de células totales por recuento al microscopio óptico empleando una cámara de Neubauer. El número de células viables se estimó por recuento en placa de las unidades formadoras de colonias (UFC) en el medio YEM-agar. Los recuentos se realizaron por el método de la gota (Somasegaran & Hoben 1985) colocándose gotas de 5 μ l del cultivo bacteriano diluido de forma tal que se puedan contar entre 5 a 40 UFC provenientes de cada gota. Se colocaron de 10 a 15 gotas por dilución y tres diluciones por placa. En caso de ser necesario, los recuentos se realizaron en presencia del antibiótico correspondiente.

II.4. Técnicas de biología molecular.

II.4.1. Obtención de ADN.

Se utilizaron dos técnicas de extracción de ADN para su posterior utilización en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, ver más adelante).

II.4.1.1 Obtención de ADN total mediante resinas.

A partir de una estría de cultivo se recogió masa bacteriana en una punta de pipeta y se la resuspendió en 300 μ l de NaCl 1 M. Se agitó vigorosamente por vórtex y se incubó toda la noche a 4 °C. La muestra se centrifugó en microcentrífuga a 14.000 rpm durante 4 minutos y el pellet obtenido se lavó dos veces con 300 μ l de agua bidestilada estéril. Luego se continuó con el protocolo empleando una resina de calidad para biología molecular, que tiene la capacidad de unir ADN (Walsh et al. 1991). Para ello se agregaron 150 μ l de resina Chelex-100 (Bio-Rad) 5 % (p/v) con agitación y se mezcló manualmente. Se incubó durante 20 minutos a 56 °C, se agitó con vórtex y se volvió a incubar durante 8 minutos a 99 °C. Finalmente se agitó con vórtex y se conservó a 4 °C.

II.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Los ensayos de PCR fueron realizados empleando un ciclador térmico. Para los ensayos de huella digital se utilizó el cebador Box A1R (Versalovic et al. 1994) y fue sintetizado por encargo en Operon Co. (EEUU). La composición de las mezclas de reacción fue: tampón de reacción Tris-HCl 10 X, $MgCl_2$ 2,5 mM, dNTPs 200 μ M, 20 μ M del cebador Box A1R y 2 unidades de Taq polimerasa (Invitrogen o PBL), completando un volumen final de mezcla de reacción, para todos los casos, de 20 μ l. Como molde se utilizó 5 μ l de una dilución de la extracción de ADN total de forma tal de tener 20 ng de ADN en la mezcla de reacción.

El ciclado se realizó respetando el esquema básico de una desnaturalización inicial; 35 ciclos de desnaturalización, hibridación (annealing) y elongación; y por último una elongación final. Los tiempos y temperaturas utilizados se detallan en la Tabla II.3. Al finalizar las reacciones de PCR, los productos de las mismas fueron separados por electroforesis en gel de agarosa.

II.4.3 Electroforesis en geles de agarosa.

La electroforesis horizontal en geles de agarosa fue la técnica que se utilizó para observar el producto de las extracciones de ADN total, como así también los productos obtenidos por PCR. El porcentaje de agarosa de la solución (0,8 – 2% p/v) preparada

empleando solución tampón TBE (Tris 89 mM, EDTA Na₂ 2,5 mM, BO₃H₃ 89 mM, pH 8,2) se eligió según el producto que se deseaba observar. Las muestras se mezclaron para su siembra con solución de carga 6 X (sacarosa 40 % p/v y azul de bromofenol 0,25 % p/v en TBE). Las corridas se realizaron a voltaje constante (80 a 120 volts), utilizando como solución tampón de corrida el mismo TBE. Para los productos obtenidos por PCR con los cebadores BoxAR1, se realizó una corrida electroforética a 70 voltios durante 5 horas.

Tabla II.3. Ciclado utilizado en PCR.

Ciclado		Box AIR
	Desnaturalización inicial	95° C - 5 min
35 ciclos	Desnaturalización	94° C - 1 min
	Hibridación	52° C - 1 min
	Elongación	65° C - 8 min
	Elongación final	68° C - 16 min

II.4.3.1 Revelado de los geles y fotografía.

El agregado de 0,5 µg.ml⁻¹ de bromuro de etidio a los geles de agarosa permitió la visualización de los fragmentos de ADN por transiluminación con luz ultravioleta de longitud de onda $\lambda = 260$ nm. El registro de los resultados se realizó mediante fotografía de los geles con una cámara digital Kodak modelo DC 120 (software EDAS-Kodak) bajo iluminación ultravioleta.

En caso de ser necesario determinar el peso molecular de los fragmentos visualizados, se corrió en paralelo con las muestras el marcador de peso molecular DNA ladder plus 100 pb (Genbiotech).

II.5. Microscopía.

II.5.1. Óptica.

Los cultivos de rizobios se colocaron entre porta y cubreobjetos y se observaron en un microscopio óptico Carl Zeiss Jena por contraste de fase con un aumento de 1.000 X con luz visible.

II.5.2. Electrónica de Transmisión (MET).

Para observar células a partir de colonias de *swarming*, se utilizó el método de Kirov et al. (2002) con las siguientes modificaciones: la muestra se tomó directamente colocando la grilla conteniendo una gota de buffer PIPES (piperazina-N, N-bis [ácido 2-etanosulfónico]) pH 7,3 sobre la zona de la colonia a observar. Una vez obtenida la muestra sobre la rejilla, se fijó con glutaraldehído 0,5 % (p/v) en buffer PIPES 0,1 M durante dos minutos. Las grillas fueron lavadas tres veces con buffer PIPES durante 10 segundos y teñidas negativamente durante 10-30 segundos con fosfotungstato de potasio 2 % (p/v). El microscopio electrónico de transmisión utilizado fue un JEM 1200 EX II (JEOL), ubicado en el Servicio Central de Microscopía de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP.

II.6. Ensayos biológicos.

II.6.1. Ensayos microbiológicos.

II.6.1.1. Caracterización fenotípica de aislamientos de (bradi)rizobios noduladores de soja.

Los aislamientos de (bradi)rizobios detallados en la tabla II.2 fueron evaluados según su crecimiento en YEM-agar para caracterizar sus fenotipos más relevantes.

Para estimar la velocidad de crecimiento, cada uno de los aislamientos fue sembrado en placas suplementadas con rojo congo o con azul de bromotimol. En ambos casos, las placas fueron incubadas en estufa a 28 °C y se realizaron observaciones diarias, hasta ver la aparición de colonias típicas de (bradi)rizobios. De acuerdo con Somasegaran & Hoben (1985) los (bradi)rizobios pueden ser catalogados como de crecimiento rápido si se observa un color amarillo (ácido) en placas de YEM-agar con azul de bromotimol y la aparición de colonias ocurre entre los tres a cinco días. En cambio, pueden ser clasificados como bradirrizobios cuando alcalinizan el medio produciendo un cambio de color hacia el azul y presentan colonias a partir de los cinco a siete días.

Para evaluar la capacidad de los aislamientos para crecer a temperaturas altas, se los sembró en placas de YEM-agar por duplicado, de forma tal de obtener colonias aisladas. Uno de los duplicados fue incubado durante 10 días en estufa a 37 °C, mientras el otro fue incubado durante el mismo periodo a 28 °C. Las placas fueron observadas a los 3, 5, 7 y 10 días. Como referencia se utilizó la cepa E109.

La tolerancia de los rizobios para crecer en presencia de aluminio y a pH ácido en YEM-agar se evaluó de acuerdo con Ayanaba et al. (1983). Previamente, se realizó un ensayo para evaluar la capacidad de los rizobios para crecer en YEM-agar con azul de bromotimol a pH 4,8 durante 10 días en estufa a 28 °C. Una vez observada esta capacidad, se evaluó de la misma forma la capacidad para crecer en placas conteniendo el medio ácido y en presencia de aluminio (para más detalles de los medios véase el apartado II.2.1.2). Como referencias se incluyeron las cepas E109 y USDA110.

Para evaluar la tolerancia a glifosato se utilizó el método propuesto por Moorman et al. (1992). Las cepas fueron crecidas en medio MSR, con agitación a 180 rpm y a 28 °C hasta una concentración aproximada de 10^8 células.ml⁻¹, constituyendo así el cultivo iniciador. A partir de este cultivo, se realizaron las diluciones adecuadas para obtener aproximadamente 10^7 células.ml⁻¹ en el medio MSR con o sin glifosato 2,5 mM. Los cultivos diluidos fueron crecidos con agitación a 180 rpm y 28 °C durante cuatro días. En todos los casos se tomaron muestras para medir DO₅₀₀ y para realizar el recuento de viables tanto del cultivo iniciador como del cultivo diluido; en este último caso se tomaron muestras a los días 0, 1, 2 y 3. Como cepa de referencia se utilizó LP3018.

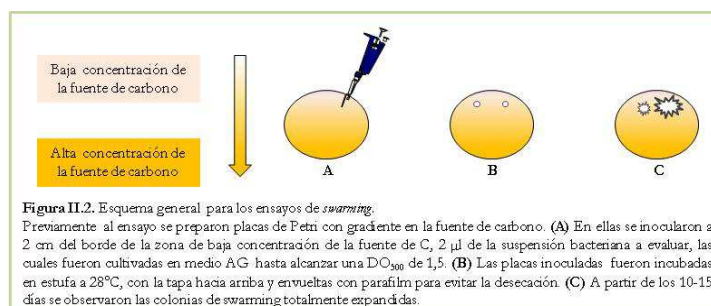
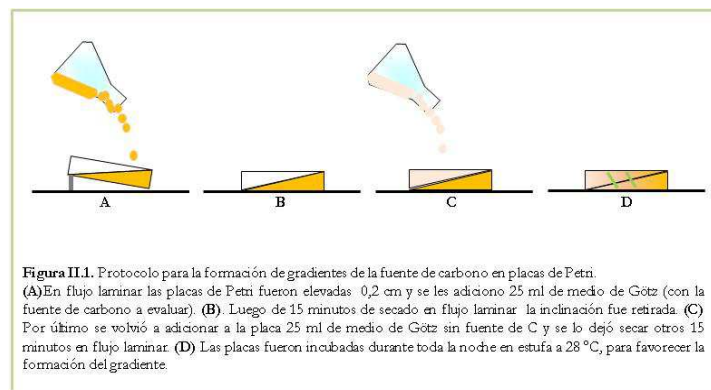
II.6.1.2. Caracterización molecular de los aislamientos de (bradi)-rizobios noduladores de soja.

Para evaluar la variabilidad genómica de los aislamientos se utilizó la huella digital de ADN por PCR con cebadores Box A1R. Una vez terminada la reacción de PCR, se realizó la separación de los fragmentos obtenidos para cada muestra mediante electroforesis en gel de agarosa 2 % (p/v) en donde para cada reacción de PCR de los aislamientos se

realizaron dos gels de agarosa independientes. En cada gel se sembraron 5 μ l de producto de PCR por triplicado. La corrida electroforética se realizó durante cinco horas a 70 V (constante). En todos los casos cada gel fue sembrado en los extremos con marcador de peso molecular y con alguno de los controles positivos con su duplicado de PCR. Cada gel fue fotografiado y analizado con el software GelCompare II 4.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) como se detalla más adelante.

II.6.1.3. Ensayos de movilidad.

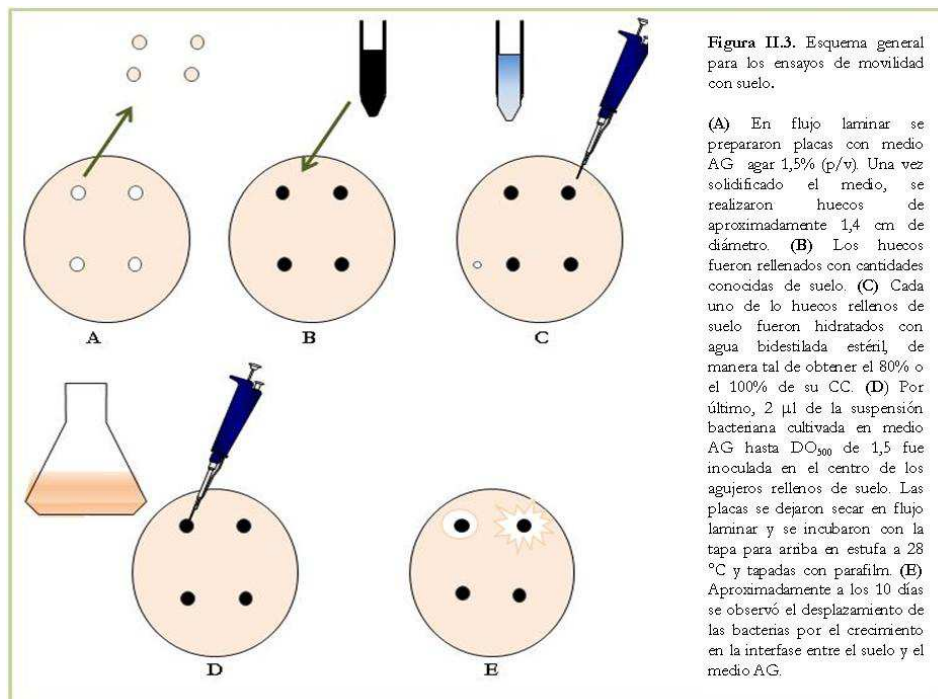
Para preparar las placas de Petri con gradiente de la fuente de C para ensayos de *swarming* se utilizaron dos medios de Götz, a uno de los cuales no se le adicionó la fuente de C. En flujo laminar, las placas fueron elevadas en uno de los lados aproximadamente 0,5 cm y se les adicionó 25 ml del medio de Götz fundido conteniendo la fuente de C. Se les dejó secar durante 15 minutos en flujo laminar y se les retiró la inclinación. Por último se les adicionó 25 ml del medio de Götz sin la fuente de C y se las dejó secar por otros 15 minutos en flujo laminar. Las placas de Petri preparadas de esta manera fueron incubadas toda la noche en estufa a 28 °C para favorecer *la* formación del gradiente (Fig. II.1). Paralelamente, se cultivaron las bacterias en AG sin antibióticos, hasta una DO_{500} de 1,5 (fase logarítmica). Dos μ l de ese cultivo se inocularon a aproximadamente 2 cm del borde de la placa del lado en donde la concentración de C era 0 g/l. Las placas inoculadas se dejaron secar unos minutos en flujo laminar y se las incubó en estufa a 28 °C durante aproximadamente 10 días, con la tapa hacia arriba y envueltas en parafilm para evitar la desecación (Fig. II.2).



Para analizar la movilidad de los rizobios en muestras de suelo con contenidos hídricos conocidos, se incluyeron las mismas en placas de Petri con medio AG-agar 1,5 %.

El contenido hídrico de las muestras de suelo se reguló de acuerdo con su capacidad de campo (CC), la cual se determinó gravimétricamente. Para ello se colocó una cantidad conocida de suelo seco en un vaso de plástico que poseía perforaciones en su base y se le agregó agua bidestilada hasta saturación. Se dejó que drene el agua gravitacional durante aproximadamente 14 horas evitando la evaporación, tras lo cual se volvió a pesar el vaso y la diferencia de pesos entre el suelo seco y el suelo húmedo representó el volumen de agua retenida por esa cantidad de suelo. El valor de CC se calculó como la cantidad de agua retenida por gramo de suelo.

Para incluir las muestras de suelo en las placas, se practicaron huecos de 1,4 cm de diámetro en el medio de cultivo, los cuales serían rellenos con cantidades conocidas de suelo. Para determinar la cantidad de suelo que rellenaría cada hueco, las muestras de suelo fueron colocadas en tubos Eppendorf y esterilizadas tres veces en autoclave durante 20 minutos a 121 °C. Luego de la esterilización cada tubo fue pesado en balanza analítica. Con cada una de esas muestras de suelo se relleno cada uno de los huecos de las placas de Petri y se volvió a pesar el contenido remanente de cada tubo. La diferencia de pesos de los tubos antes y después de llenar los huecos permitió calcular la cantidad exacta con la cual se relleno cada hueco en el medio AG-agar. A cada muestra de suelo se le adicionó el volumen correspondiente de agua bidestilada estéril de forma tal de obtener un 80 % o 100 % de la CC. Por último, se inocularon 2 μ l de la suspensión bacteriana (previamente cultivada en AG hasta una DO_{500} de 1,5) en el centro de cada muestra de suelo. Las placas se secaron en flujo laminar por 30 min y se incubaron en estufa a 28 °C, con la tapa hacia arriba y envueltas en parafilm durante 10 días. Como control negativo, en una de las muestras de suelo se inocularon 2 μ l de agua bidestilada estéril (Fig. II.3).



II.6.2. Ensayos con plantas.

II.6.2.1. Esterilización superficial y germinación de semillas de soja.

Las semillas de soja se lavaron durante unos segundos con alcohol 96 % (v/v) y luego fueron inmersas en una solución de lavandina comercial diluida al 20 % (v/v) durante 10 minutos, con agitación ocasional. En algunos casos, se reemplazó la solución de lavandina por una solución de peróxido de hidrógeno 3 % (v/v) y se las dejó inmersas durante cinco minutos, con agitación ocasional. En ambos casos, se descartó la solución y se lavaron al menos seis veces con agua destilada estéril, de forma tal de eliminar el remanente de lavandina o peróxido de hidrogeno. Una vez esterilizadas, las semillas fueron germinadas sobre una superficie de agar-agua al 1,5 % (p/v) durante 2 a 4 días, en estufa a 28 °C y en oscuridad.

II.6.2.2. Ensayos de competición para la nodulación.

En estos ensayos las cepas evaluadas se compitieron contra una cepa de referencia que presentaba resistencia a antibióticos para permitir su posterior identificación. Las plantas se cultivaron en vasos de plástico descartables de aproximadamente 500 ml, previamente esterilizados mediante lavados con alcohol 96° y exposición de dos horas a la luz ultravioleta en cámara cerrada. Los vasos se llenaron con vermiculita previamente esterilizada en autoclave durante 1 hora a 121 °C, y a cada uno se lo regó con un exceso de solución de Fåhraeus modificada estéril conteniendo aproximadamente 10^6 bacterias.ml⁻¹ de cada cepa, provenientes de cultivos líquidos en AG. El tamaño del inóculo utilizado fue ajustado por recuentos al microscopio óptico y posteriormente, el número de UFC inoculadas fue confirmado por recuento usando el método de la gota. La siembra de soja se realizó inmediatamente después de regar y cada en cada maceta se colocaron dos semillas de soja germinadas. Por cada condición se ensayaron 15 plantas. A su vez en cada ensayo se incluyeron cinco macetas inoculadas con Fåhraeus modificada estéril sin bacterias y cinco macetas inoculadas con cada cepa a evaluar en forma separada, constituyendo así los controles negativos y de nodulación respectivamente. Las macetas sembradas fueron tapadas con film y llevadas al invernáculo. Al tercer día de la siembra se realizó un corte en el film para permitir que las plántulas puedan emerger. Las macetas permanecieron en el invernáculo durante 30 días, con una temperatura diurna de aproximadamente 26-28 °C y una nocturna de 14 °C, una fotofase de 14 horas y un riego periódico con agua destilada estéril para mantener la humedad. Transcurridos 30 días las plantas fueron llevadas al laboratorio para determinar los porcentajes de ocupación de nódulos de cada cepa. Los nódulos de cada tratamiento fueron extraídos y cada uno colocado separadamente en fosas de placas multipocillo estériles. Una vez depositados, se procedió a la esterilización superficial con lavandina al 20 % (v/v) durante cinco minutos, seguidos de al menos seis lavados con agua destilada estéril. De esta manera cada nódulo pudo ser procesado de manera independiente en su fosa, evitando la contaminación cruzada. Los nódulos esterilizados superficialmente fueron macerados con palillos estériles con una de sus puntas truncas, y este mismo material se depositó en placas de Petri réplicas. Una de esas placas contenía los antibióticos selectivos para la cepa de referencia, lo que permitió determinar qué cepa ocupaba cada nódulo.

II.6.2.3. Ensayos de fijación de N₂.

Las plantas se cultivaron en tupperes Ta-Tay de 600 ml, con tapa a rosca (Plásticos Ta-Tay S.A. Barcelona, España). En cada tapa se practicó un orificio de aproximadamente

5 cm de diámetro, para que posteriormente las plántulas puedan emerger. Esta tapa permitió eliminar cualquier fuente de contaminación cruzada. Los tupperes fueron esterilizados como se describió arriba y llenados con una mezcla de vermiculita/perlita estéril en una relación 2:1, previamente esterilizada en autoclave durante 1 hora a 121°C. Cada tupper fue regado con 250 ml de solución de Fåhraeus modificada e inmediatamente se sembraron semillas de soja previamente germinadas como se describió. Cada semilla fue inoculada directamente con 1 ml de suspensión bacteriana, preparada a partir de cultivos en YEM-agar resuspendidos en solución de Fåhraeus modificada. Se ensayaron 8 plantas por cepa y se incluyeron controles con plantas sin inocular y controles con plantas inoculadas con cepas de referencia (E109 y USDA110). Las macetas sembradas e inoculadas fueron trasladadas a un fitotrón con una fotofase de 16 horas, temperatura diurna de 26 °C con humedad relativa del 60 % y temperatura nocturna de 18 °C con humedad relativa del 80 %. Se aplicó un régimen de tres riegos semanales de los cuales uno se realizaba con solución de Fåhraeus modificada y el resto con agua destilada estéril. A los 20 días las plantas fueron nuevamente inoculadas con 1 ml de suspensión bacteriana. A los 50 días las plantas se encontraban en la etapa vegetativa V5, momento en el que fueron procesadas. De cada planta se separó la parte aérea (tallo y hojas), la raíz y los nódulos, y se registraron los correspondientes pesos frescos. Posteriormente, el material vegetal fue secado hasta constancia de peso en estufa a 60°C, y se determinó su peso seco. Luego, se tomaron muestras de 10 mg de hojas para determinar su concentración de alantoína. A cada muestra se le adicionó 1 ml de NaOH 0,2 N, se lo calentó durante 30 minutos a 100 °C y se centrifugó durante 10 minutos a 7.500 rpm. La cuantificación de la alantoína se llevó a cabo por duplicado con el método colorimétrico de Trijbels & Vogels (1966).

II.7. Análisis estadísticos y bioinformáticos.

II.7.1. Análisis estadísticos.

El análisis de los datos provenientes de las medidas de tolerancia a glifosato se realizó mediante el cálculo del intervalo de confianza. En los ensayos de plantas se utilizó el análisis de varianza (ANOVA). En el ensayo de fijación de N₂ se utilizaron tanto un ANOVA según un diseño en bloques completamente aleatorizados (DCBA), como un diseño completamente aleatorizado (DCA). Para establecer entre qué medias existían diferencias significativas se utilizó el test de Tukey. Para evaluar el ensayo de competición para la nodulación se realizó una transformación angular de los porcentajes de ocupación de nódulos antes de aplicar un ANOVA (Lison 1976). Para tener en cuenta la posibilidad de que los nódulos estuvieran ocupados por ambas cepas competidoras al mismo tiempo (doble ocupación), se utilizó un análisis de χ^2 . Esta misma prueba fue utilizada en el análisis de clados obtenidos mediante la tipificación molecular con Box AR1, en donde se evaluó la distribución de los agrupamientos observados.

II.7.2. Análisis bioinformáticos.

Para el análisis del perfil de bandas obtenido con los cebadores Box A1R, se utilizó el software Gelcompar II 4.0 (Applied. Maths, Kortrijk, Belgium). Los geles fueron normalizados por medio del marcador de peso molecular y analizados por presencia o ausencia de bandas. A su vez, al perfil de bandas obtenido se le aplicó una optimización y una tolerancia de 1,5 %. El cladograma se obtuvo con el algoritmo UPGMA (Sneath & Sokal 1973) y el coeficiente de Jaccard (Jaccard 1912).

CAPITULO

III

Caracterización
fenotípica y genotípica
de (bradi)rizobios
alóctonos aislados de
suelos con historial de
cultivo de soja.

Para comprender el problema de la competición para la nodulación desde el punto de vista del microsimbionte deben abordarse dos aspectos complementarios, como caras de una misma moneda: quién compite y contra quiénes compite.

El primero es sin dudas el inoculante. Las cepas utilizadas en los inoculantes han sido seleccionadas y ensayadas, y en Argentina *B. japonicum* E109 es la recomendada actualmente por el INTA. Sin embargo, la legislación argentina no exige declarar con qué cepas se formulan los inoculantes; de hecho, solo el 46,5 % de los inoculantes inscriptos declaran estar formulados con esta cepa (González 2007) y el resto lleva mezclas de E109 con otros bradirrizobios.

Los segundos representan un universo todavía muy poco explorado en los suelos de nuestro país (González 2007, Melchiorre et al. 2011). La planta de soja puede ser nodulada por *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii*, *Ensifer fredii*, *B. liaoningense*, *Rhizobium* sp. NGR234, *Ensifer xinjiangensis* y *Mesbhorizobium thianshanense*. Pese a esto, por los valores de pH en nuestros suelos es esperable que en Argentina la soja sea nodulada en mayor proporción por el género *Bradyrhizobium*, en particular por *B. japonicum* y *B. elkanii*. (González et al. 2000).

Trabajos realizados en otros países de la región demuestran que las poblaciones autóctonas aisladas de suelos con historial de cultivo de soja poseen un alto polimorfismo en comparación con las cepas de los inoculantes (Hungria et al. 2006, Loureiro et al. 2006, Batista et al. 2007). Por lo tanto, es probable que nuestras poblaciones autóctonas también sean diversas, aunque el genotipo de E109 debería ser el predominante, debido al extenso uso que se hace de la biofertilización. Dado que nuestro laboratorio cuenta con una colección de aislamientos de rizobios noduladores de soja provenientes de distintas zonas del cinturón sojero, en esta primera parte de mi Tesis trataremos de responder a la pregunta planteada más arriba y conocer mejor contra quiénes debe competir el inoculante. Para ello, en este capítulo evaluaremos las características fenotípicas y genotípicas más relevantes de 100 aislamientos tomados de esa colección, y nos preguntaremos si los genotipos dominantes en los nódulos tienen alguna particularidad con respecto a la población en general. Esto nos va permitir realizar una aproximación al entendimiento del fenómeno de competición para la nodulación y eventualmente, encontrar cepas adaptadas a ambientes locales que puedan poseer características simbióticas deseables para futuros inoculantes.

En ese sentido la caracterización del conjunto de aislamientos de (bradi)rizobios puede encararse de distintas formas dependiendo de los parámetros a evaluar. Nosotros nos propusimos realizar una caracterización de la colección de (bradi)rizobios autóctonos mediante:

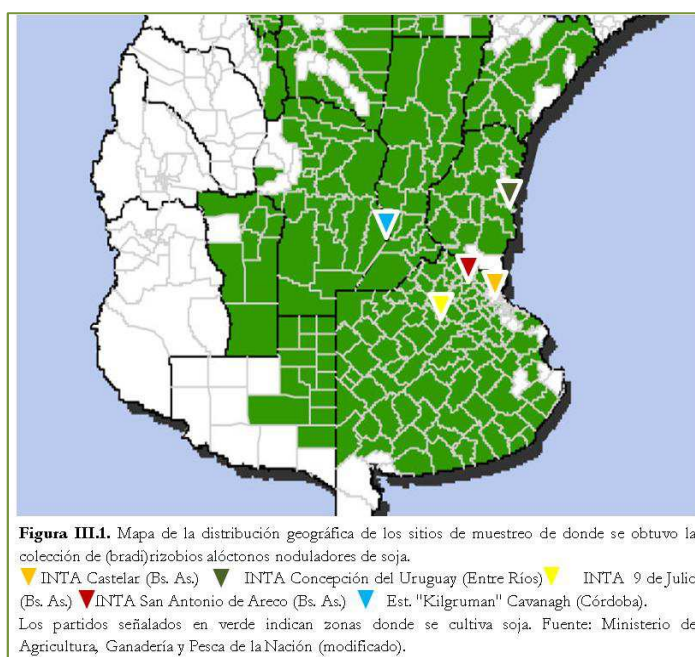
- Análisis de caracteres fenotípicos (morfológicos y fisiológicos).
- Tipificación genotípica mediante huella digital de ADN.

III.1. Obtención de la colección de (bradi)rizobios autóctonos.

En la Fig. III.1 se observa la distribución geográfica de los sitios a partir de los cuales se obtuvieron los aislamientos que serán caracterizados en este estudio. En particular, los sitios de muestreo pertenecen a dependencias del INTA (provincias de

Buenos Aires y Entre Ríos) y a un establecimiento agropecuario de la provincia de Córdoba. Los sitios de muestreo fueron:

- ✓ INTA-Castelar, (CA) Pcia de Buenos Aires.
- ✓ INTA-Concepción del Uruguay, (CU) Pcia de Entre Ríos.
- ✓ INTA-Nueve de Julio, (NJ) Pcia de Buenos Aires.
- ✓ INTA-San Antonio de Areco, (SA) Pcia de Buenos Aires.
- ✓ Est. "Kilgruman" Cavanagh, cercano a Venado Tuerto, (VT) Pcia. de Córdoba.



En estas localidades los suelos presentan un historial de cultivo de soja y biofertilización con E109 de al menos un año. En la cosecha anterior a los muestreos se cultivó soja en Castelar y Concepción del Uruguay, trigo en San Antonio de Areco y maíz en Nueve de Julio y Venado Tuerto. En todos los casos la estructura del suelo era similar. Las principales características de estos suelos se resumen en la Tabla III.1.

Para comenzar nuestro estudio de los (bradi)rizobios autóctonos noduladores de soja nos preguntamos en primer lugar si los que eran capaces de ocupar nódulos bajo las condiciones de suelo y clima particulares del sitio y en el momento del muestreo, serían genotípicamente distintos de los (bradi)rizobios noduladores de soja de la población general. Este aspecto reviste importancia ecológica porque podría ocurrir que existan adaptaciones específicas para realizar el proceso de infección/nodulación bajo condiciones ambientales particulares, lo que podría otorgar ventajas a las cepas autóctonas en su competitividad para nodular. Por lo tanto, realizamos dos tipos de muestreo:

Tabla III.1 Principales características de los suelos de donde se obtuvieron los aislamientos de rizobios noduladores de soja.

Sitio de Procedencia	CA	CU	NJ	SA	VT
	INTA Castelar	INTA Concepción del Uruguay	INTA 9 de Julio	INTA San Antonio de Areco	Establecimiento "Kilgouran" Cavanagh
Tipo de suelo	Aguadol vértico.	Peludete argilo. Serie Urdinarain	Hapludol éntico. Serie Nonarabega	Aguadol vértico	Serie Cavanagh- Lic.
Textura horizonte superficial	Franco limoso.	Acililo- limoso	Asenoso	Franco- aciliosa	Aciliosa
Cobertura vegetal	Escasa.	Media	Escasa	Densa (astrojo de trigo)	Media
Cultivo anterior	Soja	Soja	Maíz	Trigo	Maíz
Labranza anterior	Convencional	Convencional	Convencional	Directa	Directa
Materia orgánica (%)	4,6	4,31	2,9	3,28	2,38
N orgánico (%)	0,26	0,18	0,13	0,18	0,14
Relación C/N	10,3	13,9	10,2	10,6	9,8
Fósforo asimilable (ppm)	5,8	5,8	16,4	18,6	10,7
pH (en H ₂ O)	5,7	6,4	6,2	4,8	5,6

Abreviaturas: CA, Castelar; CU, Concepción del Uruguay; NJ, Nueve de Julio; SA, San Antonio de Areco ;VT, Venado Tuerto.

1. Rizobios aislados a partir de nódulos obtenidos de plantas de soja sin inocular cultivadas en cada sitio (**N**).
2. Rizobios aislados a partir de muestras de suelo tomadas en cada sitio (**S**).

Con la primera metodología se logró rescatar a rizobios que efectivamente ocuparon nódulos desarrollados en el sitio de muestreo, es decir rizobios que fueron capaces de infectar y nodular en las condiciones particulares de suelo y clima del sitio en cuestión. Con la segunda metodología se partió directamente de extractos de la solución del suelo, los cuales fueron inoculados a plantas de soja en condiciones controladas de laboratorio (plantas “trampa”) y recuperados de sus nódulos, representando así a los rizobios potencialmente capaces de nodular independientemente de las condiciones locales. De esta forma el subgrupo de rizobios N, que podrían poseer ventajas adaptativas para nodular en cada lugar de muestreo debería quedar incluido en la población de rizobios potencialmente noduladores de soja (S).

En todos los casos (N y S), los rizobios obtenidos desde los nódulos se purificaron por estría en YEM-agar, hasta obtener colonias puras. A partir de una colonia se inocularon nuevamente plantas de soja, las cuales se cultivaron en vermiculita estéril con solución de Fåhraeus modificada hasta su nodulación. A continuación se extrajeron tres nódulos de la raíz principal de cada planta y se recuperaron los rizobios de su interior. Estos rizobios fueron nuevamente purificados por otros tres pasajes de estría en YEM-agar, tras lo cual se tomó una colonia al azar y se la congeló en glicerol. Esta colección se realizó a lo largo de seis años con la colaboración de la Qca. Cecilia Cimino y actualmente consta de más de 500 aislamientos, que se mantienen en el IBBM.

A partir de esta colección seleccionamos al azar veinte aislamientos de cada sitio de muestreo, que incluyeron diez aislamientos N y diez aislamientos S. Así, utilizamos un total de 100 aislamientos para los estudios que se describen a continuación. Los nombres asignados a los aislamientos hacen referencia al sitio de procedencia y al tipo de muestreo,

así por ejemplo CU42S, implica que es la cepa 42 aislada en el INTA-Concepción del Uruguay (Pcia. de Entre Ríos) y que fue obtenida a partir de una muestra de suelo.

III.2. Análisis de la diversidad genotípica.

Con la llegada de la biología molecular como herramienta, se desarrollaron diversos marcadores moleculares para realizar estudios sobre la diversidad de organismos presentes en una población, inferir sobre relaciones filogenéticas e identificar a un microorganismo. Si nos centramos en el estudio de diversidad en poblaciones bacterianas, actualmente existen múltiples métodos para evaluarla, entre ellos podemos mencionar: amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD, Thomas-Oates et al. 2003), análisis de fragmentos de restricción con polimorfismo de longitud, (RFLP, Qin Qin et al. 2011) electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE, Webster et al. 2012) y huella digital (Fingerprint, De Bruijn et al. 1992). Estas técnicas pueden ser utilizadas tanto de forma individual (Chen et al. 2000), como en conjunto (Batista et al. 2007, Hungria et al. 2006) dependiendo del objetivo y nivel de información que se desea obtener. En particular, la técnica de huella digital ha sido ampliamente utilizada para caracterizar la diversidad de poblaciones alóctonas de bacterias noduladoras de leguminosas (Laguerre et al. 1994, Rademaker et al. 2000, Thomas-Oates et al. 2003, Grange & Mariangela Hungria 2004, Loureiro et al. 2006, Menna et al. 2006, Saeki 2008, Batista et al. 2007, Estrella et al. 2009, Angelini et al. 2011). Esto se debe a que la huella digital de ADN es un método muy sencillo que analiza la existencia de secuencias repetitivas dentro del genoma (Versalovic et al. 1994). Para ello se utiliza la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores específicos para tales secuencias. Además, este tipo de método, utilizado en forma conjunta con el análisis de secuencias que codifican al ARNr 16S, o de genes como *nodC*, *nifH*, *glnA*, *glnII*, *recA*, *dnaK*, permite identificar e inferir las relaciones filogenéticas de las cepas entre sí (Lloret & Martínez-Romero 2005, Menna et al. 2006, Ribeiro et al. 2009).

