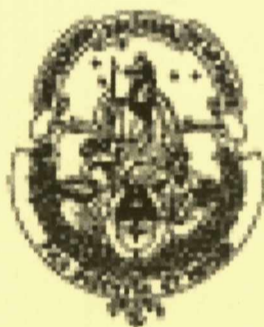


Tesis Doctoral

El uso de marcadores moleculares de ADN en el estudio de la biodiversidad de rizobios nodulantes de leguminosas silvestres del Noroeste Argentino



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P.

**Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas**

Año 2002

María Verónica López

Director: Prof. Dr. O. Mario Aguilar

TESIS No 958

DONACION.....
A.....
Fecha 12-11-02
Inv. E..... Inv..... B. 56987

Tesis Doctoral

**El uso de marcadores moleculares de ADN en el estudio de
la biodiversidad de rizobios nodulantes de leguminosas
silvestres del Noroeste Argentino**



**Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas
Año 2002**

María Verónica López

Director: Prof. Dr. O. Mario Aguilar

//

El presente trabajo de tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas ha sido desarrollado en el Instituto de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata bajo la dirección del Profesor Dr. Orlando Mario Aguilar.

Entre Mayo y Agosto de 1999 el trabajo fue desarrollado en los laboratorios del Dr. Manuel Megías de la Universidad de Sevilla- España y la Dra Noelle Amarger en INRA-Dijon, Francia.

//

**Con todo mi amor,
para Ana, Eduardo y Katy.**

--

/

Durante el presente trabajo de Tesis fueron publicaron los siguientes artículos:

Rapid identification of bean rhizobial isolates type I by a *nifH*-PCR assay. Aguilar, O. M., D. H. Grasso, P. M. Riccillo, M. V. López, and E. Szafer. *Soil Biol. Biochem* 1998. **30**:1655-1661.

Prevalence of the *Rhizobium etli*-like allele in genes coding for 16S rRNA among the indigenous rhizobial populations found associated with wild beans from the Southern Andes in Argentina. Aguilar, O. M., M. V. López, P. M. Riccillo, R. A. Gonzales, M. Pagano, D. H. Grasso, A. Pühler, and G. Favelukes. 1998. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:3520-3524.

The diversity of rhizobia nodulating beans in Northwest of Argentina as a source of more efficient inoculant strains. Aguilar, O. M., M. V. López, and P. M. Riccillo. 2001. *J. Biotech.* **91**:181-188.

Mi reconocimiento

A la Facultad de Ciencias Exactas, por haberme brindado la educación de grado, el espacio físico, los equipos y las instalaciones necesarias para el desarrollo de este trabajo, y un ámbito propicio para mi desarrollo profesional.

Al Instituto de Bioquímica y Biología Molecular (IBBM) por permitirme desarrollar el presente trabajo en su ámbito. A todos sus integrantes.

Al consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por su apoyo financiero, que hizo posible mi dedicación exclusiva a la investigación.

A IFS (International Foundation for Science) por haberme prestado la ayuda financiera necesaria para llevar a cabo la mayor parte de los experimentos de este trabajo.

Mi agradecimiento:

Al Prof. Dr. O. Mario Aguilar, a quien también dedico este trabajo, por dirigirme en forma crítica y entusiasta, por sus consejos, por estimular con apoyo y confianza mi formación profesional.

A mis compañeros de laboratorio: Mónica Collavino, Cecilia Muglia, Omar Riva, Juan Carlos López, Daniel Grasso, Adriana Alippi, Katy López, Pedro David Gara, Laura Nieto y Vanina Pérez por brindarme su apoyo y amistad, y un agradecimiento especial Pablo Riccillo por su colaboración en el Capítulo 7.

Al Prof. Dr. Gabriel Favelukes por su apoyo y sus reflexiones acerca del saber científico.

A los Profesores, Dr. Daniel Grasso, Dr. Antonio Lagares, Dra. Daniela F. Hozbor, Dr. Anibal Lodeiro, por sus consejos y explicaciones, en cada momento que lo necesite.

A los Profesores, Dr. Victor Romanowski y Dr. Oscar Grau, por facilitarme equipamiento y materiales cuando lo necesité.

Al Dr. Manuel Megías de la Universidad de Sevilla, España por sus consejos y por permitirme trabajar en su laboratorio y hacerme sentir como en mi país.

A la Dra Noelle Amarger de INRA-Dijon, Francia, por su apoyo, sus consejos, vista crítica de mi trabajo y por permitirme trabajar en su grupo.

Al Ingeniero Roberto Neumman de la estación experimental de INTA-Cerrillos, Salta por su apoyo y su valiosa ayuda

Al Dr. Alberto Capparelli por ser mi oreja en los tiempos difíciles y por sus sugerencias para la elaboración del Capítulo 8 de este trabajo de Tesis.

A mis compañeros del IBBM: Pich Otero, Mariano Pistorio, Laura J. Balagué, María Florencia Del Papa, Tirso Vazquez, Silvina López García, Julieta Fernandez, Federico Sisti César Albariño, Eloisa Arana, Selma Gago Zachert, Gonzalo Legarreta, María Laura García, Alejandra Tortoricci, Diego Posik, Alejandra Manzán,, Cristina McCarthy, Cecilia Zaneck, Martín Sarachu, Verónica, Ramiro Mendez, Silvia Moya, Liliana Semorille, y Gabriela Naum, por compartir este tiempo y la ayuda amablemente prestada.

A mis compañeros de la Cátedra de Fisicoquímica I por todo el cariño que me brindaron y los buenos momentos que hicieron muy amenas las clases.

A Pato, Amaicha, Carina, Andrea, Fede, Mariano. S, Mariano, Edgardo, Cintia, Diego, Carolina, Daniela, Mariela, Nelson, Cecilia, Fernando y Osvaldo por aguantarme y alentarme durante este último tiempo.

A Carlitos Illiano, Catalina López y a Rubén Bustos por su ayuda.

A mis padres, Ana y Eduardo y mi hermana Ana Claudia por su constante apoyo y cariño.

A Laura y Jole quienes pusieron su oreja, me acompañaron y ayudaron durante todo este tiempo.

Nota

....., la única explicación posible es la de que un científico es un hombre. Como consecuencia, si desea ardientemente hacer un descubrimiento importante y si este descubrimiento está justo en el mismo límite de la percepción de los sentidos, el científico es propenso, sin ninguna intención de engañar, a ver lo que desesperadamente quiere ver.

Isaac Asimov, Mas allá de cualquier lugar.

Índice

	Página
Introducción General	1-29
Ecología Microbiana	1
Objetivo general del trabajo	2
La simbiosis rizobio –leguminosa	2
1- La interacción entre leguminosas y rizobios	3
2- Metabolismo energético	7
3- Organización del genoma rizobiano	8
4- Una visión de la taxonomía de las familias Leguminosae y <i>Rhizobiaceae</i>	9
Taxonomía polifásica	15
1- <i>Multilocus enzyme electrophoresis</i> (MLEE)	16
2- Análisis de perfiles de <i>fingerprints</i> generados por <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	16
3- Análisis de secuencia de ADN	17
4- Taxonomía numérica	17
5- Hibridación ADN-ADN	19
6- Análisis del operón ARNr y sus aplicaciones en los estudios moleculares ecológicos	19
7- Análisis de secuencias en geles desnaturizantes	22
Objetivos de este trabajo y estrategia seguida para su desarrollo	24
Bibliografía	26
Materiales y Métodos	31-53
Aislamiento de los rizobios	31
1- Aislamiento de rizobios a partir de nódulo	31
2- Aislamiento de rizobios a partir de muestras de suelo	31
Ensayos de nodulación	32
1- Esterilización y germinación de semillas	32
2- Preparación del inoculante bacteriano e inoculación de las plántulas	32
3- Determinación del número de rizobios en las muestras de suelo	33
4- Determinación del peso seco de la parte aérea de la leguminosa	34
5- Ensayos en campo	34
Preparación de ADN total a partir de cultivos puros de rizobios y muestras de suelo	34
1- Preparación de ADN a partir de medio sólido	34
2- Preparación de ADN a partir de medio líquido	35
3- Preparación de ADN a partir de medio líquido por el método de extracción fenólica	35
4- Extracción de ADN de muestras de suelo a partir del método de lisis directa	35
Determinación del pH de muestras de suelo por el método en pasta de suelo saturado	36
Reacciones de PCR y condiciones de restricción con endonucleasas	36
1- Condiciones generales de PCR y de electroforesis	36
2- Condiciones para la restricción de los fragmentos de amplificación con endonucleasas	36
3- Análisis por RFLP de un fragmento del gen 16S ARNr	37
4- Análisis por RFLP de la región intergénica 16S-23S ADNr	37
5- Amplificación por PCR de un fragmento del gen <i>nifH</i>	37
6- Amplificación por PCR de un fragmento del gen <i>nodC</i>	38
7- Análisis de la secuencia nucleotídica de un fragmento de 260 pb del gen 16S ARNr	38
8- Amplificación de un fragmento del gen <i>nifH</i> con <i>primers</i> específicos para cepas del Tipo I	38
9- Obtención de perfiles de <i>fingerprints</i> de ADN, mediante la amplificación genómica con <i>primers</i> ERIC y REP	39
10- Amplificación por PCR de un fragmento conservado del gen <i>nifD</i>	39
11- Amplificación por PCR del producto a analizar por DTGGE	39
12- Preparación de la sonda marcada con biotina, a partir de la reacción de PCR	40
13- Purificación de los productos de PCR y secuenciación	40
Programas informáticos destinados al análisis de secuencias	41
Geles en gradiente desnaturizantes	42
1- Preparación de un gel en gradiente desnaturizante paralelo	43

2- Preparación de un gel en gradiente desnaturizante perpendicular	44
3- Aislamiento y secuenciación de una banda del gel de DTGGE	44
Obtención de perfiles plasmídicos, técnica de Eckardt modificada	44
Ensayos de utilización de hidratos de carbono y resistencia intrínseca a antibióticos	45
Ensayos de hibridación con sondas biotiniladas	45
Caracterización de la molécula señal	46
Obtención de exudados radicales de leguminosas	46
Obtención de exudado de semilla de leguminosa	47
Protocolo para la obtención de la molécula señal	47
Transferencia de plásmidos mediante conjugación bacteriana	47
Medida de la actividad β- galactosidasa	48
Medios de cultivo y soluciones empleadas	48
Bibliografía	53

Capítulos de Resultados

Capítulo 1 **55-65**

Características de la colección de aislamientos de rizobios representativos de las poblaciones del Noroeste Argentino

Topografía y clima del NOA	55
Sitios de colección de rizobios del NOA	57
Densidad rizobiana y características fisicoquímicas de los suelos	58
Características de las muestras utilizadas para establecer la colección de rizobios	61
Nomenclatura de los aislamientos que componen la colección	63
Discusión	63
Bibliografía	64

Capítulo 2 **67-91**

El uso de marcadores moleculares de ADN para el estudio de la diversidad de las poblaciones de rizobios

Introducción	66
<i>Fingerprinting</i> de ADN a partir de amplificaciones con <i>primers</i> semiespecíficos	67
Análisis por RFLP del gen 16S rRNA (ARDRA, <i>Amplified rDNA Restriction Analysis</i>).	72
Estudio de la región intergénica, IGS	77
Análisis del gen 16S ARNr de especies rizobianas: La identificación de regiones variables.	78
Diseño de los <i>primers</i> para análisis de DGGE	81
Puesta a punto de los geles desnaturizantes	82
Comparación de los resultados experimentales y las predicciones teóricas aplicadas al fragmento de 16S ARNr	84
El uso de <i>fingerprints</i> como criterio para seleccionar aislamientos representativos de poblaciones.	86
Discusión	87
Bibliografía.	90

Capítulo 3 **93-107**

Análisis de las poblaciones de rizobios de suelo aplicando geles desnaturizantes

Introducción	93
Extracción de ADN a partir de muestras de suelo	94
Análisis de comunidades rizobianas presentes en suelos del NOA	95
Análisis de DTGGE de muestras de suelo	98
Asignación de especie de las bandas reveladas por DTGGE	101
Discusión	104
Bibliografía	106

Capítulo 4	109-144
Caracterización de las poblaciones de rizobios del NOA asociadas a <i>Phaseolus vulgaris</i> L. var. aborigineus y <i>Phaseolus vulgaris</i> L. var. vulgaris	
Introducción	109
Establecimiento de una colección de rizobios nodulantes de poroto	110
Caracterización genómica de los aislamientos	112
1- Diversidad de la población revelada por perfiles de <i>fingerprints</i>	116
2- Análisis de la secuencia del gen 16S ARNr	116
A- Identificación de alelos de 16S ADNr	116
B- Análisis DTGGE de la región 16S ADNr	119
3- Análisis de las poblaciones	122
A- Identificación de amplicones característicos de especies	122
B- Limitaciones del análisis de <i>fingerprints</i> en la clasificación taxonómica de los rizobios nodulantes de poroto.	122
4- Análisis tipo RFLP de la región intergénica 16S-23S ADNr	123
5- Análisis de variabilidad de secuencias simbióticas	126
A- Variabilidad en el gen <i>nodC</i> .	126
B- Análisis del gen <i>nifH</i>	131
6- Análisis del perfil plasmídico	132
7- Análisis de diversidad a nivel de la planta revelada por <i>fingerprints</i> de ADN y por ensayos de hibridación con sondas de secuencias de inserción y del gen <i>nodD</i> .	133
Utilización de hidratos de carbono y resistencia intrínseca a antibióticos	136
Ensayos de competencia por la nodulación de poroto	138
Rango de planta hospedante	138
Niveles de variabilidad en la población nodulante de poroto.	139
Discusión	140
Bibliografía	143
Capítulo 5	145-180
Descripción de la diversidad rizobiana asociada simbióticamente a leguminosas silvestres del NOA	
Introducción	145
Establecimiento de una colección de rizobios asociados a diferentes leguminosas.	146
Caracterización genotípica	148
1- <i>Fingerprinting</i> de AND	148
2- Análisis de 16S ADNr-RFLP de los aislamientos representativos	151
3- Análisis de la secuencia nucleotídica del gen 16S ARNr	153
4- Análisis de PCR-DTGGE	158
5- Análisis tipo RFLP de la región intergénica 16S-23S ADNr	160
6- Análisis RFLP de los genes <i>nifH</i> y <i>nodC</i>	163
Caracterización de la molécula señal de los rizobios nodulantes de <i>P. augusti</i>	167
Caracterización fenotípica: Utilización de hidratos de carbono y resistencia intrínseca a antibióticos	169
Rango de planta hospedante	172
Discusión	174
Bibliografía	179
Capítulo 6	181-216
Caracterización de las poblaciones de rizobios nodulantes de <i>Leucaena leucocephala</i>	
Introducción	181
Aislamientos de rizobios nodulantes de <i>Leucaena leucocephala</i>	182
Caracterización genotípica	182
1- Diversidad a través de perfiles de <i>fingerprints</i> de ADN	182
2- El análisis del gen 16S ARNr mediante RFLP	185
3- Análisis de DTGGE	186
4- Análisis de la secuencia de 260 pb del gen 16S ARNr	191
5- Análisis RFLP de la región intergénica 16S-23S ADNr	195

6- Diversidad de los genes simbióticos <i>nodC</i> y <i>nifH</i>	199
7- Perfil plasmídico	204
Caracterización fenotípica	205
Rango de planta hospedante	207
Estudio de la molécula señal de la nodulación	208
Discusión	210
Bibliografía	214
Capítulo 7	217-226
Aplicaciones del estudio de la diversidad de los rizobios nodulantes de poroto en la selección de aislamientos que mejoren la productividad del cultivo	
Introducción	217
Colección aislamientos de poroto a partir de la cual se seleccionaron cepas para la inoculación	218
Caracterización de las poblaciones en los suelos cultivados con poroto	218
Selección de aislamientos en condiciones de invernadero	220
Ensayos de campo	223
Discusión	224
Bibliografía	225
Capítulo 8	227-241
Análisis de la diversidad de la colección de aislamientos de leguminosas del NOA	
Introducción	227
Análisis global de la colección de rizobios del NOA	229
1- Consideraciones generales	229
2- La distribución de los alelos ribosomales entre los diferentes sitios del NOA	230
3- Distribución de los alelos ribosomales según su relación filogenética	232
4- Distribución de los alelos ribosomales en los distintos sitios según su hospedador de origen	234
Cuantificación de la diversidad entre los aislamientos de la colección	237
Análisis de la diversidad intraespecífica de la colección a través de la región IGS	238
Discusión	240
Bibliografía	241
Discusión General y Conclusiones	243-249
Apéndices	
Apéndice 1 Muestras de suelos del NOA	251
Apéndice 2 Aislamientos de <i>P. vulgaris</i>	253
Apéndice 3 Aislamientos de <i>P. augusti</i>	267
Apéndice 4 Aislamientos de otras leguminosas silvestres	271
Apéndice 5 Aislamientos de <i>Leucaena leucocephala</i>	277
Apéndice 6 Alineamiento de secuencias de bandas de DTGGE	281
Apéndice 7 Alineamiento de secuencias de 16S ADNr de aislamientos de <i>Leucaena leucocephala</i>	285

Abreviaturas y Siglas

A	Amper
ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
ARN _r	ARN ribosomal
ARN _t	ARN de transferencia
ATP	adenosina 5'-trifosfato
Bisacrilamida	N,N'-metilenbisacrilamida
BSA	seroalbúmina bovina
CTAB	<i>hexadecyltrimethyl-ammonium bromide</i>
dATP	2'-deoxiadenosina 5'-trifostato
DGGE	<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>
dNTPs	2'-deoxirribonucleósidos 5-trifosfato
DO	densidad óptica
DTT	dithiothreitol
EDTA	ácido etilen diamino tetracético
g	gramo(s)
h	hora(s)
Km	kilómetros
LB	Luria Bertoni (medio de cultivo)
m	metro (s)
M	molar
mg	miligramo(s)
min	minuto(s)
ml	mililitro(s)
mM	milimolar
mmol	milimol
ng	nanogramo(s)
nt	nucleótido(s)
pb	pares de bases
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PVP	polivinilpirrolidona
RFLP	<i>restriction fragment length polymorphism</i>
SDS	<i>sodium dodecil sulfate</i>
TAE	Tris-acetato-EDTA
TBE	Tris-borato-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletlen-diamina
TGGE	<i>Temperature Gradient Gel Electrophoresis</i>
UV	luz ultravioleta
V	Volts
μl	microlitro(s)
μM	micromolar
% p/v	porcentaje peso en volumen
% v/v	porcentaje volumen en volumen

Introducción General y Objetivos



Salvia Sclaria,
from DI HISTORIA STIRPIUM
by Leonhard Fuchs (Fuchsius), Basle, 1542.

Introducción General y Objetivos

Ecología y Diversidad Microbiana

Ecología Microbiana

La diversidad microbiana y su rol en la naturaleza es prácticamente desconocida. Se estima que el 50% del protoplasma del planeta es microbiano y sólo se conoce entre un 1 y 5% del mismo (Rosado *et al.*, 1997). Este desconocimiento se atribuye a la utilización de las técnicas comunes de la microbiología tradicional, tales como la microscopia y cultivo *in vitro* de microorganismos las cuales tienen sus limitaciones en la clasificación e identificación de los mismos. Por ejemplo, la clasificación mediante rasgos fisiológicos y bioquímicos es prácticamente imposible puesto que aproximadamente el 80% de los microorganismos en la naturaleza no pueden ser aislados en cultivos puros principalmente por la falta de conocimiento de las condiciones óptimas de cultivo (Muyzer, 1999). Por lo tanto, para un mejor entendimiento de la diversidad microbiana y su rol en el ecosistema es necesario utilizar otro tipo de técnicas que prescindan del cultivo del microorganismo, tales como las desarrolladas por la biología molecular, las que han dado lugar a una nueva rama de la ecología que es la **ecología microbiana molecular**. La ecología microbiana molecular intenta estudiar tanto a los microorganismos cultivables como a los aún no cultivables mediante técnicas que hacen uso de algunos marcadores moleculares de ADN los cuales se caracterizan por conservarse en los distintos niveles jerárquicos de la clasificación: Familia, género, especie, subespecie y cepa.

Se describen a continuación algunas cuestiones que impulsan el estudio de la diversidad microbiana.

¿Por qué es importante el estudio de la diversidad microbiana? 1- Los microorganismos juegan un rol muy importante en los ciclos biogeoquímicos del planeta (Whitman *et al.*, 1998). 2- Los microorganismos representan reservorios de nuevos genes que pueden ser utilizados por la biotecnología (Rondon *et al.*, 2000). 3- Los microorganismos desempeñan papeles en la conservación y recuperación de ecosistemas. 4- Representan modelos para estudios de ecología y evolución. 5- Los microorganismos generan sistemas de competencia entre ellos que pueden afectar algunos procesos desarrollados por el hombre.

¿Cuáles son los mecanismos que generan diversidad? La diversidad microbiana se genera básicamente por transferencia horizontal de genes (de la Cruz *et al.*, 2000), mutaciones y evolución (Whitman *et al.*, 1998).

¿Cómo se jerarquiza la diversidad? Se utiliza toda la información disponible sobre los microorganismos para clasificarlos obedeciendo niveles de jerarquía taxonómicos, género, especie, subespecie y cepa.

¿Fenotipo vs genotipo? En estudios tempranos la microbiología utilizó para clasificar a los microorganismos rasgos fenotípicos tales como, aspecto de colonia, presencia de flagelos, movilidad, coloraciones y utilización de hidratos de carbono. El desarrollo de la biología molecular, experimentado en las dos últimas décadas, ha permitido incorporar otros criterios clasificatorios basados en el análisis genómico como por ejemplo, presencia o ausencia de un gen, variabilidad en una determinada secuencia o expresión de una proteína determinada. En muchos casos la caracterización fenotípica no alcanza para la clasificación de un determinado grupo o conduce a agrupamientos groseros, mientras que la diversidad genotípica revelada puede resultar tan grande que dificulte la identificación y clasificación. A raíz de esta dualidad en los últimos años surgió la necesidad de combinar estudios fenotípicos y genotípicos a través de una taxonomía polifásica para lograr la caracterización de una población (Graham *et al.*, 1991).

Objetivo general del trabajo

El objetivo general de este trabajo de tesis doctoral es el análisis de la diversidad de las poblaciones de rizobios, asociadas simbióticamente a leguminosas silvestres del Noroeste Argentino (NOA), mediante la utilización de marcadores moleculares de ADN.

A continuación se describen los aspectos sobresalientes de la interacción simbiótica entre rizobios y leguminosas y las características de los marcadores moleculares de ADN utilizados en este trabajo.

La simbiosis rizobio –leguminosa

Desde la antigüedad se practica la rotación de cultivos de leguminosas a fin de incrementar la productividad, preservar los suelos del empobrecimiento y evitar enfermedades de la planta. En particular las leguminosas como arveja y poroto fueron utilizadas como abono ‘verde’ ya que mejoran las condiciones del suelo para el crecimiento de otro tipo de cultivo.

Los estudios de la simbiosis fijadora de nitrógeno comenzaron en Europa, en 1542, cuando el físico y botánico alemán Leonhard Fuchsius publicó dibujos de leguminosas noduladas. Durante el siglo XVII Malpighi (Italia) observó nódulos en raíces de poroto (*Phaseolus*

vulgaris y *Vicia faba*). Cerca de 200 años más tarde el botánico ruso Woronin observó que los nódulos de *Alnus glutinosa* y *Lupinus mutabilis* estaban llenos de cuerpos diminutos similares a bacterias y Frank en 1879 demostró que los suelos incinerados no nodulan *Pisum sativum*. Hace más de cien años los alemanes Hellriegel y Wilfarth mostraron en un estudio que la formación de nódulos resultaba de la infección externa de distintas leguminosas. Pero fue Beyerinck en Holanda quien probó, por inoculación de plantas estériles de *V. faba* con extractos de nódulos de la misma leguminosa, que las bacterias son las responsables de la formación de los nódulos. En 1889 Prazmowski (Polonia) inoculó *P. sativum* con cultivos puros bacterianos y mostró que estas penetran las leguminosas a través de hilos de infección en las raíces (Perret *et al.*, 2000).

1- La interacción entre leguminosas y rizobios

La nodulación es un proceso que permite la colonización de células de la planta por bacterias invasoras. A pesar de que muchas bacterias puedan iniciar la formación del nódulo, sólo algunas combinaciones de simbioses dan lugar a la formación de nódulos fijadores de nitrógeno. La especificidad entre el rizobio y la leguminosa minimiza tanto la probabilidad de infección por agentes patógenos, como la formación de asociaciones inefectivas que van en detrimento de ambos simbioses (Perret *et al.*, 2000).

La habilidad de las plantas de establecer simbiosis con rizobios está restringida a la familia Leguminosae con la excepción del género *Parasponia* de la familia de Ulmaceae. Los rizobios pueden infectar al huésped por varios mecanismos tales como, la penetración intercelular (*crack-in*) entre células epidermales y corticales como ocurre en *Arachis* spp. y *Parasponia* spp. o por infección de las células del pelo radicular como sucede en la mayoría de las plantas. Este proceso resulta en la formación de un nuevo órgano en la planta, el nódulo. Los nódulos se forman generalmente en las raíces, sin embargo algunas leguminosas acuáticas tal como *Sesbania rostrata* también exhiben nódulos en el tallo (Hadri *et al.*, 1998).

Las evidencias experimentales sugieren que el progreso en la invasión del rizobio hasta formar el nódulo implica la apertura de varias puertas, las que se abrirán si los códigos (señales moleculares) son correctos. El diálogo molecular comienza cuando la bacteria reacciona a sustancias con propiedades inductoras presentes en los exudados radiculares. Estos inductores son característicos de cada leguminosa y se los clasifica en flavonoides (chalconas, flavonas, flavanonas, flavonoles, antocianidinas, isoflavonoides) y no-flavonoides que incluyen a betaínas (estachidrina, trigonellina) y ácidos aldónicos (ácido eritrónico, ácido tetrónico). Las señales moleculares son liberadas desde la raíz y/o semilla durante la germinación. En algunos casos el mismo compuesto regula otros procesos microbianos como la quimiotaxis, crecimiento y

germinación de esporas micorrizas (Phillips, 2000). Los flavonoides en combinación con el producto de un gen constitutivo *nodD*, presente en el plásmido simbiótico o en la región cromosomal simbiótica de la bacteria, activan genes de nodulación inducibles cuyos productos sintetizan compuestos de naturaleza lipo-quito-oligosacarídica denominados factores de nodulación. Estos factores inducen una serie de cambios en la raíz de la leguminosa que comprenden a la deformación del pelo radicular, la promoción de la formación del hilo de infección y la estimulación de la actividad mitótica en las células corticales como muestra la Figura 1 (Perret *et al.*, 2000). Existen 55 genes de nodulación que son los responsables de la síntesis del factor Nod, la nomenclatura de estos genes involucra a más de 26 letras del alfabeto para los genes *nod* y *nol* y *noe* (Stacey, 1995).

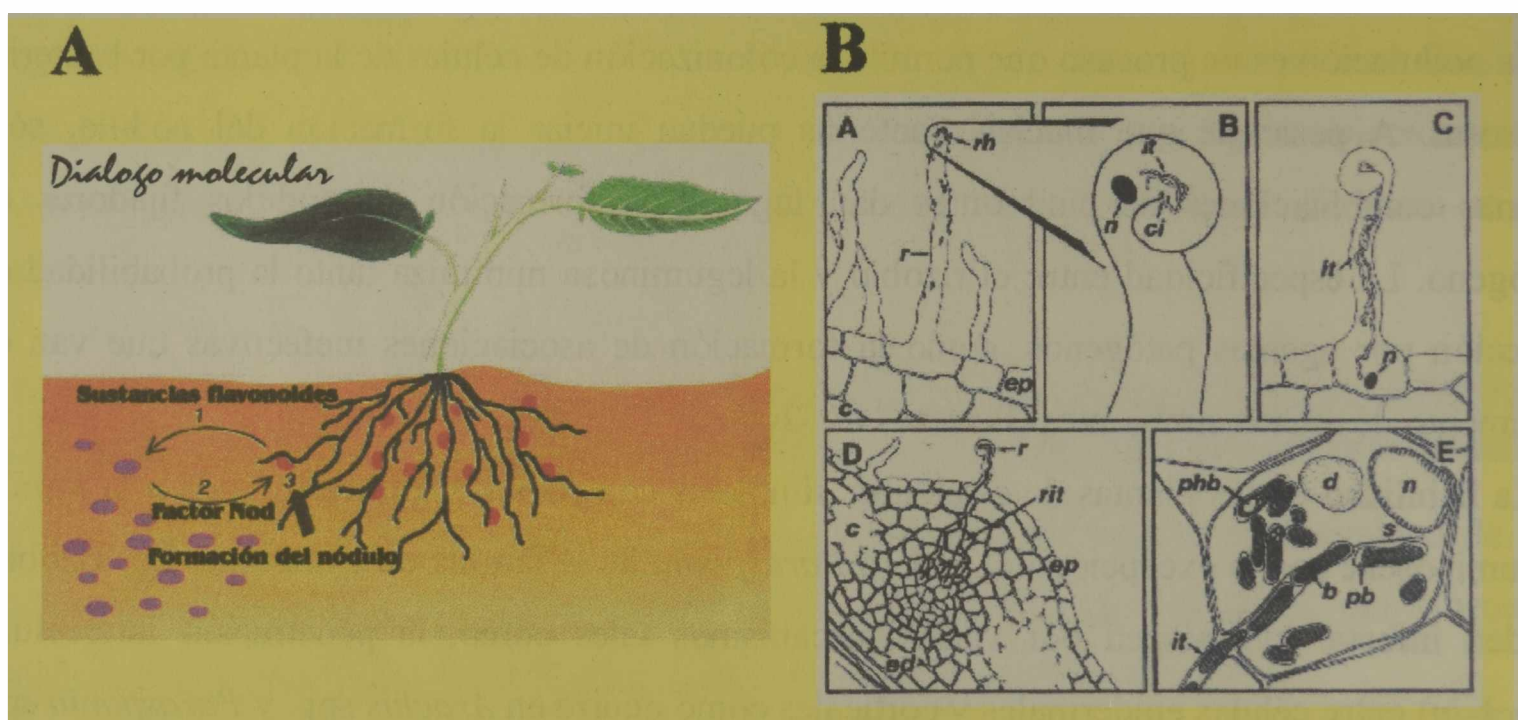


Figura 1: Diálogo molecular entre la leguminosa y el rizobio. A- Esquema del dialogo molecular entre la planta y los rizobios del suelo: (1) Las sustancias flavonoides secretadas por la planta inducen a las bacterias a la producción del factor Nod (2), el cual desencadena el desarrollo del nódulo (3). B (A, B, C, D y E)- Invasión de la raíz de la leguminosa por rizobio. El rizobio (*rh*) coloniza la rizosfera y se une al pelo radicular(*r*), aquí se produce el primer intercambio de señales y el factor Nod induce el curvado del pelo radicular y permite la entrada del rizobio al centro de infección (*ci*). El núcleo de la planta (*n*) precede al o los hilos de infección (*it*). Acompañado por el núcleo (*n*) se elonga el hilo de infección (*it*) hasta llegar a la base de la célula del pelo radicular. El hilo de infección se ramifica (*rit*) cerca del primordio del nódulo formado por división de las células corticales. En las células del nódulo se forman los simbiosomas (*s*) a partir de los bacteroides (*b*) que llegan por el hilo de infección. En los bacteroides se observa el almacenamiento de C mediante la acumulación de poli-β- hidroxibutarato (*phb*) alrededor de la membrana peribacteroidal (*pb*). Otras abreviaciones: Cortex (*c*), vacuola digestiva (*d*), epidermis (*ep*) y endodermis (*ed*).

El esqueleto del factor Nod es un N-acil-quitin-oligómero, con uniones β 1,4, sintetizado por las proteínas que son productos de los genes comunes de nodulación *nodABC*. El primer paso en la síntesis del factor Nod es realizado por una N- acetil glucosamiltransferasa codificada por *nodC*. La elongación del factor realizada por la proteína NodC tiene lugar en el extremo no reductor (Kamst *et al.*, 1997). Luego la deacetilasa NodB remueve el motivo N-acetil del

extremo no reductor del oligosacárido N-acetilglucosamina. Finalmente una aciltransferasa codificada por *nodA* une las cadenas acilo al carbono C-2 del extremo no reductor (Debellé *et al.*, 1996). El transporte del factor Nod fuera de la membrana plasmática de la bacteria (en el periplasma) estaría mediado por NodI y NodJ, pero también depende de las condiciones ambientales como pH y temperatura. Posteriormente sería secretado del periplasma hacia la superficie por otra proteína, aún desconocida (Spaink *et al.*, 1995; Perret *et al.*, 2000). Un esquema de la síntesis del esqueleto del factor Nod se muestra en la Figura 2 (Carlson *et al.*, 1994). La reacción inicial sería la transferencia de acetilglucosamina de UDP-acetilglucosamina al undecaprenol fosfato (para el caso de los *Rhizobium*) o diacilglicerol (*Bradyrhizobium*) anclado en la membrana junto con NodC y luego actuarían desde el citosol NodA y NodB.

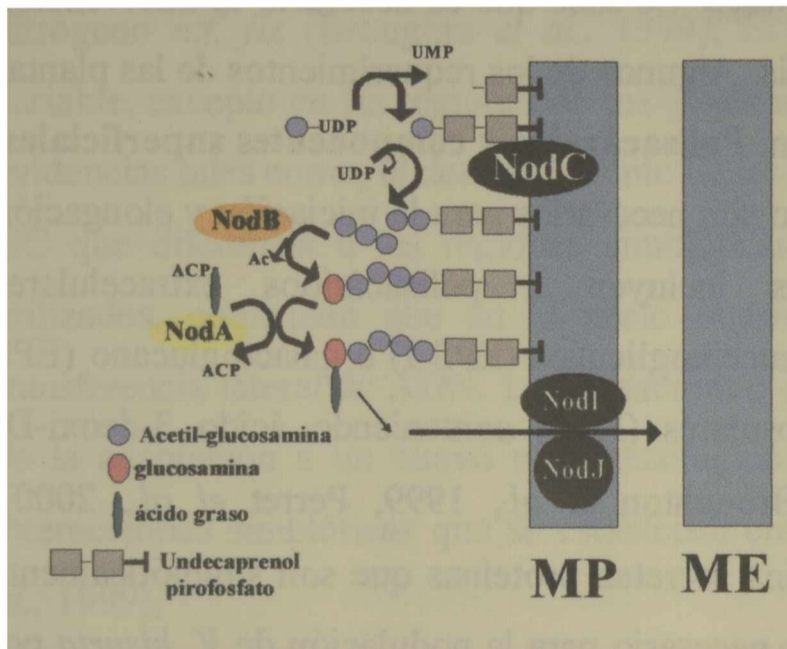


Figura 2: Biosíntesis del factor Nod. Diagrama esquemático que muestra una posible ruta para la biosíntesis del factor Nod (acetilquitinolímero) común a todos los rizobios. MP es la membrana plasmática y ME es la membrana externa. NodC media la transferencia de la acetilglucosamina de UDP-acetilglucosamina al undecaprenol pirofosfato anclado en la membrana plasmática. Posteriormente la proteína NodB remueve el acetilo y la NodA le transfiere el ácido graso. Este modelo fue extraído de Carlson *et al.* (1994).

La conversión de un factor Nod común a uno huésped específico requiere la adición de varios sustituyentes. Los productos de otros genes *nod* son los responsables de varias modificaciones aunque no se conoce muy bien en que momento de la biosíntesis ocurren estas sustituciones. El esqueleto tipo del factor Nod y sus posibles sustituyentes se muestran en la Figura 3 (Perret *et al.*, 2000).

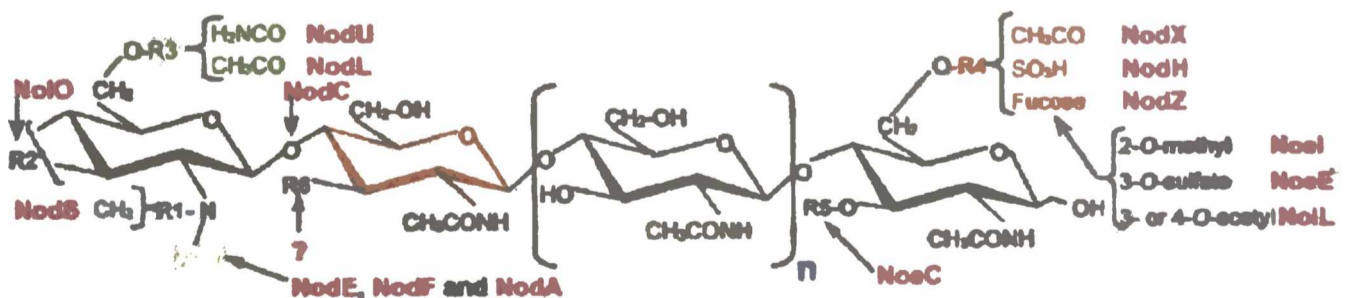


Figura 3: Genes de nodulación responsables de los distintos grupos de sustituyentes del factor Nod. R1 (H, Metilo); R2 (carbamilo, OH, H); R3 (H, acetil, carbamilo), R4 (Sulfato, H, metilfucosa, fucosa, D-arabinosa, o acetilo), R5 (H, arabinosil), R6 (OH, H, acetilo, fucosilo), n (-1, 0, 1, 2, 3). Acyl (grupo acilo).

Las modificaciones pueden ser por adición de otro residuo glicosílico o un grupo sulfato, carbamilo, acetilo, y/o un sustituyente glicerol, confiriendo en general mayor especificidad a la simbiosis (Carlson *et al.*, 1994; Dénarié *et al.*, 1996).

Algunas modificaciones parecerían restringir el rango de huésped y otras por el contrario extenderlo. Las primeras incluirían la sulfatación, la presencia de residuos grasos poli-insaturados y un residuo de arabinosa. Mientras la presencia de una metilfucosa y un grupo N-metilo estarían relacionadas con un rango amplio de hospedantes.

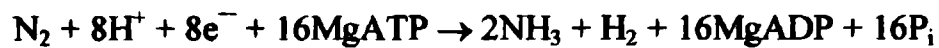
Las moléculas señales de *B. japonicum* y *B. elkanii* son tetrámeros o pentámeros de N-acetilglucosamina con el extremo reductor modificado por una 2-O-metilfucosa, fucosa y/o un residuo de glicerol. El extremo no reducido está sustituido por cualquiera de los ácidos grasos 18:1, 16:0, o 16:1. además puede estar acetilado, carbamoilado o N-metilado.

Otros requerimientos para establecer la simbiosis. Se sabe que es necesario la intervención de otros factores para el desarrollo de la simbiosis. Algunos de los requerimientos de las plantas para con los rizobios se describen a continuación. **Polisacáridos y componentes superficiales.** Constituyentes específicos de la pared del rizobio son necesarios para la iniciación y elongación del hilo de infección. Estos compuestos incluyen a polisacáridos extracelulares (exopolisacáridos, EPS) que son polímeros de succinoglicanos (EPS I) o galactoglucano (EPS II), lipopolisacáridos (LPS), polisacáridos capsulares (KPS) conteniendo ácido 3-deoxi-D-mano-2-octulosónico y β -glucanos cíclicos (Broughton *et al.*, 1999, Perret *et al.*, 2000). **Proteínas secretadas.** Algunas cepas de rizobios secretan proteínas que son simbióticamente activas. Entre ellas el producto del gen *nodO* es necesario para la nodulación de *V. hisurta* por *R. leguminosarum*.

Los niveles de factor Nod, polisacáridos y proteínas secretadas contribuyen al control de la especificidad del huésped y disminuyen la respuesta de defensa de la planta. Los rizobios de amplio rango de hospedador probablemente tengan las llaves para abrir las distintas puertas de cada leguminosa.

Una vez desarrollado el nódulo, los rizobios se diferencian en el interior del citoplasma de las células vegetales como bacteroides y es allí donde se activa el proceso de fijación de nitrógeno. Este proceso está mediado por la inducción micro-aeróbica de los genes de fijación (*nif/fix*) vía la hemoproteína FixL que es oxígeno sensible. Conjuntamente se activan genes de la planta (nodulinas tardías) que codifican para una proteína transportadora de oxígeno

(leghemoglobina), y proteínas involucradas en la asimilación de carbono y nitrógeno. La enzima nitrogenasa, que cataliza la reducción del N₂ atmosférico según la siguiente reacción:



Está compuesta por dos componentes: El componente I o también llamado proteína MoFe que es un tetrámero $\alpha_2\beta_2$ cuyas subunidades α y β son diferentes, 55000 y 60000 daltons respectivamente. El componente II o proteína Fe (dinitrogenasa reductasa) es un dímero con dos subunidades idénticas de 35000 daltons. La nitrogenasa está codificada por los genes *nif*, los genes *nifD* y *nifK* codifican para las subunidades α y β de la proteína MoFe y el gen *nifH* codifica el componente II de la nitrogenasa (Henmecke *et al.*, 1985). En *Klebsiella pneumoniae* por ejemplo, son necesarios más de 20 genes para ensamblar la nitrogenasa (Posgate, 1990).

Se ha propuesto que los organismos simbióticos fijadores de nitrógeno evolucionaron a partir de un ancestro no simbiótico por adquisición de genes de nodulación *nod* y genes de fijación de nitrógeno *nif*, *fix* (Broughtn *et al.*, 1999). El genoma de los distintos rizobios es por tanto variable, excepto en las regiones de los genes involucrados en la actividad simbiótica. Algunas evidencias tales como, el descubrimiento de las *islas simbióticas* en *M. loti*, el alto contenido de GC que diferencia a las regiones simbióticas del resto del genoma, y el tipo de codones utilizados, confirman que en el suelo ocurre un proceso evolutivo que comprende a la transferencia lateral de ADN. La transferencia horizontal de las funciones simbióticas, seguida de la adaptación a un nuevo nicho ecológico conduce probablemente a la evolución de las interacciones simbióticas que se establecen entre las leguminosas y los rizobios (Broughtn *et al.*, 1999).

2- Metabolismo energético

La simbiosis rizobio-leguminosa requiere grandes cantidades de energía para utilizarla en la reducción del nitrógeno atmosférico. Las reacciones catabólicas de los rizobios presentan variaciones de una especie de rizobio a otra, constituyendo otro punto de estudio para la caracterización de los mismos (Dupuy *et al.*, 1994; Gao *et al.*, 1994; Ladha *et al.*, 1994).

Utilización de fuentes de carbono de los rizobios en vida libre: En general los rizobios de crecimiento rápido son capaces de utilizar una variedad mayor de sustratos que los rizobios de crecimiento lento, que en cambio son capaces de utilizar un número mayor de compuestos aromáticos. El uso de azúcares o ácidos orgánicos por los rizobios puede ser importante en el laboratorio para cultivarlos o en la producción de energía en el nódulo pero para sobrevivir en el suelo ellos dependen de los compuestos aromáticos. La especie más restrictiva de usar compuestos aromáticos del suelo es *S. meliloti*.

Las especies del género *Rhizobium* son capaces de usar una variedad de hexosas, pentosas, disacáridos, trisacáridos y ácidos orgánicos para crecer. El glicerol es la fuente de carbono universal entre los rizobios (Stowers, 1985). Los bradirizobios, por ejemplo, presentan tiempos de generación menores cuando crecen con glicerol que con otra fuente de carbono como glucosa, manitol, galactosa o sacarosa.




Los monosacáridos son principalmente metabolizados por la vía de Entner-Doudoroff en *Bradyrhizobium* y *Rhizobium* (Stowers, 1985) siendo la vía de Entner-Meyer-Parnas dependiente de cada cepa. Rossum *et al.* (1995) han descrito que *Bradyrhizobium* tiene activo el ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

El metabolismo del carbono en el bacteroide: Los bacteroides tiene la capacidad de utilizar como fuente primaria de carbono ácidos orgánicos tales como succinato, fumarato, malato y piruvato, todos ellos provenientes de las células del nódulo de la planta (Stowers, 1985).

Estudios del metabolismo aplicados a la taxonomía. Algunos ensayos de utilización de substratos carbonados son realizados con fines taxonómicos, adquiriendo significancia ecológica cuando los substratos son los que se encuentran en el hábitat del microorganismo, como por ejemplo los compuestos aromáticos en el caso de los rizobios (Dupuy *et al.*, 1994; Gao *et al.*, 1994; Ladha *et al.*, 1994).

3- Organización del genoma rizobiano

Según al género de la familia *Rhizobiaceae* al cual pertenezcan lo rizobios, tienen diferentes características genómicas. Recientemente se han secuenciado los genomas completos de una de las especies más estudiadas por los rizobiólogos, *Sinorhizobium meliloti* y de *Mesorhizobium loti* (Galibert *et al.*, 2000; Kaneko *et al.*, 2000). El genoma de *S. meliloti* de 6.6 Mb está compuesto por tres replicones:

Cromosoma		3.7 Mb
Plásmido Simbiótico A (pSymA)		1.4 Mb
Plásmido Simbiótico B (pSymB)		1.7 Mb

Una proporción significativa del genoma de las especies del género *Rhizobium* está representada por plásmidos, dentro de los cuales se encuentran, en un número variable, los que portan los genes simbióticos. En algunas especies, como *S. meliloti*, los plásmidos simbióticos se corresponden con plásmidos de más de 1 Mb denominados megaplásmidos.

Los plásmidos simbióticos pueden ser transferidos entre especies de *Rhizobium* así como también a géneros cercanos como *Agrobacterium* (Wang *et al.*, 1999). Se ha secuenciado también, el plásmido simbiótico de la cepa NGR234 (Freiberg *et al.*, 1997). Estas secuencias revelan que los genes que componen el plásmido tienen orígenes diferentes sugiriendo la naturaleza quimérica del plásmido simbiótico.

En *B. japonicum*, los genes simbióticos, los cuales incluyen genes *nod* y aquellos esenciales para la fijación del nitrógeno (*nif* y *fix*) se encuentran en el cromosoma en dos grandes clusters separados por aproximadamente 200 Kb (Stacey, 1995). De igual forma, en *Mesorhizobium loti* se han encontrado también islas simbióticas (Broughton *et al.*, 1999).

4- Una visión de la taxonomía de las familias Leguminosae y Rhizobiaceae

En la actualidad se sabe que de todos los seres vivos, sólo un centenar de géneros de bacterias están capacitados para fijar nitrógeno del aire y convertirlo en compuestos asimilables y utilizables por otros organismos. Entre los microorganismos fijadores de nitrógeno se encuentran las cianobacterias (*Anabena*), arqueobacterias (*Methanococcus*), bacterias grampositivas (*Frankia* y *Clostridium*), enterobacterias (*Klebsiella*) y otras protobacterias (*Rhizobium*, *Azospirillum* y *Acetobacter*, entre varias). La familia Leguminosae, con más de 19.000 especies distribuidas por ambientes muy dispares, aprovecha la simbiosis con los rizobios del suelo, no estando todas las especies capacitadas para formar nódulos (Martínez-Romero *et al.*, 1998).

Origen de las leguminosas

Las leguminosas tienen antiguo linaje, existen restos fósiles de ellas en la Era Cuaternaria (Reciente y Pleistoceno), por toda la Terciaria (Plioceno, Mioceno, Oligoceno, y Eoceno) y hasta en la Secundaria o Mesozoica. Se estima que estos períodos han cubierto 95 a 120 millones de años. Las leguminosas están representadas en las floras de casi todos los países, excepción hecha de las regiones árticas y antárticas y de algunas islas, como Nueva Zelandia, donde son muy escasas. En la Argentina se han encontrado numerosas impresiones fósiles, sobre todo de hojas, que se atribuyen al período Terciario (Burkat, 1952).

Flora leguminosa argentina

La flora argentina cuenta con 571 especies indígenas y entre 33 y 36 introducidas asilvestradas (Burkart, 1952). Este número representa el 4 a 5% del total mundial de especies. Nuestras especies indígenas se reparten en 94 géneros. La riqueza en leguminosas es máxima en

el norte y nordeste de la Argentina. En Jujuy por ejemplo existen, unos 40 géneros y más de 80 especies espontáneas. En la provincia de Tucumán hay representantes de 54 géneros. Su abundancia disminuye paulatinamente hacia el sur, siendo escasas en la región de los bosques patagónicos.

En las altas cordilleras se encuentran varios géneros xerófilos o criófilos, hierbas y subarbustos espinosos de los géneros *Adesmia*, *Astragalus*, *Lupinus* y *Trifolium*.

En nuestras selvas subtropicales abundan los árboles de los géneros *Acacia*, *Enterolobium*, *Piptadenia*, *Tipuana*, *Lonchocarpus*, *Erythrina*, etc, habiendo muchas enredaderas (*Canavalia*, *Bauhinia*, *Phaseolus*, etc) y especies herbáceas o arbustivas (*Desmodium*, *Stylosanthes*, *Aeschynomene*, *Crotalaria*, *Cassia*, *Phaseolus*, *Centrosema*, *Clitoria*, etc).

En las sabanas y bosques del Chaco, bosque pampeano, y monte dominan los géneros *Acacia*, *Prosopis*, *Cercidium*, *Mimozyanthus*, etc. La estepa pampeana, en cambio, sólo presenta géneros herbáceos: *Vicia*, *Lathyrus*, *Adesmia*, *Trifolium*, *Rhynchosia*, etc, entre los indígenas y *Medicago*, *Melilotus*, *Galega*, *Lotus* entre los introducidos naturalizados.

Leguminosas silvestres estudiadas en este trabajo

La descripción de las leguminosas del NOA estudiadas en este trabajo se muestra en la Tabla 1, en ella se ha tenido en cuenta la clasificación taxonómica de las especies, las cuales pertenecen a dos de las tres subfamilias que componen la familia Leguminosae: *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* y *Papilionoideae*.

Subfamilia	Tribu	Género	Características
<i>Mimosoideas</i>		<i>Acacia</i>	Árboles o arbustos, suministran madera, leña, goma, taninos, esencias, vainas forrajeras, etc.
		<i>Mimosa</i>	Hierbas o arbustos, con hojas sensitivas. Género megatérmico con más de 400 especies en América
		<i>Leucaena</i>	Género compuesto por 40 especies cuyo centro de polimorfismo se encuentra en México, con algunas especies en Perú y Venezuela. No es nativa del NOA.
<i>Papilionoideas</i>	<i>Dalbergieas</i>	<i>Tipuana</i>	La única especie es <i>T. tipu</i> . La corteza herida produce una resina roja. La madera se utiliza para la fabricación de muebles.
	<i>Hedisareas</i>	<i>Desmodium</i>	Hierbas perennes, rara vez anuales, subarbustos. Comprende cerca de 200 especie, que viven en las selvas, sabanas y campos en regiones cálido-húmedas. Casi todas las especies son buenas forrajeras naturales.
		<i>Stylosanthes</i>	En el centro y norte de la Argentina existen 6 especies y algunas variedades.
		<i>Arachis</i>	Hierbas anuales o perennes. Género sudamericano termófilo. En la flora argentina está representado por 4 especies silvestres y una cultivada
	<i>Genisteas</i>	<i>Crotalaria</i>	En las regiones cálidas de ambos hemisferios hay 400 especies. En América desde el sur de Estados Unidos hasta la Argentina subtropical y Uruguay. En la Argentina existen por lo menos 5 especies indígenas y 2 introducidas. <i>C. anagyroides</i> se encuentra desde Misiones hasta el Delta del Paraná, además existe en Salta y Jujuy
	<i>Trifolieas</i>	<i>Medicago</i>	No hay especies indígenas en América, pero muchas se han aclimatado por el cultivo o se han naturalizado.
	<i>Viceas</i>	<i>Vicia</i>	Hierbas anuales o perennes. Las 150 especies que comprenden este género, vegetan principalmente en la zona templada del hemisferio boreal. Casi todas las especies son forrajeras con alto valor nutritivo.
<i>Faseoleas</i>	<i>Centrosema</i>	Hierbas perennes, volubles o rastreras, o trepadoras altas. De las 35 especies exclusivamente americanas, en la Argentina se conocen 5	

Subfamilia	Tribu	Género	Características
	<i>Faseoleas</i>	<i>Glycine</i>	La especie más conocida y útil es <i>Glycine max</i> (soja) que fue introducida en Argentina en 1882 y 1889
		<i>Erythrina</i>	Arboles o arbustos erectos, de madera blanda. Habita las regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo. Cuenta con 105 especies, tres de ellas son indígenas de nuestro país. <i>E. falcata</i> es el seibo salteño, mientras que <i>E. cristagalli</i> es la flor nacional
		<i>Eriosema</i>	Más de 100 especies, sobre todo en África y América tropical, son plantas heliófilas, típicas de la vegetación de sabanas. En la Argentina se pueden encontrar algunas en el norte. Su uso no es muy difundido pero <i>E. edule</i> (albarillo del campo) tiene vainas comestibles
		<i>Calopogonium</i>	Son hierbas perennes, volubles o erguidas. Es un género pequeño extendido a través de toda América tropical, desde México hasta el norte de la Argentina, contando con 8 especies
		<i>Vigna</i>	Hierbas anuales o perennes. La gran mayoría de las especies (80) son de origen africano, y media docena son americanas. La especie nativa es <i>V. luteola</i> , y tres especies exóticas se cultivan aquí por sus semillas comestibles o por su valor forrajero. La especie más conocida es <i>V. sinensis</i> (caupí)
		<i>Phaseolus</i>	Plantas glabras, pubescentes o hirsutas, a veces con follaje levemente adherente. Género que consta con más de 180 especies, en general polimorfos, distribuidas en zonas cálidas de ambos hemisferios, pero con predominancia manifiesta en América. En la flora argentina están bien representadas con 18 especies indígenas y algunas cultivadas. Entre las cultivadas la más importante económicamente es <i>Phaseolus vulgaris</i> (poroto) que se cultiva principalmente en el NOA
		<i>Macroptilium</i>	Leguminosa de clima tropical, forrajera, perenne con sistema radicular bien desarrollado que le permite soportar sequías prolongadas. El cultivar más conocido es Siratro que fue desarrollado en Australia.

Tabla 1: Especies de leguminosas utilizadas en este trabajo. Los datos de esta tabla fueron extraídos de Leguminosas argentinas Burkart, 1952.

Breve historia de la taxonomía rizobiana

Los estudios de los microorganismos causantes de la formación de nódulos y de la leguminosa nodulada fueron realizados casi simultáneamente. Frank (1879) propuso que el simbionte era un hongo nombrándolo *Schinzia leguminosarum*. Cuando Beijerinck (1888) aisló bacterias de los nódulos las llamó *Bacillus radicicola*, pero al año siguiente Frank publicó un trabajo en el que los denominó *Rhizobium leguminosarum*, nombre que continúa en la actualidad. En 1932 Fred, Baldwin & McCoy publicaron un libro que resumió lo estudiado hasta ese momento, y que fue utilizado como libro de referencia prácticamente sin cambios hasta 1982. Para definir las seis especies, *Rhizobium leguminosarum*, (nodula *Lathyrus*, *Pisum*, *Vicia* y *Lens*), *R. trifolii* (*Trifolium*), *R. phaseoli* (*Phaseolus*), *R. meliloti* (*Melilotus*, *Medicago*, *Trigonella*), *R. japonicum* (*Glycine max*) y *R. lupinus* (*Lupinus*) se utilizaron las características del rango hospedante, diferencias morfológicas y fisiológicas (Young *et al.*, 1996).

La progresión de la diversidad encontrada en los rizobios llevó a cuestionar el uso del rango de huésped como criterio de clasificación. En particular Jordan en 1982 propuso mover los rizobios de crecimiento lento a un género nuevo llamado *Bradyrhizobium*. La taxonomía numérica permitió combinar los datos clásicos de fisiología, morfología y serología de una manera más rigurosa evitando subjetividad al asignar similitudes. Luego el desarrollo de las técnicas de la biología molecular, que introducen numerosos datos para cada microorganismo, condujeron a la definición de nuevos taxones y/o revisiones de los mismos (Young *et al.*, 1996).

Taxonomía rizobiana actual y filogenia

La familia *Rhizobiaceae* se encuentra, en términos filogenéticos (inferidos por comparación del análisis de las secuencias de 16S ADN_r), emparentada con las familias *Bartonellaceae*, *Brucellaceae* y *Phyllobacteriaceae* de las α -Proteobacteria. Esta nomenclatura de las familias es la propuesta por la segunda edición del Manual Bergey de Bacteriología Sistemática (<http://www.cme.msu.edu/Bergeys>). Las bacterias que son capaces de formar nódulos fijadores de nitrógeno en plantas y árboles de leguminosas se dividen actualmente en 6 géneros *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*. En la Tabla 2 se muestra la clasificación actual de los rizobios, así como también la planta huésped de donde fueron aislados.

Género	Especie	Huésped
<i>Allorhizobium</i>	<i>A. undicola</i>	<i>Neptunia natans</i>
<i>Azorhizobium</i>	<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. elkanii</i>	<i>Glicine max</i>
	<i>B. japonicum</i>	<i>Glicine max</i>
	<i>B. liaoningense</i>	<i>Glicine max</i>
<i>Mesorhizobium</i>	<i>M. amorphae</i>	<i>Amorpha fruticosa</i>
	<i>M. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>
	<i>M. huakuii</i>	<i>Astragalus</i> spp.
	<i>M. loti</i>	<i>Lotus</i> spp.
	<i>M. mediterraneum</i>	<i>Cicer arietinum</i>
	<i>M. plurifarium</i>	<i>Acacia, Leucaena</i>
	<i>M. chacoense</i>	<i>Prosopis alba</i>
<i>M. tianshanense</i>	<i>Glycyrrhiza, Sophora, Glycine</i> y otras.	
<i>Rhizobium</i>	<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus vulgaris, Mimosa affinis</i>
	<i>R. galegae</i>	<i>Galega</i> spp.
	<i>R. gallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
	<i>R. giardinii</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
	<i>R. hainanense</i>	<i>Stylosanthes</i> spp., <i>Centrosema</i> spp., <i>Desmodium</i> spp., <i>Tephrosia</i> spp.
	<i>R. huatlense</i>	<i>Sesbania herbacea</i>
	<i>R. leguminosarum</i>	<i>Vicia, Trifolium, Phaseolus vulgaris</i>
	<i>R. mongolense</i>	<i>Medicago ruthenica, Phaseolus vulgaris</i>
	<i>R. tropici</i>	<i>Phaseolus vulgaris, Leucaena</i>
	<i>R. yanglingense</i>	<i>Coronilla varia, Gueldenstaëdtia</i> <i>multiflora, Amphicarpaea trisperma</i>
<i>Sinorhizobium</i>	<i>S. arboris</i>	<i>Acacia senegal, Prosopis chilensis</i>
	<i>S. fredii</i>	<i>Glicine max</i>
	<i>S. kostiense</i>	<i>Acacia senegal, Prosopis chilensis</i>
	<i>S. medicae</i>	<i>Medicago</i> spp.
	<i>S. meliloti</i>	<i>Medicago sativa</i>
	<i>S. saheli</i>	<i>Sesbania</i> spp.
	<i>S. terangaë</i>	<i>Sesbania, Acacia</i>
	<i>S. xinjiangense</i>	<i>Glicine max</i>

Tabla 2: Género, especie y huésped de los rizobios.

El género *Allorhizobium* (*allos* es otros, significa otros rizobios, puesto que se encuentra filogenéticamente separado del resto de los rizobios), está compuesto por una especie *A. undicola*, fue descrito por de Lajudie *et al* en 1998 y se caracteriza por formar nódulos en *Neptunia natans*, sus parientes más cercanos son *R. galegae* y *Agrobacterium vitis*. La cepa tipo es ORS 992. Recientemente Young *et al.* (2001) realizaron una revisión de la clasificación rizobiana y llegaron a la conclusión de que no existen argumentos suficientes para crear un nuevo género y proponen renombrarla como *Rhizobium undicola*.

Azorhizobium caulinodans es una especie nodulante de tallo y es la única especie de este género (Dreyfus *et al.*, 1988). La cepa tipo de esta especie es ORS 571. *Azorhizobium* y *Xanthobacter* son muy similares en sus secuencias de ADN_r, pero varias divergencias morfológicas y bioquímicas justifican la separación de los géneros.

Los bradirizobios son de crecimiento lento y están compuestos por tres especies *B. elkanii* (Kuykendall *et al.*, 1992), *B. japonicum* (Jordan, 1984) y *B. liaoningense* (Xu *et al.*, 1995). La taxonomía de este grupo resulta confusa, inicialmente todas las especies que nodulaban soja efectivamente fueron agrupadas según reacciones serológicas pero en conjunto se las denominaba *B. japonicum* (Jordan, 1982). Como la diversidad dentro de este género era grande Kuykendall (1992) propuso para uno de los grupos serológicos (grupo II) el nombre de *B. elkanii*. Las cepas remanentes del grupo de *B. japonicum* son aún muy diversas y un número mayor de especies deben ser reconocidas. En 1995 Xu *et al.* proponen una nueva especie, *B. liaoningense*, que se distingue por ensayos de hibridación ADN-ADN además de su excepcional crecimiento lento. Actualmente hay muchas cepas que pertenecen claramente al género pero no nodulan soja, ellas son conocidas como *Bradyrhizobium* sp. seguido por el nombre de la especie leguminosa de donde se han aislado. Eventualmente por criterios de similitud se los clasifica como *B. japonicum* o *B. elkanii* pero en esta clasificación se está excluyendo el rango de huésped (Young *et al.*, 1996).

El género *Mesorhizobium* (Jarvis *et al.*, 1997) tiene su nombre porque las especies que lo componen tienen un crecimiento intermedio entre los rizobios y bradirizobios. Algunas de las especies tienen flagelación polar o subpolar mientras que los rizobios de crecimiento rápido presentan flagelos peritricos. Otra característica que los distingue es la integración de los genes simbióticos en el cromosoma (Broughton *et al.*, 1999; Sullivan *et al.*, 1996, Ronson *et al.*, 1999). Las especies que comprenden este género son *M. loti*, *M. ciceri* (Nour *et al.*, 1994), *M. huakuii* (Chen *et al.*, 1991), *M. mediterraneum* (Nour *et al.*, 1995), *M. tianshanense* (Chen *et al.*, 1995), *M. plurifarum* (de Lajudie *et al.*, 1998), *M. amorphae* (Wang *et al.*, 1999) y *M. chacoense* (Velásquez *et al.*, 2001).

El género *Rhizobium* es filogenéticamente heterogéneo formado por dos grupos definidos por análisis de la secuencia del gen 16S ARNr: *Rhizobium etli* (Segovia *et al.*, 1993), *Rhizobium gallicum* (Amarger *et al.*, 1997), *Rhizobium hainanense* (Chen *et al.*, 1997), *R. leguminosarum* (Jordan, 1984), *Rhizobium mongolense* (van Berkum *et al.*, 1998), *Rhizobium tropici* (Martinez-Romero *et al.*, 1991) y *R. yanglingense* (Tan *et al.*, 2001) que forman una rama del árbol (Figura 4) mientras que *Rhizobium galegae* (Lindström, 1989), *Rhizobium huautlense* (Wang *et al.*, 1998) y *Rhizobium giardinii* (Amarger *et al.*, 1997) se encuentran en ramas separadas.

Finalmente otro grupo de rizobios de crecimiento rápido está clasificado dentro del género *Sinorhizobium* que se distingue principalmente por la información que ha dado la taxonomía numérica y en especial por su secuencia de 16S ARNr. Las especies que lo componen son *S. fredii* (Scholla *et al.*, 1984), *S. meliloti* (Jordan, 1984), *S. saheli* y *S. terangaie* (de Lajudie *et al.*, 1994), *S. medicae* (Rome *et al.*, 1996), *S. xianjianense* (Chen *et al.*, 1998), *S. arboris* y *S. kostiense* (Nick *et al.*, 1999)

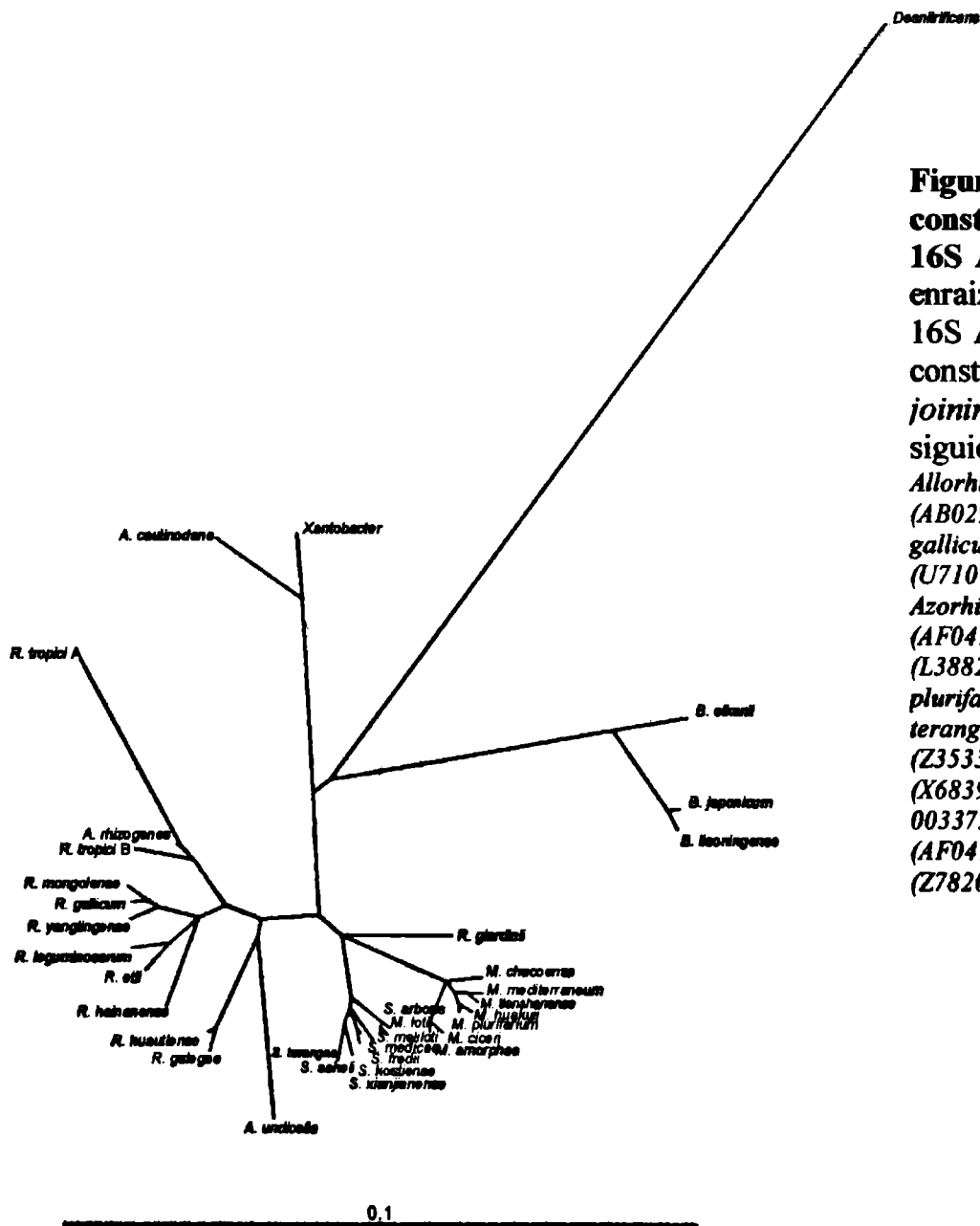


Figura 4: Dendrograma de similitud construido a partir de las secuencias del gen 16S ADN de especies de rizobios. Árbol no enraizado correspondiente a las secuencias de 16S ADN de rizobios conocidos. El árbol fue construido usando el método de neighbor joining. Las secuencias utilizadas fueron las siguientes: *Agrobacterium rhizogenes* (D12788), *Allorhizobium undicola* (Y17047), *B. liaoningense* (AB029402), *M. ciceri* (U07934), *R. galegae* (D12793), *R. gallicum* (U86343), *R. giardinii* (U86344), *R. hainanense* (U71078), *R. huakuii* (D12797), *R. huautlense* (AF025852), *Azorhizobium caulinodans* (D13948), *M. amorphae* (AF041442), *S. medicae* (L39882), *M. mediterraneum* (L38825), *M. loti* (D14514), *R. mongolense* (U89817), *M. plurifarum* (Y14158), *M. tianshanense* (U71079), *S. terangaie* (X68388), *B. elkanii* (U35000), *B. japonicum* (Z35330), *S. fredii* (X67231), *R. etli* (U28910), *S. saheli* (X68390), *S. meliloti* (X67222), *R. yanglingense* (AJ003375), *M. chacoense* (AJ 278249), *M. tianshanense* (AF041447), *S. xianjianense* (AF250377), *S. arboris* (Z78204), *S. kostiense* (Z78203).

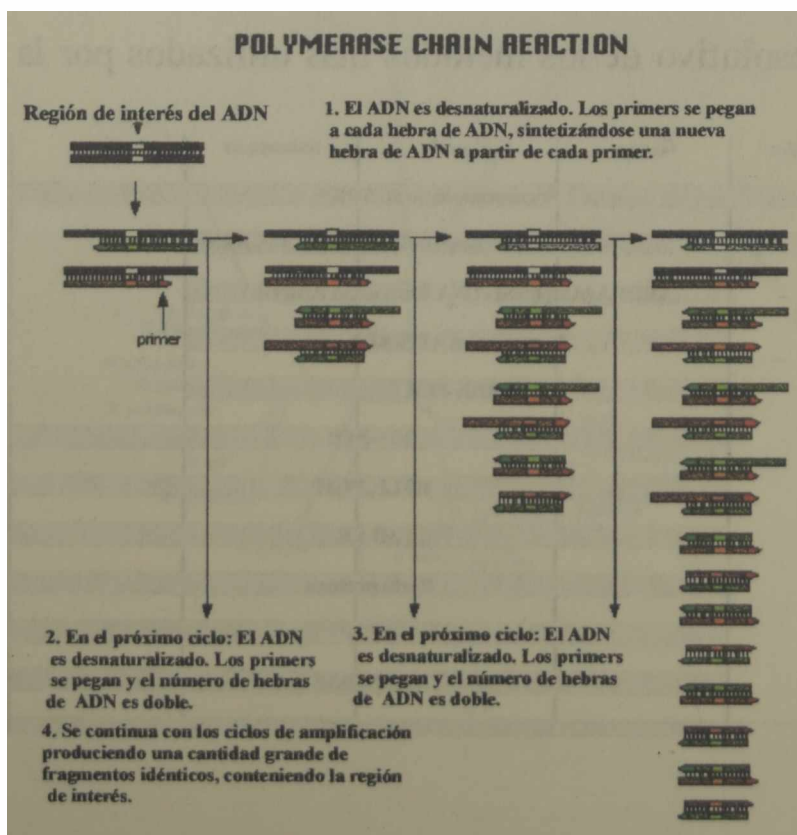
En las próximas secciones se describirán algunas de las herramientas que se utilizan para identificar taxonómicamente a los microorganismos.