En esta sección analizamos la diversidad genotípica de nuestra colección de aislamientos mediante el método de huella digital de ADN con los cebadores Box A1R, los cuales ya han sido utilizados exitosamente por diversos autores (Loureiro et al. 2006, Batista et al. 2007, Gomes Barcellos et al. 2007, Melchiorre et al. 2010) Los resultados de dicha técnica fueron analizados mediante la utilización del software GelCompar II 4.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium).

III.2.1. Tipificación genotípica.

Para realizar el análisis con el software GelCompare II 4.0 nos basamos en el análisis de presencia o ausencia de cada banda en el gel de agarosa. Debido a que la asignación de “presencia/ausencia” depende de la posición de la banda en el gel, debíamos asegurar la reproducibilidad de los perfiles obtenidos. Las reacciones de PCR suelen estar sujetas a variaciones por ser una metodología de muy alta sensibilidad; por lo tanto, con el fin de minimizar esta variabilidad decidimos llevar a cabo el diseño experimental que se describe a continuación.

Realizamos una sola mezcla de reacción para PCR, con un duplicado para cada muestra. Además incluimos a otras cepas noduladoras de soja como cepas de referencia, por un lado E104 y E110, ambas *B. elkanii*, y por otro E109 y USDA 110, ambas *B. japonicum*. Para evaluar la reproducibilidad del perfil de bandas, realizamos dos geles de agarosa independientes para cada aislamiento, y a su vez en cada gel sembramos cada

muestra por triplicado. De esta manera cada aislamiento tenía dos reacciones de PCR a partir de la misma mezcla de reacción, y su perfil de bandas resultante se visualizó por medio de dos geles de agarosa independientes sembrados cada uno por triplicado. Por su parte, USDA 110 también fue utilizada como cepa de control interno en cada uno de los geles de agarosa, es decir que esta cepa se utilizó en absolutamente todos los geles realizados, y a diferencia del resto de las cepas, ésta tuvo sextuplicados pero se sembró solo por duplicado. En la Fig. III.2 se muestra un gel de agarosa representativo de los obtenidos para el análisis de la colección de aislamientos.

Una vez obtenidas todas las fotografías de los geles, se procedió a realizar el análisis de los perfiles de bandas. Aunque se trató de minimizar las fuentes de variabilidad entre los geles, muchas veces observamos que dos bandas del mismo peso molecular no quedaban exactamente en la misma posición en un mismo gel. Esto puede ser corregido en el GelCompar II 4.0 mediante la elección de los porcentajes de los parámetros denominados tolerancia y posición. Estos dos parámetros hacen referencia a los límites del software para interpretar que dos bandas son diferentes, es decir acepta hasta un cierto valor (determinado por el usuario) de diferencia de posición por encima y por debajo entre dos bandas para seguir tomándolas como si se tratara de la misma banda. En tal sentido, (Vinueza 2007) propone utilizar valores de optimización y tolerancia de 1,5 a 2 % respectivamente, aunque se pueden encontrar en la bibliografía valores de tolerancia que llegan al 5 %, dependiendo de la población bajo estudio (Batista et al. 2007, Loureiro et al. 2006). Por lo expuesto, previamente al análisis de los cien aislamientos, realizamos una evaluación de los porcentajes de tolerancia, utilizando el perfil de bandas de las cepas de referencia (USDA 110, E104, E109, E110 y *E. fredii* USDA 205) y fijando los valores de este parámetro en 2 y 5 %. Como se observa en la Fig. III.3, el porcentaje de tolerancia que mejor se adaptó a nuestro perfil de bandas fue 2 %, dado que con ese valor las cepas del género *Bradyrhizobium* quedaron agrupadas tal como esperábamos: las cepas de una misma especie –por ejemplo E109 y USDA 110– se relacionaron dentro de un mismo grupo y en cambio *E. fredii* se ubicó en un grupo distinto. Finalmente, realizamos el análisis de similitud con el coeficiente de Jaccard, dado que es el que se adapta mejor cuando los geles evaluados presentan manchas (Grange & Mariangela Hungria 2004).

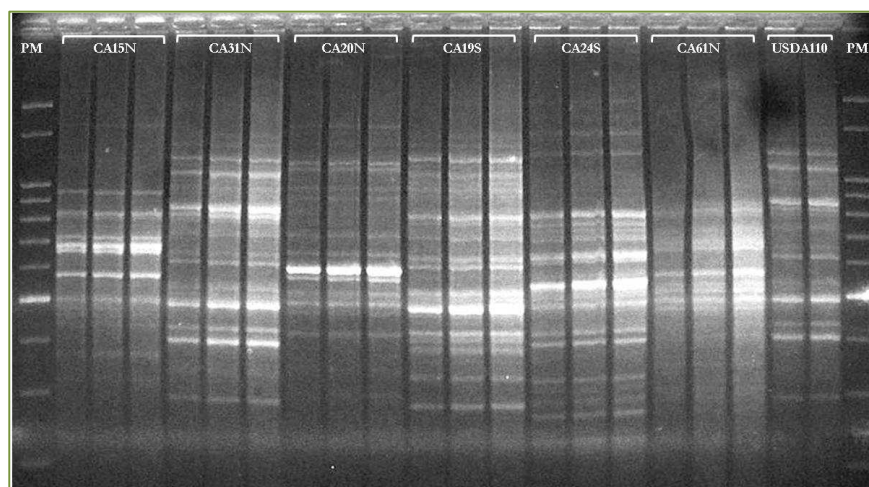
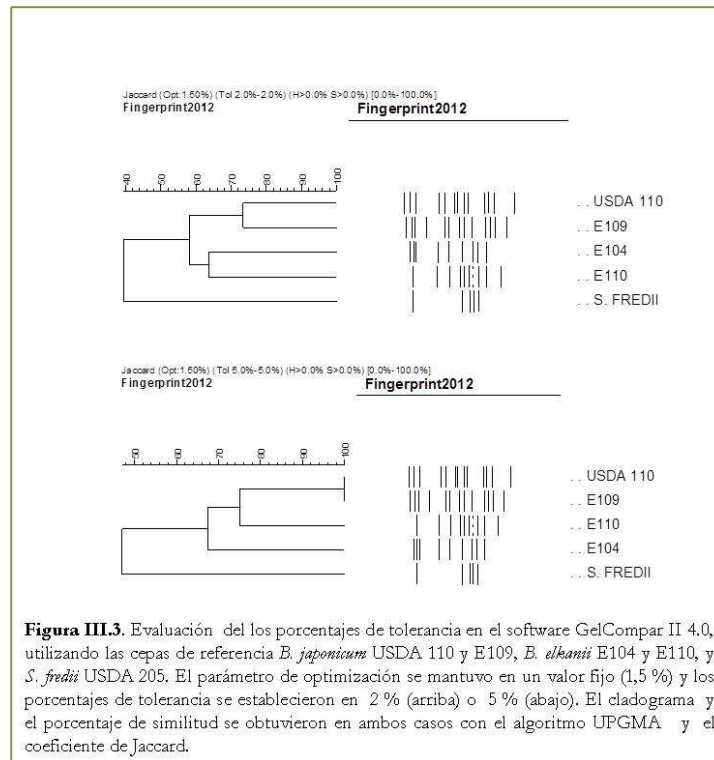


Figura III.2. Perfil de bandas representativo de aislamientos provenientes de Castelar, obtenido con los cebadores Box A1R. Cinco μ l de producto de PCR fueron sembrados en cada calle del gel de agarosa 2 %, y se realizó una corrida electroforética durante 5 horas a 70 V (constantes). La tinción se realizó con bromuro de etidio y el revelado con luz ultravioleta ($\lambda = 260$ nm). La fotografía fue tomada con una cámara digital Kodak modelo DC 120 bajo la misma intensidad de luz. USDA 110, cepa de referencia, PM: marcador de peso molecular de 100 pb.



III.2.2. Análisis del cladograma.

En la Fig. III.4 se observa el cladograma obtenido para nuestra colección de 100 aislamientos, donde además incluimos información sobre el sitio de procedencia (CA, CU, NJ, SA, VT) y el tipo de muestreo utilizado (S o N). Como puede observarse, hay una significativa diversidad, que puede agruparse en clados de mayor o menor tamaño según el porcentaje de similitud que se escoja para trazar la línea de corte. Si se elige un 45 % de similitud, resultan nueve clados mayoritarios bien distinguibles, que hemos numerado del I al IX (Fig. III.4). Entre estos clados destaca el Nro. VI por contener más de la mitad de las huellas digitales de ADN, y por lo tanto lo hemos subdividido con una línea de corte al 54 % de similitud en tres clados a los que hemos llamado VIA, VIB y VIC. Posteriormente, y como la inmensa mayoría de los aislamientos del clado VI quedaron agrupados en el clado VIB, decidimos realizar una subdivisión adicional de este clado con una línea de corte al 62 % de similitud, con lo cual resultaron los clados VIB1, VIB2 y VIB3.

Si bien estas divisiones y subdivisiones son en cierto modo arbitrarias, en todos los casos se tomaron líneas de corte con porcentajes de similitud inferiores a la similitud necesaria para considerar que dos aislamientos pertenecen a la misma cepa (Kaschuk et al. 2006, Loureiro et al. 2006). En efecto, si consideramos que huellas digitales de ADN con similitudes mayores o iguales a 70 % pertenecen a la misma cepa, nuestra colección de aislamientos contendría por lo menos 44 cepas distintas.

Asimismo, la mayoría de los clados observados en base a nuestras divisiones arbitrarias contienen un número de aislamientos tal que permite realizar un análisis estadístico de las tendencias de distribución de los genotipos de acuerdo al tipo de muestreo utilizado para ver si es posible corroborar la hipótesis planteada más arriba, según la cual podría existir una adaptabilidad específica para nodular en las condiciones

particulares de suelo y clima de cada muestreo. Si esta hipótesis es cierta, debería observarse una tendencia de los aislamientos N a agruparse juntos, distintamente de los aislamientos S, que deberían aparecer dispersos en el cladograma. Si esto no se cumple, el criterio de división adoptado para agrupar los genotipos nos puede permitir detectar si hay alguna otra tendencia estadísticamente significativa al agrupamiento por otra propiedad.

Para detectar estas posibles tendencias utilizamos la prueba de χ^2 , que permite comparar dos hipótesis: la *hipótesis nula*, según la cual la propiedad elegida se distribuiría de forma aleatoria entre los clados, y la *hipótesis alternativa*, según la cual la propiedad elegida tendería a concentrarse en forma significativamente sesgada en uno o unos pocos clados particulares en detrimento de los otros. El cálculo se realiza sobre la base de evaluar los cuadrados de las diferencias entre los valores esperados de la distribución de las propiedades si ésta fuera al azar, y los efectivamente observados. Así, si hubiera un ajuste perfecto de los valores observados con los esperados, el resultado del χ^2 debería ser cero. Sin embargo, deben esperarse desviaciones de este valor debido a la aleatoriedad de las muestras. Para valorar estadísticamente estas desviaciones se compara el valor de χ^2 calculado con valores tabulados, que representan los máximos valores de χ^2 que podrían obtenerse con una probabilidad dada debido a la aleatoriedad del muestreo, si aún la hipótesis nula fuera cierta.

Nosotros planteamos como hipótesis nula que los aislamientos N y S se distribuyen al azar entre los clados, por lo que se esperaría que en cada clado haya aproximadamente un 50 % de aislamientos de cada tipo, ya que la mitad de los aislamientos son N y la mitad son S. Para realizar el cálculo consideramos solamente a los cinco clados que contienen como mínimo cinco aislamientos cada uno, con lo cual el análisis constó de diez comparaciones. El valor de χ^2 obtenido al comparar la distribución de los genotipos contra esta hipótesis nula fue de 16,01 mientras que, con 9 grados de libertad, el valor límite por encima del cual la hipótesis nula puede rechazarse con una probabilidad de error menor que 0,05 es de 16,92; lo cual indica que los aislamientos N y S efectivamente están distribuidos al azar entre los clados.

La otra propiedad ecológicamente importante de los aislamientos es su sitio de procedencia. Por lo tanto, repetimos el cálculo esta vez planteando como hipótesis nula que en cada clado todos los sitios de procedencia están representados al azar. Nuevamente, dado que la colección de 100 aislamientos está compuesta por 20 aislamientos de cada sitio, se esperaría que de cumplirse la hipótesis nula, cada clado con al menos cinco aislamientos debería contener en promedio uno de cada sitio (20 %). Esta vez se realizaron 25 comparaciones, y el valor de χ^2 obtenido al comparar la distribución de los sitios de procedencia dentro de los clados frente a la hipótesis nula fue de 133,06; mientras que, con 24 grados de libertad, el valor límite de χ^2 tabulado por encima del cual puede rechazarse la hipótesis nula con una probabilidad de error menor que 0,001 es de 51,18. Este resultado indica que existe un sesgo estadísticamente muy significativo en la distribución de los genotipos por sitio de procedencia entre los clados.

Para visualizar este resultado en forma gráfica, analizamos histogramas de la distribución de cada sitio de procedencia dentro de los clados, como muestra la Fig. III.5. De aquí podemos observar lo siguiente:

- CA: Tendió a agruparse en el clado VI, distribuyéndose con mayor frecuencia en los clados VIB.2 y VIB.3 (81 % de los aislamientos) y en menor proporción en los clados VIB.1, I y II.
- CU: Se agrupó casi por completo en el clado I con un 82% de los aislamientos.
- NJ: Se distribuyó de forma pareja entre todos los clados, excepto en los clados II (que contiene solo tres aislamientos) y el IX (formado por un solo aislamiento).
- SA: Se distribuyó con un 55% de los aislamientos en el clado VIA y con un 33% en el VIB.1.
- VT: El 59% se agrupó en el clado VIB.1 y el 30% en el VIB.3.

Dado que el clado VI se subdividió dos veces, realizamos otros dos análisis de χ^2 para ver si esta subdivisión introducía un sesgo artificial. En el primer análisis consideramos al clado VI sin subdividir, y nuevamente la probabilidad de que la distribución de los sitios de procedencia fuera al azar entre los clados fue menor que 0,001. Alternativamente, analizamos solamente al clado VI con sus subdivisiones y hallamos también que la distribución de los sitios de muestreo dentro de este clado tiene un sesgo estadísticamente significativo, con una probabilidad de error menor a 0,001.

El análisis de los clados nos sugirió por un lado, que las cepas obtenidas en este trabajo poseen una fuerte adaptación a su zona de origen, pero que las cepas que efectivamente nodularon en el sitio y el año de muestreo dentro de cada zona no poseen una adaptación particular entre las que potencialmente son capaces de nodular soja en dichas zonas. Además, parecería que la cepa utilizada mayormente como inoculante en estos suelos, *B. japonicum* E109, está pobremente representada, ya que la misma se agrupa en el clado III, el cual contiene menos del 4% del total de cepas analizadas.

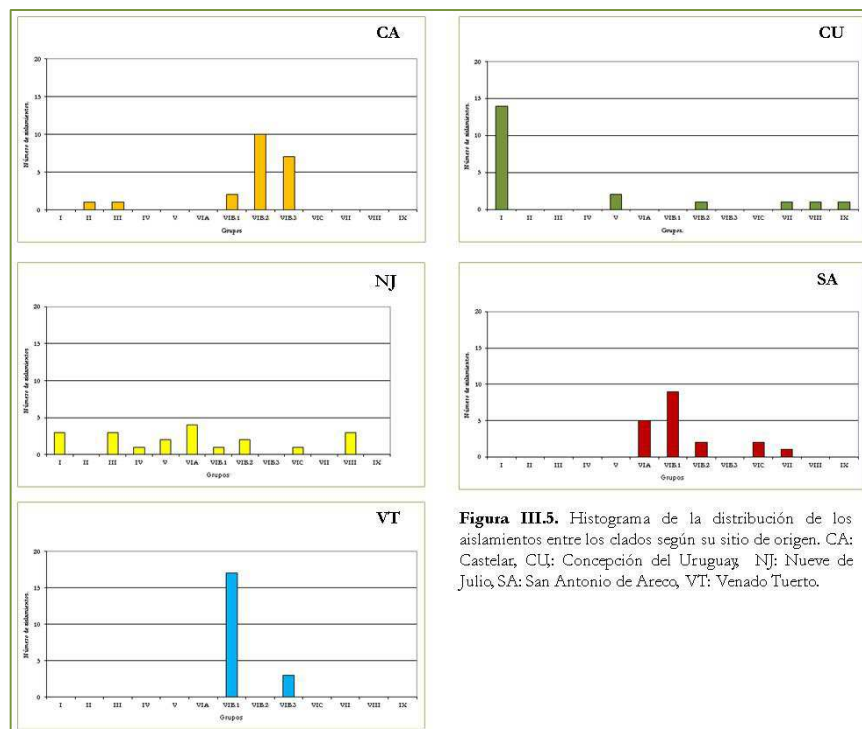


Figura III.5. Histograma de la distribución de los aislamientos entre los clados según su sitio de origen. CA: Castelar, CU: Concepción del Uruguay, NJ: Nueve de Julio, SA: San Antonio de Areco, VT: Venado Tuerto.

III.3. Caracterización Fenotípica.

Hoy en día, la caracterización de un (bradi)rizobio se basa tanto en los caracteres fenotípicos como genotípicos. De esto modo de acuerdo a Jordan (en Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey 1984) los (bradi)rizobios pueden ser descriptos de acuerdo a su crecimiento en medios de cultivo sólidos o líquidos. Tanto el tamaño, la forma, el color y la textura de las colonias, como así también la capacidad de modificar el pH del medio, son características estables que pueden utilizarse para la caracterización de cepas. Los (bradi)rizobios presentan una temperatura óptima de crecimiento de 25 a 30 °C, en medios de cultivo con pH entre 6 y 7.

Para comenzar nuestra caracterización de los 100 aislamientos de rizobios noduladores de soja realizamos una evaluación de distintos aspectos fenotípicos y fisiológicos. De esta manera obtuvimos una aproximación del tipo de diversidad rizobiana de cada sitio. En esta sección evaluamos los siguientes caracteres:

1. Capacidad de crecimiento a 28 °C y 37 °C.
2. Coloración de las colonias crecidas en YEM-agar suplementado con rojo congo.
3. Acidificación o alcalinización del medio YEM agar suplementado con azul de bromotimol.

III.3.1. Capacidad de crecimiento de las colonias a distintas temperaturas.

Con el fin de evaluar la capacidad de los aislamientos para crecer a temperaturas por encima de la óptima tolerada por los (bradi)rizobios, cultivamos las bacterias en placas de YEM-agar con rojo congo a 28 °C y a 37 °C. La primera temperatura es la normal para el crecimiento de (bradi)rizobios y la segunda no es tolerada por (bradi)rizobios mesófilos, aunque en los suelos puede haber cortos periodos con estas marcas térmicas en zonas expuestas al sol durante el verano. Como se observa en la Tabla III.2, todos los aislamientos fueron capaces de crecer a 37 °C, en contraste con la cepa E109 utilizada como referencia. La colección de (bradi)rizobios presentó un tiempo de formación de nuevas colonias a 37 °C similar al observado a 28 °C. Este resultado sugiere que nuestros aislamientos pueden poseer una ventaja selectiva frente a la cepa utilizada en los inoculantes por su tolerancia a la alta temperatura. La soja es un cultivo de verano, y la formación de los nódulos que más contribuyen a la fijación de N₂ total del cultivo ocurre en las primeras etapas, entre diciembre y febrero, meses que suelen ser muy calientes en las zonas donde se realizaron los muestreos.

III.3.2. Evaluación de la coloración de las colonias en YEM-agar con rojo congo.

El medio YEM-agar con rojo congo es uno de los medios de cultivo más utilizados para (bradi)rizobios, por ser indicador para este género de bacterias en base a la baja o nula capacidad de las mismas para absorber el colorante. Como resultado, las colonias de estas bacterias son generalmente blancas con los bordes regulares, pudiendo virar al rojo un cierto tiempo después que se completó el crecimiento debido a la biosíntesis tardía de celulosa. Por lo tanto, dentro de esta característica y dependiendo del (bradi)rizobio, podemos encontrar distintos grados de coloración, incluyendo colonias blancas, opacas, translúcidas, rosadas y en algunos casos rojas (*E. meliloti*). La Tabla III.2 nos muestra la distribución del tipo de coloración obtenido en nuestra colección. Si bien es clara la

Tabla III.2. Caracterización fenotípica y crecimiento a 37 °C de los aislamientos.

Procedencia	Color de las colonias en YEM				Color del medio de YEM con azul de bromotimol (%)			Crecimiento a 37 °C (%)
	Con rojo congo (%)				Azul	Amarillo	Verde	
	Blancas/ Opacas	Blancas/ Translúcidas	Translúcidas	Rosadas				
Castelar	15	-	75	10	15	10	75	100
Concepción del Uruguay	10	5	15	65	15	70	15	100
Nueve de Julio	30	10	40	20	35	25	40	100
San Antonio de Areco	35	-	45	20	35	20	45	100
Venado Tuerto	30	-	35	35	35	30	35	100

diversidad, la mayoría de las cepas presentaron un fenotipo translúcido, a diferencia de E109, que presentó colonias blancas más típicas del crecimiento de *B. japonicum* en YEM-agar con rojo congo. Estos resultados además indican que la capacidad de sintetizar celulosa está pobremente representada en nuestra colección.

III.3.3. Evaluación de la modificación del pH del medio y la velocidad de crecimiento.

Para observar la capacidad de estas cepas para modificar el pH del medio suplementamos el YEM-agar con azul de bromotimol. Este colorante es utilizado como marcador de pH, dado que su viraje a un color amarillo indica la acidificación del medio, mientras que su viraje hacia el azul se corresponde con la alcalinización. Estas modificaciones en el pH del medio se correlacionan además con la velocidad de crecimiento. Los rizobios como *E. fredii*, liberan al medio ácidos orgánicos, disminuyendo así su pH. En cambio, los bradirrizobios como *B. japonicum* liberan al medio cationes que lo alcalinizan. Mediante estas observaciones hemos dividido a los aislamientos en bradirrizobios, en los cuales la presencia de colonias se evidenciaba a partir de los cinco días de crecimiento y el medio viraba al azul, y los rizobios, en los que las colonias fueron visibles en dos días y el medio viraba al amarillo. Como referencias utilizamos a *B. japonicum* E109 como representante de los bradirrizobios y *E. fredii* USDA 205 como representante de los rizobios. Cabe destacar que algunos aislamientos no mostraron modificación del pH del medio. En esos casos, no pudimos determinar con certeza si se trataba de bradirrizobios o rizobios (para más detalles, véase Tabla 1 en el apéndice B).

Si realizamos el análisis por viraje de pH, en todos los sitios se obtuvo entre un 45 % y 75 % de aislamientos que dieron color verde (G) excepto para CU que solo mostró un 15 % de esta categoría. El color verde implicaría un pH neutro y por lo tanto no podemos determinar si se trata de bradirrizobios o rizobios. Si analizamos el viraje a pH alcalino, vemos que en Castelar y Concepción del Uruguay el 15 % de los aislamientos mostraron un color azul (B) y en Nueve de Julio, San Antonio de Areco y Venado Tuerto lo hicieron un 35 % de las cepas. Por último, si analizamos el viraje a pH ácido, en todos los casos obtuvimos unos valores de entre 10 y 35 %, excepto para Concepción del Uruguay, que mostró un 70 %. En forma global, el 42 % de las cepas produjo un pH neutro, el 33 % un pH ácido y el 25 %, alcalino. Con respecto al tipo de crecimiento, observamos que el 25 % de los aislamientos serían de crecimiento lento, el 33% de crecimiento rápido y a un 42% no lo pudimos determinar por este medio (Tabla III.2).

III.3.4. Elección de cepas para continuar el estudio.

Los próximos pasos que nos propusimos para nuestro estudio consistieron en:

1. Tratar de develar qué características ambientales podrían explicar el sesgo en la distribución de los genotipos por sitio de procedencia, y si ello podría tener relación con la baja representatividad de la cepa E109 en el cladograma.
2. Analizar las capacidades simbióticas de las cepas de esta colección con el fin de poner a prueba experimentalmente la hipótesis corriente de que las cepas alóctonas de la población del suelo son buenas competidoras para la nodulación pero mediocres fijadoras de N_2 , y eventualmente, encontrar cepas con caracteres deseables para su uso en nuevos inoculantes.

Debido a que resultaba imposible llevar a cabo estos análisis con los 100 aislamientos, decidimos elegir dos representantes de cada sitio de muestreo, de modo tal que también estuvieran representados los otros criterios, es decir: pertenencia a diferentes clados, modo de aislamiento y capacidad de modificar el pH del medio (asimilable a crecimiento rápido o lento). Con este criterio elegimos las siguientes cepas: CA12S, CA61N, CU05N, CU42S, NJ33N, NJ63N, VT12S, VT16S, SA35N, SA37S (para más detalles, ver Tabla 1 en el Apéndice B).

III.4. Evaluación de la tolerancia a la acidez.

Con el objeto de encontrar posibles características ambientales que expliquen el agrupamiento de los genotipos por zona de origen, realizamos un análisis de las características de los suelos de donde provenían nuestros aislamientos. Entre las características evaluadas incluimos los valores de pH de cada suelo (Tabla III.1). La medición de este parámetro es afectada tanto por la dilución de la muestra utilizada, como por la concentración de sales que presenta. Por ello, este parámetro puede ser medido por dos metodologías: en disolución con KCl (nos da una idea de los H^+ disueltos y de los iones adsorbidos en la muestra) o con H_2O (nos da el valor de la concentración de H^+ disueltos). Dependiendo del método utilizado, se puede definir una clasificación de los suelos. Dado que nuestras muestras habían sido medidas en H_2O , tomamos la clasificación definida en el manual *Soil Chemistry* (Bohn et al. 2001).

- Suelos débilmente ácidos: aquellos que presentan un rango de pH de 6,1 a 6,5, incluyendo en este grupo a los suelos de Nueve de Julio (pH 6,2) y Concepción del Uruguay (pH 6,4).
- Suelos moderadamente ácidos: aquellos con un rango de pH de 5,6 a 6, ubicando en este grupo a Castelar (pH 5,7) y a Venado Tuerto (pH 5,8).
- Suelos muy fuertemente ácidos: como aquellos que presentan un rango de pH de 4,5 a 5, en este grupo ubicamos a San Antonio de Areco (pH 4,8).

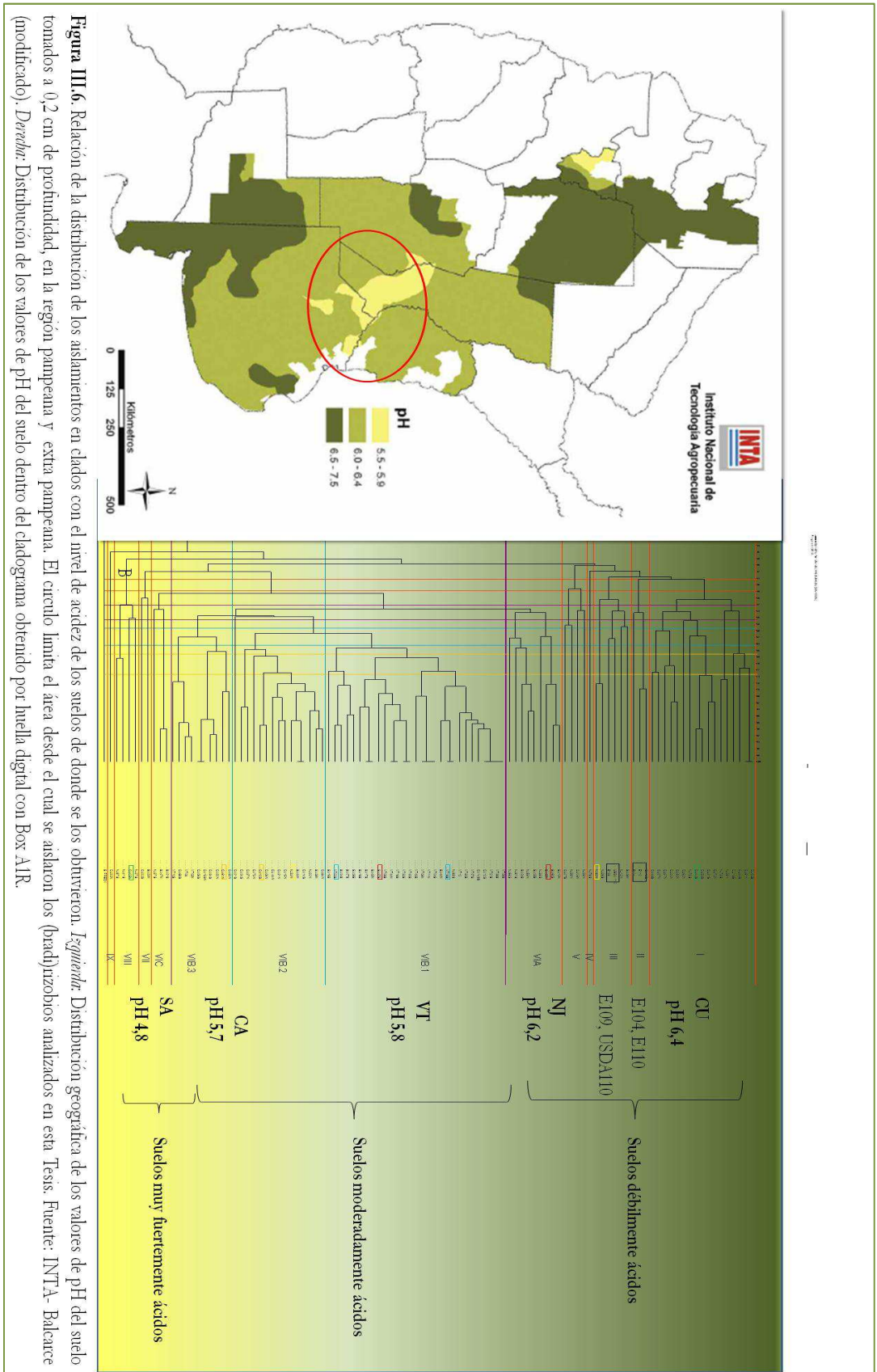


Figura III.6. Relación de la distribución de los aislamientos en clados con el nivel de acidez de los suelos de donde se los obtuvieron. *Legenda:* Distribución geográfica de los valores de pH del suelo tomados a 0,2 cm de profundidad, en la región pampeana y extra pampeana. El círculo limita el área desde el cual se aislaron los (bardi)rizobios analizados en esta Tesis. Fuente: INTA- Balcarce (modificado). *Detalle:* Distribución de los valores de pH del suelo dentro del cladograma obtenido por huella digital con Box AIR.

Como se observa en la Fig. III.6, esos valores de pH se correspondieron con la distribución de los clados evidenciados con la técnica de huella digital de ADN, donde además se puede observar que las cepas de referencia se ubican en clados relacionados con suelos débilmente ácidos. Es decir que el agrupamiento por zonas de origen podría relacionarse con el pH de los suelos de dichas zonas y por lo tanto, esto podría reflejar una cierta adaptabilidad de las cepas bajo estudio a esos rangos de acidez.

Además de la influencia del pH en el crecimiento de los rizobios y los bradirrizobios, es conocido el hecho de que en suelos ácidos aumentan las concentraciones de los cationes Al^{3+} y Mn^{2+} y se reducen las de Ca^{2+} , PO_4^{3-} , Mg^{2+} y Mo^{2+} . En particular, cuando el suelo presenta pH por debajo de 5,3 la concentración de Al^{3+} disponible aumenta, llegando a observarse un efecto tóxico para las plantas, como así también para este grupo de bacterias, y por ende la simbiosis resulta afectada (Keyser & Munns 1978).

Por todo lo expuesto, decidimos continuar nuestros estudios evaluando la tolerancia a la acidez y al Al^{3+} tanto de las diez cepas seleccionadas como de la cepa E109. Para realizar este análisis utilizamos el método propuesto por el grupo de Ayanaba et al. (1983) excepto que el medio mínimo propuesto por ellos fue reemplazado por YEM-agar (20 g.l⁻¹). Así, las cepas a evaluar fueron estriadas en placas de Petri conteniendo:

- ✓ YEM-agar, pH 7 (control de crecimiento).
- ✓ YEM-agar, pH 4,8.
- ✓ YEM-agar, pH 4,8 suplementadas con AlCl_3 50 μM .

En todos los casos los medios contenían el colorante azul de bromotimol como indicador de pH. Como se observa en la Tabla III.3, todas las cepas fueron capaces de crecer a pH 4,8 y pH 7 luego de 10 días de incubación a 28 °C. Sin embargo, cuando evaluamos su crecimiento a pH 4,8 en presencia de AlCl_3 , observamos que todas las cepas autóctonas crecieron, mientras E109 no. Dentro de las cepas autóctonas observamos dos comportamientos: algunas crecieron igual en presencia o ausencia de AlCl_3 , mientras que otras crecieron en menor medida en presencia de AlCl_3 . Por lo tanto, en líneas generales podemos afirmar que las cepas autóctonas presentan mayor tolerancia al aluminio que la cepa E109. El análisis en conjunto del crecimiento a pH ácido nos revela que esta propiedad no fue exclusiva de las cepas provenientes de suelos fuertemente ácidos, con lo cual podría ser una cualidad intrínseca de todo este grupo de bacterias, no necesariamente sujeta a selección en su nicho particular. Por otro lado, encontramos cepas que fueron aisladas de suelos débilmente ácidos (NJ33N, NJ63N, CU05N y CU42S) y que resultaron tolerantes a aluminio, mientras que la cepa SA35N, que fue aislada desde el suelo con menor pH, fue menos tolerante. Estos resultados indican que la tolerancia a aluminio tampoco se correlacionaría con la acidez del suelo de origen. En cualquiera de los casos, estas características no parecerían estar relacionadas con la velocidad de crecimiento, es decir si son bradirrizobios o rizobios.

Por lo tanto, si bien es claro que hubo una tendencia de los genotipos a agruparse según el nivel de acidez de sus suelos de origen, la capacidad de estas cepas para crecer en medio YEM a pH 4,8 en presencia o ausencia de AlCl_3 no explica la adaptabilidad sugerida por dicho agrupamiento.

Tabla III.3. Crecimiento en YEM-agar al pH indicado, en presencia o ausencia de AlCl_3 ($50 \mu\text{M}$) de las cepas representativas de cada clado y de E109.

Nombre		Crecimiento a 28 °C		
		YEM pH 7	YEM pH 4	YEM pH 4 / AlCl_3
Rhizobios	CA12S	Sí	Sí	Sí
	CU42S	Sí	Sí	Sí*
	NJ63N	Sí	Sí	Sí
	SA35N	Sí	Sí	Sí*
	VT02S	Sí	Sí	Sí
Bradirrhizobios	CA61N	Sí	Sí	Sí
	CU05N	Sí	Sí	Sí
	NJ33N	Sí	Sí	Sí*
	SA37S	Sí	Sí	Sí
	VT16S	Sí	Sí	Sí
E109		Sí	Sí	No

Sí/No, indica si se observó o no crecimiento en las placas de Petri al cabo de 10 días.

El símbolo * indica que hubo crecimiento, pero que fue menor al observado en la placa de YEM pH 4 ó 7.

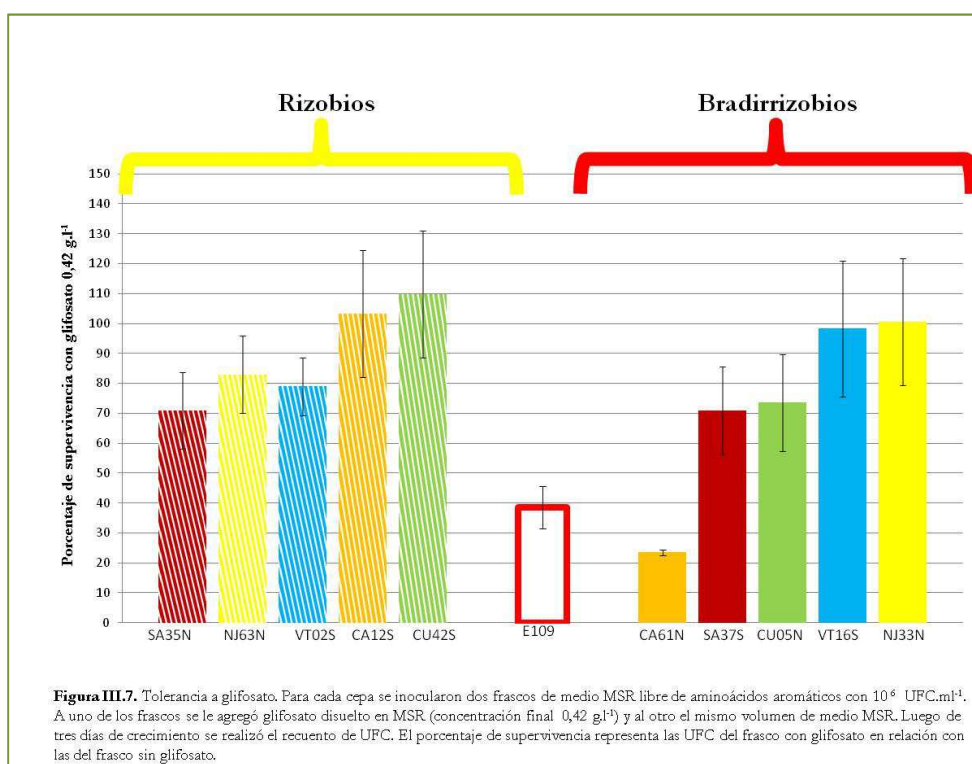
III.5. Evaluación de la tolerancia al glifosato.

El herbicida glifosato (isopropilamina de N-fosfonometilglicina) ha sido ampliamente utilizado en los cultivos de soja en nuestro país. Esto se debe a que el 95 % de los cultivos de soja se realizan empleando la variedad transgénica RR, la cual es resistente a este herbicida. El glifosato actúa como inhibidor competitivo de la enzima 3-enolpiruvilshikimato-5-fosfato (EPSP) sintasa (EC 2.5.1.19), dado que presenta una estructura química muy similar al fosfoenolpiruvato (PEP), sustrato de dicha enzima (Steinrücken & Amrhein 1980). La EPSP sintasa está presente en plantas y microorganismos, pero no en animales. Esta enzima reviste vital importancia ya que pertenece a la vía metabólica de la síntesis de aminoácidos aromáticos.

Algunas especies de bacterias, tales como *Agrobacterium tumefaciens*, poseen formas de EPSP sintasa resistentes a glifosato. Además, este herbicida puede ser degradado y utilizado como fuente de fósforo. Diversos reportes muestran que esta capacidad es una característica ampliamente extendida en la familia Rhizobiaceae, sin embargo muy pocas especies son capaces de utilizarlo como única fuente de fósforo (Liu et al. 1991). En particular *B. japonicum* USDA110, USDA123 y USDA138 han sido reportadas como sensibles a glifosato en medios libres de aminoácidos aromáticos (Moorman et al. 1992).

Para evaluar la posible tolerancia a glifosato de las cepas alóctonas utilizamos el método propuesto por (Moorman et al. 1992) (para más detalles véase Capítulo II). En la Fig. III.7 se muestran los resultados como porcentaje de sobrevivientes en una incubación en MSR con glifosato $0,42 \text{ g.l}^{-1}$ con respecto a una incubación paralela en MSR sin glifosato. La mayoría de las cepas alóctonas presentaron un mayor porcentaje de supervivencia al glifosato en relación con E109, cuya supervivencia no superó el 50 %, de acuerdo con lo observado en otras cepas de *B. japonicum* (Moorman et al. 1992). La excepción fue CA61N, que resultó inhibida un 70 %.

Si bien estos resultados por sí solos no explican la baja representatividad del genotipo de E109 en el cladograma, sugieren que la tolerancia al glifosato de las cepas alóctonas podría jugar un papel en su adaptabilidad a los suelos bajo cultivo de soja.



III.6. Resumen y discusión.

En este capítulo nos propusimos realizar una caracterización de las bacterias alóctonas frente a las cuales deben competir los bradirrizobios de los inoculantes, de manera tal de tratar de comprender mejor ese aspecto de la problemática de la competencia para la nodulación de soja en Argentina. A partir de una colección de aislamientos de bacterias noduladoras de soja obtenidos de cinco zonas del denominado cinturón sojero de nuestro país logramos realizar un paneo de su diversidad biológica, tanto desde el punto de vista fenotípico como genotípico. El material utilizado incluyó muestras de las provincias de Buenos Aires (Castelar, Nueve de Julio y San Antonio de Areco), Entre Ríos (Concepción del Uruguay) y Córdoba (Cavanagh, cercana a Venado Tuerto), las que fueron obtenidas con dos métodos de muestreo: desde nódulos desarrollados en el sitio o desde muestras de suelo (N o S respectivamente). De esta forma, los aislamientos fueron evaluados por área de muestreo y por su potencial de nodulación tanto en condiciones óptimas (laboratorio), como en una condición ambiental particular. Esto también nos permitió evaluar la posible adaptación de los aislamientos a cada zona y hacer una estimación de la influencia de las condiciones del suelo sobre la adaptabilidad de la cepa E109, usualmente utilizada en los inoculantes.

Al realizar la caracterización fenotípica de los aislamientos mediante la evaluación del tipo de colonia formada en placas de YEM-agar con rojo congo y su capacidad de modificar el pH en YEM-agar suplementado con azul de bromotimol, observamos un alto grado de diversidad entre ellos. Este comportamiento fue independiente de la zona de la

cual fueron obtenidos, como así también del método de muestreo utilizado. Sin embargo, cuando evaluamos su capacidad para tolerar temperaturas superiores (37 °C) a la óptima de cultivo (28 °C), observamos una alta homogeneidad, dado que el 100 % de los aislamientos crecieron a 37 °C a diferencia de la cepa E109, que fue incapaz de tolerar dicha temperatura. Este tipo de evaluación nos puso de manifiesto que nuestra colección presentaba un alto grado de heterogeneidad con respecto a características morfológicas y de crecimiento, pero no así en su adaptabilidad a una característica ambiental generalizada en las zonas de muestreo.

Al realizar la caracterización genotípica por medio de la técnica de huella digital de ADN, obtuvimos un cladograma que nos permitió evidenciar nuevamente un alto grado de diversidad en los perfiles de bandas. Asimismo, creemos que la colección está formada por al menos 44 cepas distintas, si consideramos como la misma cepa a un conjunto de aislamientos que presentan un valor de similitud mayor al 70 % (Loureiro et al. 2006).

La diversidad de cepas autóctonas tendió a agruparse en clados según el sitio de procedencia y en particular, según el nivel de acidez del suelo de procedencia

Debido a que resultaba imposible llevar a cabo análisis biológicos más pormenorizados con todas las cepas, decidimos elegir dos representantes de cada sitio de muestreo para continuar el trabajo. Los criterios de elección fueron: pertenencia a diferentes clados, modo de aislamiento y capacidad de modificar el pH del medio (crecimiento rápido o lento). Con estos criterios elegimos las siguientes cepas: CA12S, CA61N, CU05N, CU42S, NJ33N, NJ63N, VT12S, VT16S, SA35N, SA37S.

Los suelos de los cuales habían sido aisladas las cepas presentaban un pH ácido. De acuerdo a sus valores, pudimos clasificarlos en suelos débilmente ácidos (Nueve de Julio y Concepción del Uruguay), moderadamente ácidos (Venado Tuerto y Castelar) y muy fuertemente ácidos (San Antonio de Areco). A su vez, encontramos que el ordenamiento de los valores de pH de cada suelo se correlacionó con la distribución de los clados. Así, los aislamientos de suelos catalogados en débilmente ácidos (NJ y CU) se ubicaron en un extremo del cladograma, mientras los aislamientos provenientes del suelo extremadamente ácido (SA), se ubicaron en el extremo opuesto. Por su parte, la cepa E109 se agrupó dentro del clado correspondiente a suelos débilmente ácidos. Sin embargo, todas las cepas analizadas fueron tolerantes a la acidez en medio YEM, pero solo las cepas autóctonas fueron al mismo tiempo tolerantes a aluminio. Un comportamiento similar tuvieron en su tolerancia a glifosato, donde E109 fue sensible, mientras que nueve de las diez cepas analizadas resultaron resistentes.

Los resultados de este capítulo nos indican la existencia de un alto grado de diversidad rizobiana en los suelos bajo cultivo de soja en Argentina. Esta diversidad parece relacionarse con el sitio de procedencia de cada población, pero parecería que todas las cepas autóctonas sufrieron la misma presión de selección, ya que todas mostraron un comportamiento homogéneo para los caracteres selectivos estudiados: tolerancia a la alta temperatura, a la acidez, al aluminio y al glifosato, independientemente del sitio de procedencia, tipo de muestreo y velocidad de crecimiento. Este comportamiento no es general de los (bradi)rizobios, ya que fue diferencial a E109, la que resultó sensible a la alta temperatura, al aluminio y al glifosato. El análisis del cladograma nos puso de manifiesto que el genotipo de la cepa E109 se ubicaba en un clado representado por menos del 6 % del total de los genotipos, lo que nos indicaba que esta cepa presentaba una baja

representatividad dentro de nuestra colección. Esta baja representatividad podría estar relacionada con la adaptabilidad diferencial de las cepas autóctonas, pero no puede descartarse que haya otros caracteres adaptativos que también sean diferenciales entre aquéllas y E109.

Los resultados presentados en este capítulo indican que a la hora de formular nuevos inoculantes, no solo se debería tener en cuenta su eficiencia simbiótica, sino también su capacidad de adaptación general al sitio donde se pretende que sean utilizados.

CAPITULO

IV

Caracterización
simbiótica de cepas
alóctonas aisladas de
suelos con historial
de cultivo de soja

En el capítulo anterior pudimos agrupar a las cien cepas aisladas de suelos con historial de cultivo de soja en nueve clados de acuerdo a sus huellas digitales de ADN por PCR con cebadores arbitrarios Box A1R (Versalovic et al. 1994). En la mayoría de los casos, las cepas se agruparon con una tendencia estadísticamente significativa, según su zona de procedencia, pero no así por su tipo de crecimiento en placas de YEM-agar ni por el tipo de muestreo (Fig. III.4). Por lo tanto, estos clados solo nos proporcionan información sobre las relaciones genotípicas de estas cepas. Si bien todas estas cepas ya habían demostrado su capacidad de nodular, hasta el momento no teníamos una visión clara de sus capacidades simbióticas, las que no pueden derivarse del agrupamiento genotípico.

La hipótesis más comúnmente aceptada para explicar la falta de respuesta a la biofertilización en suelos con poblaciones alóctonas de (bradi)rizobios noduladores de soja es que dichas poblaciones son muy competitivas para nodular pero poco eficientes para fijar N_2 , razón por la cual interfieren con el biofertilizante al ocupar la mayoría de los nódulos y por lo tanto, conducen a una pobre FBN en general. La simbiosis, como se mencionó anteriormente, es un proceso complejo que no solo está determinado por el (bradi)rizobio sino también por las necesidades nutricionales de la planta y los factores bióticos y abióticos que condicionan la infectividad. De este modo, en este capítulo pondremos a prueba experimentalmente la hipótesis antedicha, evaluando la capacidad simbiótica de nuestras cepas, no solamente desde el punto de vista de su capacidad para nodular y fijar N_2 , sino también de su capacidad intrínseca para competir por la nodulación.

Dado que, por razones de espacio, los experimentos de interacción rizobio-planta no podían llevarse a cabo con las cien cepas, utilizamos las 10 cepas seleccionadas en el capítulo anterior, las cuales que fueron evaluadas en comparación con *B. japonicum* E109 (empleada en la mayoría de los inoculantes en la Argentina) y *B. japonicum* USDA 110 [cuyo genoma se encuentra totalmente secuenciado (Kaneko et al. 2002)] como cepas de referencia (Tabla IV.1). Además de poner a prueba la hipótesis de que estas cepas deberían poseer, mayoritariamente, una alta competitividad para nodular y una baja eficiencia para fijar N_2 , contemplamos la posibilidad de que exista algún tipo de relación entre la eficiencia simbiótica de cada cepa y su lugar de procedencia.

IV.1. Diseño del ensayo de fijación de FBN.

Para realizar los ensayos de nodulación y fijación de N_2 se inocularon ocho plantas con cada cepa, y se dejaron ocho plantas sin inocular como controles negativos. A cada planta se le midió el peso seco de la parte aérea, el número de nódulos, el peso seco de los nódulos y el contenido de ureidos en hojas.¹

Teniendo en cuenta el número de plantas totales (104), el espacio físico a utilizar y la manipulación necesaria para el procesamiento de las mismas, se decidió realizar el experimento en dos etapas, inoculando cuatro plantas con cada cepa en un día y repitiendo la operación con otras cuatro plantas al día siguiente. Esto permitió realizar todas las manipulaciones de inoculación y cosecha adecuadamente, pero trajo el inconveniente de que los dos grupos de cuatro plantas que recibieron inóculos de una dada cepa fueron inoculados con cultivos distintos, lo cual podría implicar que las unidades experimentales de un grupo de plantas difirieran de las del otro grupo de cuatro plantas. Para ver si este diseño experimental incorporaba una fuente de variación adicional, se realizaron análisis de

¹Realizado en la Universidad Pública de Navarra (Pamplona, España) bajo la dirección del Dr. Cesar Arrese-Igor

Tabla IV.1. Cepas utilizadas para los ensayos simbióticos y de competición para la nodulación, y sus características relevantes.

Nombre		Características relevantes			
		Sitio de procedencia	Método de aislamiento*	Velocidad de crecimiento*	Clado
Rizobios	CA12S	Castelar	Suelo	Rápida	VIB2
	CU42S	Concepción del Uruguay	Suelo	Rápida	I
	NJ63N	Nueve de Julio	Nódulo	Rápida	III
	SA35N	San Antonio de Areco	Nódulo	Rápida	VIA
	VT02S	Venado Tuerto	Suelo	Rápida	VIB1
Bradirrizobios	CA61N	Castelar	Nódulo	Lenta	VIB3
	CU05N	Concepción del Uruguay	Nódulo	Lenta	VIII
	NJ33N	Nueve de Julio	Nódulo	Lenta	VIB2
	SA37S	San Antonio de Areco	Suelo	Lenta	VIB1
	VT16S	Venado Tuerto	Suelo	Lenta	VIB1
E109			NE†	Lenta	III
USDA 110			NE†	Lenta	III
LP 3018		Colección propia.	NE†	Lenta	-

†NE: No especificado.

variancia según un diseño en bloques completamente aleatorizados, **DBCA**, donde los bloques fueron los grupos de cuatro plantas inoculadas en días sucesivos. En la Tabla IV.2 se muestra el análisis de los datos de peso seco de la parte aérea a modo de ejemplo, donde se observa que no hubo diferencias significativas entre los dos bloques. Resultados similares se obtuvieron con las otras variables, de lo cual se concluyó que esta inoculación en dos etapas no introdujo una fuente de variación adicional. Por lo tanto, en lo sucesivo el experimento se analizó según un diseño completamente aleatorizado, **DCA**, considerando a las ocho plantas inoculadas con cada cepa como unidades experimentales equivalentes. Posteriormente, para analizar si existían diferencias significativas entre las performances de las diferentes cepas, se aplicó el análisis de variancia seguido de un test de Tukey ($p < 0,05$).

Tabla IV.2. Análisis de varianza según un DBCA de los datos de peso seco de la parte aérea de las plantas inoculadas con las cepas indicadas en la **Tabla IV.1.**

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	F (calculado)	F (tablas, $p < 0,05$)
Cepas	34,34	12	2,86	12,93**	2,39
Bloques	0,96	1	0,96	4,34	6,93
Error	19,92	90	0,22		
Total	55,225	103	0,54		

IV. 2 Análisis de parámetros nodulares

Se evaluaron tanto el peso seco promedio de los nódulos, como el número total de ellos de cada planta. Como primera medida al procesar cada bloque, se verificó que los controles negativos no presentaran nódulos en sus raíces. A continuación se procedió al procesamiento de las plantas.

Al analizar estadísticamente el peso seco promedio por nódulo (PSN, Fig. IV.1.) se observó que las cepas se separaban claramente en cuatro grupos: 1) las que producían menor PSN que las cepas de referencia, 2) las que producían mayor PSN que las cepas de referencia, 3) las que producían PSN dentro del rango de las cepas de referencia, y 4) SA37S, que produjo un PSN significativamente mayor que todas las otras cepas. A los fines prácticos, en lo que sigue incluiremos a SA37S dentro del grupo que produjo mayor PSN que las cepas de referencia.

Al analizar los tres grupos por sus características de crecimiento, éstas también se relacionaron. El grupo que presentó menor PSN estuvo integrado por rizobios, excepto CU05N. Esta cepa, como se comentó en el capítulo anterior, es representativa del clado VIII, el cual presenta un 75 % de cepas provenientes de Nueve de Julio y de crecimiento rápido. Por otro lado el grupo de mayor PSN estuvo constituido por bradirrizobios, excepto CU42S. El tercer grupo, de PSN sin diferencias significativas con respecto a las cepas de referencia contiene sólo a NJ33N, la cual también es un bradirrizobio y por tales razones decidimos incluirla con el resto de las cepas de crecimiento lento, con el fin de simplificar el análisis. Con estos datos, podemos plantear que el conjunto de cepas analizadas se puede dividir en dos grandes grupos:

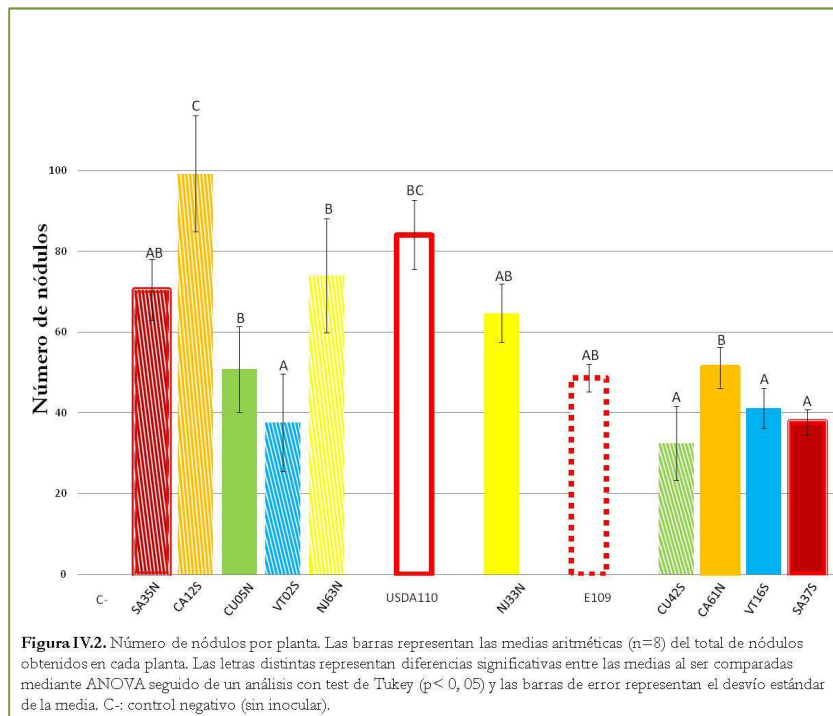
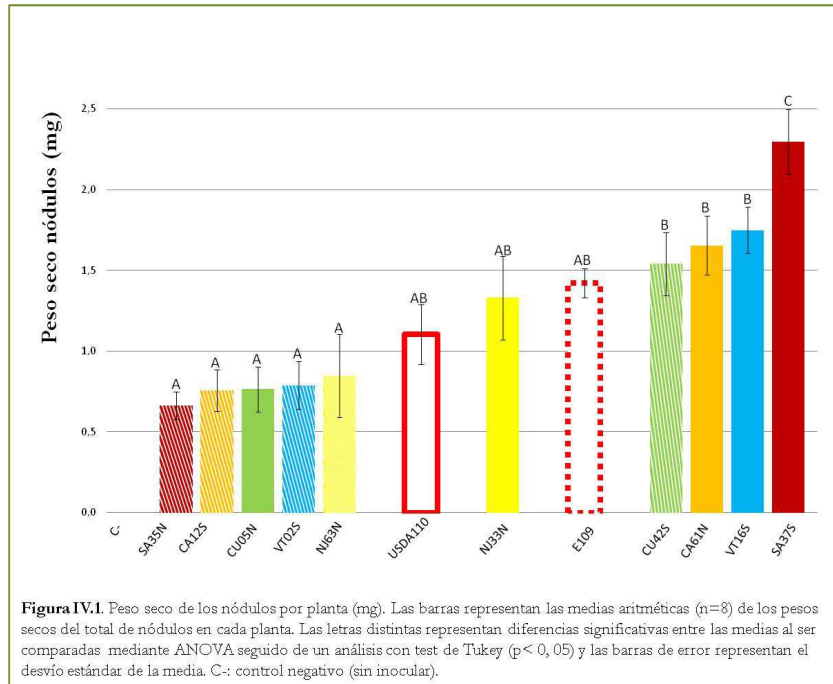
1. Cepas mayoritariamente de crecimiento rápido (**MCR**) y de bajo PSN, integrado por las cepas CA12S, NJ63N, SA35N, VT02S (todas rizobios) y CU05N (bradirrizobio).
2. Cepas de mayoritariamente de crecimiento lento (**MCL**) y de mayor PSN, integrado por las cepas CA61N, NJ33N, SA37S, VT16S (todas bradirrizobios) y CU42S (rizobio).

La pregunta que se desprende de este resultado es ¿el bajo PSN se debe a un bajo número de nódulos? Para responder a esta pregunta analizamos los datos de número de nódulos por planta obtenidos con cada cepa.

A diferencia de lo observado para el PSN, la tendencia de número medio de nódulos no fue tan marcada (Fig. IV.2). No obstante, puede observarse una relación inversa entre el PSN y el número medio de nódulos comparando el grupo MCL con el grupo MCR. Si bien las cepas MCL produjeron un mayor PSN que las MCR, el número medio de nódulos en las MCL resultó menor que en las MCR. En otras palabras, las cepas MCL produjeron pocos nódulos pero de mayor tamaño. Por su parte, en el grupo de cepas MCR, el número medio de nódulos producidos no fue tan consistente como en el caso anterior (Fig. IV.2).

Al analizar los dos parámetros de nodulación en conjunto podemos deducir que las cepas MCL presentaron caracteres compatibles con una mayor actividad nitrogenasa. Por otro lado, en las cepas MCR el menor PSN se relacionó con el tamaño de los nódulos de

manera dispar. En las cepas SA35N, CA12S y NJ63N, tal efecto resultó de un alto número de nódulos, pero de tamaño pequeño. En cambio, en VT02S y CU05N, el bajo PSN se debió a un número pequeño de nódulos de tamaño heterogéneo. En cualquiera de los dos casos, y tal como describimos anteriormente, un bajo PSN implicaría una deficiente tasa de FBN. Para tratar de corroborar esto, analizamos el contenido de ureidos en nuestras plantas.



IV. 3. Estimación de la actividad nodular

IV.3.1. Análisis de la concentración de ureidos en hojas.

De los resultados observados en el análisis de la nodulación, podríamos estimar que las cepas MCL, con mayor peso seco medio de nódulos y bajo número medio de nódulos por planta, deberían tener una eficiente fijación de nitrógeno y lo contrario debería ocurrir con las MCR.

Para corroborarlo, determinamos la concentración de ureidos en hojas. Este ensayo nos da una medida indirecta de cuán eficiente es la FBN a nivel global, ya que los ureidos son los compuestos mediante los cuales la soja transloca el nitrógeno asimilado, y de acuerdo con ello, se ha establecido una correlación positiva entre la FBN y la concentración de ureidos en hojas (Grageda-Cabrera et al. 2003). A cada muestra de hojas proveniente de cada planta, se le realizó la medida de concentración de ureidos por cuadruplicado. A los datos obtenidos de cada planta se le aplicó un análisis de varianza ($p < 0,05$) y en todos los casos se observó que los datos no mostraban diferencias estadísticamente significativas para los resultados de los cuadruplicados. Esto indicó que las cuatro medidas de cada planta eran consistentes y por lo tanto, se continuó el análisis de datos trabajando con la media obtenida en cada planta como una repetición.

Al analizar los datos por grupos de cepas MCL y MCR se observaron nuevamente dos comportamientos bien definidos (Fig. IV.3). Tal como esperábamos, las cepas MCL tuvieron en general una mayor concentración de ureidos en hojas que las MCR. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas excepto para VT16S y CU42S (ambas MCL), que mostraron un comportamiento intermedio. La cepa USDA 110 no presentó diferencias estadísticamente significativas con ninguna de las cepas MCR o MCL, no obstante se siguió observando con ella la tendencia intermedia antes mencionada. Entre las cepas MCR, CA12S (Fig. IV.3) presentó una llamativamente mayor concentración de ureidos en hojas con respecto al resto del grupo y sin diferencias estadísticamente significativas con el grupo MCL. Este resultado no era el esperado *a priori* dado que, como observamos anteriormente, CA12S presentaba muchos nódulos de tamaño pequeño y bajo peso seco (Fig. IV.1 y IV.2), por lo que suponíamos que los mismos serían ineficientes para la FBN.

Con estos resultados y teniendo en cuenta lo observado con los parámetros nodulares podríamos interpretar que las cepas MCL tendrían una mayor actividad fijadora de N_2 que las cepas MCR, e incluso podríamos proponer que CA61N y SA37S tendrían un mejor comportamiento simbiótico general que la cepa E109. Para corroborarlo, analizamos la producción de biomasa total de la parte aérea.

IV.3.2. Análisis del peso seco de la parte aérea.

El interés agronómico en la eficiencia simbiótica es lograr un aumento en el rendimiento y la calidad de las leguminosas sin que esto implique una pérdida de nutrientes para el suelo. Teniendo esto en mente, nos preguntamos si el comportamiento observado con las diferentes cepas se vería reflejado en la biomasa total de la parte aérea de las plantas, la cual se traslada luego a la producción de granos. De este modo, y para poder concluir nuestro estudio sobre la eficiencia simbiótica, analizamos el peso seco promedio de la parte aérea (PSA, Fig. IV.4). Con este parámetro volvimos a corroborar que las cepas MCR y MCL se dividían en los mismos dos grupos que ya caracterizamos.

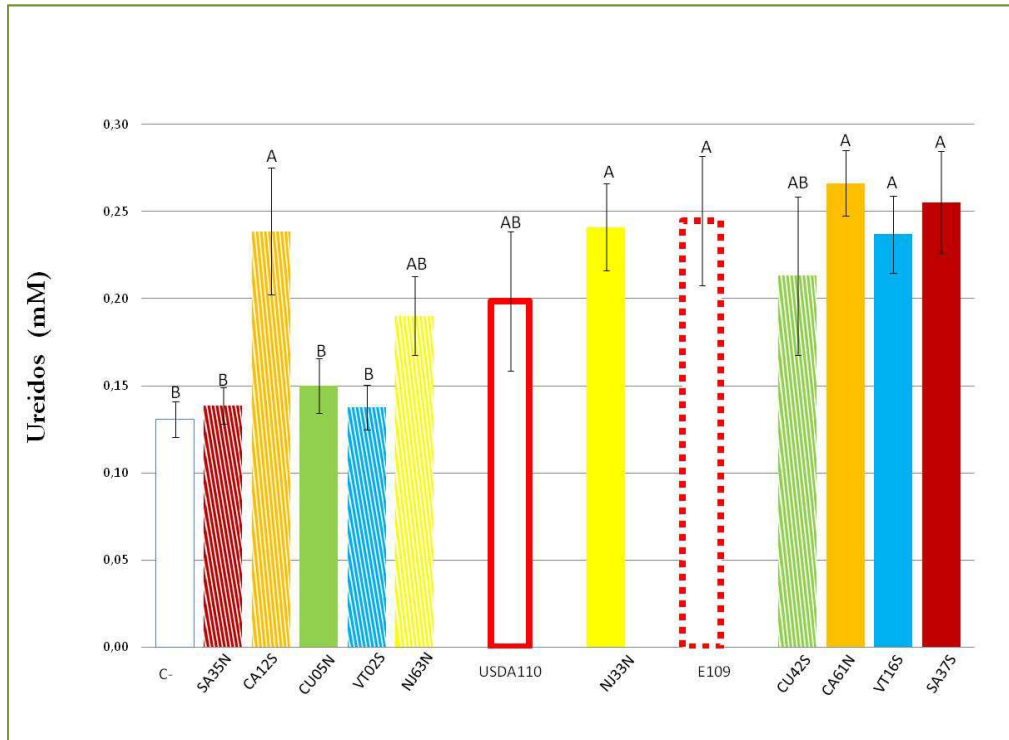


Figura IV.3. Concentración de ureidos en hoja (mM). Las barras representan las medias aritméticas (n=8) de la concentración de ureidos en hojas de cada planta. Las letras distintas representan diferencias significativas entre las medias al ser comparadas mediante ANOVA seguido de un análisis con test de Tukey ($p < 0,05$) y las barras de error representan el desvío estándar de la media. C-: control negativo (sin inocular).

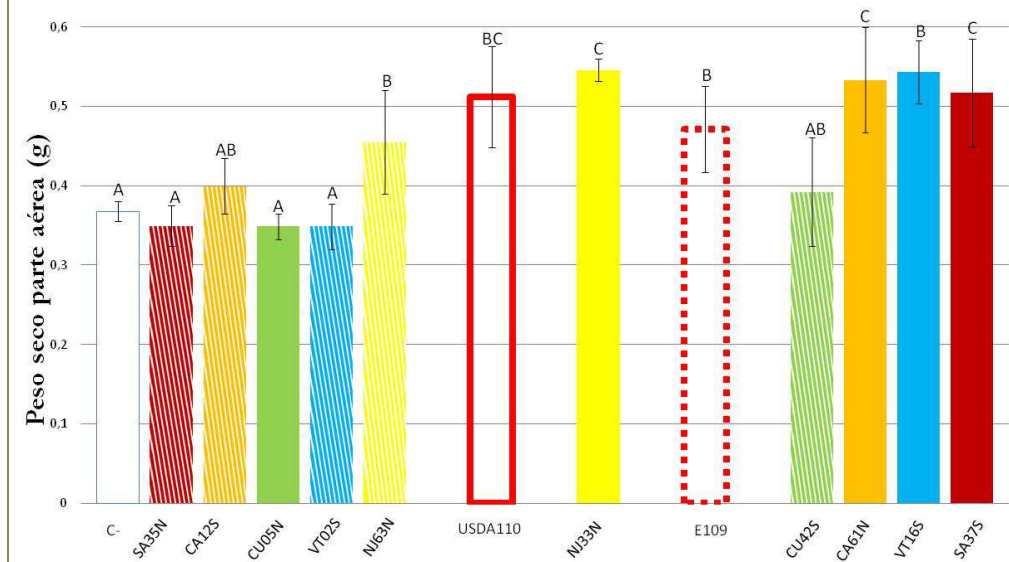


Figura IV.4. Peso seco de la parte aérea (g). Las barras representan las medias aritméticas (n=8) del peso seco de la parte aérea de cada planta. Las letras distintas representan diferencias significativas entre las medias al ser comparadas mediante ANOVA seguido de un análisis con test de Tukey ($p < 0,05$) y las barras de error representan el desvío estándar de la media. C-: control negativo (sin inocular).

Las cepas MCR presentaron, tal como esperábamos, un PSA significativamente menor que las cepas MCL. Excepto CA12S, el resto de las cepas MCR no tuvo diferencias estadísticamente significativas con el control negativo. La cepa CA12S ya había sido notada como anómala en los análisis anteriores. Esta cepa produjo muchos nódulos de bajo peso seco, y promovió una concentración de ureidos del mismo orden que las cepas MCL. De este modo, no nos extrañó el hecho de que las plantas inoculadas con esta cepa tuvieran un PSA significativamente mayor que el resto de las cepas MCR. Sin embargo, y a diferencia de lo ocurrido con la concentración de ureidos, el PSA de estas plantas solo alcanzó al 73% del obtenido con E109. En el caso de las plantas inoculadas con las cepas MCL, excepto CU42S, el resto tuvo un peso medio de la parte aérea del mismo orden que USDA 110 y E109, y significativamente mayor que las cepas MCR. CU42S es un rizobio (Tabla IV.1) que ya había mostrado deficiencias en la producción de ureidos, y fue la cepa que produjo el menor número de nódulos por planta (Fig. IV.1-3)

De este modo, el agrupamiento MCL, realizado en base al peso seco de los nódulos, se reduce a un conjunto de bradirrizobios cuando consideramos al resto de los parámetros simbióticos. Este conjunto está formado por cuatro de las cinco cepas de bradirrizobios elegidas para este trabajo, a saber: CA61N, NJ33N, SA37S y VT16S. Por su parte, CU42S habría quedado incluida en este grupo MCL al ser una excepción entre las cepas de crecimiento rápido (en general de baja eficiencia simbiótica), por presentar algunos parámetros, tales como PSN y concentración de ureidos en hojas, compatibles con una moderada eficiencia en la FBN.

Por último, la cepa NJ33N también mantuvo la tendencia observada con los anteriores parámetros. Esta cepa siempre se comportó de manera similar a las cepas de referencia USDA110 y E109, aun cuando estas dos cepas pertenecen a un clado bien diferenciado, con una similitud menor al 40 % respecto de NJ33N (Fig. III.4).

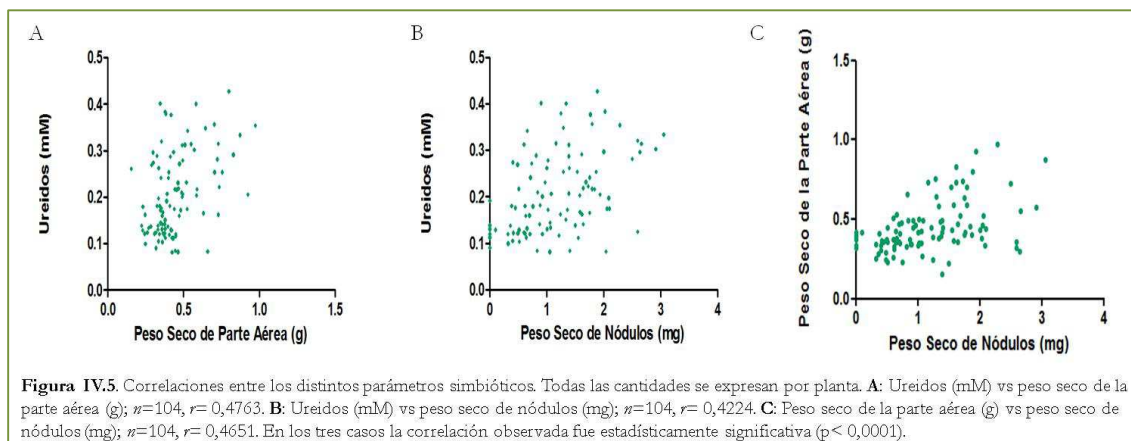
IV.4. Correlación entre distintos parámetros.