1- *Multilocus enzyme electrophoresis* (MLEE)

Es posible estimar las relaciones genéticas entre los microorganismos por comparación de variaciones alélicas entre distintos genes altamente conservados. En el caso de MLEE se comparan las movilidades electroforéticas de distintas enzimas acuosolubles involucradas en el metabolismo. Esta técnica provee información sobre la organización de las variaciones genéticas de una especie. Sin embargo, como mediante este método se evidencia diferencias en las cargas de los aminoácidos, no se revela información a escala fina de recombinaciones genéticas. En el campo de la rizobiología se ha aplicado en diversos trabajos: Eardly *et al.* (1990), Martínez-Romero *et al* (1991), Spaink *et al* (1998).

2- Análisis de perfiles de *fingerprints* generados por *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Se han identificado tres familias de elementos repetitivos, incluyendo la secuencia de 35-40 pb REP (*Repetitive Extragenic Palindromic*), la secuencia de 124-127 pb ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) y el elemento BOX de 154 pb (Versalovic *et al.*, 1994). Estas secuencias se encuentran distribuidas en distintas posiciones intergénicas a lo largo del genoma, lo cual motivó el desarrollo de una metodología que se denominó rep-PCR para mostrar las variaciones entre los genomas debido a sus localizaciones relativas. Los elementos repetitivos pueden estar presentes en ambas orientaciones, y se han diseñado oligonucleótidos para iniciar la síntesis hacia fuera de las secuencias repetitivas (ERIC y REP)



y para la subunidad boxA de BOX en la reacción de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Mediante la reacción de PCR, ilustrada en la Figura 6, se pueden obtener altas concentraciones de un fragmento de ADN, es por ello que se escribe comúnmente amplificación de una determina región de ADN.

Figura 6: Reacción en cadena de la polimerasa, PCR. Esquema ilustrativo en el que se muestra como a partir de un molde de ADN se amplifica un fragmento de ADN mediante la utilización de los oligonucleótidos adecuados.

Los fragmentos amplificados pueden ser resueltos en una matriz de un gel de agarosa y cada producto se llama *rep-fingerprint* (Figura 7). Estos *fingerprints* recuerdan a los códigos de barras utilizados en los productos que consumimos habitualmente en un supermercado. Los *rep-fingerprints* se analizan con programas de computación para encontrar grupos de similitudes entre los aislamientos estudiados.

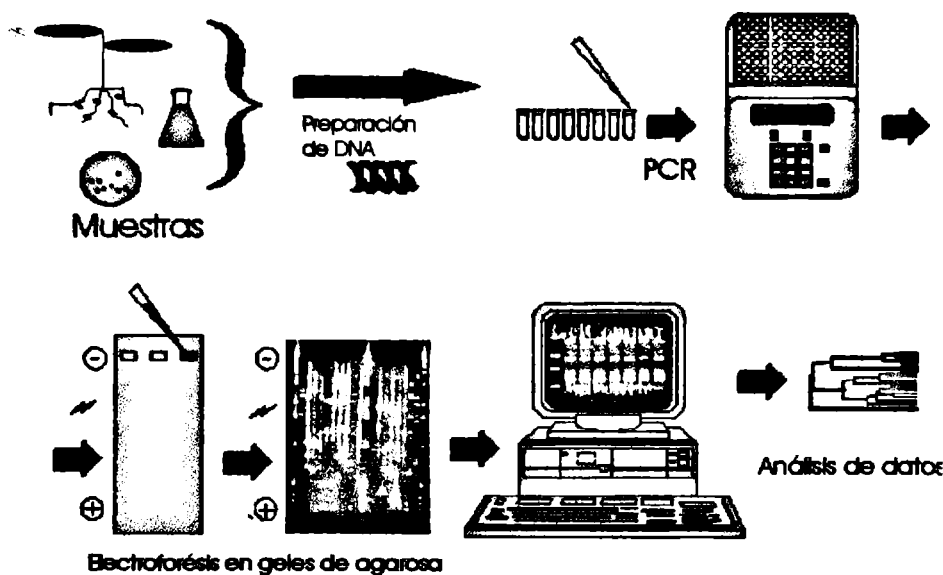


Figura 7: Generación de perfiles de fingerprints. A partir de diferentes muestras se realiza la preparación del ADN, el cual es utilizado como molde en la amplificación por PCR con los *primers* correspondientes. El producto de la reacción es revelado por electroforésis y tinción con bromuro de etidio. Los patrones de bandas obtenidos son analizados con programas de computación

3- Análisis de secuencia de ADN

El estudio de las secuencias de genes o regiones genómicas puede ser abordado mediante diferentes protocolos tales como, RFLP (*Restriction Fragment Length Polimorphims*) o secuenciamiento. La primera metodología es una aproximación que compara el polimorfismo en los sitios de restricción de dos o más secuencias. El secuenciamiento de una región del ADN es un método confiable que se reproduce de un laboratorio a otro y no requiere condiciones especiales de cultivo como ocurre con otras técnicas.

Una vez obtenida la secuencia se la utiliza para buscar homología en bancos de datos o para compararla con otras secuencias ya obtenidas y deducir relaciones filogenéticas.

4- Taxonomía numérica

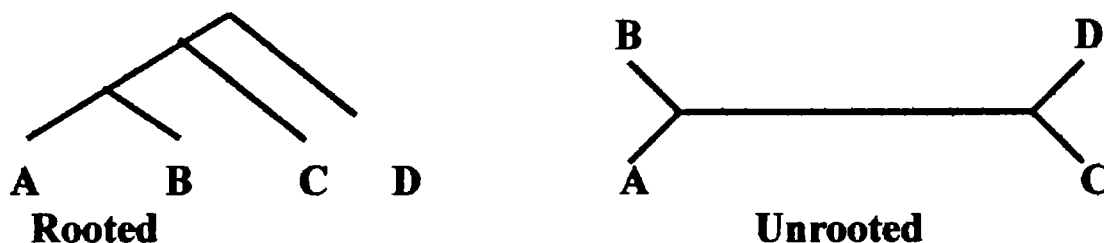
La taxonomía agrupa a los organismos dentro de un número de grupos cuyas características se mantienen constantes, esto permite la clasificación de las especies. Para estudios evolutivos la clasificación también permite la realización de construcciones filogenéticas (Bruce Weir).

Es necesario distinguir entre datos fenéticos y cladistas. Desde el punto de vista fenético las relaciones están basadas en la similitud a partir de un grupo de características fenotípicas o genotípicas del organismo en estudio. Mientras que las relaciones cladistas, contienen información de datos ancestrales y pueden ser usados para estudiar las vías de la evolución.

Ambas relaciones son representadas como árboles o dendrogramas (llamados fenogramas o cladogramas respectivamente).

En general los árboles filogenéticos representan las vías de la evolución y se pueden comparar dendrogramas de las especies con los realizados a partir de los genes. Esta comparación no suele ser igual puesto los árboles de los genes se construyen a partir de una región reducida del genoma, mientras que los árboles de las especies contienen mayor número de información. Además dos especies pueden tener genes que divergen antes o después de la separación de las especies. En este sentido la elección de la secuencia a comparar juega un papel muy importante en el análisis posterior de los dendrogramas.

Otra distinción que se hace entre los árboles es si son *rooted* (enraizados) o *unrooted* (no enraizados). Un árbol enraizado contiene la noción de un orden temporal, mientras que un árbol no enraizado meramente refleja distancias entre las unidades comparadas y no da la noción de cual es ancestral a cual.



En la historia de la filogenia se pueden describir tres métodos principales de ordenamientos:

1. **Matriz de distancia:** Estos métodos se basan en un grupo de distancias calculadas entre cada par de especies, entre ellos mencionaremos en *de neighbor-joining* (NJ). La calidad de los árboles depende de la calidad de las distancias medidas.
2. **Máxima parsimonia:** Este método busca la minimización del número de cambios entre especies, requiere además valores constantes de cambios entre especies. Bajo el criterio de parsimonia se elige la hipótesis más simple para explicar los datos y la inferencia de filogenias se realiza seleccionando el o los árboles que presentan el menor número de pasos evolutivos.
3. **Método de máxima verosimilitud (MV):** Bajo el criterio de MV se concluye que la historia con mayor probabilidad de originar el estado actual de hechos es la hipótesis de elección frente a otra historia con menor probabilidad de producir ese mismo estado (Swofford *et al.*, 1996). Esta clase de construcciones es computacionalmente demandante, usan eficientemente todos los datos y reducen todo a un grupo de distancias. Se los suele utilizar para hacer inferencias estadísticas.

El análisis de *bootstrapping* se utiliza para estimar el significado estadístico de las ramas individuales dentro de un árbol. El *bootstrapping* es un método de “muestreo con reemplazo”, donde cada columna del alineamiento puede utilizarse como “muestra” para generar un determinado número de alineamientos artificiales (usualmente 100). A partir de cada uno de estos se produce un árbol y se registra en cuántos de ellos se encuentran los mismos patrones de ramas. Si un determinado patrón se obtiene en un 70% de los árboles se dice que tiene un respaldo del 70%. Las ramas que tienen un valor de *bootstrapping* mayor al 70% tienen una probabilidad del 95% de ser correctas (Lake and Moore, 1998).

En este trabajo se emplearán principalmente dendrogramas de similitud (fenogramas), con lo cual no se realizarán inferencias filogenéticas a partir de los árboles construidos, solamente se los usará para analizar la similitud entre los microorganismos estudiados.

5- Hibridación ADN-ADN

Las secuencias de ADN pueden ser comparadas en función de su similitud o su complementación. La similitud entre dos secuencias está dada en principio por la proporción de bases que es idéntica.

La complementaridad es determinada por la regla de apareamiento de bases (A y T, G y C). En un *duplex* perfecto de ADN, las hebras son totalmente complementarias. Si se comparan dos moléculas de ADN de organismos cercanos, cada hebra de la primera será similar a una hebra de la segunda molécula, y serán parcialmente complementarias. La complementaridad puede ser medida directamente por la habilidad de dos hebras simples de ADN de aparearse. Cuando dos hebras simples de ADN diferentes son renaturalizadas (se complementan) al proceso se lo llama hibridación. La habilidad de dos preparaciones de ácidos nucleicos de hibridar constituye un ensayo para medir la complementación entre las secuencias.

6- Análisis del operón ARNr y sus aplicaciones en los estudios moleculares ecológicos

Los ribosomas son los encargados de catalizar la síntesis de proteínas y por lo tanto constituyentes fundamentales para la proliferación de células eucariotas y procariotas. Su composición es de un 35% de proteínas y 65% de ARNs. En eubacterias estos ARNs son 16S ARNr, 23S ARNr y 5S ARNr. La molécula de 16S ARNr forma junto con 21 proteínas la subunidad menor de 30S, mientras que el 23S ARNr junto con el 5S ARNr y 34 proteínas forman la subunidad mayor de 50S. Ambas subunidades se ensamblan para formar el ribosoma funcional con coeficiente de sedimentación de 70S y un diámetro aproximado de 18 nm.

Los genes que codifican para estos ARNr se encuentran constituyendo un operón que posee una organización que se mantiene esencialmente de una célula a otra. La organización del operón consiste en una región promotora compuesta por dos promotores P1 y P2, siendo P1 el promotor principal. Esta región está seguida por una secuencia que codifica para el gen 16S ARNr (1540 pb), una región espaciadora o intergénica (en algunos casos puede presentar secuencias codificantes para ARNts); la secuencia que codifica para el gen 23S ARNr (2900 pb), se continúa una secuencia espaciadora pequeña y por último la secuencia que codifica para el 5S ARNr (120 pb).

En algunas bacterias el operón se extiende aún más incluyendo secuencias codificantes para ARNts. Este grupo de genes está presente en el genoma en múltiples copias y el número de copias puede variar de un grupo de microorganismo a otro (Gütler *et al.*, 1996; Garnier *et al.*, 1991).

En los últimos años el análisis de la secuencia del gen 16S ARNr permitió a la ecología microbiana realizar asignaciones de especie bacterianas a organismos aun no clasificados, y de esta manera detectar también nuevas especies microbianas (Diouf *et al.*, 2000; de Lajudie *et al.*, 1998a; de Lajudie *et al.*, 1998b, Wang *et al.*, 1999; Nick *et al.*, 1999, Wang *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1997; Laguerre *et al.*, 1994). Se ha demostrado la correlación de este análisis con otras técnicas como la hibridación ADN-ADN, ADN-RNA, MLEE, etc (Lagerre *et al.*, 1993; Fitz-Gibbon *et al.*, 1999, Willems *et al.*, 2001, Cho *et al.*, 2001).

Los genes 16S ARNr y 23S ARNr presentan además, todas las características que definen a **un marcador filogenético:**

- 1- Los ARNr están presentes en todos los organismos y cumple la misma función.
- 2- Los ARNr se originaron a partir de un ancestro común, puesto que son homólogos.
- 3- Su secuencia nucleotídica es altamente conservada en algunas regiones y contiene regiones variables, el porcentaje de mutación es relativamente bajo comparado con otros genes. Trabajos anteriores (Laguerre *et al.*, 1994; Young *et al.*, 1991) revelaron que las secuencias del gen 16S ARNr es conservada a nivel de especie, otra característica de este gen es que la longitud de 1540 pb permanece constante en la mayoría de las eubacterias (Neefs *et al.*, 1990; Young *et al.*, 1991).
- 4- Las moléculas de 16S y 23S ARNr son relativamente grandes, con lo cual contienen suficiente información en su secuencia para realizar comparaciones estadísticamente significativas.

- 5- La estructura primaria de estas moléculas está formada por dominios que han evolucionado independientemente y de esta manera ellos contienen suficientes regiones variables para discriminar entre moléculas diferentes (Figura 8).

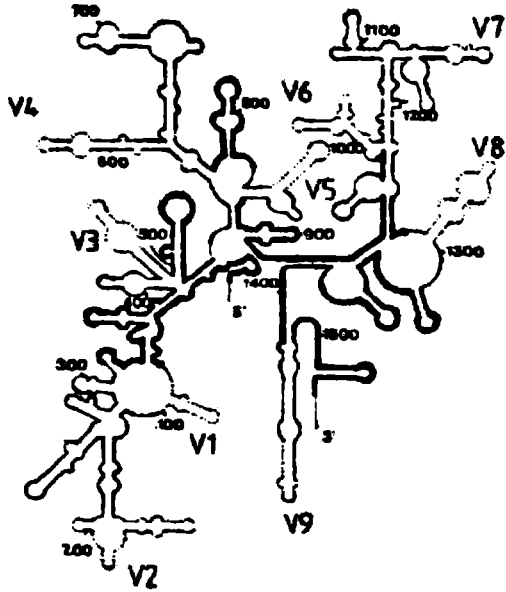


Figura 8: Estructura secundaria del gen 16S ARNr. Con líneas finas se identifican las regiones de conservación casi universal, con líneas gruesas de conservación intermedia y las líneas interrumpidas señalan las zonas hipervariables. Se distinguen 9 regiones hipervariables denominadas V1 a V9 a partir del extremo terminal 5'.

- 6- Un gran número de secuencias se encuentran disponibles en bancos de datos y es posible alinearlas y compararlas gracias a la aplicación de diferentes *softwares* que ofrece el mercado (Olsen *et al.*, 1994; Maidak *et al.*, 1997). Muchos trabajos ya publicados han hecho uso de esta información para diseñar *primers* o sondas las cuales pueden ser género, especie o cepa específicas (Briglia *et al.*, 1996; Stephen *et al.*, 1998; Hever *et al.*, 1999).

El análisis de la secuencia de gen 16S ARNr para la asignación de especies tiene sus limitaciones:

- 1- *Recombinación entre secuencias de 16S ADNr.* En general se asume que este gen no se transfiere entre especies. Sin embargo, Sneath *et al.* (1993), encontró evidencias de recombinación entre diferentes linajes de *Aeromonas*. Un fenómeno similar se piensa ocurre en algunos rizobios. Por ejemplo las primeras 300 pb de la secuencia de 16S de *S. meliloti* es significativamente más similar a *R. leguminosarum*, y no a *M. loti*, sin embargo el resto de la secuencia invierte esta tendencia (Young *et al.*, 1996).
- 2- *Recombinación entre secuencias de 16S ADNr y otros genes.* Las diferencias entre las secuencias de 16S ADNr, no necesariamente están acompañadas por diferencias muy grandes en el genoma (Eardly *et al.*, 1995).
- 3- *Identidad entre especies.* Como es una molécula muy conservada en muchas oportunidades no resulta de utilidad para discriminar entre especies muy cercanas.

- 4- *Heterogeneidad entre especies*. Al comienzo se estudiaron sólo las cepas de referencia pero luego al estudiar más bacterias de la misma especie se encontró que la diferencia entre los miembros de una especie podía llegar al 1%.
- 5- *Heterogeneidad dentro del genoma*. Una bacteria puede tener más de una copia del operón ribosomal, y todas las copias no necesariamente son iguales. Comúnmente la variación se debe a la región intergénica, pero sorprendentemente se han descritos casos en donde la variaciones se encuentran en el gen 16S ARNr (Young *et al.*, 1996).
- 6- *Formación de moléculas quiméricas*. Esta limitación ocurre cuando se amplifica el gen a partir de un cultivo mixto o de una muestra de suelo. Los valores son mayores para microorganismos filogenéticamente relacionados (30%) y decrece cuando la similitud es menor (13% para 84% de similitud).

Teniendo presente las bondades y limitaciones de utilizar este marcador, se considera el análisis de la secuencia de 16S ADNr como una herramienta poderosa para la asignación de especie y es entonces, una de las más utilizadas para estudios evolutivos en ecología microbiana.

7- Análisis de secuencias en geles desnaturalizantes

Una de las herramientas más poderosas para explorar la diversidad microbiana en muestras naturales es el clonado y secuencia del gen que codifica para el 16S ARNr. Por uso de esta técnica se sabe que la diversidad microbiana es mucho mayor de lo que se anticipaba confirmando que las técnicas de cultivo resultan insuficientes para explorar este enorme reservorio de diversidad.

Una posibilidad es obtener *fingerprints* de comunidades microbianas complejas. Se pueden aplicar muchas técnicas, pero la estrategia general para obtenerlos consiste en la extracción de los ácidos nucleicos (ADN o ARN), seguido de la amplificación del gen que codifica para 16S ARNr y por último el análisis de los productos de PCR por técnicas de *fingerprints* genético tal como DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) o TGGE (*Temperature Gradient Gel Electrophoresis*). Este procedimiento fue desarrollado por Fisher y Lerman en 1979 y usado para identificar fragmentos de restricción del ADN del bacteriofago λ que portaban mutaciones puntuales. Posteriormente, en 1985, se utilizó este procedimiento con fines de investigación médica para detectar sustituciones de bases en genes de β -globina obtenidos de pacientes con β -talasemia (Myers *et al.*, 1985). En 1993 Muyzer *et al.* introducen la técnica de DGGE en ecología microbiana y la aplican a diferentes clases de ambientes, que incluyen sedimentos

microbianos del mar de Wadden y *biofilms* bacterianos generados en reactores usados en el tratamiento de residuos acuosos; observando la presencia de bandas bien distinguibles correspondientes a diferentes especies microbianas.

En los dos tipos de electroforesis en gradientes, TGGE y DGGE, los fragmentos de ADN de la misma longitud pero de diferente secuencia pueden ser separados de acuerdo a sus propiedades de fusión (*melting*). Cuando los fragmentos de ADN son electroforados a través de un gradiente lineal incremental desnaturizante, estos permanecen como doble cadena hasta alcanzar la condición de desnaturización del dominio de menor temperatura de fusión (en general 50-200 nucleótidos). En ese momento se produce un cambio conformacional de la molécula que le provoca una disminución de la movilidad. Se suele agregar una secuencia muy rica en G y C (llamada *GC-clamp*) de 40-45 pb unida al extremo 5' del primer *forward* cuya función es la de preveer la desnaturización completa del producto de PCR (Myers *et al.*, 1985). En DGGE, la doble cadena de ADN es separada en un gradiente lineal de urea y formamida a una temperatura elevada constante de aproximadamente 60 °C. En contraste, en TGGE se aplica un incremento lineal de la temperatura en presencia de una concentración alta y constante de urea y formamida para separar los fragmentos de ADN.

En la Figura 9 se muestra el esquema de un gel en gradiente perpendicular a la dirección de corrida. La muestra de ADN a analizar, mezcla de secuencias salvaje y mutante que difieren en una mutación puntual, se electrofora y a medida que los fragmentos avanzan a lo largo del gel, se separan de acuerdo a sus propiedades de fusión. A bajas concentraciones desnaturizantes (parte izquierda del gel), los fragmentos de ADN se mantienen como doble cadena, pero al aumentar la concentración desnaturizante (moviéndose hacia la derecha del gel) los fragmentos de ADN comienzan a desnaturizarse, creando una molécula parcialmente abierta que modifica sus propiedades de corrida según su composición nucleotídica. A muy altas concentraciones desnaturizantes el ADN queda completamente desnaturizado creando dos cadenas simples. La curva así obtenida se denomina sigmoidea.



Figura 9: Gel de DGGE. En el esquema se ejemplifica la separación de dos fragmentos de ADN (salvaje y mutante) de igual longitud pero que difieren en una base en su secuencia. El gradiente desnaturizante es perpendicular a la dirección de corrida.

La posibilidad de identificar miembros de una comunidad constituye una ventaja adicional de la técnica. Se separa una banda del gel y posteriormente se secuencian (Zoetendal *et al.*, 1998) o se puede hibridar una membrana de nitrocelulosa del gel con sondas específicas (Stephen *et al.*, 1998).

Las limitaciones de las técnicas de DGGE y TGGE son las propias de las técnicas comunes como PCR y el manejo de las muestras de origen (suelo, agua, etc). La detección de heteroduplex o moléculas producidas por diferentes operones del mismo organismo y la sensibilidad de detección para miembros de algunas comunidades que puede depender de la sonda utilizada o de los *primers* específicos usados (Nübel *et al.*, 1996) constituyen otras limitaciones características de la técnica. Sin embargo, sorteando estas complicaciones resulta una técnica muy valiosa para el estudio de la dinámica poblacional y fundamentalmente para detectar microorganismos aun no cultivables.

Objetivos de este trabajo y estrategia seguida para su desarrollo

Como se mencionó anteriormente el objetivo del trabajo es el análisis de las poblaciones rizobianas de la región del NOA asociadas a *P. vulgaris* var *aborigineus* y otras leguminosas silvestres que comparten el mismo hábitat. Los objetivos específicos son los siguientes:

- ✓ Establecimiento de una colección de aislamientos de rizobios representativos de la región del NOA.
- ✓ Puesta a punto de técnicas de biología molecular para el estudio de la colección de aislamientos.
- ✓ Desarrollo de un protocolo de DGGE para el estudio de la dinámica poblacional de rizobios en muestras de suelo.
- ✓ Selección de aislamientos representativos de la colección para su caracterización genotípica y fenotípica.
- ✓ Selección de aislamientos eficientes para la fijación simbiótica de nitrógeno.

Para lograr estos objetivos el trabajo se dividió en cuatro etapas principales que fueron desarrolladas en forma secuencial y que se encuentran esquematizadas en la Figura 10.



Figura 10: Estrategia general para el estudio de las poblaciones de rizobios del NOA. La estrategia consistió en el aislamiento de rizobios a partir de muestras de suelo y plantas silvestres noduladas obtenidas en distintos sitios del NOA. Los aislamientos fueron caracterizados por rasgos moleculares y fenotípicos para definir poblaciones e identificar representativos, a partir de los cuales se realizaron ensayos de campo.

Aislamiento de rizobios. A partir de muestras de suelo y plantas noduladas se aislaron los rizobios que fueron conservados en stock de glicerol. Se cuantificaron además, los rizobios de muestras de suelo nodulantes de algunas leguminosas. **Selección de rizobios representativos.** El estudio de las poblaciones se basó en el concepto de representatividad el cual consistió en la selección de aislamientos que representen a una determinada población. Inicialmente el método utilizado para la selección de los aislamientos representativos fue la diferencia en los perfiles de *fingerprints* y en los dendrogramas de similitud construidos a partir de dichos perfiles. **Caracterización de los rizobios representativos** La caracterización fue encarada aplicando una combinación de métodos basados en técnicas de PCR que han sido propuestos para analizar cepas de rizobios y examinar relaciones entre los distintos grupos de microorganismos y también se incluyeron estudios fenotípicos. Estos comprendieron el análisis del operón del

ARNr, análisis de la región intergénica 16S-23S ADNr, la obtención de *fingerprint* de ADN, el estudio del perfil plasmídico, el análisis de los genes de nodulación, la utilización de hidratos de carbono y resistencia intrínseca a antibióticos, el rango de planta hospedante y el análisis de la molécula señal. **Ensayos de competencia y pruebas en campo.** De la caracterización surgieron aislamientos que resultaron en el laboratorio más eficientes en la nodulación, los mismos fueron utilizados para realizar ensayos de inoculación en el campo. Además, se realizaron estudios de competencia entre miembros de especies diferentes.

Bibliografía

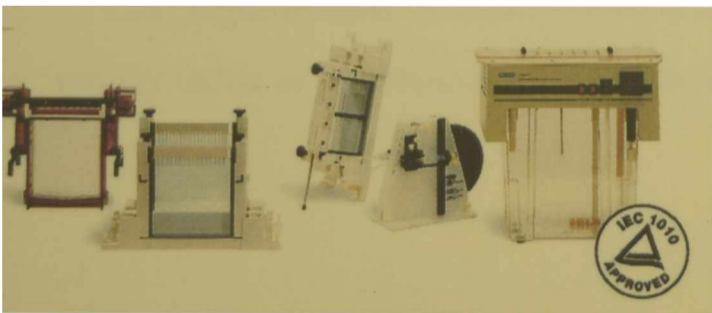
1. **Amarger, N., V. Macheret, and G. Laguerre.** 1997. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**:996-1006.
2. **Briglia, M., R. L. L. Eggen, W. M. De Vos, and J. D. van Elsas.** 1996. Rapid and sensitive method for the detection of *Mycobacterium chlorophenicum* PCP-1 in soil based on 16S rRNA gene-target PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1478-1480.
3. **Broughton, W. J., and X. Perret.** 1999. Genealogy of legume-*Rhizobium* symbioses. *Current Opinion in Plant Biology.* **2**:305-311.
4. **Bruce Weir.** Genetic Sequence analysis.
5. **Burkart, A.** 1952. Las leguminosas argentinas silvestres y cultivadas. Ediciones Acme Agency
6. **Carlson, R. W., N. P. J. Price, and G. Stacey.** 1994. The biosynthesis of rhizobial Lipo-Oligosaccharide nodulation signal molecules. *Mol. Plant. Microb. Int.* **7**:684-695.
7. **Chen, W. X., E. T. Wan, S. Wan, Y. Li, X. Chen, and J. L. Li.** Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp. nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, People's Republic of china. *Int J Syst Microbiol.* **45**:153-159.
8. **Chen, W. X., G. S. Li, Y. L. Qi, E. T. Wan, H. L. Yuan, and J. L. Li.** 1991. *Rhizobium huakuii* sp. nov. Isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. *Int J Syst Microbiol.* **41**:275-280.
9. **Chen, W. X., Z. Y. Tan, J. L. Gao, Y. Li, and E. T. Wang.** 1997. *Rhizobium hainanense* sp. nov., Isolated from tropical legumes. *Int J Syst Microbiol.* **47**:870-873.
10. **Cho, J-C., and J. M. Tiedje.** 2001. Bacterial species determination from DNA-DNA hybridization by using genome fragments and DNA microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:3677-3682.
11. **De Bruijn, F. J., Y. Jing, and F. B. Dazzo.** 1995. Potential and pitfalls of trying to extend symbiotic interactions of nitrogen-fixing organisms to presently non-nodulated plants, such as rice. *Plant and soil.* **174**:225-240.
12. **De la Cruz, F., and J. Davies.** 2000. Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends in Microbiology.* **8**: 128-133.
13. **de Lajudie, P., A. Willems, B. Pot, D. Dewettinck, G. Maestrojuan, M. Neyra, M. D. Collins, B. Dreyfus, K. Kersters, and M. Gillis.** 1994. Polyphasic taxonomy of rhizobia: Enmendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**:715-733.
14. **de Lajudie, P., A. Willems, G. Nick, F. Moreira, F. Molouba, B. Hoste, U. Torck, M. Neyra, M. D. Collins, K. Lindström, B. Dreyfus, and M. Gillis.** 1998. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp nov. *Int J Syst Microbiol.* **48**:369-382.
15. **de Lajudie, P., E. Laurent-Fulele, A. Willems, U. Torck, R. Coopman, M. D. Collins, K. Kesters, B. Dreyfus, and M. Gillis.** 1998. *Allorhizobium undicolla* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. *Int J Syst Microbiol.* **48**:1277-1290.
16. **Debelle, F., C. Plazanet, P. Roche, C. Pujol, A. Savagnac, C. Rosenberg, J.-C. Prome, and J. Denarie.** 1996. The NodA proteins of *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium tropici* specify the N-acylation of Nod factors by different fatty acids. *Mol. Microbiol.* **22**:303-314.
17. **Dénarié, J., and F. Debellé.** 1996. *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: Signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *annu. Rev. Biochem.* **65**:503-535.
18. **Diouf, A., P. de Lajudie, M. Neyra, K. Kesters, M. Gillis, E. Martinez-Romero, and M. Gueye.** 2000. Polyphasic characterization of rhizobia that nodulate *Phaseolus vulgaris* in west Africa (Senegal and Gambia). *Int J Syst Evol Microbiol.* **50**:159-170.

19. Dreyfus, B., J. L. García, and M. Gillis. 1988. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *Int J Syst Bacteriol.* 38:89-98.
20. Dupuy, N., A. Willems, B. Pot, D. Dewettinck, L. vandenbruaene, G. Maestrojuan, B. Dreyfus, K. Kersters, M. D. Collins, and M. Gillis. 1994. Phenotypic and genotypic characterization of bradyrhizobia nodulating the leguminous tree *Acacia albida*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44:461-473.
21. Eardly, B. D., L. A. Materon, N. H. Smith, D. A. Johnson, M. D. Rumbaugh, and R. K. Selander. 1990. Genetic structure of natural populations of the nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:187-194
22. Fisher, S. G., and L. S. Lerman. 1979. Length-independent separation of DNA restriction fragments in two dimensional gel electrophoresis. *Cell.* 16, 191-200.
23. Fitz-Gibbon, S. T., and C. H. House. 1999. Whole genome-based phylogenetic analysis of free-living microorganisms. *Nucleic Acids Res.* 27: 4218-4222.
24. Freiberg, C., R. Fellay, A. Bairoch, W. J. Broughton, A. Rosenthal, and X. Perret. 1997. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature.* 387:394-401.
25. Galibert, F., J. Batut, G. Bothe, A. Goffeau, D. Portetelle, and A. Pühler. 2000. Sequencing the chromosome of *Sinorhizobium meliloti*. 4th European Nitrogen Fixation Conference. p 22.
26. Gao, J. L., J. G. Sun, Y. Li, E. T. Wang, and W. X. Chen. 1994. Numerical taxonomy and DNA relatedness of tropical rhizobia isolated from Hainan province, China. *Int J. Syst Bacteriol.* 44:151-158.
27. Garnier, T., B. Canard, and S. T. Cole. 1991. Cloning, mapping, and molecular characterization of the rRNA operons of *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* 173:5431-5438.
28. Graham, P. H., M. J. Saqdownsky, H. H. Keyser, Y. M. Barnett, R. S. Bradley, J. E. Cooper, D. J. De Ley, B. D. W. Jarvis, E. B. Roslycky, B. W. Strijdom, and J. P. W. Young. 1991. Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root-and stem-nodulating bacteria. *Int J. Syst Bact* 41:582-587.
29. Gürtler, V., and V. A. Stanisich. 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology.* 142:3-16.
30. Hadri, A-E, H. P. Spaink, T. Bisseling, and N. J. Brewin. 1998. Diversity of root nodulation and rhizobial infection processes. p. 347-360. *In* H. P. Spaink, A. Kondorosi and P. J. J. Hooykaas (ed.), *The Rhizobiaceae*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
31. Hennecke, H., K. Kaluza, B. Thony, M. Fuhrmann, W. Ludwig, and E. Stackebrandt. 1985. Current evolution of nitrogenase genes and 16S rRNA in *Rhizobium* species and other nitrogen fixing bacteria. *Arch. Microbiol.* 142:342-348.
32. Jarvis, B. D. W., P. van Berkum, W. X. Chen, S. M. Nour, M. P. Fernandez, J. C. Cleyet-Marel, and M. Gillis. 1997. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. Nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47:895-898.
33. Jordan, D. C. 1982. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1890 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growings, root nodule bacteria from leguminous plants. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32:136-139.
34. Jordan, D. C. 1984. Rhizobiaceae. *In* Krig NR, ed. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1. Baltimore: Williams and Wilkins. 234-256.
35. Kamst, E., J. Pilling, L. M. Raamsdonk, B. J. J. Lugtenberg, and H. P. Spaink. 1997. *Rhizobium* nodulation protein NodC is an important determinant of chitin oligosaccharide chain length in Nod factor biosynthesis. *J. Bacteriol.* 179:2103-2108.
36. Kaneko, T., Y. Nakamura, S. Sato, E. Asamizu, T. Kato, S. Sasamoto, A. Watanabe, K. Idesawa, A. Ishikawa, K. Kawashima, T. Kimura, Y. Kishida, C. Kiyokawa, M. Kohara, M. Matsumoto, A. Matsuno, Y. Mochizuki, S. Nakayama, N. Nakazaki, S. Shimpo, M. Sugimoto, C. Takeuchi, M. Yamada, and S. Tabata. 2000. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti* (supplement). *DNA Res* 7: 381-406 [21082936]
37. Kuykendall, L. D., and B. Saxena. 1992. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* 38:501-505.
38. Ladha, J. K., and R. B. So. 1994. Numerical taxonomy of photosynthetic rhizobia nodulating *Aeschymene* species. *Int J. Syst Bacteriol.* 44:62-73.
39. Laguerre, G., M. P. Fernandez, V. Edel, P. Normand, and N. Amarger. 1993. Genomic heterogeneity among French *Rhizobium* strains isolated from *Phaseolus vulgaris* L. *Int J Syst Microbiol.* 43:761-767.
40. Laguerre, G., M. R. Allard, F. Revoy, and N. Amarger. 1994. Rapid identification of rhizobia by Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:56-63.
41. Lake, J. A., and J. E. Moore. 1998. Phylogenetic analysis & comparative genomics. *Trends guide to Bioinformatics* 22-23.
42. Lindström, K. 1989. *Rhizobium galegae*, a new specie of legume nodule bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39:365-367.

43. Maidak, B. L., G. J Olsen, N Larsen, R Overbeek, M. J McCaughey, and C. R Woese. 1997. The RDP (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res.* 25:109-110.
44. Martínez-Romero, E., L. Segovia, F. M. Mercante, A. A. Franco, P. Graham, and M. A. Pardo. 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* spp trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41:417-426.
45. Martínez-Romero, E., R. Palacios and J. Mora. 1998. Cepas mejoradas de *Rhizobium*. *Investigación y ciencia.* No 265:14-19.
46. Muyzer, G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology.* 1999, 2:317-322.
47. Muyzer, G.; E. C. de Waal, and A. G. Uitterlinden. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 1993, 59:695-700.
48. Myers, R. M.; Fisher, S. G.; Lerman, L. S. and T. Maniatis. Neally all single substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 1985, 13:3131-3145.
49. Neef, J. -M., Y. Van de Peer, L. Hendriks, and R. De wachter. 1990. Compilation of small ribosomal sub-unit RNA sequences. *Nucleic Acids Research.* 18:r2237-r2317.
50. Nick, G., P de Lajudie, B. D. Eardly, S. Suomalainen, L. Paulin, X. Zhang, M. Gillis, and K. Lindström. 1999. *Sinorhizobium arboris* sp. nov. and *Sinorhizobium kostiense* sp. nov., isolated from leguminous trees in Sudan and Kenya. *Int J Syst Microbiol.* 49:1359-1368.
51. Nour, S. M, J. C. Cleyet-Marel, P. Normand, and M. P. Fernandez. 1995. Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp. nov. *Int J Syst Microbiol.* 45:640-648.
52. Nour, S. M, M. P. Fernandez, P. Normand, and J. C. Cleyet-Marel. 1994. *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L.). *Int J Syst Microbiol.* 44:511-522.
53. Nübel, U.; B. Engelen, A. Felske, J. Snair, A. Wiesher, R. L. Amann, W. Ludwig, and H. Backhaus. 1996. Sequence heterogeneity of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* 178:5636-5643.
54. Olsen, G. J., C. R. Woese, and R. Overbeek. 1994. The wind of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. *J. Bacteriol.* 176:1-6.
55. Perret, X., C. Staehelin, and W. J. Broughton. 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:180-201.
56. Phillips, D. A. 2000. Biosynthesis and release of rhizobial nodulation gene inducers by legumes. EW. Triplett Editorial Horizon. Prokaryotic nitrogen fixation: A model system for the analysis of a biological process.
57. Posgate. 1990. Fixing the nitrogen fixers. *New Scientist.* Pag 57-61.
58. Rademaker, J. L. W., and F. J de Bruijn. 1997. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. Capítulo 10. DNA Markers. Wiley-Liss.
59. Rome, S., M. P. Fernandez, B. Brunel, P. Normand, and J. C. Cleyet-Marel. 1996. *Sinorhizobium medicae* sp. nov., isolated from annual Medicago spp. *J. Syst. Bacteriol.* 46:972-980.
60. Ronson, C., J. Sullivan, R. Cruickshank, S. Brown, R. Elliot, D. Fleetwood, A. Hubber, N. McCallum, K. Muirhead, J. Weaver, R. Webby, G. Wijkstra, J. Trzebiatowski and F. de Bruijn. The symbiosis island of a *Mezorhizobium* strain that nodulates *Lotus*. *Nitrogen Fixation: From Molecules to Crop Productivity*, 275-276. © 2000 Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.
61. Rosado, A. S., G. F. Duarte, L. Seldin, and J. D. van Elsas. 1997. Molecular Microbial Ecology: A Minireview. *Revista de Microbiologia.* 28:135-147.
62. Rossum, D. V., F. P Schuurmans, M Gillis, A Muyotcha, H. W. Van Verseveld, A. H Stouthamer, and F. C Boogerd. 1995. Genetic and phenetic analyses of *Bradyrhizobium* strains nodulating peanut (*Arachis hypogaea* L.) roots. *Appl. Env. Microbiol.* 61:1599-1609.
63. Scholla, M. H., and G. H. Elkan. 1984. *Rhizobium fredii* sp. nov., a fast-growing species that effectively nodulates soybeans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34:484-486.
64. Segovia, L., J. P. Young, and E. Martínez Romero. 1993. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strain as *Rhizobium etli* sp. Nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43:374-377.
65. Sneath, P. H. A. 1993. Evidence from *Aeromonas* for genetic crossing-over in ribosomal sequences. *Int J Syst Microbiol.* 43:626-629.
66. Spaink, H. P., A. H. M. Wijfjes, and B. J. J. Lugtenberg. 1995. *Rhizobium* NodI and NodJ proteins play a role in the efficiency of secretion of lipochitin oligosaccharides. *J. Bacteriol.* 177:6276-6281.
67. Spaink, H. P., A. Kondorosi, and P. J. J. Hooykaas. 1998. The Rhizobiaceae. Kluwer Academic Publishers.
68. Stacey, G. 1995. *Bradyrhizobium japonicum* nodulation genetics. *FEMS. microbiol. Lett.* 127:1-9.
69. Stephen, J. R., G. A. Kowalchuck, M-AV Bruns, A. E. McCaig, C. J. Phillips, T. M. Embley, and J. L. Prosser. 1998. Analysis of γ -subgroup proteobacterial ammonia oxidizer populations in soil by denaturing

- gradient gel electrophoresis analysis and hierarchical phylogenetic probing. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2958-2965.
70. Stowers M. D. 1985. Carbon Metabolism in *Rhizobium* species. *Ann. Rev. Microbiol.* **39**:89-108.
71. Sullivan, J. T., B. D. Early, P. van Berkum, and C. W. Ronson. 1996. Four unnamed species of nonsymbiotic rhizobia isolated from the rhizosphere of *Lotus corniculatus*. *Appl. Env. Microbiol.* **62**:2818-2825.
72. Swofford, D. L.; G. J. Olsen; P. J. Waddell, and D. M. Hillis. 1996. In "Molecular Systematics" (D.M. Hillis, C. Moritz and B.K.Mable, ed), pp. 407-514. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
73. Tan, Z. Y., F. L. Kan, G. X. Peng, E. T. Wang, B. Reinhold-Hurek, and X. Chen. 2001. *Rhizobium yanglingense* sp. nov., isolated from arid and semi-arid regions in China. *Int J Syst Evol Microbiol.* **51**:909-914.
74. Velázquez, E., J. M. Igual, A Willems, M. P. Fernández, E. Muñoz, P. F. Mateos, A Abril, N. Toro, P. Normand, E. cervantes, M. Gillis, and E. Martinez-Molina. 2001. *Mesorhizobium chacoense* sp. nov., a novel species that nodulates *Prosopis alba* in the Chaco Arido region (Argentina). *Int J Syst Evol Microbiol.* **51**:1011-1021.
75. Wang, E. T., M. A. Rogel, A. García-de los Santos, J. Martínez-Romero, M. A. Cevallos, and E. Martínez-Romero. 1999. *Rhizobium etli* bv mimosae, a novel biovar isolated from Mimosa affinis. *Int J Syst Bacteriol.* **49**:1479-1491.
76. Wang, E. T., P. van Berkum, D. Beyene, X. H. Sui, O. Dorado, W. X. Chen, and E. Martinez-Romero. 1998. *Rhizobium huautlense* sp. nov., symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*. *Int J Syst Microbiol.* **49**:687-699.
77. Wang, E. T., P. van Berkum, X. H. Sui, D. Beyene, W. X. Chen, and E. Martinez-Romero. 1999. Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from Chinese soils and description of *Mesorhizobium amorphae* sp. nov. *Int J Syst Microbiol.* **49**:51-65.
78. Whitman, W. B., D. C. Coleman, and W. J. Wiebe. 1998. Prokaryotes: The unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**:6578-6583.
79. Willems, A., R. Coopman, and M. Gillis. 2001. Comparison of sequence analysis of 16S-23S rDNA spacer regions, AFLP analysis and DNA-DNA hybridations in *Bradyrhizobium*. *Int. J. Syst. Evol. Bacteriol.* **51**:623-632.
80. Xu, L. M., C. Ge, Z. cui, J. Li, and H. Fan. 1995. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybean. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**:706-711.
81. Young, J. M., L. D. Kuykendall, E. Martinez-Romero, A. Kerr, and H. Sawada. 2001. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *Int J Syst Microbiol.* **51**:89-103.
82. Young, J. P. W., and K. E. Haukka. 1996. Diversity and phylogeny of rhizobia. *New Phytol.* **133**:87-94.
83. Young, J. P. W., H. L. Downer, and B. D. Eardly. 1991. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAi1 by Polymerase Chain Reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. *J. Bacteriol.* **173**:2271-2277.
84. Zoetendal, E. G.; A. D. L. Akkermans, and W. DeVos. 1998. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:3854-3859.

Materiales y Métodos



Materiales y Métodos

Protocolos utilizados y puestos a punto para el aislamiento, almacenamiento y caracterización de la colección de rizobios del NOA

Aislamiento de los rizobios

1- Aislamiento de rizobios a partir de nódulo

Los nódulos de las distintas leguminosas recolectadas, fueron removidos con un bisturí y posteriormente esterilizados superficialmente según el siguiente protocolo:

- Tratamiento con alcohol 96° durante 30 segundos.
- 1 lavado con agua destilada estéril.
- Tratamiento con peróxido de hidrógeno (30 volúmenes) durante 3 minutos.
- 7 lavados con agua destilada estéril

Posteriormente se rompió individualmente cada nódulo resuspendiéndolo en 300 µl de H₂O destilada estéril. Una alícuota de 5 µl de esta suspensión fue plaqueada en el medio sólido YEM-RC. Las placas inoculadas con la muestra fueron incubadas en estufa a 28 °C y a partir de una colonia aislada se realizó otro aislamiento en el mismo medio. Se tomaron muestras de esta última placa para conservar los aislamientos en medio TY con agregado de glicerol al 15%.

2- Aislamiento de rizobios a partir de muestras de suelo

Las muestras de suelos recogidas fueron conservadas a 4 °C hasta el momento de ser analizadas. La recuperación de los rizobios se realizó con la ayuda de leguminosas hospedantes que actuaron como plantas atrapanes. Para ello se sembraron semillas germinadas en condiciones de asepsia en vasos que contenían vermiculita estéril. Posteriormente, al alcanzar el estado de plántula (Figura 1) fueron inoculadas con suspensiones de suelo al 10% (p/p) en H₂O destilada estéril. Se adicionó una capa de arena estéril para prevenir contaminaciones.

Las leguminosas fueron cosechadas al cabo de tres o cuatro semanas y los nódulos recolectados se procesaron como se detalló anteriormente.

Ensayos de nodulación

1-Esterilización y germinación de semillas

Las semillas utilizadas fueron esterilizadas superficialmente usando un tratamiento con alcohol 96° durante 30 segundos, seguido de un tratamiento con hipoclorito de sodio al 20% durante 20 minutos.

Finalmente, se enjuagaron con H₂O destilada estéril. Algunas semillas requieren una modificación de este procedimiento, como es el caso de la semilla de *Leucaena leucocephala* que previamente deben ser sumergidas durante cinco minutos en un baño de agua a 80 °C o las de *Acacia* spp. que se tratan con ácido sulfúrico concentrado durante 30 minutos.

Las semillas fueron germinadas sobre una superficie de agar al 1,5% y sembradas en vasos de 330 cm³ conteniendo, como soporte inerte y libre de nitrógeno fijado, vermiculita estéril. Las semillas utilizadas en los ensayos fueron provistas por el Ingeniero Neumann de INTA-Salta, Cerrillos.

2- Preparación del inoculante bacteriano e inoculación de las plántulas

El inoculante bacteriano se preparó partiendo de una colonia aislada de la bacteria, la cual fue posteriormente incubada a 28 °C a 180 rpm en medio YEM líquido. A partir de los cultivos saturados se sedimentaron los rizobios por centrifugación para eliminar restos de medio de cultivo y se resuspendió el sedimento en igual volumen de H₂O destilada estéril. Se tomaron 2,5 ml de esta suspensión y se los depositó sobre el tallo adyacente a la raíz de la plántula para evitar la dispersión del inoculante (Figura 1). En todos los ensayos se incluyeron controles de

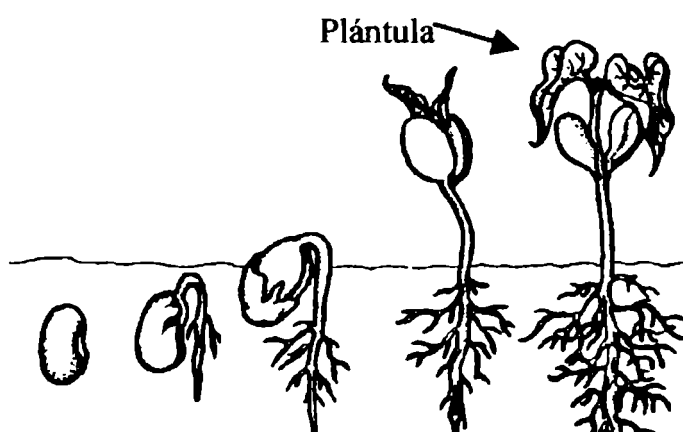


Figura 1: Germinación de poroto. Se muestra modo de ejemplo el estadio llamado plántula utilizado comúnmente para inocular. En la mayoría de los casos se esperó a que los cotiledones se desprendan o los mismos fueron cortados.

leguminosas sin inocular.

Las plantas fueron regadas periódicamente con soluciones de Fahraeus libre de nitrógeno para proveerla de los nutrientes necesarios para el crecimiento. Luego de tres o cuatro semanas

se cosecharon las plantas y se extrajeron los nódulos resultantes de la simbiosis. A partir de los nódulos se aislaron los rizobios utilizados como inoculantes.

Las leguminosas utilizadas para este fin fueron las siguientes: *Medicago sativa*, *Lupinus albus*, *Lupinus mutabilis*, *Macroptilium atropurpureum*, *Phaseolus augusti*, *Phaseolus vulgaris*, *Arachis hypogaea*, *Leucaena leucocephala*, *Glycine max* y *Vigna* spp..

3- Determinación del número de rizobios en las muestras de suelo

La determinación del número de rizobios capaces de nodular *Phaseolus vulgaris*, *Leucaena leucocephala*, *Vigna* pp., *Glicine max* y *Medicago sativa*, se realizó por dilución de la muestra de suelo con agua destilada estéril como se esquematiza en la Figura 2, a este método se lo llama Método del Número Más Probable (NMP). Tres mililitros de cada dilución de suelo fueron inoculados sobre el tallo de la plántula, adyacente a la raíz de la leguminosa. Se inocularon cuatro plantas por dilución. Luego de tres semanas se cosecharon las plantas de poroto (en el caso de *Leucaena leucocephala*, *Vigna* spp. y *Glicine max* se esperaron cuatro semanas) y se contó el número de plantas noduladas. Con este valor y el número de repeticiones por dilución de suelo se estimó el número de unidades formadoras de nódulos por gramo de suelo UFN/gr según lo descrito por Somasegaran (1985). Para expresar el resultado por gramo de suelo seco, se tomó una porción de la muestra y se determinó su humedad mediante secado en estufa de 60 °C.

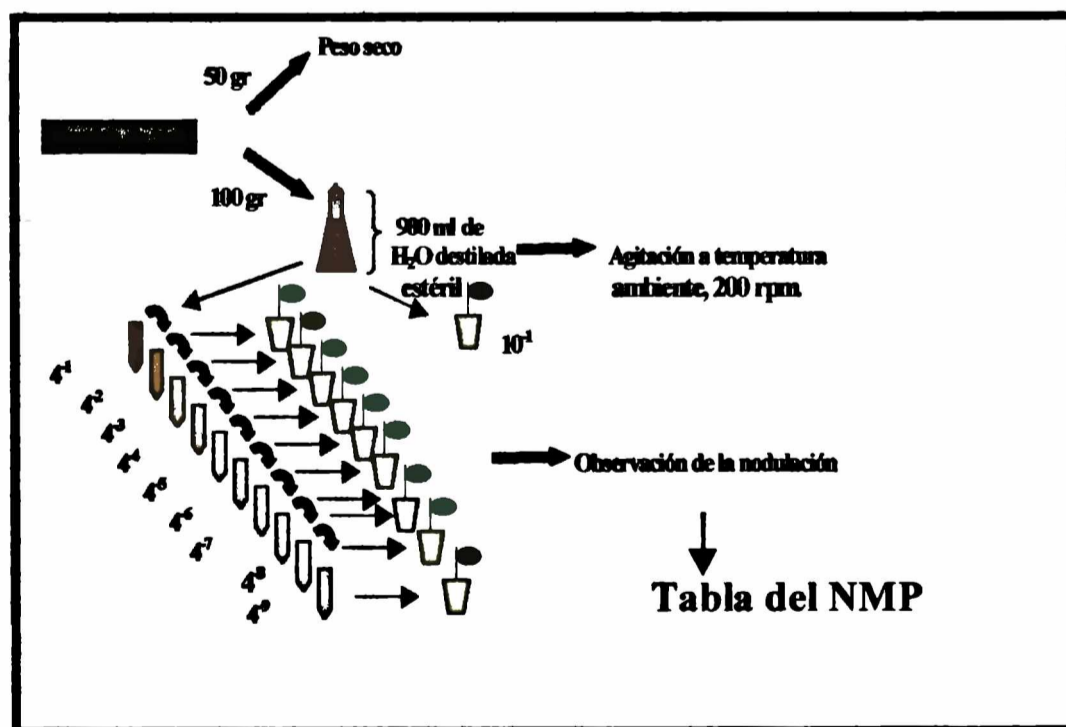


Figura 2: Cuantificación de rizobios en muestras de suelo. Esquema del protocolo seguido para cuantificar el número de rizobios por gramo de tierra por el método de las diluciones de suelo. La agitación de la muestra se produjo durante 30 minutos.

4- Determinación del peso seco de la parte aérea de la leguminosa

Semillas germinadas de poroto negro (*Phaseolus vulgaris* L. cultivar Negro NAG12, INTA Estación Experimental Salta, Argentina) fueron transferidas a vasos plásticos de 500 ml conteniendo vermiculita estéril. Repeticiones de 5 plántulas fueron inoculadas con 3 ml de una suspensión saturada de rizobios en medio YEM. Las condiciones de la cámara de cultivo consistieron en dos ciclos de 12 hs con 20 °C y 25 °C respectivamente y 70% de humedad. Luego de 6 semanas de crecimiento se cosecharon 5 plantas por tratamiento y se secó en estufa a 60 °C la parte aérea hasta peso constante.

5- Ensayos en campo

Se realizaron dos experimentos de campo en los años 1999 y 2000 durante la estación de siembra de poroto (enero-febrero) en la localidad de Cerrillos en Salta. Las características principales del suelo son: pH 6,4; contenido de nitrógeno, 0,1%; carbón orgánico, 1,03%; materia orgánica, 1,78 % y fósforo, 10 ppm. El número de rizobios nodulantes de poroto fue estimado por el método de diluciones de suelo (Vincent, 1970).

El diseño experimental consistió en bloques randomizados con 4 réplicas por parcela 5x2 m, con 0,5 m entre líneas. La inoculación fue realizada por mezcla de 50 gr de inoculante en turba (10^9 rizobios por gramo), 50 ml de un cultivo de rizobio (10^9 rizobio por ml) y 1 Kg de semillas de poroto cultivar Negro Camilo (INTA Estación Experimental Salta, Argentina). Se agregó también 0,3% (p/v) de sacarosa para favorecer la adherencia. En los ensayos se incluyeron controles sin inocular, conteniendo o no nitrógeno como fertilizante (25 Kg de N por hectárea como urea en el momento de la siembra y 25 Kg de N por hectárea previo a la floración). Alrededor de los 100 días después de la siembra se completó la maduración de la vaina y se evaluó la producción como el peso del grano (11,5% de humedad). Los datos fueron estadísticamente estudiados por análisis de varianza.

Preparación de ADN total a partir de cultivos puros de rizobios y muestras de suelo

1- Preparación de ADN a partir de medio sólido

Se resuspendieron tres o cinco colonias aisladas en 300 µl de NaCl 1 M, las mismas fueron tomadas con un ansa o una punta (tip) a partir de una caja YEM o TY. Se vortexeó para favorecer la homogenización de la muestra y se incubó a temperatura ambiente durante 15-60 minutos. Luego se centrifugó 3 minutos a 21000 g para recolectar los rizobios, el *pellet* fue

resuspendido en 300 μ l de bidestilada estéril se centrifugó nuevamente y se adicionó 150 μ l de una suspensión acuosa (6% p/v) de resina en agitación (Chelex 100, BIO-RAD). Se incubó 20 minutos a 56 °C, y posteriormente 8 minutos a 99 °C. Las muestras así preparadas se conservaron a -20 °C.

2- Preparación de ADN a partir de medio líquido

Se centrifugó 500 μ l de un cultivo saturado en TY a 21000 g durante 3-4 minutos. El *pellet* fue lavado con 300 μ l de bidestilada estéril y resuspendido en 150 μ l de una suspensión acuosa (6% p/v) de resina en agitación (Chelex 100, BIO-RAD). La suspensión fue incubada 20 minutos a 56 °C, posteriormente 8 minutos a 99 °C. Se conservó a -20 °C, hasta el momento de uso.

3- Preparación de ADN a partir de medio líquido por el método de extracción fenólica

Se centrifugó 1,5 ml del cultivo líquido saturado durante 4 minutos a 21000 g. El *pellet* fue resuspendido en 1 ml de NaCl 1M, dejándolo reposar en hielo 10 minutos. Esta operación se repitió 2 veces más. El *pellet* fue lavado con 1,0 ml de TES frío y posteriormente resuspendido en 0,5 ml de TE frío con agregado de lisozima (2 mg/ml en TE). Esta mezcla fue incubada durante 30 minutos a 37 °C. Finalizado ese tiempo se agregó 50 μ l de la solución de sarcosil-pronasa (SK-Pr) y se incubó 1 hora a 37 °C. El ADN presente se extrajo con 0.6 ml de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1). El sobrenadante fue precipitado con NH_4Ac concentración 0,3 N final y 0,6 volúmenes de isopropanol o dos volúmenes de etanol. La muestra de ADN fue lavada con etanol al 70% y resuspendida en agua bidestilada estéril.

4- Extracción de ADN de muestras de suelo a partir del método de lisis directa

En un tubo de centrifuga de 35 ml, se colocaron 8 gr de tierra y 20 ml de solución A. Se agitó a 150 rpm durante una hora, luego se centrifugó a 20 Kxg durante 10 minutos a 4 °C. El *pellet* fue lavado durante 15 minutos y centrifugado. Se repitió este procedimiento hasta que el sobrenadante quedó clarificado. El sedimento fue resuspendido en 20 ml (o 2.5-3X de su volumen) de Buffer de lisis B. Se agitó entre 15 y 60 minutos en posición inclinada a temperatura ambiente y se agregó 2 ml de solución C con proteinasa K mas 2 ml de SDS al 20% (p/v). Se incubó 30 minutos a temperatura ambiente en agitación inclinada. Las células fueron lisadas por agregado de 2 ml de Solución D a 65 °C durante 30 minutos. La muestra lisada fue extraída con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1). Las fases se separaron

por centrifugación a 10Kxg durante 20 minutos a 4 °C. Se realizó luego otra extracción con cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Las fases se separaron por centrifugación a 10Kxg 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue precipitado toda la noche a -20 °C con 0,6 volúmenes de isopropanol y centrifugado a 20 Kg durante 20 minutos. Se lavó con etanol 70% y se resuspendió en H₂O bidestilada.

Los ácidos nucleicos así obtenidos, fueron purificados con una columna Wizard PCR-preps (Promega), la cantidad de veces necesarias para eliminar sustancias que puedan inhibir la reacción de PCR (usualmente una o dos).

Determinación del pH de muestras de suelo por el método en pasta de suelo saturado

Se agregó pequeños volúmenes de agua destilada (500 µl), sobre 20 gr de suelo hasta observar la aparición de una película brillante en la superficie, pero sin exceso de agua. Posteriormente cada muestra fue trasvasada a un tubo de plástico y se midió el pH con un aparato Orion Research digital ionalyzer/501.

Reacciones de PCR y condiciones de restricción con endonucleasas

1- Condiciones generales de PCR y de electroforésis

Todas las amplificaciones del trabajo fueron realizadas en los termocicladores Biometra UNO Thermoblock o Mastercycler gradient de Eppendorf. Las condiciones de PCR fueron variables de acuerdo a los *primers* utilizados. Alícuotas de 2 a 5 µl de los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa al 1% en buffer TBE 0,5X, posteriormente fueron teñidos con una solución de bromuro de etidio (5×10^{-4} mg/ml) y fotografiados bajo luz UV con película Polaroid tipo 667 positivo o las imágenes fueron digitalizadas con la cámara Kodak DC120. Todos los geles fueron preparados en cubas de electroforésis de 7 x 10 cm; 15 x 10 cm o 25 x 15 cm (BIO-RAD) y las fuentes de poder utilizadas fueron PowerPac 200 y 300 (BIO-RAD).

2- Condiciones para la restricción de los fragmentos de amplificación con endonucleasas

Las digestiones se realizaron a partir de alícuotas de 6 a 10 µl de la mezcla de reacción de PCR que fueron incubadas con endonucleasas de restricción (Boehringer Manneheim, Promega o Gibco) siguiendo las condiciones especificadas por el fabricante, pero poniendo un exceso de enzima (3 U por reacción). Se incubó toda la noche a 37 °C o a 65 °C, de acuerdo a la temperatura óptima de la endonucleasa utilizada.

Las digestiones fueron analizadas por electroforesis en geles horizontales de agarosa al 2,5% en buffer TBE 0,5X. La electroforesis fue llevada a cabo a 80 V durante 3 hs, en el mismo buffer. Los perfiles de digestión fueron analizados con el programa GelCompar 4.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Se aplicó el método de sustracción del fondo “*rolling disk*” y se utilizó el algoritmo de comparación de bandas con el coeficiente de similitud de Dice que le da mas peso a las bandas que son iguales. La tolerancia de identidad de banda fue de 1%. El análisis de matrices de similaridades fue realizado a partir de matrices UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages*).

3- Análisis por RFLP de un fragmento del gen 16S ARNr

Para la amplificación de la secuencia del gen 16S ARNr se utilizaron los *primers* rD1/fD1 (Tabla 1) descritos por Weisburg *et al.* (1991). Las condiciones de amplificación fueron las descritas por Laguerre *et al.* (1994), las cuales luego de nuestra experiencia, se modificaron de acuerdo al tipo de ADN molde utilizado. Las preparaciones de ADN por el método de extracción fenólica pudieron ser amplificadas con el ciclo original, mientras que las otras preparaciones requirieron otro tipo de ciclo.

Ciclo original de rD1/fD1:

95° C ⇔ 5 minutos	} 35 ciclos
94° C ⇔ 1 minuto	
55° C ⇔ 1 minuto	
72° C ⇔ 2 minutos	
72° C ⇔ 3 minutos	

Ciclo modificado de rD1/fD1:

95° C ⇔ 3 minutos	} 35 ciclos
94° C ⇔ 1 minuto	
53° C ⇔ 1 minuto	
72° C ⇔ 2 minutos	
72° C ⇔ 5 minutos	

Se ensayaron las digestiones del producto de amplificación con las siguientes enzimas: *AluI*, *HaeIII*, *MspI* y *NdeII* (*MboI*), *DdeI*, *CfoI* (*HhaI*), *Hinfl*, *TaqI* y *RsaI*.

4- Análisis por RFLP de la región intergénica 16S-23S ADNr

La región intergénica 16S-23S fue amplificada con los *primers* 16f/23r (Tabla 1) bajo las condiciones de reacción descritas por Laguerre *et al.* (1996). Las enzimas utilizadas en el análisis de RFLP fueron: *AluI*, *HaeIII*, *MspI*, *TaqI*, *DdeI* y *AvaI*.

5- Amplificación por PCR de un fragmento del gen *nifH*

Se amplificó una región de 784 pb del gen *nifH*. Los *primers* utilizados *nifHf/nifHR* (Tabla 1) fueron descritos por Laguerre *et al.* (2001). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl, con 50 a 100 ng de ADN puro o 2,5 µl de las preparaciones con resina,

buffer de polimerasa (10 mM Tris-Cl pH 9: 25 °C), 1,5 mM MgCl₂, 20 μM de cada dNTP, 0,1 μM de cada primer y 0,625 U de *Taq* polimerasa. El ciclo seguido para la amplificación fue:

95° C ⇒ 3 minutos	} 35 ciclos
94° C ⇒ 1 minuto	
57° C ⇒ 1 minuto	
72° C ⇒ 2 minutos	
72° C ⇒ 10 minutos	

6- Amplificación por PCR de un fragmento del gen *nodC*

Se amplificó una región de 930 pb del gen *nodC*. Los *primers* utilizados *nodCF/nodCR* (Tabla 1) fueron descritos por Laguerre *et al.* (2001). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 μl, con 50 a 100 ng de ADN puro o 2,5 μl de las preparaciones con resina, buffer de polimerasa (10 mM Tris-Cl pH 9: 25 °C), 2,5 mM MgCl₂, 200 μM de cada dNTP, 0,4 μM de cada primer y 1 U de *Taq* polimerasa. Las condiciones de amplificación utilizadas fueron:

95° C ⇒ 3 minutos	} 35 ciclos
94° C ⇒ 1 minuto	
55° C ⇒ 1 minuto	
72° C ⇒ 2 minutos	
72° C ⇒ 10 minutos	

7- Análisis de la secuencia nucleotídica de un fragmento de 260 pb del gen 16S ARNr

Se amplificó una región del gen 16S rRNA que en el caso de la secuencia del mismo gen en *Escherichia coli* corresponde a los nucleótidos 20 a 338. Los *primers* utilizados fueron Y1/Y2 (Tabla 1) descritos por Young *et al.* (1991).

8- Amplificación de un fragmento del gen *nifH* con *primers* específicos para cepas del Tipo I

Se amplificó una región de 570 pb del gen *nifH*. Los *primers* que fueron utilizados fueron los descritos por Aguilar *et al.* (1998) *nif 1* y *nif 2* (Tabla 1), las condiciones de amplificación utilizadas fueron:

95° C ⇒ 3 minutos	} 35 ciclos
94° C ⇒ 1 minuto	
55° C ⇒ 1 minuto	
72° C ⇒ 2 minutos	
72° C ⇒ 10 minutos	

9- Obtención de perfiles de *fingerprint* de ADN, mediante la amplificación genómica con *primers* ERIC y REP

La reacción de ERIC-PCR se llevó a cabo en un volumen final de 10 μ l, con 2,5 μ l de las preparaciones con resina, buffer de polimerasa (10 mM Tris-Cl pH 9: 25 °C), 3 mM MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP, 1,5 μ M de cada *primer* (ERIC1/ERIC2) y 0,55 U de *Taq* polimerasa. La reacción de REP-PCR se realizó bajo la misma mezcla de reacción pero se utilizó 3,2 μ l ADN molde y 1 μ M de cada *primer* (REP1/REP2). El ADN amplificado fue analizado mediante una electroforesis horizontal en geles (25 x 15 cm) de agarosa 1,8% en buffer TBE 0.5X sembrando una alícuota de 5 μ l de la mezcla de reacción. La electroforesis fue llevada a cabo a 150 V durante 3-4 hs, en buffer TBE 0,5X. Al analizar los perfiles obtenidos con Gelcompar 4.1, se utilizó la comparación por curvas densitográficas con el coeficiente de Pearson.

En la Tabla 1 se muestran las secuencias de los *primers* REP y ERIC utilizados:

Ciclo de amplificación para ERIC-PCR:

95° C \Rightarrow 5 minutos	} 35 ciclos
94° C \Rightarrow 1 minuto	
52° C \Rightarrow 1 minuto	
65° C \Rightarrow 8 minutos	
68° C \Rightarrow 16 minutos	

Ciclo de amplificación para REP-PCR:

95° C \Rightarrow 5 minutos	} 35 ciclos
94° C \Rightarrow 1 minuto	
40° C \Rightarrow 1 minuto	
65° C \Rightarrow 8 minutos	
65° C \Rightarrow 16 minutos	

10- Amplificación por PCR de un fragmento conservado del gen *nifD*

Se amplificó una región de 390 pb conservada en muchos microorganismos fijadores de nitrógeno del gen *nifD*. Los *primers* *nifDF/nifDR* utilizados (Tabla 1) fueron descritos por Stoltzfus *et al.* (1997), y el ciclo utilizado para la amplificación fue el mismo de ERIC-PCR.

11- Amplificación por PCR del producto a analizar por DTGGE

La reacción de PCR para amplificar la región de 260 pb a separar en el gel de DTGGE se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ l, con 50 a 100 ng de ADN puro o 2,0 μ l de las preparaciones con resina, buffer de polimerasa (10 mM Tris-Cl pH 9: 25 °C), 1,9 mM MgCl₂, 20 μ M de cada dNTP, 0,5 μ M de cada *primer* y 0,5 U de *Taq* polimerasa. El ciclo seguido para la amplificación fue:

95 °C \Rightarrow 3 minutos	} 35 ciclos
94 °C \Rightarrow 1 minuto	
65 °C \Rightarrow 1 minuto	
72 °C \Rightarrow 2 minutos	
72 °C \Rightarrow 5 minutos	

La reacción de PCR para amplificar la región de 1200 pb con los *primers* fog y revg (Tabla 1) se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ l, con 50 a 100 ng de ADN puro o 2.0 μ l de las preparaciones con resina, buffer de polimerasa (10 mM Tris-Cl pH 9: 25 °C), 1.5 mM MgCl₂, 20 μ M de cada dNTP, 1 μ M de cada *primer* y 0,5 U de *Taq* polimerasa. El ciclo seguido para la amplificación fue:

95 °C \Rightarrow 3 minutos
95 °C \Rightarrow 1 minuto
55 °C \Rightarrow 1 minuto
72 °C \Rightarrow 2 minutos
72 °C \Rightarrow 10 minutos } 35 ciclos

12- Preparación de la sonda marcada con biotina, a partir de la reacción de PCR

La reacción de PCR para amplificar las sondas de nodD e ISRL 2 (Tabla 1) se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ l, con 100 ng de ADN puro o 10 μ l de las preparaciones con resina, buffer de polimerasa (10 mM Tris-Cl pH 9: 25 °C), 1,5 mM MgCl₂, 20 μ M de cada dNTP, excepto dATP que fue utilizado en una relación 60/40 frío/marcado, 1 μ M de cada *primer* y 2 U de *Taq* polimerasa. Los oligonucleótidos utilizados fueron nodd-F/nodd-R y ISR-F/ISR-R, respectivamente. El ciclo seguido para la amplificación de ambos fue:

95 °C \Rightarrow 3 minutos
95 °C \Rightarrow 1 minuto
55 °C \Rightarrow 1 minuto
72 °C \Rightarrow 2 minutos
72 °C \Rightarrow 10 minutos } 35 ciclos

13- Purificación de los productos de PCR y secuenciación

El producto de PCR obtenido de la amplificación del ADN molde fue purificado por precipitación y posteriormente secuenciado. El protocolo para la purificación por precipitación fue el siguiente: Un volumen del producto de PCR se precipitó con un volumen de NH₄Ac 4 M y dos volúmenes de isopropanol durante toda la noche a -20 °C. Luego se centrifugó a 21000 g durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Por último se lavó con etanol 80%, se secó al aire y el ADN fue resuspendido en agua bidestilada estéril. En un gel de agarosa 1,6 % se estimó la cantidad de ADN obtenido.