Hasta aquí hemos realizado un análisis de los parámetros nodulares y de la estimación de la actividad nodular, basándonos en que cada uno de ellos tiene una relación directa con la eficiencia de la FBN. Estas relaciones se encuentran ampliamente descritas en la literatura, pero ¿existe alguna relación directa entre cada uno de los parámetros analizados en este trabajo? Para tratar de contestar esta pregunta y de manera de obtener una corroboración adicional de la consistencia de los resultados obtenidos hasta aquí, medimos la correlación estadística entre los distintos parámetros. En particular, establecimos la correlación entre:

- 1) PSN vs. PSA
- 2) PSN vs. concentración de ureidos en hojas
- 3) PSA vs. concentración de ureidos en hojas

Para cada una de las correlaciones calculadas utilizamos el conjunto de todos los datos de cada uno de los ensayos incluidas las plantas sin inocular. Como se observa en la Fig. IV.5, en los tres casos existe la tendencia de una pendiente positiva. Para verificar si esta tendencia tiene significación estadística calculamos, para cada par de datos, el coeficiente de Pearson (r).

En los tres casos evaluados, el valor de r dio entre 0,42 y 0,47 (Fig. IV.5), indicando una correlación estadísticamente significativa y positiva con $p < 0,0001$ entre los tres pares de variables analizadas.



IV.5. Competitividad para la nodulación.

En esta sección evaluamos la capacidad intrínseca de las diez cepas para competir por la nodulación. Definimos como “capacidad intrínseca” a la que muestra una cepa dada puesta a competir frente a una cepa de referencia en iguales condiciones tanto de número de UFC, estado fisiológico y distribución respecto de la raíz (Amarger & Lobreau 1982, López-García et al. 2001, 2002).

Nuevamente, el número de plantas a utilizar nos obligó a dividir el ensayo en dos bloques, evaluando así por un lado a los bradirrizobios frente a la cepa de referencia y luego a los rizobios frente a la misma cepa de referencia. En todos los casos la cepa de referencia fue LP 3018 (E109 resistente a Sm y Sp, Tabla II.2), ya que previamente verificamos que nuestras cepas eran sensibles a al menos uno de estos antibióticos. Antes de inocular las macetas conteniendo la mezcla de cepas a competir, realizamos diluciones de los inóculos iniciales para asegurarnos de que todas las competiciones se realizaran con igual número de bacterias. Como se observa en la tabla IV.3, en todos los casos los recuentos fueron del orden de 10^7 UFC ml^{-1} . Luego de 3 semanas en invernáculo, se recogieron las plantas y se sacaron los nódulos para procesarlos. Dado que nuestros aislamientos no presentaban alguna resistencia a antibióticos que los diferenciara de LP 3018, no pudimos distinguir la proporción de nódulos ocupados solamente por esta cepa de la proporción de nódulos con doble ocupación, la que podría abarcar al 10-20 % de los nódulos totales (Althabegoiti et al. 2011). Por lo tanto, realizamos un análisis de χ^2 con dos hipótesis nulas alternativas. En una de ellas supusimos que hasta un 20 % de los nódulos podrían presentar doble ocupación. Esta hipótesis nula prevé que el 60 % de los nódulos que presenten crecimiento en placas con o sin antibiótico, representan un 40 % ocupado por la cepa LP3018 y un 20 % con doble ocupación. Por otro lado, el 40 % restante contendrá bacterias capaces de crecer solo en placas sin antibiótico. En la otra hipótesis nula planteada, supusimos que solo el 10 % de los nódulos podrían presentar doble ocupación. Haciendo el mismo razonamiento que en el caso anterior, podíamos esperar que un 55 % de los nódulos estén ocupados con LP3018 y un 45 % con las cepas a evaluar. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla IV.3 y nos indican, por un lado, que los rizobios fueron muy malos

competidores, ya que solo ocuparon entre 1,4% (CU42S) y 7% (VT02S) de los nódulos, en coincidencia con trabajos previos realizados con cepas provenientes de otros suelos (Pastorino et al. 2009). Un comportamiento atípico fue observado para el rizobio CA12S, que ocupó un 39,7% de de los nódulos, indicando una competitividad similar a LP3018.

En el caso de los bradirrizobios, el porcentaje de ocupación de nódulos comprendió entre un 6 % (NJ33N) y un 36 % (SA37S). En particular, las cepas NJ33N, VT16S y CU05N fueron significativamente menos competitivas que LP3018, mientras que CA61N y SA37S presentaron la misma capacidad competitiva que la cepa de referencia.

Tabla IV.3. Competición para la nodulación de cada una de las 10 cepas seleccionadas frente a *B. japonicum* LP 3018, en todos los casos con una relación aproximada 1:1.

Nombre		Inóculo inicial			Ocupación de nódulos (%) [†]	
		Bacterias estimadas por DO (500nm)	Bacterias viables (UFC.ml ⁻¹)	Bacterias totales (bacterias.ml ⁻¹)	Sm [†] /Sp [†]	Sensibles a antibióticos
Rizobios	CA12S	9,90. 10 ⁷	9,57. 10 ⁷	9,87. 10 ⁷	60,30	39,7
	CU42S	9,90.10 ⁷	9,33. 10 ⁷	9,43. 10 ⁷	82,22	17,78*
	NJ63N	1,00.10 ⁸	1,00. 10 ⁸	1,03. 10 ⁸	94,44	5,56**
	SA35N	9,78.10 ⁷	9,2310 ⁷	9,71. 10 ⁷	96,59	3,41**
	VT02S	9,80.10 ⁷	9,67. 10 ⁷	1,00. 10 ⁸	92,94	7,06**
	LP 3018	1,10.10 ⁸	1,01. 10 ⁸	1,04. 10 ⁸	100	0
Bradirrizobios	CA61N	9,20. 10 ⁷	8,89. 10 ⁷	8,71. 10 ⁷	70,40	29,60
	CU05N	1,00. 10 ⁸	1,03. 10 ⁸	1,00. 10 ⁸	98,59	1,41**
	NJ33N	9,20. 10 ⁷	8,91. 10 ⁷	8,71. 10 ⁷	94,70	5,30**
	SA37S	9,10. 10 ⁷	8,74. 10 ⁷	8,94. 10 ⁷	64,60	35,40
	VT16S	9,60. 10 ⁷	8,29. 10 ⁷	8,00. 10 ⁷	87,10	12,90*
	LP 3018	9,30. 10 ⁷	8,69. 10 ⁷	8,47. 10 ⁷	100	0

[†]Los porcentajes de ocupación de nódulos se refieren a los obtenidos para cada cepa competida con LP 3018. Las cepas alóctonas inoculadas individualmente no produjeron nódulos con bacterias Sm[†]/Sp[†]. Los controles sin inocular no produjeron nódulos.

Asteriscos: porcentajes estadísticamente diferentes a la hipótesis nula teniendo en cuenta un 10 % de doble ocupación de nódulos, analizado con χ^2 (*p< 0,05) (** p< 0,01).

IV.6. Resumen y discusión.

A lo largo de este capítulo, analizamos las 10 cepas alóctonas seleccionadas en el capítulo anterior y evaluamos su capacidad simbiótica y su competitividad intrínseca para la nodulación. En particular analizamos:

- 1) Peso seco de los nódulos.
- 2) Número de nódulos.
- 3) Concentración de ureidos en la parte aérea.

- 4) Peso seco de la parte aérea.
- 5) Competitividad para la nodulación.

En los 5 casos, observamos una tendencia diferencial entre los bradirrizobios y los rizobios. En los parámetros relacionados con la simbiosis y la FBN generalmente los bradirrizobios mostraron un comportamiento similar a las cepas de referencia E109 y USDA 110, y significativamente superior a los rizobios. Las diferencias de comportamiento observadas evidenciaron la existencia de una correlación positiva y estadísticamente significativa entre el PSN, el PSA y la concentración de ureidos.

Las cepas MCL, excepto CU42S, mostraron un bajo número de nódulos con un alto peso seco por nódulo. Estos dos parámetros nos indican que los nódulos formados por estas cepas poseen buena eficiencia de FBN. Esto se corrobora al cuantificar tanto la concentración de ureidos en hojas como el PSA. Por lo tanto, estas cepas resultan más que interesantes para mejorar la respuesta del rendimiento a la biofertilización con cepas adaptadas a nuestros suelos. En particular Peticari et al. (1998) seleccionaron cepas alóctonas del NOA con potencial uso en inoculantes, lo cual, de acuerdo con nuestros resultados y los de Melchiorre et al. (2011) podría extenderse a la zona pampeana. Sin embargo el proceso de selección no es un proceso cerrado, lo cual a futuro se podría dirigir a la búsqueda de nuevas cepas para la formulación de biofertilizantes adaptados a cada una de las regiones donde se desarrolla el cultivo de soja en nuestro país.

Por su parte, las cepas MCR tuvieron un comportamiento inverso a las MCL: excepto CA12S, el resto presentó un alto número de nódulos pero de bajo PSN, lo cual se tradujo en una baja concentración de ureidos en hojas y bajo PSA.

Las excepciones CU42S y CA12S tuvieron un deficiente rendimiento de la parte aérea. En el caso de CA12S, se observó un gran número de nódulos pero de bajo PSN (Fig. IV.6), lo cual sugiere que son deficientes para la FBN. Sin embargo, la concentración de ureidos fue mayor que en los rizobios del mismo grupo y del orden de las cepas de referencia, lo cual podría explicarse suponiendo que el alto número de nódulos podría haber provisto una actividad nitrogenasa global significativa. De todos modos, el PSA fue bajo y las hojas presentaron un color amarillo similar al de la planta que no recibió inoculación (Fig. IV.6), indicando que esta cepa podría inhibir de algún modo la utilización de los ureidos o inducir clorosis en las hojas (O'Connell & Handelsman 1993) Por su parte, en la otra excepción, CU42S, el bajo rendimiento de la parte aérea se correspondió con una baja concentración de ureidos. Esto podría deberse al tamaño heterogéneo los nódulos (Fig. IV.6), lo que implicaría que varios de ellos habrán tenido una deficiente actividad FBN.

Cuando evaluamos la capacidad intrínseca para competir para la nodulación frente a la cepa de referencia LP 3018 (E109 Sm^f/Sp^r), observamos que excepto CA12S (rizobio), CA61N y SA37S (bradirrizobios), el resto de la cepas fue deficiente, ocupando solamente un 1,41 % a 17,78 % de los nódulos. Por lo tanto, no se observó la tendencia de comportamiento diferencial entre rizobios y bradirrizobios observada en los otros caracteres de la simbiosis y en general se puede decir que las cepas alóctonas estudiadas aquí son malas competidoras para la nodulación en comparación con LP 3018. Entre las cepas de buen comportamiento, CA61N y SA37S no presentaron diferencias significativas de competitividad intrínseca con LP 3018. Por su parte, CA12S también mostró una similar

competitividad intrínseca que la cepa de referencia, lo cual no coincide con que los rizobios suelen ser deficientes noduladores cuando se los compete con bradirrizobios (O Chueire et al. 1997, Pastorino et al. 2009).

En general, no hemos observado una mayor competitividad para nodular en las cepas alóctonas, contrariamente a reportes previos (McDermott & Graham 1989). Esto nos induce a pensar que la mayor competitividad de la población alóctona observada a campo (López García et al. 2009) podría estar relacionada con su adaptación y supervivencia en el medio edáfico, y por ello también observamos una baja representatividad de la cepa E109 en el cladograma. En tal sentido, Buendía–Clavería et al. (1994), observaron una clara relación entre el pH de los suelos y la capacidad de competir entre USDA110 y *E. fredii* HH103. En particular, estos autores observaron que a pH ácidos USDA 110 presenta una mayor ocupación de nódulos, en cambio a pH alcalinos la relación se invierte y *E. fredii* ocupa hasta un 80 % de los nódulos, lo que indicaría que el pH de los suelos estaría jugando un rol determinante en dichas competiciones. De forma análoga, nosotros podemos hipotetizar que la distribución espacial de los (bradi)rizobios en el suelo, su movilidad y su adaptabilidad a las condiciones locales pueden estar jugando un rol determinante en la competitividad para nodular a campo (Althabegoiti et al. 2008, López-García et al. 2002, 2009). Por lo tanto, además de la competitividad intrínseca del inoculante y la población alóctona, es imprescindible entender cómo juegan estos otros factores en el resultado final de la ocupación de nódulos a campo. Los trabajos previos del laboratorio han señalado que la movilidad de los (bradi)rizobios en el suelo puede ser un factor determinante en el problema de la competición para la nodulación (Althabegoiti et al. 2008, 2011, López-García et al. 2002, 2009) pero aún no se comprenden bien todos los tipos de movilidad que estas bacterias podrían utilizar en el suelo. En particular la movilidad sobre superficies podría jugar un rol en la colonización de diversos nichos en el suelo y la rizósfera, por lo cual es necesario caracterizarla en los bradirrizobios.

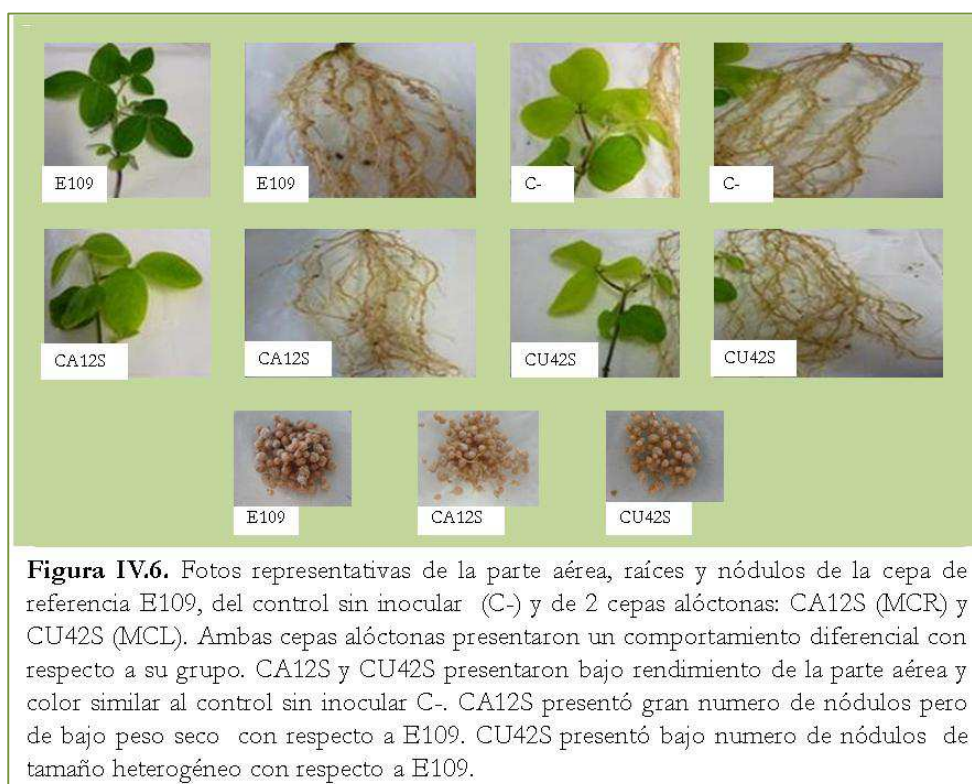


Figura IV.6. Fotos representativas de la parte aérea, raíces y nódulos de la cepa de referencia E109, del control sin inocular (C-) y de 2 cepas alóctonas: CA12S (MCR) y CU42S (MCL). Ambas cepas alóctonas presentaron un comportamiento diferencial con respecto a su grupo. CA12S y CU42S presentaron bajo rendimiento de la parte aérea y color similar al control sin inocular C-. CA12S presentó gran número de nódulos pero de bajo peso seco con respecto a E109. CU42S presentó bajo número de nódulos de tamaño heterogéneo con respecto a E109.

CAPITULO

V

Caracterización del

swarming en

Bradyrhizobium japonicum

USDA 110

En los capítulos anteriores hemos hecho referencia al término “competición para la nodulación” para describir un fenómeno complejo, que puede ser estudiado desde distintos puntos de vista. También hemos señalado que, al estudiarlo desde el punto de vista del microsimbionte, es necesario abarcarlo conociendo quién compite y contra quiénes compite.

Así, en la primera parte de esta Tesis realizamos un estudio sobre las características fenotípicas, genotípicas y simbióticas de las cepas alóctonas contra quienes debe competir el inoculante. Como una de las conclusiones principales de esos estudios hemos observado que la competitividad intrínseca de representantes de esa población fue sorprendentemente baja, no pudiendo explicar por sí sola al problema de la competición para la nodulación, al menos en los suelos del cinturón sojero de Argentina. Por lo tanto, alguna otra perturbación conspira contra la competitividad del inoculante, con lo cual ha llegado el momento de profundizar nuestro conocimiento acerca de quién compite. Pero más allá de sus características intrínsecas, es necesario estudiar a dicho participante desde el punto de vista de cómo se posiciona en el ambiente edáfico, escenario de esta competición.

Desde hace años, en nuestro laboratorio ha sido demostrado que la movilidad de los bradirrizobios en el suelo, junto a su distribución en profundidad, pueden determinar el resultado de la competición aun cuando se comparen cepas con la misma capacidad competitiva intrínseca (Althabegoiti et al. 2008, López-García et al. 2009). Ello se debe a que la distribución de los (bradi)rizobios alóctonos suele ser mucho más amplia que la de las bacterias recién inoculadas, que quedan restringidas a un pequeño volumen de suelo alrededor de la semilla. Así, la raíz emerge y crece hacia la zona ocupada por la población alóctona, con pocas chances de encontrarse con los bradirrizobios inoculados. Por lo tanto, la movilidad de las bacterias llevadas en el inoculante es clave para que puedan distribuirse activamente hacia los puntos de infección tempranos de la raíz en crecimiento. Es por ello que, para avanzar en el estudio de los factores que condicionan la competitividad del inoculante, nos enfocaremos en la movilidad de *B. japonicum*.

Desde la década del '70 se describen por lo menos seis formas distintas en que las bacterias pueden desplazarse, tanto sobre medios sólidos como dentro de líquidos (Henrichsen 1972). Estos tipos de desplazamientos pueden ser clasificados de diversas maneras (sociales, individuales, activos, pasivos, etc) (Jarrell & McBride 2008). Sin embargo, una de las clasificaciones más utilizadas es la que se basa en diferenciarlos por el tipo de aparato celular que utilizan para desplazarse; de esta manera podemos distinguir entre los que utilizan el o los flagelos de los que utilizan otros tipos de locomoción (véase I.7). Entre los desplazamientos dependientes de flagelos se han caracterizado la natación en medios líquidos (I.7.1) y el *swarming*, un movimiento social que ocurre sobre superficies sólidas o semisólidas (I.7.2). Es importante destacar que muchas veces en la literatura se ha utilizado el término *swarming* para hacer referencia a zonas de desplazamiento o como sinónimo de la natación (Henrichsen 1972, Kearns 2011). Sin embargo el *swarming* es un tipo de desplazamiento que se caracteriza, a diferencia de la natación, por ser un movimiento en masa, dependiente de flagelos, que ocurre sobre superficies sólidas o semisólidas. Para lograr esto, las bacterias se diferencian a formas híperflageladas y secretan sustancias que disminuyen la tensión superficial, como así también moléculas que ayudan a la organización entre células (Kearns 2011). Debido a estas características, el *swarming* podría ser el tipo de movimiento mediante el cual los (bradi)rizobios se desplacen sobre las partículas del suelo o de la raíz, con lo cual podría resultar clave para que el inoculante

pueda distribuirse en el suelo de tal manera que pueda expresar su mayor competitividad para nodular frente a las cepas alóctonas.

Para intentar averiguar si el *swarming* puede jugar un papel en la distribución de los bradirrizobios del inoculante en el suelo, primero es necesario ponerlo de manifiesto en este tipo de bacterias. Entre los rizobios son muy pocas las especies en donde se ha demostrado el movimiento de *swarming*. (Kearns 2011). Además, en la mayoría de los casos solo se observó el *swarming* en cepas particulares o en mutantes; como ejemplos podemos nombrar a *Ensifer meliloti* (Nogales et al. 2010, 2012), *Rhizobium etli* (Daniels et al. 2006, Verstraeten et al. 2008) y *R. leguminosarum* *bv. viceae* (Tambalo et al. 2010), pero al momento de realizar este trabajo no existían reportes de este tipo de movimiento en *B. japonicum*. Dado que *B. japonicum* USDA 110 presenta dos tipos de flagelos diferentes (Kanbe et al. 2007, Althabegoiti et al. 2008), es de esperar que sea capaz de desplazarse por *swarming*. Por lo tanto, decidimos encarar nuestros estudios con *B. japonicum* USDA 110, que se encuentra totalmente secuenciada (Kaneko et al. 2002) y de la cual poseemos mutantes en cada flagelo (Althabegoiti et al. 2011), para encontrar las condiciones en las cuales un bradirrizobio podría desplazarse por *swarming* y describir sus requerimientos principales.

V.1. Posibles fenotipos del *swarming*.

Aunque las características que definen al *swarming* están muy definidas, no ocurre lo mismo con las condiciones fisiológicas necesarias para que se desarrolle este movimiento, ni el fenotipo esperado en placas de Petri. Es más, parecería que dependiendo de la cepa a estudiar las condiciones de cultivo podrían ir desde medios ricos a condiciones específicas (como presencia de hierro o glucosa) o a medios con deficiencia nutricional. Por su parte el fenotipo asociado podría variar de acuerdo de diversas variables de cultivo, como podrían ser: concentración de agar, temperatura de incubación, fuente de C etc. (Daniels et al. 2004, Kearns 2011)

En base a lo expuesto nos hemos enfrentado a dos desafíos:

- 1- Encontrar las condiciones en las cuales se podría evidenciar el *swarming* en *B. japonicum* USDA 110.
- 2- Verificar si los movimientos observados en *B. japonicum* USDA 110 bajo esas condiciones podrían ser considerados como *swarming*.

Así, además de poder poner a punto la metodología para evidenciar este movimiento, debimos definir qué fenotipo podríamos esperar observar. En ese sentido, nosotros decidimos utilizar la caracterización dada por Kearns (2011). De acuerdo a este autor, el *swarming* se define como un movimiento multicelular dependiente de flagelos, el cual requiere una diferenciación de las células, un aumento de la síntesis de los flagelos, interacciones célula-célula y de la secreción de sustancias que puedan actuar como surfactantes. En el laboratorio, este tipo de movimiento puede ser evidenciado utilizando placas de agar con concentraciones superiores a 0,3% (ya que por debajo de esta concentración las células tienden a realizar natación) y menores al 1% (a mayores concentraciones, la tensión superficial podría inhibir el desplazamiento). El fenotipo asociado implica la formación de una monocapa de células, que se extiende uniformemente desde el punto de inoculación (Kearns 2011), la cual suele ser traslúcida por el efecto de los surfactantes. Las células del borde de la monocapa son las que se encuentran diferenciadas

con respecto a las del centro de la colonia. Dicho desplazamiento puede adoptar alguna de las siguientes formas: anillos concéntricos, ramificaciones tipo dendríticas, o una especie de “crecimiento en vortex”. Como la mayoría de los rizobios que realizan *swarming* presentan un fenotipo de bordes con pequeñas ramificaciones o en forma de “crecimiento en vortex”, nosotros enfocamos nuestra búsqueda a un fenotipo similar en *B. japonicum*.

V.2. Obtención de las condiciones experimentales para evidenciar el *swarming* en cepas derivadas de *B. japonicum* USDA 110.

Las cepas *B. japonicum* LP 3004 y LP 3008 derivan de *B. japonicum* USDA 110 y son Nod⁺ y Fix⁺ en soja. LP 3004 es una mutante espontánea con resistencia a estreptomycin (López-García et al. 2002) y LP 3008 fue seleccionada por mayor movilidad a partir de LP 3004 (Althabegoiti et al. 2008). Al ser caracterizadas por su perfil de expresión de flagelinas en el medio mínimo de Götz, la cepa LP 3004 presentó solamente al conjunto de las flagelinas subpolares (FliC1234), mientras que LP 3008 presentó tanto FliC1234 como las flagelinas laterales (LafA12) (Tesis Doctoral M. J. Althabegoiti 2011, UNLP)

Para comenzar nuestro estudio del *swarming*, no solo debíamos encontrar el medio de cultivo adecuado para observarlo, sino también ajustar ciertas condiciones clave, como la concentración de agar, la cantidad y el estado fisiológico de las bacterias, como así también las condiciones de incubación. Ya que en ese momento no había ninguna publicación al respecto en *Bradyrhizobium*, empezamos por reproducir las condiciones que ya habían sido utilizadas en otras especies de rizobios.

Los primeros ensayos los realizamos en placas de Petri conteniendo YEM-agar semisólido (0,5; 0,6 y 0,7 % de agar). En esas placas inoculamos cultivos de LP 3004 o LP 3008 crecidos en YEM líquido hasta una DO₅₀₀ de 1. Además, y sobre la base de un reporte de Thampuran y Surendran (1996), modificamos las concentraciones de algunas sales del medio de cultivo (Tabla V.I). Otra de las variables a ensayar era la cantidad y el estado fisiológico de las bacterias, por lo cual decidimos probar las fases de crecimiento

Tabla V.I. Modificación del medio de cultivo YEM agar evaluados para *swarming*.

Medio	Sales modificadas (g/l)	
	NaCl	MgSO ₄ ·7H ₂ O
YEM (original)	0,1	0,2
YEM1	0,1	0,1
YEM2	0,1	1
YEM3	0,5	0,2
YEM4	0,5	0,1
YEM5	0,5	1
YEM6	1	0,2
YEM7	1	0,1
YEM8	1	1

logarítmica y exponencial tardía, como así también distintas concentraciones del inóculo (10^4 , 10^5 , 10^6 y 10^8 UFC.ml⁻¹ de medio de cultivo). Adicionalmente, probamos las siguientes temperaturas de incubación: 22, 28 y 30 °C. A modo de control positivo, utilizamos la cepa *R. etli* CNPAF512 puesto que el *swarming* en la misma ya había sido reportado y caracterizado (Daniels et al. 2006).

Si bien el fenotipo de *swarming* que obtuvimos en *R. etli* CNPAF512 no fue idéntico al descrito previamente, resultaba claro que se trataba de dicho movimiento (Fig. V.1), corroborando así que nuestras condiciones de ensayo permitían reproducirlo. Sin embargo, nosotros no logramos observar el *swarming* en LP 3004 ni en LP 3008 durante estos primeros experimentos.

En vista de esos resultados, decidimos cambiar de medio de cultivo y utilizar un medio mínimo en la placa de Petri. Para tal fin elegimos el medio de Götz, debido a que por un lado había sido desarrollado para estudios de movilidad en *E. meliloti* (Götz et al. 1982) y por otro, ya había sido utilizado en el laboratorio para estudiar la natación de LP 3004 y LP 3008 (Althabegoiti et al. 2008, 2011). Nuevamente variamos las concentraciones de sales, en este caso CaCl₂.2H₂O, ya sea aumentando o disminuyendo su concentración 10 veces (0,01; 0,1 y 1 g.l⁻¹). Además, dado que algunos reportes señalaban que la incorporación de sustancias con actividad surfactante favorecían el desarrollo de colonias de *swarming* (Soto et al. 2002, Niu et al. 2005), decidimos incorporar a las placas de Petri sustancias que disminuyeran la tensión superficial. Con tal fin, utilizamos carboximetil celulosa, dodecilsulfato sódico o Tween 20. Sin embargo, los resultados volvieron a ser negativos. Una posible explicación para esta imposibilidad de ver el *swarming* podría ser que USDA 110 no produce acil-homoserina lactonas (acil-HSL) (Pongsilp et al. 2005), que además de su conocido rol en la percepción del quórum presentan actividad surfactante (Daniels et al. 2004, 2006). Por otro lado, se había encontrado que las raíces de soja pueden secretar moléculas homólogas a las acil-HSL (Teplitski et al. 2000), con lo cual pensamos que podría ser necesario agregar exudados de raíces de soja en nuestros ensayos. Por lo tanto, agregamos exudados de raíces de soja, o extractos de raíces de soja o extractos de semilla de soja, pero nuevamente obtuvimos resultados negativos. Lo mismo ocurrió con el agregado de otras sustancias como ácido etilendiamin-tetra acético (EDTA) o casaminoácidos.

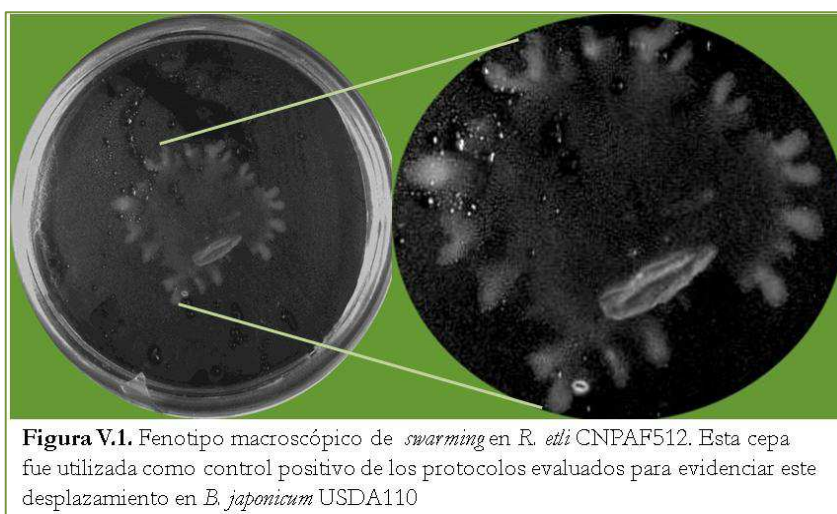


Figura V.1. Fenotipo macroscópico de *swarming* en *R. etli* CNPAF512. Esta cepa fue utilizada como control positivo de los protocolos evaluados para evidenciar este desplazamiento en *B. japonicum* USDA110

Hasta ese momento nosotros no podíamos poner en evidencia que las señales que disparaban este tipo de movimiento en otras bacterias lo hicieran en LP 3004 o LP3008. Sin embargo, *B. japonicum* está evolutivamente poco relacionado con los otros rizobios, lo que nos hizo plantear que tal vez las condiciones que disparaban el *swarming* en nuestras cepas eran distintas a las requeridas en aquéllos. Así, nos propusimos que un estrés nutricional en la placa de Petri podría estimular este desplazamiento. Para que este efecto sea más severo, decidimos cambiar el medio YEM para el crecimiento del inóculo líquido por el medio AG (Sadowsky et al. 1987). Este es un medio rico y fue elegido dado que las cepas cultivadas en el mismo presentaban una tasa de duplicación alta. A su vez en este medio tanto USDA 110 como LP 3004 expresan ambos flagelos. Es decir, nos planteamos cultivar las cepas en un medio rico, con extracto de levadura y dos fuentes de C (L-arabinosa y gluconato de sodio) y luego exponerlas a un estrés nutricional por el cambio brusco del medio rico al medio mínimo en las placas de Petri. El medio de Götz contiene manitol 0,05 g.l⁻¹ y (NH₄)₂SO₄, 0,13 g.l⁻¹, lo que permite el crecimiento sostenido de estas bacterias. Por ello también nos planteamos que deberíamos potenciar el efecto nutricional. Una forma de potenciar el efecto causado por el déficit nutricional, podría ser inocular las bacterias en un gradiente de concentración de la fuente de C o de N en las placas, entre cero y la concentración normal del medio. A continuación describimos los experimentos realizados con esta metodología.

V.2.1 Obtención de gradientes en placas de Petri.

Para poner de manifiesto nuestra idea de que un estrés nutricional podría requerirse para que *B. japonicum* comience a realizar *swarming*, iniciamos experimentos tratando de generar un gradiente en las placas de Petri. Como primera aproximación a la formación del gradiente, preparamos placas según se describió en la sección II.6.1.3, excepto que a una fracción del medio de cultivo se le agregó rojo congo. Estas placas fueron incubadas durante la noche en estufa a 28 °C, para favorecer la formación del gradiente. Como se observa en la Fig. V.2., pudimos observar la formación de un gradiente del colorante en las placas de Petri, el cual se visualizaba por la variación de la intensidad del color rojo desde un extremo de la placa hacia el otro. De manera análoga pensamos que eliminando en uno de los medios agarizados las fuentes de nutrientes podríamos formar los gradientes de concentración de las fuentes de C o N.

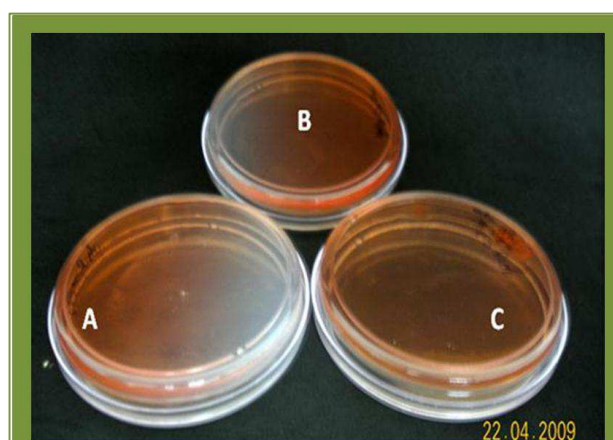
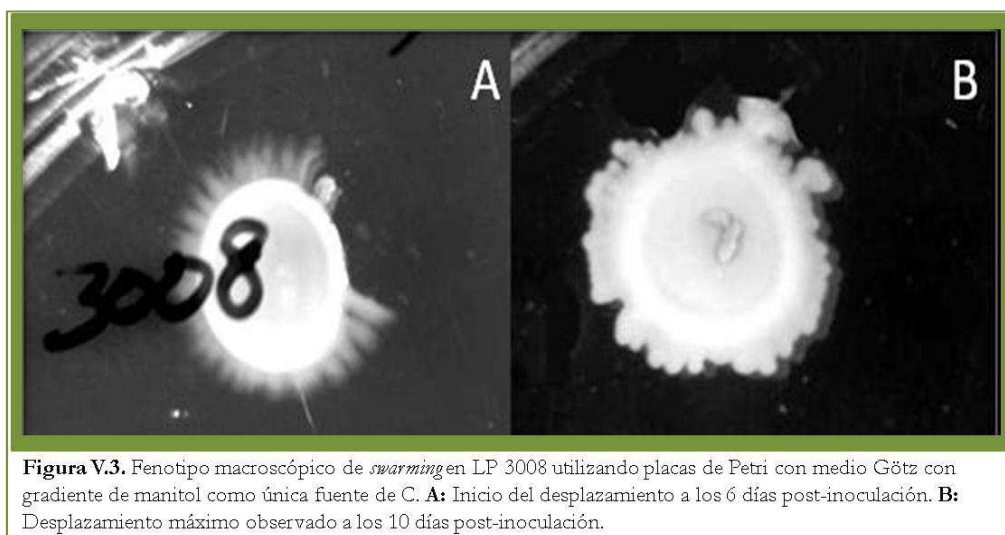


Figura V.2. Visualización de los gradientes mediante el empleo de rojo congo en placas de Petri. **A:** Gradiente realizado colocando primero el medio YEM-agar sin colorante y posteriormente con colorante. **B:** Gradiente realizado colocando primero el medio de YEM-agar con colorante y posteriormente sin colorante. **C:** Placas de Petri sin gradiente, colocando ambos medios con colorante. Para más detalles acerca del procedimiento, véase II.6.1.3.

Con este protocolo pusimos a prueba las fuentes de C y N, en particular manitol (en gradiente de 0 a 5 g.l⁻¹) o (NH₄)₂SO₄ (en gradiente de 0 a 1,3 g.l⁻¹) respectivamente. Además, evaluamos nuevamente distintas condiciones del inóculo inicial y de la incubación. Al cabo de aproximadamente 6 días post-inoculación, comenzamos a observar pequeñas irregularidades en los bordes de la colonia de *B. japonicum* LP 3004 y LP 3008. Esto se observaba en aquellas placas cuya inoculación había sido a aproximadamente a 2 cm del borde correspondiente al extremo de concentración 0 g.l⁻¹. Este efecto era más notorio en la cepa LP 3008 (Fig. V.3.).