El producto purificado fue secuenciado en ambas hebras usando los *primers* correspondientes. El ADN fue secuenciado usando Taq FS DNA polimerasa y terminadores dideoxi fluorescentes en un método de secuenciamiento por ciclado, los fragmentos de ADN

Las secuencias de referencia utilizadas fueron extraídas de bancos de datos (<http://www2.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/genbank>). La identidad de las secuencias de los aislamientos del NOA fue encontrada mediante la utilización de los programas Blastn (<http://sol.biol.unlp.edu.ar/enbnet/>) y los programas presentes en la página de *Ribosomal D Project* (http://rdp.cme.msu.edu/cgis/seq_match.cgi).

Para realizar mapas teóricos de restricción de secuencias nucleotídicas utilizamos el programa *Map* y *Mappot* (GCG), los cuales permiten ver ambas hebras del DNA con los puntos de corte de las enzimas de restricción seleccionadas y, además, ofrecen la posibilidad de generar las secuencias aminoacídicas deducidas en los seis marcos posibles. También con el mismo propósito fue usado el programa Clone Manager, el cual permite simular el perfil de bandas en un gel de agarosa.

El análisis de las secuencias quimeras fue realizado mediante el programa CHIMERA_CHECK version 2.7 presente en RDP (http://rdp.cme.msu.edu/cgis/seq_match.cgi).

Para realizar el análisis filogenético de los datos se utilizó el programa PAUP (Swofford, 1998). Este programa utiliza, como archivo de entrada un alineamiento múltiple. Los alineamientos se realizaron con el programa PileUp (GCG), sin modificar los parámetros por *default* del mismo. Los árboles se obtuvieron con el método *neighbor-joining*. Para visualizar los árboles se utilizó la versión 1.6.1 del programa TreeView (Win32) (Page, 1996).

Geles en gradiente desnaturizantes

El aparato utilizado (Figura 3) para las corridas electroforéticas en geles de acrilamida fue **The DCode Universal Mutation Detection System** de BIO-RAD (# 170-9080 a 170-9104). Debido a que las condiciones para poner a punto la reacción fueron en algunos casos muy diferentes se explicará el procedimiento seguido en la preparación y corrida electroforética para el gel que se consideró óptimo.

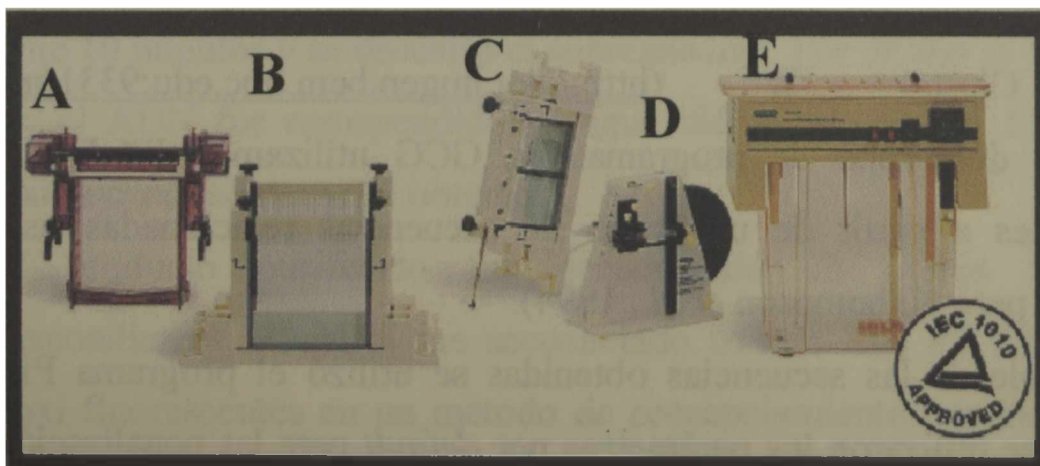


Figura 3: Equipo de electroforésis para preparar los geles desnaturizantes. A- Soporte de geles armados. B- Armador de geles. C- Dispositivo para armar geles perpendiculares. D- Armador de gradiente. E- Tanque de corrida con el controlador de temperatura.

1- Preparación de un gel en gradiente desnaturalizante paralelo

Los vidrios sobre los cuales se polimerizó el gel de acrilamida fueron lavados con abundante agua y detergente. Posteriormente se enjuagaron con agua destilada y se limpiaron con alcohol 96. Los vidrios secos fueron utilizados para armar el dispositivo sobre el cual se polimerizó el gel (Figura 3B). Se prepararon las dos soluciones desnaturalizantes de la siguiente manera:

Reactivo	0% desnaturalizante	45% desnaturalizante	65% desnaturalizante
Acrilamida 30%	2,7 ml	4 ml	4 ml
urea	no	2,34 gr	4,10 gr
formamida	no	2,7 ml	3,9 ml
TAE 50X	0,2 ml	0,3 ml	0,3 ml
glicerol	0,23 ml	0,34 ml	0,34 ml
H ₂ O _{bd}	csp 10 ml	csp 15 ml	csp 15 ml
TEMED	0,018 ml	0,027 ml	0,027 ml
APS	0,027 ml	0,040 ml	0,040 ml
Vol final	10 ml	15 ml	15 ml

Se identificó la solución con mayor porcentaje desnaturalizante con 0,2 ml de Solución A.

Se cargó 15 ml de cada solución desnaturalizante en jeringas de 30 ml que se ajustaron al armador de gradiente mostrado en la Figura 3D y se procedió a formar el gradiente. La formación correcta del gradiente se visualiza por un degradé de color azul de abajo hacia arriba que se debe a la marca de la solución de mayor porcentaje desnaturalizante con Solución A. Una vez armado el gradiente se depositó sobre la superficie del gel 1 ml de N- Butanol y se dejó polimerizar entre 2 y 4 hs. Finalizado ese período se extrajo el alcohol y se secó la superficie del gel, colocando luego 3 ml de la solución de acrilamida 0% desnaturalizante y un peine de 16 calles. Se dejó polimerizar 1 hs.

Una hora antes de iniciar la corrida del gel es necesario calentar a la temperatura inicial el buffer de corrida (TAE 1X) dentro del tanque donde se desarrollará la corrida electroforética. (Figura 3E).

Las muestras a sembrar (el producto de la reacción de PCR) se mezclaron previamente con buffer de siembra 2X. El volumen a sembrar dependió de la eficacia de la amplificación, usualmente entre 3 y 10 µl del producto. La siembra se realizó con una jeringa Hamilton. Se corrió a voltaje constante 110 volt comenzando con un amperaje de 50-60 mA. La rampa de aumento de temperatura fue inicialmente de 200 °C/hs hasta alcanzar la temperatura de inicio de corrida, usualmente unos 15 minutos. Este tiempo suele coincidir con la entrada de la muestra al gel desnaturalizante. Se inició entonces, el gradiente de temperatura con una rampa de aumento de temperatura de 0,9 °C/hs y un rango de temperatura de 51 °C-59 °C. Finalizado

el gradiente de temperatura la corrida continuó durante 7 hs más a una temperatura constante de 59 °C.

Finalizada la corrida electroforética los geles fueron separados del marco de vidrio donde se armaron y se tiñeron en un baño de bromuro de etidio (10 mg/L) durante 30 minutos, se lavó 10 minutos en un baño de agua destilada y se fotografió bajo luz UV igual que un gel de agarosa.

2- Preparación de un gel en gradiente desnaturalizante perpendicular

Los geles desnaturalizantes perpendiculares a la dirección de corrida se prepararon de la misma manera que los paralelos pero en lugar de cargarlos por la parte superior, se les incorporó un dispositivo que permitió cargar el gel rotado 90° (Figura 3C). Una vez polimerizado se colocó en su posición original y la corrida se desarrolló igual que la anterior, excepto que la temperatura se mantuvo constante.

3- Aislamiento y secuenciación de una banda del gel de DTGGE

Con la ayuda de un bisturí estéril se escindió del gel de poliacrilamida la banda de interés. La misma fue depositada en un eppendorf de 1,5 ml conteniendo 300 µl de agua bidestilada estéril. Se incubó durante 12 hs a 4 °C. Posteriormente se tomó una alícuota la cual fue usada como molde para la amplificación con los *primers* dgefo/dgere. El producto de amplificación fue purificado por precipitación y secuenciado en una de sus hebras.

Obtención de perfiles plasmídicos, técnica de Eckardt modificada

Los rizobios cultivados en medio TY (un volumen equivalente a 1 ml de $DO_{620} \text{ nm}=0,4$) fueron colectados por centrifugación durante 4 minutos a 16000 g. La muestra se mantuvo en hielo en todo momento. El pellet fue posteriormente resuspendido en 1 ml de sarcosil 0,3% frío (4 °C). Luego se centrifugó 4 minutos a 16000 g y se resuspendió el *pellet* en 15 µl de solución de Ficoll. La muestra así preparada se conservó en la heladera hasta el momento de siembra.

El gel de 11x14x0,5 cm con agarosa 0,75% en Buffer TBE 1x fue sembrado con 25 µl de SDS 10% con agregado de xilene xianole y corrido con polaridad reversa durante 15 minutos a 110 V. Posteriormente, se agregó a cada muestra la solución de lisis con agregado de lisozima y se sembró 15 µl de la misma. La migración con polaridad normal comenzó con 30 V durante 30 minutos y luego 2 hs a 110 V. Finalizada la corrida electroforética se sumergió el gel en solución de Bromuro de Etidio durante 10 minutos y se lavó con agua destilada durante 30 minutos. Las fotografías de los geles fueron tomadas como fue descrito anteriormente.

Ensayos de utilización de hidratos de carbono y resistencia intrínseca a antibióticos

El ensayo de utilización de diferentes fuentes de carbono fue realizado con un medio basal al cual se le adicionó las fuentes de carbono (xilitol, lactato, eritritol, dulcitol, citrulina, manitol, D-fructosa, glicerol y L-arabinosa) a una concentración final de 10 mM. Cuando se probó lisina como única fuente de nitrógeno esta fue agregada en una concentración final de 0,5 gr/l, omitiendo en el medio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y agregando como fuente de carbono manitol en una concentración de 10 mM. Los sustratos fueron filtrados antes de ser añadidos al medio basal previamente autoclavado. La inoculación de los distintos medios se realizó a partir de una dilución de un cultivo líquido saturado en medio YEM, previa colección de las células por centrifugación y disolución en agua. Las bacterias fueron incubadas en los distintos medios a 28 °C durante 4 o 10 días, según su crecimiento normal, rápido o lento.

La resistencia intrínseca a antibióticos fue ensayada en medio TY. El agregado de los antibióticos se realizó sobre el medio previamente autoclavado y fundido a una temperatura inferior a los 60 °C. Las concentraciones ensayadas fueron las siguientes (en µg/ml): rifampicina (500, 50), ácido nalidixico (50, 40, 25), estreptomycin (400, 100, 10, 4), tetraciclina (100) y cloranfenicol (500). Las cajas fueron incubadas a 28 °C durante 4 o 10 días.

Ensayos de hibridación con sondas biotiniladas

El ADN (5-10 µg) resultante de la digestión con las endonucleasas de restricción, fue separado por electroforesis en gel de agarosa-TBE al 0,8% (1-2 Volt/cm, durante 18 hs). Una vez finalizada la corrida se visualizó el ADN por tinción con Bromuro de Etidio y fluorescencia a la luz UV. A continuación el gel fue sometido a un tratamiento con una solución desnaturalizante (NaOH 0,4 M, NaCl 3 M) durante 60 minutos. Luego el gel fue tratado con la solución de transferencia (NaOH 0,8 mM, NaCl 3 M) durante 15 minutos y finalmente fue transferido a nitrocelulosa o membranas de Nylon (Nylon N) por capilaridad durante una hora, tal como describe Piotr (1992). Una vez finalizada la transferencia se tiñó nuevamente el gel con Bromuro de Etidio para verificar si la transferencia fue completa. Las membranas fueron neutralizadas con buffer fosfato (NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 0,2 M pH 6,8) y luego fijadas 15 minutos bajo luz UV y secadas en estufa a 60 °C.

Los filtros fueron prehibridados e hibridados con mezclas de diferente composición (solución de prehibridación e hibridación). Se rehidrató homogéneamente la membrana en la

solución SSC 2X y luego fue colocada en un tubo de hibridación conteniendo la solución de prehibridación (50% formamida, SSC 5 X, Solución de Denhardt's 5 X, 20 mM fosfato de sodio(pH 6,5), 0,5 mg/ml de esperma de salmón desnaturalizado por 5 minutos a ebullición). Se incubó la membrana con esta solución durante 2 o 4 horas a 42 °C. Luego se descartó la solución de prehibridación y se agregó la solución de hibridación (45% formamida, SSC 5X, solución de Denhardt's 1X, 20 mM fosfato de sodio(pH 6,5), 0,3 mg/ml de esperma de salmón desnaturalizado, 5% dextran sulfato, 0,1 a 0,5 µg/ml de la sonda desnaturalizada 5 minutos a ebullición). Se procedió a incubar a 42 °C, durante toda la noche.

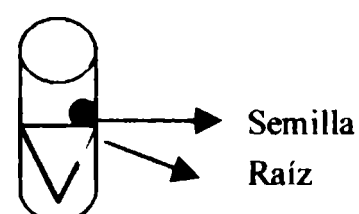
Finalizada la incubación se procedió a lavar la membrana según el siguiente protocolo: dos lavados con 250 ml de 2X SSC/0.1%(P/V) SDS por 3 minutos a temperatura ambiente, dos lavados con 250 ml de 0.2X SSC/0.1%(P/V) SDS por 3 minutos a temperatura ambiente y por último un lavado con 250 ml de 0.16X SSC/0.1%(P/V) SDS por 15 minutos a 50°C. Una vez terminados los lavados se colocó la membrana en SSC 2 X.

Para visualizar la hibridación se incubó la membrana durante un minuto en Buffer 1, luego en Buffer 2 por una hora a 65 °C. El anticuerpo SA-AP se preparó en un tubo de polipropileno por agregado de 1 µl de la solución stock del anticuerpo por 1 ml de Buffer 1. Se preparon 7 ml por cada 100 cm² de membrana. Se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos con agitación suave. Finalizada la incubación con el anticuerpo se realizaron tres lavados de 15 minutos con Buffer 1 usando 20 a 40 veces más volumen que para el paso anterior. Posteriormente se incubó con el Buffer 3 por 10 minutos a temperatura ambiente y se agregó la solución de tinción (NBT y BCIP) hasta desarrollo de color entre 30 minutos y las 3 horas, durante este tiempo se mantuvo la membrana en la oscuridad. La reacción de tinción se detuvo con una solución de Tris-EDTA.

Caracterización de la molécula señal

1- Obtención de exudados radicales de leguminosas

Las semillas estériles fueron germinadas sobre una superficie de agar al 1,5%. Al alcanzar las raíces un tamaño de 1-2 cm fueron colocadas en un tubo en presencia de solución salina 1 como se esquematiza a continuación:



Estos tubos se mantuvieron en cámara de crecimiento vegetal durante 5 o 7 días. Posteriormente se retiraron las plantas y se esterilizó por filtración el exudado obtenido. Los exudados obtenidos se mantuvieron a 4 °C, hasta el momento de ser utilizados.

2- Obtención de exudado de semilla de leguminosa

Se utilizó una modificación del protocolo descrito por Barbour *et al.* (1991). Las semillas (50 gr) fueron enjuagadas con agua destilada estéril, luego se le adicionó etanol al 50% en una proporción de 1 ml de solución por cada semilla. Esta suspensión fue agitada durante 10 hs a 170 rpm a 28 °C. Se filtró y se conservó a 4 °C.

3- Protocolo para la obtención de la molécula señal

Se utilizó un cultivo líquido saturado de rizobio para inocular tubos con 5 ml de medio mínimo B (-) con agregado de YEM al 5%. Los cultivos fueron incubados a 28 °C con agitación, hasta DO_{600} 0,2-0,4. Se colocaron 100 µl de esta suspensión bacteriana en tubos plásticos de 10 ml. Esto se hizo por duplicado, a uno de los tubos se le agregó el flavonoide o el exudado (1 µl por ml) y al otro no, constituyendo este último el control negativo del ensayo. Posteriormente se agregó la marca (C^{14} glucosamina, acetato o metil metionina) a una concentración de 1,5 µl por ml, se vorteoó y los tubos fueron incubados en agitación a 28 °C durante 24 - 72 hs.

Luego de la incubación se centrifugó a 21000 g durante 15 minutos. Se colocó el sobrenadante en un tubo plástico y se agregó 0,5 ml de butanol saturado en agua, los tubos fueron vortexeados para favorecer la emulsión de las fases y se los colocó nuevamente en agitación a 28 °C. Por último, se centrifugó durante 15 minutos a 21000 g y el sobrenadante obtenido fue evaporado en Speed -vac durante 30 minutos. El *pellet* fue resuspendido en 40 µl de butanol saturado en agua y conservado a 4 °C. La placa de TLC (silicagel C18 octadecilo) fue corrida durante 30 o 45 minutos con acetonitrilo al 50%. Para revelarla se la expuso durante 15 o 20 días con película Kodak.

Transferencia de plásmidos mediante conjugación bacteriana

La transferencia de plásmidos a aislamientos de *L. leucocephala* resistentes a ácido nalidixico se realizó mediante conjugación, en las que se empleó el sistema biparental con la cepa de *E.coli* S17-1::pMP154 (H. P. Spaink, *et al.*, 1992). Se mezclaron 800 µl de una suspensión de rizobio ($DO_{600}=0,5-0,7$) y 400 µl de un cultivo del donador ($DO_{600}=0,5-0,7$). La

mezcla fue centrifugada durante 2 minutos a 7000 g. El sedimento obtenido fue resuspendido en 500 µl de solución salina y posteriormente se centrifugó y el sedimento fue resuspendido en 100 µl de solución salina. Este extracto se colocó en el centro de una placa de YEM-rc e incubó a 28 °C toda la noche. Luego de la incubación se resuspendió todo el cultivo en 1 ml de solución salina, se realizaron las diluciones correspondientes y se incubó cada dilución a 28 °C en placas de medio B(-) suplementado con Nx (0,01 mg/ml) y Sm (0,2 mg/ml). En todos los casos se incluyeron controles con la cepa donora y la cepa aceptora por separado. Las colonias obtenidas fueron utilizadas en los ensayos de inducción.

Medida de la actividad β-galactosidasa

Los aislamientos a ensayar fueron incubados en medio TY en presencia de Nx (0,01 mg/ml) y Sm (0,2 mg/ml) hasta la saturación del cultivo. Diez microlitros de este cultivo fueron utilizados para inocular tubos conteniendo 5 ml de medio B(-) y 1 µl/ml de la sustancia inductora (con algunos exudados se utilizó otro volumen). El control negativo del ensayo consistió en un tubo sin inductor. La mezcla fue incubada a 28 °C con agitación hasta una DO₆₀₀ de 0,6 - 0,8 y a 400 µl de ese cultivo se le agregaron 400 µl de Buffer Z, 100 µl de SDS 0,1% y 50 µl de cloroformo. La mezcla fue vortexeada vigorosamente durante aproximadamente 1 minuto, luego se agregaron 150 µl de una solución de ONPG (80 mg/20 ml de Buffer Z). Se dejó reaccionar a 28 °C durante 10-15 minutos y la reacción fue detenida con 400 µl de una solución de Na₂CO₃ 1 M. Se centrifugó a 21000 g durante 4 minutos y se midió DO₄₂₀ del sobrenadante obtenido. Paralelamente se midió DO₆₀₀ de los cultivos de partida. El resultado se expresó en unidades Miller (UM):

$$UM = \frac{DO_{420} \times 1000}{DO_{600} \times 400 \times t}$$

t: Tiempo de la reacción

Medios de cultivo y soluciones empleadas

Medios de cultivo

YEM-rojo congo (YEM-rc)		
Reactivo	Concentración	Observaciones
Extracto de levadura	0.4 gr/L	Ajustar el medio a pH=7
Manitol	10.0 gr/L	
NaCl	0.1 gr/L	
SO ₄ Mg.7H ₂ O	0.2 gr/L	
K ₂ HPO ₄	0.5 gr/L	
rojo congo	0.025 gr/L	
Agar	15.0 gr/L	

TY

Reactivo	Concentración
Triptona	0.5 gr/L
Extracto de levadura	3.0 gr/L
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.7 gr/L
Agar	15.0 gr/L

TY/glicerol

Reactivo	Concentración
Triptona	0.5 gr/L
Extracto de levadura	3.0 gr/L
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.7 gr/L
Glicerol	20%

Medio B(-)

Reactivo	Concentración	Observaciones
Manitol	14 gr/l	Ajustar el pH a 5.
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	1.3 gr/l	
KNO ₃	0,55 gr/l	
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,55 gr/l	
Biotina	0,2 mg/l	
Tiamina	5 mg/l	
Micronutrientes	2,5 ml	
FeEDTA	2,5 ml (de una solución de Fe-EDTA 13 gr/L)	
KH ₂ PO ₄	1 mM	

Micronutrientes

Reactivo	Concentración
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.0354 gr/l
MnSO ₄ .4H ₂ O	0.609 gr/l
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.0974 gr/l
H ₃ BO ₃	1.264 gr/l
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.398 gr/l

Medio basal, utilizado para los ensayos de utilización de hidratos de carbono

Reactivo	Concentración
K ₂ HPO ₄	6 mM
KH ₂ PO ₄	7 mM
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.8 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	7.5 mM
FeCl ₃ .6H ₂ O,	0.04 mM
CaCl ₂	0.9 mM
Agar	1.5 % (p/v)

Soluciones**Solución de Frazer libre de nitrógeno.**

Reactivo	Concentración
CaCl ₂	0.1 gr/L
SO ₄ Mg.7H ₂ O	0.12 gr/L
KH ₂ PO ₄	0.1 gr/L
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	0.15 gr/L
Citrato férrico	0.005 gr/L
Mn, Cu, Zn, B, Mo	Trazas

Solución para plantas: Solucion 1 salina

Reactivo	Concentración
CaCl ₂ .2H ₂ O	294.1 gr/l
KH ₂ PO ₄	136.1 gr/l
Fe EDTA	4.47 gr/l
Citrato ferrico	6.7 gr/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	123.3 gr/l
K ₂ SO ₄	87 gr/l
MnSO ₄ .H ₂ O	0.338 gr/l
H ₃ BO ₃	0.247 gr/l
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.288 gr/l
CuSO ₄ .7H ₂ O	0.100 gr/l
CaSO ₄ .7H ₂ O	0.0056 gr/l
NaMoO ₂ .2H ₂ O	0.048 gr/l

TE	
Reactivo	Concentración
Tris-Cl	10 mM
EDTA	10 mM

TES	
Reactivo	Concentración
Tris-Cl	10 mM
EDTA	10 mM
NaCl	0.15 M

FICOLL	
Reactivo	Concentración
Ficoll Mr 400 000	20% en TE

Buffers para electroforesis

Buffer para electroforesis: TBE 5X.	
Reactivo	Concentración
Tris-Cl	89 mM
EDTA	2.5 mM
Acido Bórico	89 mM

Buffer para electroforesis TAE 50X		
Reactivo	Cantidad	Concentración final
Tris base	242.0 gr	2 M
Acido acético glacial	57.1 ml	1 M
0.5 M EDTA, pH 8.0	100 ml	50 mM
H ₂ O	csp 1000 ml	

Soluciones para preparar los geles desnaturizantes

Acrilamida 40%		
Reactivo	Concentración final	Observaciones
Acrilamida	40%	Filtrar y almacenar a 4 °C.
Bisacrilamida	0.8%	
H ₂ O	csp 100 ml	

Acrilamida 30%		
Reactivo	Concentración final	Observaciones
Acrilamida	30%	Filtrar y almacenar a 4 °C.
Bisacrilamida	0.8%	
H ₂ O	csp 100 ml	

Las distintas soluciones desnaturizantes se prepararon de la siguiente manera (los valores están dados para 100 ml de solución):

Solución desnaturizante	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	100%
Formamida (ml)	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40
Urea (gr)	4.2	8.4	12.6	16.8	21	25.2	29.4	33.6	37.8	42

Solución A	
Reactivos	Concentración final
Azul de bromofenol	0.5%
Xylene Cyanol	0.5%
TAE 50X	1X

Buffer de siembra (2X)	
Reactivos	Concentración final
2% Azul de bromofenol	0.05%
2% Xylene Cyanol	0.05%
Glicerol	70%
H ₂ O	csp 10 ml

Solución de persulfato de amonio (10%)

Reactivos	Cantidad
Persulfato de amonio	0.1 gr
H ₂ O	1.0 ml

Soluciones para extracción de ADN de muestras de suelo

Solución A

Reactivo	Cantidad	Concentración final
Na ₄ P ₂ O ₇ · 10H ₂ O	25 gr	5% p/v
PVP (polivinilpirrolidina)	10 gr	2% p/v
H ₂ O	csp 500 ml	

Buffer de lisis B

Reactivo	Cantidad	Concentración final
Tris-ClH [pH=8]	10 ml de una sol 1M	50mM
EDTA [pH=8]	10 ml de una sol 0.5M	25 mM
Sacarosa	20.5 gr	0.3 M
PVP	4 gr	2% p/v
Lisozima	Se agrega en el momento de usar	5 mg/ml
H ₂ O	csp 200 ml	

Solución C

Reactivo	Concentración final	Observaciones
Tris-ClH [pH=8]	50mM	Conservar a - 20 °C
EDTA [pH=8]	25 mM	
Proteínasa K	20 mg/ml (Se agrega luego de autoclavar)	
H ₂ O	csp 100 ml	

Buffer de siembra

Reactivo	Concentración final
Xilene cianol	0.25 %
Azul de bromofenol	0.25 %
glicerol	50%
TAE 50X	TAE 6X
H ₂ O	csp 10 ml

Solución D

Reactivo	Cantidad	Concentración final
CTAB	10.0 gr	10% p/v
NaCl	4.1 gr	0.7 M
H ₂ O	csp 100 ml	

Soluciones de hibridación

20X SSC

Reactivo	Concentración	gr o ml	Observaciones
NaCl	3 M	175 gr/L	Agustar el pH a 7, filtrar y autoclavar
Citrato de Na	0.3 M	88 gr/L	

2X SSC/ 0.1%(P/V) SDS

Reactivo	Concentración	gr o ml
SSC	2X	50 ml de 20X SSC/ 500 ml
SDS	0.1%	10 ml de una solución 5% / 500 ml

0.2X SSC/ 0.1%(P/V) SDS

Reactivo	Concentración	gr o ml
SSC	0.2X	5 ml de 20X SSC/ 500 ml
SDS	0.1%	10 ml de una solución 5% / 500 ml

0.16X SSC/ 0.1%(P/V) SDS

Reactivo	Concentración	gr o ml
SSC	0.16X	4 ml de 20X SSC/ 500 ml
SDS	0.1%	10 ml de una solución 5% / 500 ml

Buffer fosfato de sodio, pH 6.5

Reactivo	Concentración	gr o ml
NaH ₂ PO ₄	0.25 M	34.5 gr/L
Na ₂ HPO ₄	0.25 M	44.5 gr/L

50X Solución de Denhardt's		
Reactivo	Concentración	Observaciones
Ficoll	1% (P/V)	Agitar toda la noche y autoclavar
Polivinilpirrolidina	1% (P/V)	Conservar a -20°C
BSA fracción V	1% (P/V)	

Solución de prehibridación	
Reactivo	Concentración
Formamida	50%
SSC 20X	5X
Solución de Denhardt's	5X
Buffer fosfato pH 6.5	20 mM
Esperma de Salmón desnaturalizado	0.5 mg/ ml

Solución de hibridación	
Reactivo	Concentración
Formamida	45%
SSC	5X
Solución de Denhardt's	1X
Buffer fosfato pH 6.5	20 mM
Esperma de Salmón desnaturalizado	0.3 mg/ ml
Dextran sulfato	5%
Probe desnaturalizada	0.1 a 0.5 µg/ml

Buffer 1		
Reactivo	Concentración	Observaciones
Tris-HCl pH 7.5	0.1 M	Filtrar para reducir el background
NaCl	0.15 M	

Buffer 2		
Reactivo	Concentración	Observaciones
Tris-HCl pH 7.5	0.1 M	Filtrar para reducir el background
NaCl	0.15 M	
BSA fracción V	3%	

Buffer 3	
Reactivo	Concentración
Tris-HCl pH 9.5	0.1 M
NaCl	0.1 M
MgCl ₂	50 mM

Tris-EDTA		
Reactivo	Concentración	Observaciones
Tris-HCl pH 7.5	20 mM	Filtrar el buffer para reducir el background
NaEDTA	0.5 mM	

Preparación de fenol pH 8

En un baño de agua fueron fundidos 500 gr de fenol, agregándole posteriormente 0,5 gr de 8-hidroxiquinolina y 500 ml de una solución de Tris-ClH 1M (pH=8). La emulsión fue agitada durante 30 minutos, luego se extrajo la solución de Tris-ClH y se agregó 500 ml de Tris-ClH 0,5 M (pH=8) agitando durante aproximadamente otros 30 minutos hasta alcanzar un pH=8 en la fase fenólica. Finalmente se agregó TE pH=8 y se alicuotó. La conservación fue en heladera a 4 °C o almacenado a - 20 °C.

Preparación de la solución de Sarcosil-pronasa.

Una solución de TE (10 ml) estéril con 100 mg de pronasa se incubó durante una hora a 37 °C. Luego se agregó 7 ml de sarcosil 30% (p/v) y 3 ml de TE estéril. Se agitó y se conservó a -20 °C.

Bibliografía

1. Aguilar, O. M., D. H. Grasso, P. M. Riccillo, M. V. López, and E. Szafer. 1998. Rapid identification of bean rhizobial isolates type I by a *nifH*-PCR assay. *Soil Biol. Biochem.* **30**:1655-1661
2. Barbour, W. M., Dennis R. Hattermann, and G. Stacey. 1991. Chemotaxis of *Bradyrhizobium japonicum* to soybean exudates. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:2635-2639.
3. Deveraux, V., P. Haerberli, and O. Smithies. 1984. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* **12**(1), 387-395 (de *WISCONSIN PACKAGE, VERSION 9.0*, 1996).
4. Laguerre, G., M. R. Allard, F. Revoy, and N. Amarger. 1994. Rapid identification of rizobia by Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:56-63.
5. Laguerre, G., P. Mavingui, M. R. Allard, M. P. Charnay, P. Louvrier, S. I. Mazurier, L. Rigottier-Gois, and N. Amarger. 1996. Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of chromosomal and Symbiotic gene regions: Application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2029-2036.
6. Laguerre, G., S. M. Nour, V. Macheret, J. Sanjuan, P. Drouin, and N. Amarger. 2001. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiol.* **147**: 981-993.
7. Page, R. D. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* **12**, 357-358.
8. Pior. 1992. Chomczynsky. One hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Analytical Biochemistry.* **201**:134-139.
9. Somasegaran, P. Hoben, H. J. 1985. Methods in legume-*Rhizobium* technology. NifTAL Project and MIRCEN.
10. Stoltzfus, J. R., R. So., P. P. Malarvithi, J. K. Ladha, and F. de Bruijn. 1997. Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biological nitrogen fixation. *Plant and Soil.* **197**:25-36.
11. Spaink, H. P., A. Aarts, G. Stacey, G. V. Bloemberg, B. J. J. Lugtenberg and E. P. Kennedy. 1992. Detection and separation of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* Nod metabolites using Thin-Layer Chromatography. *MPMI.* **5**:72-80.
12. Swofford, D. L.; G. J. Olsen; P. J. Waddell, and D. M. Hillis. 1996. In "Molecular Systematics" (D.M. Hillis, C. Moritz and B.K.Mable, ed), pp. 407-514. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
13. Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680.
14. Versalovic J., M. Schneider, F. J. de Bruijn, and J. R. Lupski. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using Repetitive sequence-based Polymerase Chain Reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology.* **5**:25-40
15. Vincent, J. M. 1970. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. IBP Handbook No 15. Blackwell scientific Publications, Oxford, United Kingdom.
16. Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier, and D. J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**:697-703.
17. Young, J. P. W., H. L. Downer, and B. D. Eardly. 1991. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAi1 by Polymerase Chain Reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. *J. Bacteriol.* **173**:2271-2277.

Capítulos de Resultados

Capítulo 1



Capítulo 1

Características de la colección de aislamientos de rizobios representativos de las poblaciones del Noroeste Argentino

Topografía y clima del NOA

El Noroeste Argentino (NOA) se caracteriza por ser una región de amplia extensión geográfica que comprende 25000 km² en el ángulo noroeste de Argentina y posee una importante diversidad de ecosistemas que abarcan ambientes desérticos y selváticos.

Para facilitar el estudio de esa diversidad geográfica, el NOA puede ser dividido en cuatro subregiones: Puna, Cordillera Oriental, Sierras Subandinas, Campos y Valles.

La *Puna* es un conjunto de altas mesetas separadas por cordones elevados de naturaleza volcánica. En el paisaje (Figura 1 A) se destacan cordones montañosos con rumbo N - S y macizos volcánicos; la mayoría apagados. Los salares y salinas son característicos de este paisaje desértico, con abundancia de minerales de gran valor industrial. En cuanto a las formaciones naturales son las del semidesierto con dominio de la estepa, los vegetales poseen adaptaciones acordes a la falta de agua, con raíces penetrantes, tallos acumuladores y hojas reducidas o ausentes. Como todos los climas de alta montaña, se caracteriza por exhibir situaciones extremas. La principal es la amplitud térmica diaria, los 365 días del año presentan heladas; todas las noches la temperatura alcanza registros bajo 0 °C y la máxima, cuando sopla el viento Zonda, puede superar los 40 °C. Las precipitaciones muy escasas son menores de 300 mm anuales.

La *Cordillera Oriental* o Precordillera salteño-jujeña está formada por dos cordones paralelos separados por quebradas; el occidental es el más elevado y culmina en el nevado de Chañi (Jujuy), con 6.200 m. El cordón oriental es más bajo y en las sierras de Tilcara alcanza en el cerro Negro de Zucho los 4.851 m. Quebradas tales como Capillitas y del Toro (Figura 1 B), caracterizan el paisaje salteño, las cuales son producto de la erosión fluvial. En Jujuy las sierras de Zenta y Tilcara enmarcan la quebrada de Humahuaca (Figura 1 C). En las laderas y quebradas, según su exposición a los rayos solares y vientos húmedos, se dan condiciones de microclimas.

Centinela, de Ronda y del Maíz Gordo, y otro occidental con las sierras de Arón, Cerro Negro y Santa María. Jujuy tiene montañas bajas de entre 1.000 y 1.500 m de altura, angostas y alargadas, cubiertas por una densa selva y ricas en hidrocarburos. Las sierras de Zapla, Ledesma, Calilegua, Santa Bárbara, Centinela y Maíz Gordo conforman este sistema. En las Sierras Subandinas predomina la selva subtropical tucumano-oranesa. Las altas temperatura y la humedad ofrecen grandes posibilidades para el desarrollo de la vida vegetal (flora muy variada) y animal. El promedio térmico varía según la altura. Las precipitaciones son muy elevadas por la presencia del relieve; superan los 300 mm anuales.

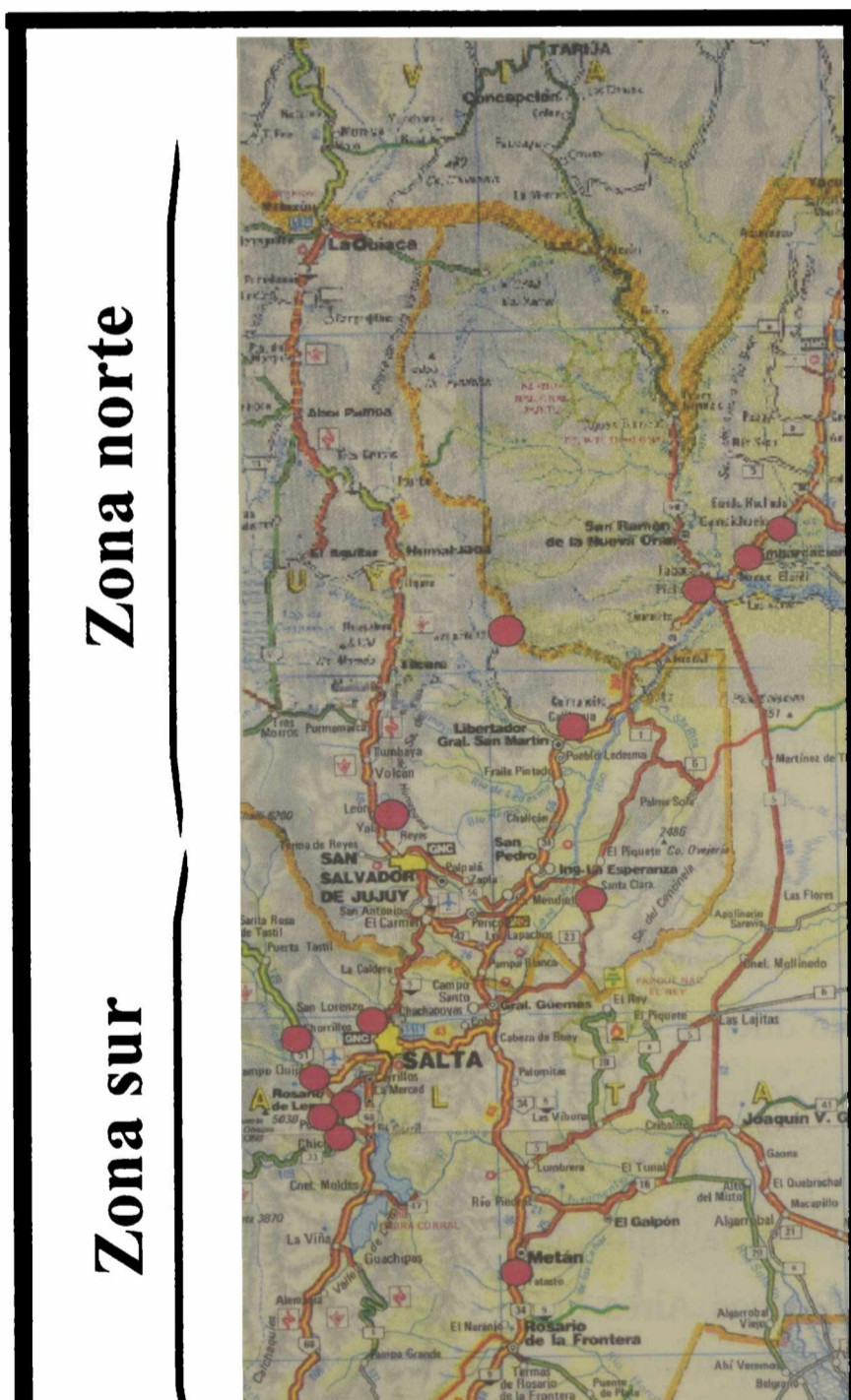
Los *Campos o Valles* de la región son zonas bajas rellenas por sedimentos finos, tienen clima subtropical (con amplitud térmica de 10 °C-32 °C) sobre ellos se realizan los cultivos y se asientan las ciudades. Los valles principales son los de Lerma, Jujuy y Campo Santo. La provincia de Salta representa parte de la llanura chaqueña que es una cuenca sedimentaria con lomadas anchas y bajas. Los ríos chaqueños influyen en la ecología de la región porque durante la época de las crecidas rebalsan, inundando los alrededores y creando cuerpos acuáticos de aguas no corrientes que en la estación seca desaparecen por infiltración. La región chaqueña se caracteriza por sus extensos bosques xerófilos, vegetación compuesta por plantas pequeñas y sin hojas, con tallos verdes y raíces pivotantes y profundas que dan como formación natural más frecuente a la estepa.



Figura 1: Distintos ambientes del NOA. Puna: A- Puna jujeña en Purmamarca. Cordillera y precordillera: B- Quebrada del Toro (Salta) junto al río Toro C- Quebrada de Humahuaca. Valle: D- Valle de Lerma, Campo de cultivo de poroto en Cerrillos, Salta.

Sitios de colección de rizobios del NOA

En el marco de la diversidad de ecosistemas descritos en la sección anterior se escogieron lugares para la recolección de los ejemplares que representan esos diferentes ambientes naturales de la región del NOA. En alguno de esos lugares se encontraron poblaciones silvestres de leguminosas tales como *Phaseolus vulgaris* var aborigineus, *Desmodium* spp., *Crotalaria* spp., *Phaseolus augusti*, *Macroptilium* spp., etc. En otros, en los que la aridez del suelo no permite el desarrollo de leguminosas se tomaron muestras de los mismos para su análisis en el laboratorio.



En el muestreo se incluyeron también, otros ambientes naturales del NOA donde habitualmente se cultiva poroto comercial (Figura 1D). En el mapa de la Figura 2, se muestra la región relevada que abarca aproximadamente 400 km en longitud y 150 km de ancho y se indican los lugares de recolección con círculos fucsias. Cada lugar representa a un ecosistema específico el cual esta descrito en la Tabla 1 junto con sus coordenadas. Así mismo, se dividió a la región en una zona norte, abarcando principalmente la región de Pichanal, Calilegua y Santa Clara y una zona sur correspondiente al Valle de Lerma, con los alrededores de la ciudad de Salta y Metán.

Figura 2: Región de muestreo de rizobios en las provincias de Salta y Jujuy. Se indica con círculos fucsias algunos de los sitios de recolección de muestras. La descripción del tipo de ecosistema y sus respectivas coordenadas se encuentran en la Tabla 1

Lugar	Tipo de Ecosistema	Coordenadas	Altitud (m)	Zona
Calilegua, Jujuy	Selva pedemontana	23° 47'S - 64° 00'W	465	Norte
Campichuelo, Salta	Selva pedemontana seca	23° 07'S - 64° 00'W	308	Norte
Embarcación, Salta	Selva pedemontana seca	23° 16'S - 63° 59'W	770	Norte
Pichanal, Salta	Chaco subhúmedo seco	23° 19'S - 64° 14'W	306	Norte
Santa Clara, Jujuy	Chaco interserrano	24° 49'S - 65° 29'W	567	Norte
Tópico Capricornio, Jujuy	Prepuna	23° 27'S - 65° 21'W	2435	Norte
Valle Grande, Salta	Chaco Serrano b/montaña	23° 28'S - 64° 59'W	1580	Norte
Yutumayo, Jujuy	Pastizal serrano	24° 05'S - 65° 27'W	1600	Norte
Zanja de Tigre, Jujuy	Selva pedemontana	23° 06'S - 64° 13'W	296	Norte
Castellanos, Salta	Selva montana	24° 42'S - 65° 28'W	1397	Sur
Cerrillos, Salta	Chaco interserrano	24° 57'S - 65° 29'W	1327	Sur
Chorro Blanco, Salta	Selva montana seca	25° 09'S - 65° 37'W	1490	Sur
Los Laureles, Salta	Selva montana	25° 06'S - 65° 36'W	1480	Sur
Los Nogales	Selva montana	25° 09'S - 65° 40'W	1580	Sur
Los Pulares, Salta	Selva montana seca	25° 05'S - 65° 35'W	1400	Sur
Metán-Yatasto, Salta	Selva pedemontana	25° 35'S - 65° 58'W	800	Sur
Peña Baya, Salta	Chaco Serrano	25° 09'S - 65° 39'W	1590	Sur
Quebrada del Toro, Salta	Selva montana seca	24° 54'S - 65° 40'W	1580	Sur
Río Blanco, Salta	Selva montana seca	24° 55'S - 65° 39'W	1586	Sur
Rosario de Lerma, Salta	Chaco interserrano	24° 56'S - 65° 36'W	1388	Sur
San Lorenzo, Salta	Selva montana	24° 45'S - 65° 27'W	1244	Sur
San Luis, Salta	Chaco interserrano	24° 49'S - 65° 29'W	1230	Sur

Tabla 1: Sitios de muestreo de leguminosas silvestres. Se describen los nombres de los lugares con sus respectivas coordenadas.

Densidad rizobiana y características fisicoquímicas de los suelos

Entre los años 1996 y 2000 se tomaron muestras de suelos con dos propósitos, el primero para aislar rizobios y el segundo para determinar los niveles de rizobios por gramo de suelo mediante el método del número más probable (NMP). En el Apéndice 1 se indican la totalidad de muestras de suelo tomadas en el NOA junto con el resultado de la determinación de pH y en la Tabla 2 se resumen los resultados del análisis del NMP de algunos de esos suelos.

El análisis de las muestras de suelos reveló diferencias en el número de rizobios por gramo de suelo entre las distintas regiones y también entre las leguminosas atrapantes estudiadas. Los rizobios nodulantes de poroto en el NOA varían entre 10^2 - 10^5 UFN/gr, la alta concentración de rizobios aparece como una característica propia de la región del NOA puesto que el examen de dos muestras de suelo de la provincia de Buenos Aires (T68 y T70) no reveló población indígena rizobiana capaz de nodular poroto.

En las distintas muestras de suelos analizadas los rizobios nodulantes de *Leucaena leucocephala* se encuentran en una concentración de 10 - 10^2 UFN/gr. Dado que en el NOA las especies rizobianas nodulantes de poroto y leucaena no son las mismas, se concluye que las

poblaciones de rizobios asociadas simbióticamente a poroto son más densas en los suelos que las nodulantes de leucaena (la caracterización de las poblaciones de rizobios de poroto y leucaena se muestra en los Capítulos 4 y 6).

Localización	Muestra	Coordenadas	Año	pH	NMP poroto ^a	NMP leucaena ^a
Campichuelo	T28	23° 07'S - 64° 00'W	1997	6.20	2.1*10 ⁴	nd ^c
Cerrillos	T24	24° 57'S - 65° 29'W	1997	7.00	9.0*10 ^{2b}	5.3*10 ^{2b}
	T36		1998	nd	1.8*10 ⁵	5.7*10 ²
	T32		1998	nd	6.7*10 ⁴	9.3*10 ¹
Chorro Blanco	T48	25° 09'S - 65° 37'W	1999	7.32	6.7*10 ²	nd
Embarcación	T53	23° 16'S - 63° 59'W	1999	7.60	13.3*10 ²	nd
Metan	T23	25° 35'S - 65° 58'W	1997	6.03	1.3*10 ³	1.1*10 ⁰
	T35		1998	nd	1.2*10 ⁴	3.3*10 ⁰
Pichanal	T20	23° 19'S - 64° 14'W	1997	7.19	5.0*10 ³	4.6*10 ²
Quebrada del Toro	T29	24° 54'S - 65° 40'W	1998	5.43	1.5*10 ⁴	6.0*10 ¹
Santa Clara	T27	24° 49'S - 65° 29'W	1997	7.33	7.3*10 ³	5.1*10 ⁰
Bolivar, (Bs As)	T70	nd	2000	8.96	0	nd

Tabla 2: Densidad de rizobios del NOA nodulantes de poroto y leucaena. De cada muestra de suelo se indican el año de recolección, la localización y el código con que fue denominada, así como también el valor de pH determinado mediante el método de pasta dura.

^a La unidad que se utiliza es UNF/gr, unidades formadoras de nódulos por gramo de suelo seco.

^b En los casos en los que fueron analizadas más de una leguminosa los ensayos se realizaron en paralelo, utilizando la misma dilución de suelo para inocular las distintas plantas.

^c nd es no determinado.

Con el propósito de revelar los niveles en los suelos de rizobios nodulantes de otras leguminosas diferentes a poroto y leucaena se determinó el NMP utilizando *Vigna* spp. (caupí), *Medicago sativa* y *Glycine max*. *Vigna* spp. permite revelar poblaciones de crecimiento lento; alfalfa, las poblaciones de *S. meliloti* y soja las poblaciones de rizobios de crecimiento rápido (*S. fredii*) y lento (*B. japonicum* y *B. elkanii*). El NMP con *Vigna* spp. resultó en valores comparables a los encontrados con leucaena. No se encontraron nódulos en soja ni alfalfa inoculadas con las muestras de suelo.

Teniendo en cuenta que los valores del NMP reflejan los niveles de poblaciones en suelo, se concluye que los rizobios nodulantes de poroto son relativamente más altos que otros rizobios, siendo esta una característica de la región del NOA.

Palmer *et al.* (2000) describen algunos parámetros específicos de los suelos que pueden influenciar sobre la diversidad rizobiana. Entre ellos se destaca por un lado el pH y la concentración de los iones Mg⁺² y Ca⁺² que influyen el funcionamiento celular y por el otro el porcentaje de arcilla que afecta la sobrevivencia de las bacterias en el suelo. A su vez, algunos de estos parámetros son utilizados para evaluar la calidad agronómica de los suelos.

Corvalán (1996) analizó 5 parámetros de 1100 suelos provenientes de las regiones de explotación agrícola de las provincias de Salta y Jujuy y encontró una alta susceptibilidad a la degradación, lo cual provoca problemas con la estructura de los suelos tales como, la compactación, baja aireación, etc., lo que condiciona la fertilidad química y biológica de la tierra.

Los valores de pH de las muestras de este trabajo, que incluyen suelos de explotación agrícola y suelos vírgenes, estuvieron en el rango 5,20-8,18 (Apéndice 1). Sin embargo, el pH de la mayoría de los suelos se encuentra en el rango ligeramente ácido de 6.5-7.2, con lo cual no se esperaría una diferencia poblacional importante debido a esta característica de los suelos.

Se realizaron determinaciones fisicoquímicas de algunas muestras de suelo provenientes de los valles donde se cultiva el poroto y la soja. Los resultados se muestran en la Tabla 3. El suelo de Cerrillos, por ejemplo, presenta características de un suelo pobre con valores bajos de arcilla, materia orgánica, Ca^{+2} , Mg^{+2} , P y N. La salinidad de los tres suelos (determinada por la conductividad eléctrica) se encontró en los rangos bajos, la materia orgánica se correspondió con la presente en suelos pobres. Los valores de fósforo extractable y potasio intercambiable se encontraron en el rango medio o alto, excepto en Cerrillos donde resultó bajo.

Análisis	Resultado Cerrillos	Resultado Metán	Resultado Campichuelo
Profundidad de muestreo	0-40 cm	0-20 cm	0-20 cm
Arena	55 %	71 %	51 %
Limo	34%	22 %	39 %
Arcilla	11%	7 %	10 %
Calificación textural	Franco arenoso	Franco arenoso	Franco
Capacidad hídrica de saturación	27 %	27 %	27 %
pH en pasta	6.4	6.9	6.1
Conductividad eléctrica en extracto de saturación ^a	1.01 mmhos/cm	0.90 mmhos/cm	1.24 mmhos/cm
Carbonato de Ca y Mg	0 %	0 %	0 %
Carbono orgánico	1.03 %	1.20 %	0.92 %
Materia orgánica ^b	1.78 %	2.07 %	1.58 %
Nitrógeno total	0.10 %	0.11 %	0.10 %
Relación C/N	10	11	9
Fósforo extractable ^c	10 ppm	26 ppm	88 ppm
Sodio intercambiable	0.8 meq/100g	0.1 meq/100g	0.1 meq/100g
Potasio intercambiable ^d	1.19 meq/100g	0.68 meq/100g	1.20 meq/100g
Calcio intercambiable	4.4 meq/100g	nd	6.2 meq/100g
Magnesio intercambiable	1.8 meq/100g	nd	1.8 meq/100g
Cloruro soluble en extracto de saturación	1.7 meq/l	< 5 meq/l	2.7 meq/l
Cloruro soluble en extracto de saturación, referido a suelo seco	16 ppm	< 20 ppm	26 ppm

Tabla 3: Características fisicoquímicas del suelo. Muestra de Cerrillos, Salta (24° 57'S - 65° 29'W, T69), Metán (finca Radrizzani) y Campichuelo (finca Franzini).

^a Normal (<2.0), lig alta (2.1-4.0), alta (4.1-8.0) y muy alta (>8.1).

^b Muy bajo (<1.00), bajo (1.10-2.50), medio (2.51-3.90) y alto (>3.90).

^c Muy bajo (<7), bajo (8-10), medio (11-20) y alto (>20).

^d Muy bajo (<0.05), bajo (0.06-0.20), medio (0.21-0.50) y alto (>0.50).

La comparación de los distintos parámetros analizados de cada suelo muestra la variabilidad de los mismos, lo cual podría hacer suponer diversidad en las poblaciones de rizobios que los habitan como consecuencia de una mejor adaptación a ellos.

Características de las muestras utilizadas para establecer la colección de rizobios

Las muestras del NOA utilizadas consistieron en suelos y leguminosas noduladas. Los suelos fueron utilizados para inocular leguminosas en el laboratorio para detectar poblaciones de rizobios potencialmente presentes en ellos.

Los aislamientos fueron obtenidos a partir de los nódulos provenientes de las distintas muestras que se esterilizaron superficialmente y una alícuota de su contenido fue plaqueada en cajas de YEM (Vincent, 1970) con agregado de rojo congo (YEM-rc). Los microorganismos aislados fueron conservados en medios conteniendo glicerol, a una temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ / $-135\text{ }^{\circ}\text{C}$.

La colección de 1182 aislamientos comprende a rizobios de 22 géneros de leguminosas (Tabla 4). El mayor número de aislamientos proviene de: *Phaseolus vulgaris* var. *vulgaris* (n=530), *Phaseolus vulgaris* var. *aborigineus* (n=163), *Leucaena leucocephala* (n=154), *Phaseolus augusti* (n=114), *Desmodium* spp. (n=45), *Vigna* spp. (n=40), *Macroptilium* spp (n=22) y *Crotalaria* spp. (n=19). Un número menor a 15 aislamientos fueron recolectados de cada una de las otras especies de leguminosas listadas en la Tabla 4.

La identidad de género de cada miembro de la colección fue confirmada aplicando tres criterios diferentes. El primero fue basado en el aspecto que presentaron las colonias en el medio YEM-rc. Las colonias fueron de color blanco, rosa o naranja y además presentaron una abundante mucosidad, que podía ser laxa o por el contrario bien consistente. El segundo criterio fue investigar la presencia de genes de la enzima nitrogenasa, esenciales para la fijación de nitrógeno atmosférico, amplificando una región del gen *nifD*, muy conservado en todos los organismos que poseen esta enzima (Stoltzfus *et al*, 1997). El tercer criterio consistió en inocular la leguminosa hospedante de donde se aisló originalmente el microbio. En la Figura 3 se muestra el esquema de trabajo utilizado para establecer la colección.

Especie de leguminosa	Cantidad de aislamientos
<i>Acacia</i> spp.	3
<i>Arachis</i> spp.	5
<i>Calopogonium</i> spp.	6
<i>Centrosema</i> spp.	9
<i>Chaemecrita</i> spp.	3
<i>Crotalaria</i> spp.	19
Desconocido 1	5
Desconocido 2	3
Desconocido 3	6
<i>Desmodium</i> spp.	45
<i>Eriosema</i> spp.	11
<i>Eritrina</i> spp.	6
<i>Leucaena leucocephala</i>	154
<i>Macroptilium</i> spp.	22
<i>Medicago polymorpha</i>	2
<i>Mimosa</i> spp.	15
<i>Neonotonia</i> spp.	8
<i>P. aborigineus</i>	163
<i>P. augusti</i>	114
<i>P. vulgaris</i>	530
<i>Stylosanthes</i> spp.	1
<i>Tipuana tipu</i>	1
<i>Vicia benzodermis</i>	11
<i>Vigna</i> spp.	40

Tabla 4: Nómina de las leguminosas exploradas en el NOA. Se listan las distintas especies de leguminosas junto con el número de aislamientos de rizobios recuperados de cada una.

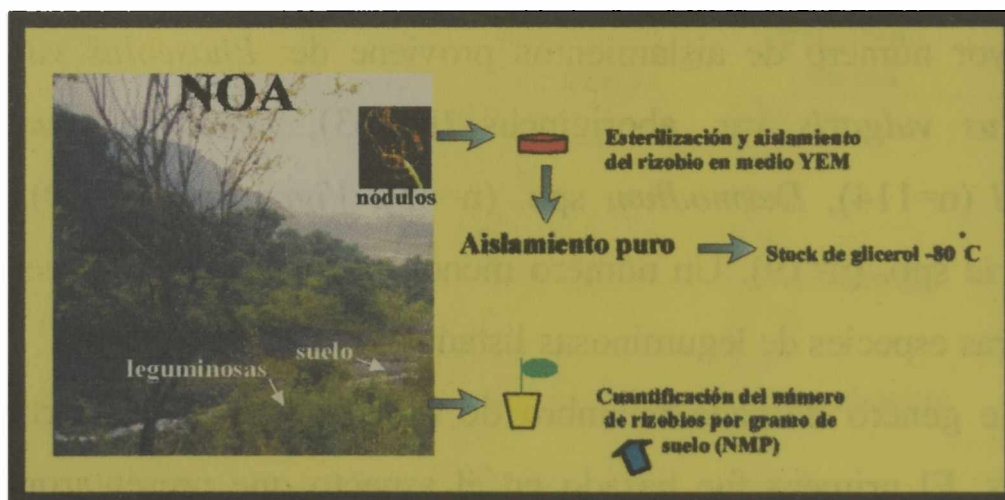
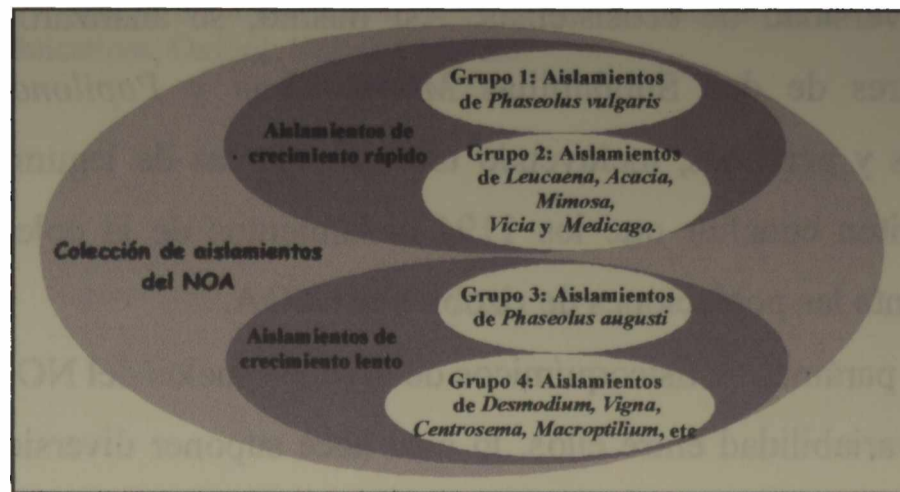


Figura 3: Aislamiento de las poblaciones de rizobios del NOA. A partir de diferentes muestras (leguminosas silvestres y suelos) se extrajeron nódulos, de los cuales se aislaron los rizobios. Las muestras de suelo fueron utilizadas también para cuantificar los rizobios de los distintos lugares.

La velocidad de crecimiento en medio sólido fue la propiedad diferencial observada en los miembros de la población. Una porción de la población creció durante las primeras 48 hs y la otra luego de las 72 hs. Esto permitió agrupar a la colección en dos subpoblaciones, que fueron a su vez divididas para favorecer la caracterización según:



El **Grupo 1** será estudiado en el Capítulo 4 de este trabajo, el **Grupo 2** en el Capítulo 6, mientras que los **Grupos 3 y 4** se estudiarán en el Capítulo 5.

Nomenclatura de los aislamientos que componen la colección

La diversidad de procedencia y el número de los aislamientos motivó la adopción de una nomenclatura alfanumérica que favorezca el ordenamiento de los mismos y una rápida asociación con su origen. De esta manera los aislamientos de nódulos de plantas que fueron cosechadas en la región se llamaron **NOAP**(seguido del número de planta)**N**(seguido del número de nódulo de esa planta). Por ejemplo **NOAP51N1** corresponde al nódulo 1 de la planta 51. Los aislamientos provenientes de suelos se identificaron como **T**(número de muestra de suelo)**N**(número de nódulo)**L**(seguido de la o las primeras letras de la leguminosa usada para atrapar al rizobio). Por ejemplo **T23N3L** corresponde al nódulo 3 obtenido de la muestra de suelo 23 y atrapado con leucaena. En algunas oportunidades los rizobios fueron aislados de nódulos de plantas utilizadas en los ensayos del NMP y para diferenciarlos se los denominó **T**(número de muestra de suelo)-(número de nódulo)**L**(seguido de la o las primeras letras de la leguminosa usada para atrapar al rizobio), como por ejemplo **T29-8P**. Por último en algunos ensayos particulares se aislaron rizobios que se identificaron con nombres arbitrarios como Sc15 o Camp11. El listado de todos los aislamientos se muestra en los Apéndices 2 a 5

Discusión

Se esperaría que una colección de aislamientos que represente una determinada región, este compuesta por miembros recolectados de los más diversos ambientes geográficos y en el caso de una colección de rizobios que estos fueran aislados de la mayor variedad de especies de leguminosas que habitan los distintos ambientes. Es por ello que la colección de aislamientos de rizobios obtenida en este estudio proviene de regiones distantes cubriendo una gran extensión

del NOA y una diversidad de ecosistemas. Así mismo, se analizaron los aislamientos de leguminosas silvestres de dos Subfamilias *Mimosoideae* y *Papilionoideae*. Se exploraron leguminosas anuales y perennes, incluyendo también plantas de leguminosas arbóreas. Estas características permiten concluir que los 1194 aislamientos de la colección constituyen una muestra que representa las poblaciones de rizobios del NOA.

El análisis de los parámetros fisicoquímicos de algunos suelos del NOA del mismo ambiente geográfico mostró variabilidad entre ellos, lo cual hace suponer diversidad en las poblaciones de rizobios que los habitan.

Una vez establecida la colección de aislamientos se aplicó un criterio para iniciar el estudio de la diversidad de la misma. En primer lugar, se decidió analizar los aislamientos de una especie de leguminosa y luego la comparación global de los aislamientos representativos de cada leguminosa. Se observó también, que las especies de leguminosas podrían agruparse según la velocidad de crecimiento de sus aislamientos. Las asociadas a rizobios de crecimiento rápido son la forma primitiva de poroto *P vulgaris* var. *aborigineus*, *Mimosa* spp., *Acacia* spp., *Vicia* spp. y *Medicago* spp. Las especies de leguminosas noduladas por aislamientos de crecimiento lento son *Desmodium* spp., *P augusti*, *Crotalaria* spp., *Eriosema* spp., *Macroptilium* spp., *Vigna* spp., *Arachis* spp., *Calopogonium* spp., *Centrosema* spp., *Chaemecrista* spp., *Stylosanthes* spp., *Tipuana tipa* y *Eritrina* spp.. La mayoría de las plantas analizadas fueron encontradas en los mismos lugares que *P vulgaris* var. *aborigineus*.

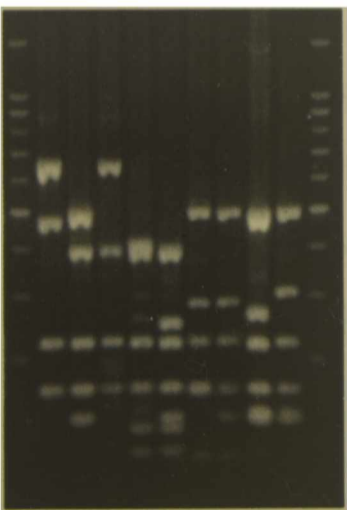
Se determinó la densidad rizobiana nodulante de poroto en muestras de suelo de casi todas las regiones geográficas del NOA, encontrando valores elevados que fueron mayores en las regiones de siembra de *P vulgaris*. Además, las poblaciones indígenas capaces de nodular poroto son superiores a las poblaciones nodulantes de *Leucaena leucocephala* y también a las otras leguminosas utilizadas en este trabajo. Esta es una característica propia del NOA ya que los niveles de rizobios en otra región del país, tal como la provincia de Buenos Aires, fueron muy bajos.

1. 7- Bibliografía.

- 1- **Corvalán E.** 1996. Niveles de fertilidad de los suelos agrícolas de Salta. Laboratorio Central de Análisis. INTA-EEA Salta.
- 2- **Palmer, K. M., and J. P. W. Young.** 2000. Higher diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* populations in arable soils than in grass soils. *Appl Env Microbiol.* **66**:2445-2450.
- 3- **Somasegaran, P., H. J. Hoben.** 1985. Methods in legume-*Rhizobium* technology. NifTAL Project and MIRCEN.
- 4- **Stoltzfus, J. R., R. So., P. P. Malarvithi, J. K. Ladha, and F. de Bruijn.** 1997. Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biological nitrogen fixation. *Plant and Soil.* **197**:25-36.

- 5- **Vincent, J. M.** 1970. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. IBP Handbook No 15. Blackwell scientific Publications, Oxford, United Kingdom.

Capítulo 2



Capítulo 2

El uso de marcadores moleculares de ADN para el estudio de la diversidad de las poblaciones de rizobios

Introducción.

Las técnicas empleadas para explorar el genoma bacteriano utilizadas en numerosos estudios de taxonomía y tipificación bacteriana se pueden agrupar en: **A-** Las que analizan al azar el genoma entero. **B-** Las que estudian las variaciones alélicas de un gen específico. **C-** Las que estudian a los elementos genéticos móviles como las secuencias de inserción o los plásmidos (Gürtler y Mayall, 2001; Doignon-Bourcier *et al.*, 2000; Garnier *et al.*, 1991; Gürtler y Stanisich, 1996; Laguerre *et al.*, 1994 y 2001; Neef *et al.*, 1990; van Berkum *et al.*, 2000; Vinuesa *et al.*, 1998; Willems *et al.*, 2001, Wang *et al.*, 1998 y 1999). En este capítulo se hace referencia a las técnicas agrupadas en A y B, mientras que en el Capítulo 4 se hará referencia a las del grupo C.

A- El análisis del genoma completo mediante la generación de un patrón de bandas ha sido facilitado por el descubrimiento de los elementos repetitivos (RAPD, ERIC, BOX y REP) y la adaptación de las técnicas de PCR. La similitud entre pares de perfiles se determina a través de la utilización del coeficiente de correlación producto-momento que se aplica a la curva densitográfica de cada calle del gel (Tenover *et al.*, 1995, Rademaker *et al.*, 2000). Gürtler y Mayall consideran que estos métodos, en relación con la taxonomía, poseen el mismo nivel de resolución que un método fenotípico puesto que las variaciones de los patrones no son atribuibles a un gen particular (2001).

B- En la búsqueda de variantes alélicas que puedan usarse como marcadores moleculares se han utilizado diversos genes específicos tales como, los de patogenicidad y resistencia a antibióticos y no específicos como 16S ARNr (Gürtler y Mayall, 2001). El estudio del gen ribosomal 16S ARNr es uno de los más difundidos y ya se han mencionado en la Introducción General las ventajas de su utilización para la identificación de especies bacterianas. Recientemente, Fitz-Gibbon y House (1999) construyeron árboles filogenéticos a partir de 11 genomas completamente secuenciados correspondientes a microorganismos de vida libre y estos coincidieron con los árboles obtenidos a partir de las secuencias de 16S ARNr de las mismas especies, demostrando la utilidad de este gen como marcador de especies bacterianas. Las técnicas que utilizan gradientes desnaturizantes (DGGE y TGGE) permiten diferenciar dos fragmentos de ADN aún cuando la secuencia difiere en un

nucleótido. El uso de estas técnicas para el análisis de las secuencias de 16S ADNr de una colección de microorganismos permitiría examinar un número mayor de muestras que mediante la secuenciación de los respectivos fragmentos. Además, se podría analizar la composición de las comunidades de microorganismos en muestras de suelo. La aplicación de DGGE al estudio de las comunidades rizobianas del suelo es limitada ya que no se han encontrado aún las condiciones experimentales apropiadas que comprenda a todas las especies (Vallaey *et al.*, 1997). Otras estrategias para explorar el genoma intentan describir las variaciones en las secuencias de regiones no codificantes, tal es el caso de la región comprendida entre los genes 16S y 23S ARNr (IGS). Esta región tiene una presión de selección más baja que los genes que la flanquean y numerosos estudios han demostrado que presenta mayor variabilidad que el gen 16S ARNr (Barry *et al.*, 1991; Doignon-Bourcier *et al.*, 2000; Garnier *et al.*, 1991; Gütler y Stanisich, 1996; Laguerre *et al.*, 1996; van Berkum *et al.*, 2000; Vinuesa *et al.*, 1998; Willems *et al.*, 2001). Esta variabilidad entre bacterias de la misma especie está dada principalmente por diferencias en su secuencia nucleotídica, así como también en la longitud de la IGS. El análisis de la IGS, ha sido por lo tanto desarrollado con el propósito de caracterizar los aislamientos que pertenecen a una misma especie

En este capítulo se presentan los ensayos dirigidos a evaluar los métodos y optimizar las condiciones experimentales para la caracterización de una colección de especies conocidas de rizobios usada para tal fin.

Fingerprinting de ADN a partir de amplificaciones con primers semlespecíficos

La obtención de los perfiles de *fingerprints* resulta una práctica común en numerosos laboratorios sin embargo, muchas variables que influyen en las distintas etapas, desde la preparación de la muestra de ADN hasta la separación de los productos de PCR en geles de agarosa, pueden conducir a resultados divergentes y afectar el análisis de similitud. Con el propósito de asegurar la reproducibilidad de la técnica de *fingerprints* de ADN en nuestro laboratorio se llevaron a cabo los siguientes ensayos.

Ensayo N° 1. Las variables ensayadas fueron: A- La amplificación en el mismo termociclador en tiempos diferentes. B- La utilización de distintos termocicladores para llevar a cabo la misma reacción de PCR. C- El uso de diferentes protocolos para la preparación del ADN molde

del mismo microorganismo y aplicados a distintos tiempos. El resultado de este estudio mostró que:

- ✓ El perfil de bandas en el rango comprendido entre 150 y 1200 pb de las amplificaciones realizadas en el mismo termociclador resultó reproducible en días diferentes. Las bandas mayores a 1200 pb no se encontraron reproducibles (Figura 1A).
- ✓ El mismo molde de ADN dio lugar a los mismos perfiles de bandas (en el rango de tamaño de 150 – 1200 pb) para reacciones de PCR realizadas en diferentes termocicladores (Figura 1A).
- ✓ Todas las preparaciones de ADN realizadas con el protocolo que utiliza una resina de intercambio iónico generaron el mismo perfil de *rep-fingerprints* dentro del rango de 150 – 1200 pb, demostrando que este protocolo de preparación resulta reproducible. Las amplificaciones a partir de ADN molde obtenido con extracción fenólica resultaron en perfiles iguales a los de la otra preparación, con la excepción de un amplicón de aproximadamente 850 pb (Figura 1A).

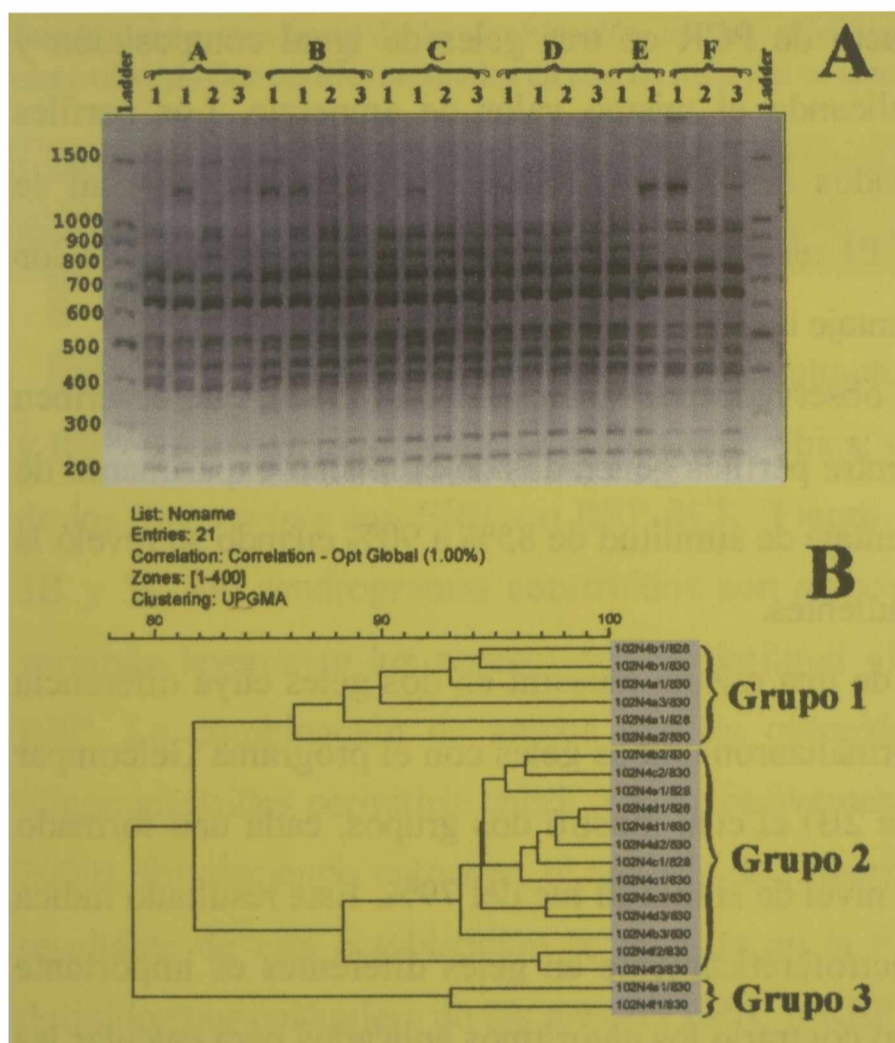


Figura 1: Condiciones experimentales de *fingerprints* teniendo en cuenta la técnica empleada en la preparación del ADN molde y la utilización de diferentes termocicladores. A- Perfiles de ERIC-*fingerprints* del mismo microorganismo obtenidos utilizando diferentes condiciones experimentales. Con letras se identifican los distintos protocolos utilizados para preparar el ADN, letras A a C son preparaciones con resinas a partir de medio líquido, D y E a partir de medio sólido, y F es una preparación de ADN por extracción fenólica. Con números se identifican los tres termocicladores utilizados. El mismo molde fue amplificado en dos días diferentes en el termociclador 1 (se observan las dos calles de cada preparación con el número 1). **B-** Dendrograma obtenido a partir de la Figura 1A utilizando el coeficiente producto-momento del programa Gelcompar 4.1. Se distingue el tipo de preparación con una letra minúscula a, b, c, d, e y f, que se corresponden con las mismas letras mayúsculas de la sección A. Los números corresponden a los termocicladores, 1, 2 o 3 y las dos reacciones de PCR realizadas en tiempos distintos se identificaron como 830 y 828 respectivamente.

Los productos de *rep-fingerprints* resultantes de la amplificación con las distintas condiciones ensayadas fueron separados en un gel de agarosa como se muestra en la Figura 1A

y se analizó la similitud entre los perfiles mediante un dendrograma obtenido con el programa Gelcompar 4.1 (Figura 1B). El dendrograma agrupa todos los perfiles en tres *clusters* llamados 1, 2 y 3 con un porcentaje de similitud del 78%. Dentro de cada grupo la similitud entre los perfiles es mayor de aproximadamente 90% y se observa que los perfiles incluidos en un grupo comprenden a *fingerprints* que provienen de distintas condiciones, demostrando la reproducibilidad de la técnica.

Se concluye que los perfiles de rep-fingerprints son reproducibles y se adopta la región comprendida entre los tamaños 150-1200 pb para realizar el análisis de similitud entre los perfiles. Además, se concluye que el protocolo de preparación de ADN que utiliza la suspensión de una resina de intercambio iónico es satisfactorio y conveniente para su uso en los estudios de rizobios.

Ensayo N° 2. El segundo ensayo estuvo dirigido a evaluar la reproducibilidad del procedimiento de separación electroforética en geles de agarosa. Para ello se sembraron tres alícuotas de una misma muestra de producto de PCR en tres geles de igual composición y tamaño, la electroforesis fue realizada aplicando el mismo valor de amperaje. Los perfiles resultantes fueron digitalizados y combinados en una única imagen, a partir de la cual se comparó la similitud de los *fingerprints*. El resultado de esta comparación mostró que los perfiles de las tres alícuotas tienen un porcentaje de similitud del 90% (Figura 2A).

Estos resultados están de acuerdo con lo observado por Vinuesa *et al.* (1998), que describen un porcentaje de similitud de 90% a 95% entre perfiles generados en el mismo experimento de PCR y resueltos en el mismo gel y un porcentaje de similitud de 85% a 90% cuando se reveló la misma muestra en geles de agarosa independientes.

En otro ensayo se separaron dos alícuotas de una misma muestra en dos geles cuya diferencia fundamental fue la longitud (10 cm). Se normalizaron ambos geles con el programa Gelcompar 4.1 y se construyó un dendrograma (Figura 2B) el cual mostró dos grupos, cada uno formado por las muestras pertenecientes a un gel. El nivel de similitud fue del 79%. Este resultado indica que para comparar muestras separadas electroforéticamente en geles diferentes es importante utilizar los geles de igual dimensión, en caso contrario los algoritmos aplicados para calcular las similitudes tenderán a agrupar los perfiles de un mismo gel.

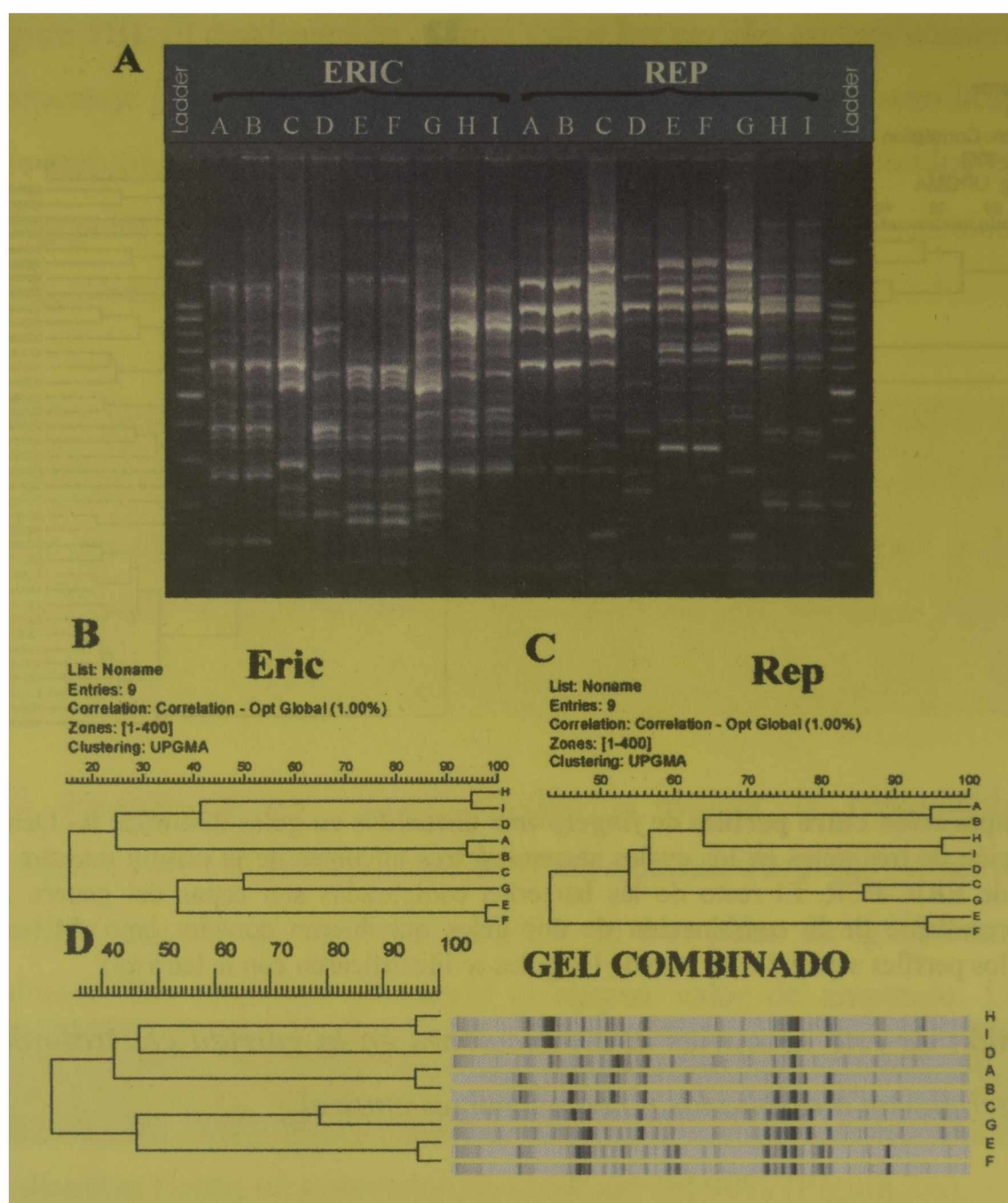


Figura 3: Poder de resolución de ERIC y REP fingerprints. A- Productos de PCR ERIC y REP obtenidos a partir de distintas cepas de rizobios que fueron identificadas con letras. Las reacciones de ERIC o REP- PCR fueron llevadas a cabo a partir del mismo ADN molde. B y C- Dendrogramas obtenidos con los perfiles de cada grupo de *primers*. D- Dendrograma resultante de la combinación de ambas corridas electroforéticas.

Análisis por RFLP del gen 16S ARNr (ARDRA, *Amplified rDNA Restriction Analysis*)

Para identificar los sitios de reconocimiento de enzimas endonucleasas se aplicó el análisis conocido como MRSP (*Mapped Restriction Site Polymorphism*) a las secuencias de 16S ADNr de las especies de rizobios presentes en los bancos de datos (Laguerre *et al.*, 1996). Se utilizaron los programas Mapplot, Map (ambos programas pertenecientes al paquete de programas de GCG) y Clone Manager 4.01. El resultado de este análisis se muestra en la Tabla 1.

Enzima	<i>R. tropici</i> A	<i>R. huautlense</i>	<i>R. tropici</i> B	<i>R. etli</i>	<i>R. leguminosarum</i>	<i>R. mongolense</i>	<i>R. galegae</i>	<i>M. ciceri</i>	<i>M. huakuii</i>	<i>M. loti</i>	<i>S. medicae</i>	<i>R. gallicum</i>	<i>R. giardinii</i>	<i>S. teranga</i>	<i>S. sahelii</i>	<i>S. fredii</i>	<i>B. japonicum</i>	<i>B. elkanii</i>	<i>B. liaoningense</i>
<i>HaeIII</i>	486	486	486	487	486	488	571	486	486	486	486	486	486	486	486	486	300	300	300
	277	214	278	278	278	204	278	282	282	282	282	279	282	282	282	282	280	282	280
	276	204	224	179	224	179	205	204	205	226	204	190	224	204	204*	231*	186	192	186
	179	179	179	173	179	170	179	179	179	179	179	179	179	179	179	179	179	186	179
	85	153	155	158	155	121	135	121	135	153	121	155	155	133	135*	152*	174	179	172
	71	85	86	66	86	74	86	85	85	85	85	85	85	85	85	85	85	100	100
	66	74	66	46	46	66		66	66	66	66	66	66	66	66	66	80	93	85
		66		39		46							34				66	85	5
			34		39											60	78		
					34											34			
<i>MboI</i>	705	854	706	707	708	943	854	945	945	945	587	942	352	944	603	587	708	710	708
	205	228	233	175	218	164	219	218	219	228	319	178	319	218	342	319	235	235	235
	175	174	175	174	175	153	167	153	167	174	218	174	232	167	218	256	172	174	166
	103	87	174	167	174	83	87	83	83	83	153	83	175	83	167	83	168	133	83
	85	83	84	83	83	54	83	24	24	24	83	54	174	24	83	23	83	83	54
	83	24	56	56	56	24	24			12	24	24	83		24	16	54	54	37
	56	11	24	54	24					11	23	13	56		13*		24	49	24
	24		13	24	16						16	6	39					24	
4		5	16	4								24					21		
		4	4									13					8		
												6					4		
												4							
<i>MspI</i>	655	496	656	497	498	498	496	495	309	495	660	497	660	381*	381*	419	502	495	502
	452	273	401	383	380	380	273	309	254	308	380	400	400	253	254	407	289	289	289
	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222
	75	157	159	162	162	125	139	125	139	157	125	159	159	138*	138*	156*	156	149	156
	22	123	22	123	123	123	123	122	122	130	22	123	22	122	122	109	131	122	129
	14	117	14	37	37	37	108	107	109	122	14	37	14	109	109	86	81	96	9
		37		22	22	22	37	43	108	43		22		86	43	33	63	79	
		22		14	14	14	22		86			14		43	33	22		43	
	14					14		43					33	22	14				
								33					22	14	13				
								13					14	13					
													13						
<i>TaqI</i>	541	839	471	469	469	841	839	531	531	527	839	839	469	838	839	839	843	843	843
	359	359	357	359	359	359	359	315	315	315	315	360	315	315	315	315	361	363	361
	313	219	316	315	316	187	201	308	308	308	187	221	314	201	201	218*	206	237	71
	137	44	221	224	224	34	35	187	201	219	48	54	112	48	48	61*	34	52	32
	56		56	56	56			48	48	60	34		109	34	34	48			
	34		53	37	34			34	35	48			56						
												54							
												48							

Tabla 1: Sitios de restricción encontrados en secuencias de especies rizobianas. Se muestran los tamaños en pares de bases de los fragmentos generados por cada endonucleasa de restricción en las secuencias de las especies de rizobios. Los códigos de acceso a los bancos de datos de las secuencias son: *R. tropici* A (X67234), *R. huautlense* (AF025852), *R. tropici* B (U89832), *R. etli* (U28916), *R. leguminosarum* (U29388), *R. mongolense* (U89817), *R. galegae* (D12793), *M. ciceri* (U07934), *M. huakuii* (D12797), *M. loti* (D14514), *S. medicae* (L39882), *R. gallicum* (U86343), *R. giardinii* (U86344), *S. teranga* (X68388), *S. sahelii* (X68390), *S. fredii* (X67231), *B. japonicum* (Z35330), *B. elkanii* (U35000) y *B. liaoningense* (AB029402).

La Tabla 1 muestra que algunos sitios están conservados en todas las especies, tal es el caso de los dos sitios de la endonucleasa *MspI* que flanquean al fragmento de 222 pb. También, en el caso de algunas enzimas, se observan pocos sitios de reconocimiento (por ejemplo *HinfI* o *RsaI*), mientras que para otras hay un número mayor de sitios (*AluI*, *MspI* o *DdeI*).

En una segunda etapa se optimizaron las condiciones experimentales para amplificar el gen 16S ARNr de las muestras de ADN molde de las cepas de referencia (Tabla 2) usando los *primers* rD1/fD1 (Weisburg *et al.* 1991). El tamaño del producto fue de 1500 pb en todos los casos, excepto con la cepa CFN299 (*Rhizobium tropici* A) que fue de 1600 pb. Este fragmento de mayor tamaño se debe a una inserción de 72 pb en la secuencia 16S ADNr que ha sido descrita por van Berkum *et al.* (1994). El producto resultante de la amplificación de las especies de rizobios de referencia fue incubado individualmente con las enzimas de restricción derivadas del análisis del análisis de MRSP.

Cepa	Género y especie	Huésped	Sinónimos
CFN42	<i>Rhizobium etli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	
CFN299	<i>Rhizobium tropici</i> A	<i>Phaseolus vulgaris</i>	
CIAT899	<i>Rhizobium tropici</i> B	<i>Phaseolus vulgaris</i>	
USDA2671	<i>R. leguminosarum</i> bv phaseoli	<i>Phaseolus vulgaris</i>	
USDA2370	<i>R. leguminosarum</i> bv viciae	<i>Pisum sativum</i>	
USDA4900	<i>Rhizobium huautlense</i>	<i>Sesbania herbacea</i>	
USDA4128	<i>Rhizobium galegae</i>	<i>Galega orientalis</i>	gal 1261, HAMBI 540
USDA191	<i>Sinorhizobium fredii</i>	<i>Glycine max</i>	
USDA257	<i>Sinorhizobium fredii</i>	<i>Glycine max</i>	
USDA4893	<i>Sinorhizobium saheli</i>	<i>Sesbania canabina</i>	ORS 609, LMG 7837
USDA4894	<i>Sinorhizobium teranga</i>	<i>Acacia laeta</i>	ORS 1009, LMG 7834
USDA1037	<i>Sinorhizobium medicae</i>	<i>Medicago spp</i>	
Cepa1021	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	<i>Medicago sativa</i>	
USDA1002	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	<i>Medicago sativa</i>	3DOa 2
USDA3592	<i>Mesorhizobium tianshanense</i>	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	A-1BS
USDA3383	<i>Mesorhizobium ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>	UPM-Ca 7
USDA110	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Glycine max</i>	311b110, TAL 102, IITA 2121, IITA 2018
USDA59	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Glycine max</i>	311b59, 61A68, SEMIA5057, NC 13
USDA76	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	<i>Glycine max</i>	311b76
USDA94	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	<i>Glycine max</i>	311b94, RCR 3422
USAD46	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	<i>Glycine max</i>	311b46, 61A66, SEMIA 0584
USDA61	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	<i>Glycine max</i>	311b61
NGR234	<i>Rhizobium</i> sp.	<i>Lablab purpureus</i>	

Tabla 2: Cepas de referencia usadas para la asignación de especie. Se describe la denominación común de la cepa, la posición taxonómica, el hospedante de origen y otras denominaciones encontradas en la literatura.

Los perfiles de RFLP obtenidos experimentalmente con las cepas de referencia y los esperados a partir del análisis de MRSP de las respectivas secuencias fueron coincidentes. Se observaron sin embargo, algunas divergencias las cuales pudieron ser atribuidas a errores presentes en el dato de secuencia o a secuencias incompletas presentes en los bancos de datos,

tal como sucede con *R. tropici* A, CFN299. Por otra parte, se observó que las bandas de tamaños menores a 120 pb no siempre pudieron ser resueltas en los geles de agarosa.

Los diferentes perfiles obtenidos con una determinada enzima fueron identificados con letras. Los perfiles resultantes del tratamiento con cada endonucleasa se combinaron en un único patrón dando lugar a un genotipo de 16S ADN-RFLP (o genotipo de ARDRA).. La Figura 4 y la Tabla 3 resumen los perfiles obtenidos con cada especie rizobiana.

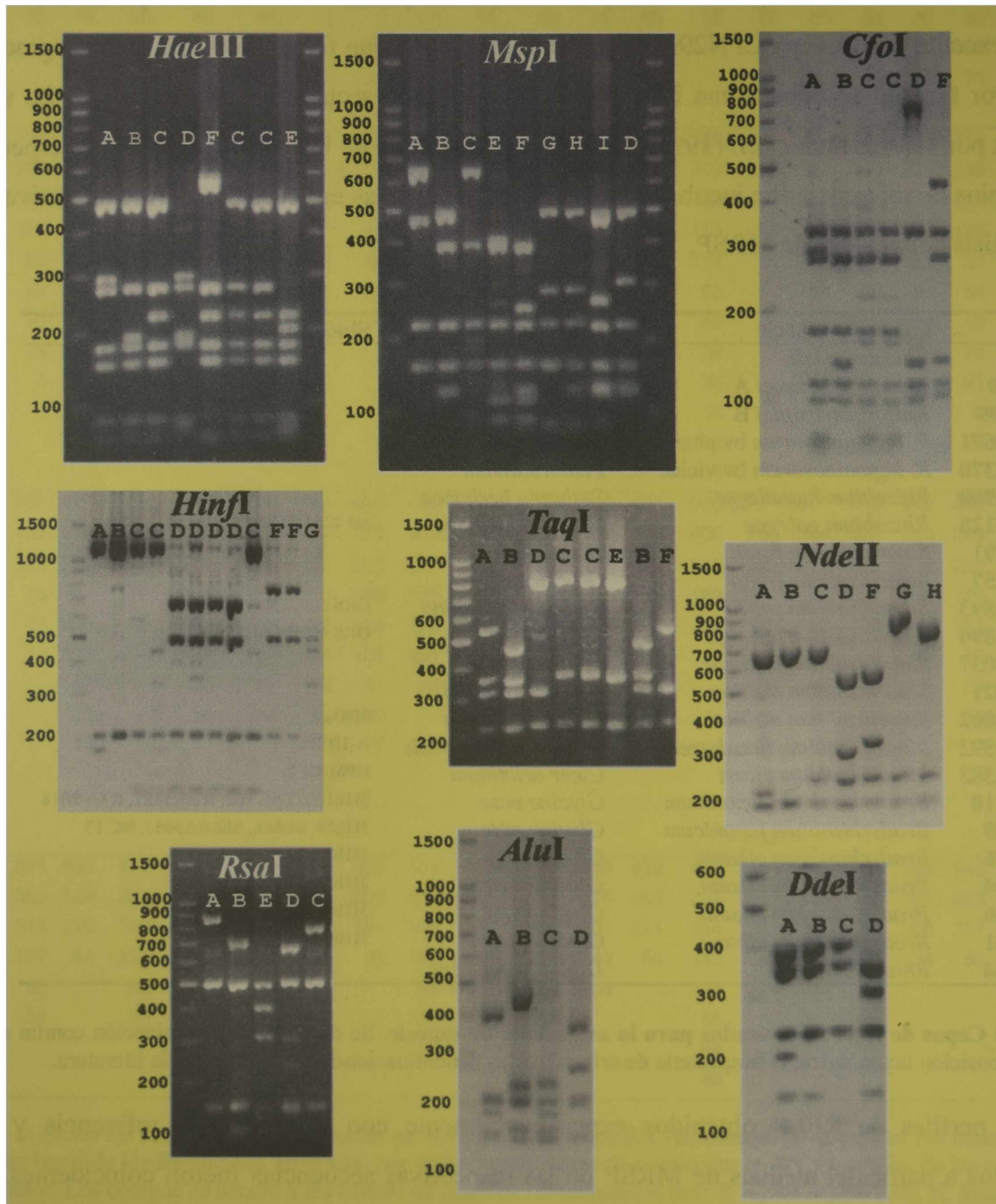


Figura 4: Perfiles de restricción del fragmento de 1500 pb de 16S ADNr. Se muestran los distintos patrones de digestión con las endonucleasas *HaeIII*, *MspI*, *CfoI*, *HinfI*, *TaqI*, *NdeII*, *RsaI*, *AluI* y *DdeI*. Cada perfil fue distinguido con una letra, las cuales se corresponden con las letras de la Tabla 3. Las corridas electroforéticas fueron realizadas en geles de agarosa 2.5 % y se incluyó un marcador de tamaño molecular (Ladder 100, Promega)

Especie	HaeIII	MspI	NdeII	AbaI	HinfI	CfoI	DdeI	TaqI	XbaI	Genotipo
<i>R. tropici</i> A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	AAAAAAAAA (1)
<i>R. etli</i>	B	B	B	A	B	B	B	B	B	BBBABBBBB (2)
<i>R. tropici</i> B	C	C	C	A	C	C	B	B	C	CCCACCBBC (3)
<i>S. meliloti</i>	C	C	D	A	D	B	B	D	C	CCDADBDDC (4)
<i>R. leg</i> bv phaseol	C	B	C	A	C	B	B	B	C	CBCACBBBC (5)
<i>R. leg</i> bv vicia	C	B	C	A	C	B	B	B	C	CBCACBBBC (5)
<i>S. fredii</i>	C	E	D	A	D	B	B	D	D	CEDADBDD (7)
<i>S. saheli</i>	C	F	F	A	D	B	B	D	C	CFFADBDDC (8)
<i>S. terungae</i>	C	F	G	A	D	B	B	D	C	CFGDBDDC (9)
<i>B. japonicum</i>	D	G	C	B	F	D	C	C	E	DGCBFDCCE (10)
<i>B. elkanii</i>	D	H	C	B	G	E	C	C	E	DHCBGECCE (11)
<i>R. galegae</i>	F	I	H	C	C	B	D	E	C	FIHCCBDEC (12)
<i>M. ciceri</i>	C	D	G	D	D	F	B	F	D	CDGDDFBFD (13)
<i>R. huastlense</i>	E	I	H	C	C	B	D	F	C	EIHCCBDFC (14)
NGR234	C	E	D	A	D	B	B	D	D	CEDADBDD (7)

Tabla 3: Perfiles de 16S ADN_r-RFLP de las cepas de referencia. Patrones de digestión del fragmento resultante de la amplificación por PCR con los *primers* rD1/fD1. Las letras se corresponden con las usadas en la Figura 4 para identificar los perfiles de RFLP.

El uso de las enzimas *MspI*, *NdeII* y *HaeIII* o *TaqI* permitió distinguir cada especie de rizobio. Los perfiles propios de las cepas de referencia generados con las distintas endonucleasas constituyeron una herramienta criteriosa para la clasificación de los aislamientos del NOA. Por ejemplo, las especies conocidas del género *Bradyrhizobium* se pueden distinguir utilizando *HinfI* y *CfoI* (Tabla 3). Las tres especies nodulantes de poroto *R. etli*, *R. tropici* y *R. leguminosarum* bv phaseoli se pueden diferenciar por el uso de las enzimas *MspI* y *HaeIII*.

Estudio de la región intergénica, IGS.

La gran variabilidad encontrada dentro de la región comprendida entre los genes 16S y 23S ARNr en rizobios que tienen la misma secuencia de 16S ADN_r se ha utilizado para estudios de diversidad intraespecífica (Laguerre *et al.*, 1996; Vinuesa *et al.*, 1998; van Berkum *et al.*, 2000). Este análisis fue usado también en este trabajo para caracterizar las poblaciones del NOA. Se amplificó dicha región utilizando los *primers* FGPS14900 (16F) y FPGL132'(23R). El primero (*forward*) deriva de una secuencia conservada en el extremo 3' del gen 16S ARNr y el *primer* reverso corresponde a el extremo 5' del gen 23S ARNr (Laguerre *et al.*, 1996). Las condiciones de reacción fueron optimizadas utilizando las cepas de referencia mencionadas en la Tabla 2 y algunos aislamientos de poroto caracterizados por 16S ADN_r. Se encontró que los productos de PCR de las especies *R. etli* y *R. leguminosarum* presentan un rango de tamaño de 1100 a 1400

pb mientras que las especies del género *Bradyrhizobium* tienen un tamaño menor de aproximadamente 900 pb (Figura 5).

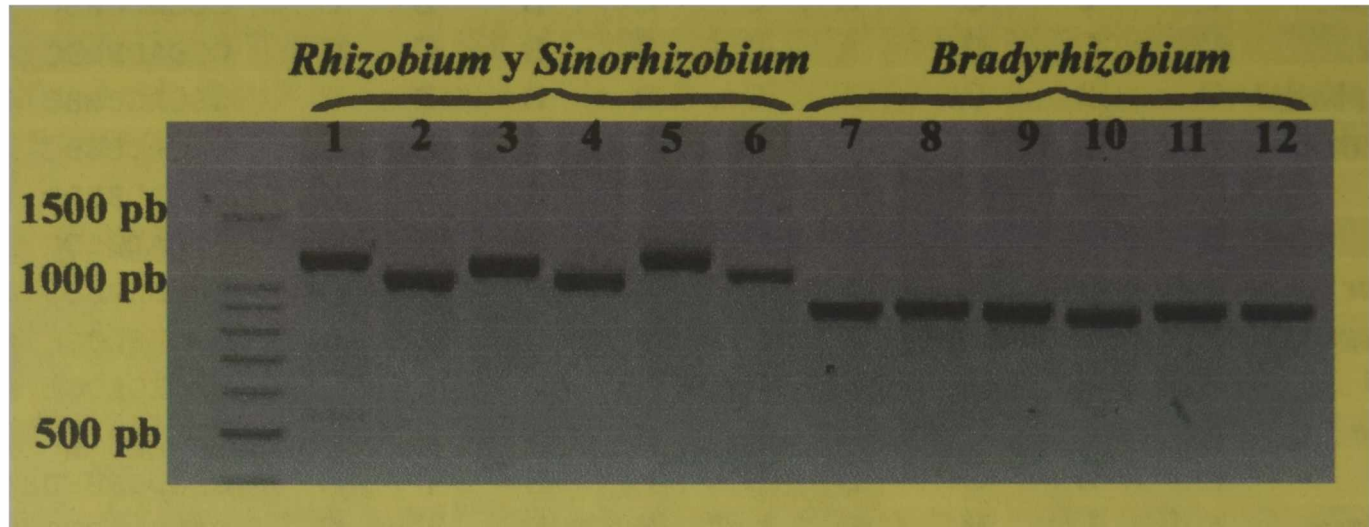


Figura 5: Productos de PCR de la región intergénica 16S-23S ADNr. Se muestran las diferencias en los rangos de tamaños de los productos de amplificación de la IGS de los géneros *Rhizobium* y *Sinorhizobium* con respecto a los del género *Bradyrhizobium*. Además, dentro de las especies de crecimiento rápido se observa un rango de variación entre 1100 y 1400 pb, mientras *Bradyrhizobium* presenta productos alrededor de 900 pb. Las calles fueron sembradas con los productos de IGS de: 1-NOAP37N1 (Poroto), 2- T44N22P (Poroto), 3- *R. tropici* B, (CIAT899), 4- T56N1L (leucaena), 5- NOAP25N1 (Poroto), 6- T25N1L (leucaena), 7- NOAP193N1 (*P. augusti*), 8- NOAP227N4 (*P. augusti*), 9- T46N1Paug (*P. augusti*), 10-NOAP19N1 (*P. augusti*), 11- - T46N2Paug (*P. augusti*), 12- NOAP193N2 (*P. augusti*).

Análisis del gen 16S ARNr de especies rizobianas: La identificación de regiones variables

Con el propósito de identificar las partes hipervariables del gen 16S ARNr de rizobio se alinearon las secuencias de distintas especies y se identificó una región de 260 pb, en la cual se encontraron entre 1 y 51 posiciones variables. Este fragmento de ADN y la región propuesta por Young *et al.* (1991) para la asignación de especie resultaron ser coincidentes (Figura 6).

	1	16	26	36	46	56	66	76	86
<i>B. jap</i> 1	AGGCTT AACACATGCA AGTCGA CG	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT
<i>B. jap</i> 2	AGGCTT AACACATGCA AGTCGA CG	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT
<i>B. elkanii</i>	AGGCTT AACACATGCA AGTCGA CG	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT
<i>S. meliloti</i>	AGGCTT AACACATGCA AGTCGA CG	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT
<i>S. fredii</i>	AGGCTT AACACATGCA AGTCGA CG	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT
<i>S. saheli</i>	AGGCTT AACACATGCA AGTCGA CG	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT
<i>S. teranga</i>	AGGCTT AACACATGCA AGTCGA CG	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT
<i>R. galegae</i>	AGGCTT AACACATGCA AGTCGA CG	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT
<i>R. huatlense</i>	AGGCTT AACACATGCA AGTCGA CG	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT
<i>R. etli</i>	AGGCTT AACACATGCA AGTCGA CG	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT
<i>R. leg</i>	AGGCTT AACACATGCA AGTCGA CG	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT
<i>M. ciceri</i>	AGGCTT AACACATGCA AGTCGA CG	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT
<i>R. tropici</i> B	AGGCTT AACACATGCA AGTCGA CG	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT	GGGAAACT
	96	106	116	126	136	146	156	166	176
<i>B. jap</i> 1	CGGAA AAC	GGGAAACT	GCTGCTAATA	CCG ATATAG	CCTTACGGG	AAAGATTTAT	CGGCA AGGA	TGGCCCGCG	TGATTAGC
<i>B. jap</i> 2	CGGAA AAC	GGGAAACT	GCTGCTAATA	CCG ATATAG	CCTTACGGG	AAAGATTTAT	CGGCA AGGA	TGGCCCGCG	TGATTAGC
<i>B. elkanii</i>	CGGAA AAC	GGGAAACT	GCTGCTAATA	CCG ATATAG	CCTTACGGG	AAAGATTTAT	CGGCA AGGA	TGGCCCGCG	TGATTAGC
<i>S. meliloti</i>	CGGAA AAC	GGGAAACT	GCTGCTAATA	CCG ATATAG	CCTTACGGG	AAAGATTTAT	CGGCA AGGA	TGGCCCGCG	TGATTAGC
<i>S. fredii</i>	CGGAA AAC	GGGAAACT	GCTGCTAATA	CCG ATATAG	CCTTACGGG	AAAGATTTAT	CGGCA AGGA	TGGCCCGCG	TGATTAGC
<i>S. saheli</i>	CGGAA AAC	GGGAAACT	GCTGCTAATA	CCG ATATAG	CCTTACGGG	AAAGATTTAT	CGGCA AGGA	TGGCCCGCG	TGATTAGC
<i>S. teranga</i>	CGGAA AAC	GGGAAACT	GCTGCTAATA	CCG ATATAG	CCTTACGGG	AAAGATTTAT	CGGCA AGGA	TGGCCCGCG	TGATTAGC
<i>R. galegae</i>	CGGAA AAC	GGGAAACT	GCTGCTAATA	CCG ATATAG	CCTTACGGG	AAAGATTTAT	CGGCA AGGA	TGGCCCGCG	TGATTAGC
<i>R. huatlense</i>	CGGAA AAC	GGGAAACT	GCTGCTAATA	CCG ATATAG	CCTTACGGG	AAAGATTTAT	CGGCA AGGA	TGGCCCGCG	TGATTAGC
<i>R. etli</i>	CGGAA AAC	GGGAAACT	GCTGCTAATA	CCG ATATAG	CCTTACGGG	AAAGATTTAT	CGGCA AGGA	TGGCCCGCG	TGATTAGC
<i>R. leg</i>	CGGAA AAC	GGGAAACT	GCTGCTAATA	CCG ATATAG	CCTTACGGG	AAAGATTTAT	CGGCA AGGA	TGGCCCGCG	TGATTAGC
<i>M. ciceri</i>	CGGAA AAC	GGGAAACT	GCTGCTAATA	CCG ATATAG	CCTTACGGG	AAAGATTTAT	CGGCA AGGA	TGGCCCGCG	TGATTAGC
<i>R. tropici</i> B	BCGGAA AAC	GGGAAACT	GCTGCTAATA	CCG ATATAG	CCTTACGGG	AAAGATTTAT	CGGCA AGGA	TGGCCCGCG	TGATTAGC

	186	196	206	216	226	236	246	256	265
B. jap 1	TAGTTGGT	GGTAA GGC	ACCAAGGCG	ACGATC	TA GCTGGTCTGA	GAGGATGATC	A CCACATTG	GGACTGAGAC	ACGGCCCAA
B. jap 2	TAGTTGGT	GGTAA GGC	ACCAAGGCG	ACGATC	TA GCTGGTCTGA	GAGGATGATC	A CCACATTG	GGACTGAGAC	ACGGCCCAA
B. elkanii	TAGTTGGT	GGTAA GGC	ACCAAGGCG	ACGATC	TA GCTGGTCTGA	GAGGATGATC	A CCACATTG	GGACTGAGAC	ACGGCCCAA
S. meliloti	TAGTTGGT	GGTAA GGC	ACCAAGGCG	ACGATC	TA GCTGGTCTGA	GAGGATGATC	A CCACATTG	GGACTGAGAC	ACGGCCCAA
S. fredii	TAGTTGGT	GGTAA GGC	ACCAAGGCG	ACGATC	TA GCTGGTCTGA	GAGGATGATC	A CCACATTG	GGACTGAGAC	ACGGCCCAA
S. saheli	TAGTTGGT	GGTAA GGC	ACCAAGGCG	ACGATC	TA GCTGGTCTGA	GAGGATGATC	A CCACATTG	GGACTGAGAC	ACGGCCCAA
S. teranga	TAGTTGGT	GGTAA GGC	ACCAAGGCG	ACGATC	TA GCTGGTCTGA	GAGGATGATC	A CCACATTG	GGACTGAGAC	ACGGCCCAA
R. galegae	TAGTTGGT	GGTAA GGC	ACCAAGGCG	ACGATC	TA GCTGGTCTGA	GAGGATGATC	A CCACATTG	GGACTGAGAC	ACGGCCCAA
R. huatlense	TAGTTGGT	GGTAA GGC	ACCAAGGCG	ACGATC	TA GCTGGTCTGA	GAGGATGATC	A CCACATTG	GGACTGAGAC	ACGGCCCAA
R. etli	TAGTTGGT	GGTAA GGC	ACCAAGGCG	ACGATC	TA GCTGGTCTGA	GAGGATGATC	A CCACATTG	GGACTGAGAC	ACGGCCCAA
R. leg	TAGTTGGT	GGTAA GGC	ACCAAGGCG	ACGATC	TA GCTGGTCTGA	GAGGATGATC	A CCACATTG	GGACTGAGAC	ACGGCCCAA
M. ciceri	TAGTTGGT	GGTAA GGC	ACCAAGGCG	ACGATC	TA GCTGGTCTGA	GAGGATGATC	A CCACATTG	GGACTGAGAC	ACGGCCCAA
R. tropici B	TAGTTGGT	GGTAA GGC	ACCAAGGCG	ACGATC	TA GCTGGTCTGA	GAGGATGATC	A CCACATTG	GGACTGAGAC	ACGGCCCAA

Figura 6: Región variable de la secuencia 16S ADNr. Alineamiento múltiple de 260 pb del gen 16S ARNr que corresponde a la secuencia amplificada con los primers Y1/Y2 descritos por Young *et al.* (1991) de cepas de rizobios de referencia presentes en bancos de datos. Con color turquesa se muestra las regiones de la secuencia que difieren entre las distintas especies de rizobios. La numeración de la secuencia comienza a partir del primer nucleótido luego del *primer forward*. Los códigos de acceso de las secuencias a los bancos de datos son: *B. jap 1* es *Bradyrhizobium japonicum* cepa USDA59 (M55489); *B. jap 2* es *Bradyrhizobium japonicum* cepa USDA110 (Z35330), *Bradyrhizobium elkanii* (U35000), *Sinorhizobium meliloti* (X67222); *Sinorhizobium fredii* (X67231); *Sinorhizobium saheli* (X68390); *Sinorhizobium teranga* (X68388); *Rhizobium galegae* (D12793), *Rhizobium huatlense* (AF025852), *Rhizobium etli* (U28916); *Rhizobium leguminosarum* (U29388), *Mesorhizobium ciceri* (U07934) y *Rhizobium tropici* B (U89832)

La diferencia en la migración de dos fragmentos de igual tamaño en un gel de DGGE depende del porcentaje de GC de sus dominios de menor temperatura de fusión. Para evaluar si las diferencias entre las secuencias de 260 pb de distintos rizobios pueden revelarse en diferencias migracionales en un gel de DGGE, se analizó cada posición nucleotídica en la cual se encontró variabilidad y el efecto de la misma, de acuerdo a los siguientes criterios y consideraciones:

- 1- Se considera que cualquier cambio en una posición de A por T o viceversa no afecta la movilidad electroforética en condiciones desnaturalizantes.
- 2- Idem para un cambio que implique a G por C o viceversa.
- 3- Los únicos cambios que provocan efectos significativos de movilidad en geles desnaturalizantes son: A/T por G/C o viceversa.
- 4- Si dos moléculas iguales difieren sólo en una posición, en la cual A/T se reemplaza por G/C se considera que aquella que posee G/C es más estable, con lo cual en un gradiente desnaturalizante el fragmento de ADN con G/C presentará una mayor migración.
- 5- En el caso que la diferencia entre las secuencias consista en una inserción de entre 1 y 6 nucleótidos, se considera que la misma confiere una mayor estabilidad a la desnaturalización. Como una primera aproximación la presencia de cada nucleótido de la inserción es equivalente a tener en esa posición una G o C.

Con el fin de evaluar las consideraciones anteriores como elementos útiles para predecir las propiedades migracionales de las secuencias de 16S ADNr en un gel desnaturalizante, se aplicaron al análisis de las secuencias de rizobios de la Figura 6. Los resultados obtenidos se

muestran en la Tabla 4, donde las posiciones variables con G o C fueron indicadas con una flecha hacia arriba, señalando mayor estabilidad. Contrariamente la presencia de A o T con una flecha hacia abajo.

Posición	<i>R. etli</i>	<i>R. leg</i>	<i>S. fredii</i>	<i>S. teranga</i>	<i>S. saheii</i>	<i>S. mellotii</i>	<i>R. tropici B</i>	<i>R. galegae</i>	<i>R. huautlense</i>	<i>M. ciceri</i>	<i>B. japonicum</i> I/SDA110	USDA76	<i>B. japonicum</i> I/SDA59
23	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↑
28	↑	↑	↑	↓	↓	↑	↑	↓	↑	↑	↑	↑	↑
29/32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑ ⁴	↑ ⁴	↑ ⁴
33	↑	↑	↑	↓	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
34	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↓	↓
35	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↓	↓
38	↑	↑	↑	↓	↓	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↑
39	↑	↑	↑	↓	↓	↑	↑	↓	↑	↑	↑	↑	↑
40	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↓	↓
72	↑	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↑	↑
78	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↑	↑	↑	↓	↓	↓
81	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↑	↑	↓	↓	↓
82	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↑	↑	↓	↑	↑	↑
85	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	-	-	-
86	-	-	-	-	-	-	↑	-	-	-	↑	↑	↑
92	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↑	↑	↑	↑	↑
96	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↓	↓	↓	↓	↓
98	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↑	↑	↓	↓	↓
107	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↑	↑	↓	↓	↓
120	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↑	↑
123	↑	↑	↑	↓	↓	↑	↑	↓	↓	↓	↓	↓	↓
124	↓	↓	↓	↑	↓	↓	↓	↑	↑	↑	↓	↓	↓
126	↑	↓	↑	↑	↑	↑	↓	↑	↑	↓	↑	↑	↑
131	↓	↑	↑	↓	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↓	↓
132	↑	↑	↑	↓	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
135	↑	↓	↑	↑	↑	↑	↓	↑	↑	↓	↑	↑	↑
150	↓	↓	↑	↓	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↑	↑	↑
151	↓	↑	↓	↑	↓	↓	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
153	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↓	↓
154	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↑	↑	↑	↓	↓	↓
159	↑	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↑	↑
168	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↑	↑
169	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↓	↓
185	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↓	↓
186	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↓
192	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↓	↓
196	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↓
197	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↑
213	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↓	↓
214	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↑	↑
238	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Total	9↑	7↑	9↑	2↓	1↑	9↑	6↑	15↑	19↑	11↑	10↑	3↑	7↑
Normalizado	11↑	9↑	11↑	-	3↑	11↑	8↑	17↑	21↑	13↑	12↑	5↑	9↑

Tabla 4: Efecto de las variaciones nucleotídicas en posiciones diferentes. La tabla muestra las posiciones variables en algunas de las especies de referencia. Con una flecha se indica el tipo de nucleótido: posición con G o C, ↑ y posición con A o T, ↓. Además una barra horizontal [-] indica que en la posición seleccionada hay un salto en la secuencia (gap). Al pie de la tabla se colocaron el balance total y normalizado de las fechas.

La predicción de las posiciones migratorias de los fragmentos de ADN en el gel desnaturizante resultó del balance de flechas en los dos sentidos: La secuencia con mayor número de flechas hacia arriba será la más estable y de mayor migración en un gel desnaturizante.

De acuerdo a este análisis la secuencia migratoria predicha en sentido del polo negativo al positivo es: 1^{ro} - *S. teranga*, 2^{do} - *S. sahari*, 3^{ro} - *B. elkanii*, 4^{to} - *R. tropici* B, 5^{to} - *R. leguminosarum*, *B. japonicum* (USDA59) 6^{to} - *R. etli*, *S. fredii* y *S. meliloti* 7^{mo} - *B. japonicum* (USDA110), 8^{vo} - *M. ciceri*, 9^{no} - *R. galegae* y 10^{mo} - *R. huautlense*. El hecho de que distintas especies puedan resolverse por esta técnica indica que el método es de utilidad para ser aplicado al estudio de las poblaciones de rizobios en muestras de suelo. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que algunas especies no alcanzan a resolverse, lo cual representa una limitación en el análisis propuesto.

Diseño de los *primers* para análisis de DGGE

Se ha propuesto que los cambios de nucleótidos de un mismo locus pueden ser visualizados en geles desnaturizantes solamente si tienen lugar en el dominio de menor temperatura de fusión (*melting*) que comprende en general una región de 50 a 300 pb del fragmento analizado (Myers *et al.*, 1985). Con el propósito de aumentar las chances de visualizar las variaciones se ha encontrado útil el agregado de una secuencia rica en GC a uno de los *primers*, la cual asegura un dominio con una temperatura de fusión superior a la del fragmento amplificado (Myers *et al.*, 1985). Siguiendo las recomendaciones de Muyzer *et al* (1993), quienes encontraron que el agregado de una secuencia rica en GC al extremo 5' de *primer forward* producía mejores resultados que al agregarla al *primer* reverso; en este trabajo se agregó una secuencia rica en GC en el extremo 5' del *primer forward* Y1 (Young *et al.*, 1991). Esta modificación de Y1 dio lugar a la formación del *primer dgefo*, el oligonucleótido reverso al cual denominamos *dgere* es idéntico al *primer* Y2 descrito por Young *et al.* (1991). Después de ajustar las condiciones de la reacción, el producto de PCR obtenido fue un fragmento de aproximadamente 330 pb.

Puesta a punto de los geles desnaturalizantes

La puesta a punto de los geles desnaturalizantes requirió la realización de numerosos experimentos preliminares para ajustar una variedad de parámetros tales como: La concentración de los agentes desnaturalizantes, el tipo de protocolo DGGE o TGGE, el porcentaje de polimerización de la acrilamida, el tiempo de polimerización, la temperatura, la rampa de aumento de temperatura, la cantidad de muestra, el tiempo de desarrollo de la corrida electroforética, el amperaje, la concentración del buffer de corrida y la forma de visualizar las bandas. Esta puesta a punto puede dividirse en cuatro etapas que se ilustran en la Figura 7. Se comenzó con un gel de DGGE con el gradiente desnaturalizante perpendicular a la dirección de electroforesis, el cual permitió definir la concentración de urea y formamida entre 26% y 37%, como el rango óptimo para lograr la separación de las especies *R. tropici* y *R. leguminosarum* (Figura 7B). Sin embargo, la resolución de los geles con el gradiente formado en la misma dirección del desarrollo de la electroforesis (paralelos) no resultó satisfactoria.

Se realizó entonces, una nueva serie de experimentos en los cuales se aplicó un gradiente de temperatura, manteniendo la concentración desnaturalizante uniforme (TGGE). Además, se ensayaron variaciones en los siguientes parámetros: Voltaje, gradiente de temperatura, rampa de aumento de temperatura, porcentaje de acrilamida y concentración de glicerol (usado para compactar las bandas). Los resultados de estos ensayos se muestran en la Figura 7C, D, E y F. Se observó que las calles de los extremos del gel mostraban perfiles migracionales distorsionados como se aprecia, con el fragmento de *S. fredii* cepa HH103, en los paneles D y E de la Figura 7. Se logró que los fragmentos migren como bandas no difusas (condición F de la Figura 7), pero estas eran aún anchas como para permitir visualizar dos especies cuya diferencia migracional es muy pequeña (Por ejemplo *R. etli* y *R. leguminosarum*). Finalmente, se realizó un ensayo en el cual se combinaron los agentes desnaturalizantes utilizados por ambas técnicas DGGE y TGGE, que consistió en una corrida electroforética con gradiente desnaturalizante de urea y formamida y simultáneamente se aplicó un gradiente de temperatura. A este protocolo se denominó DTGGE. La corrida de fragmentos de ADN en los geles de DTGGE resultó satisfactoria con bandas de migración discretas y un nivel de resolución similar al observado usando el protocolo de TGGE. Además, el protocolo resultó reproducible.

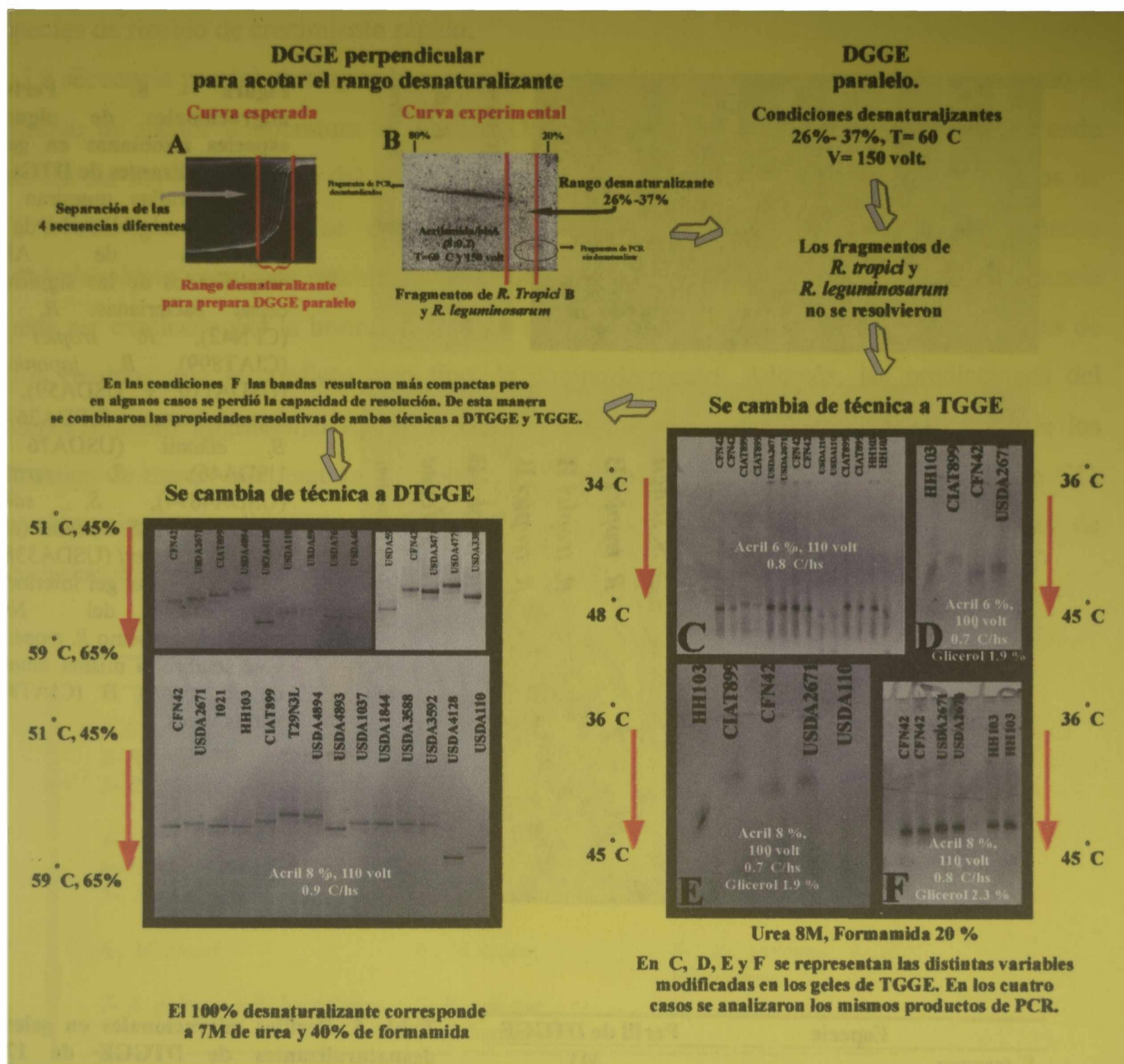


Figura 7: Distintas etapas en la optimización de la técnica DTGGE. Se muestran las etapas secuenciales que se siguieron hasta lograr las condiciones desnaturilizantes para la separación de algunas especies rizobianas. Las cepas de referencia utilizadas fueron: *R. etli* (CFN42), *R. leguminosarum* (USDA2671), *S. meliloti* (1021), *S. fredii* (HH103), *R. tropici* (CIAT899), *S. teranga* (USDA4894), *R. galegae* (USDA4128), *B. japonicum* (USDA110 y USDA59), *B. elkanii* (USDA76 y USDA46), *S. saheli* (USDA4893) y *M. ciceri* (USDA3383).

Los resultados del análisis de 12 especies de rizobios se muestran en la Figura 8. Se identificaron 10 perfiles migracionales, los cuales fueron denominados M1 a M10 (Tabla 5). Algunas especies comparten el mismo perfil migracional, mientras que otras presentan perfiles propios. En el caso de las 2 cepas de la especie *Bradyrhizobium japonicum* USDA59 y USDA110, se encontraron los perfiles M7 y M8 respectivamente.

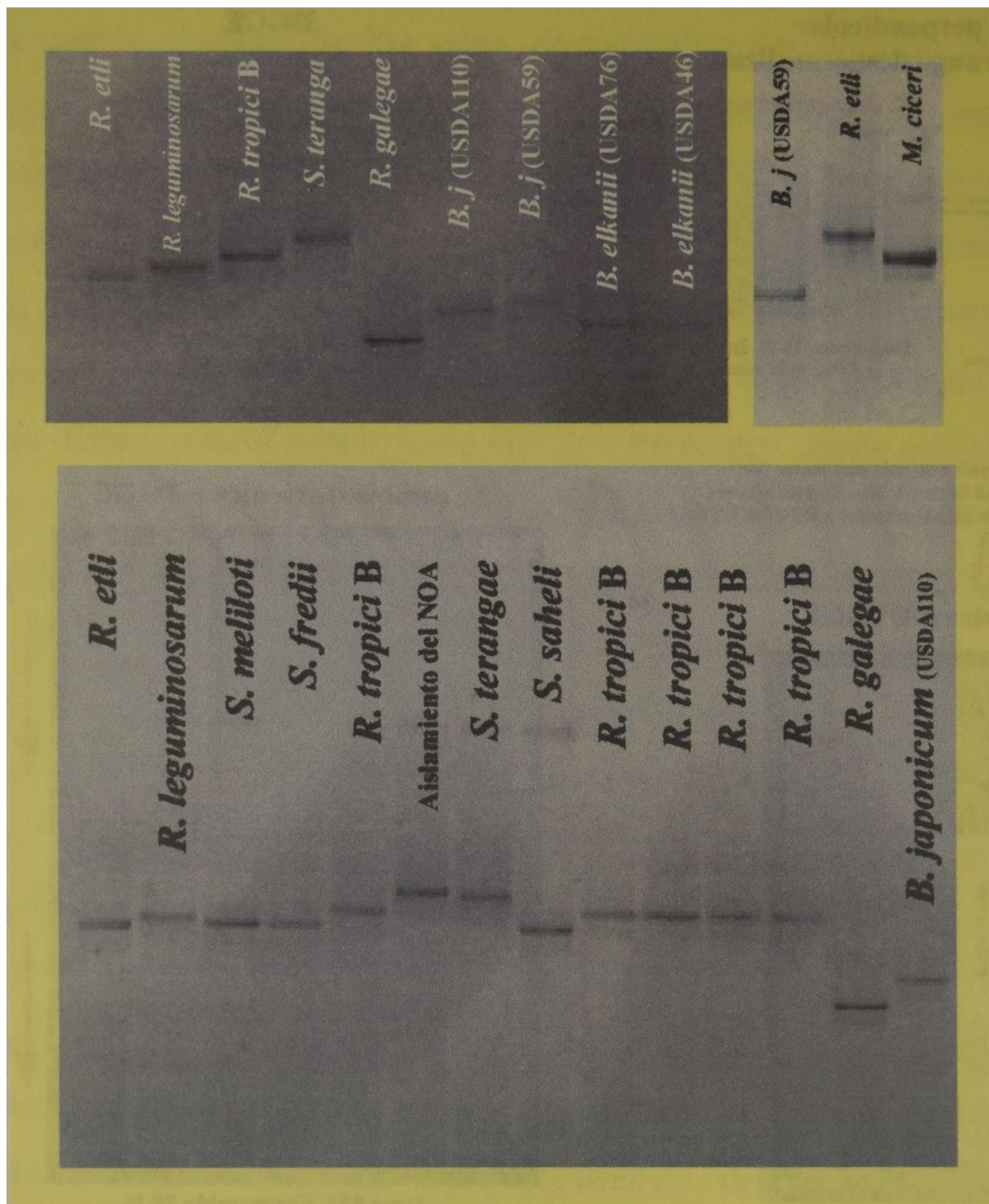


Figura 8: Perfiles migracionales de algunas especies rizobianas en geles desnaturalizantes de DTGGE. Las fotografías muestran las diferencias migracionales de los fragmentos de ADN amplificadas de las siguientes cepas bacterianas: *R. etli* (CFN42), *R. tropici* B (CIAT899), *B. japonicum* (USDA110 y USDA59), *R. leguminosarum* (USDA2671), *B. elkanii* (USDA76 y USDA46). *S. teranga* (USDA4894), *S. sahelii* (USDA4893), *S. meliloti* (cepa 1021) y *M. ciceri* (USDA3388). Se incluyó en el gel inferior un aislamiento del NOA caracterizado como *R. tropici* B y se sembró la misma muestra de *R. tropici* B (CIAT899) varias veces.

Especie	Perfil de DTGGE
<i>S. teranga</i>	M1
<i>R. tropici</i> B	M2
<i>R. leguminosarum</i> ,	M3
<i>S. sahelii</i> , <i>S. fredii</i> y <i>S. meliloti</i> .	M4
<i>R. etli</i>	M5
<i>M. ciceri</i>	M6
<i>B. japonicum</i> (USDA59)	M7
<i>B. japonicum</i> (USDA110)	M8
<i>B. elkanii</i> (USDA76/USDA46)	M9
<i>R. galegae</i> y <i>R. huautlense</i>	M10

Tabla 5: Perfiles migracionales en geles desnaturalizantes de DTGGE de 12 especies rizobianas analizadas. Se indica entre paréntesis las cepas de referencia de las especies *B. japonicum* y *B. elkanii* analizadas.

Comparación de los resultados experimentales y las predicciones teóricas aplicadas al fragmento de 16S ADNr

Como se observa en la Figura 8 y en la Tabla 6 los patrones de desnaturalización experimentales y teóricos de los fragmentos no son coincidentes en la totalidad de los casos. En la Tabla 6 se comparan las posiciones migracionales experimentales y deducidas a partir de la

secuencia de 260 pb de 16S ADNr (Considerada en este análisis como total) y parcial de las especies de rizobio de crecimiento rápido.

La secuencia parcial corresponde a un grupo de nucleótidos sucesivos considerados como el dominio de menor temperatura de fusión (Dado su contenido bajo de GC) y que por ende podrían ser los responsables del comportamiento migracional diferencial de los fragmentos de ADN. Así por ejemplo, se encontró que las moléculas de las especies del género *Bradyrhizobium* eran más estables que las de los rizobios. Probablemente, esta discrepancia pueda ser explicada por la inserción de 4 pb que tienen estas secuencias con respecto a las de otros rizobios que le confiere otro tipo de comportamiento. Además, las predicciones del comportamiento migracional fueron realizadas suponiendo una coincidencia espacial de los dominios de menor temperatura de fusión pero probablemente estos dominios, pobres en GC, no abarquen la totalidad de los 260 pb y no sean coincidentes entre las especies de *Bradyrhizobium* y *Rhizobium*.

Perfiles migracionales		
Experimental	Teórico total	Teórico 72-169 ^a
1- <i>S. teranga</i>	1- <i>S. teranga</i>	1- <i>S. teranga</i>
2- <i>R. tropici B</i>	2- <i>S. saheli</i>	2- <i>R. tropici B</i>
3- <i>R. leguminosarum</i>	3- <i>R. tropici B</i>	3- <i>R. leguminosarum</i> y <i>S. saheli</i>
4- <i>S. saheli</i> , <i>S. fredii</i> y <i>S. meliloti</i>	4- <i>R. leguminosarum</i>	4- <i>R. etli</i> , <i>S. fredii</i> , <i>S. meliloti</i>
5- <i>R. etli</i>	5- <i>R. etli</i> , <i>S. fredii</i> , <i>S. meliloti</i> ,	5- <i>M. ciceri</i>
6- <i>M. ciceri</i>	6- <i>M. ciceri</i>	6- <i>R. galegae</i> y <i>R. huautlense</i>
7- <i>R. galegae</i> y <i>R. huautlense</i>	7- <i>R. galegae</i>	
	8- <i>R. huautlense</i>	

Dirección de migración

Tabla 6: Posiciones migracionales teóricas y experimentales del fragmento de 260 pb del gen 16S ARNr. Cada columna muestra la posición de los fragmentos en geles de DTGGE desde el punto de siembra hacia el frente de corrida teniendo en cuenta los resultados experimentales y las predicciones teóricas. ^a Posiciones de nucleótidos determinadas a partir del primer *forward*

Las especies *B. japonicum* y *B. elkanii* generan perfiles diferentes en un gel de DTGGE como se demostró a partir del análisis de las secuencias de 16S ADNr, pero el orden de desnaturalización experimental resultó inverso. No hemos podido explicar esta discrepancia a partir del análisis de las secuencias.

El fragmento de *B. japonicum*, USDA110 tiene una mayor migración que el fragmento de *B. japonicum*, USDA59. Esta propiedad migracional se explica por la divergencia de sus secuencias, USDA110 tiene en dos posiciones G y C mientras que USDA59 tiene A y T que le

confieren una mayor predisposición a la desnaturalización. En la Figura 9 se señalan los nucleótidos involucrados en este comportamiento.

```

USDA59  AGGCTT AACACATGCA AGTCGAGCGG GCGTAGCAAT ACGTCAGCGG CAGACGGGTG AGTAACGCGT GGAACGTAC CTTTGGTTC GGAACAACAC
USDA110 AGGCTT AACACATGCA AGTCGAGCGG GCGTAGCAAT ACGTCAGCGG CAGACGGGTG AGTAACGCGT GGAACGTAC CTTTGGTTC GGAACAACAC

USDA59  AGGGAACTT GTGCTAATAC CGGATAAGCC CTTACGGGGA AAGATTTATC GCCGAAAGAT CGGCCCGCGT CTGATTAGCT AGTTGGTG
USDA110 AGGGAACTT GTGCTAATAC CGGATAAGCC CTTACGGGGA AAGATTTATC GCCGAAAGAT CGGCCCGCGT CTGATTAGCT AGTTGGTA

USDA59  GTAAAGGC ACCAAGGCGA CGATCAGTAG CTGGTCTGAG AGGATGATCA GCCACATTGG GACTGAGACA CGGCCCAA
USDA110 GTAAAGGC ACCAAGGCGA CGATCAGTAG CTGGTCTGAG AGGATGATCA GCCACATTGG GACTGAGACA CGGCCCAA

```

Figura 9: Divergencias en las secuencias de *B. japonicum*, USDA59 y USDA110. Se señalan los nucleótidos diferentes entre ambas secuencias y que explican el comportamiento migracional en un gel desnaturalizante.

Los fragmentos de las especies *R. etli* y *S. saheli* no migran según lo esperado (página 79 de este capítulo), pero la diferencia de migración en los geles desnaturalizantes resultó mínima, pudiéndose atribuir a los cambios de A por T o C por G considerados inicialmente como neutros. La mayor coincidencia entre las predicciones teóricas y los resultados experimentales resulta de considerar una subregión entre las posiciones 72 y 169 como el dominio de menor temperatura *melting*.

Hemos establecido un protocolo llamado DTGGE, que permite la separación de fragmentos de 260 pb del gen 16S ADN de la mayoría de las especies de Rhizobium, Sinorhizobium y Bradyrhizobium, facilitando la identificación de especies. También se demostró que es posible predecir la posición relativa de estos fragmentos de ADN en un gel desnaturalizante aplicando consideraciones simples a las secuencias del fragmento de ADN.

El uso de *fingerprints* como criterio para seleccionar aislamientos representativos de poblaciones

Con el propósito de utilizar el valor de 95% de similitud, entre los perfiles de *fingerprints* de dos aislamientos, como umbral inferior para concluir que son idénticos se realizó el siguiente ensayo: Se tomaron dos rizobios cuyos *fingerprints* presentaban estas características y se analizó RFLP del gen 16S ARNr, RFLP-IGS, RFLP-*nodC*, RFLP-*nifH*, *nifD*, y ERIC- REP-*fingerprinting* (datos no mostrados). Los resultados de estos estudios no mostraron diferencias entre las cepas utilizadas, es por ello que durante la caracterización de la colección de los aislamientos, dos individuos que presentan similitudes mayores al 95% se los considerará iguales y uno de ellos constituirá el **aislamiento representativo** de ese grupo.

Discusión

En este capítulo se describen tres procedimientos de análisis de ADN para su uso en la caracterización de las poblaciones rizobianas. El análisis de rep-PCR explora de forma semiazarosa la totalidad del genoma de los microorganismos, resultando en perfiles llamados *fingerprints* por su analogía con las huellas dactilares que identifican a las personas. En el caso de las bacterias no se ha demostrado que cada una tenga un perfil propio de *fingerprints*. Además, los microorganismos que provienen del mismo progenitor son considerados, a diferencia de los humanos, clones idénticos mientras no suceda un evento de mutación que los diferencie. De esta manera se esperaría que aislamientos de un mismo lugar que tienen orígenes clonales compartan sus perfiles de *fingerprints* con mayor frecuencia que los aislamientos provenientes de sitios diferentes. Entonces, la presencia de perfiles iguales de *fingerprints* de rizobios provenientes de sitios diferentes indicaría una distribución amplia de ese tipo de rizobio, la cual podría ser asociada con la presencia de la leguminosa o la adaptación del rizobio en la región.

En este capítulo se definieron las condiciones experimentales apropiadas para lograr la reproducibilidad de los *fingerprints* y a partir de ellas se definió 95% como el porcentaje de similitud mínimo entre perfiles para concluir que se trata de aislamientos idénticos. Se aplicará este criterio en los sucesivos capítulos para seleccionar los aislamientos representativos de las distintas poblaciones y así acotar el número de muestras a caracterizar.

La aplicación de esta técnica presenta, sin embargo, un inconveniente y es el requerimiento de un seguimiento estricto del protocolo para asegurar reproducibilidad de resultados. Se observó que pequeñas modificaciones de los parámetros experimentales pueden llevar a agrupamientos diferentes y por lo tanto interpretaciones distintas de los resultados. Cuando lo único que se busca al aplicar rep-PCR es la diferencia en los perfiles de bandas con el propósito de seleccionar los aislamientos representativos, el error cometido simplemente se traduce en un aumento del número de muestras a caracterizar puesto que dos perfiles iguales pueden ser tomados como diferentes. Sin embargo, si lo que se desea es conocer la relación de similitudes de los *fingerprints* analizados, los errores cometidos se traducirán en las similitudes calculadas. Es por ello que para un número reducido de muestras (a mi entender alrededor de 50) se podría completar el análisis computacional con un análisis visual.

A pesar de los cuidados que se deben tener para la aplicación de rep-PCR, esta técnica resulta de utilidad puesto que dos genotipos iguales expresan que los rizobios a los cuales pertenecen son prácticamente idénticos. De esta manera se agiliza la caracterización evitando

repetir el análisis de muestras que son iguales. Rademaker *et al.* (2000) observaron una alta correlación entre estudios de homología ADN-ADN y los perfiles genómicos de *fingerpring* rep-PCR o AFLP del género *Xanthomonas*. Encontrando no sólo una relación genética entre los aislamientos del género, sino también una relación filogenética y taxonómica. En el campo de la rizobiología algunos trabajos no lograron inferir relaciones taxonómicas mediante la aplicación de las técnicas de *fingerprints* (Judd *et al.*, 1993) pero dada la clara evidencia experimental del trabajo de Rademaker *et al.* se intentará utilizar esta metodología también con fines taxonómicos. Por lo tanto en los respectivos capítulos se incluirán en el análisis de los rep-*fingerprints* las cepas de referencia de rizobios con que cuenta el laboratorio.

El análisis de 16S ADNr-RFLP de las cepas de referencia de rizobios resultó de utilidad para la selección de las endonucleasas necesarias para identificar un grupo de rizobios. La combinación de este análisis y las características culturales de los aislamientos permiten la elección de la estrategia a seguir para la caracterización. Así, por ejemplo, los rizobios pueden ser divididos en tres grandes grupos según su velocidad de crecimiento: Rápido (rizobios), medio (mesorizobios) y lento (bradirizobios). Si se tienen en cuenta las especies de referencia comprendidas en cada grupo se pueden acotar las enzimas a usar en la caracterización. En el caso de que los perfiles de restricción que no coincidan con los de las especies de referencia, se utilizará un número mayor de endonucleasas para explorar por RFLP la secuencia del gen.

En el curso de este trabajo se mencionará en algunas oportunidades que un aislamiento pertenece a una determinada especie rizobiana. Si bien muchos investigadores confirmaron la existencia de una correlación entre el análisis de 16S ADNr-RFLP y la especie bacteriana, se han descrito excepciones y la clasificación de un aislamiento como perteneciente a una determinada especie requiere otros ensayos tal como la hibridación ADN-ADN (Diouf *et al.*, 2000; de Lajudie *et al.*, 1998a; y 1998b, Fitz-Gibbon y House, 1999; Wang *et al.*, 1999; Nick *et al.*, 1999, Wang *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1997; Laguerre *et al.*, 1994, Laguerre *et al.*, 1993).