Este resultado fue mucho más reproducible en las placas de Petri con el gradiente en la fuente de carbono, las cuales habían sido inoculadas con cultivos crecidos hasta fase exponencial tardía. En cuanto a la variable temperatura, observamos que a 22 °C o a 30 °C, el *swarming* parecería estar inhibido, dado que solo observamos colonias de crecimiento con los bordes homogéneos. Con respecto a las concentraciones de agar evaluadas (0,5; 0,6 y 0,7%), solo con 0,5% obtuvimos un fenotipo reproducible. Además, esta concentración nos permitía observar una mayor expansión del movimiento con respecto a las otras concentraciones evaluadas. Finalmente, el inóculo con el que observamos un mayor desplazamiento fue 2 µl del cultivo DO₆₀₀ de 1,5 (fase exponencial tardía).



Así, finalmente pudimos establecer un protocolo reproducible para observar un fenotipo macroscópico que coincidiera con los fenotipos descritos como *swarming*. En resumen, el protocolo consistió en:

- 1- Las bacterias se cultivaron en medio AG líquido sin antibióticos a 28 °C hasta alcanzar una a DO₆₀₀ de 1,5.
- 2- El día anterior a realizar el ensayo de *swarming* se prepararon las placas con gradiente en la fuente de C como se describió anteriormente. Las placas de Petri fueron incubadas toda la noche en estufa a 28 °C, para favorecer la formación del gradiente.
- 3- En flujo laminar, se inocularon 2 µl de la suspensión de bacterias a 2 cm del borde de la placa donde se había colocado el medio sin fuente de C.

- 4- Las placas de Petri fueron tapadas y se dejaron secar en flujo laminar hasta que se observó que la suspensión bacteriana fue absorbida. Por último, las placas de Petri fueron envueltas con Parafilm y se las incubó con la tapa hacia arriba en estufa a 28 °C durante aproximadamente 10 días (Fig. V.3.B.).

V.2.2 Observación microscópica de los rizobios tomados de colonias de *swarming*.

Para confirmar si el fenotipo macroscópico observado en las placas de Petri con gradiente en la fuente de C se trataba de *swarming*, realizamos observaciones del fenotipo microscópico. Si las bacterias se encontraban realizando *swarming*, se esperaría que las células de los bordes se encontraran diferenciadas con respecto a las del centro de la colonia, las cuales suelen ser no móviles. Esta diferenciación implica la multiflagelación y un aumento del tamaño celular para favorecer la asociación entre las células, lo cual permitiría coordinar el movimiento. Así, la observación de este tipo de diferenciación en las colonias que se desplazan sobre la superficie del medio de Götz con gradiente de la fuente de C permitiría confirmar que el movimiento observado en las derivadas de USDA110 es *swarming*. Por lo tanto, realizamos observaciones al microscopio electrónico de transmisión (MET) de las células de los bordes y del centro de las colonias de *swarming* obtenidas con LP 3008. No obstante, nuevamente nos enfrentamos a una puesta a punto de la técnica de fijación de las células de los bordes de la colonia de *swarming*, antes de visualizarlas en el MET ya que por un lado, sabíamos que los flagelos de *B. japonicum* se desprenden con facilidad y que la morfología de sus células puede sufrir distorsiones al ser fijadas. Por otro lado, algunos autores postulan que basta una gota de agua para disgregar las asociaciones entre las células y favorecer que las mismas realicen natación (Henrichsen 1972). Para ello realizamos modificaciones al protocolo propuesto por el grupo de Kirov et al. (2002). Este protocolo, a diferencia de otros, incluye una fijación de las células directamente sobre el centro o en los bordes de la colonia (para más detalles véase capítulo II). Como se observa en la Fig. V.4, las células de LP 3008 fijadas desde los bordes de la colonia de *swarming* (Fig. V.4.C) se encontraban diferenciadas con respecto a las células tomadas desde el centro de la misma colonia (Fig. V.4.B). A su vez éstas se observaban mucho más flageladas que las células de LP 3008 tomadas desde una colonia de crecimiento en placas de Petri con medio de Götz sin gradiente (Fig. V.4.D-F). Al realizar una comparación más profunda de los parámetros que deberían ser diferenciales en colonias de *swarming*, pudimos caracterizar lo siguiente:

- **Flagelos:** En las células tomadas desde los bordes de las colonias de *swarming* se observó una hiperflagelación con respecto a las del centro o a células tomadas de placas de crecimiento sin gradiente. Aunque LP 3008 expresa ambos flagelos en medio de cultivo líquido (Althabegoiti et al. 2008), no teníamos evidencias si sucedía lo mismo en medio semisólido. En este caso también pudimos poner en evidencia que se expresaban ambos flagelos pero no logramos determinar con precisión si alguno de ellos lo hacía en mayor medida.
- **Tipo de asociación:** las células de los bordes se encontraban asociadas, pero a diferencia de lo esperado, estas se encontraban asociadas por los polos. Este tipo de asociación fue similar al observado por Ho et al. (1990) debido a la actividad de la lectina bacteriana BJ38. Si bien no era el tipo de asociación esperada, la misma no contradecía la caracterización dada por

Kearns (2011), quien postula que no siempre se observan asociaciones longitudinales, y por lo tanto no debería tomarse como un requisito esencial para corroborar que el fenotipo observado en la placa de Petri es *swarming*, sin embargo lo que sí debe cumplirse es el aumento de los flagelos. Otros autores además postulan que la asociación longitudinal entre células solo es requisito para aquellas especies capaces de realizar *swarming* en concentraciones de agar mayores a 1 %. (Harshey 2003).

- **Superficie de contacto:** Las células de los bordes generalmente presentaban una superficie de contacto mayor que las células tomadas desde una placa de crecimiento sin gradiente. Esto no se observaba en las células tomadas desde el centro de la colonia. Las células del centro de la colonia presentaban la misma morfología de las células de las placas de crecimiento en medio Götz sin gradiente.

Con estas diferencias de morfología con respecto a las células del centro de la colonia, pudimos confirmar dos hechos que hasta ese momento eran desconocidos. El primero de ellos era que habíamos encontrado por lo menos una condición reproducible para evidenciar el *swarming* en *B. japonicum*, y el segundo, que LP 3008 era capaz de realizar dicho movimiento en placas con gradiente de la fuente de C. Estos resultados ahora nos inducían a tratar de develar si la condición que disparaba el *swarming* en LP 3008 era la existencia de un gradiente de la fuente de C o si solo era necesaria una determinada concentración de la misma.

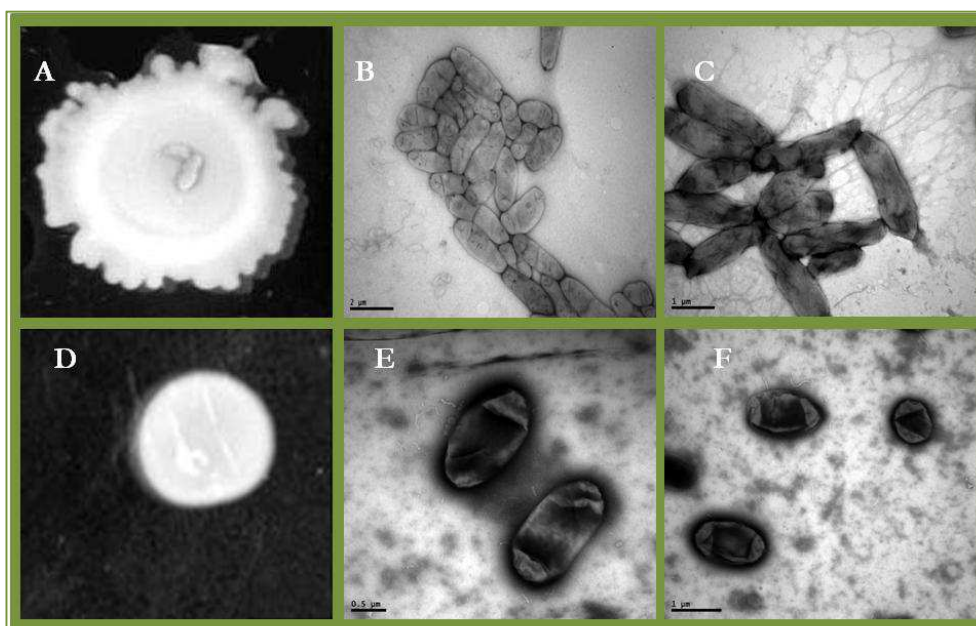


Figura V.4. Fenotipo macro y microscópico (MET) de colonias de LP 3008 en placas de Petri realizando *swarming* (A, B, C) o creciendo (D, E, F) a los 10 días post-inoculación. A y D: Fenotipo macroscópico del *swarming* o crecimiento observado en placas de Petri con medio de Götz con gradiente de manitol (A) o sin gradiente (D). B y E: Fenotipo microscópico observado al tomar células desde el centro de la colonia de *swarming* (B) o de crecimiento (E). C y F: Fenotipo microscópico observado al tomar células desde el borde de la colonia de *swarming* (C) o de crecimiento (F).

V.3. ¿Gradiente o deficiencia nutricional?

El hecho de haber observado *swarming* solo cuando la placa de Petri contenía un gradiente, nos llamó particularmente la atención. ¿Sería el gradiente de concentraciones de fuente de C lo que disparaba las señales para que la célula comenzara a realizar *swarming* o solo sería necesaria una concentración particular de fuente de C? Para continuar nuestros estudios, nos planteamos realizar variantes a nuestro protocolo, con el fin de determinar cuál de las condiciones era la que disparaba el *swarming* en *B. japonicum*. Como el gradiente de concentraciones de la fuente de C iba de 0 g.l⁻¹ a 5 g.l⁻¹ realizamos dos experimentos. Por un lado, preparamos placas con gradiente de la fuente de C como detallamos más arriba, pero en vez de inocularlas a 2 cm de distancia del borde que no tenía la fuente de C, inculamos a distintas distancias barriendo un rango de concentraciones del gradiente. Por otro lado preparamos placas con medio Götz sin gradiente, con concentraciones definidas de la fuente de C dentro de los límites que elegimos para el gradiente, en particular ensayamos con 5; 2,5 y 1 g.l⁻¹. En el primer caso evidenciamos que solo cuando la cepa se inculaba en la parte de menor concentración se observaba un fenotipo similar al observado anteriormente, pero en el caso de concentraciones definidas de la fuente de carbono, no pudimos observar el fenotipo en ninguna de las concentraciones. Estos resultados nos terminaban de indicar que era necesaria la formación de un gradiente, a menos que la concentración de fuente de carbono requerida para el *swarming* sea muy particular y en un rango estrecho. Sin embargo, ciertas propiedades del suelo y en especial, de la rizósfera, podrían explicar el requerimiento de un gradiente de concentración. Dichos gradientes son comunes en los suelos, dado que en ciertos lugares puede haber altas concentraciones de materia orgánica en disolución y lenta difusión (como por ejemplo, alrededor de restos animales o vegetales). Asimismo, en la rizósfera es esperable que se formen gradientes de concentración de nutrientes debido a la constante exudación de los mismos por parte de las raíces y al consumo simultáneo por parte de la microflora que coloniza tanto la rizósfera como el rizoplano. Así, en condiciones naturales podrían existir gradientes dinámicos. En el caso de nuestras placas, los gradientes se van disipando con el tiempo y por lo tanto, en el punto donde se han inculado las bacterias existe un constante influjo de fuente de C que proviene desde la zona rica, yendo hacia la zona de falta de fuente de C. Quizás estos gradientes dinámicos estimulen el *swarming* en *B. japonicum*.

V.4. Relación entre el *swarming*, la expresión de flagelos y las fuentes de C.

Como mencionamos al principio del capítulo, las fuentes de C influyen sobre la expresión de uno de los flagelos de USDA 110. Este hecho no ha sido reportado para otras especies bacterianas que presenten dos tipos de flagelos. En particular, el flagelo que expresa de manera diferencial USDA 110 en gluconato o L- arabinosa, es el flagelo peritróico o lateral. La cepa LP 3004, dado que pertenece al mismo acervo genético que USDA 110, presenta el mismo comportamiento de expresión en medios de cultivo con dichas fuentes de carbono. En particular, el flagelo peritróico está compuesto por las flagelinas LafA1 y LafA2 (en adelante nos referiremos a ellas en conjunto como LafA1-2), que poseen un peso molecular de 33 KDa, a diferencia de las flagelinas del flagelo subpolar, llamadas FliC1, FliC2, FliC3 y FliC4 (en adelante, FliC1-4) cuyo peso molecular es mayor que el promedio de las flagelinas (65 KDa). Las flagelinas LafA1-2 no se producen cuando LP 3004 o USDA 110 son cultivados en medio líquido conteniendo manitol o extracto de levadura como única fuente de carbono, a diferencia de sus ARNm, lo cual indica que el

control de su síntesis es al nivel de la traducción (Tesis Doctoral M. J. Althabegoiti 2011, UNLP). Bajo esas mismas condiciones en LP 3008, que presenta mayor movilidad, se observa el perfil de bandas correspondientes a ambas flagelinas (Althabegoiti et al. 2011).

Dado que en varias especies de bacterias que poseen dos sistemas de flagelos se ha propuesto que uno de ellos se utiliza para la natación y el otro para el *swarming* (Atsumi et al. 1996, Kirov et al. 2002, Stewart & McCarter 2003, McCarter 2004, Merino et al. 2006, Turner et al. 2010, Partridge & Harshey 2013) nos preguntamos si el efecto de las fuentes de C sobre la síntesis de LafA1-2 también se vería reflejado en el *swarming*.

Para ello, analizamos y caracterizamos el *swarming* en las cepas LP 3004 y LP3008 en placas con gradiente de cada una de las fuentes de C mencionadas.

V.4.1 *Swarming* en las distintas fuentes de C.

Como se observa en la Fig. V.5.A, tanto LP 3004 como LP 3008 fueron capaces de realizar *swarming* en el medio de Götz ya sea con L-arabinosa, o extracto de levadura, o manitol o gluconato como única fuente de C. Sin embargo, y aunque es difícil medir con precisión la extensión de las colonias de *swarming*, LP 3008 siempre presentó una mayor movilidad con cualquiera de las fuentes de C evaluadas. Este hecho igualmente no nos llamó la atención, ya que previamente se había observado que la mayor movilidad de LP 3008 no está relacionada solamente con la expresión constitutiva del flagelo lateral, puesto que mutantes de LP 3008 carentes de este flagelo siguen siendo más móviles que mutantes similares en el acervo de LP 3004 (Althabegoiti et al. 2011). Además, la expresión diferencial del flagelo peritrico en LP 3004 se observó en medios líquidos, lo cual no necesariamente debería ocurrir en un medio semisólido. Existen varios reportes que indican que los flagelos laterales se inducen en contacto con superficies viscosas (Kirov et al. 2002, Stewart & McCarter 2003, Merino et al. 2006). Sumado a esto, como mencionamos anteriormente, la regulación del flagelo lateral parecería ser a nivel traduccional. Por lo tanto, podría ocurrir que si bien LafA1-2 no se detectaran en medio líquido de Götz con manitol o extracto de levadura como únicas fuente de carbono, el flagelo lateral sí se expresara en mayor proporción en LP 3004 una vez que esta bacteria entrara en contacto con la superficie. Volveremos sobre esta cuestión más adelante, al analizar las imágenes de estas células obtenidas por microscopía electrónica.

V.4.2. Tiempo de formación de colonias de *swarming*.

Tanto LP 3004 como LP 3008 presentaron aproximadamente el mismo tiempo de formación de las colonias, sin embargo las diferencias se dieron al comparar sus comportamientos en las distintas fuentes de C.

En manitol, gluconato y L-arabinosa las colonias comenzaron a expandirse y ramificarse a partir de los cinco días luego de la inoculación, en cambio en extracto de levadura este efecto comenzó a los 10 días. La expansión completa se obtuvo a los 10 días en L-arabinosa y gluconato, a los 15 días en manitol, y a los 20 días en extracto de levadura. Teniendo en cuenta datos previos (Althabegoiti 2011) de los tiempos de duplicación en las distintas fuentes de carbono, calculamos el número de duplicaciones necesarias para desarrollar el *swarming*. Como se observa en la Tabla V.2., los valores obtenidos para gluconato y L-arabinosa fueron 6 y 11 duplicaciones respectivamente. Estos valores fueron similares a los observados en *S. meliloti*, que teniendo un tiempo de duplicación de

aproximadamente 2-3 horas tarda unas 20 hs, es decir unas 7 a 10 duplicaciones, para expandir la colonia (Nogales et al. 2012).

Tabla V.2. Velocidad de expansión de las colonias de *swarming* en *B. japonicum*

Fuente de Carbono (gradiente de 0 a 5 g/l)	Tiempo de duplicación (hs)	Número de duplicaciones requeridas para la máxima expansión de la colonia
Manitol	20-22	16
Gluconato	40	6
L-Arabinosa	20-22	11
Extracto de Levadura	20-22	24

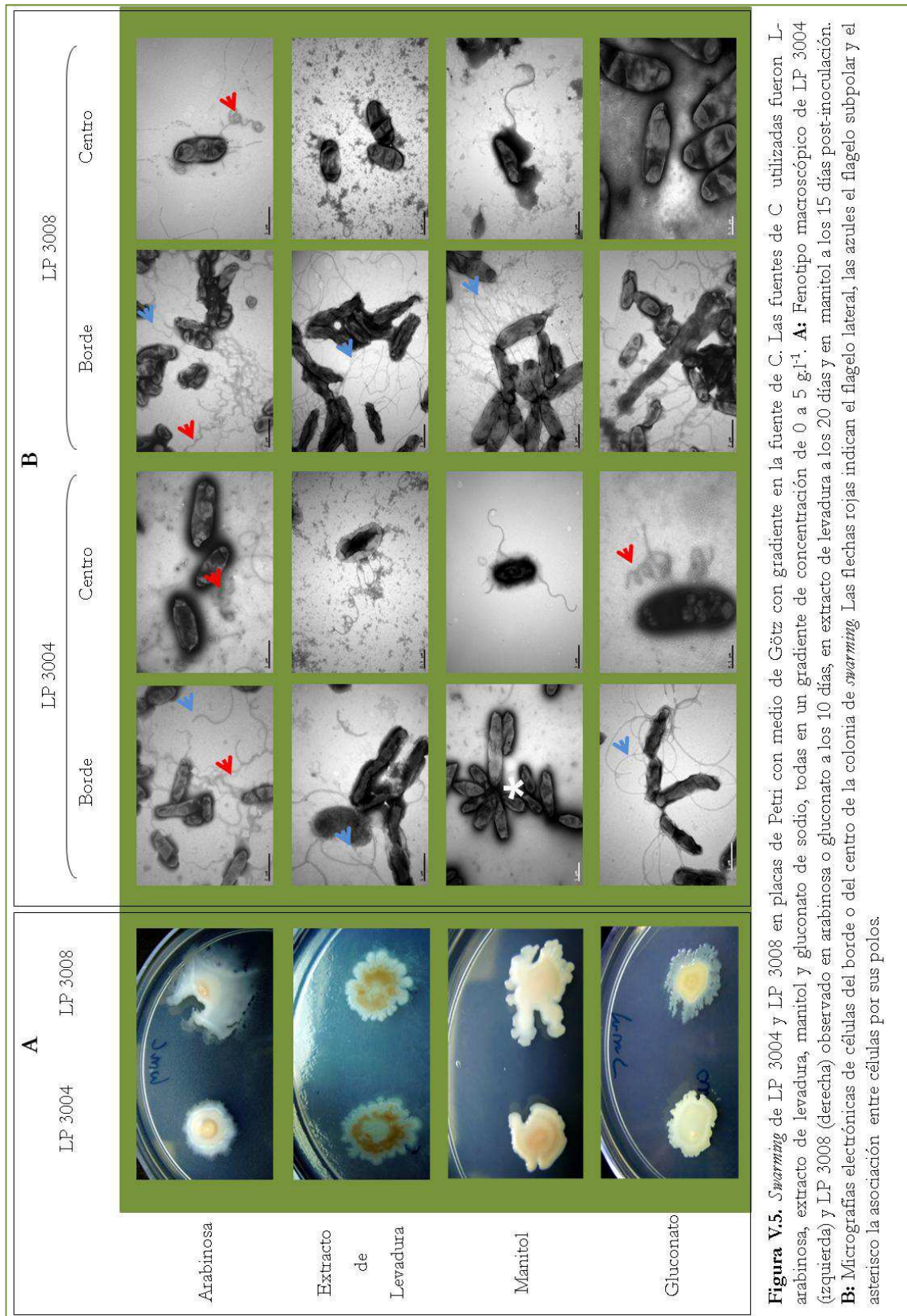
V.4.3 Morfología macroscópica.

Al comparar la morfología de las colonias de *swarming* observamos que, dependiendo de la fuente de C, las mismas adoptaban fenotipos particulares. En todos los casos siempre observamos tanto para LP 3004 como para LP 3008 un desarrollo de la colonia por encima del agar, pero en particular en L-arabinosa y gluconato, los bordes de la colonia eran más difusos que en manitol o extracto de levadura (Fig. V.5.A).

Además, en algunos casos LP 3004 y LP 3008 presentaron en el centro de la colonia un color más oscuro que en los bordes. Esto nos sugiere cierta diferenciación fisiológica entre las células del centro y las del borde (Fig. V.5.A). Esta diferencia de color nunca había sido observada en colonias de crecimiento en placas con 1,5 % de agar, lo que nos sugeriría el requerimiento de una diferenciación fisiológica para la iniciación del *swarming*.

V.4.4. Morfología microscópica.

Para caracterizar la morfología celular se tomaron muestras del centro y de los bordes de cada colonia de *swarming*, obtenidas en cada una de las fuentes de carbono y las observamos en el MET con el protocolo de fijación antes mencionado. Tal como habíamos observado en el fenotipo macroscópico de LP 3008, su mayor desplazamiento también se relacionaba con el fenotipo microscópico, presentando un mayor número de flagelos con respecto a LP 3004. En particular, en las células tomadas del borde de las colonias obtenidas con L-arabinosa observamos claramente, tanto en LP 3004 como en LP 3008, la presencia de ambos flagelos (Fig. V.5.B). La morfología de los flagelos peritricos presentaba una forma sinusoidal, en cambio el flagelo subpolar presentaba una forma más relajada (Fig. V.5.B) de acuerdo con observaciones previas (Althabegoiti et al. 2008). En el caso de LP 3008, los flagelos peritricos fueron observados de forma más abundante en todos los casos. En cambio, en LP 3004 los flagelos peritricos no pudieron ser observados en manitol o extracto de levadura, lo cual nos sorprendió, dado que como se mencionó anteriormente, en otras especies el flagelo lateral está presente cuando las bacterias realizan *swarming* y podría ser inducido por el contacto con la superficie de mayor viscosidad. Sin embargo, se ha observado que en *Rhodospirillum* es necesaria la presencia del flagelo polar para desplazarse (McClain et al. 2002).



Por último, volvimos a corroborar que las células tomadas desde los bordes de la colonia presentaban una morfología distinta a las células tomadas del centro independientemente de la fuente de C, y además observamos nuevamente el tipo de asociación de las células por los polos en las placas con manitol o gluconato como única fuente de C.

V.5. Resumen y discusión.

Al comenzar este capítulo, hemos comentado sobre la importancia de la movilidad en la competición para la nodulación. De entre los tipos de movilidad identificados en bacterias (Henrischen, 1972) el *swarming* podría jugar un papel en el desplazamiento de los (bradi)rizobios sobre las superficies del suelo o la planta y por lo tanto, podría estar implicado en la dispersión de los (bradi)rizobios en el suelo, la cual es determinante de su competitividad para nodular (López García et al. 2002). Además, *B. japonicum*, a diferencia de otros (bradi)rizobios, expresa dos sistemas flagelares diferentes, uno subpolar y otro lateral. Se ha sugerido en otras bacterias que el sistema lateral podría ser el responsable del *swarming*, lo cual nos indicó que este tipo de movimiento muy probablemente fuera llevado a cabo por *B. japonicum*. Por ello, decidimos estudiar la capacidad de *B. japonicum* LP 3004 y LP 3008 (derivadas de USDA 110) para realizar dicho desplazamiento. Como no contábamos con un protocolo para poner en evidencia al *swarming*, nuestro primer objetivo incluía encontrar las condiciones adecuadas en las cuales *B. japonicum* podría realizarlo. Luego de un número de intentos negativos, en los cuales fuimos probando diversas variables, encontramos un protocolo que nos permitió observar el *swarming* de forma reproducible en cepas derivadas de USDA 110. Este protocolo se basó en la utilización de un gradiente de la fuente de C en las placas de Petri. El gradiente implicaría un déficit nutricional para la bacteria, y al mismo tiempo podría ser representativo de cambios dinámicos de las concentraciones que ocurren en el suelo y en la rizósfera.

Como segundo objetivo nos planteamos confirmar que el fenotipo macroscópico observado en las placas de Petri con gradiente en la fuente de C se correlacionaba con el fenotipo microscópico esperado para las células que realizan *swarming*. Para realizar la observación microscópica, nuevamente nos enfrentamos al desafío de poner a punto un protocolo para fijar y teñir las células para su posterior visualización en el MET. En nuestro caso, realizamos una adaptación del método propuesto por Kirov et al. (2002), en el cual las células son fijadas directamente desde la colonia de *swarming*, evitando así el desprendimiento de flagelos y la modificación de las estructuras de asociación entre bacterias. Con este protocolo logramos observar y caracterizar microscópicamente las células de *B. japonicum* que realizaban *swarming*. Las células de los bordes presentaban una morfología diferencial con respecto a las células del centro o a las células que provenían de colonias en crecimiento en placas sin gradiente. En particular, y en concordancia con lo descrito para otras bacterias que realizan *swarming*, las células de los bordes presentaban mayor superficie de contacto y mostraban hiperflagelación. Sin embargo, estas células estaban asociadas por los polos. Este hecho, si bien no está descrito para otras bacterias que realizan *swarming*, tampoco contradice la definición general del movimiento que mencionamos más arriba.

Cuando evaluamos si existía algún tipo de relación entre las fuentes de C y el desarrollo del *swarming*, observamos que las células de los bordes se encontraban hiperflageladas, pero que LP 3008 siempre presentó un mayor número de flagelos peritricos, independientemente de la fuente de C utilizada. En cambio, en la cepa LP 3004

el flagelo peritrico no pudo ser observado en las placas de *swarming* que contenían manitol o extracto de levadura como fuente de C. Este resultado se correspondía con el perfil de flagelinas observado en medios líquidos (Althabegoiti et al. 2011). Sin embargo a nivel del fenotipo macroscópico, observamos que de manera análoga a lo observado para el movimiento de natación, LP 3008 siempre mostró un perfil de desplazamiento mayor que LP 3004, independientemente de las fuentes de C. Al inquirir si existía alguna diferencia del *swarming* con las distintas fuentes de C, observamos que con gluconato o L-arabinosa se necesitaba un menor número de duplicaciones. Estos valores eran similares a los observados en colonias de *swarming* de *E. meliloti* (Nogales et al. 2010). En algunos casos, observamos que los centros de las colonias de *swarming* presentaban un color más oscuro con respecto a los bordes, que eran blancos y traslúcidos. Esto nos indicaría que las células del centro de la colonia presentaban una diferenciación fisiológica con respecto a las del borde. Se ha demostrado que para realizar el *swarming* es necesario que las bacterias secreten sustancias surfactantes, una de las cuales son las acil-HSL (Daniels et al. 2004, 2006, Kearns 2011). Aunque bien es conocido que *B. japonicum* USDA 110 no sintetiza en cantidades significativas de acil-HSL (Pongsilp et al. 2005), se ha demostrado que en bacterias como *E. coli* o *S. enterica* los lipopolisacáridos (LPS) superficiales estarían cumpliendo dicha función (Kearns 2011). Por lo tanto no sería raro que en *B. japonicum* las células de los bordes de la colonia de *swarming* estuvieran sintetizando una mayor cantidad de LPS a fin de disminuir la tensión superficial y favorecer la translocación. Esta suposición podría ponerse a prueba con mutantes específicos en la biosíntesis de polisacáridos superficiales.

Hasta aquí, si bien habíamos logrado caracterizar el *swarming* en LP 3004 y LP 3008 en diversas fuentes de carbono tanto a nivel macroscópico como microscópico, no habíamos podido determinar si la condición en la cual *B. japonicum* realizaba *swarming* era debido al déficit nutricional o solo al gradiente nutricional. Si extrapoláramos nuestros resultados a las condiciones naturales a las cuales deberían estar expuestas las bacterias, resulta razonable que las mismas necesiten un gradiente de nutrientes, ya que es esperable que en la rizósfera la concentración de los nutrientes no sea estática. Sin embargo, las células no se desplazaron en las placas de Petri de forma direccionada hacia las zonas de mayor concentración de nutrientes, lo cual resulta curioso dado que las bacterias presentan un sistema de quimiotaxis que les permite censar la diferencia de concentración de los nutrientes y en base a ello orientar su desplazamiento. Por análisis bioinformático de la secuencia nucleotídica de *B. japonicum* USDA 110 (Kaneko et al. 2002), hemos hallado dos sistemas quimiotácticos, lo cual nos haría pensar que cada uno de ellos podría estar relacionado con cada uno de los flagelos. Sin embargo, en *E. coli* se ha propuesto que el sistema quimiotáctico pero no la quimiotaxis en sí es necesario para que esta bacteria realice *swarming* (Burkart et al. 1998), si bien no se ha aclarado del todo cuál es la función del sistema quimiotáctico en este contexto. Además, se ha reportado que durante el *swarming* las bacterias no pueden modificar la dirección de sus movimientos por medios de tumbos, tal como ocurre en respuesta al sistema de quimiotaxis en medios líquidos (Kearns 2011). En base a esto podríamos hipotetizar que el posible requerimiento del gradiente nutricional para que *B. japonicum* realice *swarming* podría relacionarse con un rol del sistema quimiotáctico en percibir dicho gradiente, lo cual podría ser parte del disparo de la señalización intracelular que va dar como resultado la hiperflagelación y la activación del movimiento.

CAPITULO

VI

Rol de los flagelos
en el *swarming*

Los dos sistemas de flagelos de *B. japonicum* difieren completamente entre sí no solamente por el tipo de filamento que presentan, sino por los diferentes reguladores que controlarían su biosíntesis y las distintas proteínas que conforman sus cuerpos basales y motores, todo lo cual parece tener un origen evolutivo independiente (Liu & Ochman 2007, Mongiardini, com. pers.). La flagelación mixta observada en *B. japonicum* es un rasgo que se observa en pocas especies bacterianas, entre las cuales podemos nombrar *Vibrio parahaemolyticus*, *Rhodospirillum centenum*, *Azospirillum sp.* y *Aeromonas sp.* En estas especies se ha demostrado que el flagelo lateral se expresa de forma adicional al subpolar en medios sólidos o de alta viscosidad, donde se requiere mayor fuerza de tracción y eventualmente, las bacterias conmutan su movimiento de natación por el de *swarming*. Por lo tanto, se propone que el movimiento constitutivo de estas bacterias es la natación, y dependiendo de las circunstancias se induciría el movimiento de *swarming*, que requeriría al flagelo lateral (McCarter 2004, Jarrell & McBride 2008, Merino & Tomas 2009, Kearns 2011). En el caso de *B. japonicum*, la propuesta de que cada flagelo se utiliza para cada tipo de movimiento no se ha sustentado con evidencia experimental. Por otra parte, Kanbe et al. (2007) sugirieron que ambos flagelos utilizan la fuerza protón-motriz para hacer funcionar sus motores, a diferencia de otras especies de flagelación mixta, en donde el flagelo polar utiliza la fuerza de la bomba de Na⁺ y el flagelo lateral utiliza la fuerza protón-motriz. Por lo tanto, no puede descartarse que *B. japonicum* utilice cualquiera de los dos flagelos para realizar el *swarming*.

En nuestro laboratorio contamos con mutantes delecionales de cada uno de los flagelos y de ambos, tanto en el acervo genómico de LP 3004 como en el de LP 3008 (Tabla VI.1). Los mutantes LP 5843 ($\Delta fliC1234/lafA12^+$) y LP 6865 ($fliC1234^+/\Delta lafA12$), ambos derivados de LP 3004, expanden sus halos de natación a una tasa similar en medio de Götz con agar 0,3 %. Sin embargo, no ocurre lo mismo con los mutantes equivalentes derivados de LP 3008. El mutante denominado LP 5844 ($\Delta fliC1234/lafA12^+$) que solo posee el flagelo lateral, muestra una tasa de expansión del halo de natación del 90% con respecto a su cepa parental; en cambio, el mutante LP 6866 ($fliC1234^+/\Delta lafA12$), que solo posee el flagelo polar, tiene una tasa de expansión del halo de natación del 60% de su cepa parental (Althabegoiti et al. 2011). Estos resultados nos indican que *B. japonicum*, a diferencia de las otras bacterias con flagelación mixta, utiliza ambos flagelos para realizar natación, y en particular, señalan que esta especie bacteriana es capaz de realizar natación solamente con el flagelo lateral. Nuevamente, estas evidencias nos pusieron de manifiesto que no tiene por qué haber una tendencia marcada en *B. japonicum* para utilizar un tipo de flagelo en particular para cada tipo de movimiento.

Para ver si el flagelo lateral es requerido para el *swarming* nos propusimos analizar la capacidad de la colección de mutantes en cada uno de los flagelos de LP 3004 y LP 3008 para realizar este tipo de movimiento. En los experimentos que se describen a continuación utilizamos como fuentes de C, L-arabinosa o extracto de levadura, dado que con la primera se expresan los dos flagelos y se observa el fenotipo macroscópico en 10 días, mientras que con la segunda no se detecta el flagelo lateral y el fenotipo macroscópico se obtiene luego de 20 días. De esta manera evaluamos el rol de cada flagelo en las condiciones nutricionales más opuestas que hemos podido caracterizar.

VI.1. El movimiento social observado en el capítulo anterior requiere los flagelos.

Entre los tipos de movimiento descritos por Henrichsen (1972) solamente la natación y el *swarming* requieren los flagelos. A su vez, estos dos tipos de movimientos se distinguen entre sí por las características reseñadas en el Cap. V, y muy especialmente por ser el *swarming* un movimiento en superficie y la natación un movimiento en el interior de un líquido. Por lo tanto, el hecho de que el movimiento observado por nosotros en el Cap. V fuera en superficie descarta la posibilidad de que sea natación. Si además este tipo de movimiento es dependiente de los flagelos, podríamos confirmar que se trata de *swarming*. Para encarar esta cuestión comenzamos por estudiar el movimiento en superficie de las cepas LP 6543 y LP 6644, carentes de ambos flagelos, en comparación con sus respectivas cepas parentales (Tabla VI.1). Tal como se esperaría en el caso de que se tratara de *swarming*, ambos mutantes fueron incapaces de moverse sobre la superficie de las placas con gradiente de la fuente de C (Fig. VI.1). Cabe mencionar que estudios previos en nuestro laboratorio mostraron que los distintos mutantes poseen la misma tasa de crecimiento que su cepa parental (Tesis Doctoral M. J. Althabegoiti 2011, UNLP), por lo que la diferencia en el tamaño de la colonia de *swarming* refleja directamente la diferencia en la tasa de movilidad. La diferencia entre LP 3004 y LP 6543, o LP 3008 y LP 6844 para realizar *swarming* se observó independientemente de la fuente de carbono utilizada.