Algunos autores como Young (2000) proponen la unificación de las técnicas a seguir para la clasificación e identificación de las especies microbianas, puesto que una proporción importante del genoma de muchos rizobios reside en los plásmidos. Los plásmidos "son elementos transferibles y no estarían definiendo la especie, además pueden tener una organización (tipos de codones, por ejemplo) totalmente diferente del cromosoma. La hibridación ADN-ADN tiene en cuenta todo el genoma incluyendo a los plásmidos y el resultado de este ensayo puede alejar filogenéticamente a dos aislamientos de la misma especie con diferente contenido plasmídico. De esta manera se demuestra que el límite de las especies bacterianas aun no esta claro y es por ello que generalmente no se utiliza el resultado de una sola técnica para la localización

taxonómica de un microorganismo, sino que es recomendable la combinación de los datos obtenidos de la aplicación de diferentes criterios clasificatorios (Eardly *et al.*, 1995, Young, 2000).

El objetivo de utilizar TGGE/DGGE/DTGGE en este trabajo fue disponer de un método de biología molecular que resulte aplicable al estudio de la dinámica de las poblaciones de especies de rizobios directamente en el suelo. Se seleccionó como marcador molecular de rizobios a una región variable del gen 16S ARNr que presentó divergencia en las secuencias de las especies de referencia.

La puesta a punto de los geles desnaturalizantes llevó a encontrar condiciones que definieron un nuevo protocolo denominado DTGGE. La aplicación de DTGGE permitió separar un número importante de especies rizobianas, mientras que algunas comigraron en el gel desnaturalizante.

El análisis de dos cepas pertenecientes a la especie *B. japonicum* demostró que una pequeña diferencia en sus secuencias puede revelarse en el gel desnaturalizante. Así fue posible resaltar el poder de resolución de DTGGE que discriminó entre dos cepas que no se diferenciaron mediante 16S ADN-RFLP.

Cuando se compararon los resultados de las predicciones teóricas con los experimentales se encontró una concordancia parcial y esto se podría explicar porque no todos los fragmentos tienen sus dominios de menor temperatura de fusión en la misma región de la secuencia.

Los resultados de este capítulo permiten definir una marcha de análisis, esquematiza en la Figura 10, para la caracterización de las poblaciones rizobianas que fueran presentadas en el Capítulo 1.

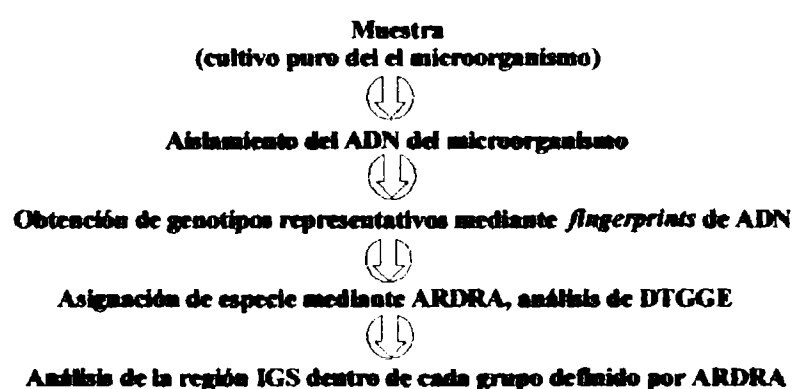


Figura 10: Análisis secuencial aplicado a la caracterización de rizobios aislados en cultivo puro

Se analizan los perfiles de *fingerprints* de los aislamientos de una misma leguminosa, según las condiciones descritas en la sección 2. 3. Los dendrogramas construidos permiten ayudar a la selección de los genotipos representativos, se procede entonces a la caracterización mediante

16S ADNr-RFLP y DTGGE. Finalmente, dentro de cada grupo definido por 16S ADNr-RFLP se analiza la variabilidad de la región IGS.

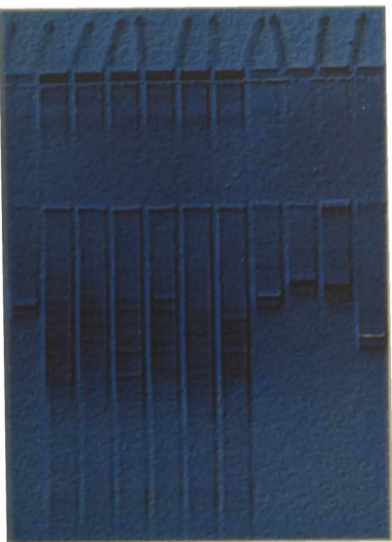
Podemos concluir que los tres marcadores moleculares de ADN: 16S ADNr, IGS, secuencias repetitivas (REP, ERIC), resultan herramientas útiles para evidenciar la diversidad de las poblaciones de rizobios.

Bibliografía

1. Barry, T., G. Colleran, M. Glennon, L. K. Dunican, and F. Gannon. 1991. The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. *PCR Methods Appl.* 1:51-56.
2. (A) de Lajudie, P., A. Willems, G. Nick, F. Moreira, F. Molouba, B. Hoste, U. Torck, M. Neyra, M. D. Collins, K. Lindström, B. Dreyfus, and M. Gillis. 1998. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp nov. *Int J Syst Microbiol.* 48:369-382.
3. (B) de Lajudie, P., E. Laurent-Fulele, A. Willems, U. Torck, R. Coopman, M. D. Collins, K. Kesters, B. Dreyfus, and M. Gillis. 1998. *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. *Int J Syst Microbiol.* 48:1277-1290.
4. Diouf, A., P. de Lajudie, M. Neyra, K. Kesters, M. Gillis, E. Martinez-Romero, and M. Gueye. 2000. Polyphasic characterization of rhizobia that nodulate *Phaseolus vulgaris* in west Africa (Senegal and Gambia). *Int J Syst Evol Microbiol.* 50:159-170.
5. Doignon-Bourcier, F., A. Willems, R. Coopman, G. Laguerre, M. Gillis, and P. de Lajudie. 2000. Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating small Senegalese legumes by 16S-23S Intergenic Gene Spacers and Amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprint Analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3987-3997.
6. Eardly, B. D., F. S. Wang, T. S. Whittam, and R. K. Selander. 1995. Species limits in *Rhizobium* populations that nodulate the common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Appl. Environ. Microbiol.* 61:507-512
7. Fitz-Gibbon, S. T., and C. H. House. 1999. Whole genome-based phylogenetic analysis of free-living microorganisms. *Nucleic Acids Res.* 27:4218-4222.
8. Garnier, T., B. Canard, and S. T. Cole. 1991. Cloning, mapping, and molecular characterization of the rRNA operons of *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* 173:5431-5438.
9. Gürtler, V., and B. C. Mayall. 2001. Genomic approaches to typing, taxonomy and evolution of bacterial isolates. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51:3-16.
10. Gürtler, V., and V. A. Stanisich. 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology.* 142:3-16.
11. Judd, A. K., M. Schneider, M. J. Sadowsky, and F. J. de Bruijn. 1993. Use of repetitive sequences and the polymerase chain reaction technique to classify genetically related *Bradyrhizobium japonicum* serocluster 123 strains. *Appl. Env. Microbiol.* 59:1702-1708.
12. Laguerre, G., M. P. Fernandez, V. Edel, P. Normand, and N. Amarger. 1993. Genomic heterogeneity among French *Rhizobium* strains isolated from *Phaseolus vulgaris* L. *Int J Syst Microbiol.* 43:761-767.
13. Laguerre, G., M. R. Allard, F. Revoy, and N. Amarger. 1994. Rapid identification of rhizobia by Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:56-63.
14. Laguerre, G., P. Mavingui, M. R. Allard, M. P. Charnay, P. Louvrier, S. I. Mazurier, L. Rigottier-Gois, and N. Amarger. 1996. Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of chromosomal and Symbiotic gene regions: Application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2029-2036.
15. Laguerre, G., S. M. Nour, V. Macheret, J. Sanjuan, P. Drouin, and N. Amarger. 2001. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology.* 147: 981-993
16. Myers, R. M., S. G. Fischer, L. S. Lerman, and T. Maniatis. 1985. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nuc. Acids. Res.* 13:3131-3145.
17. Muyzer, G.; E. C de Waal, and A. G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:695-700.

18. Neef, J. M., Y. Van de Peer, L. Hendriks, and R. De wachter. 1990. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic Acids Research*. 18:r2237-r2317.
19. Nick, G., P. de Lajudie, B. D. Eardly, S. Suomalainen, L. Paulin, X. Zhang, M. Gillis, and K. Lindström. 1999. *Sinorhizobium arboris* sp. nov. and *Sinorhizobium kostiense* sp. nov., isolated from leguminous trees in Sudan and Kenya. *Int J Syst Microbiol*. 49:1359-1368.
20. Rademaker, J. L. W., B. Hoste, F. J. Louws, K. Kesters, J. Swings, P. Vauterin, and F. J. de Bruijn. 2000. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *Int J syst Evol Microbiol*. 50:665-677.
21. Tenover, F. C., R. D. Albeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, and B. Swaminathan. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulse-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin Microbiol*. 33: 2233-2239.
22. Vallaey, T., E. Topp, G. Muyzer, V. Macheret, G. Laguerre, A. Rigaud, and G. Soulas. 1997. Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. *FEMS Microbiology Ecology*. 24:279-285.
23. van Berkum, P., and J. J. Fuhrmann. 2000. Evolutionary relationships among the soybean bradyrhizobia reconstructed from 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequence divergence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 50:2165-2172.
24. van Berkum, P., R. Navarro, and A. A. T. Vargas. 1994. Classification of the uptake hydrogenase-positive (Hup+) bean rhizobia as *Rhizobium tropici*. *Appl. Environ. Microbiol*. 60:554-564.
25. Versalovic J., M. Schneider, F. J. de Bruijn, and J. R. Lupski. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using Repetitive sequence-based Polymerase Chain Reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*. 5:25-40
26. Vinuesa, P., J. W. Rademaker, F. J. de Bruijn, and D. Werner. 1998. Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-Restriction Fragment length Polymorphism Analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA Intergenic Spacers, Repetitive extragenic Palindromic PCR genomic fingerprinting and partial 16S rDNA sequencing. *Appl. Environ. Microbiol*. 64:2096-2104.
27. Wang, E. T., P. van Berkum, D. Beyene, X. H Sui, O. Dorado, W. X. Chen, and E. Martinez-Romero. 1998. *Rhizobium huautlense* sp. nov., symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*. *Int J Syst Microbiol*. 49:687-699.
28. Wang, E. T., P. van Berkum, X. H Sui, D. Beyene, W. X. Chen, and E. Martinez-Romero. 1999. Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from Chinese soils and description of *Mesorhizobium amorphae* sp. nov. *Int J Syst Microbiol*. 49:51-65.
29. Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier, and D. J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol*. 173:697-703.
30. Willems, A., R. Coopman, and M. Gillis. 2001. Comparison of sequence analysis of 16S-23S rDNA spacer regions, AFLP analysis and DNA-DNA hybridizations in *Bradyrhizobium*. *Int J syst Evol Microbiol*. 51:623-632.
31. Young, J. P. 2000. Taxonomy and evolution of Diazotrophs. F. O. Pedrosa et al. (eds), *Nitrogen Fixation: From Molecules to Crop Productivity*, 153-154. © 2000. Kluwer Academic Publishers. Printed en the Netherlands.
32. Young, J. P. W., H. L. Downer, and B. D. Eardly. 1991. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAi1 by Polymerase Chain Reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. *J. Bacteriol*. 173:2271-2277.

Capítulo 3



Capítulo 3

Análisis de las poblaciones de rizobios de suelo aplicando geles desnaturalizantes

Introducción

Los estudios ecológicos de comunidades bacterianas y fúngicas han estado restringidos a los microorganismos cultivables en el laboratorio, y no fue hasta hace pocos años cuando se incorporó el uso combinado de técnicas de extracción de ADN de muestras de ambientes naturales, de amplificación-PCR y de electroforesis de ADN en condiciones desnaturalizantes (DGGE, TGGE), que se logró independizarse del cultivo. En su conjunto, estas técnicas han sido eficaces para revelar especies ignoradas por el impedimento de su cultivo en condiciones de laboratorio (Hever *et al.*, 1997; Smit *et al.*, 1999; Muyzer, 1999). Además, facilita experimentalmente el estudio de la estructura y dinámica de comunidades microbianas de ecosistemas variados.

¿En qué consiste el análisis de microorganismos con DGGE? En general, comprende una primera etapa en la cual se extrae el ADN a partir de muestras naturales, el cual se usa como molde para amplificar por PCR la secuencia del gen 16S ARNr. La ubicuidad y disponibilidad de una amplia base de datos sobre el gen 16S ARNr de bacterias constituyen factores que determinaron su elección como un marcador de diversidad. Además, posee regiones conservadas e hipervariables que permiten el diseño de oligonucleótidos tanto universales como específicos. El producto de esta amplificación es una mezcla compleja de fragmentos de ADN provenientes de los diferentes microorganismos presentes en la muestra, que al ser separados electroforéticamente por DGGE o TGGE dan lugar a un patrón de bandas denominado “*fingerprint*” representativo de las poblaciones de ese ambiente natural. La simple comparación de los perfiles permite obtener información sobre la composición de comunidades microbianas, su evolución en el tiempo y la influencia de factores bióticos y abióticos sobre la composición de la misma (Muyzer y Smalla, 1998). También se pueden realizar otros análisis complementarios para identificar un determinado género o especie microbiana, tales como la transferencia del ADN separado en el gel de DGGE a una membrana de nylon seguido de la hibridación con sondas específicas (Heuer *et al.*, 1999), y el análisis de la secuencia del ADN de una banda (Zoetendal *et al.*, 1998).

La técnica DGGE no se ha limitado al análisis del gen 16S ARNr, sino que se ha extendido a otras secuencias específicas de grupos de microorganismos. Por ejemplo, el estudio del gen de la enzima hidrogenasa [NiFe] de distintas especies de *Desulfovibrio*, ha permitido demostrar la presencia de diferentes poblaciones en biorreactores incubados con el sustrato hidrógeno (Wawer, *et al.* (1995). Por otro lado, Rosado *et al.* (1998) examinaron la variabilidad del gen *nifH* de *Paenibacillus azotofixans* en muestras de suelos. El análisis de la región intergénica 16S – 23S ADNr le ha permitido a de Oliveira *et al.* (1999) diferenciar entre las especies *R. tropici* y *R. leguminosarum*.

El análisis DTGGE de una región hipervariable de 260 pb del gen 16S ARNr, descrita en el Capítulo 2, discrimina especies de rizobios obtenidas de cultivos puros, y su aplicación en la caracterización de los aislamientos del NOA aportó resultados novedosos tal como se describen en los Capítulos 2, 3, 4 y 5. En este capítulo se describen los estudios dirigidos al establecimiento en nuestro laboratorio, de un protocolo experimental de DTGGE que nos permita el caracterizar a las poblaciones de rizobios directamente en los suelos del NOA mediante el análisis de la región hipervariable 16S ADNr.

Extracción de ADN a partir de muestras de suelo

La técnica DGGE tiene como objetivo lograr que el perfil de bandas DTGGE refleje la composición de la comunidad microbiana en la muestra analizada, lo cual implica que la extracción de ADN debe ser eficiente y representativa de todos sus componentes. Por otro lado, y dado que algunos estudios requieren el análisis de numerosas muestras, es también deseable que su ejecución sea simple y rápida.

Utilizamos un protocolo (denominado Protocolo R4) consistente en una lisis directa, seguida de dos etapas de purificación por extracción fenólica y pasaje a través de una columna comercial (Wizard®, Promega). El protocolo R4 permite iniciar la extracción con una cantidad de 8 gramos de suelo (Figura 1) y el rendimiento obtenido (Tabla 1) fue de aproximadamente 4 µg ADN/gr de suelo, resultando comparable con el obtenido por otros autores aplicando protocolos de lisis directa (Smalla *et al.*, 1993; van Elsas y Smalla, 1995). Hemos observado que los distintos suelos difieren en su contenido en materia orgánica y otros componentes que resultan en extractos con intensidades variables de color oscuro a claro. Esto nos condujo a la aplicación de etapas adicionales de lavado para clarificar, con lo cual no se puede comparar entre las distintas muestras de suelo el rendimiento obtenido.

Una vez obtenido el extracto de ADN pasamos a ensayarlos en reacciones de PCR con el propósito de evaluar la calidad de los mismos en cuanto a la presencia de sustancias inhibitorias de la reacción de PCR. Todos los ADN fueron capaces de ser amplificados utilizando los *primers* universales rD1/fD1, indicando que la purificación del ADN de suelo resultó en un producto susceptible de ser usado para las futuras reacciones de PCR.

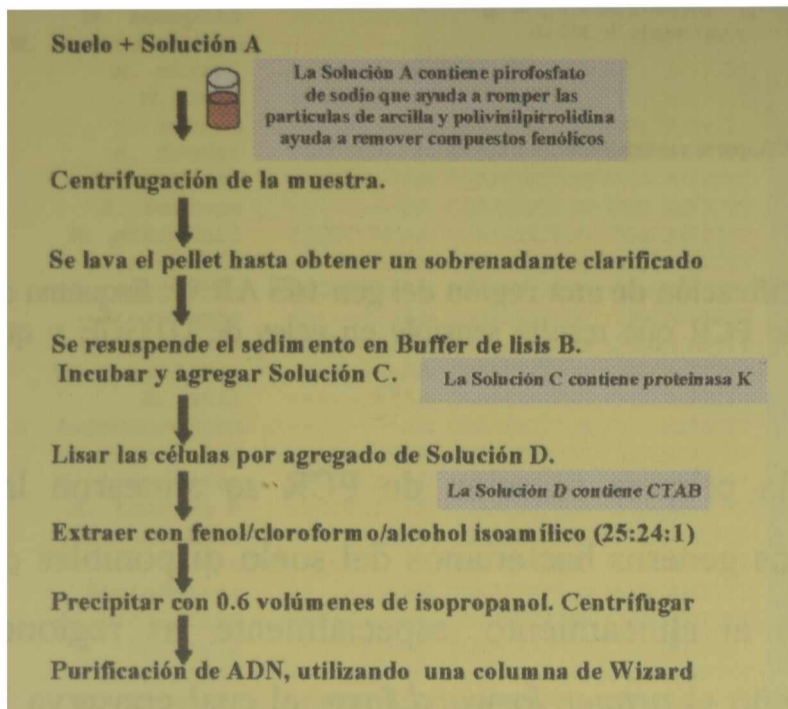


Figura 1: Extracción de ADN de muestras de suelo según el protocolo R4. Esquema del protocolo para la extracción del ADN microbiano del suelo basado en la lisis directa de las células.

Muestra de suelo	Rendimiento de ADN Protocolo R4 (µg/gr suelo)
T65 (San Luis)	2.1
T50 (Peña Baya)	4.6
T69 (Cerrillos)	5.2
T56 (Campo Quijano)	3.5
T58 (Quebrada del Toro)	nd
T62 (Metán)	nd

Tabla 1: Rendimiento de ADN extraído por gramo de suelo. Se utilizó el protocolo R4 desarrollado en el laboratorio (R4) en muestras de suelo de distintos sitios de la provincia de Salta.
nd, no determinado

Análisis de comunidades rizobianas presentes en suelos del NOA

Dado el carácter universal de los *primers* dgefo/dgere, se esperaría observar un perfil de bandas numerosas resultante de la amplificación del ADN de muchas especies presentes en el suelo. Con el propósito de acotar a las bandas de los rizobios, se ensayó un procedimiento con dos etapas de reacción PCR, esquematizado en la Figura 2. Para llevar a cabo la primera etapa, diseñamos los oligonucleótidos forg/revg para amplificar específicamente una región del gen 16S ARNr de los rizobios, que a su vez, incluye a la subregión amplificada con los *primers* dgefo/dgere.

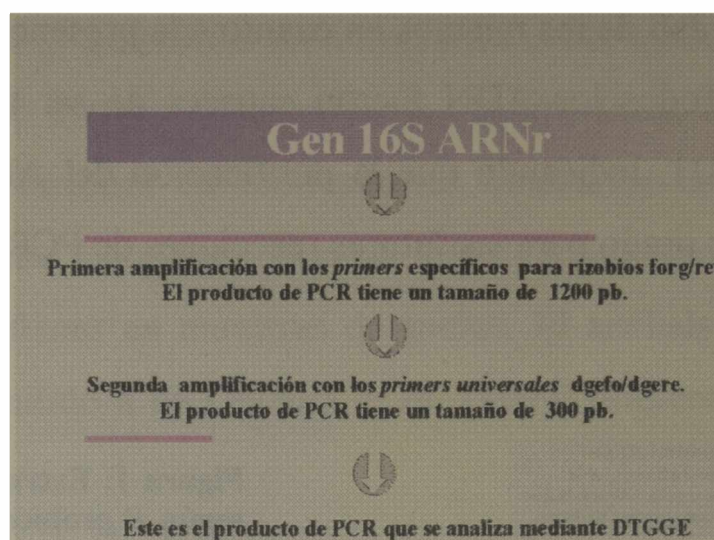


Figura 2: Esquema del protocolo seguido para la amplificación de una región del gen 16S ARNr. Esquema de las etapas seguidas para la obtención de un producto de PCR que resulte sensible en geles de DTGGE y que represente a la comunidad de rizobios del suelo.

Para el diseño de los *primers* usados en la primera reacción de PCR se alinearon las secuencias de las especies de rizobios y de otros géneros bacterianos del suelo disponibles en bancos de datos. En la Figura 3 se muestra el alineamiento, especialmente las regiones adyacentes a los *primers* seleccionados. Se diseñó el *primer forward forg*, el cual conserva la secuencia del *primer dgefo* pero sin el agregado de la secuencia rica en GC.

Como *primer* reverso se diseñó *revg* que es específico para especies de rizobios y presenta dos o tres nucleótidos diferentes con especies de bradirizobios. Por otra parte, algunos géneros de la α subdivisión tales como, *Bartonella* o *Agrobacterium* podrían resultar amplificados con estos *primers* “específicos” de los géneros rizobianos. De cualquier manera se esperaría que el número de géneros microbianos susceptibles de ser amplificados de muestras de suelo resulte significativamente menor.

En una segunda etapa el producto de la primera reacción de PCR se usó como molde en la reacción *nested-PCR* (Mc Pherson *et al.*, 1995) usando los *primers* universales *dgefo/dgere*. El producto de esta segunda reacción fue examinado por DTGGE.

Para evaluar la especificidad de los *primers* *forg/revg* se realizaron ensayos preliminares usando distintas especies de rizobios y también de otros microorganismos. El resultado fue inesperado ya que las especies de los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* y *Escherichia* también fueron amplificadas aunque con perfiles complejos. En la Figura 4 se observan las bandas de estos géneros, ninguna de las cuales es igual en tamaño al de las especies de rizobios.

	GGCTCAGAA CGAACGCTGG CGGC	GGTGACAG TGGGCAGCGA G	revg
Cyanobacterium	~GAACGCTGG CGGTATGCGY	GTGGGACAA AGGGATGCGA GACCCGCAAGG	
Trichodesmium	~GA TGAACGCTGG CGGTCTGCTT	GTGGGACAG AGGGCAGCGA ACCCGAGAGG	
Caulobacter	~GAACGCTGG CGGCAGGCTT	GCGACTACAG AGGGT.....	
Hyphomonas	AGAGTTTGA TCTGGCTCAG AACGAACGCT	GCGGTGACAA TGGGA.....	
B. liaoningense	~GAACGCTGG CGGCAGGCTT	GCGGTGACAA TGGGATGCTA AGGGGCGACC	
B. japonicum	TGGCTCAGAA CGAACGCTGG CGGCAGGCTT	GCGGTGACAA TGGGATGCTA AGGGGCGACC	
Agromonas	~GAACGCTGG CGGCAGGCTT	GCGGTGACAG TGGGAAGCTA AGGGGCAACC	
Blastobacter	~GAACGCTGG CGGCAGGCTT	GCGGTGACAG TGGGAAGCTA AGGGGTGACC	
B. elkanii	TGGCTCAGAA CGAACGCTGG CGGCAGGCTT	GCGGTGACAA TGGGATGCTA AGGGGCGACC	
R. acidophila	TGGCTCAGAA CGAACGCTGG CGGCAGGCTT	GCGGTGACAA TGGGAAGCGA AGGGGCGACC	
A. caulnodans	~GAACGCTGG CGGCAGGCTT	GCGGTGACAA TGGGATGCGA GCCTNCGAGG	
Xanthobacter	~GCTGG CGGCAGGCTT	GCGGTGACAG TGGGATGCGA GCCTGCGAGG	
M. huakuii	~GAA CGAACGCTGG CGGCAGGCTT	GTGGTGACAG TGGGCAGCGA GACCCGCGAGG	
M. plurifarum	~AA CGAACGCTGG CGGCAGGCTT	GTGGTGACAG TGGGCAGCGA GACCCGCGAGG	
M. amorphae	TGGCTCAGAA CGAACGCTGG CGGCAGGCTT	GTGGTGACAG TGGGCAGCGA GACCCGCGAGG	
M. mediterraneum	~AA CGAACGCTGG CGGCAGGCTT	GTGGTGACAG TGGGCAGCGA GACCCGCGAGG	
M. ciceri	~AA CGAACGCTGG CGGCAGGCTT	GTGGTGACAG TGGGCAGCGA GACCCGCGAGG	
M. loti	TGGCTCAGAA CGAACGCTGG CGGCAGGCTT	GTGGTGACAG TGGGCAGCGA GACCCGCGAGG	
S. sahelii	~AA CGAACGCTGG CGGCAGGCTT	GTGGTGACAG TGGGCAGCGA GACCCGCGAGG	
S. fredii	TGGCTCAGAA CGAACGCTGG CGGCAGGCTT	GTGGTGACAG TGGGCAGCGA GACCCGCGAGG	
S. medicae	~AA CGAACGCTGG CGGCAGGCTT	GTGGTGACAG TGGGCAGCGA GACCCGCGAGG	
S. teranga	~AA CGAACGCTGG CGGCAGGCTT	GTGGTGACAG TGGGCAGCGA GACCCGCGAGG	
R. giardinii	TGGCTCAGAA CGAACGCTGG CGGCAGGCTT	GTGGTGACAG TGGGCAGCGA GACCCGCGAGG	
Bartonella	~AA CGAACGCTGG CGGCAGGCTT	GTGGTGACAG TGGGCAGCGA GACCCGCGAGG	
R. huatlense	TGGCTCAGAA CGAACGCTGG CGGCAGGCTT	GTGGTGACAG TGGGCAGCGA AGGAGCGATC	
R. galegae	~GAA CGAACGCTGG CGGCAGGCTT	GTGGTGACAG TGGGCAGCGA AGGAGCGATC	
R. gallicum	TGGCTCAGAA CGAACGCTGG CGGCAGGCTT	GTGGTGACAG TGGGCAGCGA GCACGCGAGT	
R. mongolense	~AA CGAACGCTGG CGGCAGGCTT	GTGGTGACAG TGGGCAGCGA GCACGCGAGT	
R. etli	~CACAA CGAACGCTGG CGGCAGGCTT	GTGGTGACAG TGGGCAGCGA GCACGCGAGT	
R. leguminosarum	~AA CGAACGCTGG CGGCAGGCTT	GTGGTGACAG TGGGCAGCGA GCACGCGAGT	
A. rhizogenes	~GAA CGAACGCTGG CGGCAGGCTT	GTGGTGACAG TGGGCAGCGA GCACGCGACT	
R. hainanense	TGGCTCAGAA CGAACGCTGG CGGCAGGCTT	GTGGTGACAG TGGGCAGCGA GCACGCGACT	
R. tropici	TGGCTCAGAA CGAACGCTGG CGGCAGGCTT	GTGGTGACAG TGGGCAGCGA GCACGCGAGT	
Allorhizobium	~CGAACGCTGG CGGCAGGCTT	GTGGTGACAG TGGGCAGCGA GACCCGCGAGG	
A. amazonense	~CTGG CGGCATGCCT	GTGGTGACAG TGGGCAGCGA CCTCTGAGG	
Acetobacter	~AG CGAACGCTGG CGGCAGGCTT	GCGGTGACAG TGGGAAGCGA GGCAGCGATG	
A. brasilense	~CGAACGCTGG CGGCAGGCTT	GCGGTGACAG TGGGATGCGA AGTCCGAAGA	
Escarpia	~TCAGAT TGAACGCTGG CGGTATGCTT	GCCGGTACAG AGGGCTGCAA CCCCCTGAGG	
P. fluorescens	~G CGGCAGGCTT	GTCGGTACAG AGGGTTGCCA AGCCGCGAGG	
Nitrosomonas	TGTCTC.NNN NNAACGCTGG CGGCATGCTT	GCGGTACAG AGGGTTGCCA ACCCGCGAGG	
Spirillum	TGGCTCAGAT TGAACGCTGN CNGCATGCCT	GTCGGTACAG AGGGTTGCCA ACCCGTGAAG	
P. azotoformans	TGGCTCAGGA CGAACGCTGG CGGCATGCTT	GATGGTACAA AGGGCTGCTA NGCCGCGAGG	
B. denitrificans	~CTCAGGA CGAACGCTGG CGGCATGCTT	GCGGTACAA AGGGCTGCGA ACCCGCGAGG	
Desulfonatronovibr	~CTGG CGGCATGCTT	GTGGGGACAA CGGGTCCGCA GGCCGCGAGG	
Campylobacter	~CGAACGCTGG CGGCAGGCTT	GCGTATACAA TGAGACGCAA TATCGCGAGA	
Pelodictyon	~CGAACGCTGG CGGCAGGCTT	GTAGCTACAG AGGGCA...A AGCCGCGAGG	
Rodothermus	~GG CGGCAGGCTT	GCCGGTACAA TGGGCAGCGA CCCCCTGAGG	
Desulfobacterium	~TAACACAT	GTCGGGACAG AGGGAAGCGA AGCCGCGAGG	
Verrucomicrobium	~GAACGCTGG CGGCATGCTT	CCCAGCACAA TGTGAACCGA AACCGCGAGG	
A. vitis	~CGAACGCTGG CGGCATGCTT	TGGTAGTTCG ATGGGAACCA CGTTAATATT	
Phyllobacterium	AGCCGAGGT TCCCTTACGG CTACCTTGT	GACCAGTTGG CCGCTTCGC CACTG.GTGT	

Figura 3: Comparación de secuencias de 16S ADNr de microbios del suelo. Se muestra el apilamiento de los extremos 3' y 5' (separados por una franja turquesa) de las secuencias de algunas especies microbianas presentes en muestras de suelo, así como también de especies de rizobios (resaltadas en negrita). Con rojo se distinguen las secuencias de los dos primers diseñados forg (3') y revg (5'), y se resaltó en gris las diferencias encontradas con las distintas especies. El fragmento del gen comprendido entre los dos primers es de aproximadamente 1200 pb. Los ID de los microorganismos son: Acetobacter azotocaptans(AF192761), Agrobacterium rhizogenes (D12788), Agromonas oligotrophica (strain:JCM1494) (D68366), Azospirillum amazonense (Z29616), Azospirillum brasilense (X79739), Bacillus azotoformans (D78309), Bartonella alsatica (AJ002139), Blastobacter denitrificans (X66025), Brucella melitensis (AF220147), Campylobacter curvus (L04313), Caulobacter bacteroides (AB008513), Cyanobacterium stanieri (AF132782), Bacillus denitrificans (Z26927), Desulfurobacterium thermolithotrophum (AJ001049), Desulfonatronovibrio hydrogenovorans (X99234), Escarpia spicata endosymbiont (AF165909), Pseudomonas fluorescens bv. C (AF228367), Hyphomonas adhaerens (AF082790), Nitrosomonas oligotropha (AF272422), Pelodictyon phaeoclathratiforme (Y08108), Pseudomonas azotoformans (D84009), Rhodopseudomonas acidophila (M34128), Rhodothermus marinus (AF217493), Spirillum volutans (M34131), Trichodesmium contortum (AF013028), Verrucomicrobium spinosum (X90515) Allorhizobium undicola (Y17047), Agrobacterium rhizogenes (D12788), Agrobacterium vitis (AF209076), Bradyrhizobium liaoningense (AB029402), Mesorhizobium ciceri (U07934), Rhizobium galegae (D12793), Rhizobium gallicum (U86343), Rhizobium giardinii (U86344), Rhizobium hainanensis (U71078), Rhizobium huakuii (D12797), Rhizobium huatlense (AF025852), Azorhizobium caulnodans (D13948), Mesorhizobium amorphae (AF041442), Sinorhizobium medicae (L39882), Mesorhizobium mediterraneum (L38825), Rhizobium loti (D14514), Rhizobium mongolense (U89817), Mesorhizobium plurifarum (Y14158), Mesorhizobium tianshanense (U71079), Phyllobacterium rubiacearum (AF008564), Sinorhizobium teranga (X68388), Xanthobacter agilis (X94198), Bradyrhizobium elkanii (U35000), Bradyrhizobium japonicum (Z35330), Sinorhizobium fredii (X67231), R. etli (U28910), S. sahelii (X68390).

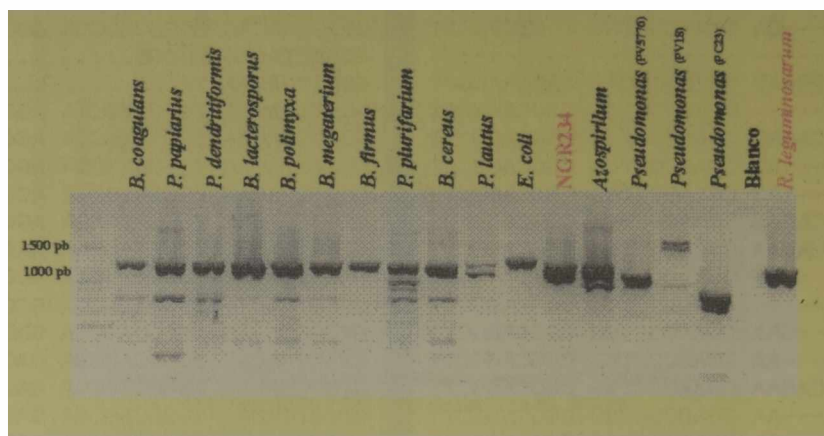


Figura 4: Resultados de la amplificación de distintos géneros bacterianos con los primers forg/revg. Se indican las especies de *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Azoapirilum* y *Rhizobium* que han sido utilizadas para comprobar la especificidad de los primers forg/revg.

Se utilizó para la amplificación de las muestras de ADN de suelo la modalidad de amplificación *Hot start* para evitar las amplificaciones de secuencias inespecíficas (Mc Pherson *et al.*, 1995). En la Figura 5 se muestra el resultado el cual consistió en una banda de 1200 pb.

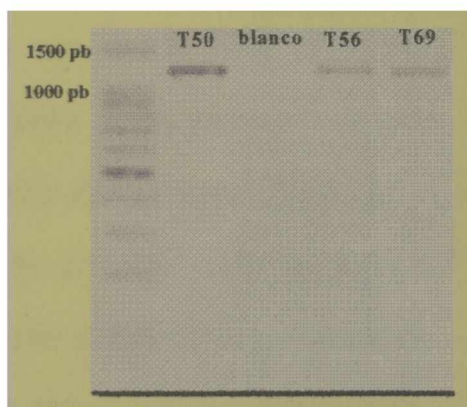


Figura 5: Resultado de las reacciones PCR usando ADN extraído de suelo y los primers forg/revg. Se muestran los productos de la reacción de aproximadamente 1200 pb para los suelos T50 (Peña Baya), T56 (Campo Quijano) y T69 (Cerrillos) separados por electroforesis en un gel de agarosa.

Análisis de DTGGE de muestras de suelo

En esta sección se describe el análisis de muestras de suelo del NOA. Se ensayaron, 4 muestras de tierras vírgenes (T50, T56, T58 y T65) y dos de campos de cultivo intensivo de poroto (T62 y T69). El ADN extraído de cada muestra de suelo fue usado como molde en la reacción PCR con los primers forg/revg. Una alícuota de una dilución 1/100 de la primera reacción fue utilizada a su vez como molde para la reacción PCR con los primers dgefo/dgere. El producto de esta segunda reacción de 330 pb fue analizado en un gel de DTGGE junto al de especies conocidas de rizobios con el fin de correlacionar las posiciones migracionales y eventualmente establecer identidades. El resultado se muestra en las Figuras 6 y 7

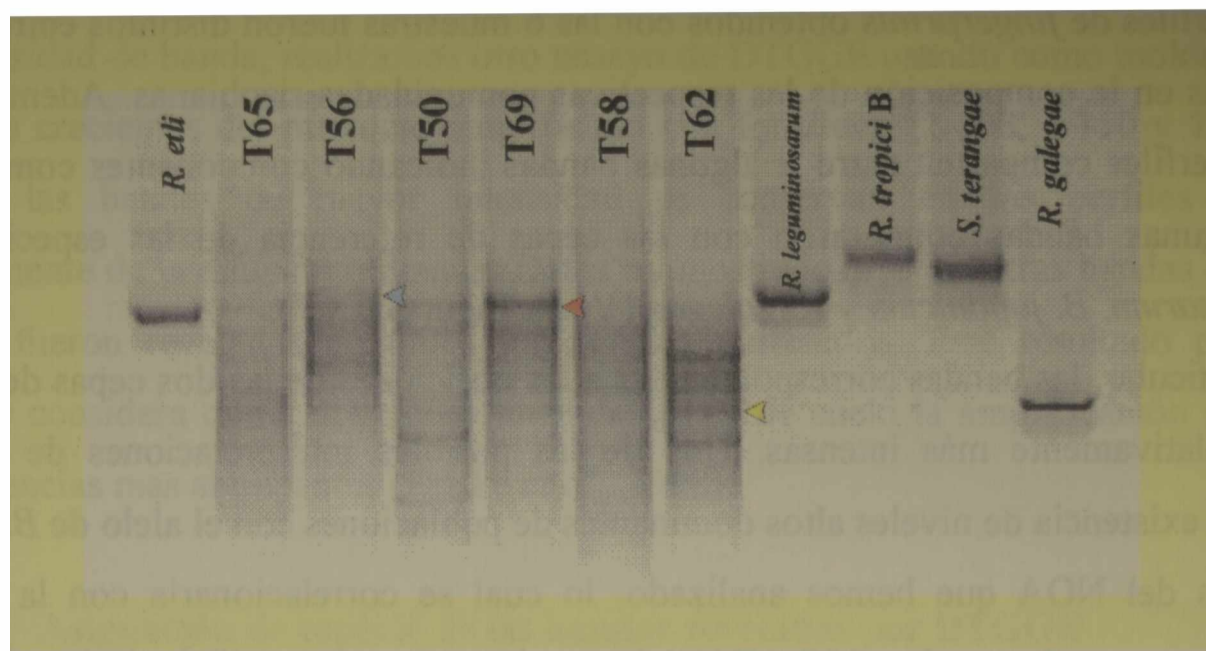


Figura 6: Perfiles de *fingerprints* de 16S ADNr de suelos del NOA. Se analizaron con DTGGE los productos de la amplificación de 6 muestras de suelo: T65 (San Luis), T56 (lugar próximo a Rosario de Lerma), T50 (Peña Baya), T69 (Cerrillos), T58 (Quebrada del Toro) y T62 (Metán). Con una punta de flecha roja se indica la banda que comigra con la especie *R. etli*. Con amarillo la que comigra con *R. galegae* y en celeste con *R. leguminosarum*. Las cepas utilizadas son *R. etli* (CFN42), *R. leguminosarum* (USDA2671), *R. galegae* (USDA4128), *S. teranga* (USDA4894) y el aislamiento de *Mimosa* NOAP159N2 (caracterizado con el genotipo de *R. tropici* B, el cual fue posteriormente denominado *genotipo salteño*).

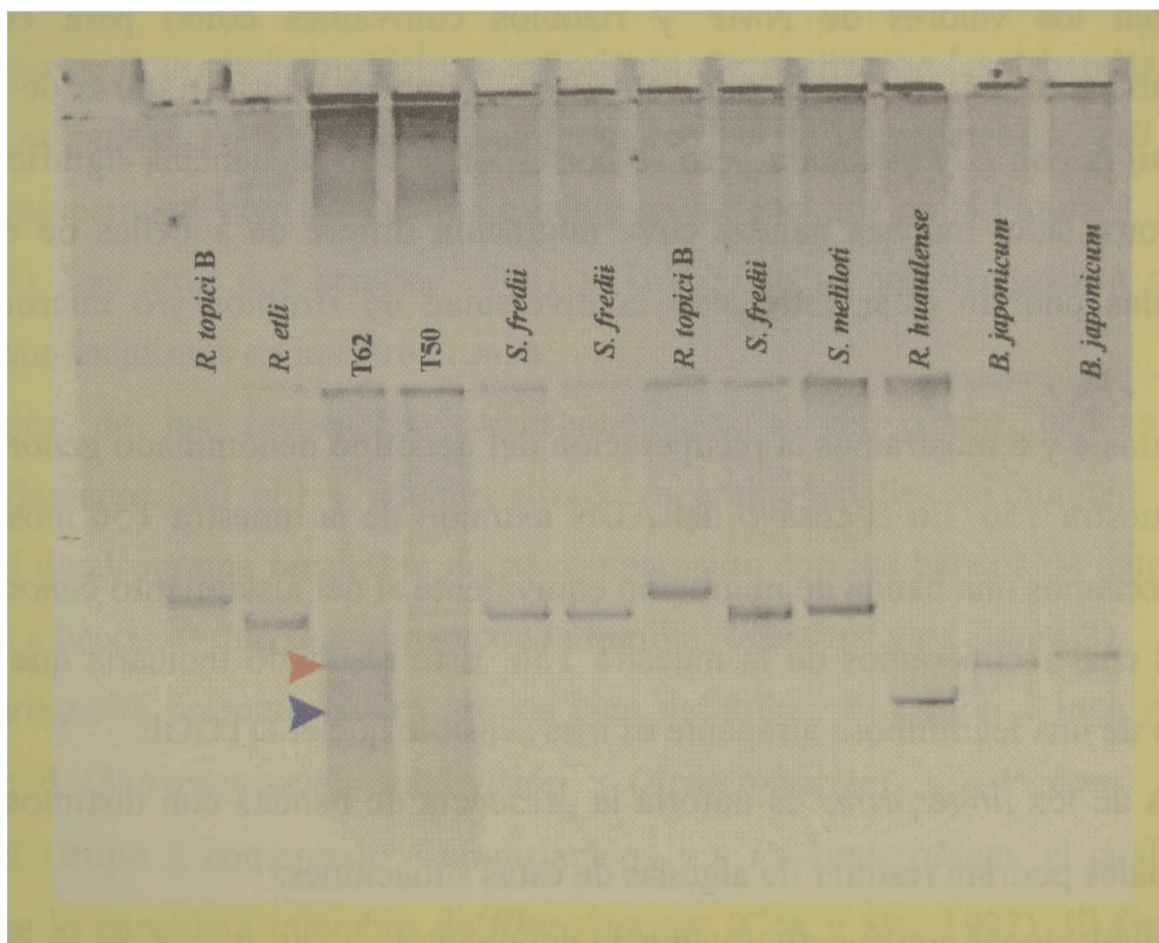


Figura 7: Perfiles de *fingerprints* de 16S ADNr de suelos del NOA. En el ensayo se analizaron con DTGGE dos alícuotas de los productos de PCR de 2 muestras de suelo: T62 y T50. Se muestra la comigración de una banda intensa de la muestra T62 y la de la especie *B. japonicum* USDA59 (Punta de flecha roja). También se muestra la comigración de *R. huautlense* (Punta de flecha azul) con una banda de la misma muestra. De izquierda a derecha fueron sembradas: CIAT899 (*R. tropici* B), CFN42 (*R. etli*), muestra T62, muestra T50, NOAP159N3 (genotipo salteño), USDA191 (*S. fredii*), CIAT899 (*R. tropici* B), USDA191 (*S. fredii*), cepa 1021 (*S. meliloti*), USDA4900 (*R. huautlense*), USDA110 (*B. japonicum*) y USDA59 (*B. japonicum*).

Los perfiles de *fingerprints* obtenidos con las 6 muestras fueron distintos entre sí, señalando diferencias en la composición de las respectivas comunidades rizobianas. Además se observó, que los perfiles comparten entre sí algunas bandas indicando componentes comunes. Por otra parte, algunas bandas comigraron con las cepas de referencia de las especies *R. etli*, *R. leguminosarum*, *B. japonicum* y *R. galegae* (Véase Figuras 6 y 7).

En particular, las bandas correspondientes a las posiciones de las dos cepas de *B. japonicum* fueron relativamente más intensas. Una de las posibles interpretaciones de este resultado supone la existencia de niveles altos dominantes de poblaciones con el alelo de *B. japonicum* en los suelos del NOA que hemos analizado, lo cual se correlacionaría con la frecuencia de aislamientos con el genotipo 16S ADN_r observado en nuestro análisis de los aislamientos de leguminosas silvestres del NOA; aunque sin embargo, diverge respecto al bajo nivel de bradirizobios en suelo determinado mediante el uso de *Vigna* como atrapante y el procedimiento NMP. Estudiando un sistema diferente, van Elsas *et al.* (1998) han sugerido que el umbral empírico de detección mediante DGGE es aproximadamente el 1% de la totalidad de la población cultivable de *Pseudomonas stutzeri* KC. Lamentablemente no disponemos de datos que correlacionen los valores de NMP y rizobios cultivables como para encarar una comparación semejante a la realizada por van Elsas. También podría tratarse de una banda intensa que comigra con *B. japonicum* pero se corresponde con secuencias significativamente diferentes. Por otro lado, muchas bandas cuya migración difiere de aquellas de especies de rizobios conocidas podrían estar reflejando la diversidad de rizobios y/o microorganismos emparentados.

En los Capítulos 4 y 6 mostramos la recuperación del genotipo denominado *genotipo salteño* a partir de la muestra T56. En el ensayo del ADN extraído de la muestra T56 mostrado en la Figura 6, no detectamos una banda de migración equivalente al del aislamiento *genotipo salteño* NOAP159N2 el cual recuperamos de la muestra T56. Este resultado indicaría que el método basado en el uso de una leguminosa atrapante es más sensible que el DTGGE

En el análisis de los *fingerprints* es notoria la presencia de bandas con distintos grados de intensidad las cuales podrían resultar de algunas de estas situaciones:

- A- Algunas poblaciones son cuantitativamente dominantes
- B- El ADN de algunas poblaciones es extraíble con mayor eficiencia
- C- Algunas de las secuencias que componen el ADN extraído, son amplificadas con una eficiencia superior.
- D- Los productos de especies distintas de rizobio convergen en una misma banda.

Para investigar si la dilución del ADN de suelo afecta el patrón de bandas en cuanto al número e intensidad de banda, realizamos otro ensayo de DTGGE usando como molde el ADN de 3 diluciones crecientes del producto amplificado con *forG/revG* (1/100, 1/150 y 1/200). Se encontró que las bandas de mayor intensidad se conservan en los perfiles DTGGE independientemente de la dilución utilizada (Datos no mostrados). Y las otras bandas de menor intensidad no fueron reveladas en todos los perfiles obtenidos. Este resultado puede ser explicado si se considera que a diluciones altas del ADN de suelo la amplificación se reduce sólo a las secuencias más abundantes (Felske *et al.*, 1998).

Asignación de especie de las bandas reveladas por DTGGE

Como fue explicado en la sección anterior algunas bandas del perfil de DTGGE comigraron con las de especies conocidas de rizobios, lo cual sugirió que la muestra de suelo contiene poblaciones de esas especies. Para corroborarlo se realizó un ensayo de DTGGE en el cual se extrajo el ADN de la parte del gel correspondiente a algunas de las bandas de las muestras T50 y T69, el mismo fue reamplificado, purificado y finalmente secuenciado. El diagrama de la Figura 8 representa un esquema del procedimiento. Se analizaron las 4 bandas indicadas en la Figura 8. Las bandas T69b1 y T69b2 comigran con las de las especies *R. etli* y *B. japonicum* USDA59, respectivamente (Esta última especie no fue incluida en la Figura 8, pero sí en el gel de DTGGE). Las otras dos bandas, T50b1 y T69b3, no se correlacionaron con las especies conocidas que incluimos en nuestro ensayo.

Los datos de las secuencias correspondientes a las cuatro bandas son parciales (Aproximadamente 200 pb) y además presentan ambigüedades en algunas posiciones. Sin embargo, el dendrograma resultante de su comparación con los bancos de datos demostró que representan a bacterias que se agrupan con la familia *Rhizobiaceae* (Figura 8).

El dendrograma presenta cuatro grupos bien definidos: El Grupo 1 incluye géneros de la subdivisión β (*Nitrosomonas*), subdivisión γ (*Acinetobacter*), *Clostridium*, *Pseudomonas* y *Bacillus*. El Grupo 2 comprende a bradirizobios y a *Pedomicrobium*, el cual aunque no fija nitrógeno se lo considera miembro de *Rhizobiaceae* (Cox y Sly, 1997). El Grupo 3 incluye a varias especies rizobeaceas tales como, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Agrobacterium* y a los géneros *Bartonella*, *Brucella*, *Xanthobacter* y *Ochrobactrum* que no forman nódulos en leguminosas (Di Cello *et al.*, 1997; Rainey, 1996). En el Grupo 4 se encuentran especies no cultivables emparentadas con *Rhizomonas* y *Sphingomonas*. (Takeuchi

et al., 1994, Sessitsch *et al.*, 2001). Las secuencias de los fragmentos separados por DTGGE forman una rama particular de este último grupo, con lo cual es posible identificarlas como especies no cultivables emparentadas con los rizobios.

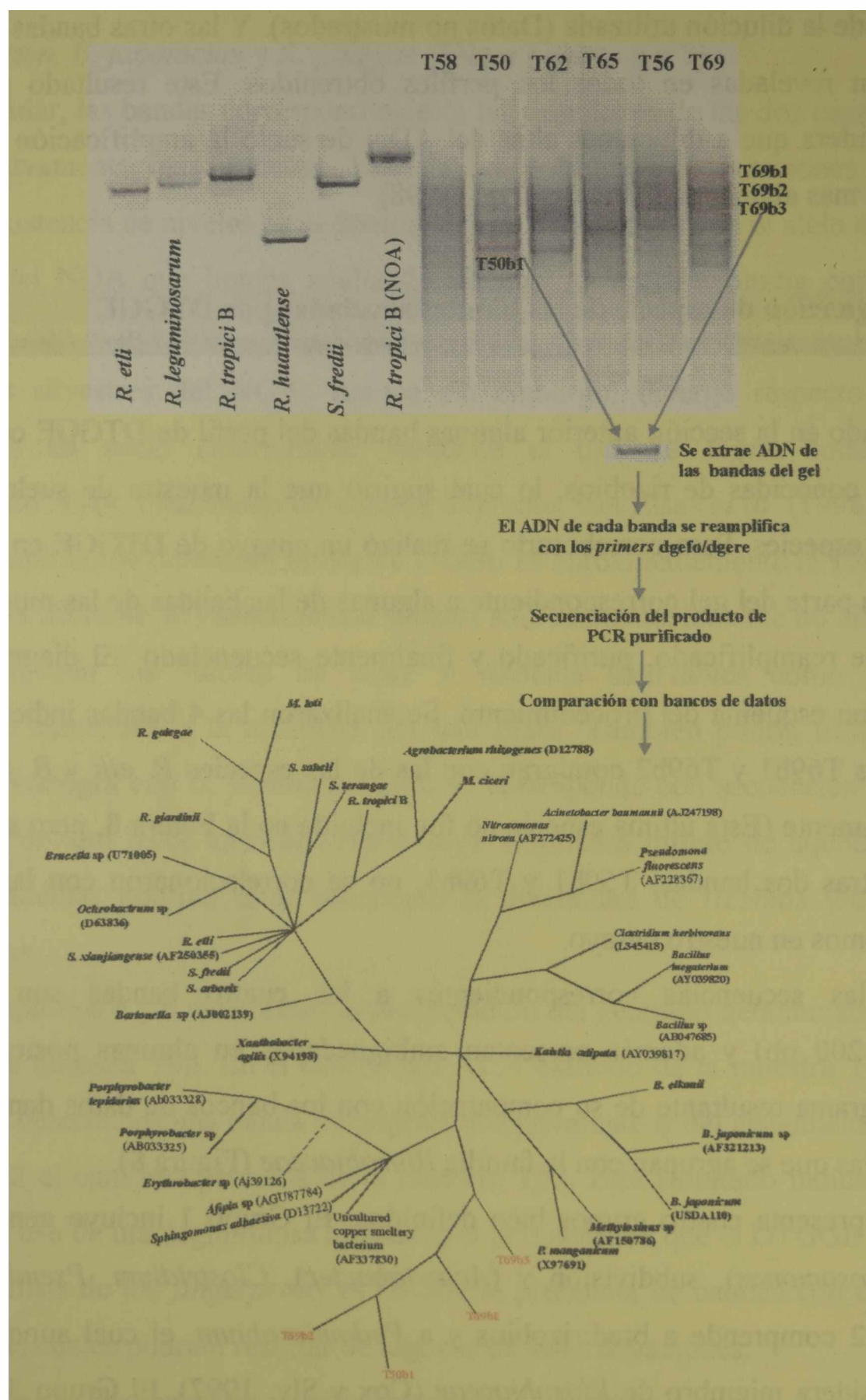


Figura 8: Identificación de algunas especies microbianas resueltas por DTGGE. Se muestra las etapas secuenciales seguidas para la identificación de determinadas bandas que fueron resultadas en un gel de DTGGE. En primer lugar se escindieron las bandas, que fueron posteriormente reamplificadas con los *primers* dgefo/dgere y los productos de PCR resultantes se secuenciaron. Estas secuencias fueron comparadas con otras presentes en bancos de datos y a partir del alineamiento se construyó el dendrograma con el programa PAUP utilizando el análisis de *bootstrapping* (500) y la distancia neighbor-joining.

Las 4 secuencias y las de especies conocidas de rizobios fueron alineadas para identificar posiciones altamente conservadas. En la Figura 9 se muestra parte de este alineamiento múltiple (El alineamiento completo se muestra en el Apéndice 6) en el cual se señala a la secuencia consenso de las especies de rizobios y se destacan las posiciones conservadas en todos los rizobios y a su vez divergentes respecto a otros géneros microbianos. Identificamos algunas posiciones nucleotídicas de las secuencias de DTGGE que concuerdan con las de los rizobios, mientras que otras les son propias (Por ejemplo posiciones 26-36) y las distinguen de otros géneros. El dato de secuencia no nos permitió concluir que alguna de las bandas analizadas se corresponde con especies de rizobios conocidas. Sin embargo, tampoco nos permite descartar que representen especies nuevas cuyo producto tenga propiedades migracionales idénticas a las de *R. etli*, en el caso de T69b1 o con *B. japonicum*, en el caso de T69b2. Estos resultados señalan la necesidad de realizar otros ensayos que demuestre esta hipótesis, como por ejemplo el diseño de oligonucleótidos específicos para especies de Tipo I y para especies de bradirizobios, respectivamente.

	42	66			
<i>B. japonicum</i> (USDA110)	AGCGG CAGACGGGTG	AGTAAACGCGT			
<i>B. elkanii</i> (USDA76)	AGCGG CAGACGGGTG	AGTAAACGCGT			
T50b1	AGTGG CAGACGGGTG	AGTAAACGCGT			
T69b2	AGTGG CAGACGGGTG	AGTAAACGCGT			
T69b1	AGTGG CAGACGGGTG	AGTAAACGCGT			
T69b3	AGTGG CAGACGGGTG	AGTAAACGCGT			
<i>Porphyrobacter</i> (AB033325)	AGTGG CGCACGGGTG	CGTAAACGCGT			
<i>Erythrobacter</i> sp (AJ39126)	AGTGG CGCACGGGTG	CGTAAACGCGT			
<i>Uncultured copper</i> (AF337830)	AGTGG CGCACGGGTG	CGTAAACGCGT			
<i>Afipia</i> sp (AGU87784)	AGTGG CGCACGGGTG	CGTAAACGCGT			
<i>Methylosinus</i> (AF150786)	AGTGG CAGACGGGTG	AGTAAACGCGT			
<i>P. manganicum</i> (X97691)	AGTGG CAGACGGGTG	AGTAAACGCGT			
<i>K. adipata</i> (AY39817)	AGTGG CAGACGGGTG	AGTAAACGCGT			
<i>Ochrobactrum</i> sp (D63836)	AGCGG CAGACGGGTG	AGTAAACGCGT			
<i>Brucella</i> (U71005)	AGCGG CAGACGGGTG	AGTAAACGCGT			
<i>R. galegae</i>	AGCGG CAGACGGGTG	AGTAAACGCGT			
<i>R. giardinii</i>	AGCGG CAGACGGGTG	AGTAAACGCGT			
<i>S. sahelii</i>	AGCGG CAGACGGGTG	AGTAAACGCGT			
<i>S. terangaie</i>	AGCGG CAGACGGGTG	AGTAAACGCGT			
<i>A. rhizogenes</i> (D12788)	AGCGG CAGACGGGTG	AGTAAACGCGT			
<i>M. ciceri</i>	AGCGG CAGACGGGTG	AGTAAACGCGT			
<i>S. arboris</i>	AGCGG CAGACGGGTG	AGTAAACGCGT			
<i>S. fredii</i>	AGCGG CAGACGGGTG	AGTAAACGCGT			
<i>S. xianjiangense</i>	AGCGG CAGACGGGTG	AGTAAACGCGT			
<i>R. etli</i>	AGCGG CAGACGGGTG	AGTAAACGCGT			
<i>R. tropici</i>	AGCGG CAGACGGGTG	AGTAAACGCGT			
<i>X. agilis</i> (X94198)	AGCGG CAGACGGGTG	AGTAAACGCGT			
<i>M. loti</i>	AGCGG CAGACGGGTG	AGTAAACGCGT			
Consenso rizobios	AG GG CA ACGGGTG	GTAACGCGT			

	67	136			
<i>B. japonicum</i> (USDA110)	GGGAACCTACCTTTTGGTT.	CGGAACAACA CAGGGAAACT	TGTGCTAATA	COGGATAAGC	
<i>B. elkanii</i> (USDA76)	GGGAACCTACCTTTTGGTT.	CGGAACAACA CAGGGAAACT	TCAGCTAATA	COGGATAAGC	
T50b1	GGGAANCTNCCNNGGTT.	CGGAACAACA CAGGGAAACT	TGAGCTAATA	COGGATANGN	
T69b2	GGGAANCTNCCNNGGTT.	CGGAACAACA CAGGGAAACT	TGAGCTAATA	COGGATANGN	
T69b1	GGGAANCTNCCNNGGTT.	CGGAANAACA CAGGGAAACT	TGAGCTAATA	COGNATNANN	
T69b3	GGGAANCTNCCNNGGTT.	CGGAANAACA CAGGGAAACT	TGAGCTAATA	COGNATNANN	
<i>Porphyrobacter</i> (AB033325)	GGGAACCTGCCTTAGGTT.	CGGAATAACT CAGAGAAATT	TGAGCTAATA	COGGATAATG	
<i>Erythrobacter</i> sp (AJ39126)	GGGAACCTGCCTTAGGTT.	CGGAATAACT CAGAGAAATT	TGAGCTAATA	COGGATAATG	
<i>Uncultured copper</i> (AF337830)	GGGAATCTGCCTTAGGTT.	CGGAATAACT CAGGGAAACT	TGAGCTAATA	COGGATAATG	
<i>Afipia</i> sp (AGU87784)	GGGAATCTGCCTTAGGTT.	CGGAATAACT CATGGAAACG	TGTGCTAATA	COGTATGATG	
<i>Methylosinus</i> (AF150786)	GGGAACCTACCTTTGGTT.	CGGAATAACT CAGGGAAACT	TGAGCTAATA	COGGATACGC	
<i>P. manganicum</i> (X97691)	GGGAACCTTCCCTATGGTT.	CGGAATAGCT CAGGGAAACC	TGGGTAATA	COGGATAAGC	
<i>K. adipata</i> (AY39817)	GGGAATCTACCTTTGGTT.	CGGAACAACC AAGGGAAACT	TTGGCTAATA	COGTATGAGC	
<i>Ochrobactrum</i> sp (D63836)	GGGAATCTACCTTTTGGTT.	CGGAATAACT CAGGGAAACT	TGTGCTAATA	COGTATGTGC	
<i>Brucella</i> (U71005)	GGGAATCTACCTTTTGGTT.	CGGAATAACT CAGGGAAACT	TGTGCTAATA	COGTATGTGC	
<i>R. galegae</i>	GGGAATCTACCCATCCCTA.	CGGAACAACA CCGGGAAACT	GGAGCTAATA	COGTATAAGC	
<i>R. giardinii</i>	GGGAATCTACCCATCCCTA.	CGGAATAACT CAGGGAAACT	TGTGCTAATA	COGTATAAGC	
<i>S. sahelii</i>	GGGAATCTACCTTTTCTA.	CGGAATAAOC CAGGGAAACT	TGTGCTAATA	COGTATGAGC	
<i>S. terangaie</i>	GGGAATCTACCTTTTCTA.	CGGAATAAOC CAGGGAAACT	TGTGCTAATA	COGTATAAGC	
<i>A. rhizogenes</i> (D12788)	GGGAATCTACCTTTTCTA.	CGGAATAAOC CAGGGAAACT	TGTGCTAATA	COGTATGTGT	
<i>M. ciceri</i>	GGGAATCTACCTTTTCTA.	CGGAATAAOC CAGGGAAACT	TGTGCTAATA	COGTATGTGT	
<i>S. arboris</i>	GGGAATCTACCTTTTCTA.	CGGAATAAOC CAGGGAAACT	TGTGCTAATA	COGTATAAGC	
<i>S. fredii</i>	GGGAATCTACCTTTTCTA.	CGGAATAAOC CAGGGAAACT	TGTGCTAATA	COGTATGAGC	
<i>S. xianjiangense</i>	GGGAATCTACCTTTTCTA.	CGGAATAAOC CAGGGAAACT	TGTGCTAATA	COGTATGAAC	
<i>R. etli</i>	GGGAACCTACCTTTTCTA.	CGGAATAAOC CAGGGAAACT	TGTGCTAATA	COGTATGTGC	

R. tropici	GGGAATCTACCTTTTGCTAT	CGGAATAACG	CAGGGAAACT	TGTGCTAATA	CCGTATGTGT
X. agilis (X94198)	GGGGATCTACCCATTTGGTA.	CGGAATAACG	CAGGGAAACT	TGGACTAATA	CCGTATAAGC
M. loti	GGGAATCTACCCATCTCTA.	CGGAACAAC	CCGGGAAACT	GGAGCTAATA	CCGTATACGT
Consenso rizobios	GGGAA**T	CC*****T**	CGGAA*AA*	** GAAA	*** CTAATA CCG*AT****

	137		204
B. japonicum (USDA110)	CCTTACGGG. GAAAGAT TTATCGCCGAA	AGATCGGCC	GCGTCTGATT AGCTAGTTGG TAGGGTAAAG
B. elkanii (USDA76)	CCTTACGGG. GAAAGAT TTATCGCCGAA	AGATCGGCC	GCGTCTGATT AGCTAGTTGG TGAGGTAATG
T50b1	C T NG CAAAGAT TTAT G	GAT CCC	GCGT GATT A CTAGTTGG T GGTAACG
T69b2	C T NG CAAAGAT TTAT G	GAT CCC	GCGT GATT A CTAGTTGG T GGTAACG
T69b1	CTT GG CAAAGAT TTAT G	GAT CCC	GCGT GATT A CTAGTTGG T GGTAACG
T69b3	CTT GG CAAAGAT TTAT G	GAT CCC	GCGT GATT A CTAGTTGG T GGTAACG
Porphyrobacter (AB033325)	TCTTCGGAC. CAAAGAT TTATCGCCTTT	GGATGGGCC	GCGTTGGATT AGCTAGTTGG TGGGGTAAAG
Erythrobacter sp (AJ39126)	TCTTCGGAC. CAAAGAT TTATCGCCTTT	GGATGGGCC	GCGTAGGATT AGCTAGTTGG TGGGGTAAAG
Uncultured copper (AF337830)	ACTTCGGTC. CAAAGAT TTATCGCCTAG	GGATGAGCCC	GCGTCGGATT AGCTAGTTGG TGAGGTAAAA
Afipia sp (AGU87784)	TCTTCGGAC. CAAAGAT TTATCGCCTAG	GGATGAGCCC	GCGTTGGATT AGCTAGTTGG TGAGGTAAAG
Methylosinus (AF150786)	CCTTCGGGG. GAAAGAT TTATCGCCGAA	GGATCGGCC	GCGTCGGATT AGCTAGTTGG TGAGGTAAAG
P. manganicum (X97691)	CCTTCGGGG. GAAAGAT TTATCGCCATT	GGATGGGCC	GCGTAGGATT AGCTAGTTGG TGAGGTAAAG
K. adipata (AY39817)	CCTTCGGGG. GAAAGAT TTATCGCCATA	AGATGAGCCC	GCGTAGGATT AGCTAGTTGG TGAGGTAAAG
Ochrobactrum sp (D63836)	CCTTCGGGG. GAAAGAT TTATCGCCAAA	GGATGAGCCC	GCGTTGGATT AGCTAGTTGG TGGGGTAAAG
Brucella (U71005)	CCTTCGGG. GAAAGAT TTATCGCCAAA	GGATGAGCCC	GCGTTGGATT AGCTAGTTGG TGGGGTAAAG
R. galegae	CCTTCGGGG. GAAAGAT TTATCGGGGAT	GGATGAGCCC	GCGTTGGATT AGCTAGTTGG TGGGGTAAAG
R. giardinii	CCTTCGGGG. GAAAGAT TTATCGGGATA	GGATGAGCCC	GCGTTGGATT AGCTAGTTGG TGGGGTAAAG
S. saheli	CCTTCGGGG. GAAAGAT TTATCGGGAAA	GGATGAGCCC	GCGTTGGATT AGCTAGTTGG TGGGGTAAAG
S. terangaie	CCTTTGGGG. GAAAGAT TTATCGGAGAA	GGATGAGCCC	GCGTTGGATT AGCTAGTTGG TGGGGTAAAG
A. rhizogenes (D12788)	CCTTCGGGA. GAAAGAT TTATCGGGAAA	GGATGAGCCC	GCGTTGGATT AGCTAGTTGG TGGGGTAAAG
M. ciceri	CCTTCGGGA. GAAAGAT TTATCGGGAAA	GGATGAGCCC	GCGTTGGATT AGCTAGTTGG TGGGGTAAAG
S. arboris	CCTTCGGGG. GAAAGAT TTATCGGGAAA	GGATGAGCCC	GCGTTGGATT AGCTAGTTGG TGGGGTAAAG
S. fredii	CCTTCGGGG. GAAAGAT TTATCGGGAAA	GGATGAGCCC	GCGTTGGATT AGCTAGTTGG TGGGGTAAAG
S. xianjiangense	CCTTCGGGG. GAAAGAT TTATCGGGAAA	GGATGAGCCC	GCGTTGGATT AGCTAGTTGG TGGGGTAAAG
R. etli	CCTTCGGGA. GAAAGAT TTATCGGCAAG	AGATGAGCCC	GCGTTGGATT AGCTAGTTGG TGGGGTAAAG
R. tropici	CCTTCGGGG. GAAAGAT TTATCGCCAAT	GGATGAGCCC	GCGTCGGATT AGCTAGTTGG TGGGGTAAAG
X. agilis (X94198)	CCTTCGGGG. GAAAGAT TTATCGGAGAT	GGATGAGCCC	GCGTTGGATT AGCTAGTTGG TGGGGTAAAG
M. loti	CCTTCGGGA. GAAAGAT TTATCGGAGAT	GGATGAGCCC	GCGTTGGATT AGCTAGTTGG TGGGGTAAAG
Consenso rizobios	CTT**G *	GAAAGAT TTAT G***	*GAT***CCC GCGT**GATT A TAGTTGG T**GGTAA**

	205		275
B. japonicum (USDA110)	GCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACA	TTGGGACTGAGACACGGGCCA	
B. elkanii (USDA76)	GCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACA	TTGGGACTGAGACACGGGCCA	
T50b1	GC ACCAAGGCGACGATC TAGCTG TCTGAGAGGATGA CA CCACA	TGGGACTGAGACACGGGCC	
T69b2	GC ACCAAGGCGACGATC TAGCTG TCTGAGAGGATGA CA CCACA	TGGGACTGAGACACGGGCC	
T69b1	GC ACCAAGGCGACGATC TAGCTGGTCTGAGAGGATGA CA CCACA	TGGGACTGAGACACGGGCC	
T69b3	GC ACCAAGGCGACGATC TAGCTGGTCTGAGAGGATGA CA CCACA	TGGGACTGAGACACGGGCC	
Porphyrobacter (AB033325)	GCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACA	CTGGGACTGAGACACGGGCCG	
Erythrobacter sp (AJ39126)	GCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACA	CTGGGACTGAGACACGGGCCG	
Uncultured copper (AF337830)	GCTCACCAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACA	CTGGGACTGAGACACGGGCCG	
Afipia sp (AGU87784)	GCTCACCAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACA	CTGGGACTGAGACACGGGCCG	
Methylosinus (AF150786)	GCTCACCAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACA	CTGGGACTGAGACACGGGCCG	
P. manganicum (X97691)	GCTCACCAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACA	CTGGGACTGAGACACGGGCCG	
K. adipata (AY39817)	GCTCACCAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACA	CTGGGACTGAGACACGGGCCG	
Ochrobactrum sp (D63836)	GCTCACCAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACA	CTGGGACTGAGACACGGGCCG	
Brucella (U71005)	GCTCACCAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACA	CTGGGACTGAGACACGGGCCG	
R. galegae	GCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACA	TTGGGACTGAGACACGGGCCA	
R. giardinii	GCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACA	TTGGGACTGAGACACGGGCCA	
S. saheli	GCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACA	TTGGGACTGAGACACGGGCCA	
S. terangaie	GCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACA	TTGGGACTGAGACACGGGCCA	
A. rhizogenes (D12788)	GCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACA	TTGGGACTGAGACACGGGCCA	
M. ciceri	GCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACA	TTGGGACTGAGACACGGGCCA	
S. arboris	GCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACA	TTGGGACTGAGACACGGGCCA	
S. fredii	GCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACA	TTGGGACTGAGACACGGGCCA	
S. xianjiangense	GCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACA	TTGGGACTGAGACACGGGCCA	
R. etli	GCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACA	TTGGGACTGAGACACGGGCCA	
R. tropici	GCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACA	TTGGGACTGAGACACGGGCCA	
X. agilis (X94198)	GCTCACCAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACA	CTGGGACTGAGACACGGGCCG	
M. loti	GCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACA	TTGGGACTGAGACACGGGCCA	
Consenso rizobios	GC**ACCAAGGCGACGATC**TAGCTGGTCTGAGAGGATGA CA**CCACA	*TGGGACTGAGACACGGGCC*	

Figura 9: Comparación de las secuencias del ADN de las bandas de DTGGE con las secuencias de especies conocidas de rizobios. Con color gris se resaltan las posiciones en las cuales se observó divergencia entre las secuencias. En color azul se resaltan los nucleótidos diferentes de las secuencias de las bandas de DTGGE. Se muestra también la secuencia consenso de todas las secuencias comparadas.

Discusión

La tarea de revelar las diferentes poblaciones de rizobios del suelo requiere del uso de leguminosas que resulten noduladas por los componentes de esa diversidad. Sin embargo, dada la especificidad por la leguminosa hospedante que caracteriza a los rizobios se requiere de una exhaustiva colección de leguminosas, y aún así el análisis de los rizobios recuperados de esos nódulos dará una idea de aquella comunidad que alcanzó a asociarse, representando sólo una parte de las poblaciones del suelo. Estas limitaciones señalan la necesidad de disponer de una

herramienta experimental independiente de la nodulación. Por otra parte, los rizobios representan un componente minoritario de los microbios del suelo (0,8-1%) requiriendo una metodología altamente sensible para revelarlos. Identificamos la metodología DGGE como una posible herramienta experimental superadora de esas limitaciones y en el Capítulo 2 demostramos que DTGGE nos permite diferenciar secuencias de 16S ADNr de distintas especies rizobianas dándonos las bases experimentales para intentar su aplicación al estudio directo de las poblaciones de rizobios de muestras de suelo.

Se diseñaron *primers* específicos para que en una primera etapa se amplifique una región del gen 16S ARNr de rizobios y así disminuir el número de géneros microbianos a analizar en los suelos. Sin embargo, cuando se evaluó su especificidad, se encontró que algunas especies ajenas a la α subdivisión también producían una señal. De esta manera, queremos destacar la limitación experimental con la cual nos enfrentamos al basar el análisis en una región presente en todas las bacterias del suelo. Probablemente otra forma de encarar el estudio de las poblaciones fijadoras de nitrógeno sería analizar un gen específico de esas bacterias (por ejemplo genes de la nitrogenasa), o un gen común de la nodulación, en combinación con 16S ARNr.

La aplicación de esta metodología permitió obtener perfiles de *fingerprints* de las comunidades microbianas de 6 suelos del NOA. Estos perfiles resultaron complejos indicando la presencia de un número grande de especies con una abundancia equivalente.

El análisis de las secuencias de cuatro bandas mostró que ninguna se correspondió con especies conocidas de rizobios agrupándose junto a especies no cultivables y al género *Sphingomonas*. Este resultado nos sorprendió, como así también la similitud encontrada entre las 4 secuencias puesto que esperábamos una secuencia similar a rizobio. Sin embargo, dado que el número de bandas en cada perfil es grande se esperaba que el análisis de las secuencias de un número mayor de ellas nos revele especies de rizobios o de otros géneros que se encuentran en la muestra de suelo. También, este resultado nos motivó a dirigir nuestro esfuerzo futuro al diseño de *primers* con mayor especificidad para rizobios.

El método DTGGE fue aplicado por vez primera a la ecología microbiana en el año 1993 por Muyzer *et al.*, y a partir de entonces se han realizado mejoras y diversificado su uso.

El estudio de los rizobios del suelo con esta técnica comenzó con Vallaey *et al.* (1997) quienes analizaron un fragmento de 16S ARNr de 190 pb que no presenta mayores variaciones entre los rizobios. En este trabajo estudiamos otra región de 16S ADNr que resulta más variable entre los rizobios y a partir de la cual pudimos encontrar diferencias migracionales en los perfiles de DGGE. Además aplicamos al estudio de los rizobios del suelo un protocolo nuevo,

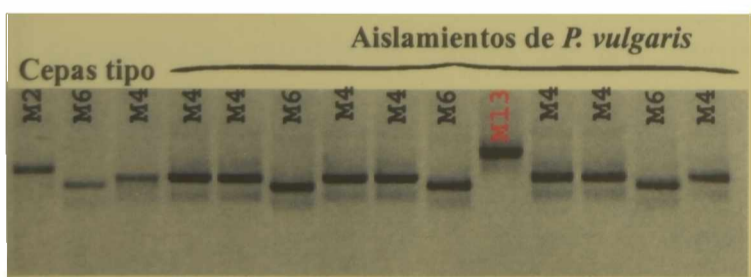
DTGGE, el cual combina las propiedades desnaturalizantes de los gradientes de urea y formamida junto con el gradiente de temperatura. DTGGE ha permitido lograr un alto grado de resolución y podría ser aplicado para revelar la diversidad de las principales poblaciones rizobianas de los suelos y esperamos que futuras modificaciones del protocolo que hemos introducido permitan la utilización de DTGGE como una herramienta más en la caracterización de los distintos ecosistemas rizobianos.

Bibliografía

- 1- Aguilar, O. M., D. H. Grasso, P. M. Riccillo, M. V. López, and E. Szafer. 1998. Rapid identification of bean rhizobial isolates type I by a *nifH*-PCR assay. *Soil Biol. Biochem.* **30**:1655-1661.
- 2- Cox, T. L., and L. I. Sly. 1997. Phylogenetic relationships and uncertain taxonomy of *Pedomicrobium* species. *Int J Syst Bacteriol.* **47**:377-380.
- 3- de Oliveira, V. M., H. L., C. Coutinho, B. W. S. Sobral, C. T. Guimarães, J. D. van Elsas, and G. P. Manfio. 1999. Discrimination of *Rhizobium tropici* and *R. leguminosarum* strains by PCR-specific amplification of 16S-23S rDNA spacer region fragments and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Letters in Applied Microbiology.* **28**:137-141.
- 4- Di Cello, F., M. Pepi, F. Baldi, and R. Fani. 1997. Molecular characterization of an n-alkane-degrading bacterial community and identification of a new species, *Acinetobacter venetianus*. *Res Microbiol.* **148**:237-249.
- 5- Dupuy, N., A. Willems, B. Pot, D. Dewettinck, L. vandenbruaene, G. Maestrojuan, B. Dreyfus, K. Kersters, M. D. Collins, and M. Gillis. 1994. Phenotypic and genotypic characterization of bradyrhizobia nodulating the leguminous tree *Acacia albida*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**:461-473.
- 6- Felske, A., A. D. L. Akkermans, and W. M. de Vos. 1998. Quantification of 16S rRNAs in complex bacterial communities by multiple competitive reverse transcription-PCR in temperature gradient gel electrophoresis fingerprints. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4581-4587.
- 7- Heuer, H., K. Hartung, G. Wieland, I. Kramer, and K. Smalla. 1999. Polynucleotide probes that target a hypervariable region of 16S rRNA genes to identify bacterial isolates corresponding to bands of community fingerprints. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1045-1049.
- 8- Heuer, H., M. Krsek, P. Baker, K. Smalla, and E. M. H. Wellington. 1997. analysis of Actinomycete communities by specific amplification of gene encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3233-3241.
- 9- McCoy, W. F., and B. H. Olson. 1985. Fluorometric determination of the DNA concentration in municipal drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**:811-817.
- 10- Mc Pherson, M. J., B. D. Hames, and G. R. Taylor. 1995. PCR 2. A practical approach. IRL Press at Oxford University Press.
- 11- Muyzer, G. 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current opinion in microbiology.* **2**:317-322.
- 12- Muyzer, G., and K. Smalla. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology *Antonie van Leeuwenhoek.* **73**:127-141.
- 13- Myers, R. M., S. G. Fischer, L. S. Lerman, and T. Maniatis. 1985. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nuc. Acids. Res.* **13**:3131-3145.
- 14- Myers, R. M., T Maniatis, and L. S. Lerman. 1987. Detection and localization of single base changes by denaturing gel electrophoresis. *Methods in Enzimology.* **155**:501-527
- 15- Rainey, E. 1996. 16S ribosomal DNA sequence analysis confirms the close relationship between the genera *Xanthobacter*, *Azorhizobium*, and *Aquabacter* and reveals a lack of phylogenetic coherence among *Xanthobacter* specie. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**: 607-610.
- 16- Rosado, A. S., G. F. Duarte, L. Seldin, and J. D. van Elsas. 1998. Genetic diversity of *nifH* gene sequences in *Paenibacillus azotofixans* strain and soil samples analysed by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2770-2779.

- 17- Sessitsch, A., A. Weilharter, M. H. Gerzabek, H. Kirchmann, and E. Kandeler. 2001. Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4215-4224.
- 18- Smalla, K., N. Cresswell, L. C. Mendoca-Hagler, A. Wolters, and J. D. Van Elsas. 1993. Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification. *J Appl Bacteriol.* 74:78-85.
- 19- Smit, E., P. Leeftang, B. Glandorf, J. D. van Elsas, and K. Wernars. 1999. analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2614-2621.
- 20- Stoltzfus, J. R., R. So., P. P. Malarvithi, J. K. Ladha, and F. de Bruijn. 1997. Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biological nitrogen fixation. *Plant and Soil.* 197:25-36.
- 21- Takeuchi, M., H. Sawada, H. Oyaizu, and A. Yokota. 1994. Phylogenetic evidence for *Sphingomonas* and *Rhizomonas* as nonphotosynthetic members of the alpha-4 subclass of the Proteobacteria. *Int J Syst Bacteriol* 44:308-314
- 22- Vallaeyts, T., E Topp, G. Muyzer, V. Macheret, G. Laguerre, A. Rigaud, and G. Soulas. 1997. Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. *FEMS Microbiology Ecology.* 24:279-285.
- 23- van Elsas, J. D., and K. Smalla. 1995. Extraction of microbial community from soils. *Molecular Microbial Ecology Manual.* Kluwer Academic Publishers. 1.3.3:1-11.
- 24- van Elsas, J. D., G. F. Duarte, A. S. Rosado, and K. Smalla. 1998. Microbiological and molecular biological methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the soil environment. *J Meth.* 32:133-154.
- 25- Wawer, C., and G. Muyzer. 1995. Genetic diversity of *Desulfovibrio* spp. in environmental samples analysed by denaturing gradient gel electrophoresis of [NiFe] hydrogenase gene fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2203-2210.
- 26- Young, J. P. W., H. L. Downer, and B. D. Eardly. 1991. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAi1 by Polymerase Chain Reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. *J. Bacteriol.* 173:2271-2277.
- 27- Zoetendal, E. G.; A. D. L. Akkermans, and W. DeVos. 1998. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3854-3859.

Capítulo 4



Capítulo 4

Caracterización de las poblaciones de rizobios del NOA asociadas a *Phaseolus vulgaris* L. var. *aborigineus* y *Phaseolus vulgaris* L. var. *vulgaris*

Introducción

Se acepta que *Phaseolus vulgaris* (poroto, frijol, common beans) es originario de las Américas con dos centros de domesticación, uno en Mesoamérica en los países de México, América Central y Colombia, y el otro en los Andes del Sur en los países de Bolivia, Perú y Argentina (Gepts, 1988, Kami *et al.*, 1995). El descubrimiento de América permitió que los exploradores europeos recolectaran y llevaran a Europa la variedad primitiva de poroto. En Europa tuvo lugar la selección de cultivares con propiedades mejoradas (Por ejemplo, mayor tamaño de grano) que significaron una mayor productividad. La posterior inmigración europea de comienzos del siglo XX trajo consigo las variedades de poroto que encontraron en el NOA asiento apropiado para su cultivo (Figura 1).

Todavía es posible encontrar en la actualidad ciertas poblaciones de poroto silvestre en zonas de selva montana en el NOA, que no han sido perturbadas por el hombre. Dado que la diversidad del rizobio es máxima en el centro de origen del hospedador y teniendo en cuenta que el NOA forma parte de la región andina de domesticación, se podría esperar que en el NOA resida una variabilidad rizobiana asociada a poroto (Lie *et al.* 1987, Piñero *et al.*, 1988).

El NOA es además, la región argentina del cultivo de poroto. En esta región no se ha incorporado la práctica de la inoculación. Una de las razones es la falta de resultados satisfactorios debidos a la competencia entre los rizobios usados como inoculante y la población microbiana presente en el suelo (Aguilar *et al.*, 2001). Es por ello que el estudio de la comunidad rizobiana nativa de los suelos del NOA podría ser de utilidad en programas de inoculación de poroto.

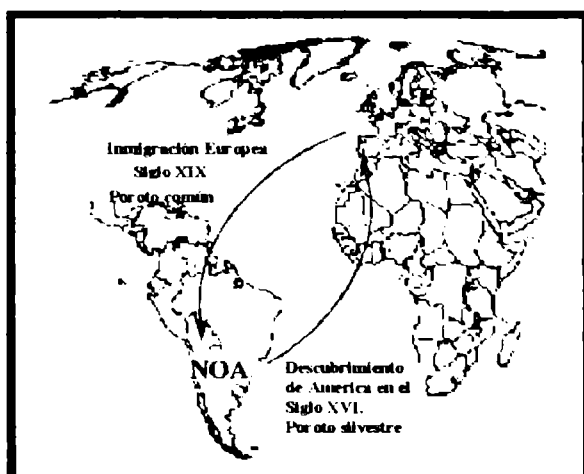


Figura 1: La domesticación del poroto común en el Noroeste Argentino (NOA) El poroto silvestre encontrado en América fue llevado a Europa por los descubridores españoles, donde se seleccionaron las mejores variedades agronómicas que retornaron al NOA con la inmigración del siglo XX. En la actualidad en el NOA se encuentran áreas vírgenes en donde crece el poroto silvestre y zonas de cosecha del poroto común.

Los rizobios que nodulan poroto fueron clasificados inicialmente dentro de la especie *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* por su especificidad de huésped que los diferenciaba de *R. leguminosarum* bv. *viceae* y *R. leguminosarum* bv. *trifolii* que nodulan *Vicia* spp., *Pisum* spp., y trébol respectivamente, y además por los diferentes perfiles plasmídicos de cada subespecie (Martínez-Romero *et al.*, 1985, 1988 y 1991, Segovia *et al.*, 1993, Amarger *et al.*, 1997). Posteriormente, se encontró por el análisis de perfiles proteicos, MLEE (*Multilocus Enzyme Electrophoresis*), análisis de ADN y las secuencias del gen 16S ARNr, que *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* resultó un grupo taxonómicamente heterogéneo (Laguerre *et al.*, 1993; van Berkum *et al.*, 1996; Segovia *et al.*, 1993; Hernández-Lucas *et al.*, 1995). Esto llevó a proponer la división de la especie *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* provenientes de México y América del Sur en dos grupos denominados Tipos I y II (Martínez-Romero *et al.*, 1988). Así, se propuso a la nueva especie *R. etli* dentro del Tipo I junto con la especie *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, caracterizándose por tener múltiples copias del gen *nifH* en su plásmido simbiótico y un rango de nodulación restringido a *P. vulgaris* (Martínez-Romero *et al.*, 1985, Segovia *et al.*, 1993). Por otro lado, a partir del análisis de los rizobios agrupados dentro de Tipo II se definió la especie *R. tropici* A y B, caracterizándose por tener una única copia del gen *nifH* y nodular poroto y otras leguminosas no emparentadas tales como *Leucaena* spp. Las subespecies A y B se distinguen de las especies de Tipo I por su grado de homología en la hibridación ADN-ADN, características fenotípicas y la presencia de un megaplásmido específico (Martínez-Romero *et al.*, 1991, Geniaux *et al.*, 1995). Más recientemente, la caracterización realizada en el laboratorio de Amarger en Dijón, de aislamientos de poroto de suelos europeos resultó en la definición de dos especies nuevas denominadas *Rhizobium gallicum* y *Rhizobium giardinii* (Amarger *et al.*, 1997). En resumen, se han descrito cinco especies de rizobios capaces de asociarse simbióticamente con *P. vulgaris*, que han sido aisladas de nódulos de poroto formados en ambientes naturales. Sin embargo, está demostrado que poroto es promiscuo y que otras especies también pueden nodular en condiciones de laboratorio.

En este capítulo describimos el resultado de la caracterización de los rizobios asociados simbióticamente a *P. vulgaris* var. *aborigineus* y *P. vulgaris* var. *vulgaris* aislados en el NOA.

Establecimiento de una colección de rizobios nodulantes de poroto

La colección de rizobios se formó con los aislamientos obtenidos a partir de nódulos cosechados en el NOA de las variedades silvestre y cultivadas de poroto entre los meses de enero y marzo durante los años 1996-2000, y también con los recuperados en el laboratorio a

partir de muestras de suelo de la región usando las mismas variedades de poroto como atrapantes de rizobios.

Obtuvimos 693 aislamientos, los cuales se listan en el Apéndice 2, que provienen de los 19 sitios del NOA que se muestran en la Tabla 1. Estos lugares representan diferentes latitudes y altitudes de las provincias de Salta y Jujuy conformando una amplia variedad de ecosistemas. Sin embargo, la mayoría de los aislamientos de poroto provienen de ecosistemas del tipo bosque lluvioso, excepto un muestreo realizado en la región desértica y árida de la Quebrada de Humahuaca (Trópico Capricornio). Algunos de los sitios fueron explorados en años sucesivos.

Lugar	Coordenadas	Altitud (m)
Campichuelo, Salta	23° 07'S - 64° 00'W	308
Embarcación, Salta	23° 16'S - 63° 59'W	770
Pichanal, Salta	23° 19'S - 64° 14'W	306
Trópico Capricornio, Jujuy	23° 27'S - 65° 21'W	2435
Valle Grande, Salta	23° 28'S - 64° 59'W	1580
Los Nogales, Salta	24° 07'S - 65° 29'W	1445
Castellanos, Salta	24° 42'S - 65° 28'W	1397
San Lorenzo, Salta	24° 45'S - 65° 27'W	1244
Santa Clara, Jujuy	24° 49'S - 65° 29'W	567
San Luis, Salta	24° 49'S - 65° 29'W	1230
Quebrada del Toro, Salta	24° 54'S - 65° 40'W	1580
Río Blanco, Salta	24° 55'S - 65° 39'W	1586
Rosario de Lerma, Salta	24° 56'S - 65° 36'W	1388
Cerrillos, Salta	24° 57'S - 65° 29'W	1327
Los Pulares, Salta	25° 05'S - 65° 35'W	1400
Los Laureles, Salta	25° 06'S - 65° 36'W	1480
Chorro Blanco, Salta	25° 09'S - 65° 37'W	1490
Peña Baya, Salta	25° 09'S - 65° 39'W	1590
Metán-Yatasto, Salta	25° 35'S - 65° 58'W	800

Tabla 1: Sitios de muestreo de plantas de poroto. Los sitios de recolección de muestras fueron ordenados de norte a sur.

El 23% de la colección está constituida por aislamientos recuperados de poroto silvestre y el resto son aislamientos de variedades comerciales de cultivos de poroto, con predominio (65%) de la variedad NAG12 (Figura 2). Se observó que las plantas de *P. vulgaris* var aborigineus presentan un número promedio de 10 nódulos por planta, lo cual es significativamente menor a lo encontrado en variedades comerciales encontrando hasta 100 nódulos por planta. El procedimiento microbiológico de aislamiento a partir de nódulos fue realizado en nuestro laboratorio en La Plata.

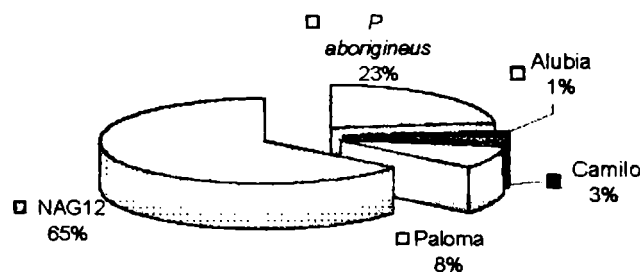


Figura 2: Distribución porcentual de los aislamientos de poroto según la variedad de poroto. En el gráfico se muestra el porcentaje de rizobios aislados a partir de poroto silvestre (*P. vulgaris* var *aborigineus*) y de las cuatro variedades comerciales: Poroto blanco, variedades Alubia y Paloma; poroto negro, variedades Camilo y Nag12.

El cultivo en medio YEM-rc (28 °C) demostró que todos los aislamientos son de crecimiento rápido y las colonias formadas luego de 3 días de incubación se caracterizaron por presentar mucosidad de color rosa claro u oscuro, excepto unas pocas que resultaron menos mucosas y de una coloración roja intensa.

Se confirmó el potencial de fijación de nitrógeno de cada aislamiento demostrando por PCR la presencia de una región conservada del gen *nifD* (Stoltzfus *et al.*, 1997).

Caracterización genómica de los aislamientos

1- Diversidad de la población revelada por perfiles de *fingerprints*

La caracterización de la colección mediante *fingerprints* de ADN se llevó a cabo en dos etapas. En la primera se analizaron conjuntamente los aislamientos de un mismo sitio y a partir de la cual se escogieron los representativos. En la segunda etapa, los ejemplares representativos fueron comparados entre sí. Si bien la variabilidad encontrada en cada sitio fue grande con índices bajos de similitud entre 40 y 60%, se detectaron muchos aislamientos con perfiles iguales. Dos casos excepcionales de muy escasa variabilidad lo fueron las muestras provenientes de Trópico de Capricornio (Recuperadas de la muestra T22) y de las proximidades de Rosario de Lerma (Muestras T44 y T56), dos sitios donde no encontramos poroto silvestre ni cultivos de poroto común (Figura 3A).

También a modo de ejemplo, se muestra en la Figura 3A la variabilidad encontrada en los perfiles de *fingerprints* ERIC de aislamientos de poroto de otros dos sitios del NOA (Río Blanco y Quebrada del Toro). En la Figura 3B se demuestra la alta diversidad observada en rizobios provenientes de los distintos sitios del NOA, encontrando que aproximadamente el 70% de la colección de rizobios presentaba un perfil de *fingerprint* diferente. El dendrograma que se muestra en la Figura 3C, resultante del análisis de los perfiles de la Figura 3B, indica un grado de similitud bajo no mayor del 20%.

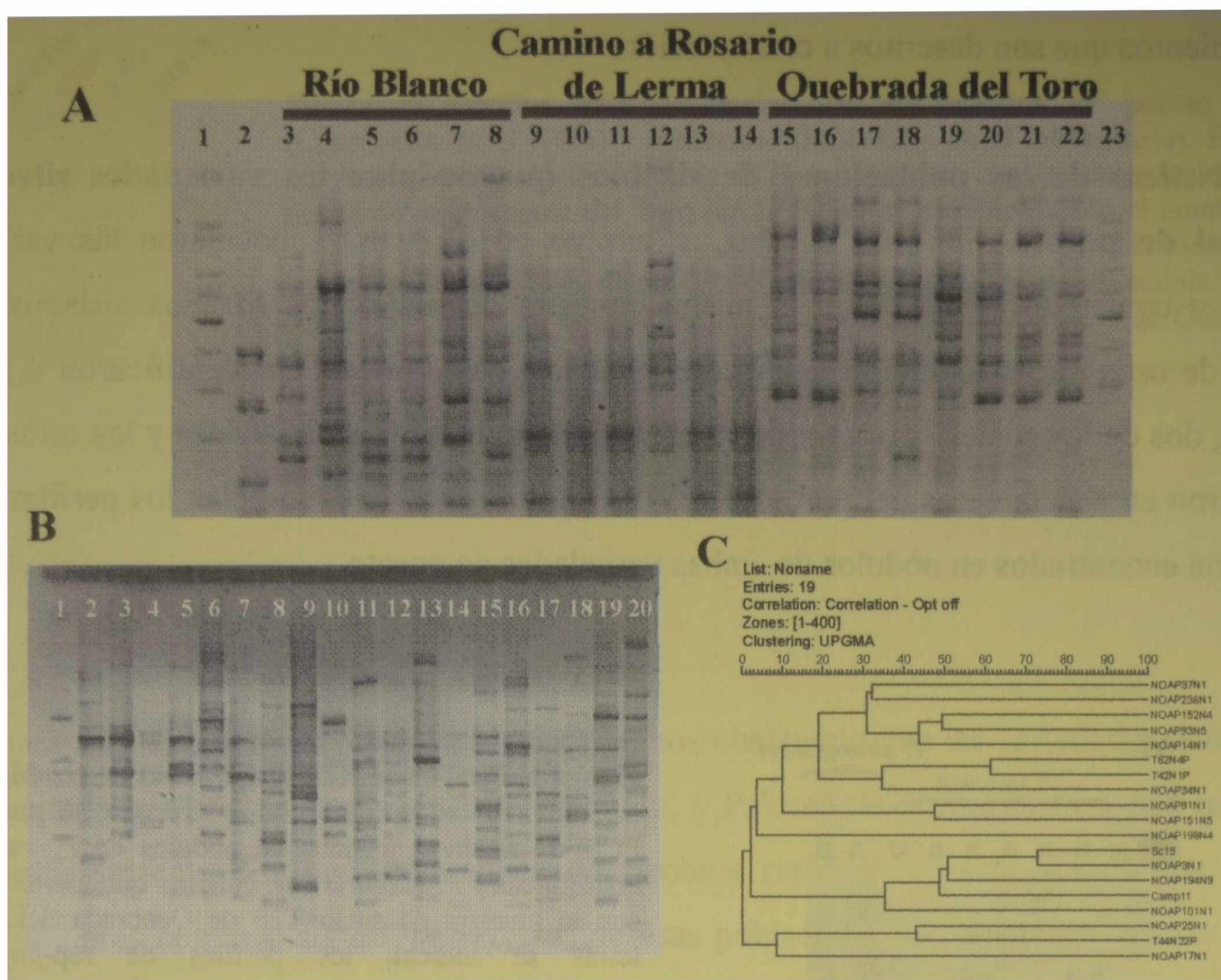


Figura 3: Comparación de los perfiles de ERIC-*fingerprints* de rizobios nodulantes de poroto aislados de sitios distintos del NOA. A- Calles: 1-Ladder 100 pb, 2-T62N2P, 3-T66N1P, 4-T66N2P, 5- T66N3P, 6-T66N4P, 7- T66N5P, 8- T66N6P, 9- T56N2P, 10- T56N3P, 11- T56N4P, 12- T56N6P, 13- T56N8P, 14-T56N10P, 15- T57N1P, 16-T57N2P, 17- T57N3P, 18- T57N4P, 19-T57N5P, 20-T57N6P, 21-T57N7P, 22-T57N8P, 23- Ladder 100 pb. **B-** Calles: 1-Ladder 100 pb, 2-Camp11 (Campichuelo), 3-Sc15 (Santa Clara), 4-NOAP101N1 (Quebrada del Toro), 5- NOAP3N1 (Pichanal), 6- NOAP91N1 (Quebrada de Escoipe), 7-NOAP194N9 (Pichanal), 8- NOAP34N1 (Cerrillos), 9- NOAP17N1 (Tilcara), 10- NOAP151N5 (Castellanos), 11- NOAP152N4 (Peña Baya), 12- NOAP93N5 (Quebrada del Toro), 13- NOAP198N4 (Metán), 14-T62N4P (Yatasto), 15- NOAP37N1 (Los Laureles), 16-T42N1P (Rosario de Lerma), 17- NOAP14N1 (Valle Grande), 18- NOAP236N1 (Río Blanco), 19-NOAP25N1 (Valle Grande) y 20-T44N22P (suelo T44). **C-** Dendrograma de similitud calculado con el programa Gelcompar a partir de los perfiles presentes en la foto mostrada en B.

El 70% de aislamientos con perfiles de *fingerprints* diferentes representó un número grande para abordar un análisis experimental individual, y es por ello que aplicamos un criterio que nos permitió reducir el tamaño de la población a caracterizar mediante un criterio de selección de aislamientos representativos. De esta manera para cada sitio se escogieron entre uno y dos aislamientos que representaron a una subpoblación agrupada con una similitud del 65 al 75%. Así, adoptamos un concepto de análisis poblacional basado en la selección de individuos representativos y el cual fue aplicado en el caso de aislamientos de otras leguminosas tal como aparece en otros capítulos de esta tesis.

El análisis de los perfiles de *fingerprints* permitió revelar otras características de la población de aislamientos que son descritos a continuación:

Características de las poblaciones de rizobios que nodulan las variedades silvestre y comercial de poroto. Se llevó a cabo un ensayo en el cual se inocularon las variedades silvestre y comercial NAG12 con la misma muestra de suelo. Los rizobios aislados de 20 nódulos de cada variedad fueron analizados mediante *fingerprints*. Se identificaron 4 perfiles distintos, dos de los cuales corresponden a aislamientos de las dos variedades y los otros dos se encontraron en aislamientos del poroto NAG12. En la Figura 4 se muestran los perfiles A y B que fueron encontrados en nódulos de ambas variedades de poroto.

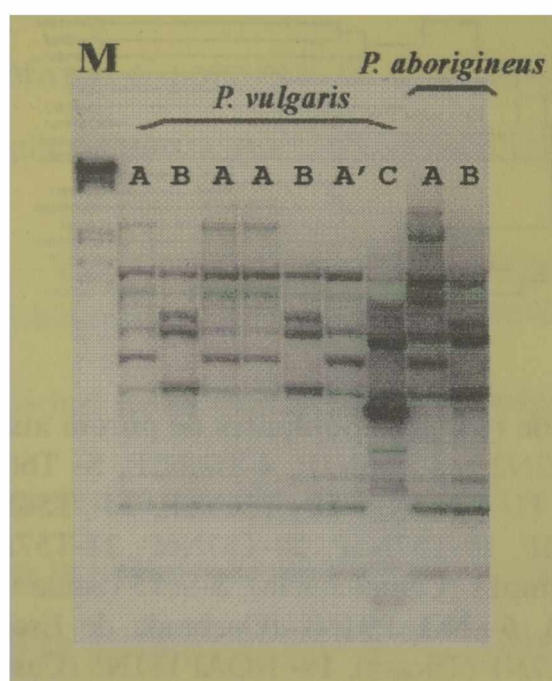


Figura 4: Perfiles de REP-*fingerprints* de rizobios aislados de las variedades comercial y silvestre de poroto. REP-PCR de rizobios aislados de nódulos de *P. vulgaris* var. *aborigineus* y *P. vulgaris* var. *vulgaris* que fueron inoculadas con la muestra de suelo T29 de Quebrada del Toro. Con letras se indican los perfiles de *rep-fingerprinting* encontrados. El marcador de peso molecular utilizado (M) fue el fago λ digerido con *EcoRI* y *HindIII*. De izquierda a derecha se sembraron los productos de los siguientes aislamientos: T29N4P, T29N5P, T29N6P, T29N7P, T29N8P, T29N9P, T29N10P, T29N2Pab y T29N3Pab.

En otro ensayo similar comparamos los perfiles de aislamientos de los nódulos de *P. vulgaris* var *aborigineus* de Quebrada del Toro y de nódulos obtenidos en el laboratorio por inoculación de NAG12 con una suspensión de suelo de Quebrada del Toro. El resultado mostrado en la Figura 5 demuestra que algunos de los genotipos aislados de nódulos de plantas silvestres cosechadas en la Quebrada del Toro también se recuperan en el laboratorio a partir de la muestra de suelo usando una variedad comercial

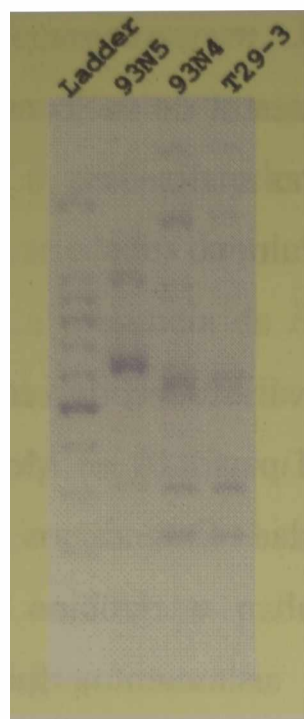


Figura 5: Perfiles REP-*fingerprints* de aislamientos de poroto silvestre (Cosechada en el NOA) y comercial (Inoculada en el laboratorio). Perfiles de rep-*fingerprinting* de aislamientos de *P. vulgaris* var. *aborigineus* extraídos de una planta de la Quebrada del Toro (en la figura se ha simplificado el nombre de los aislamientos NOAP93N5 y NOAP93N4). Junto con esos perfiles se muestra el correspondiente al aislamiento T29-3 que fue recuperado de un nódulo de poroto común inoculado en el laboratorio con una suspensión de suelo de Quebrada del Toro.

En nuestros viajes de recolección al NOA hemos observado que las variedades comerciales más usadas de poroto negro NAG12 y Camilo, y Paloma de poroto blanco, son noduladas espontáneamente por las poblaciones de rizobios residentes en el suelo. Los estudios preliminares con análisis de *fingerprints* de esas poblaciones demostraron la existencia de diversos genotipos, lo cual motivó la realización de un ensayo de inoculación con suspensiones de suelo de 5 sitios diferentes del NOA con el fin de identificar a esos genotipos y determinar si son capaces de asociarse con cada una de las variedades. Los aislamientos obtenidos de los nódulos cosechados 4 semanas después de la inoculación, fueron estudiados por *fingerprints*. En la Tabla 2 se resumen los resultados.

Muestra de suelo	Cultivares de poroto					
	Nódulos ^a	NAG12 Genotipo ^c	Nódulos ^a	Camilo Genotipos	Nódulos ^a	Paloma Genotipos
Peña Baya, T50	4	- ^b	10	1	6	- ^b
Cerrillos, T51	13	8 ^d y 9	7	5, 6, 7	6	2, 3, 4
Metán, T52	12	10 ^d , 11, 12, 13, 14 y 15.	9	16, 10, 17 ^d	15	10, 13
Embarcación, T53	13	18, 19, 20 ^d , 21, 22	4	- ^b	4	22 ^d , 23, 24
Pichanal, T54	20	27 ^d , 28, 29	17	27	32	25, 26, 27 ^d

Tabla 2: Perfiles de *fingerprints* de aislamientos de tres variedades comerciales de poroto inoculadas con cinco muestras de suelos. Los distintos genotipos obtenidos con cada muestra de suelo fueron identificados con un número.

^a Número de nódulos totales por planta

^b Los nódulos resultantes fueron muy pequeños y no se logró aislar los rizobios de su interior.

^c Genotipos de *fingerprints*.

^d Genotipo predominante numéricamente.

A continuación se sintetizan los resultados de este ensayo:

- 1- Todas las variedades formaron nódulos con los rizobios presentes en los 5 suelos.

- 2- Los nódulos formados con las muestras de suelo T50 y T53 resultaron muy pequeños impidiendo aislar el rizobio que los infectó.
- 3- Los perfiles de *fingerprints* de los rizobios recuperados de una muestra de suelo no se corresponden con los encontrados en cualquiera de las otras muestras analizadas.
- 4- La mayor diversidad fue encontrada con las variedades NAG12 y Paloma.

Algunos perfiles de *fingerprints* fueron recuperados con las tres variedades, tal como ocurre con el perfil 27 encontrado en las muestras de Pichanal, o el perfil 10 en Metán. Mientras que otros perfiles fueron encontrados sólo con una variedad. Entendimos que aquellos genotipos recuperados de distintos cultivares representaban a rizobios con capacidad de adaptabilidad para la nodulación de poroto. Estos aislamientos fueron seleccionados para ensayos tendientes a comprobar su eficiencia en la nodulación en el campo (Ver Capítulo 7).

En otro ensayo se usaron algunos aislamientos, cuyos perfiles de *fingerprints* no fueron encontrados en NAG12, y fueron inoculados en NAG12 observándose la formación de nódulos, lo cual demostró su capacidad para nodular NAG12.

Se puede concluir que el mismo genotipo de rizobio puede nodular distintas variedades de poroto por lo tanto en el proceso de domesticación de la leguminosa no se ha afectado en forma significativa la capacidad de asociación simbiótica de la leguminosa.

2. Análisis de la secuencia del gen 16S ARNr

Los ensayos que se describen a continuación fueron realizados sobre una subpoblación de 420 aislamientos que representa la diversidad de *fingerprints* observada.

A- Identificación de alelos de 16S ADNr.

Los aislamientos fueron examinados mediante ARDRA, usando las enzimas *HaeIII* y *MspI*. Se encontraron 4 perfiles que fueron asimilados a las especies *R. etli*, *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, *R. tropici* A y *R. tropici* B. En el curso de este trabajo se adoptará el resultado de ARDRA como indicativo de especie, sin embargo, se tiene en cuenta las limitaciones que tiene la adopción de ese criterio y que se trata de uno de los varios análisis necesarios para definir la especie.

A continuación se describen las características de esas cuatro poblaciones:

- 1- Los aislamientos de poroto silvestre fueron mayoritariamente de las especies *R. etli* y *R. leguminosarum*. Excepcionalmente, un aislamiento, NOAP25N1 de Los Toldos, fue asimilable a la especie *R. tropici* A.
- 2- La población de rizobios con el alelo de *R. etli* fue encontrada predominante en las variedades de poroto comerciales y silvestre.
- 3- La presencia de *R. etli* fue detectada en todos los lugares con la excepción de los sitios ubicados entre Rosario de Lerma y Campo Quijano, donde los aislamientos pertenecen a la especie *R. tropici* B (Muestras T44 y T56, tomadas en años sucesivos).
- 4- En unos pocos sitios se aisló *R. leguminosarum* además de *R. etli* (Tabla 3). En Castellanos, Los Nogales y Río Blanco se aislaron proporciones iguales de las especies *R. etli* y *R. leguminosarum*.

Lugar	Porcentaje de aislamientos con el alelo de <i>R. etli</i>
Campichuelo, Salta	100
Castellanos, Salta	50
Cerrillos, Salta	100
Chorro Blanco, Salta	88
Embarcación, Salta	100
Los Laureles, Salta	81
Los Nogales, Salta	50
Los Pulares, Salta	86
Metán-Yatasto, Salta	100
Peña Baya, Salta	100
Pichanal, Salta	100
Quebrada de Humahuaca, Jujuy	100
Quebrada del Toro, Salta	3
Río Blanco, Salta	50
Rosario de Lerma, Salta	100
Cercanías de Rosario de Lerma, Salta	0 (<i>R. tropici</i> B, 100%)
San Lorenzo, Salta	100
San Luis, Salta	100
Santa Clara, Jujuy	100
Valle Grande, Salta	75

Tabla 3: Frecuencias del alelo de 16S ADNr de *R. etli* en las poblaciones provenientes de distintos sitios del NOA. La relación entre el número total de alelos de *R. etli* y el número total de aislamientos analizados se expresa en forma porcentual. En caso de no aislar el alelo de *R. etli* se indica el alelo correspondiente y su porcentaje.

- 5- La Quebrada del Toro fue el único lugar en donde encontramos al alelo de *R. leguminosarum* en forma predominante, constituyendo más del 97% de los aislamientos. Este resultado se repitió en tres años sucesivos.

En la Figura 6 se muestra la distribución porcentual de los 4 alelos de 16S ADNr en la colección.



Figura 6: Distribución porcentual de alelos de 16S ADNr en la población de aislamientos de poroto. Porcentajes de ocurrencia de un determinado alelo dentro de la población de 420 aislamientos nodulantes de poroto.

El resultado del análisis de ARDRA fue confirmado mediante la secuenciación de un fragmento amplificado por PCR del gen 16S ARNr de aproximadamente 260 pb (Young *et al.*, 1991). Se analizaron las secuencias de los aislamientos NOAP8N1, T29N1Pab, NOAP45N1, NOAP66N1, NOAP8N3, NOAP14N1, NOAP90N5, NOAP37N1 y NOAP25N1. El aislamiento NOAP25N1, caracterizado como *R. tropici* A, dio lugar a un producto de PCR de aproximadamente 310 pb, característico de la especie *R. tropici* A, tal como se muestra en la Figura 7

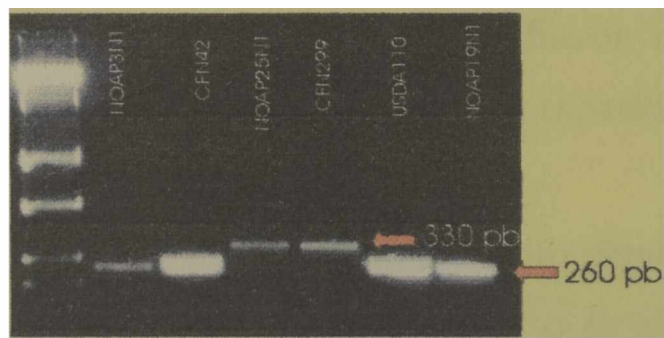


Figura 7: Producto de amplificación del gen 16S ARNr con los primers Y1/Y2. Se muestran los productos de PCR separados en un gel de agarosa. Se observa la diferencia de tamaño del producto de amplificación de NOAP25N1, el cual es igual al de *R. tropici* A (CFN299), respecto al fragmento de 260 pb de *R. etli*. Se incluyeron tres cepas de referencia USDA110 (*B. japonicum*), CFN42 (*R. etli*) y CFN299 (*R. tropici* A). El marcador es λ EcoRI/HindIII.

Las secuencias de los aislamientos NOAP66N1, NOAP8N1, T29N1Pab, NOAP8N3, caracterizados como *R. leguminosarum* y la cepa de referencia USDA2671 fueron idénticas, mientras que la correspondiente a NOAP45N1, también caracterizada como *R. leguminosarum*, difiere en una posición nucleotídica (Posición 321, señalada en la Figura 8 con color azul). Las secuencias de los aislamientos NOAP14N1 y NOAP90N5, y la de referencia *R. etli* CFN42 son iguales, mientras que la secuencia de NOAP37N1 difiere en la posición nucleotídica 201 (Véase Figura 8). Las secuencias de NOAP25N1 y *R. tropici* A, CFN299 son muy parecidas, con 5 posiciones nucleotídicas que resultan de inserciones o deleciones con respecto a la secuencia de la cepa de referencia. Estas diferencias están señaladas en el apilamiento mostrado en la Figura 8, donde también se muestra el dendrograma resultante, en el cual se observa que los aislamientos con un determinado alelo ribosomal y la cepa de referencia respectiva conforman un grupo. Los códigos de acceso a la base de datos de las secuencias de los aislamientos son: AF071113 a AF071120.

NOAP8N1	AGGCTTAA-CACATGCAAGTCGAGCGCC	-----GCAAG-----	-----GGAGCGCAG
T29N1Pab	AGGCTTAA-CACATGCAAGTCGAGCGCC	-----GCAAG-----	-----GGAGCGCAG
USDA2671	AGGCTTAA-CACATGCAAGTCGAGCGCC	-----GCAAG-----	-----GGAGCGCAG
NOAP45N1	AGGCTTAA-CACATGCAAGTCGAGCGCC	-----GCAAG-----	-----GGAGCGCAG
NOAP66N1	AGGCTTAA-CACATGCAAGTCGAGCGCC	-----GCAAG-----	-----GGAGCGCAG
NOAP8N3	AGGCTTAA-CACATGCAAGTCGAGCGCC	-----GCAAG-----	-----GGAGCGCAG
CFN42	AGGCTTAA-CACATGCAAGTCGAGCGCC	-----GCAAG-----	-----GGAGCGCAG
NOAP14N1	AGGCTTAA-CACATGCAAGTCGAGCGCC	-----GCAAG-----	-----GGAGCGCAG
NOAP90N5	AGGCTTAA-CACATGCAAGTCGAGCGCC	-----GCAAG-----	-----GGAGCGCAG
TAL182	AGGCTTAA-CACATGCAAGTCGAGCGCC	-----GCAAG-----	-----GGAGCGCAG
NOAP37N1	AGGCTTAA-CACATGCAAGTCGAGCGCC	-----GCAAG-----	-----GGAGCGCAG
CIAT899	AGGCTTAA-CACATGCAAGTCGAGCGCC	-----GCAAG-----	-----GGAGCGCAG
CFN299	AGGCTTAA-CACATGCAAGTCGAGCGCC	-----GCAAG-----	-----GGAGCGCAG
NOAP25N1	AGGCTTAA-CACATGCAAGTCGAGCGCC	-----GCAAG-----	-----GGAGCGCAG

NOAP8N1	CGGGTGAGTAACCGCTGGGAACTACCTTTGACTA-CGGAATAACGCAGGGAACTTTGTG	CTAATACCGTATGTGTCCTTCGGGAGAAAGATTTATCGGTCANGGATGAGCCCGCGTTGG
T29N1Pab	CGGGTGAGTAACCGCTGGGAACTACCTTTGACTA-CGGAATAACGCAGGGAACTTTGTG	CTAATACCGTATGTGTCCTTCGGGAGAAAGATTTATCGGTCANGGATGAGCCCGCGTTGG
USDA2671	CGGGTGAGTAACCGCTGGGAACTACCTTTGACTA-CGGAATAACGCAGGGAACTTTGTG	CTAATACCGTATGTGTCCTTCGGGAGAAAGATTTATCGGTCANGGATGAGCCCGCGTTGG
NOAP45N1	CGGGTGAGTAACCGCTGGGAACTACCTTTGACTA-CGGAATAACGCAGGGAACTTTGTG	CTAATACCGTATGTGTCCTTCGGGAGAAAGATTTATCGGTCANGGATGAGCCCGCGTTGG
NOAP66N1	CGGGTGAGTAACCGCTGGGAACTACCTTTGACTA-CGGAATAACGCAGGGAACTTTGTG	CTAATACCGTATGTGTCCTTCGGGAGAAAGATTTATCGGTCANGGATGAGCCCGCGTTGG
NOAP8N3	CGGGTGAGTAACCGCTGGGAACTACCTTTGACTA-CGGAATAACGCAGGGAACTTTGTG	CTAATACCGTATGTGTCCTTCGGGAGAAAGATTTATCGGTCANGGATGAGCCCGCGTTGG
CFN42	CGGGTGAGTAACCGCTGGGAACTACCTTTGACTA-CGGAATAACGCAGGGAACTTTGTG	CTAATACCGTATGTGTCCTTCGGGAGAAAGATTTATCGGTCANGGATGAGCCCGCGTTGG
NOAP14N1	CGGGTGAGTAACCGCTGGGAACTACCTTTGACTA-CGGAATAACGCAGGGAACTTTGTG	CTAATACCGTATGTGTCCTTCGGGAGAAAGATTTATCGGTCANGGATGAGCCCGCGTTGG
NOAP90N5	CGGGTGAGTAACCGCTGGGAACTACCTTTGACTA-CGGAATAACGCAGGGAACTTTGTG	CTAATACCGTATGTGTCCTTCGGGAGAAAGATTTATCGGTCANGGATGAGCCCGCGTTGG
TAL182	CGGGTGAGTAACCGCTGGGAACTACCTTTGACTA-CGGAATAACGCAGGGAACTTTGTG	CTAATACCGTATGTGTCCTTCGGGAGAAAGATTTATCGGTCANGGATGAGCCCGCGTTGG
NOAP37N1	CGGGTGAGTAACCGCTGGGAACTACCTTTGACTA-CGGAATAACGCAGGGAACTTTGTG	CTAATACCGTATGTGTCCTTCGGGAGAAAGATTTATCGGTCANGGATGAGCCCGCGTTGG
CIAT899	CGGGTGAGTAACCGCTGGGAACTACCTTTGACTA-CGGAATAACGCAGGGAACTTTGTG	CTAATACCGTATGTGTCCTTCGGGAGAAAGATTTATCGGTCANGGATGAGCCCGCGTTGG
CFN299	CGGGTGAGTAACCGCTGGGAACTACCTTTGACTA-CGGAATAACGCAGGGAACTTTGTG	CTAATACCGTATGTGTCCTTCGGGAGAAAGATTTATCGGTCANGGATGAGCCCGCGTTGG
NOAP25N1	CGGGTGAGTAACCGCTGGGAACTACCTTTGACTA-CGGAATAACGCAGGGAACTTTGTG	CTAATACCGTATGTGTCCTTCGGGAGAAAGATTTATCGGTCANGGATGAGCCCGCGTTGG

NOAP8N1	ATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCC	TACCAAGGCGACGATCCATAGCTGG-TCTGAGAG	GATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
T29N1Pab	ATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCC	TACCAAGGCGACGATCCATAGCTGG-TCTGAGAG	GATGATCAGCCACATTGGGACTGATACACGGCCCAA
USDA2671	ATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCC	TACCAAGGCGACGATCCATAGCTGG-TCTGAGAG	GATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
NOAP45N1	ATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCC	TACCAAGGCGACGATCCATAGCTGG-TCTGAGAG	GATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
NOAP66N1	ATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCC	TACCAAGGCGACGATCCATAGCTGG-TCTGAGAG	GATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
NOAP8N3	ATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCC	TACCAAGGCGACGATCCATAGCTGG-TCTGAGAG	GATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
CFN42	ATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCC	TACCAAGGCGACGATCCATAGCTGG-TCTGAGAG	GATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
NOAP14N1	ATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCC	TACCAAGGCGACGATCCATAGCTGG-TCTGAGAG	GATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
NOAP90N5	ATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCC	TACCAAGGCGACGATCCATAGCTGG-TCTGAGAG	GATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
TAL182	ATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCC	TACCAAGGCGACGATCCATAGCTGG-TCTGAGAG	GATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
NOAP37N1	ATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCC	TACCAAGGCGACGATCCATAGCTGG-TCTGAGAG	GATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
CIAT899	ATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCC	TACCAAGGCGACGATCCATAGCTGG-TCTGAGAG	GATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
CFN299	ATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCC	TACCAAGGCGACGATCCATAGCTGG-TCTGAGAG	GATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
NOAP25N1	ATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCC	TACCAAGGCGACGATCCATAGCTGG-TCTGAGAG	GATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA

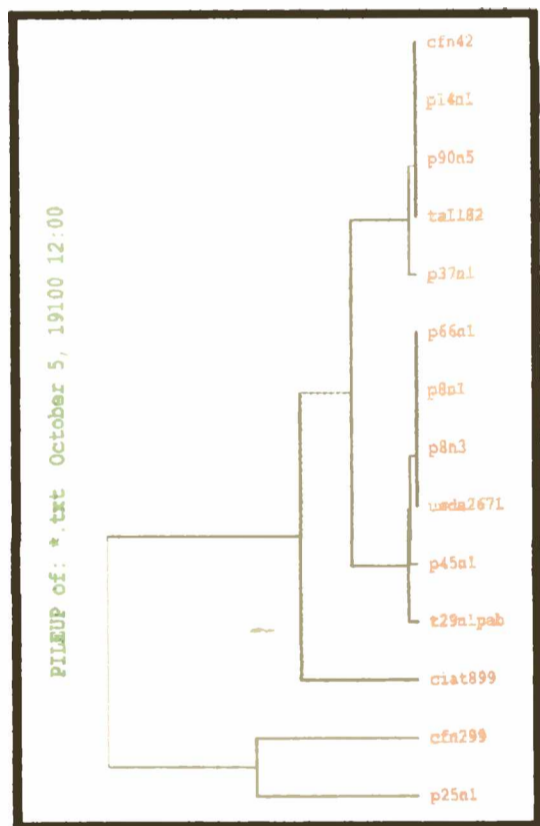


Figura 8: Alineamiento de las secuencias parciales de 16S ADNr de aislamientos de poroto. Se muestra el alineamiento de las secuencias de los aislamientos junto con las especies *R. tropici* B (CIAT899, ID= X67234), *R. tropici* A (CFN299, ID=X67233), *R. etli* (CFN42, ID=U28916) y *R. leguminosarum* (USDA2671, ID=U29388). El dendrograma de la izquierda muestra la relación de similitudes deducidas a partir de las secuencias alineadas. Se utilizó el programa Pileup (GCG) para obtener el apilamiento y el diagrama del dendrograma. Los aislamientos fueron nombrados en forma simplificada (por ejemplo P8N1 en vez de NOAP8N1)

Del análisis de la secuencia podemos concluir que la identidad encontrada es consistente con la resultante del análisis por RFLP de una región más extensa del gen 16S ARNr

B- Análisis DTGGE de la región 16S ADNr.

El producto de PCR obtenido con los primers dgefo/dgere, a partir de 33 aislamientos representantes de los alelos de 16S ADNr de *R. etli*, *R. leguminosarum* y *R. tropici* B fue analizado en geles desnaturalizantes. El aislamiento NOAP25N1 con el alelo de *R. tropici* A no

fue incluido en este análisis porque el tamaño del producto de PCR es sustancialmente diferente y su distinción es obvia en un gel de agarosa. El resultado de este experimento se muestra en la fotografía de la Figura 9 en donde se observan los perfiles junto a las cepas de referencia y en la Tabla 4 se muestran los perfiles de todos los aislamientos estudiados.

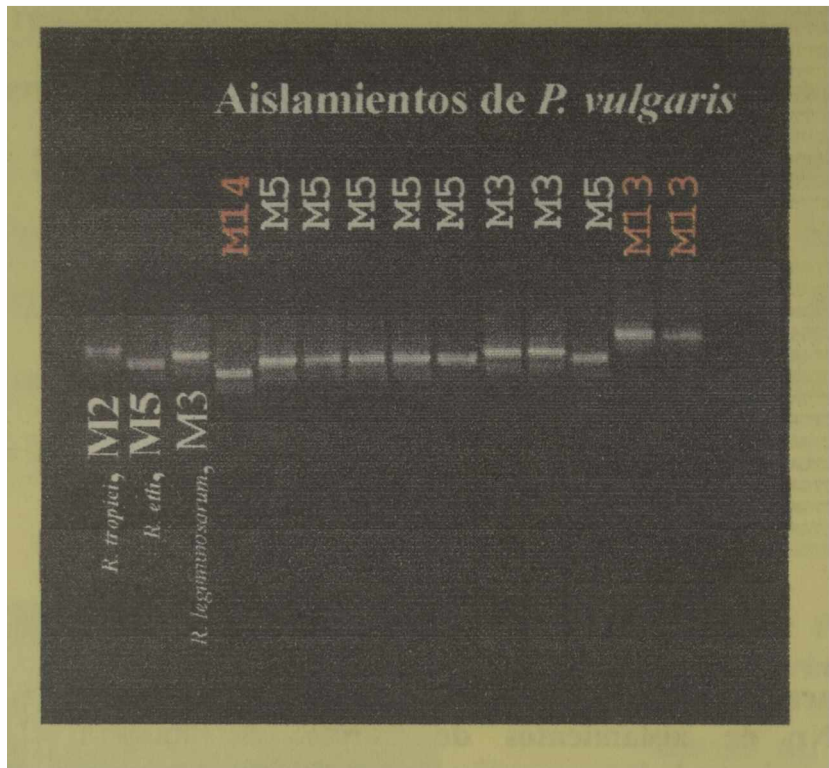
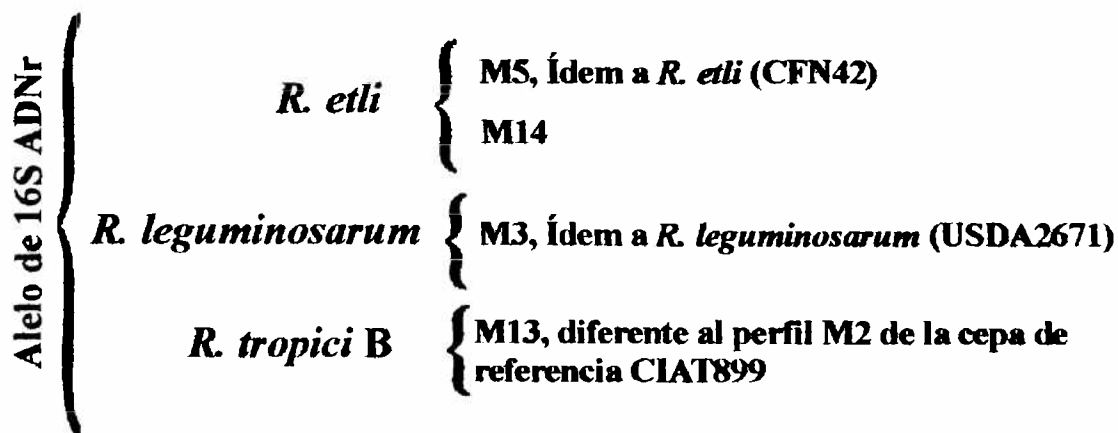


Figura 9: Perfiles de DTGGE de aislamientos de poroto. En la fotografía se muestran diferencias en la migración de los fragmentos de 16S ADNr amplificados con dgere/dgefo. Los 3 alelos de 16S ADNr encontrados en la población presentan sus propios perfiles migracionales: *R. etli*, M5 y M14; *R. leguminosarum*, M3 y *R. tropici* B, M13 (La cepa tipo, CIAT899 muestra el perfil M2). De izquierda a derecha se sembraron: CIAT899, CFN42, USDA2671, NOAP37N1, T66N1P, NOAP152N1, NOAP151N1, NOAP136N3, NOAP238N3, NOAP45N1, NOAP117N1, T29-15, T44N22P y T44N23P.

Se encontraron perfiles migracionales asociados a los alelos de 16S ADNr según el siguiente esquema:



Las secuencias de *R. etli* CFN42 y de NOAP37N1, con perfiles migracionales M5 y M14 respectivamente, difieren entre sí en la posición nucleotídica 201 (T⇒C) (Indicado en la Figura 8 con color rojo), lo cual confiere a M14 mayor estabilidad en un gel desnaturizante. Este perfil M14 fue observado también, en aislamientos de varias regiones tales como Campichuelo, Los Laureles, Pichanal, Chorro Blanco, Trópico de Capricornio y Metán. Además, fue aislado tanto de variedades comerciales como silvestre de poroto. Esta única diferencia no es

significativa para intentar definir una nueva especie y se trataría entonces, de una variante alélica de *R. etli*. Un resultado interesante del análisis fue la diferencia entre los aislamientos con el alelo de *R. tropici* B y la cepa de referencia CIAT899. Este resultado constituye otro ejemplo de la utilidad de aplicar DTGGE para revelar diversidad poblacional en una colección numerosa de aislamientos representativos.

	Alelo de 16S ADNr	Lugar de cosecha	Perfil de DTGGE
Cepa de referencia			
CIAT899	<i>R. tropici</i> B		M2
USDA2671	<i>R. leguminosarum</i>		M3
CFN42	<i>R. etli</i>		M5
Aislamiento			
Camp11	<i>R. etli</i>	Campichuelo	M14
NOAP37N1	<i>R. etli</i>	Los Laureles	M14*
NOAP3N1	<i>R. etli</i>	Pichanal	M14
NOAP46N1	<i>R. etli</i>	Chorro Blanco	M14
T22N1P	<i>R. etli</i>	Trópico Capricornio	M14
T23N1P	<i>R. etli</i>	Metán	M14
T62N7P	<i>R. etli</i>	Metán	M14
NOAP124N3	<i>R. etli</i>	Los Pulares	M5
NOAP125N1	<i>R. etli</i>	Los Pulares	M5
NOAP136N3	<i>R. etli</i>	Chorro Blanco	M5*
NOAP151N1	<i>R. etli</i>	Castellanos	M5*
NOAP152N1	<i>R. etli</i>	Peña Baya	M5*
NOAP17N1	<i>R. etli</i>	Tilcara	M5
NOAP17N2	<i>R. etli</i>	Tilcara	M5
NOAP238N3	<i>R. etli</i>	Chorro Blanco	M5*
NOAP41N1	<i>R. etli</i>	Los Laureles	M5
NOAP43N1	<i>R. etli</i>	Chorro Blanco	M5
NOAP67N1	<i>R. etli</i>	Los Nogales	M5
NOAP90N2	<i>R. etli</i>	Chorro Blanco	M5
NOAP90N5	<i>R. etli</i>	Chorro Blanco	M5
T29-15	<i>R. etli</i>	Quebrada del Toro	M5*
T42N5P	<i>R. etli</i>	Rosario de Lerma	M5
T66N1P	<i>R. etli</i>	Río Blanco	M5*
NOAP101N14	<i>R. leguminosarum</i>	Quebrada del Toro	M3
NOAP117N1	<i>R. leguminosarum</i>	Quebrada del Toro	M3*
NOAP125N3	<i>R. leguminosarum</i>	Río Blanco	M3
NOAP210N2	<i>R. leguminosarum</i>	Quebrada del Toro	M3
NOAP211N1	<i>R. leguminosarum</i>	Quebrada del Toro	M3
NOAP45N1	<i>R. leguminosarum</i>	Chorro Blanco	M3*
NOAP64N1	<i>R. leguminosarum</i>	Los Pulares	M3
NOAP93N5	<i>R. leguminosarum</i>	Quebrada del Toro	M3
T44N22P	<i>R. tropici</i> B	Rosario de Lerma	M13*
T44N23P	<i>R. tropici</i> B	Rosario de Lerma	M13*

Tabla 4: Perfiles de DTGGE de aislamientos de poroto. Se muestran los perfiles migracionales de 33 aislamientos representantes de diferentes localidades del NOA. Los perfiles M3 y M5 fueron introducidos en el Capítulo 3 y se corresponden con las especies *R. leguminosarum* y *R. etli* respectivamente. Con un asterisco se indica a los perfiles que se muestran en la Figura 9. A los efectos de mejorar la visualización de la tabla, los aislamientos agrupados en un mismo perfil fueron sombreados alternativamente.

3- Análisis de las poblaciones

A- Identificación de amplicones característicos de especies

El análisis de los perfiles de *fingerprints* ERIC de los aislamientos con el alelo de 16S ADN de *R. etli*, representantes de distintas regiones geográficas nos permitió identificar la presencia de dos amplicones propios como se muestra con flechas en la Figura 10A. Estos amplicones también están presentes en el perfil de *fingerprints* de la cepa tipo de *R. etli* CFN42. De la misma manera los perfiles de *fingerprints* REP de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* mostraron un amplicón (Señalado con una flecha roja) que no es compartido con aislamientos de la especie *R. etli* (Figura 10B). La presencia de los amplicones nos resultó sorprendente por la variabilidad observada en los perfiles de *fingerprints*, y si bien no fueron encontrados en el 100 % de la población representante de un alelo podrían ser considerados como un rasgo característicos o predominante de especie.

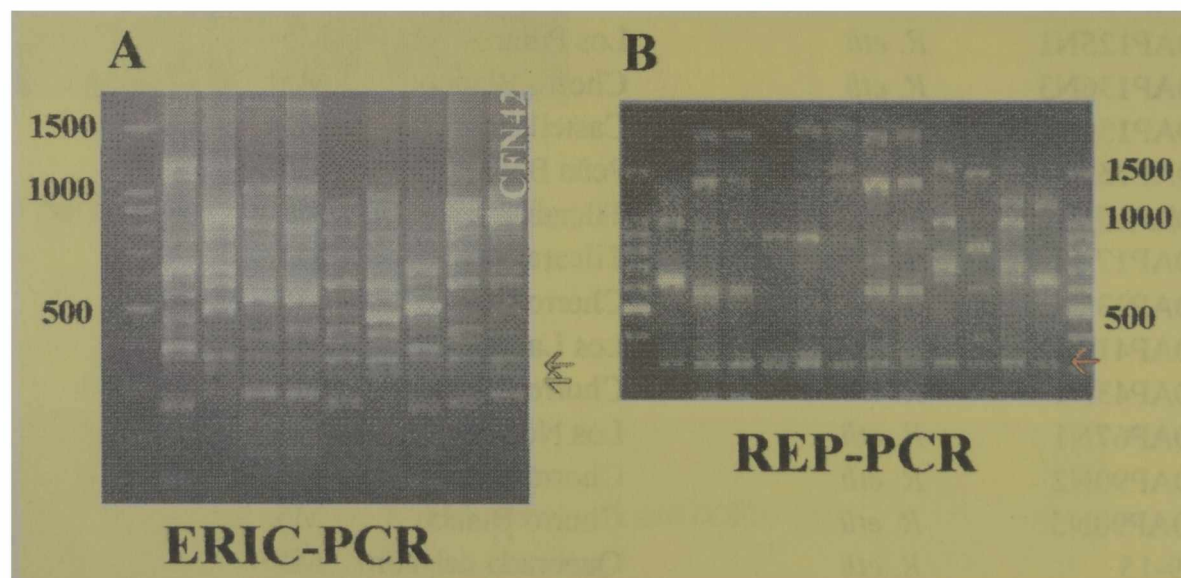


Figura 10: Amplicones propios de los alelos *R. etli* y *R. leguminosarum*. A- Amplicones (señalados con flechas) encontrados en los perfiles de *fingerprints* ERIC de aislamientos caracterizados con el alelo de 16S ADN de *R. etli*. Los mismos fueron aislados de Campichuelo, Metán, Cerrillos, Santa Clara, Embarcación y Pichanal; además se incluye la cepa de referencia CFN42. B- Con una flecha roja se señala el amplicón que se encontró en los perfiles de REP-PCR de aislamientos con el alelo de 16S ADN de *R. leguminosarum* extraídos en años sucesivos en Quebrada del Toro.

B- Limitaciones del análisis de *fingerprints* en la clasificación taxonómica de los rizobios nodulantes de poroto

La presencia de amplicones característicos de un alelo de 16S ADN llevó a suponer que los agrupamientos obtenidos a partir de los perfiles de *fingerprints* podrían ser usados con fines taxonómicos. Con el propósito de evaluar esta posibilidad se realizó un ensayo con una subpoblación de aislamientos que fueron caracterizados respectivamente por RFLP como *R.*

leguminosarum, *R. etli* y *R. tropici* B. Se obtuvo el perfil de *fingerprints* ERIC de cada aislamiento y se construyó un dendrograma de similitud el cual se muestra en la Figura 11. Los aislamientos de *R. leguminosarum* fueron agrupados en un *cluster*, mientras que los aislamientos con el alelo de *R. etli* se distribuyeron en 4 *clusters* alejados entre sí. La interpretación del dendrograma sin conocer con anterioridad el resultado de ARDRA no provee de información cierta sobre los alelos ribosomales presentes en la población de aislamientos examinados. Además, los dos aislamientos de *R. tropici* B fueron agrupados junto con *R. etli*. Esto nos permite concluir que la presencia de amplicones asociados a aislamientos con un alelo determinado de 16S ADN_r no es suficiente para encausar el agrupamiento de los perfiles de *fingerprints* según el resultado de RFLP.

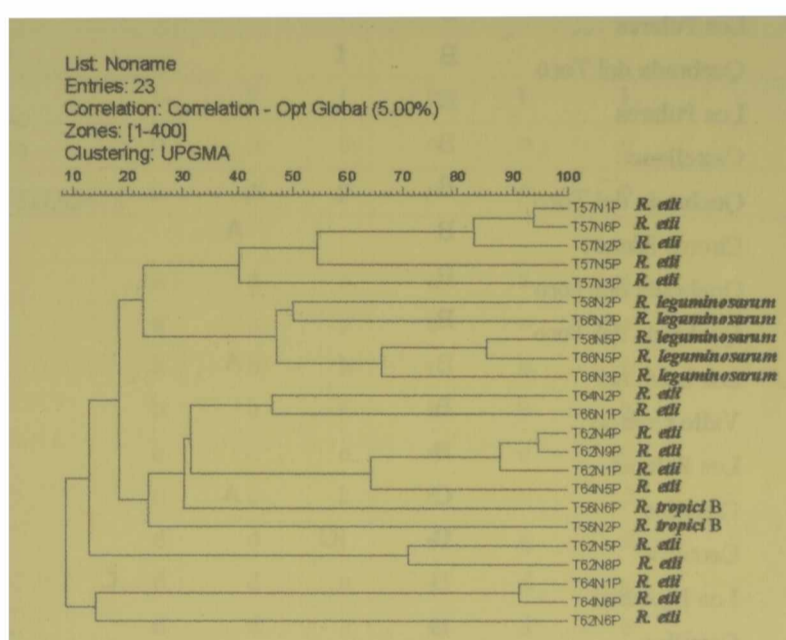


Figura 11: Comparación de los agrupamientos obtenidos a partir de los perfiles de *fingerprints* y ARDRA. Dendrograma de similitud calculado con una matriz UPGMA a partir de los perfiles de *fingerprints* de los aislamientos de poroto de los suelos Metán (T62), Rosario de Lerma (T57), camino a Rosario de Lerma (T56), Río Blanco (T66) y San Luis (T64).