Con este resultado descartamos que el desplazamiento superficial observado en esta Tesis se tratara de *twitching*, *gliding*, *sliding* o *darting* (Henrichsen 1972). Estos hechos, unidos a la observación de que se trata de un movimiento social, con mayor flagelación y aumento de la longitud celular, nos confirmaron que el movimiento caracterizado por nosotros efectivamente es *swarming*.

En la mayoría de los casos, las mutantes aflageladas LP 6543 y LP 6644 presentaron, al igual que LP 3004 y LP 3008, un color marrón en el centro de la colonia, cuyos bordes seguían siendo blancos aunque no se expandían como en las cepas de tipo silvestre. Como mencionamos en el capítulo anterior, esto podría implicar una diferenciación fisiológico-metabólica de las células previa a realizar el *swarming*.

Tabla VI.1. Cepas utilizadas y sus características con respecto a la expresión de flagelos y natación (Althabegoiti et al. 2011).

Cepa	Cepa parental	Genotipo	Fenotipo de flagelos*	Natación con respecto a su parental (%)
LP 3004	USDA 110	<i>fixC1243⁺ /lafA12⁺</i>	Subpolar ^C y lateral ^I	—
LP 3008	LP 3004	<i>fixC1243⁺ /lafA12⁺</i>	Subpolar ^C y lateral ^C	—
LP 5843	LP 3004	Δ <i>fixC1234</i> ^I / <i>lafA12⁺</i>	Lateral	70
LP 5844	LP 3008	Δ <i>fixC1234</i> ^I / <i>lafA12⁺</i>	Lateral	90
LP 6865	LP 3004	Δ <i>lafA12</i> / <i>fixC1243⁺</i>	Subpolar	70
LP 6866	LP 3008	Δ <i>lafA12</i> / <i>fixC1243⁺</i>	Subpolar	55
LP 6543	LP 6865	Δ <i>fixC1234</i> - Δ <i>lafA12</i> ^I	Ninguno	0
LP 6644	LP 6866	Δ <i>fixC1234</i> - Δ <i>lafA12</i> ^I	Ninguno	0

*Los supraindices C e I indican expresión constitutiva o inducible respectivamente

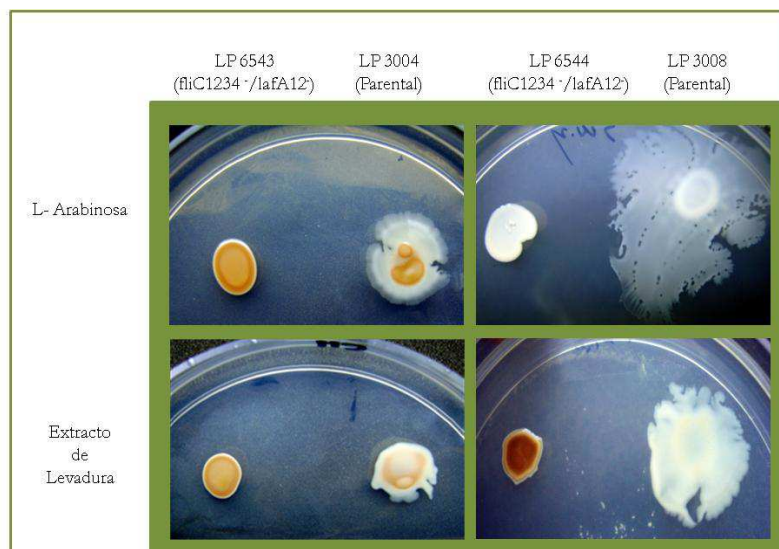


Figura VI.1. Rol de los flagelos en el *swarming* en relación con la fuente de C: L-arabinosa (arriba) o extracto de levadura (abajo). A la izquierda: mutantes LP 6543 y LP 6544, deletados en ambos flagelos (Δ *fliC1234*/ Δ *lafA12*); a la derecha: sus cepas parentales LP 3004 y LP 3008 respectivamente.

De este modo podríamos suponer que la condición de gradiente de la fuente de carbono dispararía una señalización de diferenciación metabólica requerida para iniciar el *swarming*, la cual ocurre aún cuando las células sean luego incapaces de moverse por carecer de flagelos. Sin embargo, aún no sabemos si las células carentes de flagelos por falta de flagelina pueden formar las estructuras del cuerpo basal y el motor, dado que la construcción del filamento flagelar es la última etapa de la biosíntesis de esta organela (Brown et al. 2009).

Por lo tanto, esta diferenciación de colores entre los bordes y el centro de la colonia podría indicar un proceso de diferenciación en preparación para el *swarming* que podría estar ocurriendo ya sea independientemente de la síntesis del flagelo o bien en paralelo con el disparo de las etapas iniciales de la misma. Si bien algunos autores proponen que existe una diferenciación celular previa al *swarming* (Kearns & Losick 2003, Kearns 2011) ésta no siempre se asocia con una diferenciación de colores en la misma colonia. Dado que la generación del pigmento marrón no se observó en el 100 % de los casos, podría ocurrir que las condiciones óptimas para su acumulación hasta un nivel tal que sea visible varían de un experimento a otro. De todos modos, la formación de este pigmento resulta curiosa y ofrece la oportunidad de realizar experimentos más dedicados para dilucidar si se trata de parte de un proceso de diferenciación previo al *swarming*.

VI.2. Los mutantes que solo expresan el flagelo subpolar (Δ *lafA12*) están severamente afectados en el *swarming*.

Las cepas LP 6865 y LP 6866, derivadas de LP 3004 y LP 3008 respectivamente, poseen deletaciones en *lafA12* y por ello solo son capaces de expresar el flagelo subpolar, propuesto como el responsable de la natación en *B. japonicum* (Kanbe et al. 2007). Sin embargo, LP 6865 y LP 6866 presentan disminuciones de sus halos de natación del 30 o el

45 % con respecto a su cepa parental respectivamente (Althabegoiti et al. 2011), indicando que el flagelo lateral también es requerido para la natación. De este modo, resulta difícil anticipar si los mutantes delecionales de *lafA12* presentarán alteraciones en el *swarming*. Sin embargo, como se observa en la Fig. VI.2, tanto LP 6865 como LP 6866 realizaron *swarming* con extracto de levadura y con L-arabinosa como única fuente de carbono, pero el mismo fue drásticamente reducido. En la mayoría de los casos volvimos a observar la diferenciación de color entre el centro y los bordes de la colonia. Este resultado nos sugirió que *B. japonicum* es capaz de utilizar el flagelo subpolar para realizar *swarming*, pero que el flagelo lateral debería estar realizando un aporte mayoritario en este tipo de

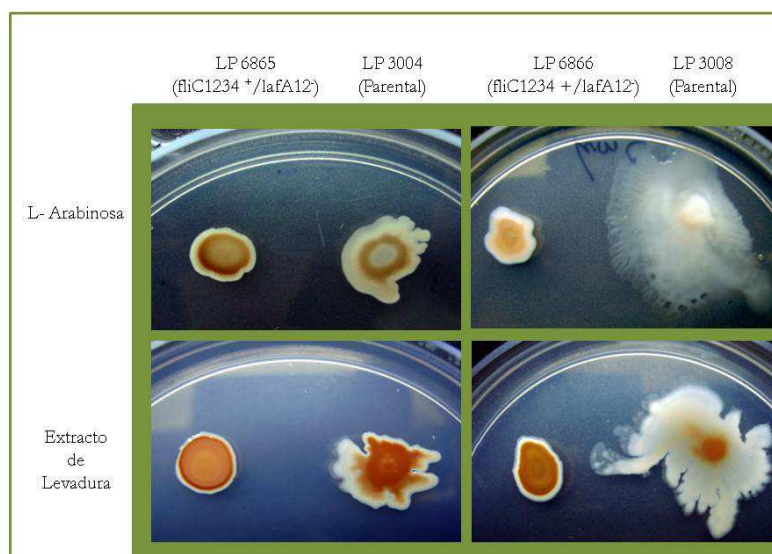


Figura VI.2. Rol de los flagelos en el *swarming* en relación con la fuente de C: L-arabinosa (arriba) o extracto de levadura (abajo). A la izquierda: mutantes LP 6865 y LP 6866, que solo expresan el flagelo subpolar, (*fliC1234*⁺/ Δ *lafA12*); a la derecha: sus cepas parentales LP 3004 y LP 3008 respectivamente.

desplazamiento.

VI.3. Los mutantes que solo expresan el flagelo lateral (Δ *fliC1234*) están menos afectados en el *swarming*.

Las cepas LP 5843 y LP 5844, con una deleción de los genes *fliC1234*, son incapaces de expresar las flagelinas FliC1234 que forman parte del flagelo subpolar y por lo tanto solo pueden expresar el lateral. Como observamos en el capítulo anterior, las células de LP 3004 y LP 3008 provenientes de colonias de *swarming* presentaron diferentes perfiles de expresión de flagelos. En particular, LP 3008 produjo ambos flagelos con todas las fuentes de carbono, mientras que en LP 3004 no pudimos detectar con el MET al flagelo lateral, ya sea en manitol o extracto de levadura. Este resultado coincidió con los obtenidos en natación. Si bien el flagelo lateral fue propuesto como responsable del *swarming* en bacterias con flagelación mixta, hasta el momento no había sido debidamente demostrado el rol de dicho flagelo en el *swarming* de *B. japonicum*. Como se observa en la Figura VI.3 ambos mutantes, LP 5843 y LP 5844, fueron capaces de realizar *swarming*, de acuerdo a lo predicho. Si bien el tamaño de las colonias de *swarming* producidas por estos mutantes era

considerable, nunca llegaron a desarrollar colonias del mismo tamaño que sus cepas parentales en ninguna de las dos fuentes de C ensayadas. Si comparamos ambos mutantes, LP 5843 o LP 5844 con su cepa parental LP 3004 o LP 3008 respectivamente, observamos que independientemente de la fuente de carbono, en ambos casos el tamaño de la colonia de la mutante fue menor. Este hecho nos confirmó que si bien el flagelo lateral aportaría en mayor proporción al *swarming*, ambos flagelos están implicados en este tipo de movimiento ya que cuando están presentes ambos se obtiene la mayor expansión de la colonia de *swarming*.

En particular, en extracto de levadura la reducción del tamaño de la colonia de *swarming* fue más pronunciado que en L-arabinosa. Esto podría estar relacionado con la eficiencia metabólica de las bacterias en estas dos fuentes de carbono, ya que la disponibilidad de protones para la formación del gradiente que genera la fuerza protón-motriz en células crecidas en L-arabinosa es muy alta, presumiblemente mayor que la que podrían otorgar los componentes del extracto de levadura (Thorne & Burris 1940).

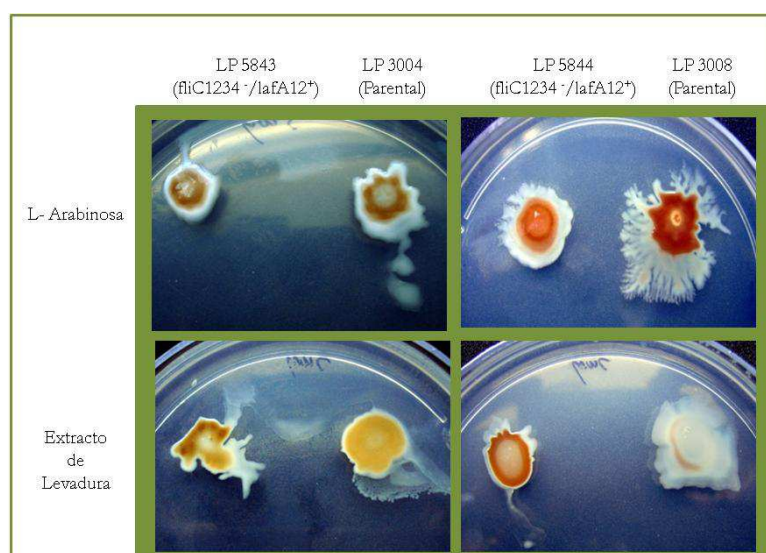


Figura VI.3. Rol de los flagelos en el *swarming* con relación a la fuente de C: L-arabinosa (arriba) o extracto de levadura (abajo). A la izquierda: mutantes LP 5843 y 5844, que solo expresan el flagelo lateral (Δ *fliC1234*/*lafA12*⁺); a la derecha: sus cepas parentales LP 3004 y LP 3008 respectivamente.

VI.4. Resumen y discusión.

En ese capítulo hemos evaluado el rol de cada uno de los flagelos de *B. japonicum* sobre el desplazamiento de *swarming*. De manera complementaria a lo obtenido en el capítulo anterior, hemos observado que los mutantes que carecen de ambos flagelos fueron incapaces de moverse en placas con medio de Götz-agar 0,5 % con gradiente de la fuente de carbono, lo que nos indicaría, junto a la caracterización micro y macroscópica ya realizada, que el desplazamiento social observado es dependiente de flagelos y por lo tanto se trata de *swarming*.

A continuación analizamos la influencia del flagelo subpolar y del lateral por separado, mediante el empleo de mutantes delecionados en una u otra de las flagelinas.

Pudimos observar que *B. japonicum* fue capaz de utilizar cualquiera de los dos flagelos para el *swarming*, aunque la total expansión de la colonia requirió la presencia de ambos. La falta del flagelo lateral redujo drásticamente al *swarming*, mientras que en los mutantes carentes del flagelo subpolar el defecto del *swarming* fue menos pronunciado. Tomados en conjunto, estos resultados nos indicarían que si bien *B. japonicum* necesita de los dos flagelos para el *swarming*, el flagelo lateral es más determinante. Este hecho se contradice con lo propuesto por Kanbe et al. (2007), pero coincide con lo observado en otras especies con flagelación mixta. En particular, en *R. centenum* se ha observado que aún cuando el flagelo lateral juega un papel importante en el *swarming*, células desprovistas de dicho flagelo son capaces de realizar *swarming* solo con el flagelo polar. Por otro lado, en *V. parahaemolyticus* se ha observado que si bien el flagelo polar no participa del movimiento de *swarming*, el mismo es utilizado como un sensor de la viscosidad del medio, controlando así la expresión del flagelo lateral.

En otros estudios se observó que el flagelo polar rota en sentido horario y antihorario (Althabegoiti et al. 2011). En general, las bacterias nadan linealmente cuando sus flagelos se mueven en sentido antihorario, pero al cambiar el sentido de rotación de los flagelos al sentido horario, la bacteria comienza a dar tumbos, lo cual le permite cambiar el sentido del movimiento. Estos cambios de sentido de rotación de los flagelos están controlados por el sistema de quimiotaxis (Schmitt 2002) y le permiten a la bacteria nadar en una trayectoria sesgada hacia el aumento de concentración de nutrientes, por ejemplo. En el caso del flagelo lateral, su movimiento es solamente en sentido antihorario (Althabegoiti et al. 2011), pero los mutantes que poseen solo este flagelo muestran una mayor tasa de tumbos (Kanbe et al. 2007, Althabegoiti et al. 2011). El flagelo lateral parece derivar del flagelo de *E. meliloti* y *Brucella* spp (Liu & Ochman 2007), y en estas especies los tumbos ocurren como consecuencia de la detención asincrónica de la rotación de los flagelos, lo que favorece el desmembramiento del bucle de flagelos, similarmente a como ocurre en otras especies al cambiar el sentido de rotación (Attmannspacher et al. 2005). Según Kearns (2011), las bacterias que realizan *swarming* solo pueden moverse en una dirección, y no presentan cambios de dirección mediados por tumbos. Esto sería favorecido con el flagelo lateral, el cual rota en una sola dirección y, dado que el *swarming* ocurre sobre una superficie, el movimiento browniano no debería influir.

CAPITULO VII

Movilidad de
B. japonicum en el
suelo.

Al comenzar esta Tesis hemos hecho hincapié en la problemática de la competición para la nodulación desde dos grandes puntos de vista: uno de ellos relacionado con los factores ambientales bióticos y el otro con las características propias de los rizobios empleados como inoculantes. Así, en la primera parte hemos estudiado la biodiversidad y las propiedades de las bacterias noduladoras de soja que se encuentran como poblaciones alóctonas en los suelos bajo cultivo de esta leguminosa, y ya en la segunda nos hemos enfocado en la movilidad de los bradirrizobios y en particular en el *swarming* como un factor propio del bradirrizobio inoculado que podría influir en su competitividad.

La relación entre la movilidad, la colonización rizosférica y la competitividad para nodular es bastante más compleja que lo que se pensó en un principio. Diversos autores han propuesto que los (bradi)rizobios, atraídos por quimioattractantes del exudado radical, se desplazarían hacia las raíces para colonizar la rizósfera y comenzar el proceso de simbiosis. Esta proposición se sustenta en ensayos con mutantes no móviles, que son incapaces de iniciar la colonización radical, o en la quimiotaxis de los (brady)rizobios hacia sustancias liberadas en los exudados radicales (Gulash et al. 1984, Barbour et al. 1991, Caetano-Anollés & Gresshoff 1991). Sin embargo, la mayoría de estos ensayos se llevaron a cabo en condiciones de laboratorio y particularmente en medios líquidos o saturados de agua. Ahora bien, si tenemos en cuenta las características del medio edáfico, en donde realmente ocurre el desplazamiento de estas bacterias, no se debería esperar una difusión homogénea de los quimioattractantes, ya que los canales de agua del suelo no son continuos, y por lo tanto, las condiciones recreadas en el laboratorio para evidenciar el desplazamiento, tal cual como lo han observado estos autores, pueden conducir a extrapolaciones erróneas. Ello podría explicar la contradicción entre los trabajos mencionados y otros realizados en medios porosos insaturados, donde se observó una escasa movilidad y en especial, una pobre correlación entre la capacidad de moverse y la competitividad para nodular (Madsen & Alexander, 1982, Liu et al. 1989, McDermott & Graham 1989, López- García et al. 2002, Horiuchi 2005).

Por supuesto, no podemos discutir que *B. japonicum* posee movilidad y más aún, que cepas con mayor movilidad son más competitivas (Althabegoiti et al. 2008, 2011), pero eso no indica que dicha movilidad se ejerza como una quimiotaxis *hacia* la raíz. Entonces ¿Cuál es el rol de la movilidad en los medios edáficos? La respuesta a esta pregunta va a depender de diversas variables, las cuales son imposibles de estudiar de manera conjunta. Sin embargo, la respuesta no debería abordarse desde experimentos en medios líquidos o agarizados, los cuales no representan las condiciones edáficas, sino más bien desde el propio suelo como modelo experimental.

El suelo está constituido por partículas de distintos tamaños y materia orgánica, que en conjunto favorecen la formación una estructura estable, con poros de diversos diámetros. Estos poros le confieren al suelo la capacidad de retener agua, siendo inversa la relación entre el diámetro de cada poro y su capacidad de retención de agua. De esta manera, los poros pueden ser clasificados en poros no capilares, que suelen drenar fácilmente el agua (referida como agua gravitacional) y en poros capilares, en los cuales el agua sí puede ser retenida con distintas presiones dependiendo del tamaño de los poros y el contenido hídrico del suelo. Los poros capilares, debido a su tamaño, le confieren a las bacterias del suelo un microhábitat que excluye a los protozoos.

El contenido de agua del suelo es muy variable; así, el suelo solo se va a encontrar saturado de agua (inundado) luego de una precipitación o un riego. En condiciones normales los suelos insaturados van a contener algunos canales de agua en los cuales los (bradi)rizobios van a poder nadar libremente, como así también superficies con menor contenido de agua, que podrían favorecer el movimiento de *swarming*. Por lo tanto, en un suelo insaturado el movimiento de *swarming* podría ser más común que la natación, y ello podría explicar la aparente contradicción entre los resultados experimentales obtenidos en medios líquidos y aquellos obtenidos en medios porosos insaturados.

Hasta el momento no ha sido demostrado qué tipo de movimiento es el que podrían realizar los (bradi)rizobios en el suelo para colonizar diferentes nichos. Como describimos en los dos capítulos anteriores, hemos logrado poner en evidencia al movimiento de *swarming* en *B. japonicum* y caracterizarlo en función del requerimiento cada uno de los dos flagelos de esta especie, como así también en relación con la influencia de las fuentes de C sobre la expresión del flagelo lateral. Así concluimos que *B. japonicum* necesita de sus dos tipos de flagelos para desplazarse por *swarming*, pero en particular el flagelo lateral sería el más necesario.

No obstante, como hemos observado, las condiciones en las cuales *B. japonicum* es capaz de realizar *swarming* en una caja de Petri son muy restrictivas y particulares, como para que ocurran en las condiciones naturales del suelo. Si bien nosotros postulamos que el gradiente de la fuente de carbono podría estar presente en la rizósfera, nuestras observaciones indicarían que el intervalo de concentraciones necesarias para disparar la diferenciación hacia el *swarming* es muy estrecho, como así también el estado fisiológico de crecimiento del inóculo, el contenido de humedad de la caja de Petri, la calidad del agar empleado, y el tamaño del inóculo, todo lo cual no necesariamente ocurra así en el suelo, haciendo que nos planteemos si este tipo de desplazamiento realmente puede ocurrir en el suelo.

Si bien no pretendemos resolver la cuestión de la movilidad en el suelo, en los estudios que se presentan en este capítulo hemos tratado de realizar una aproximación al conocimiento de los desplazamientos de *B. japonicum* mediados por flagelos en su ambiente natural. Para ello, utilizamos la cepa LP 3008 y sus mutantes en cada uno de sus flagelos o en ambos, ya que es el acervo genómico que presentó un fenotipo de movilidad más evidente tanto en natación (Althabegoiti et al. 2011) como en *swarming* (Cap. VI).

V.II.1. Evaluación del *swarming* en suelos hidratados a distintos porcentajes de su capacidad de campo.

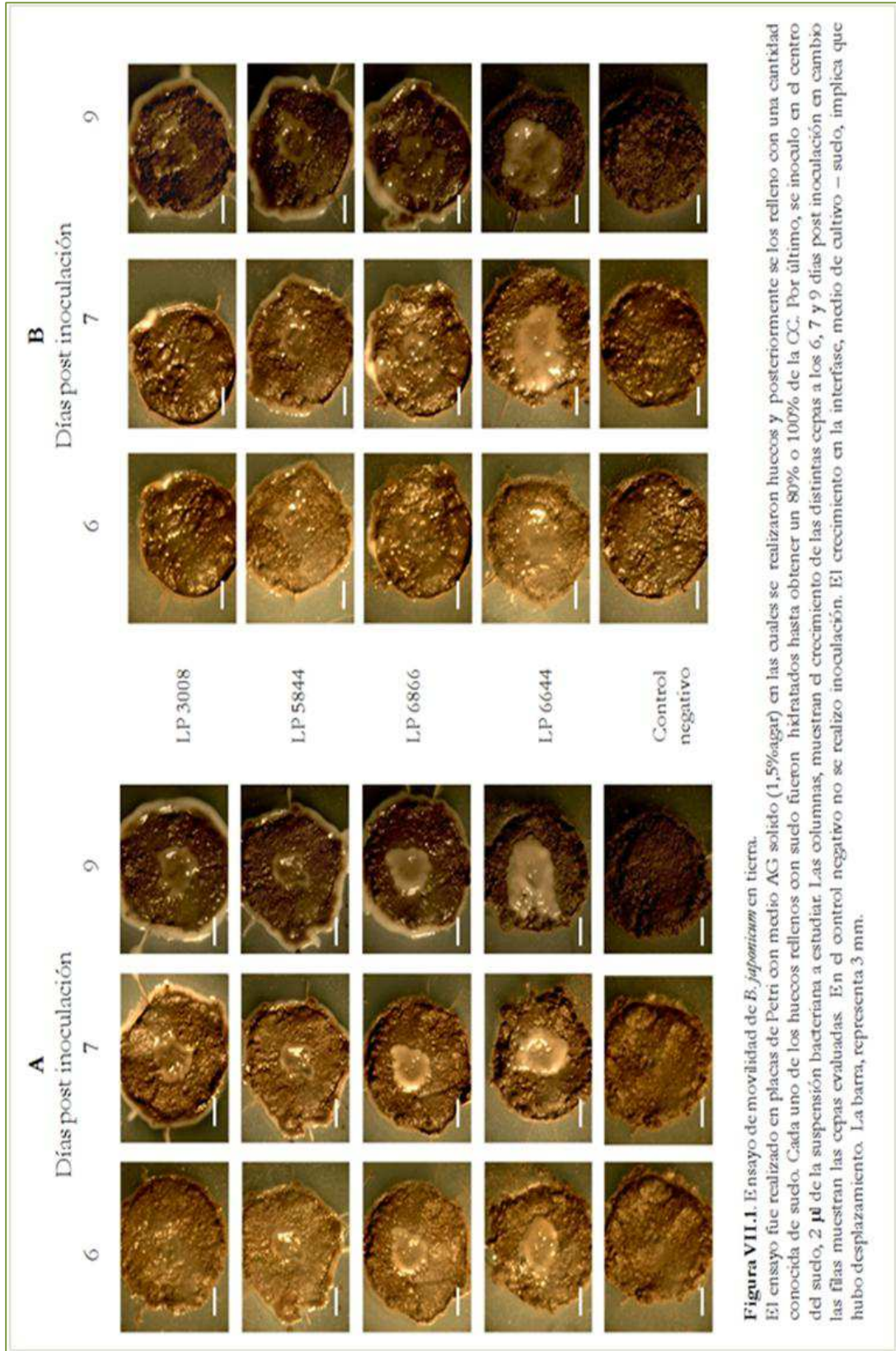
Se entiende como capacidad de campo (CC) a la cantidad de agua que es capaz de retener el suelo después de haber drenado el agua gravitacional. Así, se esperaría que la natación se vea favorecida en tanto mayor sea el contenido hídrico respecto de la CC. Es decir que al 100 % de la CC, se observará el mayor contenido de agua en los poros capilares, donde las bacterias podrán realizar natación en los canales del suelo, y por lo tanto se favorecerá la observación de este desplazamiento sobre el *swarming*. En cambio en suelos con menor CC, ambos movimientos estarían presentes y el *swarming* iría prevaleciendo a medida que el contenido de agua disminuyera.

Por lo tanto para estos experimentos elegimos llevar el suelo hasta el 80 % o el 100 % de su CC, dado que en ensayos previos donde evaluamos la competición para la nodulación de las cepas mutantes contra su parental en macetas con vermiculita, utilizamos estas mismas condiciones (Althabegoiti et al. 2011).

A su vez, la utilización de los mutantes derivados de LP 3008 nos permitiría discernir el tipo de movimiento que llevarían a cabo los (bradi)rizobios en cualquiera de las condiciones, ya que el mutante que solo expresa el flagelo lateral, LP 5844, mostró un desplazamiento de casi el 90 % con respecto a su cepa parental, LP 3008, en el movimiento de natación (Althabegoiti et al. 2011). Esta similitud en la natación entre el mutante y su parental no fue observada en el *swarming*, el cual se vio severamente restringido en el mutante LP 5844 (Fig. VI.2.). Por lo tanto, esperaríamos que si LP 5844 se desplazara mucho menos que LP 3008, el movimiento predominante sería *swarming*, en cambio, si ambas cepas se desplazaran de manera similar, el movimiento predominante sería la natación.

Para poder evaluar la movilidad de *B. japonicum* en el suelo, utilizamos una modificación del método de Vilain et al. (2006). Como describimos en el Cap. II, al medio AG sólido (1,5 % agar) contenido en una placa de Petri se le realizaron perforaciones de aproximadamente 1,4 cm de diámetro. Estas perforaciones posteriormente fueron rellenadas con cantidades conocidas de suelo de Cavanagh estéril, al que previamente se le determinó su CC gravimétricamente, lo que nos permitió calcular el volumen de agua necesario para obtener un 80 % o 100 % de su CC. El ensayo en sí consistió en inocular la suspensión bacteriana en el centro de la muestra de suelo hidratado e incubarla a 28 °C. Si ocurría un desplazamiento por parte de las bacterias desde el punto de inoculación en el centro de la muestra de suelo hacia los bordes, observaríamos un crecimiento bacteriano en el medio de cultivo que rodeaba el límite del suelo hidratado. En tal caso, si la mutante carente de flagelos, LP 6644, solo presentaba crecimiento en el centro del suelo, podíamos decir que el movimiento observado además era dependiente de flagelos.

Nosotros evaluamos las placas de Petri a los días 6, 7 y 9 post-inoculación. Como se observa en las Fig. VII.1.A y B, a los 6 días post inoculación tanto la cepa LP 3008 como los mutantes, presentaron crecimiento en el lugar donde se los había inoculado, pero en el caso de las muestras de suelo hidratadas al 100 % de su CC, este crecimiento resultó más difuso. Esto podría deberse al mayor contenido de humedad de la muestra de suelo. La diferencia de crecimiento en la interfase medio de cultivo-suelo entre los distintos mutantes y LP 3008 se comenzó a observar al día 7 y fue más evidente al día 9 post-inoculación, en ambas CC. Cuando evaluamos la movilidad de las cepas inoculadas en la muestra de suelo hidratada al 80 % de su CC, observamos al día 7 post-inoculación que tanto LP 3008 como la mutante que solo expresa el flagelo lateral, LP 5844, presentaron crecimiento en la interfase medio de cultivo-suelo. Además, el fenotipo observado en ambas cepas fue similar, indicándonos que no solo estaba ocurriendo un desplazamiento, sino que también había la misma tasa de expansión en ambas cepas. En cambio, en la mutante LP 6644, carente de flagelos, y en la que solo expresa el flagelo subpolar, LP 6866, se seguía observando crecimiento solo en el punto de inoculación. Al día 9 post inoculación todas las cepas, excepto LP 6644, habían alcanzado la interfase y presentaban un grado similar de expansión (Fig. VII.1.). De manera similar a lo descrito, cuando evaluamos las cuatro cepas en las muestras de suelo al 100 % de su CC, observamos que al día 7 post-inoculación, tanto las mutantes en uno de los flagelos como LP 3008, presentaron



crecimiento en la interfase, aunque la cepa que solo expresa el flagelo lateral, LP 5844, presentaba un fenotipo semejante al de LP 3008. Al día 9 post-inoculación, el crecimiento en la interfase alcanzó su mayor expansión, el cual era similar en las tres cepas mencionadas. Nuevamente la cepa LP 6644, carente de flagelos, solo presentó crecimiento en el punto de inoculación sin llegar nunca a la interfase suelo-medio AG (Fig. VII.1).

VII.2. Resumen y discusión.

En base a lo descrito en las placas de Petri con muestras de suelo hidratadas al 80 y 100 % de su capacidad de campo, pudimos evidenciar que *B. japonicum* fue capaz de desplazarse en suelos y que ese desplazamiento fue dependiente de flagelos. Por lo tanto, los resultados de este capítulo pueden interpretarse comparándolos con la movilidad de *swarming* observada por nosotros en el Cap. VI y con las observaciones del movimiento de natación realizadas por Althabegoiti et al. (2011), sin necesidad de invocar ningún otro tipo de movilidad. Mientras que el *swarming* se vio muy limitado en los mutantes que poseen un solo flagelo, en especial en LP 6866 (Figs. VI.1 y VI.2), en ensayos de natación ambos mutantes se desplazaron considerablemente: LP 6866 un 70 % y LP 5844 un 90 %, en ambos casos con respecto a LP 3008 (Althabegoiti et al. 2011). En nuestros experimentos con suelo (Fig. VII.1), nosotros observamos que tanto al 80 como al 100 % de la capacidad de campo, LP 3008 y su mutante LP 5844 alcanzaron la interfase suelo-agar al mismo tiempo, evidenciando un comportamiento similar al observado para la natación. Además, cuando evaluamos el desplazamiento al 100 % de la CC, observamos que tanto LP 5844 como 6866 presentaron crecimiento en la interfase a los 7 días post inoculación, al igual que LP 3008. Esto nos indica que estas cepas se habían desplazado tanto con el flagelo lateral como con el subpolar y por lo tanto el desplazamiento nuevamente era consistente con las observaciones de natación, ya que si hubieran dependido del *swarming*, deberíamos haber observado un retraso considerable en los mutantes. Por lo tanto, podríamos plantear que en las condiciones de 80-100 % de la CC la natación por medio de la utilización del flagelo subpolar fue suficiente para el desplazamiento en el suelo. Estos resultados no permiten descartar que el *swarming* sea el tipo de desplazamiento predominante a menores CC, pero esto no puede abordarse satisfactoriamente con este sistema experimental.

Si bien este ensayo no es un fiel reflejo de lo que sucede en los suelos, ya que por un lado al realizar las placas de Petri destruimos la estructura del suelo, y por otro lado eliminamos factores bióticos con la esterilización, el mismo nos permite realizar una mejor aproximación a la situación natural que los experimentos en placas de Petri con medio de cultivo. Teniendo en cuenta estas salvedades, nuestros resultados nos sugieren que el desplazamiento predominante en el suelo, tanto al 80 % o al 100 % de su CC, es la natación. No obstante, estos resultados no permiten descartar que luego del día 7 post-inoculación las bacterias hayan comenzado a realizar *swarming*, y este movimiento haya coexistido con la natación. Si este hubiera sido el caso, el *swarming* hubiera pasado desapercibido ya que solo evaluamos el desplazamiento total desde el punto de inoculación hasta el borde de la muestra de suelo. De todas maneras, sigue siendo válido afirmar que el movimiento predominante fue la natación. En particular, trabajos recientes señalan que las bacterias que realizan *swarming*, al ser inoculadas desde un medio de cultivo líquido a un medio sólido, presentan un periodo en el cual no se desplazan debido a que está ocurriendo el proceso de diferenciación a formas hiperflageladas (Kearns 2011).

CAPITULO VIII

Conclusiones
y
Perspectivas.

Al inicio de esta Tesis hemos mencionado la influencia económica que tiene el cultivo de soja en nuestro país, como así también su alto requerimiento de N. Con el fin de que la planta pueda obtener este nutriente del aire, se utiliza la biofertilización con bradirrizobios eficientes para asociarse con ella y fijar N₂, pero en general no suele observarse una respuesta significativa del rendimiento. Entre los diversos factores que pueden estar conjugándose para observar esa falta de respuesta está la denominada competición para la nodulación, la cual parecería tener un rol determinante. Este fenómeno depende de tres actores: la planta de soja, los (bradi)rizobios de los biofertilizantes y el suelo, incluyendo su microbiota, sus características intrínsecas (pH, estructura, iones, etc.) y su heterogeneidad, expresada en multitud de nichos ecológicos. Esto lo vuelve un sistema complejo de estudiar. Particularmente, dentro del ecosistema del suelo van a estar presentes poblaciones de (bradi)rizobios alóctonos, que van a estar compitiendo por la nodulación de la soja contra los bradirrizobios del inoculante. En tal sentido, creemos que es de vital importancia poder entender el fenómeno de la competitividad para nodular, como una forma de mejorar la eficiencia de la relación simbiótica entre el inoculante y el cultivo de soja.

Dada la complejidad que presenta el fenómeno de la competición para la nodulación y en base a observaciones previas de nuestro grupo de trabajo, nos planteamos como objetivos generales de esta Tesis realizar una contribución al conocimiento de aspectos determinantes de la competitividad para nodular. Específicamente nos planteamos estudiar la competición para la nodulación desde dos puntos de vista. Así, en la primera parte de esta Tesis hemos estudiado las características ecofisiológicas de las poblaciones alóctonas de (bradi)rizobios aisladas de nuestros suelos con historial de cultivo de soja. Como segundo enfoque, nos planteamos averiguar si otros tipos de movilidad diferentes de la natación ya estudiada con anterioridad (Althabegoiti et al. 2008, 2011) podrían ocurrir en el suelo y así contribuir a resolver las contradicciones del conocimiento actual acerca del posible rol de la movilidad de los (bradi)rizobios en la competición para la nodulación. Es decir, nos planteamos como problema de estudio una población de (bradi)rizobios establecida en un medio edáfico con determinadas características, que se enfrenta a una población de rizobios del biofertilizante, inoculada en una alta concentración pero que queda concentrada en un pequeño volumen de suelo. Entonces surgen estas preguntas: ¿Por qué los rizobios del biofertilizante son ineficientes para ocupar los nódulos de la soja?, ¿Qué características poseen estas poblaciones alóctonas que hacen que ocupen mayor porcentaje de nódulos? ¿Qué rol juega la movilidad de los (bradi)rizobios en esta competición para la nodulación? ¿Los rizobios se mueven en el medio edáfico?

En la primera parte de esta Tesis nos focalizamos en estudiar las características ecofisiológicas de una colección de aislamientos alóctonos provenientes de cinco zonas con historial de cultivo de soja del denominado cinturón sojero, abarcando las provincias de Buenos Aires, Entre Ríos y Córdoba. Observamos que estos aislamientos presentaron una gran diversidad genotípica que se relacionó con su suelo de origen, pero el potencial para nodular no pareció tener adaptaciones específicas al sitio de origen. En el análisis de la diversidad, también hemos observado que la cepa utilizada habitualmente en los inoculantes, *B. japonicum* E109, posee una muy baja representatividad, por lo cual nos planteamos si esto se debe a las condiciones edáficas o a una alta competitividad de las cepas alóctonas. Cuando evaluamos las características fenotípicas de nuestros aislamientos encontramos que para ciertas características como velocidad de crecimiento y tipo y

morfología de colonia nuestros aislamientos mostraron un comportamiento heterogéneo; sin embargo todos fueron tolerantes a 37 °C, por encima de la temperatura óptima de los (bradi)rizobios, la cual E109 fue incapaz de tolerar. Estos resultados no nos sorprendieron, dado que diversos autores han observado este tipo de comportamiento en suelos donde los (bradi)rizobios son introducidos por biofertilización, los cuales evolucionan para formar poblaciones alóctonas con un alto grado de diversidad tanto genotípica como fenotípica (Chen et al. 2000, Batista et al. 2007, Gomes Barcellos et al. 2007). Este resultado podría deberse a la adaptación de los rizobios al nuevo medio edáfico por deriva genética, como así también al proceso de transferencia horizontal de genes como medios de incrementar la diversidad genotípica (Gomes Barcellos et al. 2007). Evaluando algunas de las características de los suelos de donde fueron obtenidos los aislamientos observamos que se trata de suelos con pH ácido, el cual se relacionó con la distribución obtenida mediante el análisis genotípico. En medios edáficos ácidos se liberan cationes como Al^{3+} , que presentan toxicidad tanto para los microorganismos como para las leguminosas, afectando directamente a la simbiosis. En tal sentido, nos pareció interesante evaluar el comportamiento de nuestras cepas para crecer a pH ácidos y en presencia de Al^{3+} . Todas las cepas alóctonas analizadas, como así también E109, fueron capaces de crecer a pH 4,8; sin embargo, a diferencia de las cepas alóctonas, E109 fue incapaz de tolerar la presencia de Al^{3+} . Dado que los cultivos de soja en Argentina son casi en su totalidad realizados con variedades RR, evaluamos la capacidad de las cepas alóctonas para tolerar glifosato. Excepto una cepa (CA61N), el resto mostró una significativamente mayor tolerancia que E109. Claramente estos resultados no nos representan todas las adaptaciones que pueden estar presentes en las cepas alóctonas, pero sugieren que la baja representatividad de E109 podría deberse a que carece de ciertas capacidades intrínsecas de los (bradi)rizobios de la población alóctona como la tolerancia a la alta temperatura, al glifosato o al Al^{3+} .

Siguiendo con la caracterización, desde hace años se cree que las cepas alóctonas establecidas en los suelos son malas fijadoras de N_2 pero eficientes competidoras (Boonkerd et al. 1978, McDermott & Graham 1989, Sadowski & Graham. 1998, Thies et al. 1991). Sin embargo los estudios en los que se basa esta hipótesis se realizaron en suelos de Estados Unidos, cuyas características edáficas no necesariamente coinciden con las nuestras. Diversos autores han señalado que en nuestros suelos existen poblaciones con buen potencial de FBN (Perticari et al. 1998, Melchiorre et al. 2010). Por otro lado, se ha estudiado la competitividad de rizobios de crecimiento rápido contra bradirrizobios, observando que los primeros son deficientes en la ocupación de nódulos (Pastorino et al. 2009). En tal sentido, algunos autores proponen que esa competición puede estar determinada por el pH de los suelos, en donde se vería favorecido *B. japonicum* a pH ácidos y en cambio *E. fredii* se vería favorecido en suelos alcalinos independientemente de su competitividad intrínseca (Buendía Clavería et al. 1994). Cuando evaluamos nuestras cepas en comparación con E109 y USDA 110 encontramos dos comportamientos bien definidos, con pocas excepciones. Por un lado, los rizobios fueron deficientes en la FBN y en la competición para la nodulación; por otro lado, los bradirrizobios fueron eficientes FBN, pero en contra de lo previsto, no encontramos ninguna cepa que compitiera más que E109. Ahora bien, si todas estas cepas, tanto de rizobios como de bradirrizobios son deficientes frente a E109 en la competición para nodular, ¿Por qué persisten? Si bien con nuestros resultados no podemos llegar a una conclusión, podemos hipotetizar que las condiciones edáficas tienen un rol determinante en la competición; así, aunque las cepas alóctonas posean una baja competitividad intrínseca, logran sobrevivir a condiciones desfavorables para la cepa del biofertilizante y posicionarse en mejores condiciones a la hora de infectar

nuevas raíces. El otro punto que observamos es que de una población de diez cepas evaluadas en su capacidad simbiótica y su competitividad encontramos que dos cepas, SA37S y VT16S, toleraron más eficientemente la presencia de Al^{3+} y glifosato y presentaron un efecto simbiótico positivo, por lo menos equiparable a E109. Además, SA37S presentó la misma competitividad intrínseca para nodular que E109. Esto nos hace pensar que si de tan solo diez cepas evaluadas, una de ellas presentó un potencial de simbiosis y competitividad similares a E109, pero con una mejor adaptabilidad al medio, debe existir una gran riqueza de nuevas cepas potencialmente útiles para biofertilizantes en nuestros suelos. Haciendo el mismo análisis, también encontramos que existen cepas con buena tolerancia al glifosato, como CU42S y NJ33N pero deficientes en FBN y en competitividad, otras que son eficientes en FBN y competitividad como CA61N y SA37S, pero que presentaron baja tolerancia a glifosato y el resto de cepas que tienen comportamientos intermedios. Por lo tanto, nuevamente observamos una heterogeneidad en las estrategias que podrían estar utilizando para persistir en el suelo. En tal sentido es claro que se deben seguir realizando estudios sobre las características de las cepas aloctonas, pero dirigidos a las posibles adaptaciones que pueden conferirles una mejor persistencia en el suelo, dado que parecería que la capacidad intrínseca de competir para la nodulación no tendría un rol determinante y que, al menos entre los bradirrizobios, la alta capacidad para la FBN no parece haber sufrido una alta tasa de deriva génica tal como se suele creer.

En la segunda parte de esta Tesis, hemos abordado la problemática de cómo modificar la desfavorable posición de los bradirrizobios del biofertilizante al iniciar la infección de raíces. Por ello, hemos planteado la necesidad de entender mejor cómo es el proceso mediante el cual los (bradi)rizobios se encuentran con las raíces infectables. En tal sentido, hipotetizamos tres opciones, la primera de ellas hace referencia al desplazamiento de las raíces a medida que van creciendo, con lo cual podrían ir encontrando a su paso colonias de (bradi)rizobios sésiles, la segunda se relaciona con la movilidad de los (bradi)rizobios en el suelo y la tercera como una combinación de ambas. Por lo tanto, hemos abordado el estudio de los distintos tipos de movilidad que podría poseer *B. japonicum* y cómo estos condicionarían su distribución en el suelo. En este punto, cabe destacar que la mayoría de los estudios que hacen referencia a que los rizobios nadan en el suelo hacia las raíces fueron realizados en medios líquidos, medios agarizados o medios porosos saturados de agua (Caetano-Anollés et al. 1988, Barbour et al. 1991, Lowther & Patrick 1993, Gonza & Marketon 2003) mientras que otros estudios realizados en medios porosos insaturados no le adjudican un rol importante ni a la natación ni a la quimiotaxis (Madsen & Alexander, 1982, Liu et al. 1989, McDermott & Graham 1989, López- García et al. 2002, Horiuchi 2005, Althabegoiti et al. 2008, 2011). Por lo tanto, nos planteamos poner de manifiesto y describir el *swarming* en *B. japonicum*. Teniendo en cuenta la estructura del suelo y de forma análoga a lo observado en otras especies de bacterias patógenas (Jarrell & McBride 2008, Harshey 2003, Kearns 2011, Partridge & Harshey 2013), el *swarming* podría ser el movimiento que realicen los (bradi)rizobios para colonizar nuevas superficies en este ambiente. Este objetivo trajo aparejada la puesta a punto de las condiciones para poder observar este desplazamiento en nuestro bradirrizobio, dado que al momento de comenzar, el *swarming* se había demostrado solo en unos pocos rizobios (Soto et al. 2002, Braeken et al. 2008, Nogales et al. 2010, Nogales et al. 2012). Además, *B. japonicum* es taxonómicamente bastante lejano a estas especies de rizobios y posee dos sistemas flagelares independientes, uno subpolar y constitutivo y el otro, lateral e inducible por la fuente de C del medio. Este hecho también diferencia a *B. japonicum* del resto de las

bacterias de flagelación mixta, en donde se ha observado que la expresión diferencial del flagelo lateral está relacionada con el aumento de la viscosidad en el medio. Al lograr caracterizar el *swarming* en *B. japonicum* USDA 110 mediante la utilización de mutantes en cada uno o en ambos flagelos, como así también utilizando distintas fuentes de C, pudimos observar que *B. japonicum* necesitó ambos flagelos para realizar el *swarming*, siendo el flagelo lateral el más requerido, de acuerdo a lo observado en *Rhodospirillum* (Mc Clain et al. 2002) pero contrariamente a otras bacterias con flagelación mixta, donde el flagelo peritróico o lateral es el encargado de realizar el *swarming* (Mc Clain et al. 2002, Kirov 2003, Stewart & McCarter 2003, Mc Carter 2005, Merino et al. 2006). Sin embargo, observamos que las condiciones necesarias para poner en evidencia al *swarming* en el laboratorio eran demasiado restrictivas. Estos resultados, analizados en conjunto, nos llevaron a plantearnos nuevas preguntas: si en condiciones de capacidad de campo la movilidad parecería no tener un rol en la competición para la nodulación (Althabegoiti et al. 2011) ¿Los rizobios se mueven en el ambiente edáfico? y si lo hacen ¿Qué realizan *swarming* o natación? ¿Para qué les sirve? Dadas las condiciones restrictivas para visualizar el *swarming* en el laboratorio ¿Es esperable que ocurra en el suelo? Todas estas preguntas nos llevaron a tratar de ver qué desplazamiento podrían realizar estos bradirizobios en un suelo estéril en placas de cultivo como una aproximación a lo que podría observarse en los suelos naturales. Observamos que aquel mutante que no posee flagelos fue incapaz de moverse y que el mutante que posee un solo flagelo fue capaz de desplazarse en una tasa similar a su parental, lo que nos indicó por un lado que en el suelo no hubo movimientos propulsados por aparatos diferentes a los flagelos y por otro, que el tipo de movilidad predominante en este ambiente es la natación.

Siendo que *B. japonicum* puede nadar con un solo flagelo, ya sea el subpolar o el lateral, y la natación parece ser el único movimiento relevante en su ambiente natural, ¿Por qué posee dos sistemas de flagelos? es más ¿Por qué conserva un flagelo subpolar de expresión constitutiva, si éste no es necesario para la natación y aporta muy poco al *swarming*?

Claramente, con los resultados que obtuvimos a lo largo de este trabajo no logramos contestar esas preguntas. Aunque si tenemos en cuenta la estructura del suelo, en el mismo vamos a encontrar canales de distinto tamaño, desde macroporos a canales capilares en donde la retención del agua va a depender del grado de saturación del suelo. Por ejemplo, luego de una lluvia o riego el suelo está saturado de agua y tanto los macroporos como los canales capilares poseen agua. En esta situación se favorecería la natación; sin embargo, no esperaríamos que las bacterias naden grandes distancias, ya que estos canales difícilmente sean continuos. Por otro lado, a medida que el agua gravitacional va drenando y se va alcanzando la capacidad de campo, los macroporos se empiezan a llenar de aire y solo quedan canales más o menos continuos de agua en los poros capilares. Si bien aún los (bradi)rizobios pueden nadar, el camino es mucho más tortuoso y ello podría requerir al flagelo lateral, ya que se ha observado que éste promueve cambios de dirección más frecuentes y pronunciados en el desplazamiento de los bradirizobios (Althabegoiti et al. 2001).

Además se ha descripto que en bacterias de flagelación mixta el flagelo lateral se induce en medios viscosos. Para ello, el flagelo subpolar funciona como una especie de sensor de la viscosidad del medio e induce, vía el sistema de quimiotaxis, la expresión del flagelo lateral, el cual funcionaría de manera más eficiente en este tipo de superficies

(Atsumi et al. 1996, Jiang et al. 1998). De acuerdo con ello, los mutantes de *B. japonicum* carentes de flagelo lateral son incapaces de moverse en placas de natación suplementadas con polivinilpirrolidona 7 %, la cual aumenta la viscosidad del medio (Althabegoiti, com. pers.). Con estos resultados podríamos suponer que *B. japonicum* podría utilizar de forma preferencial uno u otro flagelo según la viscosidad. En tal sentido el mucigel que rodea las raíces podría requerir la expresión del flagelo lateral para que los bradirrizobios se desplacen por él.

En *Azospirillum* se ha propuesto que el flagelo subpolar, además de sensar el aumento de viscosidad y favorecer la expresión del flagelo lateral en un sistema de regulación aun no muy bien conocido, también favorece la adhesión de esta bacteria a las raíces (Burdman et al. 2000). En *B. japonicum*, nosotros hemos observado que los mutantes que solo expresan el flagelo subpolar son capaces de competir con mayor eficiencia que su parental en condiciones de capacidad de campo (Althabegoiti et al. 2011) por lo cual podríamos preguntarnos si este flagelo no cumplirá un rol similar al observado en *Azospirillum*. Es decir, si bien la movilidad no favorecería a la competición para la nodulación, permitiría que los rizobios persistan en el suelo y/o comiencen de manera más eficiente el proceso de nodulación.

Teniendo en cuenta estos tres puntos, podríamos hipotetizar el rol del *swarming* y la natación en el medio edáfico. Si tenemos en cuenta la capacidad de los rizobios para formar biopelículas que le van a permitir subsistir en un medio cuando las condiciones son desfavorables, también debemos tener en cuenta un antes y un después de la formación de la biopelícula. En tal sentido, al llegar a un estado de máxima maduración en la biopelícula, las bacterias contenidas en dicha película comienzan a diferenciarse y a expresar sus flagelos. Una vez ocurrido esto son capaces de salir en busca de un nuevo sitio para colonizar si es que las condiciones son favorables para la natación. La forma que tendrían de desplazarse al salir de una biopelícula sería nadando pequeñas distancias por medio de los canales capilares o arrastradas por el agua de una inundación o alcanzadas por una raíz en crecimiento, aunque estas dos últimas podrían suceder sin la necesidad de que la biopelícula haya madurado. Independientemente de la forma en que salgan de las biopelículas, si las condiciones siguen siendo favorables o si alguna raíz en desplazamiento alcanza a los rizobios, éstos podrán colonizar nuevas superficies dentro de la misma raíz mediante el *swarming*. De hecho, algunos autores proponen que existe una relación inversa entre el *swarming* y la formación de biopelículas, es decir que ante condiciones adversas la bacteria decide si trata de desplazarse para colonizar una nueva superficie mediante el desplazamiento con *swarming* o realiza una nueva biopelícula (Caiazza et al. 2007). En tal sentido la bacteria podría estar censando el aumento de viscosidad debido a la presencia de mucílago, o las distintas fuentes de C cerca de la rizósfera, en ambos casos promoviendo que se exprese el flagelo lateral y favoreciendo el *swarming*. A su vez, el flagelo subpolar podría tener un rol en la adhesión a las raíces al igual que en *Azospirillum*. De esta manera, tanto la natación como el *swarming* estarían relacionados con la persistencia de los rizobios en el suelo pero no necesariamente con el acercamiento direccionado hacia las raíces como paso previo a la infección, tal como hemos observado.

En conclusión, al querer contribuir al conocimiento del fenómeno de la competición para la nodulación, hemos observado que la adaptabilidad de los (bradi)rizobios a las condiciones edáficas estaría jugando un rol determinante a la hora de favorecer la persistencia de cada cepa, y tal vez por ello observamos una baja

representatividad de la cepa E109. Además, hemos puesto en evidencia, en esta Tesis y en trabajos previos (Althabegoiti et al. 2011), que la movilidad en el suelo es predominantemente natación pero que no tendría un mayor rol en la competición para la nodulación cuando el suelo está a capacidad de campo. Tomados en conjunto, estos resultados indican que la dispersión de los rizobios en el suelo y su supervivencia en condiciones probablemente sésiles son factores clave para la competitividad para nodular, sugiriendo que debe ponerse más énfasis en desarrollar métodos de biofertilización que aseguren o favorezcan dicha dispersión.

Es necesario seguir estudiando la problemática de la competición para la nodulación de forma más dirigida a las condiciones del suelo, como así también a la movilidad en sistemas edáficos, que permitan comprobar nuestra hipótesis, la cual señala que el rol principal de la movilidad no estaría relacionado con la nodulación sino con favorecer la persistencia de los (bradi)rizobios en el medio edáfico. De este modo, se podría dirigir la selección de nuevas cepas para los biofertilizantes en base a su adaptación a nuestros suelos, la tasa de FBN y su movilidad para lograr una eficiente dispersión y persistencia en los suelos. Para estos procesos de selección podría no solo partirse de las cepas ya conocidas, sino también aprovecharse la potencialidad de las poblaciones alóctonas de bradirrizobios presentes en nuestros suelos.

*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.

APENDICE

Apéndice A.**Resolución de SENASA sobre los inoculantes.**

Resolución N° 310/1994.

“Art. 8°- Los fertilizantes biológicos deberán cumplir con las siguientes especificaciones del marbete: ser efectivos para la/s especie/s vegetal/es que se consigne/n, proveyendo al vencimiento la cantidad de microorganismos viables necesarios para obtener una acción efectiva. Deben contener no menos de 10^9 rizobios por g o ml a la fecha de elaboración y no menos de 10^8 por g o ml a la fecha de vencimiento. En el caso de los inoculantes para soja éstos deben proveer el equivalente a no menos de 80.000 bacterias viables específicas por semilla.”

“Art 12°-Para semillas preinoculadas, se exigirá al vencimiento la cantidad de microorganismos viables, conforme a lo enunciado en el artículo 8°, el certificado del Instituto Nacional de Semillas, indicando variedad y calidad de semilla y muestras de las mismas. En el marbete deben figurar el inoculante aprobado, número de lote y fecha de vencimiento. En caso que la semilla sea preinoculada con un producto no aprobado, se deberán realizar ensayos de eficacia a campo durante tres (3) años, fiscalizados por el Instituto Argentino de Sanidad y Calidad Vegetal, como así también se verificará su período de vencimiento. En caso de productos importados, se deberá dar intervención al Instituto Argentino de Sanidad y Calidad Vegetal, previo despacho a plaza de cada partida como lo indica el artículo 2° del Decreto N° 4830/73, Reglamentario de la Ley N° 20466.”

Apéndice B.**Tabla 1. Caracterización del crecimiento de la colección de rizobios en medio YEMagar suplementado con distintos colorantes y a distintas temperaturas.**

Nombre	Color de la colonia en YEM agar Rojo de congo	Reaccion en YEM agar azul de bromotimol	Crecimiento a 28 °C	Crecimiento a 37 °C
CA06N	Trans lucida	G	si	si
CA06S	Trans lucida	G	si	si
CA120S	Trans lucida	G	si	si
CA12S	Trans lucida	G	si	si
CA149S	Trans lucida	G	si	si
CA14S	Trans lucida	G	si	si
CA158N	Ros ada	Y	si	si
CA15N	Trans lucida	G	si	si
CA19S	Trans lucida	G	si	si
CA20N	Trans lucida	G	si	si
CA21S	Trans lucida	G	si	si
CA24S	Trans lucida	G	si	si
CA31N	Trans lucida	G	si	si
CA32N	Blanca/opaca	B	si	si
CA34S	Blanca/opaca	B	si	si
CA37N	Trans lucida	G	si	si
CA61N	Blanca/opaca	B	si	si
CA69S	Ros ada	Y	si	si
CA73N	Trans lucida	G	si	si
CA84N	Trans lucida	G	si	si
CU04N	Ros ada	Y	si	si
CU05N	Blanca/Trans lucida	B	si	si
CU07N	Trans lucida	G	si	si
CU08N	Trans lucida	G	si	si
CU19S	Trans lucida	G	si	si
CU22S	Ros ada	Y	si	si
CU23S	Ros ada	Y	si	si
CU27S	Blanca/opaca	B	si	si
CU31S	Ros ada	Y	si	si
CU33N	Ros ada/ Trans lucida	Y	si	si
CU37N	Ros ada	Y	si	si
CU42S	Ros ada	Y	si	si
CU43S	Ros ada	Y	si	si
CU44N	Blanca/opaca	B	si	si
CU48S	Ros ada	Y	si	si
CU52N	Ros ada	Y	si	si
CU53S	Ros ada	Y	si	si
CU61N	Ros ada	Y	si	si
CU62N	Ros ada	Y	si	si
CU70N	Ros ada	Y	si	si

Tabla 1. Continuación.

Abreviaturas: B, blue se corresponde a un viraje de pH alcalino; Y, yellow implica el viraje hacia un pH ácido y G, green y se corresponde a un pH neutro del medio de cultivo.

Nombre	Color de la colonia en YEM agar Rojo de congo	Reaccion en YEM agar azul de bromotimol	Crecimiento a 28 °C	Crecimiento a 37 °C
NJ 02N	Trans lucida	G	si	si
NJ 12N	Blanca/opaca	B	si	si
NJ 27S	Trans lucida	G	si	si
NJ 28.IN	Ros ada	Y	si	si
NJ 28N	Blanca/opaca	B	si	si
NJ 29S	Ros ada	Y	si	si
NJ 33N	Blanca/opaca	B	si	si
NJ 36N	Trans lucida	G	si	si
NJ 37S	Blanca/opaca	B	si	si
NJ 39S	Trans lucida	G	si	si
NJ 4IS	Ros ada/ Trans lucida	Y	si	si
NJ 59N	Blanca/opaca	B	si	si
NJ 63N	Ros ada	Y	si	si
NJ 67S	Ros ada/ Trans lucida	Y	si	si
NJ 68S	Trans lucida	G	si	si
NJ 72S	Trans lucida	G	si	si
NJ 73S	Blanca/opaca	B	si	si
NJ 79S	Ros ada	Y	si	si
NJ 8IS	Trans lucida	G	si	si
NJ 85S	Trans lucida	G	si	si
SA 07S	Trans lucida	G	si	si
SA 12N	Blanca/opaca	B	si	si
SA 16S	Trans lucida	G	si	si
SA 17S	Blanca/opaca	B	si	si
SA 18S	Blanca/opaca	B	si	si
SA 2IS	Trans lucida	G	si	si
SA 23N	Ros ada	Y	si	si
SA 24S	Trans lucida	G	si	si
SA 24S	Ros ada	Y	si	si
SA 25S	Blanca/opaca	B	si	si
SA 26N	Ros ada	Y	si	si
SA 26S	Trans lucida	G	si	si
SA 28N	Trans lucida	G	si	si
SA 35N	Ros ada	Y	si	si
SA 37S	Blanca/opaca	B	si	si
SA 44N	Trans lucida	G	si	si
SA 44N	Blanca/opaca	B	si	si
SA 45N	Trans lucida	G	si	si
SA 47N	Blanca/opaca	B	si	si
SA 60S	Trans lucida	G	si	si

Tabla 1. Continuación.

Nombre	Color de la colonia en YEM agar Rojo de congo	Reaccion en YEM agar azul de bromotimol	Crecimiento a 28 °C	Crecimiento a 37 °C
VT01S	Trans lucida	G	si	si
VT02S	Ros ada	Y	si	si
VT04S	Blanca/o paca	B	si	si
VT05N	Trans lucida	G	si	si
VT06N	Blanca/o paca	B	si	si
VT09.04N	Ros ada	Y	si	si
VT09S	Ros ada	Y	si	si
VT10S	Ros ada	Y	si	si
VT11N	Blanca/o paca	B	si	si
VT12N	Trans lucida	G	si	si
VT16S	Blanca/o paca	B	si	si
VT18S	Trans lucida	G	si	si
VT27S	Ros ada	Y	si	si
VT29S	Trans lucida	G	si	si
VT30S	Ros ada	Y	si	si
VT32S	Blanca/o paca	B	si	si
VT38S	Trans lucida	G	si	si
VT40S	Trans lucida	G	si	si
VT43S	Ros ada	Y	si	si
VT44N	Blanca/o paca	B	si	si

Abreviaturas: B, blue se corresponde a un viraje de pH alcalino; Y, yellow implica el viraje hacia un pH ácido y G, green y se corresponde a un pH neutro del medio de cultivo.

Apéndice C.

Análisis del cladograma en función de el sitio de procedencia y su fenotipo en placa de YEM agar azul de bromotimol.

- ✓ Clado I: 17 aislamientos. 14 CU (82 %), 3 NJ (18 %). 9 S (53 %), 8 N (47 %). 13 Y (76 %), 3 BY (18 %), 1 B (6 %).
- ✓ Clado II: 3 aislamientos. 1 CA (S, BY), E 110 y E 104.
- ✓ Clado III: 6 aislamientos. 3 NJ (50 %), 1 CA (17 %), E 109, USDA 110. 3 N (50 %), 1 S (17 %). 2 Y (33 %), 1 BY (17 %), 1 B (17 %)
- ✓ Clado IV: 1 aislamiento NJ, S, Y.
- ✓ Clado V: 4 aislamientos. 2 NJ (50 %), 2 CU (50 %). 3 N (75 %), 1 S (25 %). 2 B (50 %), 2 BY (50 %).
- ✓ Clado VI: 66 aislamientos.
- ✓ Clado VIA: 9 aislamientos. 5 SA (55 %), 4 NJ (45 %). 3 N (33 %), 6 S (67 %). 1 Y (11 %), 3 B (33 %), 5 BY (56 %).
- ✓ Clado VIB: 54 aislamientos..
- ✓ Clado VIB.1: 29 aislamientos. 17 VT (59 %), 2 CA (7 %), 1 NJ (3 %), 9 SA (31 %). 5 N (17 %), 23 S (79 %). 6 Y (21 %), 11 B (38 %), 12 BY (41 %).
- ✓ Clado VIB.2: 15 aislamientos. 10 CA (67 %), 2 SA (13 %), 2 NJ (13 %), 1 CU (7 %). 11 N (73 %), 4 S (27 %).
- ✓ Clado VIB.3: 10 aislamientos. 7 CA (70 %), 3 VT (30%). 5 N (50 %), 4 S (40 %). 4 Y (40 %), 2 B (20 %), 4 BY (40 %).
- ✓ Clado VIC: 3 aislamientos. 2 SA (67 %), 1 NJ (33 %). 1 N (33 %), 2 S (67 %). 1 B (33 %), 2 BY (67 %).
- ✓ Clado VII: 2 aislamientos. 1 SA, N, Y. 1 CU, S, Y.
- ✓ Clado VIII: 4 aislamientos. 3 NJ (75 %), 1 CU (25 %). 1 N (25 %), 3 S (75 %). 2 Y (50 %), 1 B (25 %), 1 BY (25 %).
- ✓ Clado IX: 1 aislamiento. CU, N, B.

Referencias

Bibliográficas

- Althabegoiti M. J, Covelli J. M, Pérez-Giménez J, Quelas J. I, Mongiardini E. J, López M. F, López-García S. L & Lodeiro AR** (2011) Analysis of the role of the two flagella of *Bradyrhizobium japonicum* in competition for nodulation of soybean. *FEMS microbiology letters* 319: 133–139.
- Althabegoiti M. J., López-García S.L., Piccinetti C., Mongiardini E. J., Pérez-Giménez J., Quelas J. I., Peticari A. & Lodeiro A. R.** (2008) Strain selection for improvement of *Bradyrhizobium japonicum* competitiveness for nodulation of soybean. *FEMS microbiology letters* 282: 115–123.
- Amarger N & Lobreau J.P** (1982) Quantitative Study of Nodulation Competitiveness in Rhizobium Strains. *Appl. Environ. Microbiol* 44: 125-138
- Angelini J, Ibáñez F, Taurian T, Tonelli M.L, Valetti L & Fabra A** (2011) A study on the prevalence of bacteria that occupy nodules within single peanut plants. *Current microbiology* 62: 1752–1759
- Appleby C. A.** (1984) Leghemoglobin and Rhizobium respiration. *Annu Rev Plant Physiol.* 35: 443–478.
- Armitage J** (2006) *Bacterial Behavior*. Dworkin, M, Falkow, S, Rosenberg, E, Schleifer, K-H, & Stackebrandt, E, eds. Springer New York
- Arrese-Igor, C., González, E. M., Marino, D., Ladrera, R., & Larrainzar, E.** (2011). Physiological Responses of Legume Nodules to Drought. *Plant Stress*, 5:24–41.
- Atsumi T, Maekawa Y, Yamada T, Kawagishi I, Imae Y & Homma M** (1996) Effect of viscosity on swimming by the lateral and polar flagella of *Vibrio alginolyticus*. *Journal of bacteriology* 178: 5024–5026.
- Attmannspacher U., Scharf B., Schmitt R.** (2005) Control of speed modulation (chemokinesis) in the unidirectional rotary motor of *Sinorhizobium meliloti* *Molecular Microbiology* 56, 708-718
- Awramik SM, Schopf J & Walter MR** (1983) Filamentous fossil bacteria 3.5 x10⁹ years old from the Archaean Western Australia. *Precambrian. Res.* 20: 357–374.
- Baker MD, Wolanin PM & Stock JB** (2006) Systems biology of bacterial chemotaxis. *Current opinion in microbiology* 9: 187–192.
- Balatti PA** (2007) La diversidad de los rizobios que nodulan soja . De la biología del Suelos a la Agricultura, (Thuar, AM, Cassan, FD, & Olmedo, CA, eds), pp. 53–62.
- Barbour WM, Hattermann DR & Stacey G** (1991) Chemotaxis of *Bradyrhizobium japonicum* to soybean exudates. *Applied and environmental microbiology* 57: 2635–2639..
- Bardy SL** (2003) Prokaryotic motility structures. *Microbiology* 149: 295–304.

- Barton JW & Ford RM** (1995) Determination of effective transport coefficients for bacterial migration in sand columns. *Applied and environmental microbiology* 61: 3329–3335.
- Batista J, Hungria M, Gomes Barcellos F, Cristiani Ferreira M & Carvalho Mendes I** (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: 270–284.
- Becker A & Pühler A** (1998) Production of Exopolysaccharides. *The Rhizobiaceae., (Spaink, Kondorosi, & Hooykaas, eds). Kluwer Academic.*
- Benachour N & Séralini GE** (2009) Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells. *Chem. Res. Toxicol.* 22: 97–105.
- Bhuvaneswari T V., Turgeon BG & Bauer W. D. (1980) Early events in the infection of soybean (*Glycine max* L. Merr.) by *Rhizobium japonicum* I. Localization of infective root cells. *Plant Physiol.* 66: 1027– 1031.
- Boddey LH & Hungria MA** (1994) Clasificación de estirpes de *B. japonicum* en genotipo I y II basadas en características fenotípicas y genotípicas. Simposio Brasileiro sobre microbiología de suelos. Londrina, Brasil.
- Bohn H, McNeal B & O'Connor G** (2001) *Soil Chemistry.* Sons, W&, ed. New York.
- Bolaños, L, M Redondo Nieto, R Rivilla NB & Bonilla. I** (2004) Cell surface interactions of *Rhizobium* bacteroids and other bacterial strains with symbiosomal and peribacteroid membrane components from pea nodules. *Mol Plant Microbe Interact.* 17(2): 216–223.
- Boogerd F. . & Van Rossum D** (1997) Nodulation of groundnut by *Bradyrhizobium*: a simple infection process by crack entry. *FEMS Microbiol Rev.* 21: 5–27.
- Boonkerd, N., D. F. Weber, and D. F. Bezdicek. (1978). Influence of *Rhizobium japonicum* strains and inoculation methods on soybean grown in rhizobia-populated soils. *Agron. J.* 70:547-549.
- Braeken K, Daniels R, Vos K, Fauvart M, Bachaspatimayum D, Vanderleyden J & Michiels J** (2008) Genetic determinants of swarming in *Rhizobium etli*. *Microbial ecology* 55: 54–64.
- Braeken K, Daniels R, Vos K, Fauvart M, Bachaspatimayum D, Vanderleyden J & Michiels J** (2008) Genetic determinants of swarming in *Rhizobium etli*. *Microbial ecology* 55: 54–64.
- Brechenmacher L et al.** (2008) Transcription profiling of soybean nodulation by *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol Plant Microbe Interact.* 21(5): 631–45.

- Brencic A & Winans S** (2005) Detection of and Response to Signals Involved in Host-Microbe Interactions by Plant-Associated Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 69: 155–194.
- Brito B, Baginsky C, Palacios JM, Cabrera E, Ruiz-Argüeso T & Imperial J** (2005) Biodiversity of uptake hydrogenase systems from legume endosymbiotic bacteria. *Biochemical Society transactions* 33: 33–35.
- Broughton JW, Jabbour S & Perret X** (2000) MINIREVIEW Keys to Symbiotic Harmony. *Journal of bacteriology* 182: 5641–5652.
- Buendia Claveria A, Rodriguez Navarro, D.N. Santamaría Linaza C, Ruiz Sainz JE & Temprano Vera F** (1994) Evaluation of the symbiotic properties of *Rhizobium fredii* European soils. *Syst Appl Microbiol.* 17,: 155–160. 319 320.
- Burdman S, Okon Y & Jurkevitch E** (2000) Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant roots. *Critical reviews in microbiology* 26: 91–110.
- Burkart M, Toguchi a & Harshey R M** (1998) The chemotaxis system, but not chemotaxis, is essential for swarming motility in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 2568–2573..
- Butler M, Wang Q & Harshey R** (2010) Cell density and mobility protect swarming bacteria against antibiotics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 3776–3781.
- Caetano Mellor P, Ames P & Bergman K** (1981) Competitive advantage provided by bacterial motility in the formation of nodules by *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol.* , 148: 728–729.
- Caetano-Anollés G, Wall LG, De Micheli a T, Macchi EM, Bauer WD & Favelukes G** (1988) Role of Motility and Chemotaxis in Efficiency of Nodulation by *Rhizobium meliloti*. *Plant physiology* 86: 1228–1235.
- Caetano-Anollés G & Gresshoff PM** (1991) Alfalfa Controls Nodulation during the Onset of *Rhizobium*-induced Cortical Cell Division. *Plant physiology* 95: 366–373.
- Caiazza NC, Merritt JH, Brothers KM & O'Toole G a** (2007) Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Journal of bacteriology* 189: 3603–3612.).
- Cámara Civil y Comercial de Santa Fe, Sala 2ª**, (2009) Sentencia sobre el caso Peralta-San Jorge. Resol. N° 331 Folio 220 Libro 10).
- Chen LS, Figueredo A, Pedrosa FO & Hungria MA** (2000) Genetic characterization of soybean rhizobia in Paraguay. *Applied and environmental microbiology* 66: 5099–5103.