4- Análisis tipo RFLP de la región intergénica 16S-23S ADN_r

Se estudió por RFLP el producto de PCR correspondiente a la región intergénica 16S-23S ARN_r de 37 y 26 aislamientos representantes de los alelos *R. etli* y *R. leguminosarum*, respectivamente. El rango de tamaño del producto fue entre 1300 y 1450 pb. En general, consistió en un único fragmento, sin embargo algunos aislamientos presentaron dos o tres productos de amplificación con diferentes grados de intensidad, lo cual podría sugerir la existencia de diferentes copias del operón. En todos los casos el producto de PCR fue incubado con las enzimas de restricción *Hae*III (En el caso de *R. etli*) y *A*luI, *A*vaI, *D*deI, *H*aeIII, *M*spI y *T*aqI (En el caso de *R. leguminosarum*), dando lugar a una diversidad de perfiles que se ilustran en las Tablas 5 y 6 y en la Figura 12. También los productos de PCR de algunos aislamientos de

R. etli fueron incubados con las enzimas *MspI*, *Hinfi*, *CfoI* y *RsaI* como se muestra en la Tabla 5.

Cepas de referencia	Alelo de 16S ADN _r	Perfiles de restricción con las enzimas					Perfil de IGS
		<i>HaeIII</i>	<i>MspI</i>	<i>Hinfi</i>	<i>CfoI</i>	<i>RsaI</i>	
CFN42	<i>R. etli</i>	E	J	C	G	C	1
CIAT899	<i>R. tropici</i> B	M	K	D	H	D	2
USDA2671	<i>R. leguminosarum</i>	N	L	E	I	E	3
Aislamiento	Lugar						
NOAP194N2	Pichanal	A	B		A		4
Sc15	Santa Clara	A	B	B		A	4
NOAP136N4	Chorro Blanco	A					4
NOAP194N18	Pichanal	A					4
NOAP136N3	Chorro Blanco	A			A		4
NOAP138N2	Chorro Blanco	A					4
NOAP126N1	Los Pulares	B	I		B		5
NOAP93N8	Quebrada del Toro	B	I				5
NOAP124N3	Los Pulares	B					5
NOAP151N1	Castellanos	B					5
NOAP55N1	Quebrada del Toro	B				A	5
NOAP90N2	Chorro Blanco	B		A		A	5
T45N24P	Quebrada del Toro	B					5
T49N1P	Quebrada del Toro	B					5
NOAP40N1	Los Laureles	B		A			5
NOAP8N2	Valle Grande	B					5
NOAP124N4	Los Pulares	B					5
NOAP122N1	Cerrillos	C		A			6
NOAP186N1	Cerrillos	D	G			A	7
NOAP37N1	Los Laureles	D			C		7
NOAP188N6	Cerrillos	D					7
		F			D		8
T29-15	Quebrada del Toro						
NOAP194N4	Pichanal	G				A	9
NOAP3N1	Pichanal	G	G				9
T27N1Pab	Santa Clara	G	G				9
NOAP194N13	Pichanal	G					9
NOAP194N8	Pichanal	G					9
NOAP136N1	Cerca de Chorro Blanco	G		A	E		9
T22N1P	Trópico Capricornio	H	E	A			10
Camp11	Campichuelo	I	D	A	F		11
NOAP34N1	Cerrillos	I	D				11
T24N1Pab	Cerrillos	J	D	A			12
NOAP184N1	Cerrillos	K		A			13
NOAP188N1	Cerrillos	K	D			B	13
NOAP187N1	Cerrillos	K					13
NOAP152N1	Peña Baya	L					14
NOAP152N2	Peña Baya	L					14

Tabla 5: Análisis de RFLP de la IGS de aislamientos con el alelo ribosomal de *R. etli*. Los aislamientos representan diversas regiones del NOA. Los perfiles obtenidos con las endonucleasas *HaeIII*, *MspI*, *Hinfi*, *CfoI* y *RsaI* fueron identificados con letras, mientras que el perfil general fue identificado con números

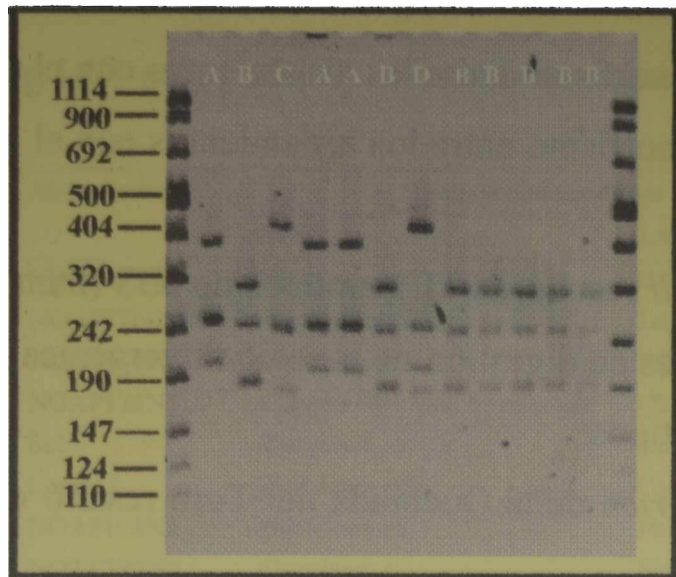


Figura 12: Análisis de RFLP de la IGS de aislamientos con el alelo de *R. etli*. Se muestra el análisis con la enzima *HaeIII* de 12 aislamientos provenientes de diferentes sitios del NOA. Las letras distinguen los distintos perfiles y se corresponden con las presentes en la Tabla 5

Alelo de 16S ADNr de <i>R. leguminosarum</i>							
	<i>HaeIII</i>	<i>MspI</i>	<i>TaqI</i>	<i>DdeI</i>	<i>AluI</i>	<i>AvaI</i>	IGS-tipo
Cepas de referencia							
<i>R. etli</i> , CFN42	l	l	l	l	l	l	17
<i>R. tropici</i> B, CIAT899	o	o	o	o	o	o	18
<i>R. leguminosarum</i> , USDA2671	p	p	p	p	p	p	19
Aislamiento							
NOAP93N3	a	a	a	a	a	a	1
NOAP93N5	a	a	a	a	a	a	1
NOAP93N4	b	b	b	b	b	b	2
T29-3	b	b	c	b	b	b	3
NOAP93N1	c	c	d	c	c	c	4
NOAP93N9	c	c	k	c	l	d	5
NOAP93N2	d	d	j	d	g	d	6
NOAP93N6	d	d	e	d	d	e	7
T29-4	d	d	e	d	d	e	7
NOAP93N7	d	d	e	d	d	e	7
T41N5P	d	e	j	d	g	e	7
T41N1P	d	g	h	g	h	g	8
T41N7P	g	e	f	e	f	f	9
T41N10P	d	g	h	g	h	g	8
NOAP101N1	e	e	f	e	f	f	10
NOAP101N14	e	e	f	e	f	f	10
NOAP118N1	e	e	f	e	f	f	10
T41N2P	e	e	f	e	f	f	10
NOAP117N1	f	f	g	f	e	h	11
T43N1P	f	f	g	f	e	h	11
T43N2P	f	f	g	f	e	h	11
NOAP93N11	m	h	g	f	e	i	12
T29-5	h	m	g	f	e	h	13
NOAP93N10	i	i	l	i	nd	j	14
T29-8	k	k	m	k	j	l	15
NOAP121N4	n	f	l	h	nd	i	16

Tabla 6: Análisis de RFLP de la IGS de aislamientos con el alelo ribosomal de *R. leguminosarum*. Los aislamientos analizados provienen de Quebrada del Toro. Los perfiles con cada enzima fueron identificados con letras mientras que el perfil general fue identificado con números.

nd, no determinado

A continuación se resumen los resultados de este análisis:

- ✓ La enzima *HaeIII* reveló el mayor grado de polimorfismo entre los aislamientos con el alelo de *R. etli*, mientras que *TaqI* reveló mayor polimorfismo entre los aislamientos con el alelo de *R. leguminosarum* (Tablas 5 y 6).
- ✓ El análisis de 37 aislamientos con alelo de *R. etli* resultó en 11 genotipos de IGS (llamados IGS-tipos). En la Figura 12 se muestra los perfiles de digestión de la región intergénica y en la Tabla 5 la distribución de los 11 perfiles IGS-tipos.
- ✓ El análisis de 26 aislamientos de *R. leguminosarum* de la Quebrada del Toro resultó en 16 IGS-tipos (Tabla 6).
- ✓ Todos los aislamientos caracterizados como *R. tropici* B presentaron el mismo IGS-tipo (Datos mostrados en Capítulo 6, Tabla 7).
- ✓ No hemos encontrado IGS-tipos asociados a un único sitio, así como tampoco perfiles comunes a más de un alelo de 16S ADNr.

Mediante el análisis de RFLP de la región intergénica 16S-23S ADNr hemos demostrado que las poblaciones con alelos de 16S ADNr *R. etli* y *R. leguminosarum* tienen una variación intraespecífica que además es propia de cada alelo. Un resultado interesante que se extrae de este estudio es la gran diversidad encontrada en los aislamientos *R. leguminosarum* de un solo sitio en la Quebrada del Toro, puesto que resultó en perfiles más diversos que los encontrados en aislamientos de *R. etli* recolectados en distintas regiones.

5-Análisis de variabilidad de secuencias simbióticas.

A- Variabilidad en el gen *nodC*.

El análisis de 75 aislamientos representativos de cada especie se realizó sobre un fragmento de amplificación de 930 pb del gen *nodC*. Los aislamientos fueron seleccionados teniendo en cuenta la diversidad de perfiles de ERIC- y REP- *fingerprints*, y la representación de los distintos sitios muestreados. Los aislamientos con el alelo ribosomal de *R. tropici* B no fueron analizados ya que no se logró amplificar el gen *nodC*.

Usando las enzimas *HinfI*, *MspI*, *NdeII*, *HaeIII*, *CfoI* y *RsaI*, se encontraron 4 genotipos diferentes denominados A, B, C y D (Tabla 7). El uso de la enzima *HinfI* resultó suficiente para distinguir los cuatro alelos de *nodC*. Los perfiles A (10 aislamientos) y D (36 aislamientos) fueron encontrados en aislamientos de las especies *R. etli* y *R. leguminosarum*. La cepa de referencia *R. etli* CFN42, mostró el perfil A. El perfil B (24 aislamientos) fue encontrado sólo

en los aislamientos de *R. leguminosarum*. El perfil C (5 aislamientos) fue similar al de la cepa Viking I (*R. etli*) y sólo se encontró en aislamientos con el alelo de 16S ADNr de *R. etli*.

Aislamiento	Características de los aislamientos		nodC-tipo
	RFLP	Lugar de aislamiento	
NOAP34N1	<i>Rhizobium etli</i>	Cerrillos	A
NOAP37N1	<i>Rhizobium etli</i>	Los Laureles	A
NOAP136N3	<i>Rhizobium etli</i>	Próximo a de Chorro Blanco	A
NOAP138N1	<i>R. leguminosarum bv phaseoli</i>	Chorro Blanco	A
Sc15	<i>Rhizobium etli</i>	Santa Clara	A
Camp11	<i>Rhizobium etli</i>	Campichuelo	A
NOAP194N2	<i>Rhizobium etli</i>	Pichanal	A
NOAP194N4	<i>Rhizobium etli</i>	Pichanal	A
T42N1P	<i>Rhizobium etli</i>	Rosario de Lerma	A
T25N1Pab	<i>Rhizobium etli</i>	Pichanal	A
NOAP8N1	<i>R. leguminosarum bv phaseoli</i>	Valle Grande	B
NOAP93N3	<i>R. leguminosarum bv phaseoli</i>	Quebrada del Toro	B
NOAP93N9	<i>R. leguminosarum bv phaseoli</i>	Quebrada del Toro	B
NOAP93N10	<i>R. leguminosarum bv phaseoli</i>	Quebrada del Toro	B
NOAP93N11	<i>R. leguminosarum bv phaseoli</i>	Quebrada del Toro	B
NOAP101N1	<i>R. leguminosarum bv phaseoli</i>	Quebrada del Toro	B
NOAP117N1	<i>R. leguminosarum bv phaseoli</i>	Quebrada del Toro	B
NOAP118N1	<i>R. leguminosarum bv phaseoli</i>	Quebrada del Toro	B
NOAP144N1	<i>R. leguminosarum bv phaseoli</i>	Quebrada del Toro	B
NOAP144N3	<i>R. leguminosarum bv phaseoli</i>	Quebrada del Toro	B
NOAP145N1	<i>R. leguminosarum bv phaseoli</i>	Quebrada del Toro	B
NOAP146N1	<i>R. leguminosarum bv phaseoli</i>	Quebrada del Toro	B
NOAP151N5	<i>R. leguminosarum bv phaseoli</i>	Castellanos	B
NOAP151N7	<i>R. leguminosarum bv phaseoli</i>	Castellanos	B
NOAP161N2	<i>R. leguminosarum bv phaseoli</i>	Quebrada del Toro	B
NOAP161N4	<i>R. leguminosarum bv phaseoli</i>	Quebrada del Toro	B
NOAP164N1	<i>R. leguminosarum bv phaseoli</i>	Quebrada del Toro	B
NOAP168N1	<i>R. leguminosarum bv phaseoli</i>	Quebrada del Toro	B
T29N10P	<i>R. leguminosarum bv phaseoli</i>	Quebrada del Toro	B
T29-4	<i>R. leguminosarum bv phaseoli</i>	Quebrada del Toro	B
T29-5	<i>R. leguminosarum bv phaseoli</i>	Quebrada del Toro	B
T41N7P	<i>R. leguminosarum bv phaseoli</i>	Quebrada del Toro	B
T41N1P	<i>R. leguminosarum bv phaseoli</i>	Quebrada del Toro	B
T43N31P	<i>R. leguminosarum bv phaseoli</i>	Quebrada del Toro	B
NOAP3N1	<i>R. etli</i>	Pichanal	C
NOAP184N1	<i>Rhizobium etli</i>	Cerrillos	C
T27N1Pab	<i>Rhizobium etli</i>	Santa Clara	C
NOAP194N8	<i>Rhizobium etli</i>	Pichanal	C
NOAP194N18	<i>Rhizobium etli</i>	Pichanal	C
T22N1P	<i>Rhizobium etli</i>	Trópico Capricornio	D
NOAP8N3	<i>R. leguminosarum bv phaseoli</i>	Valle Grande	D
NOAP40N1	<i>Rhizobium etli</i>	Los Laureles	D
NOAP45N1	<i>R. leguminosarum bv phaseoli</i>	Chorro Blanco	D
NOAP55N1	<i>Rhizobium etli</i>	Quebrada del Toro	D
NOAP90N2	<i>Rhizobium etli</i>	Chorro Blanco	D
NOAP93N2	<i>R. leguminosarum bv phaseoli</i>	Quebrada del Toro	D
NOAP93N4	<i>R. leguminosarum bv phaseoli</i>	Quebrada del Toro	D
NOAP93N8	<i>Rhizobium etli</i>	Quebrada del Toro	D
NOAP121N4	<i>R. leguminosarum bv phaseoli</i>	Quebrada del Toro	D
NOAP122N1	<i>Rhizobium etli</i>	Cerrillos	D
NOAP124N1	<i>Rhizobium etli</i>	Los Pulares	D

NOAP124N3	<i>Rhizobium etli</i>	Los Pulares	D
NOAP124N4	<i>Rhizobium etli</i>	Los Pulares	D
NOAP125N1	<i>Rhizobium etli</i>	Los Pulares	D
NOAP125N3	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	Los Pulares	D
NOAP136N1	<i>Rhizobium etli</i>	Chorro Blanco	D
NOAP136N4	<i>Rhizobium etli</i>	Chorro Blanco	D
NOAP138N2	<i>Rhizobium etli</i>	Chorro Blanco	D
NOAP149N1	<i>Rhizobium etli</i>	Castellanos	D
NOAP151N1	<i>Rhizobium etli</i>	Castellanos	D
NOAP152N1	<i>Rhizobium etli</i>	Peña Baya	D
NOAP152N2	<i>Rhizobium etli</i>	Peña Baya	D
NOAP186N1	<i>Rhizobium etli</i>	Cerrillos	D
NOAP187N1	<i>Rhizobium etli</i>	Cerrillos	D
NOAP188N1	<i>Rhizobium etli</i>	Cerrillos	D
NOAP188N6	<i>Rhizobium etli</i>	Cerrillos	D
T29-15	<i>Rhizobium etli</i>	Quebrada del Toro	D
T41N5P	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	Quebrada del Toro	D
T45N24P	<i>Rhizobium etli</i>	Quebrada del Toro	D
T45N26P	<i>Rhizobium etli</i>	Quebrada del Toro	D
T49N1P	<i>Rhizobium etli</i>	Quebrada del Toro	D
NOAP194N15	<i>Rhizobium etli</i>	Pichanal	D
NOAP126N1	<i>Rhizobium etli</i>	Los Pulares	D
T24N1Pab	<i>Rhizobium etli</i>	Cerrillos	D
NOAP194N13	<i>Rhizobium etli</i>	Pichanal	D

Tabla 7: Variantes alélicas del gen *nodC* en la colección de aislamientos de poroto del NOA. Se indica el alelo ribosomal 16S ADN_r (Según ARDRA), el lugar de procedencia y el alelo del gen *nodC*. Para facilitar la ubicación de cada perfil de *nodC* se sombrearon alternativamente las casillas que contenían a un perfil determinado.

En la Figura 13 se muestran los 4 perfiles obtenidos con la enzima *Hin*fI y el dendrograma resultante de la combinación de los patrones encontrados con las 6 endonucleasas utilizadas.

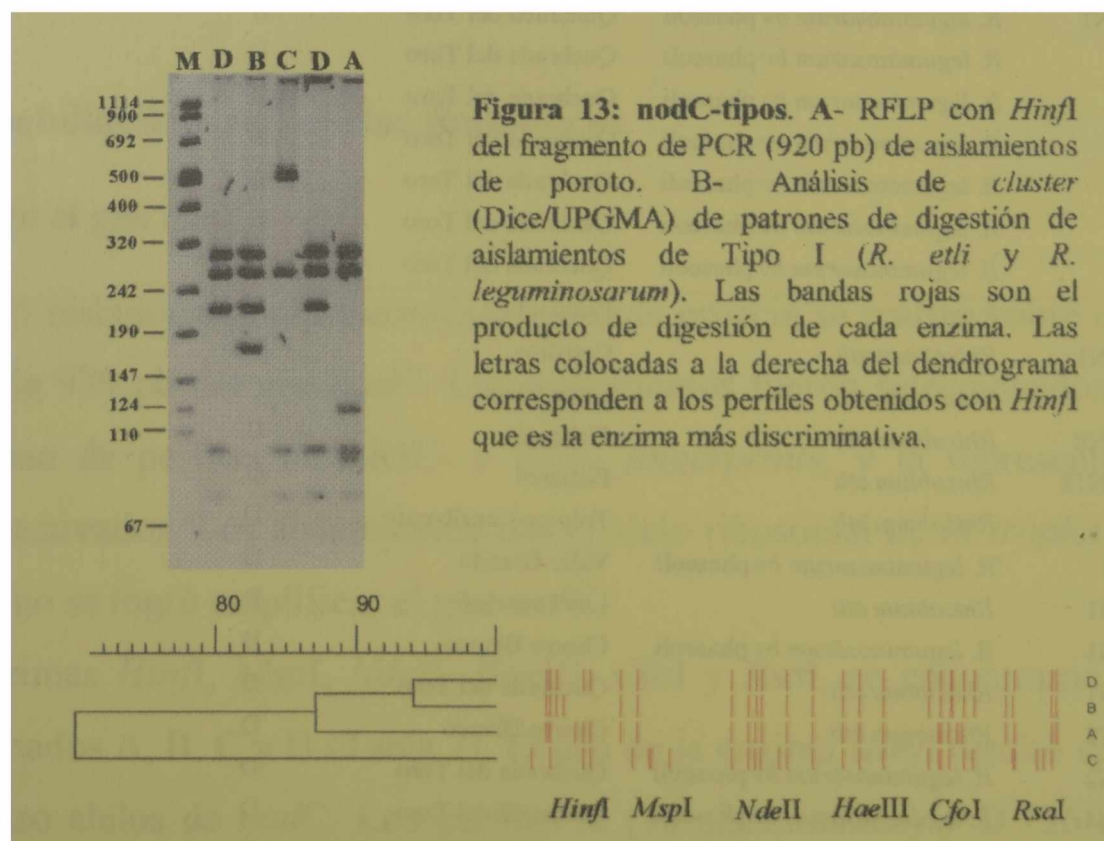


Figura 13: *nodC*-tipos. A- RFLP con *Hin*fI del fragmento de PCR (920 pb) de aislamientos de poroto. **B-** Análisis de *cluster* (Dice/UPGMA) de patrones de digestión de aislamientos de Tipo I (*R. etli* y *R. leguminosarum*). Las bandas rojas son el producto de digestión de cada enzima. Las letras colocadas a la derecha del dendrograma corresponden a los perfiles obtenidos con *Hin*fI que es la enzima más discriminativa.

<i>R. giardinii</i>	CAGTGTGACGGGGCTCGCACAGCTTGC-ATTGACGGGCACCGTGCCTTGGTTGGCATCCCTGATGATCGTGGGATGACGATGATCCA-CTGC
NOAP3N1	CAGTGTGACGGGGCTCGCACAGCTTGCATTGACGGGCACCGTGCCTTGGTTGGCATCCCTGATGATCGTGGGATGACGATGATCCACCTGC
<i>R. leguminosarum</i>	CAGTGTGACGGGGCTCGCACAGCTTGCATTGACGGGCACCGTGCCTTGGTTGGCATCCCTGATGATCGTGGGATGACGATGATCCACCTGC
<i>R. etli</i> , viking	CAGTGTGACGGGGCTCGCACAGCTTGCATTGACGGGCACCGTGCCTTGGTTGGCAGCCCTGATGATCGTGGGATGACGATGATCCACCTGC
<i>R. gallicum</i>	CGGTGTGACGGGGCTCGCACAGCTTGCATTGACGGGCACCGTGCCTTGGTTGGCAGCCCTGATGATCGTGGGATGACGATGATCCACCTGC
<i>R. etli</i> CFN42	CAGTGTGACGGGGCTCGCACAGCTTGCATTGACGGGCACCGTGCCTTGGTTGGCAGCCCTGATGATCGTGGGATGACGATGATCCACCTGC
Sc15	CAGTGTGACGGGGCTCGCACAGCTTGCATTGACGGGCACCGTGCCTTGGTTGGCAGCCCTGATGATCGTGGGATGACGATGATCCACCTGC
NOAP93N3	CAGTGTGACGGGGCTCGCACAGCTTGCATTGACGGGCACCGTGCCTTGGTTGGCAGCCCTGATGATCGTGGGATGACGATGATCCACCTGC
NOAP90N2	CAGTGTGACGGGGCTCGCACAGCTTGCATTGACGGGCACCGTGCCTTGGTTGGCAGCCCTGATGATCGTGGGATGACGATGATCCACCTGC
<i>B. japonicum</i> USDA110	CATCGATTGCCGGCTCGCACAGCTCGCGCTCACGGACAGCGTCCGGTGGACCGGTCTGACCATCGTGGGATGACCATGATCCGCATGC

<i>R. giardinii</i>	AGCGTTGTGCGCTCCGGGGCC-GCCAAACGACGGTTCCTCGGGTCTCTCTGCATG-CATTATCAATATTTTTCTGCTACTGCCCTT
NOAP3N1	AGCGTTGTGCGCTCCGGGGCCCGCCAAACGACGGTTCCTCGGGTCTCTCTGCATGCCATTATCAATATTTTTCTGCTACTGCCCTT
<i>R. leguminosarum</i>	AGCGTTGTGCGCTCCGGGGCC-GCCAAACGACGGTTCCTCGGGTCTCTCTGCATGCCATTATCAATATTTTTCTGCTACTGCC---
<i>R. etli</i> , viking	AGCGTTGTGCGCTCCGGGGCC-GCCAAACGACGGTTCCTCGGGTCTCTCTGCATGCCATTATCAATATTTTTCTGCTACTGCC--
<i>R. gallicum</i>	AGCGTTGTGCGCTCCGGGGCC-GCCAACTACGGTTCCTCGGGTCTCTCTGCATGCCATTATCAATATTTTTCTGCTACTTCCCTT
<i>R. etli</i> CFN42	AGCGTTGTAGCGCTCCGGGGCC-GCCAACTACGGTTCCTCGGATTCTCTCTGCATACCATTATCAATATTTTTCTGCTACTGCCCTT
Sc15	AGCGTTGTAGCGCTCCGGGGCC-GCCAACTACGGTTCCTCGGATTCTCTCTGCATACCATTATCAATATTTTTCTGCTACTGCCCTT
NOAP93N3	AGCGTTGTAGCGCTCCGGGGCC-GCCAACTACGGTTCCTCGGGTCTCTCTGCATACCATTATCAATATTTTTCTGCTACTGCCCTT
NOAP90N2	AGCGTTGTAGCGCTCCGGGGCC-GCCAACTACGGTTCCTCGGGTCTCTCTGCATACCATTATCAATATTTTTCTGCTACTGCCCTT
<i>B. japonicum</i> USDA110	GAGCTAGCGCCCTTGTGCGG-GCGAGCTTCGATTTCTCGGTTCTCTGCTGACACCCCGATCAACATTTTTCTCTGCTCCCGAT

Figura 14: Secuencias de *nodC* de aislamientos de poroto. Se muestra el alineamiento de las secuencias correspondientes a los 4 perfiles del gen *nodC* encontrados en los aislamientos de poroto, junto con otras de bancos de datos. Los números de acceso en bancos de datos de estas últimas se encuentran en el dendrograma de la Figura 15.

Ninguna de las secuencias es idéntica a secuencias de las cepas de referencia. Las secuencias del perfil A (Sc15) y la cepa de referencia CFN42 difieren en una base, la cual no afecta sitios de reconocimiento para *HinfI* como fue observado por análisis de RFLP del gen *nodC*. Los perfiles B y D forman un *cluster* separado como se muestra en la Figura 15 y las respectivas secuencias difieren entre sí en una sola posición que en uno de los casos (D) genera un sitio *HinfI*. Estos nucleótidos involucrados en el sitio de reconocimiento de *HinfI* están indicados con color rojo en la Figura 14. La secuencia de NOAP3N1 (Perfil C), que resultó por análisis de RFLP muy similar a la cepa Viking I, se agrupa junto a las secuencias de *R. leguminosarum* bv phaseoli, *R. giardinii* y *R. etli* Viking I y se aleja de las secuencias de los perfiles A, B y D. Por otra parte los dendrograma obtenidos con los datos de RFLP y secuencias son coincidentes (Figuras 13 y 15).

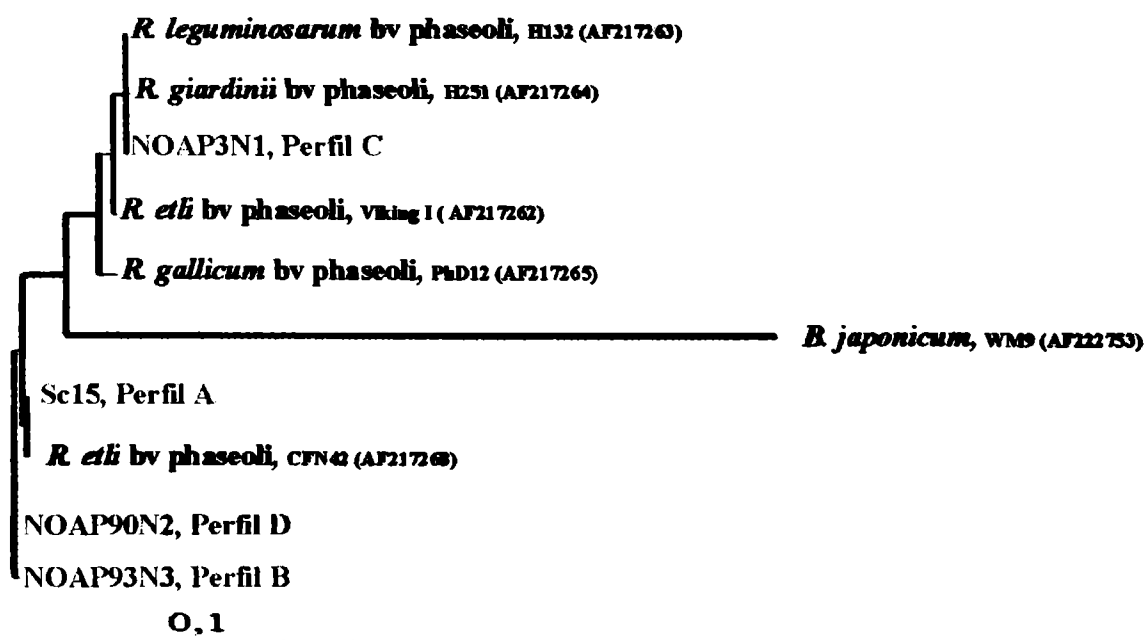


Figura 15: Análisis filogenético de la secuencia *nodC* de aislamientos de poroto con el alelo 16S ADNr de *R. etli* y *R. leguminosarum*. Se utilizó el programa PAUP (*neighbor-joining*) realizando 100 replications. Las ramas horizontales han sido graficadas proporcionalmente al número de sustituciones por sitio. Se indican las claves de acceso al banco de datos de las cepas de rizobios, así como también el perfil de *nodC* encontrado para cada uno de los cuatro aislamientos de poroto del NOA.

B- Análisis del gen *nifH*.

Aplicamos dos procedimientos analíticos para caracterizar el gen *nifH*. En primer lugar se utilizaron los *primers nifH* diseñados para amplificar específicamente un fragmento de 570 bp del gen *nifH* de las especies *R. etli* y *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (Aguilar *et al.*, 1998). El otro análisis consistió en la búsqueda de polimorfismo en un fragmento PCR de 784 pb del gen *nifH*. El esquema de la Figura 16 muestra las regiones del gen *nifH* estudiadas en cada caso.



Figura 16: Esquema de las regiones analizadas del gen *nifH*.: El fragmento de 570 pb resulta de la amplificación de rizobios de Tipo I (Aguilar *et al.*, 1998). El fragmento de 784 pb es utilizado para estudiar por RFLP.

Todos los aislamientos de poroto presentaron la banda esperada de 570 pb excepto los que fueron clasificados como *R. tropici* y los 75 aislamientos examinados por RFLP con la enzima *HaeIII* presentaron el mismo perfil de restricción (véase Figura 17). Las cepas de referencia *R. etli* CFN42 y *R. leguminosarum* USDA2671 también mostraron el mismo perfil.

Además, se ensayó una subpoblación de 12 aislamientos representativos de los 4 alelos de *nodC* con las enzimas *HhaI*, *MspI*, y *HinfI*, resultando en perfiles idénticos. Esto resultados indican una alta conservación del gen *nifH* en los aislamientos de Tipo I (Figura 17).

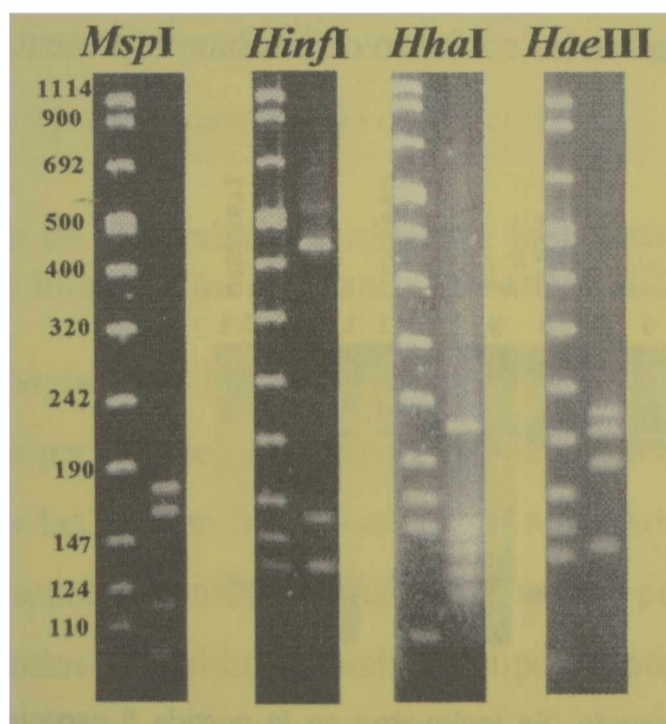


Figura 17: Análisis de la diversidad del gen *nifH* mediante RFLP. Se muestran lo perfiles de RFLP del fragmento del gen *nifH* para los aislamientos representativos de *R. etli* y *R. leguminosarum* con las 4 enzimas de restricción utilizadas.

El análisis de RFLP del gen *nifH* del grupo de aislamientos caracterizados con el alelo de 16S ADNr de *R. tropici* B se presenta en el Capítulo 6 junto con el resto de los aislamientos de

la colección que también fueron caracterizados como *R. tropici* B. No obstante se hace una breve referencia a estos resultados. Encontramos que los aislamientos caracterizados como *R. tropici* B tienen entre sí el mismo perfil, pero diferente al de la cepa tipo CIAT899. Por otra parte, el aislamiento NOAP25N1 de la subespecie *R. tropici* A y CFN299 presentan el mismo perfil (Figura 9 del Capítulo 6). Ambas subespecies de *R. tropici* presentan secuencias del gen *nifH* diferentes a las del rizobio de Tipo I.

Este resultado pone en evidencia que el gen *nifH* se ha conservado en los aislamientos del Tipo I, mientras que otros aspectos analizados resultaron diversos.

Teniendo en cuenta que los genes simbióticos de las especies R. etli y R. leguminosarum bv. phaseoli se encuentran en plásmidos, el resultado del análisis del gen nodC nos permiten concluir que habría 4 variantes plasmídicas. Dos de estas variantes, perfiles B y D, las cuales difieren entre sí en una posición nucleotídica, no fueron asimilables a secuencias de especies conocidas y podrían constituir linajes propios del NOA.

6- Análisis del perfil plasmídico

Con el propósito de continuar examinando la diversidad de esta población estudiamos el perfil plasmídico mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa (Wheatcroft *et al.*, 1990). Para comparar los distintos perfiles plasmídicos se incluyeron en cada corrida electroforética las cepas *S. meliloti* MVII 1 y *R. etli* CFN42, cuyos perfiles fueron estudiados previamente (Kosier *et al.*, 1993; Martínez-Romero *et al.*, 1999). La electroforesis de la Figura 18 muestra los perfiles plasmídicos observados en un conjunto de rizobios representativos de la población nodulante de poroto.



Figura 18: Perfil plasmídico de aislamientos de poroto. Se incluyeron en la corrida 5 especies de rizobios caracterizadas. 1- MVII (*S. meliloti*); 2-Camp11 (Campichuelo), 3-Sc15 (Santa Clara), 4-NOAP194N8 (Pichanal), 5-T52N5PN (Metán), 6- T51N5PP (Cerrillos), 7- T53N4PP (Embarcación), 8-CFN42 (*R. etli*), 9- NOAP25N1 (Valle Grande), 10-CFN299 (*R. tropici* A), 11-CIAT899 (*R. tropici* B), 12-T44N22P (Suelo T44), 13-T56N1L (Suelo T56), 14-USDA2671 (*R. leguminosarum*).

Los resultados se resumen a continuación:

- ✓ Se detectaron plásmidos en todos los aislamientos estudiados.
- ✓ El número de plásmidos resultó variable entre 1 a 6 por célula, y el rango de tamaño fue de 800 a 1500 kb.
- ✓ Los aislamientos caracterizados como *R. etli* presentaron en general un número de entre 5 y 6 plásmidos. Excepcionalmente se encontró que los aislamientos de Campichuelo (Camp11, en la Figura 18) presentaron perfiles consistentes en una única banda. Esto podría reflejar la presencia de 1 o alternativamente 2 plásmidos de igual tamaño. Este resultado es llamativo e inusual ya que tanto nuestros resultados como los descritos en la bibliografía indican que las cepas de *R. etli* poseen al menos 5 plásmidos (Martínez *et al.*, 1991). Los aislamientos de Santa Clara tienen entre 5 y 6 plásmidos, sin embargo, ninguno de los perfiles fue idéntico al de la cepa tipo de esa especie CFN42 (Calles 3 y 8 de la Figura 18).
- ✓ El perfil de los aislamientos con el alelo de 16S ADN_r de *R. leguminosarum* es diferente al resto, con un número variable entre 2 y 3 plásmidos por célula.
- ✓ Los aislamientos que portan el alelo de 16S de *R. tropici* poseen entre 2 y 3 plásmidos de manera similar a lo observado las cepas tipo de la especie CIAT899 y CFN299.

*Podemos concluir que la población nodulante de poroto conserva la característica ya descrita de poseer plásmidos. Los perfiles resultaron variables de acuerdo al alelo de 16S ADN_r al cual pertenecen. Así, por ejemplo los aislamientos agrupados con el alelo de 16S ADN_r de *R. etli* son los que presentan un número mayor de plásmidos, a excepción de los aislamientos de Campichuelo. Este resultado sugiere que el análisis de plásmidos podría ser una guía útil para la asignación de especie.*

7- Análisis de diversidad a nivel de la planta revelada por *fingerprints* de ADN y por ensayos de hibridación con sondas de secuencias de inserción y del gen *nodD*

En la mayoría de los casos entre el 40 y 70% de los aislamientos de una misma planta presentaron perfiles de *fingerprints* idénticos, señalando que en los suelos coexisten más de una población y las mismas pueden asociarse a poroto. Excepcionalmente, se encontraron plantas en las cuales todos sus nódulos estaban ocupados por rizobios con idénticos *fingerprints* o por el contrario todos sus nódulos estaban ocupados por genotipos distintos. Estos hallazgos ilustran situaciones extremas que podrían reflejar condiciones ambientales particulares. Estos casos se muestran en la Figura 19A y B.

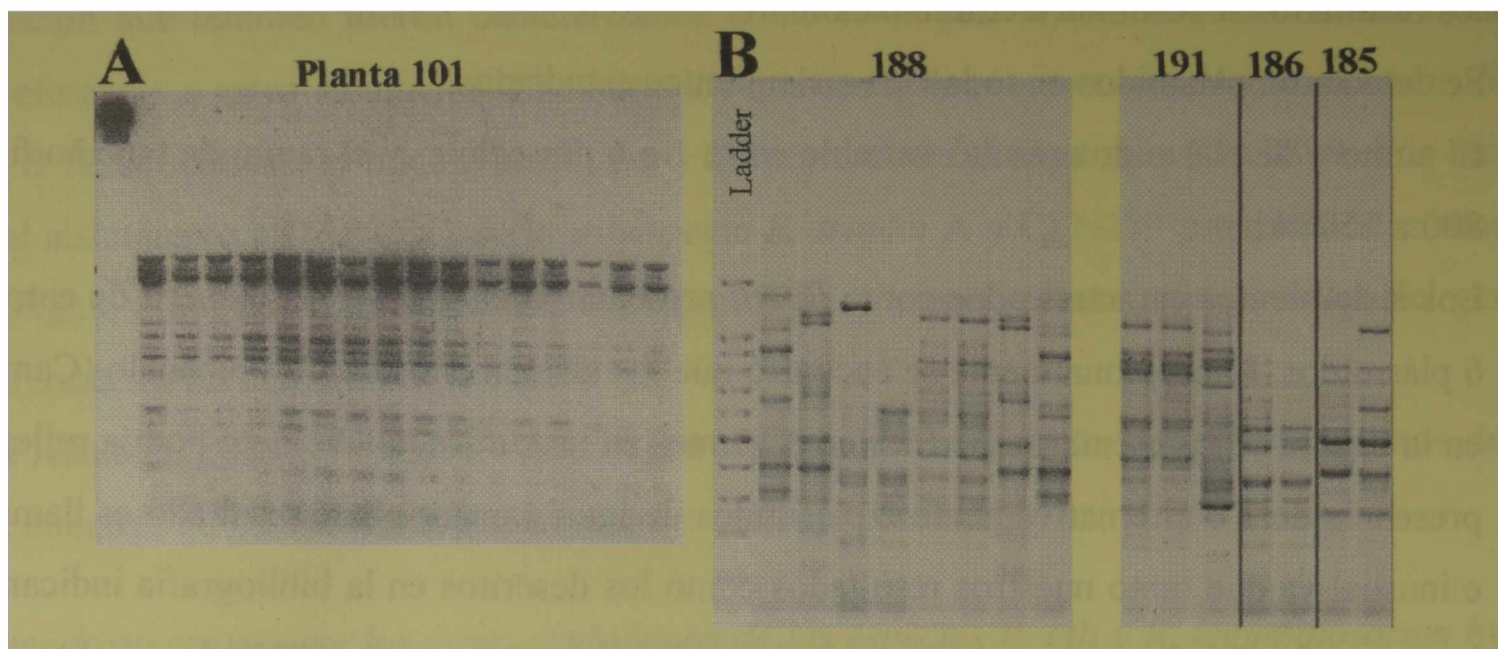


Figura 19: Perfiles de fingerprints obtenidos a partir de nódulos de una misma planta. A- Fingerprints ERIC-PCR de aislamientos de 16 nódulos de la planta NOAP101 (Quebrada del Toro). B- Fingerprints ERIC-PCR de aislamientos de nódulos de las plantas NOAP185, -186, -188. y -191 cosechadas en la zona de Cerrillos .

Este aspecto fue examinado en una colección de 11 aislamientos de una planta cosechada en la Quebrada del Toro, usando otros marcadores que se describen a continuación:

1- En una primera experiencia se utilizó la secuencia de inserción **ISR12** como sonda de hibridación. Las secuencias de inserción son elementos genéticos discretos que tienen la capacidad de transponer entre genomas. Este proceso puede mediar una variedad de fenómenos tales como rearrreglos, inserciones, y deleciones. Las copias de los elementos de inserción pueden tener localización cromosomal o plásmidica. En este trabajo se utilizó la secuencia del elemento de inserción **ISR12**, aislado de *R. leguminosarum* bv *viceae* por Mazurier et al. (1996). En nuestros ensayos la sonda de **ISR12** fue obtenida por PCR usando dATP biotinilado y un par de *primers* que diseñamos a partir de la secuencia del elemento de inserción (Mazurier *et al.*, 1996). Como fuente de ADN molde se usó la cepa S17 de *E. coli* portando el plásmido pSUP104-sac::ISR12. El producto de PCR fue utilizado para hibridar respectivamente, el ADN de los 11 aislamientos de la planta 93 previamente digerido con *EcoRI* y transferido a una membrana de nitrocelulosa. En este ensayo se incluyó ADN de cepas de especies conocidas de rizobios, *S. teranga* (USDA4894), *S. saheli* (USDA4893), *R. tropici* B (CIAT899), *S. meliloti* (Cepa 1021), *S. fredii* (USDA191) y *R. etli* (CFN42). La mayoría de los aislamientos de la planta 93 no mostró homología con la sonda y sólo dos aislamientos presentaron hibridación con perfiles diferentes entre sí (Figura 20A). Algunas de las cepas de referencia hibridaron con la sonda **ISRL2**, así la cepa de *R. etli* CFN42 presentó 2 bandas, que ya fueron descritas en el

trabajo original (Resultado no mostrado), *S. fredii* USDA191, 4 bandas y *R. tropici* B CIAT899, 5 bandas (Figura 20A).

2- En otro ensayo se utilizó un fragmento del gen *nodD* como sonda de hibridación. La sonda biotinilada del gen *nodD* se obtuvo por amplificación utilizando *primers* diseñados en este trabajo a partir del alineamiento de secuencias del gen *nodD* de especies conocidas de rizobios encontradas en los bancos de datos. La reacción de PCR fue llevada a cabo utilizando ADN de *S. meliloti* 1021 como templado. Todos los aislamientos de la planta 93 mostraron una banda de hibridación del mismo tamaño de aproximadamente 5 Kb, excepto el aislamiento NOAP93N3 que fue de mayor tamaño. Sorpresivamente las cepas de referencia capaces de nodular poroto no mostraron homología con la sonda (*R. etli*, *R. leguminosarum*, *R. tropici* B), pero sí las especies *S. fredii*, *S. teranga* y *S. saheli* (Figura 20B). Se encontró que el perfil de hibridación de los aislamientos es similar al de la cepa *S. saheli* USDA4893.



Figura 20: Perfiles de hibridación de ADN de rizobios con las sondas ISRL2 y *nodD*. La figura muestra los perfiles de hibridación de los aislamientos de rizobios y de cepas de referencia para las sondas ISRL2 y *nodD*. A- Perfiles de hibridación con la sonda de 700 pb del elemento de inserción ISRL2. B- Perfiles de hibridación con la sonda 550 pb del gen *nodD*.

En la Tabla 8 se resumen los resultados de la caracterización de los aislamientos de la planta 93. Se encontró que los 11 aislamientos presentan 10 perfiles de *rep-fingerprints* diferentes. La variabilidad en la región IGS fue comparable con la de los perfiles de *fingerprints*. A nivel de 16S ADNr encontramos predominante el alelo de *R. leguminosarum*, tal como fuera como se observado en las plantas de poroto de la región de la Quebrada del Toro en donde se demostró la predominancia de ese alelo. Los perfiles de RFLP de *nifH*, al igual que el resto de la población de Tipo I fueron idénticos entre sí. La variabilidad en el gen *nodD* resultó baja, al igual que la diversidad del gen *nodC*, esta última está dada por los perfiles B y D. Estos resultados, junto con los 4 perfiles plasmídicos (Tabla 8), descritos para este grupo de

aislamientos, señalan que los aislamientos de la planta 93 se agruparían en al menos 4 variantes plasmídicas.

Se encontró que solamente dos aislamientos presentan homología con la secuencia de inserción ISRL2, señalando la diversidad de linajes de estos rizobios, puesto que si todos provienen del mismo progenitor se esperaría presenten homología con dicha sonda.

Aislamiento	rep-fingerprints	Alelo de 16S ADNr	IGS-tipo ^a	nodC-tipo	nifH-tipo	Perfil plasmídico	ISRL2	nodD
NOAP93N1	A	<i>R. leguminosarum</i>	4	Nd ^b	1	A		1
NOAP93N2	B	<i>R. leguminosarum</i>	6	D	1	Nd		1
NOAP93N3	C	<i>R. leguminosarum</i>	1	B	1	Nd		2
NOAP93N4	D	<i>R. leguminosarum</i>	2	D	1	B		1
NOAP93N5	C	<i>R. leguminosarum</i>	1	Nd	1	C	A	Nd
NOAP93N6	E	<i>R. leguminosarum</i>	7	Nd	1	C		1
NOAP93N7	F	<i>R. leguminosarum</i>	7	Nd	1	Nd		1
NOAP93N8	G	<i>R. etli</i>	B	D	1	C		1
NOAP93N9	H	<i>R. leguminosarum</i>	5	B	1	A		1
NOAP93N10	I	<i>R. leguminosarum</i>	14	B	1	Nd	B	1
NOAP93N11	J	<i>R. leguminosarum</i>	12	B	1	D		1

Tabla 8: Caracterización de aislamientos de una planta de poroto.

^a Los IGS-tipos se corresponden con los presentes en las Tablas 5 y 6.

^b Nd no determinado

^c -, No se detectó homología con la sonda utilizada.

Estos ensayos demuestran que el análisis de sólo los nódulos de una misma planta de poroto permiten evidenciar un alto grado de diversidad. La diversidad se presenta en distintos niveles: Especie, intraespecífico y simbiótico. Además, estos ensayos de caracterización señalan no sólo la capacidad de la planta de asociarse a genotipos diferentes sino que en los suelos del NOA poroto interactúa con una población de Tipo I altamente diversa.

Utilización de hidratos de carbono y resistencia intrínseca a antibióticos

Se evaluó el crecimiento en medios de cultivo con distintos azúcares como únicas fuentes de carbono según lo descrito por Amarger *et al.* (1997), y en los medios TY carente de Ca, TY con niveles altos de sales (NaCl 0,34 M), TY (NaCl 0,17 M) y en el medio LB. Se determinó además, la resistencia intrínseca a los antibióticos ácido nalidíxico (40 µg/ml) y estroptomina (4 – 400 µg/ml). El ensayo de utilización de hidratos de carbono y crecimiento en diferentes condiciones de estrés se realizaron con 35 aislamientos representativos, mientras que el ensayo de resistencia a antibióticos se realizó con 94 aislamientos. Los resultados de estos ensayos se muestran en la Tabla 9.

Alelo de 16S y cepas de referencia	Xilitol ^b	Lactato	Eritritol	Dulcitol	Citrulin	LB	Lisina	NaCl 0,34 M	NaCl 0,17M	TY-Ca	NX	Sm 400	Sm 4
Cepas de referencia													
<i>R. leguminosarum</i> ^a	+ ^r	- ^r	+	+	-	-	-	-	-	-	S ^e	S	R
<i>R. etli</i> ^a	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	R
<i>R. tropici</i> B ^a	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	R	R	R
<i>R. tropici</i> A ^a	+	-	-	-	-	-	-	nd ^d	nd	nd	R	S	S
Aislamientos del NOA													
<i>R. leguminosarum</i>	80 ^e	50	-	70	-	-	-	-	-	25	S	S	R 43
<i>R. etli</i>	77	50	-	-	-	-	-	-	30	30	R 90	R 23	R 63

Tabla 9: Caracterización fenotípica de los aislamientos de poroto. Capacidad para crecer en distintas condiciones de cultivo.

^a Cepas de rizobios tipo de las especies *R. leguminosarum* (USDA2671), *R. tropici* B (CIAT899) y *R. etli* (CFN42), *R. tropici* A (CFN299).

^b Las concentraciones finales fueron de 1 gr/l.

^c Con un número se indica el porcentaje total de los aislamientos positivos (crecen) o resistentes (en el caso de antibióticos)

^d nd, significa no determinado.

^e R= Resistente, S= Sensible.

^f Con los símbolos + y- se indica el crecimiento de todos aislamientos o la ausencia del mismo, respectivamente.

La utilización de eritritol, dulcitol y lactato como única fuente de carbono fue descrita por Amarger *et al.* (1997) como un rasgo fenotípico que permitiría diferenciar a las especies *R. etli* y *R. leguminosarum*, los resultados de estos autores se muestran en forma resumida en la Tabla 10.

Característica	<i>R. etli</i>	<i>R. leguminosarum</i>
Eritritol	-	+
Dulcitol	44 ^a	+
dl-Lactato	-	-
NaCl 0,17 M	-	-

Tabla 10: Resultados publicados por Amarger *et al.* (1997).

^a Porcentaje total de positivos

A diferencia de lo descrito por Amarger *et al.* (1997) encontramos que los aislamientos del NOA clasificados como *R. leguminosarum* no crecen con eritritol pero, contrariamente usan lactato. Además, algunos de los aislamientos con el alelo de 16S ADN_r de *R. etli* pueden crecer en presencia de 0.17 M de NaCl y limitación de Ca⁺², demostrando mayor tolerancia que las cepas de referencia a esas condiciones de estrés.

Se encontró que la resistencia a antibióticos es un rasgo variable entre los aislamientos agrupados con el mismo alelo de 16S ADN_r.

Ensayos de competencia por la nodulación de poroto

Se realizaron ensayos de competencia por la nodulación de poroto entre aislamientos que poseen los alelos de 16S ADNr de las especies *R. etli* (NOAP3N1) y *R. tropici* A (NOAP25N1) o *S. fredii* (T1N7L). Para ello, las mezclas de los cultivos puros según las siguientes proporciones: 1:1, 1:2 y 2:1 fueron utilizadas para inocular poroto NAG12. Luego de tres semanas se cosecharon los nódulos, cuyo número osciló entre 20 y 100 por planta. A partir de los rizobios extraídos de cada nódulo se realizó una preparación de ADN y para la identificación de los rizobios se usaron *primers* de *nifH* específicos para aislamientos de Tipo I. Un 95% de los nódulos dio el producto de amplificación característico de *R. etli*, indicando que los nódulos resultaron de la infección con la cepa NOAP3N1. Estos datos demuestran que al menos en las condiciones de laboratorio *R. etli* es altamente competitiva. Esta predominancia se obtuvo también ensayando la cepa NOAP14N1.

Rango de planta hospedante

Los ensayos de inoculación fueron realizados con el propósito de determinar el rango de hospedadores que son capaces de ser reconocidos por aislamientos representativos de las especies *R. etli* y *R. leguminosarum*, respectivamente y de las subespecie de *R. tropici*. Las leguminosas ensayadas fueron *Phaseolus vulgaris* var. *vulgaris*, *Phaseolus vulgaris* var. *aborigineus*, *Phaseolus augusti*, *Phaseolus lunatus*, *Glicine max* (cultivar Peking), *Medicago sativa*, *Lupinus* spp., *Leucaena leucocephala*, *Centrosema* spp., *Vicia* spp., *Acacia aroma* y *Vigna* spp.. Los resultados de los ensayos se muestran en la Tabla 11.

Hospedador	<i>R. etli</i>		<i>R. leguminosarum</i>		<i>R. tropici</i> B	<i>R. tropici</i> A
	NOAP37N1	Sc15	NOAP8N1	NOAP93N7	T44N22P	NOAP25N1
<i>P. vulgaris</i> var. <i>aborigineus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>P. vulgaris</i> var. <i>vulgaris</i>	+	+	+	+	+	+
<i>P. augusti</i>	nd ^b	+	nd		+	+
<i>P. lunatus</i>			nd			+ ^c
<i>Leucaena leucocephala</i>					+	+
<i>Medicago sativa</i>						
<i>Lupinus</i> spp.						
<i>Vigna</i> spp.	+ ^a		+ ^a	+ ^a	+	+
<i>Centrosema</i>	+ ^a		+ ^a			
<i>Vicia</i>	nd			nd		
<i>Glycine max</i> var. Peking	+ ^a		+ ^a			
<i>Acacia aroma</i>					+	nd

Tabla 11: Rango de planta hospedante. Resultados de los ensayos de nodulación con aislamientos representativos de cada genotipo de 16S ADNr.

^a Los nódulos formados fueron pequeños, con el interior blanco y en algunos caso deformes pero de mayor tamaño

^b nd, no determinado.

^c Se obtuvo un solo nódulo muy pequeño, lo que impidió la confirmación por *fingerprints*.

Encontramos que todos los aislamientos nodularon las variedades silvestre y comercial de poroto. Este resultado concuerda con lo observado en el análisis de perfiles de *fingerprints* (Ver página 113).

Por otra parte, los ensayos de nodulación demuestran que el proceso de selección y fitomejoramiento no ha afectado ni restringido la capacidad de la forma silvestre de asociarse con distintos genotipos de rizobios.

La mayoría de los aislamientos fueron capaces de nodular *Vigna* spp. y el cultivar Peking de soja. Los nódulos fueron pequeños con su interior blanco. Por otro lado, los aislamientos caracterizados como *R. tropici* A y B de *P. vulgaris* también fueron capaces de nodular *Leucaena leucocephala*, *Acacia aroma* (Sólo fue ensayado para el caso de *R. tropici* B), *P. augusti* y *P. lunatus*, dos especies de *Phaseolus* que se encuentran emparentadas entre sí, pero alejadas de *P. vulgaris*.

Niveles de variabilidad en la población nodulante de poroto

Encaramos la caracterización de los aislamientos de *P. vulgaris* haciendo uso de una serie de ensayos moleculares y fenotípicos esperando que los resultados nos conduzcan a su ubicación taxonómica. Encontramos distintos grados de diversidad en cada una de las características examinadas tal como se muestra en el esquema de la Figura 21. En la misma aparecen como rasgos comunes de todos los aislamientos como es la capacidad de nodular poroto, y la conservación de la secuencia del gen *nifH*. Se observa también, que en algunos casos la secuencia del gen *nodC* resulta compartida por las especies *R. etli* y *R. leguminosarum*, además los perfiles B y D son perfiles encontrados sólo en aislamientos del NOA. El análisis de rasgos fenotípicos y moleculares tales como IGS y *fingerprints* de ADN resulta en una mayor dispersión de los miembros de las subpoblaciones agrupadas por alguna de las características comentadas anteriormente. Todos estos resultados nos llevan a concluir que el poroto en el NOA está nodulado por tres poblaciones ubicadas taxonómicamente en las especies *R. etli*, *R. leguminosarum* y *R. tropici*, las cuales a su vez se caracterizan por presentar diversidad intraespecífica y simbiótica.

<i>NifH</i> -tipo I	Tipo I		Tipo II	
16S ADNr	<i>R. etli</i>	<i>R. leguminosarum</i>	<i>R. tropici</i> A	<i>R. tropici</i> B
DTGGE	M6	M14	M4	No determinado M13
<i>nifH</i> -RFLP	Único perfil		Único perfil	Único perfil
<i>nodC</i> -tipo	Perfil C	Perfiles A y D	Perfil B	No determinado No determinado
Características fenotípicas	Variabilidad	Variabilidad	No determinado	Único perfil
IGS-RFLP	Perfiles variables	Perfiles variables	Único perfil	Único perfil
<i>Fingerprints</i>	Perfiles variables	Perfiles variables	Único perfil	Menor variabilidad
Rango de hospedador	<i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Leucaena</i>			

Figura 21: Niveles de variabilidad en la población de rizobios del NOA nodulantes de *P. vulgaris*.

Discusión

La colección de aislamientos de *Phaseolus vulgaris* se constituyó a partir de muestras de distintas regiones que cubren una gran extensión del NOA y a su vez comprenden a ecosistemas diversos. Podemos concluir entonces, que nuestra colección es representativa de las poblaciones de rizobios nodulante de poroto del NOA.

Los alelos del gen 16S ARNr encontrados en el NOA, *Rhizobium etli*, *Rhizobium leguminosarum* bv phaseoli y *Rhizobium tropici* subespecies A y B, se corresponden con 3 de las 5 especies nodulantes de poroto (Martínez-Romero *et al.*, 1991, Segovia *et al.*, 1993, Amarger *et al.*, 1997).

Si bien a nivel de alelo de 16S ARNr hay una diversidad limitada a 3 especies conocidas, se encontraron variantes que fueron reveladas por el uso de técnicas complementarias tales como DTGGE y secuenciación. El análisis de DTGGE permitió distinguir variantes entre los aislamientos con los alelos de 16S ADNr de *R. etli* y *R. tropici*, demostrando divergencias alélicas dentro de la colección. En el caso de *R. etli* el perfil migracional M14 se explica por un cambio nucleotídico en la secuencia de 16S ADNr. Si bien diferentes modificaciones nucleotídicas en el fragmento analizado por DTGGE pueden resultar en el mismo perfil migracional se esperaría que todos los aislamientos con el perfil M14 presenten la misma secuencia, dando lugar a una variante alélica que se encontró distribuida en la región. Todos los aislamientos con el alelo de *R. tropici* B mostraron el mismo perfil migracional que resultó

diferente al de la cepa de referencia CIAT899. En este caso se podría especular también, con la existencia de una variación alélica o una especie nueva emparentada con *R. tropici* B.

La presencia del alelo ribosomal de *R. etli* fue cuantitativamente mayor en toda la región mientras que *R. leguminosarum* fue encontrado puntualmente en algunos de los sitios del NOA. Hasta hace pocos años se creía que *R. leguminosarum* era el genotipo representativo del rizobio europeo nodulante de poroto. En este trabajo *R. leguminosarum* fue encontrado en varios lugares del NOA. O sea, es probable que *R. leguminosarum* y *R. etli* coexistieron y coevolucionaron con *P. vulgaris*. Con respecto a la coevolución, en este trabajo hemos demostrado que *R. etli* y *R. leguminosarum* comparten los perfiles A y D de *nodC*. Además, el perfil B de *nodC* encontrado en *R. leguminosarum* es muy similar al perfil D con lo cual se podría pensar en la coevolución del plásmido simbiótico de *R. etli* y *R. leguminosarum*.

Como un caso único, en el sitio de la Quebrada del Toro encontramos total predominancia de *R. leguminosarum*. Las características fisicoquímicas del suelo de la Quebrada del Toro no se distinguieron de otros suelos, como para permitirnos asociar la dominancia de esa población a alguna característica edáfica. Además, en otros tres sitios se encontró una proporción equitativa de ambas especies. Si bien no está demostrado, es oportuno mencionar que en los lugares en donde se encontró *R. leguminosarum* en una proporción igual o mayor al 50% hemos observado las siguientes características ambientales: Vegetación abundante y diversidad de géneros de leguminosas, suelo húmedo y lluvia en la época estival.

Concluimos que *R. etli* y *R. leguminosarum* constituyen respectivamente una especie cosmopolita con presencia en toda la región y una especie endémica con presencia significativa sólo en algunos lugares.

Encontramos que una población nodulante de poroto recuperada a partir de suelo fue identificada por RFLP-16S ADN_r como *R. tropici* B. Dado que esta población y la aislada de *Leucaena leucocephala* fueron encontradas muy similares, las consideraciones y discusión se realizarán en el Capítulo 6 donde se describe la caracterización de los aislamientos.

La diversidad se presentó en distintos niveles y en cada uno de ellos con distinto grado. A nivel de especie es limitada a 3 (*R. etli*, *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* y *R. tropici*). Sólo en este caso se pudo asociar un marcador molecular (16S ARN_r) con un mejor funcionamiento simbiótico, ya que por los datos del análisis de muestras naturales y ensayos de coinoculación en el laboratorio el alelo de 16S ADN_r de *R. etli* está asociado a una mayor competitividad por la nodulación.

El análisis de la región intergénica 16S-23S ADN_r demostró que hay una gran diversidad dentro de cada alelo de 16S ADN_r encontrado. Una diversidad similar fue observada por

Laguerre *et al.* (1996) en la caracterización de aislamientos de *R. leguminosarum* de suelos europeos.

La diversidad de IGS-tipos de los aislamientos de *R. etli* que fue encontrada en diferentes lugares demuestra que la población tiene un carácter cosmopolita.

En otros lugares del mundo (Distintos de América) como Senegal, Gambia, España, Australia y Austria se ha aislado *R. etli* de nódulos de poroto con una variabilidad muy limitada, contrariamente a lo observado con los aislamientos del NOA (Diouf *et al.*, 2000). Los investigadores explican esa falta de diversidad por el hecho de que poroto, en esos lugares, es un cultivo introducido, y los rizobios que lo nodulan tienen características similares a los americanos, suponiendo que han llegado con semillas de la leguminosa a los respectivos lugares. La escasa variabilidad de los rizobios recuperados fuera de los lugares de origen de la leguminosa se debe a la proliferación de unos pocos clones que fueron introducidos como rizobios adheridos a las semillas (Pérez-Ramírez *et al.*, 1999). En nuestro caso la diversidad encontrada en la población de *R. etli* del NOA estaría demostrando lo improbable de que la misma halla sido importada a través de las semillas.

Las características simbióticas de los aislamientos del NOA fueron estudiadas mediante diferentes metodologías: Perfiles plasmídicos, secuencias de genes simbióticos *nodC* y *nifH*, analizando también el rango de hospedador. El rango de huésped de los cuatro alelos de 16S ADNr resultó diferente, los aislamientos de Tipo I mostraron un rango más estrecho que los aislamientos de Tipo II, coincidiendo con los resultados descritos en otros trabajos (Martínez *et al.*, 1991). Los perfiles plasmídicos mostraron también que esta diferencia se mantenía entre estos dos grupos, con la excepción de los aislamientos de Campichuelo para los cuales se encontró una sola banda plasmídica. Los dos grupos de rizobios fueron separados también mediante una reacción de PCR específica para aislamientos de Tipo I (Aguilar *et al.*, 1998). La secuencia del gen *nifH* es conservada en todos los aislamientos de Tipo I del NOA y en las cepas de referencia de Tipo I examinadas. Así mismo, se observó en los aislamientos de *R. tropici* B un solo genotipo, diferente al de los aislamientos de Tipo I y *R. tropici* A. Los ensayos de hibridación con una sonda de *nodD* de aislamientos *R. leguminosarum* tampoco revelaron mayores diferencias entre aislamientos de Tipo I.

El único análisis que reveló una diferencia simbiótica en los aislamientos de Tipo I fue el gen *nodC*. Se distinguieron 4 alelos del gen *nodC* en la población de Tipo I, dos de ellos compartidos por rizobios de las especies *R. etli* y *R. leguminosarum* y los otros dos fueron encontrados en una u otra de las especies.

El ensayo de hibridación con una secuencia de inserción encontrada en *R. leguminosarum* en aislamientos europeos (ISR12) fue realizado con 11 aislamientos de una planta y se encontraron sólo dos que hibridaron con patrones de diferentes. Mediante este experimento se estaría confirmando en primer lugar la presencia de una secuencia homóloga a la encontrada en una cepa europea y en segundo lugar la diversidad de genotipos de los aislamientos que nodulan una planta.

Se puede concluir que la población de rizobios del NOA de poroto está compuesta por tres especies, cada una de ellas con un grado de diversidad fenotípica y genotípica diferente. La predominancia de *R. etli* en los nódulos de poroto se podría explicar por:

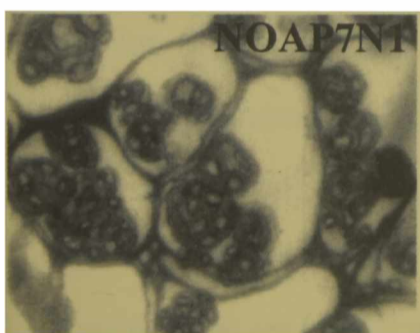
- 1- La alta concentración de la especie en el suelo.
- 2- Su capacidad de competencia por la nodulación de poroto frente a otras especies de rizobios.
- 3- Condiciones ambientales que favorecen la interacción simbiótica entre *P. vulgaris* var aborigineus y *R. etli*. En los dos sitios en donde se encontró que esta especie no predomina se podría pensar en pequeñas islas dentro del NOA en donde las condiciones favorecen a las otras especies.

Bibliografía

- 1- Aguilar, O. M., D. H. Grasso, P. M. Riccillo, M. V. López, and E. Szafer. 1998. Rapid identification of bean rhizobial isolates type I by a *nifH*-PCR assay. *Soil Biol. Biochem.* **30**:1655-1661.
- 2- Aguilar, O. M., M. V. López, P. M. Riccillo, R. A. Gonzales, M. Pagano, D. H. Grasso, A. Pühler, and G. Favelukes. 1998. Prevalence of the *Rhizobium etli*-like allele in genes coding for 16S rRNA among the indigenous rhizobial populations found associated with wild beans from the Southern Andes in Argentina. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:3520-3524.
- 3- Aguilar, O. M., M. V. López, and P. M. Riccillo. 2001. The diversity of rhizobia nodulating beans in Northwest Argentina as a source of more efficient inoculant strains. *J Biotech.* **91**:181-188.
- 4- Amarger, N., V. Macheret, and G. Laguerre. 1997. *Rhizobium gallicum* sp. Nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**:996-1006.
- 5- Barry, T., G. Colleran, M. Glennon, L. K. Dunican, and F. Gannon. 1991. The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. *PCR Methods Appl.* **1**:51-56.
1. Diouf, A., P. de Lajudie, M. Neyra, K. Kesters, M. Gillis, E. Martinez-Romero, and M. Gueye. 2000. Polyphasic characterization of rhizobia that nodulate *Phaseolus vulgaris* in west Africa (Senegal and Gambia). *Int J Syst Evol Microbiol.* **50**:159-170.
- 6- Garnier, T., B. Canard, and S. T. Cole. 1991. Cloning, mapping, and molecular characterization of the rRNA operons of *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* **173**:5431-5438.
- 7- Geniaux, E., M. Flores, R. Palacios, and E. Martinez. 1995. Presence of megaplasmids in *Rhizobium tropici* and further evidence of differences between the two *Rhizobium tropici* subtypes. *Int J Syst Bacteriol.* **45**:392-394.
- 8- Gepts, P., and F. A. Bliss. 1988. Dissemination pathways of common bean (*Phaseolus vulgaris*, *Fabaceae*) deduced from phaseolin electrophoretic variability. II. Europe and Africa. *Econ. Bot.* **42**:86-104.
- 9- Gürtler, V., and B. C. Mayall. 2001. Genomic approaches to typing, taxonomy and evolution of bacterial isolates. *Int J Syst Evol Microbiol.* **51**:3-16.
- 10- Gürtler, V., and V. A. Stanisich. 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology.* **142**:3-16.

- 11- Hernandez-Lucas, L., L. Segovia, E. Martínez-Romero, and S. G. Pueppke. 1995. Phylogenetic relationships and host range of *Rhizobium* spp., that nodulate *Phaseolus vulgaris* L. *Appl Environ Microbiol.* 61:2775-2779.
- 12- Jensen, M. A., J. A. Webster, and N. Straus. 1993. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:945-952.
- 13- Kami, J., Becerra-Velasquez, D. G. Debouck, and P. Gepts. (1995). Identification of presumed ancestral DNA sequences of phaseolin in *Phaseolus vulgaris*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 1101-1104.
- 14- Kosier, Püler and R. Simon. 1993. Monitoring the diversity of *Rhizobium meliloti* field and microcosm isolates with a novel rapid genotyping method using insertion element. *Molecular Ecology.* 2:35-36.
- 15- Laguerre, G., M. P. Fernandez, V. Edel, P. Normand, and N. Amarger. 1993. Genomic heterogeneity among French *Rhizobium* strains isolated from *Phaseolus vulgaris* L. *Int J Syst Microbiol.* 43:761-767.
- 16- Laguerre, G., P. Mavingui, M. R. Allard, M. P. Charnay, P. Louvrier, S. L. Mazurier, L. Rigottier-Gois, and N. Amarger. 1996. Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of chromosomal and Symbiotic gene regions: Application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2029-2036.
- 17- Laguerre, G., S. M. Nour, V. Macheret, J. Sanjuan, P. Drouin, and N. Amarger. 2001. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiogy.* 147: 981-993.
- 18- Lie, T. A., D. Goktan, M. Engin, J. Pijnenborg, and A. Anlarsal. 1987. Co-evolution of the legume-rhizobium association. *Plant Soil.* 100:171-181.
- 19- Martinez-Romero, E., M. A. Pardo, R. Palacios, and M. A. Cevallos. 1985. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. *J Gen Microbiol.* 131:1779-1786.
- 20- Martinez-Romero, E., M. Flores, S. Brom, D. Romero, G. Davila, and R. Palacios. 1988. *Rhizobium phaseoli*, a molecular genetic view. *Plant Soil.* 108:179-184.
- 21- Martinez-Romero, E., L. Segovia, F. M. Mercante, A. A. Franco, P. Graham, and M. A. Pardo. 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* spp. trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41:417-426.
- 22- Mazurier, S. L., L. Rigottier Goir, and N. Amarger. 1996. Characterization, distribution, and localization of ISR12, an insertion sequence element isolated from *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:685-693.
- 23- Piñero, D., E. Martinez, and R. K. Selander. 1988. Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Appl. Env. Microbiol.* 54:2825-2832.
- 24- Rademaker, J. L. W., B. Hoste, F. J. Louws, K. Kesters, J. Swings, P. Vauterin, and F. J. de Bruijn. 2000. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *Int J syst Evol Microbiol.* 50:665-677.
- 25- Segovia, L., J. P. Young, and E. Martinez Romero. 1993. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strain as *Rhizobium etli* sp. Nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43:374-377.
- 26- Stoltzfus, J. R., R. So., P. P. Malarvithi, J. K. Ladha, and F. de Bruijn. 1997. Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biological nitrogen fixation. *Plant and Soil.* 197:25-36.
- 27- van Berkum, P., D. Beyene, and B. D. Eardly. 1996. Phylogenetic relationships among *Rhizobium* species nodulating the common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:240-244.
- 28- Vincent, J. M. 1970. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. IBP Handbook No 15. Blackwell scientific Publications, Oxford, United Kingdom
- 29- Wang, E. T., M. A. Rogel, A. García-de los Santos, J. Martínez-Romero, M. A. Cevallos, and E. Martínez-Romero. 1999. *Rhizobium etli* bv *mimosae*, a novel biovar isolated from *Mimosa affinis*. *Int J Syst Bacteriol.* 49:1479-1491.
- 30- Wheatcroft, R., D. G. McRae, and R. W. Miller. 1990. Changes in the *Rhizobium meliloti* genome and the ability to detect supercoiled plasmids during bacteroid development. *Mol. Plant-Microb Interact.* 3:9-17.
- 31- Young, J. P. W., H. L. Downer, and B. D. Eardly. 1991. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAi1 by Polymerase Chain Reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. *J. Bacteriol.* 173:2271-2277.