- Cooper J E** (2007) Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *Journal of applied microbiology* 103: 1355–1365.
- Croes C, Moens S, Bastelare J, Vanderlayen J & Michael J** (1993) The polar flagellum mediates *Azospidium brasifense* adsorption to wheat roots. *Journal of General Microbiology*.
- Daniels R, Vanderleyden J & Michiels J** (2004) Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 28: 261–289.
- Daniels R** (2006) Quorum signal molecules as biosurfactants affecting swarming in *Rhizobium etli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 14965–14970.
- Davis, L. C.** (1984). Diffusion of Gases through Plant Tissues ². *Plant Physiol*, 76, 854–857
- Dazzo FB & Hubbell DH** (1975) Cross-reactive antigens and lectin as determinants of symbiotic specificity in the *Rhizobium*-clover association. *Appl Microbiol.* 30(6): 1017–1033.
- Dingding, A., Danhorn, T. & Parsek, M. R.** (2006). Quorum sensing and motility mediate interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens* in biofilm cocultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(10), 3828–33. doi:10.1073/pnas.0511323103
- Dowling DN & Broughton JW** (1986) Competition for nodulation of legumes. *Annual review of microbiology* 40: 131–157.
- Downie J** (2005) Legume haemoglobins: symbiotic nitrogen fixation needs bloody nodules. *Curr Biol.* 15(6): 196–198.
- Estrella MJ, Muñoz S, Soto MJ, Ruiz O & Sanjuán J** (2009) Genetic diversity and host range of rhizobia nodulating *Lotus tenuis* in typical soils of the Salado River Basin (Argentina). *Applied and environmental microbiology* 75: 1088–1098.
- Fabra A, Taurian T & Angelini J** (2007) Los Rizobios: Taxonomía, Actividad Promotora del Crecimiento Vegetal y Mecanismos de infección en leguminosas. *De la biología del Suelos a la Agricultura*, (Thuar, A, Cassan, F, & Olmedo, C, eds), pp. 81– 93.
- Fraser GM & Hughes C** (1999) Swarming motility. *Current opinion in microbiology* 2: 630–635.
- Frayssé N, Coudérc F & Poinot V** (2003) Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. *Eur J Biochem.* 270: 1365–1380.
- Fujishige NA, Kapadia NN, De Hoff PL & AM. H** (2006) Investigations of *Rhizobium* biofilm formation. *FEMS Microbiology Ecology* 56: 195–206.

- Fujishige N, Lum M, De Hoff P, Whitelegge J, Faull K & Hirsch A** (2008) Rhizobium common nod genes are required for biofilm formation. *Molecular microbiology* 67: 504–515.
- Gage DJ** (2004) Infection and Invasion of Roots by Symbiotic , Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes. 68: 280–300.
- Gibson, A. H., B. L. Curnow, F. J. Bergersen, J. Brockwell, and A. C. Robinson.** (1975). Studies of field populations of Rhizobium: effectiveness of strains of Rhizobium trifolii associated with Trifolium subterraneum L. pastures in south-eastern Australia. *Soil Biol. Biochem.* 7:95-102.
- Gibson A & Harper J.** (1985) Nitrate effect on nodulation of soybean by Bradyrhizobium japonicum. *Crop Sci.* 25: 497–501.
- Gomes Barcellos F, Gomes Stefa J, Batista S & Hungria M** (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: 2635–2643.
- Gonza JE & Marketon MM** (2003) Quorum Sensing in Nitrogen-Fixing Rhizobia. 67: 574–592.
- González N, Gómez MA, Beauclair P, Catroux G & Hartmann Y** (2000) Diversidad de bacterias del género bradyrhizobium utilizadas en los suelos del cinturón sojero argentino. XVII Congreso argentino de la ciencia del suelo, (Cd, E, ed), pp. 11–14. Mar del Plata.
- González N** (2007) Fijación de nitrógeno en soja inoculantes: situación actual y perspectivas en la Argentina. De la biología del Suelos a la Agricultura, (Thuar, A, Cassan, F, & Olmedo, C, eds), pp. 161– 173. Río Cuarto.
- Götz R, Limmer N, Ober K & Schmitt R** (1982) Motility and chemotaxis in two strains of Rhizobium with complex flagella. *J Gen Microbiol* 128: 789– 798.
- Grageda-Cabrera OA, Vera-Núñez JA, Castellanos JZ & Peña-Cabriales J.** (2003) Use of Different Indicators for Measuring N₂ Fixation in Common Bean under Field Conditions. *TERRA Latinoamericana* 21: 65–71..
- Grange L & Hungria M** (2004) Genetic diversity of indigenous common bean (Phaseolus vulgaris) rhizobia in two Brazilian ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry* 36: 1389–1398.
- Gulash M, Ames P, Larosiliere RC & Bergman K** (1984) Rhizobia are attracted to localized sites on legume roots. *Applied and environmental microbiology* 48: 149–152.
- Gutell RR, Weiser B, Woese CR & Noller. HF** (1984) Comparative anatomy of 16S-like ribosomal RNA. *Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 32: 55–216.

- Gyorgyey J, Vaubert D, Jimenez-Zurdo JI, Charon C, Troussard L, Kondorosi A & Kondorosi. E** (2000) Analysis of *Medicago truncatula* nodule expressed sequence tags. *Mol Plant Microbe Interact.* 13: 62–71.
- Halbleib CM & Ludden PW** (2000) Recent Advances in Nutritional Sciences. 1081–1084.
- Hardy RWF, Holsten RD, Jackson EK, Burns RC** (1968) The acetylene—ethylene assay for N₂ Fixation: Laboratory and field evaluation. *Plant Physiol* 43:1185–1207.
- Harshey R. M.** (2003) Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annual review of microbiology* 57: 249–273. .
- Henrichsen J** (1972) Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriological reviews* 36: 478–503.
- Ho S-C, Wang JL & Schindler M** (1990) Carbohydrate binding activities of *Bradyrhizobium japonicum*. II. Isolation and characterization of a galactose-specific lectin. *J. Cell. Biol.* 111: 1639–1643.
- Hoang HH, Gurich N & González Juan E** (2008) Regulation of motility by the ExpR/Sin quorum-sensing system in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of bacteriology* 190: 861–871.
- Horiuchi, J., Prithviraj, B., Bais, H.P., Kimball, B.A. & Vivanco, J.M.** (2005) Soil nematodes mediate positive interactions between legume plants and rhizobium bacteria. *Planta* Vol. 222 pp. 848-857.
- Hungria M, Chueire LM, Megías M, Lamrabet Y, Probanza A, Gutierrez-Mañero FJ & Campo RJ** (2006) Genetic diversity of indigenous tropical fast-growing rhizobia isolated from soybean nodules. *Plant and Soil* 288: 343–356.
- Hunt S & Layzell DB** (1993) Gas exchange of legume nodules and the regulation of nitrogenase activity. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology*, 44: 483–511.
- Jaccard P** (1912) The distribution of flora in the alpine zone. *New Phytol* 11: 37–50.
- Jarrell KF & McBride MJ** (2008) The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. 6. *Nature Reviews*.
- Jiang ZY, Rushing B G, Bai Y, Gest H & Bauer CE** (1998) Isolation of *Rhodospirillum centenum* mutants defective in phototactic colony motility by transposon mutagenesis. *Journal of bacteriology* 180: 1248–1255.
- Jimenez-sanchez, C., Wick, L. Y., & Ortega-calvo, J.** (2012). Chemical Effectors Cause Different Motile Behavior and Deposition of Bacteria in Porous Media. *Environmental science & technology*, 46, 6790–6797..

- Johnson, H. W., U. M. Means, and C. R. Weber.** (1965). Competition for nodule sites between strains of *Rhizobium japonicum*. *Agron. J.* 57:179-185.
- Jones KM, Kobayashi H, Davies BW, Taga ME & Walker GC** (2007) How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nature reviews. Microbiology* 5: 619–633.
- Jordan D** (1984) The Rhizobiaceae. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, (J.G. Holt y N.R. Kreig, Willians y Wilkins, L pp, ed), p. . 24–43. Willians y Wilkins, London.
- Kaiser D** (2007) Bacterial swarming: a re-examination of cell-movement patterns. *Current biology* : CB 17: R561–70.
- Kanbe M, Yagasaki J, Zehner S, Göttfert M & Aizawa SI** (2007) Characterization of two sets of subpolar flagella in *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal of bacteriology* 189: 1083–1089.
- Kaneko T et al.** (2002) Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Res* 9: 189–197.
- Kaschuk G, Hungria M, Andrade D & Campo R** (2006) Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. *Appl Soil Ecol* 32: 210–220.
- Kearns DB & Losick R** (2003) Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. 49: 581–590.
- Kearns DB** (2011) A field guide to bacterial swarming motility. *Nature reviews. Microbiology* 8: 634–644.
- Kentner D & Sourjik V** (2006) Spatial organization of the bacterial chemotaxis system. *Current opinion in microbiology* 9: 619–624.
- Keyser HH & Munns D N** (1978) Tolerance of Rhizobia to Acidity , Aluminum.
- Keyser HH, Bohlool BB, Hu TS & Weber DF** (1982) Fast-growing rhizobia isolated from root nodules of soybean. *Science* 215: 1631–1632.
- Kiers ET, Rousseau R a, West S a & Denison RF** (2003) Host sanctions and the legume-rhizobium mutualism. *Nature* 425: 78–81.
- Kirov SM** (2003) Bacteria that express lateral flagella enable dissection of the multifunctional roles of flagella in pathogenesis. *FEMS Microbiology Letters* 224: 151–159. [http://doi.wiley.com/10.1016/S0378-1097\(03\)00445-2](http://doi.wiley.com/10.1016/S0378-1097(03)00445-2).
- Köhler T, Curty LK, Barja F, Van Delden C & Pechère JC** (2000) Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *Journal of bacteriology* 182: 5990–5996.

- Kondorosi, A., & Schultze, M.** (1998). REGULATION OF SYMBIOTIC ROOT NODULE DEVELOPMENT. *Annu. Rev. Genet.* 32, 33–57.
- Kundu S, 3rd Trent JT & Hargrove MS** (2003) Plants, humans and hemoglobins. *Trends. Plant. Sci.* 8: 387–393.
- Kurdish IK** (2002) The chemotactic response of *Bradyrhizobium japonicum* to various organic compounds. *Microbiology (Russia)* 71: 391–396.
- Kuykendall LD, Saxena B, Devine TE & Udell SE.** (1992) Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Can J Microbiol.* 38: 501–505.
- Laguerre G, Allard MR, Revoy F & Amarger N** (1994) Rapid Identification of Rhizobia by Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified 16S rRNA Genes. *Applied and environmental microbiology* 60: 56–63.
- Larrainzar E, Wienkoop S, Scherling C, Kempa S, Ladrera R, Arrese-Igor C, Weckwerth W & González EM** (2009) Carbon metabolism and bacteroid functioning are involved in the regulation of nitrogen fixation in *Medicago truncatula* under drought and recovery. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI* 22: 1565–1576.
- Lison L** (1976) Estadística aplicada a la biología experimental. Eudeba Manuales, Buenos Aires.
- Liu C-M, McLean P a, Sookdeo CC & Cannon FC** (1991) Degradation of the Herbicide Glyphosate by Members of the Family Rhizobiaceae. *Applied and environmental microbiology* 57: 1799–1804.
- Liu J & Ford RM** (2009) Idling time of swimming bacteria near particulate surfaces contributes to apparent adsorption coefficients at the macroscopic scale under static conditions. *Environmental science & technology* 43: 8874–8880.
- Liu, R., Tran, V.M. & Schmidt, E.L.** (1989) Nodulating competitiveness of a nonmotile Tn7 mutant of *Bradyrhizobium japonicum* in nonsterile soil. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 55 pp. 1895-1900.
- Liu R & Ochman H** (2007) Origins of flagellar gene operons and secondary flagellar systems. *Journal of bacteriology* 189: 7098–7104.
- Lloret, L., & Martínez-Romero, E.** (2005). Evolución y filogenia de *Rhizobium*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 47, 43–60.
- Lodeiro A. R., Lagares A, Martinez EN & Favelukes G** (1995) Early Interactions of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* and Bean Roots: Specificity in the Process of Adsorption and Its Requirement of Ca(sup2+) and Mg(sup2+) Ions. *Applied and environmental microbiology* 61: 1571–1579.
- Lodeiro A. R. & Favelukes G** (1999) Early interactions of *bradyrhizobium japonicum* and soybean roots: specificity in the process of adsorption. 31: 1405–1411.

- Lodeiro A. R., Lopez-Garcia SL, Vazquez T & Favelukes G** (2000) Stimulation of adhesiveness, infectivity, and competitiveness for nodulation of bradyrhizobium japonicum by its pretreatment with soybean seed lectin". FEMS microbiology letters 191: 157–158.
- Lodeiro A.R., López García S.L., Altabegoiti MJ, Mongiardini E.J., Pérez-Giménez J. & Quelas J.I.** (2004) Parasitic traits and plant defenses in the rhizobia-legume symbiosis. Recent Research Developments in Plant Pathology 3.: 125–166.
- López-García S. L., Vázquez T. E, Favelukes G & Lodeiro A. R.** (2001) Improved Soybean Root Association of N-Starved Bradyrhizobium japonicum Improved Soybean Root Association of N-Starved Bradyrhizobium japonicum. Journal of bacteriology 183: 7241–7252.
- López-García S. L., Vázquez T. E., Favelukes G & Lodeiro A. R.** (2002) Rhizobial position as a main determinant in the problem of competition for nodulation in soybean. Environmental microbiology 4: 216–224.
- López-García SL et al.** (2009) In-Furrow Inoculation and Selection for Higher Motility Enhances the Efficacy of Nodulation. Agronomy Journal 101: 357.
- Loureiro M, Kaschuk G, Alberton O & Hungria M** (2006) Soybean [Glycine max (L.) Merrill] rhizobial diversity in Brazilian oxisols under various soil, cropping, and inoculation managements. Biology and Fertility of Soils 43(6): 665–674.
- Lowther WL & Patrick HN** (1993) Spread of Rhizobium and Bradyrhizobium in soil. Soil Biology and Biochemistry Vol. 25: 607–612
- Madsen, E.L. & Alexander, M.** (1982) Transport of Rhizobium and Pseudomonas through soil. Soil Science Society of America Journal Vol. 46 pp. 557-560
- Maier RJ & Triplett EW** (1996) Toward more productive, efficient, and competitive nitrogen-fixing symbiotic bacteria. Critical Reviews in Plant Sciences 15: 191–234.
- Maillet F, Debelle F & Denarie J** (1990) Role of the nodD and syrM genes in the activation of the regulatory gene nodD3 and of the common and host-specific nod genes of Rhizobium meliloti. Mol. Microbiol. 4: :1975–1984.
- Martínez G, Cía D** (2002) Apuntes acerca de la historia de la soja en la Argentina .Fac. Cs. Economicas- UBA
- Masatoshi N & Sudhir K** (2000) Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York.
- Masson-Boivin C, Giraud E, Perret Xavier & Batut J** (2009) Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? Trends in microbiology 17:

- McCarter LL** (2001) Polar flagellar motility of the Vibrionaceae. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65: 445–462, table of contents. <http://mmb.asm.org/cgi/content/abstract/65/3/445>.
- McCarter LL** (2004) Dual Flagellar Systems Enable Motility under Different Circumstances. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 52246: 18–29.
- Mc Carter LL** (2005) Multiple Modes of Motility: a Second Flagellar System in *Escherichia coli*. 187: 1207–1209.
- McCarter LL** (2006) Regulation of flagella. *Current opinion in microbiology* 9: 180–186.
- McDermott TR & Graham PH** (1989) Bradyrhizobium japonicum Inoculant Mobility, Nodule Occupancy, and Acetylene Reduction in the Soybean Root System. *Applied and environmental microbiology* 55: 2493–2498.
- McNeil D & Larue T** (1984) Effect of nitrogen source on ureides in soybean. *Plant Physiology* 74: 227–232.
- Melchiorre M, Luca MJ, Gonzalez Anta G, Suarez P, Lopez C, Lascano R & Racca R** (2010) Evaluation of bradyrhizobia strains isolated from field-grown soybean plants in Argentina as improved inoculants. *Biology and Fertility of Soils* 47: 81–89.
- Menna P, Hungria M., Gomes Barcellos F, Bangel E, Hess P & Martínez-Romero E** (2006) Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. *Systematic and applied microbiology* 29: 315–332.
- Mergaert P, Montagnu M & Holsters M** (1997) MicroReview Molecular mechanisms of Nod factor diversity. *Molecular microbiology* 25: 811–817.
- Merino S, Shaw JG & Tomás JM** (2006) Bacterial lateral flagella: an inducible flagella system. *FEMS microbiology letters* 263: 127–135.
- Merino S. & Tomas J (2009) Lateral Flagella systems. Pili and Flagella**, (Jarrell, K, ed), pp. 173–190. Norfolk, UK.
- Molero G, Aranjuelo I, Teixidor P, Araus JL & Nogués S** (2011) Measurement of ¹³C and ¹⁵N isotope labeling by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry to study amino acid fluxes in a plant-microbe symbiotic association. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* 25: 599–607.
- Mongiardini E. J., Ausmees, Pérez Giménez, J Althabegoiti J, Quelas J, Lopez-Garcia SL & Lodeiro A. R.** (2008) The rhizobial adhesion protein RapA1 is involved in adsorption of rhizobia to plant roots but not in nodulation. *FEMS Microbiol Ecol.* 65: 279–288.
- Moorman TB, Becerril JM, Lydon J & Duke S** (1992) Production of Hydroxybenzoic Acids by. *J. Agric. Food Chem.* 289–293.

- Nelson L** (2004) Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Prospects for New Inoculants. *Plant management network*. 20: 234–342.
- Niu C, Graves JD, Mokuolu FO, Gilbert SE & Gilbert E** (2005) Enhanced swarming of bacteria on agar plates containing the surfactant Tween 80. *Journal of microbiological methods* 62: 129–132.
- Nogales J, Domínguez-Ferreras A, Amaya-Gómez C V, Van Dillewijn P, Cuéllar V, Sanjuán J, Olivares José & Soto María J** (2010) Transcriptome profiling of a *Sinorhizobium meliloti* fadD mutant reveals the role of rhizobactin 1021 biosynthesis and regulation genes in the control of swarming. *BMC genomics* 11: 157.
- Nogales J, Bernabéu-Roda L, Cuéllar V & Soto María J** (2012) ExpR is not required for swarming but promotes sliding in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of bacteriology* 194: 2027–2035.
- O Chueire L, Hungria M & Postal C** (1997) N₂-fixation ability of Brazilian soybean cultivars with *Sinorhizobium fredii* and *Sinorhizobium xinjiangensis*. *Plant and Soil* 196: 1–5.
- Oke V. y S. R. Long.** (1999). Bacteroid formation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: : 641–6.
- Oldroyd G, Murray J, Poole P & Downie A** (2011) The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annual review of genetics* 45: 119–144. Olsen GJ, Lane DJ, Giovannone SJ, Pace N & Stahl DA (1986) Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu. Rev. Microbiol.* 40: 337–365.
- Paganelli A, Gnazzo V, Acosta H, López SL & Carrasco A** (2010) Glyphosate-based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling. *Chem. Res. Toxicol.* 23.
- Parker CA & Scutt. PB** (1960) The effect of oxygen on nitrogen fixation by *Azotobacter*. *Biochim. Biophys.* 38: 230–238.
- Partridge J. D. & Harshey R.M** (2013) Swarming: Flexible Roaming Plans. *Journal of bacteriology* 195.
- Pastorino GN, Malbrán I, Martínez V, Alcántara, Videira LB, Sarinelli JM & Balatti PA** (2009) *Ensifer fredii* S40 and SMH12 strains and *Bradyrhizobium japonicum* E109 differed in their ability to nodulate soybean. *Appl Soil Ecol.*
- Patriarca E, Taté R, Ferraioli S & Iaccarino M** (2004) Organogenesis of legume root nodules. *Int Rev Cytol.* 234:: 201–62.
- Patrick JE & Kearns DB** (2009) Laboratory strains of *Bacillus subtilis* do not exhibit swarming motility. *Journal of bacteriology* 191: 7129–7133.
- Peoples MB & Craswell ET** (1992) Biological nitrogen fixation: Investments, expectations and actual contributions to agriculture. *Plant Soil* 141: 13–39.

- Pérez-Giménez J, Quelas J.I. & Lodeiro A. R.** (2010) Competition for Nodulation. Soybean Physiology and Biochemistry, Prof. Hany El-Shemy (Ed.), ISBN: 978-953-307-534-1, InTech
- Pérez-Giménez J., Mongiardini E. J., Althabegoiti M. J., Covelli JM, Quelas J. I., López-García S. L. & Lodeiro A.R.** (2009) Soybean Lectin Enhances Biofilm Formation by Bradyrhizobium japonicum in the Absence of Plants. International journal of microbiology 2009: 719367.
- Perez-Gimenez, J., Covelli J, Lopez MF, Althabegoiti M, Navarro F, Mongiardini J & Lodeiro A. R.** (2013) Soybean seed lectin prevents the accumulation of S-adenosyl methionine synthetase and the 30S ribosomal protein S1 in Bradyrhizobium japonicum under C and N starvation. Current microbiology. En prensa.
- Perret X, Staehelin C & Broughton WJ** (2000) Molecular basis of symbiotic promiscuity. Microbiology and molecular biology reviews : MMBR 64: 180–201.
- Perticari , J.C. Pacheco Basurco, G. Benintende** (1994) Interacción entre diferentes inoculantes y temperaturas de almacenamiento sobre semilla preinoculada de soja. Reunión Latinoamericana de Rizobiología- La Habana, Cuba.
- Perticari A., Parra R, Balatti P, Fiqueni M & Rodríguez Caceres E** (1996) Selección de cepas de Bradyrhizobium japonicum, B. elkanii y Sinorhizobium fredii para la inoculación de soja. Memorias de la XVIII Reunión Latinoamericana de Rizobiología., (RELAR, ed), pp. 103–104. Santa Cruz de La Sierra, Bolivia.
- Perticari , J.C. Pacheco Basurco, G. Benintende, Stegman de Gurfinkel B, Servidio DO, Zelarrayán V & León J** (1998) Cepas eficientes para la inoculación de soja en el Noroeste Argentino. Memorias de la XIX Reunión Latinoamericana de Rizobiología., pp. 98 – 100. Venezuela
- Perticari A., Puente M, Echegaray R & Piccinetti C.** (2007) Uso eficiente de los inoculantes y de la fijación biológica de nitrógeno. De la biología del Suelos a la Agricultura, (Thuar, AM, Cassan, f. D, & Olmedo, CA, eds), pp. 277–291. Río Cuarto.
- Pieterneel Rhijin V & Vanderleyden J.** (1995) The Rhizobium-Plant Symbiosis. 59: 124–142.
- Pongsilp N, Triplett EW & Sadowsky Michael J** (2005) Detection of homoserine lactone-like quorum sensing molecules in bradyrhizobium strains. Current microbiology 51: 250–254.
- Popp C & Ott T** (2011) Regulation of signal transduction and bacterial infection during root nodule symbiosis. Current opinion in plant biology 14: 458–467.
- Prell J & Poole P** (2006) Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. Trends in microbiology 14: 161–168.

- Qin Qin L, Wang E, Zhang Y, Tian C, Sui X, Chen WF & Chen WX** (2011) Diversity and biogeography of rhizobia isolated from root nodules of *Glycine max* grown in Hebei Province, China. *Microbial ecology* 61: 917–931..
- Quispel A** (1974) *The biology of nitrogen fixation*. North Holl. Amsterdam, Holanda.
- Rademaker JL, Hoste B, Louws FJ, Kersters K, Swings J, Vauterin L, Vauterin P & De Bruijn FJ** (2000) Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 50 Pt 2: 665–677.
- Raymond J., Siefert J.L., Staples C.R. & Blankenship R.E.** (2004) The natural history of nitrogen fixation. *Mol. Biol. Evol.* 21: 541–554.
- Reid DE, Ferguson BJ & Gresshoff PM** (2011) Inoculation- and nitrate-induced CLE peptides of soybean control NARK-dependent nodule formation. *Molecular Plant- Microbe Interactions*.
- Rélic B, Talmont F, Kopcinska J, Golinowski W, Promé C & Broughton W** (1993) Biological activity of *Rhizobium* sp. NGR234 Nod-factors on *Macroptilium atropurpureum*. *Mol Plant Microbe Interact.* 6.: 764–774.
- Renate, L., & Wenyuan, S.** (2001). CHEMOTAXIS - GUIDED MOVEMENTS IN BACTERIA. *Crit Rev Oral Biol Med*, (3), 207–220.
- Ribeiro RA, Gomes Barcellos F, Gomes Thompson F & Hungria M.** (2009) Multilocus sequence analysis of Brazilian *Rhizobium* microsymbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) reveals unexpected taxonomic diversity. *Research in microbiology* 160: 297–306.
- Ruiz Argueso T, Imperial J & Palacios J** (2000) Hidrogenasas de las bacterias que nodulan leguminosas. *Prokaryotic Nitrogen Fixation*, (Triplett, E.W., ed), pp. 489–507.
- Sadowsky M. J., Tully RE, Cregan PB & Keyser HH** (1987) Genetic Diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Serogroup 123 and Its Relation to Genotype-Specific Nodulation of Soybean. *Applied and environmental microbiology* 53: 2624–2630.
- Sadowski, M.J. & P. Graham.** (1998). Soil biology of the Rhizobiaceae. H.P. Spaink, A. Kondorosi y P.J.J. Hooykaas (eds.). En: *The Rhizobiaceae. Molecular biology of model plant-associated bacteria*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 155-172.
- Sanjuán J, Carlson RW, Spaink H, Bhat U, Barbour, Glushka & Stacey G** (1992) A 2-Omethylfucose moiety is present in the lipo-oligosaccharide nodulation signal of *Bradyrhizobium japonicum*. *Proc Natl Acad Sci. USA* 89: 8789–8793.
- Schlaman H, Phillips D & Kondorosi E** (1998) Genetic organisation and regulation of the nodulation genes. *The Rhizobiaceae.* (Kluwer Academic Publishers, D, ed), pp. 361–386. The Netherlands.

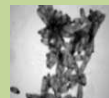
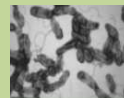
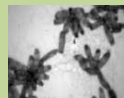
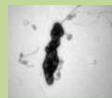
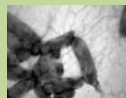
- Schmitt R** (2002) Sinorhizobial chemotaxis: a departure from the enterobacterial paradigm. *Microbiology (Reading, England)* 148: 627–631.
- Schvarzer J & Tavošnanska A** (2007) El complejo sojero argentino. Evolución y perspectivas Económicas, U de BAF de C, ed. *Memorias 2010 -INTA Campo Experimental EEA Gral. Villegas 2122*: 65–70.
- Shaw VK & Brill WJ** (1977) Isolation of an iron-molybdenum cofactor from nitrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 3249–3253.
- Shaw LJ, Morris P & Hooker J** (2006) Perception and modification of plant flavonoid signals by rhizosphere microorganisms. *Environmental microbiology* 8: 1867–1880.
- Shigeyuki T, Nomura M & Kouchi H** (2004) UREIDE BIOSYNTHESIS IN LEGUME NODULES. *Frontiers in Bioscience* 9: 1374–1381.
- Silver WS & Posgate JR** (1973) Evolution of symbiotic nitrogen fixation. *J. Theor. Biol.* 40: 1–10.
- Smit G, Swart S, Lugtenberg BJ & Kijne JW** (1992) Molecular mechanisms of attachment of Rhizobium bacteria to plant roots. *Molecular microbiology* 6: 2897–2903. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1479881>.
- Sneath PH & Sokal R** (1973) *Numerical taxonomy*. Freeman, San Francisco, USA.
- Socolow RH** (1999) Nitrogen management and the future of food: lessons from the management of energy and carbon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6001–6008. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6001–6008.
- Soil survey manual.** (1993) Soil Conservation Service. U.S. Soil Surve. Department of Agriculture Handbook.
- Somasegaran P & Hoben HJ** (1985) *METHODS IN LEGUME-RHIZOBIUM TECHNOLOGY*. University of Hawaii NifTAL.
- Soto M.J., Fernández-Pascual M & Olivares J.** (2002) A fadD mutant of Sinorhizobium meliloti shows multicellular swarming migration and is impaired in nodulation efficiency on alfalfa roots. *Molecular microbiology* 43: 371–382. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11985715>.
- Stewart BJ & McCarter LL** (2003) Lateral Flagellar Gene System of Vibrio parahaemolyticus. *Journal Of Bacteriology* 185: 4508–4518.
- Streeter J** (2007) Factors affecting the survival of Bradyrhizobium applied in liquid cultures to soya bean [Glycine max (L.) Merr.] seeds. *J Appl Microbiol* 103: 1282–1290.
- Streng A, Camp R, Bisseling T & Geurts R** (2011) Evolutionary origin of rhizobium Nod factor signaling. *Plant signaling & behavior* 6: 1510–1514.

- Subramanian S, Stacey Gary & Yu O** (2006) Endogenous isoflavones are essential for the establishment of symbiosis between soybean and *Bradyrhizobium japonicum*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 48: 261–273.
- Sun J, Cardoza V, Mitchell DM, Bright L, Oldroyd Giles & Harris JM** (2006) Crosstalk between jasmonic acid, ethylene and Nod factor signaling allows integration of diverse inputs for regulation of nodulation. *The Plant journal : for*
- Tambalo, D. D., Yost, C. K., & Hynes, M. F.** (2010). Characterization of swarming motility in *Rhizobium*. *Research Letter*, 307, 165–174. doi:10.1111/j.1574-6968.2010.01982.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M & Kumar S** (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution* 28: 2731–2739.
- Teplitski M, Robinson JB & Bauer WD** (2000) Plants secrete substances that mimic bacterial N-acyl homoserine lactone signal activities and affect population density-dependent behaviors in associated bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13: 637–648.
- Terpolilli JJ, Hood G a & Poole PS** (2012) What determines the efficiency of N(2)-fixing *Rhizobium*-legume symbioses? 1st ed. Elsevier Ltd.
- Teubal M** (2007) Expansión de la soja transgénica en la argentina. Fac. Cs. Economicas UBA
- Thampuran N & Surendran PK** (1996) Effect of chemical agents on swarming of *Bacillus* species. 296–302.
- Thies JE, Singleton PW & Bohlool B. 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* 57: 19–28.
- Thomas-Oates J et al.** (2003) A catalogue of molecular, physiological and symbiotic properties of soybean-nodulating rhizobial strains from different soybean cropping areas of China. *Systematic and applied microbiology* 26: 453–465.
- Thorne DW & Burris RH** (1940) Respiratory enzyme systems in symbiotic nitrogen fixation II. The respiration of *Rhizobium* from legume nodules and laboratory cultures. *J. Bacteriol.* 39,: 187–196.
- Todd CD, Tipton P a, Blevins DG, Piedras P, Pineda M & Polacco JC** (2006) Update on ureide degradation in legumes. *Journal of experimental botany* 57: 5–12.
- Toguchi A, Siano M, Burkart M HR** (2000) Genetics of swarming motility in *Salmonella enterica* serovar typhimurium: critical role for lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.* 182: :6308– 6321.

- Toro A** (1996) Nodulation competitiveness in the Rhizobium-legume symbiosis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 12: 157–162.
- Trijbels F & Vogels GD** (1966) Degradation of allantoin by *Pseudomonas acidovorans*. *Biochim Biophys Acta*. 113(2): 292–301.
- Turner SL & Young JP** (2000) The glutamine synthetases of rhizobia: phylogenetics and evolutionary implications. *Molecular biology and evolution* 17: 309–319..
- Unkovich MJ & Pate. JS** (2000) An appraisal of recent field measurements of symbiotic N₂ fixation by annual legumes. *Field Crops Res.* 65: : 211–228.
- van Rhijn, P** (1998) Lotus corniculatus nodulation specificity is changed by the presence of a soybean lectin gene. *Plant Cell*. 10: 1233–1250.
- Versalovic M, Schneider FJ, De Bruijn J & Lupski J** (1994) Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol Cell Biol* 5: 25–40.
- Verstraeten N, Braeken K, Debkumari B, Fauvart M, Fransaer J, Vermant J & Michiels J** (2008) Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends in microbiology* 16: 496–506.
- Vilain S, Luo Y, Hildreth MB & Brözel VS** (2006) Analysis of the life cycle of the soil saprophyte *Bacillus cereus* in liquid soil extract and in soil. *Appl. Environ. Microbiol* 72.
- Vincent J** (1970) A manual for the practical study of the root nodule bacteria. Vincent, J, ed. Blackwell Scientific Publications. Oxford, UK.
- Vinuesa P** (2007) BioInfo aplicada a estudios de ecología y sistemática molecular de bacterias. Curso: BioInfo aplicada a estudios de ecología y sistemática molecular de bacterias, UFLA, Lavras, MG, Brasil, Nov.2007
- Walsh S, Metzger DA & Higuchi R** (1991) Chelex® 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques*. 10: 506–513.
- Watt M, Silk WK & Passioura JB** (2006) Rates of root and organism growth, soil conditions, and temporal and spatial development of the rhizosphere. *Annals of botany* 97: 839–855.
- Webster NS, Luter HM, Soo RM, Botté ES, Simister RL, Abdo D & Whalan S** (2012) Same, same but different: symbiotic bacterial associations in GBR sponges. *Frontiers in microbiology* 3: 444.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA & Lane DJ** (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology* 173: 697–703..

- Wilhelms M, Fulton KM, Twine SM, Tomás JM & Merino Susana** (2012) Differential glycosylation of polar and lateral flagellins in *Aeromonas hydrophila* AH-3. *The Journal of biological chemistry* 287: 27851–27862.
- Witty JF & Minchin FR** (1998) Methods for the continuous measurement of O₂ consumption and H₂ production by nodulated legume root systems. *Journal of Experimental Botany* 49: 1041–1047.
- Wolfe a J & Berg HC** (1989) Migration of bacteria in semisolid agar. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 6973–6977..
- Yost C.K., Clark KT, Del Bel KL & Hynes M.F.** (2003) Characterization of the nodulation plasmid encoded chemoreceptor gene *mcpG* from *Rhizobium leguminosarum*. *BMC Microbiology* Vol. 3:
- Young JPW** (1992) Phylogenetic classification of Nitrogen-fixing organisms. *Biological Fixation*, (. Stacey, G., Burris, H.R. & Evans, HJ, ed), pp. 43–79. New York.
- Zahran HH** (1999) *Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate*. *Rhizobium-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate* 63: 968–89, table of contents.
- Zhao K, Liu M & Burgess RR** (2007) Adaptation in bacterial flagellar and motility systems: from regulon members to “foraging”-like behavior in *E. coli*. *Nucleic acids research* 35: 4441–4452.

Biofertilización con *Bradyrhizobium japonicum*
para la agricultura sustentable:
Aspectos ecofisiológicos del problema de la competencia para la nodulación



Universidad Nacional de La Plata
Fac. Cs. Exactas – Depto. Cs. Biológicas
Instituto de Biotecnología y Biología Molecular
IBBM – CONICET



Diseño y Edición
Covelli Julieta