Capítulo 5



Capítulo 5

Descripción de la diversidad rizobiana asociada simbióticamente a leguminosas silvestres del NOA

Introducción

En el Capítulo 4 se describió el resultado del análisis de las poblaciones rizobianas nodulantes de las variedades comerciales y primitivas de *Phaseolus vulgaris*, lo cual constituye un componente menor de la diversidad del NOA considerando que se trata de un ambiente apropiado para el desarrollo de un amplio espectro de leguminosas silvestres. La rizobiología muestra que los microsimbiontes de muchas de esas leguminosas no han sido caracterizados y permanecen desconocidos. En este capítulo se describen la caracterización de las poblaciones de rizobios que se asocian simbióticamente con esas leguminosas silvestres del NOA y de las de un sitio particular en la Quebrada del Toro donde fortuitamente encontramos simultáneamente diversas poblaciones silvestres. Además, hemos puesto cierto énfasis en el estudio de los rizobios de *Phaseolus augusti*, una leguminosa perenne distribuida en forma silvestre en distintos ambientes del NOA.

La definición de nuevas especies rizobianas que ha tenido lugar en los últimos años ha resultado del análisis de leguminosas que habían recibido poco o ningún interés, o redescubiertas recientemente (de Lajudie *et al.*, 1998 A y B; Wang *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999; Nick *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1997). Estas evidencias refuerzan el interés en llevar a cabo nuestros estudios en el NOA. Se ha sugerido que las leguminosas surgidas en el Cretáceo Superior fueron originariamente tropicales y se desplazaron luego hacia zonas templadas de la Tierra (Rothschild, 1970). Las numerosas y variadas leguminosas silvestres de la región tropical del NOA constituyen un material interesante para buscar en ellas formas primitivas y diversas de los rizobios. En general se considera que las leguminosas tropicales son promiscuas mientras las leguminosas de zonas templadas son más restrictivas en su microsimbionte.

En este capítulo continuamos con nuestro objetivo de lograr una descripción amplia de la diversidad rizobiana de la región del NOA y examinar si los diversos microsimbiontes comparten en la naturaleza el hospedador.

Establecimiento de una colección de rizobios asociados a diferentes leguminosas

La colección se formó con aislamientos de nódulos de leguminosas silvestres provenientes de lugares diversos del NOA. Muchas de las leguminosas crecen sobre las laderas de las montañas y/o en sitios expuestos a la depredación por el ganado errático, limitando así en algunos casos la disponibilidad de ejemplares y el muestreo. Además, dado que los nódulos fueron cosechados, en sucesivas épocas estivales de los años 1996 a 2000 y que el NOA se caracteriza por presentar un clima estival lluvioso que suele dificultar las tareas de recolección, resultó en que muchos sitios quedaron sin explorar. Por otro lado, encontramos que un sitio de la Quebrada del Toro, de acceso fácil, y protegido del ganado alberga una amplia variedad de leguminosa silvestres. Estas características nos favorecieron la recolección de 20 especies de leguminosas y el estudio de la diversidad rizobiana a nivel del hospedante dentro de un mismo sitio. En muchos de los sitios muestreados también se encontró *P. vulgaris* var. *aborigineus*

Teniendo en cuenta que nuestro objetivo es la descripción de los rizobios asociados a una variedad de leguminosas, se buscó una situación de compromiso, en la cual, se optó por cosechar el mayor número de variedades posibles de leguminosas silvestres en detrimento del número de plantas y nódulos de cada espécimen. Por otra parte, es oportuno comentar que encontramos algunas leguminosas carentes de nódulos, o que a partir de los pocos nódulos no logramos rizobios viables en el medio de cultivo usado. Este tipo de pérdidas, también fue observado en las poblaciones de aislamientos nodulantes de *P. vulgaris*, pero en ese caso representó una fracción pequeña del número elevado de nódulos analizados.

La nómina de las leguminosas y los sitios de recolección se muestran en la Tabla 1. No logramos clasificar a tres ejemplares de leguminosas con rasgos propios y distintos del resto.

Además, se usaron en el laboratorio las leguminosas *Arachis hypogaea*, *Centrosema* spp., *Macroptilium* spp., *P. augusti* y *Vigna* spp. para recuperar rizobios de muestras de suelo.

Leguminosa	Lugar de recolección ^a
<i>Acacia aroma</i>	Quebrada del Toro, San Luis
<i>Arachis duranensis</i>	San Luis
<i>Arachis hypogaea</i> ^b	Los Pulares, Quebrada del Toro
<i>Calopogonium</i> spp.	Quebrada del Toro
<i>Centrosema</i> spp. ^b	Quebrada del Toro
<i>Chamaecrista</i> spp.	Quebrada del Toro, San Lorenzo
<i>Crotalaria</i> spp.	Quebrada del Toro, Los Laureles,
<i>Crotalaria anagyroides</i>	Quebrada del Toro, Río Blanco
<i>Desmodium</i> spp.	Quebrada del Toro, Río Blanco
<i>Desmodium canum</i>	Quebrada del Toro, San Luis
<i>Desmodium uncinatum</i>	Quebrada del Toro, Los Laureles
<i>Eriosema</i> spp.	Quebrada del Toro
<i>Eriosema edule</i>	San Luis, Cerrillos
<i>Erythrina falcata</i>	Quebrada del Toro
<i>Erythrina</i> spp.	Quebrada del Toro
<i>Macroptilium</i> spp. ^b	Quebrada del Toro
<i>Macroptilium atropurpureum</i>	Quebrada del Toro
<i>Macroptilium erythroloma</i>	Quebrada del Toro
<i>Macroptilium fraternum</i>	San Luis, San Lorenzo
<i>Medicago polymorpha</i>	Quebrada del Toro
<i>Mimosa</i> spp.	Chorro Blanco, Rosario de Lerma, San Lorenzo
<i>Neonotonia wightii</i>	Cerrillos, Los Laureles
<i>Phaseolus augusti</i> ^b	Calilegua, Cerrillos, Chorro Blanco, Los Pulares, Peña Baya, Quebrada del Toro, Yutumayo
<i>Stylosanthes</i> spp.	San Lorenzo
<i>Tipuana tipa</i>	Quebrada del Toro
<i>Vicia benzodermis</i>	Quebrada del Toro
<i>Vigna</i> spp. ^b	Zanja del Tigre, Los Pulares, Chorro Blanco, Quebrada del Toro, Cerrillos, Metán.
Desconocido 1	San Luis
Desconocido 2	San Luis
Desconocido 3	San Luis

Tabla 1: Leguminosas y lugares explorados para establecer la colección de rizobios. Se listan las distintas especies de leguminosas y los lugares donde se recolectaron los ejemplares.

^a Todos los sitios corresponden a la provincia de Salta o Jujuy.

^b Estas especies de leguminosas fueron utilizadas en el laboratorio para recuperar rizobios de las muestras de suelo. En algunos casos las mismas especies de leguminosas también fueron cosechadas en el NOA.

La colección de 335 aislamientos (Apéndice 3 y 4) consistió mayoritariamente en rizobios de crecimiento lento. Los aislamientos de *Acacia* spp., *Mimosa* spp., *Medicago polymorpha*, y *Vicia* spp. resultaron de crecimiento rápido. No se encontraron plantas leguminosas noduladas por rizobios rápidos y lentos. En general, se encontró una diversidad de aspectos de colonias en medio YEM-rc para los dos grupos de rizobios. En el caso de los rizobios de crecimiento lento se distinguieron tres tipos de colonias de acuerdo al color: Rosas y naranjas de aspecto gomoso y rosa-oscuro de aspecto más laxo y menos gomoso.

Se analizó por PCR la presencia de una región conservada del gen *nifD*, observándose, en todos los miembros de la población, el producto característico de 390 pb. Sin embargo, en algunos casos se la observó acompañada de otros productos de distintos tamaños y menor intensidad. Este tipo de resultado también fue descrito por Stoltzfus *et al.* (1997) en bacterias que tienen la enzima nitrogenasa.

El resultado de la caracterización de los aislamientos de crecimiento rápido se muestra en el Capítulo 6 junto con el de los aislamientos de *Leucaena leucocephala*, mientras que en este capítulo se describen las características de los aislamientos de crecimiento lento.

En general, se sustenta que la hipótesis de que el rizobio tipo caupi (de crecimiento lento) es la forma típica y ancestral que representa al microsimbionte de leguminosas tropicales. (Rothschild, 1970; Gao *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1997). Las propiedades de crecimiento de los aislamientos del NOA estarían en esa dirección ya que a partir de 28 especies de las 31 examinadas se aislaron rizobios de crecimiento lento.

Caracterización genotípica

Dada la numerosa variedad de leguminosas examinadas, adoptamos un análisis consistente en dos etapas. En primer lugar, para definir los aislamientos representativos de las poblaciones de crecimiento lento se analizaron los provenientes del mismo hospedante. En una segunda etapa, se realizaron comparaciones entre los rizobios representativos de cada especie de leguminosa.

1- *Fingerprinting* de ADN

Los perfiles de *ERIC-fingerprint* de los aislamientos de crecimiento lento resultaron en general altamente variables. La Figura 1A muestra que los grados de similitud fueron menor al 10%, aunque los rizobios de una misma planta mostraron perfiles de *ERIC-fingerprints* muy similares entre sí, tal como se ilustra en la Figura 1B, con los aislamientos de una planta de *Desmodium* spp., en la cual se señalan bandas compartidas entre los mismos. En la Figura 1B, también se muestra la variabilidad encontrada entre los aislamientos de *Desmodium* spp. plantas 111 y 177. La diversidad de perfiles de *fingerprint* de aislamientos de *Eritrina* spp., *Vigna* spp. y *Desmodium* spp. se muestra en la Figura 1C.

Los perfiles de *fingerprints* de los 114 aislamientos de *P. augusti* fueron agrupados en 55 genotipos diferentes. En general, se identificaron perfiles idénticos en aislamientos provenientes de una misma planta como es el caso de los aislamientos mostrados en la Figura 2. Se encontraron excepcionalmente los siguientes casos de perfiles idénticos en aislamientos de plantas distintas: 1- Plantas 102 y 104; 2- Plantas 106 y 107; 3- Plantas 154 y 155 4- NOAP166N1, NOAP106N6 y NOAP116N1 y 5- NOAP97N5 y NOAP106N7 (Ver Figura 2 y dendrograma de la Figura 4). En los tres primeros casos, las dos plantas fueron cosechadas

simultáneamente y en el mismo lugar, encontrando sus raíces entrecruzadas, con lo cual resulta probable que las mismas fueran infectadas por la población predominante en ese microambiente rizosférico. Por el contrario, los otros ejemplos corresponden a muestras de la Quebrada del Toro tomadas en años sucesivos.

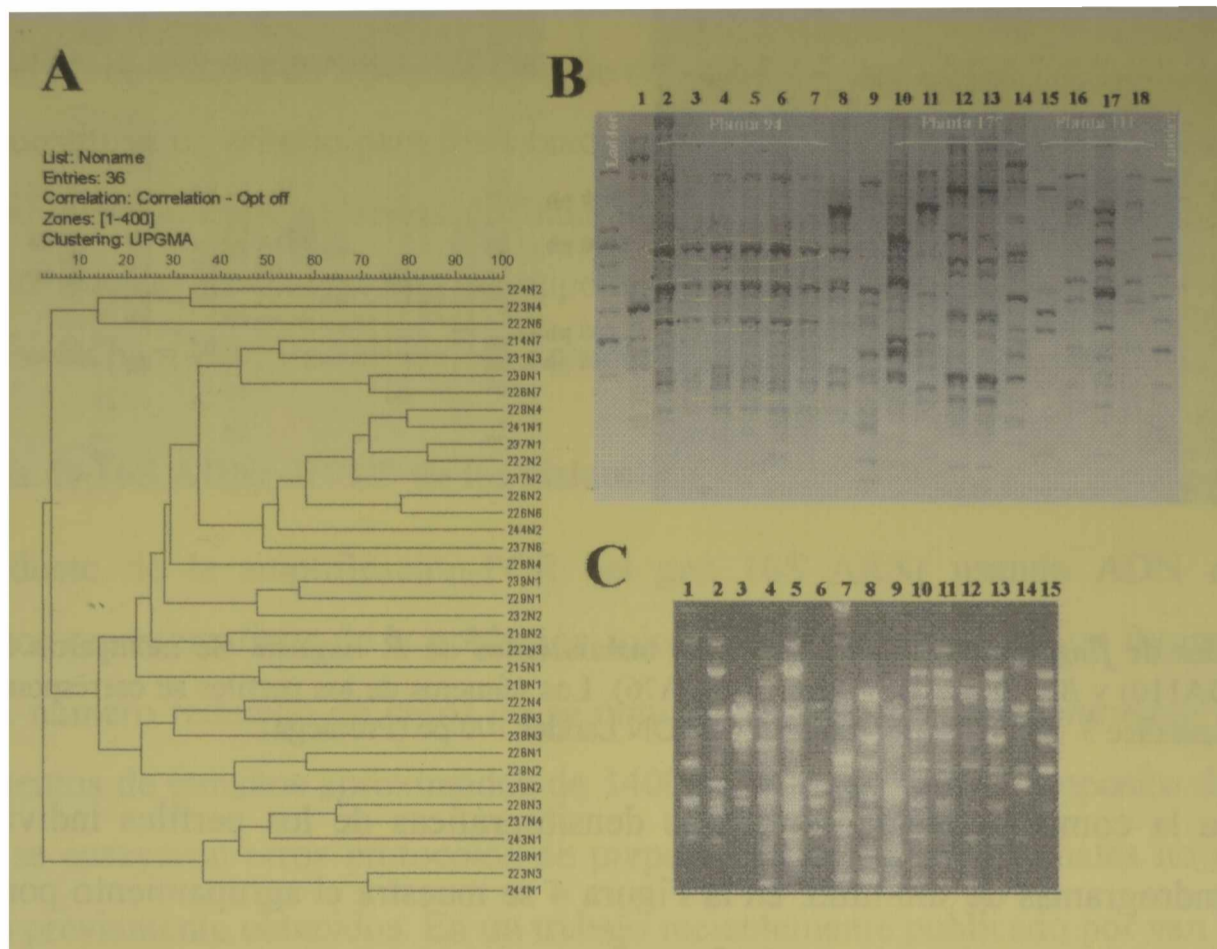


Figura 1: Perfiles de ERIC-fingerprints de aislamientos de leguminosas silvestres. En las fotografías se muestran los perfiles de ERIC-fingerprints de aislamientos de A- Dendrograma de similitud de aislamientos de diferentes leguminosas silvestres. B- Aislamientos de desmodium. 1-NOAP84N1, 2-NOAP94N2, 3-NOAP94N3, 4-NOAP94N4, 5-NOAP94N5, 6-NOAP94N6, 7-NOAP94N7, 8-NOAP49N1, 9-NOAP83N1, 10-NOAP177N1, 11-NOAP177N2, 12-NOAP177N4, 13-NOAP177N5, 14-NOAP177N6, 15-NOAP111N3, 16-NOAP111N5, 17-NOAP111N6, 18-NOAP111N4. Se indica con una llave los aislamientos pertenecientes a la misma planta. Con círculos amarillos se muestran algunas de las bandas comunes. C- Aislamientos de distintas leguminosas sembrados de acuerdo al siguiente orden 1-NOAP112N1 (D), 2-NOAP112N3(D), 3-NOAP113N3(D), 4-NOAP109N1(E), 5-NOAOP109N2(E), 6-NOAP85N1(V), 7-NOAP85N2(V), 8-NOAP85N3(V), 9-NOAP85N4(V), 10-NOAP86N1(V), 11-NOAP87N1(V), 12-NOAP87N3(V), 13-NOAP87N4(V), 14-NOAP88N2(V), 15-NOAP88N3(V). D, corresponde a *Desmodium* spp., E a *Eritrina* spp. y V a *Vigna* spp..

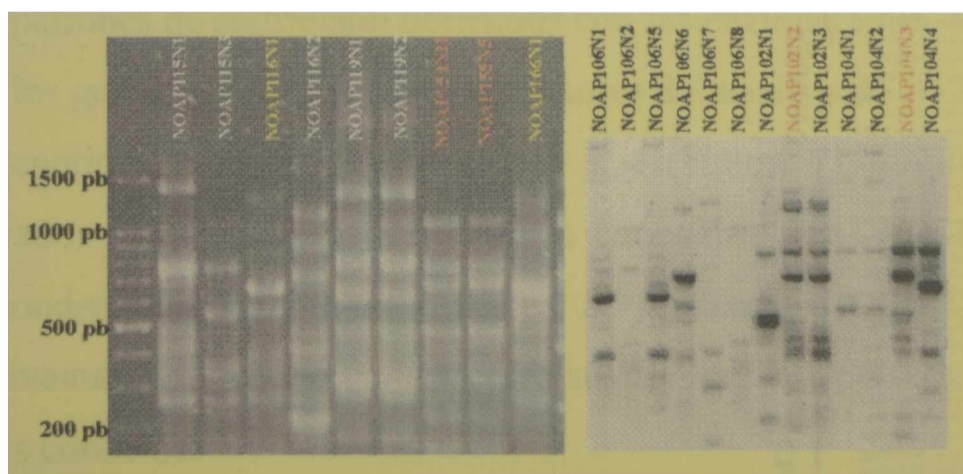


Figura 2: Perfiles idénticos de fingerprints ERIC de aislamientos de nódulos de diferentes plantas. Se distinguen con color amarillo y rojo los aislamientos de distintas plantas que presentan iguales perfiles de ERIC-fingerprints. Se muestran también los perfiles idénticos de dos aislamientos de la planta 119.

El resto de la población de *P. augusti* se caracterizó por presentar perfiles de *fingerprints* diferentes, con muy pocas bandas comunes, tal como se muestra en la Figura 3.

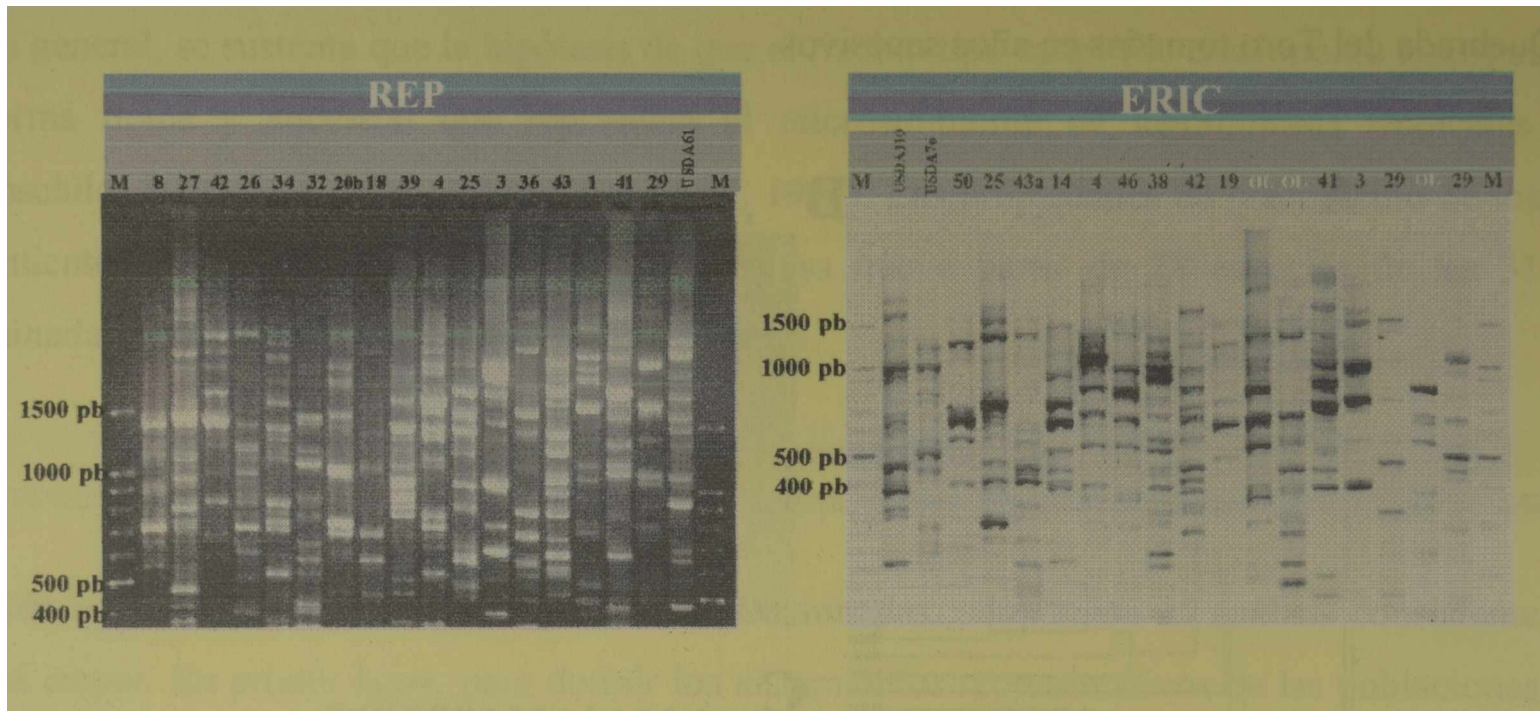


Figura 3: Perfiles de *fingerprints* REP y ERIC de aislamientos de *P. augusti*. Se incluyeron cepas de *B. japonicum* (USDA110) y *B. elkani* (USDA61 y USDA76). Los números de los perfiles se corresponden con los descritos en el Apéndice 3. M: Marcador estándar de ADN Ladder 100 pb (Promega).

A partir de la comparación de las curvas densitográficas de los perfiles individuales se obtuvieron dendrogramas de similitud, en la Figura 4 se muestra el agrupamiento por similitud de aislamientos de *P. augusti* y cepas de referencia.

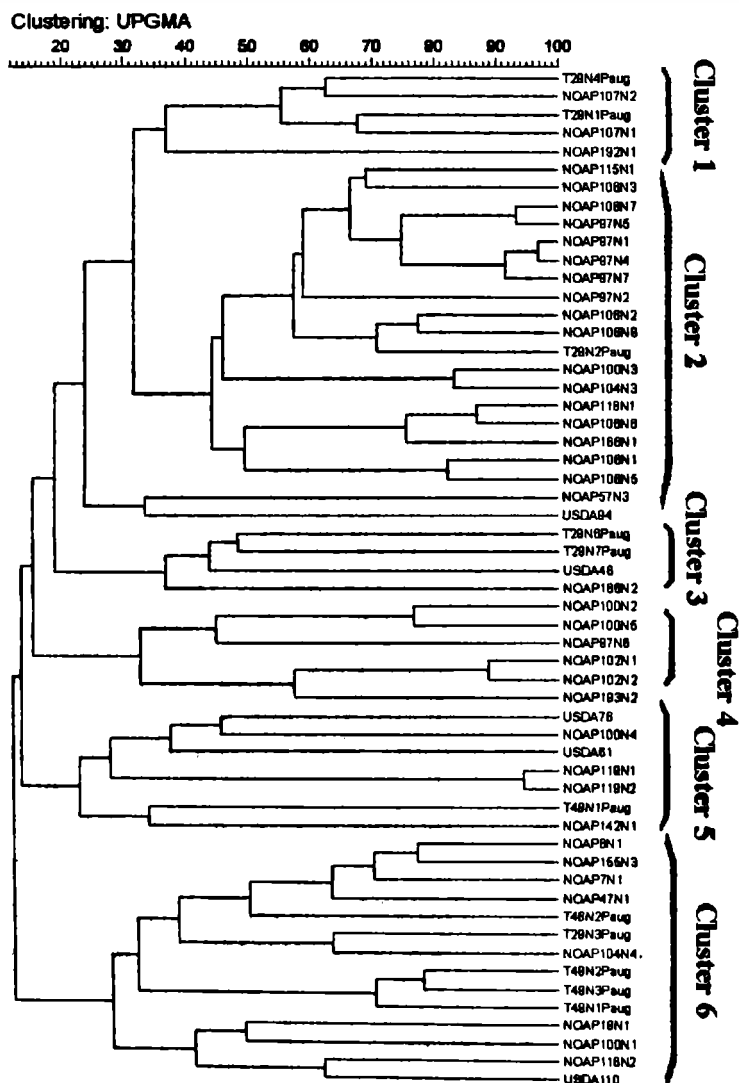


Figura 4: Relación de similitud entre los aislamientos de *P. augusti* a partir de los perfiles de *fingerprints* REP. El dendrograma fue calculado con los datos de *fingerprints* REP de 51 aislamientos representativos y cepas conocidas de las especies *B. japonicum* y *B. elkani*. Se utilizó una matriz UPGMA, y la correlación fina del programa Gelcompar 4.1, con un porcentaje de optimización entre bandas del 1 %.

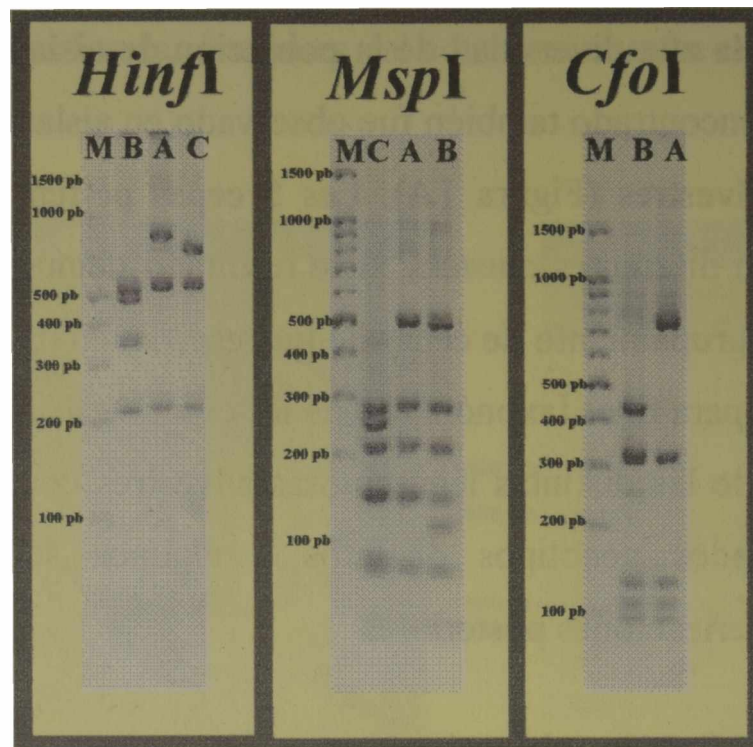
El dendrograma resultó en 6 *clusters* con un grado de similitud entre ellos de 12%. Este valor bajo de similitud refleja la alta diversidad de la población de aislamientos de *P. augusti*. Este alto grado de diversidad encontrado también fue observado en aislamientos de crecimiento lento de otras leguminosas silvestres (Figura 1A). Las 5 cepas pertenecientes a especies de bradirizobios se distribuyen en diferentes *clusters*. Este resultado demuestra que el análisis de *fingerprints* no conduce a un agrupamiento de cepas de una especie en un único *cluster* y por lo tanto no constituye un criterio para fines taxonómicos de las especies de *Bradyrhizobium*.

Los bradirizobios aislados de las distintas leguminosas silvestres con diferentes perfiles de *fingerprints* fueron considerados genotipos distintos y algunos se seleccionaron como representativos para sus caracterizaciones posteriores.

2- Análisis de 16S ADNr-RFLP de los aislamientos representativos

El producto de la amplificación-PCR del gen 16S ARNr usando ADN molde de los aislamientos representativos de la población y los *primers* rD1/fD1 fue un fragmento de 1500 pb. En un número reducido de casos no se obtuvo producto o alternativamente se observaron dos fragmentos de tamaños aproximados de 1400 – 1500 pb. Con el propósito de revertir este resultado se ensayaron otros protocolos de preparación de ADN, los cuales no mejoraron los resultados previamente obtenidos. En un trabajo recientemente publicado por van Berkum *et al.* (2000) se describen resultados similares en el análisis de bradirizobios de soja. Estos autores concluyen que los *primers* rD1/fD1 no son satisfactorios para la amplificación del gen 16S ARNr de estos microorganismos y proponen el uso de otros *primers* que no alcanzamos a ensayar en este trabajo. En nuestro caso tratamos de superar este inconveniente purificando la banda de 1500 pb en aquellos casos de productos dobles. Creemos interesantes mencionar aquí que la detección productos dobles de amplificación la encontramos asociada a los aislamientos que estudios posteriores nos permitieron asignarlos a la especie *B. elkanii*.

Los patrones de restricción obtenidos con las enzimas *CfoI*, *MspI* y *HinfI* fueron usados para definir los genotipos. Los perfiles resultantes del análisis de 212 aislamientos fueron agrupados en 4 genotipos llamados **Genotipos 1 a 4** (Figura 5). Algunos de estos genotipos fueron encontrados idénticos a los de especies conocidas. Así, el **Genotipo 1** y el **Genotipo 4** se corresponden con los de las especies *B. japonicum* (USDA110) y *B. elkanii* (USDA76), respectivamente. No se encontró correlación entre los perfiles de los **Genotipos 2 y 3**, y de especies conocidas.



Genotipo	Perfil <i>HinfI</i>	Perfil <i>MspI</i>	Perfil <i>CfoI</i>
Genotipo 1 (<i>B. japonicum</i>)	A	A	A
Genotipo 2	B	B	A
Genotipo 3	C	C	A
Genotipo 4 (<i>B. elkanii</i>)	B	B	B

Figura 5: Perfiles electroforéticos de la digestión de un fragmento de 1500 pb del gen 16S ARNr de los 4 genotipos encontrados. En la parte superior se muestran los perfiles resultantes con las enzimas de restricción *HinfI*, *MspI* y *CfoI*. En la tabla de la parte inferior se resumen los perfiles obtenidos para cada genotipo de 16S ADN. M es el estándar de tamaño de ADN, Ladder 100 pb (Promega). La nomenclatura usada para facilitar la identificación de los perfiles es independiente de la utilizada en el Capítulo 2.

En la Tabla 2 se muestran los alelos de 16S ADN encontrados en los aislamientos de las respectivas especies de leguminosas. El Genotipo 1 fue aislado de todas las especies de leguminosas estudiadas con la excepción de *Chaemecrista* spp.. El alelo Genotipo 2 fue encontrado solamente en aislamientos de *P. augusti*, mientras que los Genotipos 1, 3 y 4 fueron compartidos por varias leguminosas silvestres (Tabla 2). Se pudo observar, además, que la predominancia de un genotipo es variable y las poblaciones de cada leguminosa hospedante presentan un alelo dominante. Así por ejemplo, los aislamientos de *Vigna* spp. fueron mayoritariamente Genotipo 4 (*B. elkanii*), mientras que los de *Crotalaria* spp. fueron Genotipo 1 (*B. japonicum*) y los de *Macroptilium* spp. de Genotipo 3. En el caso de los aislamientos de *P. augusti* la distribución porcentual fue: 73% Genotipo 1; 13% Genotipo 2; 4% Genotipo 3 y 10% Genotipo 4.

Leguminosas	Alelos de 16S ADNr			
	Genotipo 1	Genotipo 2	Genotipo 3	Genotipo 4
<i>Arachis</i> spp.	X		X	
<i>Calopogonium</i> spp.	X			
<i>Centrosema</i> spp.	X		X	
<i>Chamaecrista</i> spp.			X	
<i>Crotalaria</i> spp.	X		X	
Desconocido 1	X		X	
Desconocido 2	X		X	
Desconocido 3	X		X	
<i>Desmodium</i> spp.	X		X	X
<i>Eriosema</i> spp.	X			X
<i>Erithrina</i> spp.	X			
<i>Macroptilium</i> spp.	X		X	X
<i>Neonotonia</i> spp.	X		X	
<i>Phaseolus augusti</i>	X	X	X	X
<i>Stylosanthes</i> spp.	X			
<i>Tipuana tipu</i>	X			
<i>Vigna</i> spp.	X		X	X

Tabla 2: Alelos de 16S ADNr encontrados en los rizobios aislados de leguminosas silvestres del NOA. Con la letra X se señalan los genotipos que fueron aislados de las distintas leguminosas.

3- Análisis de la secuencia nucleotídica del gen 16S ARNr

Se secuenció un fragmento de aproximadamente 260 pb, amplificado del gen 16S ARNr de aislamientos representantes de cada uno de los cuatro genotipos, y a su vez de diferentes regiones geográficas y hospedantes (Tabla 3). Además, en el caso de tres aislamientos se secuenció la casi totalidad del gen usando los *primers* rD1/fD1.

Aislamiento	Leguminosa	Alelo de 16S ADNr	Producto secuenciado ^a	Homología encontrada ^b
T29N4Ce	<i>Centrosema</i>	1	260 pb	<i>B. japonicum</i>
NOAP38N1	<i>Crotalaria</i>	1	260 pb	<i>B. japonicum</i>
NOAP39N1	<i>Crotalaria</i>	1	260 pb	<i>B. japonicum</i>
NOAP95N1	<i>Crotalaria</i>	1	260 pb	<i>B. japonicum</i>
NOAP111N7	<i>Desmodium</i>	1	260 pb	<i>B. japonicum</i>
NOAP48N1	<i>Desmodium</i>	1	260 pb	<i>B. japonicum</i>
NOAP94N1	<i>Desmodium</i>	1	260 pb	<i>B. japonicum</i>
NOAP94N4	<i>Desmodium</i>	1	260 pb	<i>B. japonicum</i>
NOAP70N1	<i>Eriosema</i>	4	260 pb	<i>B. elkanii</i>
NOAP85N4	<i>Erithryna</i>	1	260 pb	<i>B. japonicum</i>
NOAP100N3	<i>P. augusti</i>	1	260 pb	<i>B. japonicum</i>
NOAP19N1	<i>P. augusti</i>	3	1500 pb	<i>B. japonicum</i>
NOAP216N1	<i>P. augusti</i>	2	1500 pb	<i>B. japonicum/B. elkanii</i>
NOAP47N1	<i>P. augusti</i>	1	260 pb	<i>B. japonicum</i>
NOAP56N1	<i>P. augusti</i>	4	260 pb	<i>B. elkanii</i>
NOAP56N2	<i>P. augusti</i>	4	260 pb	<i>B. elkanii</i>
NOAP57N3	<i>P. augusti</i>	1	260 pb	<i>B. japonicum</i>
NOAP6N1	<i>P. augusti</i>	2	260 pb	<i>B. japonicum</i>
NOAP7N1	<i>P. augusti</i>	2	260 pb	<i>B. japonicum</i>
NOAP97N2	<i>P. augusti</i>	1	260 pb	<i>B. japonicum</i>
NOAP97N6	<i>P. augusti</i>	1	260 pb	<i>B. japonicum</i>
T29N3Paug	<i>P. augusti</i>	1	260 pb	<i>B. japonicum</i>
T29N7Paug	<i>P. augusti</i>	1	260 pb	<i>B. japonicum</i>
T48N1Paug	<i>P. augusti</i>	1	1500 pb	<i>B. japonicum</i>
NOAP87N1	<i>Vigna</i>	4	260 pb	<i>B. elkanii</i>
T29N3V	<i>Vigna</i>	1	260 pb	<i>B. japonicum</i>

Tabla 3: Análisis de las secuencias de 16S ADNr de aislamientos de leguminosas silvestres. Características de los aislamientos del NOA a partir de los cuales se secuenció un fragmento del gen 16S ARNr y homología encontradas.

^a La secuencia de 260 pb fue obtenida con los *primers* Y1/Y2 y la de 1500 pb con rD1/fD1.

^b La homología con *B. japonicum* fue con la cepa USDA6 y con *B. elkanii* con USDA76.

A partir de los datos primarios de la secuenciación de ambas hebras complementarias se estableció la secuencia consenso, la cual fue comparada y alineadas con secuencias extraídas de bases de datos. El resultado del alineamiento se muestra en la Figura 6.

Table with 10 columns of sequence positions (1, 15, 16, 31, 45, 46, 60, 61, 75, 76, 90) and 31 rows of sequence data for various samples like 47N1, T48N1Paug, 38N1, etc.

Table with 10 columns of sequence positions (91, 105, 120, 121, 135, 136, 150, 151, 165, 166, 180) and 31 rows of sequence data for various samples like 47N1, T48N1Paug, 38N1, etc.

Table with 10 columns of sequence positions (181, 195, 196, 210, 211, 225, 226, 240, 241, 255, 256) and 23 rows of sequence data for various samples like 47N1, T48N1Paug, 38N1, etc.

24 95N1	179TGGTGAGGTAATGGC	TCACCAAGGCGACGA	TCAGTAGCTGGTCTG	AGAGGATGATCAGCC	ACATTGGGACTGAGA	CACGGCCCAA-
25 94N4	179TGGTGAGGTAATGGC	TCACCAAGGCGACGA	TCAGTAGCTGGTCTG	AGAGGATGATCAGCC	ACATTGGGACTGAGA	CACGGCCCAA-
26 94N1	179TGGTGAGGTAATGGC	TCACCAAGGCGACGA	TCAGTAGCTGGTCTG	AGAGGATGATCAGCC	ACATTGGGACTGAGA	CACGGCCCAA-
27 85N4	179TGGTGAGGTAATGGC	TCACCAAGGCGACGA	TCAGTAGCTGGTCTG	AGAGGATGATCAGCC	ACATTGGGACTGAGA	CACGGCCCAA-
28 87N1	180TGGTGAGGTAATGGC	TCACCAAGGCGACGA	TCAGTAGCTGGTCTG	AGAGGATGATCAGCC	ACATTGGGACTGAGA	CACGGCCCAA-
29 USDA76	179TGGTGAGGTAATGGC	TCACCAAGGCGACGA	TCAGTAGCTGGTCTG	AGAGGATGATCAGCC	ACATTGGGACTGAGA	CACGGCCCAA-
30 56N2	179TGGTGAGGTAATGGC	TCACCAAGGCGACGA	TCAGTAGCTGGTCTG	AGAGGATGATCAGCC	ACATTGGGACTGAGA	CACGGCCCAA-
31 56N1	179TGGTGAGGTAATGGC	TCACCAAGGCGACGA	TCAGTAGCTGGTCTG	AGAGGATGATCAGCC	ACATTGGGACTGAGA	CACGGCCCAA-

Figura 6: Alineamiento de la secuencias de 260 pb del gen 16S ARNr de aislamientos de leguminosas silvestres. Se muestra el alineamiento de los 260 pb de los aislamientos de *P. augusti* (47N1, T48N1Paug, 97N2, 100N3, T29N7Paug, 7N1, 216N1, T29N3Paug, 6N1, 57N3, 19N1, 97N6, 56N1, 56N2); *Crotalaria* spp. (38N1, 39N1, 95N1); *Eriosema* spp. (70N1); *Desmodium* spp. (48N1, 111N7, 94N1, 94N4); *Centrosema* spp. (T29N4Ce) y *Vigna* spp. (T29N3V, 85N4, 87N1) con secuencias de cepas de las especies *B. japonicum* (USDA59, M55489; USDA110, Z35330; USDA6, U69638) y *B. elkanii* (USDA76, U35000; USDA94, D13429; USDA31, M55487). Con un asterisco se indican los nucleótidos que diferencian a las especies *B. japonicum* y *B. elkanii*. Con color gris claro se identificaron las cepas y los aislamientos caracterizados como *B. elkanii*.

Las secuencias correspondientes a todos los aislamientos Genotipos 1, 2 y 3 resultaron idénticas a la secuencia de la cepa tipo de la especie *B. japonicum* USDA6, con la excepción de dos aislamientos Genotipo 1 de *Crotalaria* spp. (NOAP38N1 y NOAP39N1) cuyas secuencias fueron asimilables a *B. japonicum* USDA110. Las secuencias de los aislamientos, clasificados por RFLP como Genotipo 4, NOAP70N1, NOAP56N1 y NOAP56N2 y la de la cepa de referencia *B. elkanii* USDA76 resultaron idénticas. La secuencia de NOAP87N1 (Genotipo 4) resultó diferente de la secuencia de USDA76 en una única posición, sin embargo muestra identidad con la secuencia de la especie *B. elkanii* ya que la misma se diferencia en 6 nucleótidos que se corresponden a las posiciones claves que definen a la especie *B. japonicum*. A partir del análisis de 260 pb de la secuencia de 16S ADN de los aislamientos concluimos que los aislamientos Genotipo 1 y 4 tienen el alelo ribosomal de las especies *B. japonicum* y *B. elkanii* respectivamente, mientras que Genotipo 2 y 3, que por análisis de RFLP no fueron agrupados con *B. japonicum*, presentan secuencias idénticas a *B. japonicum*.

En otro análisis cuyo resultado se muestra en la Figura 7, comparamos las secuencias de la casi totalidad del gen 16S ARNr de bradirizobios y de tres aislamientos representativos de los genotipos 1, 2, y 3 de *P. augusti*, respectivamente.

USDA110	151	AGTCGAGCGG	GCGTAGCAAT	ACGTCAGCGG	CAGACGGGTG	AGTAACGCGT	GGGAACGTAC	CTTTTGGTTC	GGAACAACAC	AGGGAAACTT	GTGCTAATAC
USDA6		AGTCGAGCGG	GCGTAGCAAT	ACGTCAGCGG	CAGACGGGTG	AGTAACGCGT	GGGAACGTAC	CTTTTGGTTC	GGAACAACAC	AGGGAAACTT	GTGCTAATAC
NOAP19N1		-----	-----	-----	-----AGGGTG	AGTAACGCGT	GGGAACGTAC	CTTTTGGTTC	GGACCAACAC	AGGGAAACTT	GTGCTAATAC
T48N1PAUG		-----	-----	-----	-----AGGGTG	AGTAACGCGT	GGGAACGTAC	CTTTTGGTTC	GNACCAACAC	A.GGAAACTT	GTGCTAATAC
NOAP216N1		AGTCGAGCGG	GCGTAGCAAT	ACGTCAGCGG	CAGACGGGTG	AGTAACGCGT	GGGAACGTAC	CTTTTGGTTC	GGAACAACAC	AGGGAAACTT	GTGCTAATAC
B. SP (X70404)		AGTCGAGCGG	GCGTAGCAAT	ACGTCAGCGG	CAGACGGGTG	AGTAACGCGT	GGGAACGTAC	CTTTTGGTTC	GGAACAACAC	AGGGAAACTT	GTGCTAATAC
B. SP (X70403)		AGTCGAGCGG	GCGTAGCAAT	ACGTCAGCGG	CAGACGGGTG	AGTAACGCGT	GGGAACGTAC	CTTTTGGTTC	GGAACAACAC	AGGGAAACTT	GTGCTAATAC
USDA76		AGTCGATCGG	GCGTAGCAAT	ACGTCAGCGG	CAGACGGGTG	AGTAACGCGT	GGGAACGTAC	CTTTTGGTTC	GGAACAACAC	AGGGAAACTT	CAGCTAATAC
USDA130		AGTCGAGCGG	GCGTAGCAAT	ACGTCAGCGG	CAGACGGGTG	AGTAACGCGT	GGGAACGTAC	CTTTTGGTTC	GGAACAACAC	AGGGAAACTT	CAGCTAATAC
GENOSPECIE L		AGTCGAGCGG	GCGTAGCAAT	ACGTCAGCGG	CAGACGGGTG	AGTAACGCGT	GGGAACGTAC	CTTTTGGTTC	GGAACAACAC	AGGGAAACTT	GTGCTAATAC
USDA94		AGTCGAGCGG	GCGTAGCAAT	ACGTCAGCGG	CAGACGGGTG	AGTAACGCGT	GGGAACGTAC	CTTTTGGTTC	GGAACAACAC	AGGGAAACTT	CAGCTAATAC
USDA110		CGGATAAGCC	CTTACGGGGA	AAGATTTATC	GCCGAAAGAT	CGGCCGCGT	CTGATTAGCT	AGTTGGTGAG	GTAATGGCTC	ACCAAGGCGA	CGATCAGTAG
USDA6		CGGATAAGCC	CTTACGGGGA	AAGATTTATC	GCCGAAAGAT	CGGCCGCGT	CTGATTAGCT	AGTTGGTGAG	GTAATGGCTC	ACCAAGGCGA	CGATCAGTAG
NOAP19N1		CGGATAAGCC	CTTACGGGGA	AAGATTTATC	GCCGAAAGAT	CGGCCGCGT	CTGATTAGCT	AGTTGGTGAG	GTAATGGCTC	ACCAAGGCGA	CGATCAGTAG
T48N1PAUG		NGGATAAGCC	NTTACGGGGA	AAGATTTATC	GCCGAAAGAT	CGGCCGCGT	CTGATTAGCT	AGTTGGTGAG	GTAATGGCTC	ACCAAGGCGA	CGATCAGTAG
NOAP216N1		CGGATAAGCC	CTTACGGGGA	AAGATTTATC	GCCGAAAGAT	CGGCCGCGT	CTGATTAGCT	AGTTGGTGAG	GTAATGGCTC	ACCAAGGCGA	CGATCAGTAG
B. SP (X70404)		CGGATAAGCC	CTTACGGGGA	AAGATTTATC	GCCGAAAGAT	CGGCCGCGT	CTGATTAGCT	AGTTGGTGAG	GTAATGGCTC	ACCAAGGCGA	CGATCAGTAG
B. SP (X70403)		CGGATAAGCC	CTTACGGGGA	AAGATTTATC	GCCGAAAGAT	CGGCCGCGT	CTGATTAGCT	AGTTGGTGAG	GTAATGGCTC	ACCAAGGCGA	CGATCAGTAG
USDA76		CGGATAAGCC	CTTACGGGGA	AAGATTTATC	GCCGAAAGAT	CGGCCGCGT	CTGATTAGCT	AGTTGGTGAG	GTAATGGCTC	ACCAAGGCGA	CGATCAGTAG
USDA130		CGGATAAGCC	CTTACGGGGA	AAGATTTATC	GCCGAAAGAT	CGGCCGCGT	CTGATTAGCT	AGTTGGTGAG	GTAATGGCTC	ACCAAGGCGA	CGATCAGTAG
GENOSPECIE L		CGGATAAGCC	CTTACGGGGA	AAGATTTATC	GCCGAAAGAT	CGGCCGCGT	CTGATTAGCT	AGTTGGTGAG	GTAATGGCTC	ACCAAGGCGA	CGATCAGTAG
USDA94		CGGATAAGCC	CTTACGGGGA	AAGATTTATC	GCCGAAAGAT	CGGCCGCGT	CTGATTAGCT	AGTTGGTGAG	GTAATGGCTC	ACCAAGGCGA	CGATCAGTAG

USDA110	CCCCGTCCT	TAGTTGCTAC	CATTTAGTTG	AGCACTCTAA	GGAGACTGCC	GGTGATAAGC	CGCGAGGAAG	GTGGGGATGG	CGTCAAGTCC	TCATGGCCCT
USDA6	CCCCGTCCT	TAGTTGCTAC	CATTTAGTTG	AGCACTCTAA	GGAGACTGCC	GGTGATAAGC	CGCGAGGAAG	GTGGGGATGA	CGTCAAGTCC	TCATGGCCCT
NOAP19N1	CCCCGTCCT	TAGTTGCTAC	CATTTAGTTG	AGCACTCTAA	GGAGACTGCC	GGTGATAAGC	CGCGAGGAAG	GTGGGGATGA	CGTCAAGTCC	TCATGGCCCT
T48N1PAUG	CCCCGTCCT	TAGTTGCTAC	CATTTAGTTG	AGCACTCTAA	GGAGACTGCC	GGTGATAAGC	CGCGAGGAAG	GTGGGGATGA	CGTCAAGTCC	TCATGGCCCT
NOAP216N1	CCCCGTCCT	TAGTTGCTAC	CATTTAGTTG	AGCACTCTAA	GGAGACTGCC	GGTGATAAGC	CGCGAGGAAG	GTGGGGATGA	CGTCAAGTCC	TCATGGCCCT
B. SP (X70404)	CCCCGTCCT	TAGTTGCTAC	CATTTAGTTG	AGCACTCTAA	GGAGACTGCC	GGTGATAAGC	CGCGAGGAAG	GTGGGGATGA	CGTCAAGTCC	TCATGGCCCT
B. SP (X70403)	CCCCGTCCT	TAGTTGCTAC	CATTTAGTTG	AGCACTCTAA	GGAGACTGCC	GGTGATAAGC	CGCGAGGAAG	GTGGGGATGA	CGTCAAGTCC	TCATGGCCCT
USDA76	CCCCGTCCT	TAGTTGCTAC	CATTTAGTTG	AGCACTCTAA	GGAGACTGCC	GGTGATAAGC	CGCGAGGAAG	GTGGGGATGA	CGTCAAGTCC	TCATGGCCCT
USDA130	CCCCGTCCT	TAGTTGCTAC	CATTTAGTTG	AGCACTCTAA	GGAGACTGCC	GGTGATAAGC	CGCGAGGAAG	GTGGGGATGA	CGTCAAGTCC	TCATGGCCCT
GENOSPECIE L	CCCCGTCCT	TAGTTGCTAC	CATTTAGTTG	AGCACTCTAA	GGAGACTGCC	GGTGATAAGC	CGCGAGGAAG	GTGGGGATGA	CGTCAAGTCC	TCATGGCCCT
USDA94	CCCCGTCCT	TAGTTGCTAC	CATTTAGTTG	AGCACTCTAA	GGAGACTGCC	GGTGATAAGC	CG. GAGGAAG	GTGGGGATGA	CGTCAAGTCC	TCATGGCCCT
USDA110	TACGGGCTGG	GCTACACAG	TGCTACAATG	GCGGTGACAA	TGGGATGCTA	AGGGGCACC	CTTCGCAAAT	CTCAAAAAGC	CGTCTCAGTT	CGGATTGGGC
USDA6	TACGGGCTGG	GCTACACAG	TGCTACAATG	GCGGTGACAA	TGGGATGCTA	AGGGGCACC	CTTCGCAAAT	CTCAAAAAGC	CGTCTCAGTT	CGGATTGGGC
NOAP19N1	TACGGGCTGG	GCTACACAG	TGCTACAATG	GCGGTGACAA	TGGGATGCTA	AGGGGCACC	CTTCGCAAAT	CTCAAAAAGC	CGTCTCAGTT	CGGATTGGGC
T48N1PAUG	TACGGGCTGG	GCTACACAG	TGCTACAATG	GCGGTGACAA	TGGGATGCTA	AGGGGCACC	CTTCGCAAAT	CTCAAAAAGC	CGTCTCAGTT	CGGATTGGGC
NOAP216N1	TACGGGCTGG	GCTACACAG	TGCTACAATG	GCGGTGACAA	TGGGATGCTA	AGGGGCACC	CTTCGCAAAT	CTCAAAAAGC	CGTCTCAGTT	CGGATTGGGC
B. SP (X70404)	TACGGGCTGG	GCTACACAG	TGCTACAATG	GCGGTGACAA	TGGGATGCTA	AGGGGCACC	CTTCGCAAAT	CTCAAAAAGC	CGTCTCAGTT	CGGATTGGGC
B. SP (X70403)	TACGGGCTGG	GCTACACAG	TGCTACAATG	GCGGTGACAA	TGGGATGCTA	AGGGGCACC	CTTCGCAAAT	CTCAAAAAGC	CGTCTCAGTT	CGGATTGGGC
USDA76	TACGGGCTGG	GCTACACAG	TGCTACAATG	GCGGTGACAA	TGGGATGCTA	AGGGGCACC	CTTCGCAAAT	CTCAAAAATC	CGTCTCAGTT	CGGATTGGGC
USDA130	TACGGGCTGG	GCTACACAG	TGCTACAATG	GCGGTGACAA	TGGGATGCTA	AGGGGCACC	CTTCGCAAAT	CTCAAAAAGC	CGTCTCAGTT	CGGATTGGGC
GENOSPECIE L	TACGGGCTGG	GCTACACAG	TGCTACAATG	GCGGTGACAA	TGGGATGCTA	AGGGGCACC	CTTCGCAAAT	CTCAAAAAGC	CGTCTCAGTT	CGGATTGGGC
USDA94	TACGGGCTGG	GCTACACAG	TGCTACAATG	GCGGTGACAA	TGGGATGCGA	AGGGGCACC	CTTCGCAAAT	CTCAAAAAGC	CGTCTCAGTT	CGGATTGGGC
USDA110	TCTGCAACTC	GAGCCCATGA	AGTTGGAATC	GCTAGTAATC	GTGGATCAGC	ACGCCACGGT	GAATACGTTT	CCGGGCCTTG	TACACACCGC	CCGTACACCC
USDA6	TCTGCAACTC	GAGCCCATGA	AGTTGGAATC	GCTAGTAATC	GTGGATCAGC	ACGCCACGGT	GAATACGTTT	CCGGGCCTTG	TACACACCGC	CCGTACACCC
NOAP19N1	TCTGCAACTC	GAGCCCATGA	AGTTGGAATC	GCTAGTAATC	GTGGATCAGC	ACGCCACGGT	GAATACGTTT	CCGGGCCTTG	TACACACCGC	CCGTACACCC
T48N1PAUG	TCTGCAACTC	GAGCCCATGA	AGTTGGAATC	GCTAGTAATC	GTGGATCAGC	ACGCCACGGT	GAATACGTTT	CCGGGCCTTG	TACACACCGC	CCGTACACCC
NOAP216N1	TCTGCAACTC	GAGCCCATGA	AGTTGGAATC	GCTAGTAATC	GTGGATCAGC	ACGCCACGGT	GAATACGTTT	CCGGGCCTTG	TACACACCGC	CCGTACACCC
B. SP (X70404)	TCTGCAACTC	GAGCCCATGA	AGTTGGAATC	GCTAGTAATC	GTGGATCAGC	ACGCCACGGT	GAATACGTTT	CCGGGCCTTG	TACACACCGC	CCGTACACCC
B. SP (X70403)	TCTGCAACTC	GAGCCCATGA	AGTTGGAATC	GCTAGTAATC	GTGGATCAGC	ACGCCACGGT	GAATACGTTT	CCGGGCCTTG	TACACACCGC	CCGTACACCC
USDA76	TCTGCAACTC	GAGCCCATGA	AGTTGGAATC	GCTAGTAATC	GTGGATCAGC	ACGCCACGGT	GAATACGTTT	CCGGGCCTTG	TACACACCGC	CCGTACACCC
USDA130	TCTGCAACTC	GAGCCCATGA	AGTTGGAATC	GCTAGTAATC	GTGGATCAGC	ACGCCACGGT	GAATACGTTT	CCGGGCCTTG	TACACACCGC	CCGTACACCC
GENOSPECIE L	TCTGCAACTC	GAGCCCATGA	AGTTGGAATC	GCTAGTAATC	GTGGATCAGC	ACGCCACGGT	GAATACGTTT	CCGGGCCTTG	TACACACCGC	CCGTACACCC
USDA94	TCTGCAACTC	GAGCCCATGA	AGTTGGAATC	GCTAGTAATC	GTGGATCAGC	ACGCCACGGT	GAATACGTTT	CCGGGCCTTG	TACACACCGC	CCGTACACCC
USDA110	ATGGGAGTTG	GTTTTACCTG	AAGACGGTGC	GCTAACCGGC	AAAGGGGCA	GCCGGCCACG	GTAGGGTCAG	CGACTGGGGT	GAAGTCGTAA	CAAGGTAGCC
USDA6	ATGGGAGTTG	GTTTTACCTG	AAGACGGTGC	GCTAACCGGC	AAAGGGGCA	GCCGGCCACG	GTAGGGTCAG	CGACTGGGGT	GAAGTCGTAA	CAAGGTAGCC
NOAP19N1	ATGGGAGTTG	GTTTTACCTG	AAGACGGTGC	GCTAACCGGC	AAAGGGGCA	GCCGGCCACG	GTAGGGTCAG	CGACTGGGGT	GAAGTCGTAA	CAAGGTAGCC
T48N1PAUG	ATGGGAGTTG	GTTTTACCTG	AAGACGGTGC	GCTAACCGGC	AAAGGGGCA	GCCGGCCACG	GTAGGGTCAG	CGACTGGGGT	GAAGTCGTAA	CAAGGTAGCC
NOAP216N1	ATGGGAGTTG	GTTTTACCTG	AAGACGGTGC	GCTAACCGGC	AAAGGGGCA	GCCGGCCACG	GTAGGGTCAG	CGACTGGGGT	GAAGTCGTAA	CAAGGTAGCC
B. SP (X70404)	ATGGGAGTTG	GTTTTACCTG	AAGACGGTGC	GCTAACCGGC	AAAGGGGCA	GCCGGCCACG	GTAGGGTCAG	CGACTGGGGT	GAAGTCGTAA	CAAGGTAGCC
B. SP (X70403)	ATGGGAGTTG	GTTTTACCTG	AAGACGGTGC	GCTAACCGGC	AAAGGGGCA	GCCGGCCACG	GTAGGGTCAG	CGACTGGGGT	GAAGTCGTAA	CAAGGTAGCC
USDA76	ATGGGAGTTG	GTTTTACCTG	AAGACGGTGC	GCTAACCGGC	AAAGGGGCA	GCCGGCCACG	GTAGGGTCAG	CGACTGGGGT	GAAGTCGTAA	CAAGGTAGCC
USDA130	ATGGGAGTTG	GTTTTACCTG	AAGACGGTGC	GCTAACCGGC	AAAGGGGCA	GCCGGCCACG	GTAGGGTCAG	CGACTGGGGT	GAAGTCGTAA	CAAGGTAGCC
GENOSPECIE L	ATGGGAGTTG	GTTTTACCTG	AAGACGGTGC	GCTAACCGGC	AAAGGGGCA	GCCGGCCACG	GTAGGGTCAG	CGACTGGGGT	G-----	-----
USDA94	ATGGGAGTTG	GTTTTACCTG	AAGACGGTGC	GCTAACCGGC	AAAGGGGCA	GCCGGCCACG	GTAGGGTCAG	CGACTGGGGT	GAAGTCGTAA	CAAGGTAGCC

Figura 7: Alineamiento de las secuencias de la casi totalidad del gen 16S ARNr de los aislamientos de *P. augusti*. Se incluyeron secuencias de cepas de las especies *B. japonicum* (USDA59, USDA110, USDA6) y *B. elkani* (USDA76, USDA94), además de secuencias con alta homología pertenecientes a *Bradyrhizobium*. sp. Con un asterisco se indican los nucleótidos diferentes entre las especies *B. japonicum* y *B. elkani*. En negro se resaltan los nucleótidos que se encontraron generando nuevos sitios de restricción (Rojo corresponde a *MspI*, CCGG; verde a *RsaI*, GTAC y con azul *HinI*, GANTC). Los nucleótidos diferentes de las cepas de las distintas especies se pintaron en forma unitaria de color gris.

A continuación se describen algunas conclusiones que se extraen esta comparación:

- 1- La secuencia del Genotipo 3 NOAP19N1 tiene 2 nucleótidos distintos respecto a las cepas *B. japonicum* (Posiciones 576 y 665 desde el extremo 5' del primer fD1). Esas dos variaciones generan secuencias de reconocimiento de las enzimas *MspI*, *HinI* y *RsaI*, que efectivamente se revelan en el análisis de RFLP (Figuras 5 y 7).
- 2- La secuencia del aislamiento del Genotipo 1, T48N1Paug, también se diferencia en 2 posiciones respecto a la secuencia consenso de *B. japonicum*, pero no afectan el patrón de restricción.
- 3- La secuencia del aislamiento del Genotipo 2 NOAP216N1 nos permitió observar que la región 5'es idéntica a la especie *B. japonicum* y el extremo 3'a *B. elkani*, lo que explicaría el resultado de la secuenciación de 260 pb y el perfil de RFLP y podría indicar que se trataría de una secuencia híbrida entre las dos especies. Para evaluar esta posibilidad aplicamos el programa CHIMERA_CHECK version 2.7, el cual disocia en segmentos la secuencia de interés

y compara cada segmento con el banco de datos. De esta manera si dos regiones de una misma secuencia tienen homologías diferentes, el programa lo visualiza como un punto de corte en las inmediaciones de la unión de las supuestas secuencias de diferente origen. El análisis de la secuencia con el programa CHIMERA_CHECK mostró que el punto de corte se encontraría alrededor del nucleótido 340 como se muestra en la Figura 8, aportando una prueba más para proponer la presencia de una secuencia híbrida.

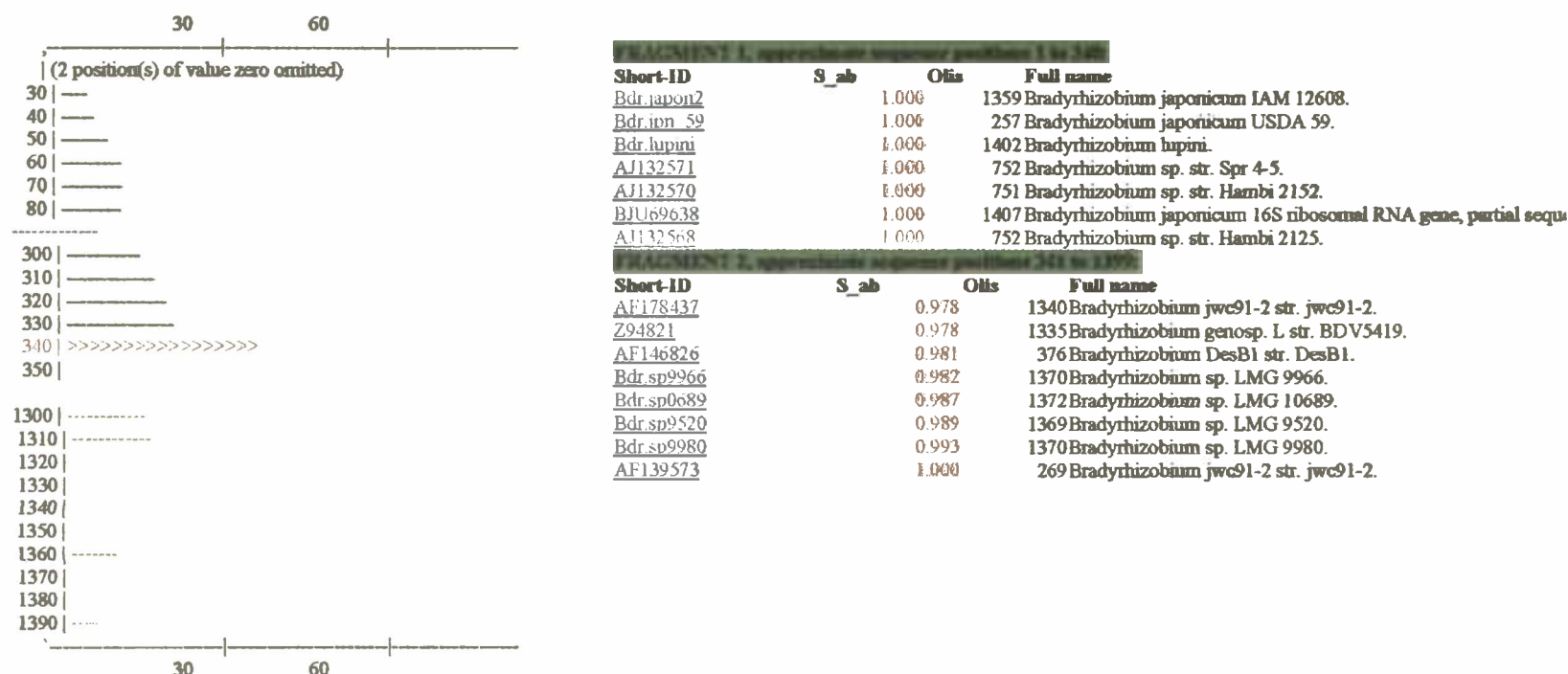


Figura 8: Análisis de la secuencia quimera del gen 16S ARNr del aislamiento NOAP216N1. El histograma de la izquierda representa un plot de valores de $N1 + N2 - N$ por cada 10^{ma} posición de la secuencia, en donde N1 es el número de oligómeros comunes entre el Fragmento 1 de la secuencia de NOAP216N1 y una secuencia del banco de datos que resultó homóloga, de la misma manera N2 representa el número de oligómeros comunes entre el Fragmento 2 y una secuencia del banco de datos. N es el número de oligómeros comunes a una secuencia del banco de datos. El punto de quiebre se muestra en color rojo. S_{AP} es un *score* de similitud del programa, short ID es el código de identificación de la secuencia, *Olig* es el número de nucleótidos de cada secuencia y *full name* el nombre de la secuencia tal como fue definida en el banco de datos. Dado que el histograma obtenido resultó extenso a fin de simplificar el gráfico se omitieron algunas posiciones, las cuales fueron representadas por una recta punteada de color azul a ambos lados del punto de quiebre. Se indican también en las tablas de la derecha algunas de las similitudes encontradas con cada uno de los fragmentos (Fragment 1 y Fragment 2).

El resultado del análisis de 26 secuencias de aislamientos de leguminosas silvestres agrupados según RFLP resultó en un número relativamente bajo de alelos de 16S ADNr. Sólo dos de las variantes alélicas son asimilables al de especies conocidas.

4- Análisis de PCR-DTGGE

El producto de la reacción de PCR con los *primers* dgefo/dgere de 35 aislamientos representantes de los 4 genotipos encontrados de 16S ADNr fue analizado en geles desnaturalizantes de DTGGE. La movilidad de los fragmentos en el gel fue caracterizada en relación con las especies *R. etli* (M5), *B. japonicum* cepa USDA59 (M7), *B. japonicum* cepa USDA110 (M8) y *B. elkanii* cepa USDA76 (M9).

Identificamos 5 perfiles entre los aislamientos, tres de los cuales M7, M8 y M9 fueron iguales al de las cepas de referencia, mientras que los otros dos perfiles no se correspondieron con los de las cepas de referencia. Continuando con la denominación introducida en el Capítulo 2 estos perfiles fueron identificados como M15 y M16 (Figura 9A y B, Tabla 4 y Tabla 5 del Capítulo 2).

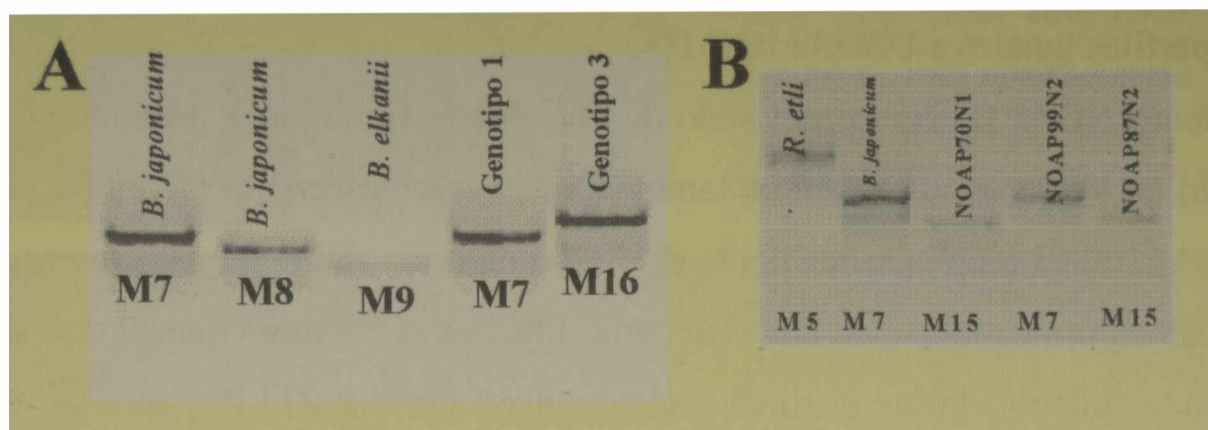


Figura 9: Perfiles de DTGGE de aislamientos de leguminosas silvestres del NOA. A- Perfiles migracionales de DTGGE de cepas de referencia y aislamientos de crecimiento lento. De izquierda a derecha: USDA59, USDA110, USDA46, NOAP104N2, NOAP100N5. **B-** Perfiles migracionales de las cepas de referencia *R. etli* (CFN42) y *B. japonicum* (USDA59) junto a tres aislamientos del NOA que fueron caracterizados con el alelo de 16S de *B. elkanii* y *B. japonicum*.

	Leguminosa	Sitio de recolección	Alelo de 16S ADNr	Perfil de DTGGE
Cepas de referencia				
CFN42			<i>R. etli</i>	M5
USDA59			<i>B. japonicum</i>	M7
USDA110			<i>B. japonicum</i>	M8
USDA76			<i>B. elkanii</i>	M9
Aislamientos				
NOAP70N1	<i>Eriosema</i> spp.	Cerrillos	<i>B. elkanii</i>	M15
NOAP87N2, NOAP88N3	<i>Vigna</i> spp.	Zanja de Tigre	<i>B. elkanii</i>	M15
T46N2Mn	<i>Arachis hypogaea</i>	Los Pulares	<i>B. japonicum</i>	M7
NOAP99N2	<i>Neonotonia wightii</i>	Cerrillos	<i>B. japonicum</i>	M7
NOAP98N2	<i>Neonotonia wightii</i>	Cerrillos	<i>B. japonicum</i>	M8
T29N2Ce,	<i>Centrosema</i> spp	QT*	<i>B. japonicum</i>	M8
T29N7Paug, T29N6Paug, NOAP47N1,	<i>Phaseolus augusti</i>	QT, Peña Baya	<i>B. japonicum</i>	M7
NOAP116N1, T49N2Paug, T29N1Paug,				
NOAP227N5, NOAP214N5,				
NOAP104N2, NOAP97N1, NOAP107N1,				
NOAP102N4, NOAP80N1				
NOAP216N6, NOAP229N1, NOAP6N1,	<i>Phaseolus augusti</i>	Peña Baya,	Genotipo 2	M7
NOAP7N1, NOAP215N1, NOAP154N2,		Calilegua, QT		
NOAP155N1				
NOAP19N1	<i>Phaseolus augusti</i>	Yutumayo	Genotipo 3	M7
NOAP100N5	<i>Phaseolus augusti</i>	QT	Genotipo 3	M16
NOAP56N1	<i>Phaseolus augusti</i>	QT	<i>B. elkanii</i>	M9
T46N1Paug, T46N2Paug	<i>Phaseolus augusti</i>	Los Pulares	<i>B. elkanii</i>	M15

Tabla 4: Perfiles de DTGGE de aislamientos de leguminosas silvestres y cepas de referencia. Se muestran los aislamientos estudiados junto con sus perfiles de DTGGE y los resultados de 16S ADNr-RFLP. Para simplificar la lectura de la tabla se reemplazó Genotipo 1 por *B. japonicum* y Genotipo 4 por *B. elkanii*.

*QT es Quebrada del Toro.

Los aislamientos caracterizados con los Genotipos 1, 2 y 3, y la cepa *B. japonicum* USDA59 presentaron perfiles migracionales iguales. Este resultado está de acuerdo con la identidad revelada por análisis de secuencia.

Excepcionalmente, los aislamientos NOAP98N2 y T29N2Ce caracterizados con el Genotipo 1 mostraron perfiles iguales a USDA110 (M8).

El aislamiento NOAP100N5 con el alelo de 16S ADNr Genotipo 3 presentó el perfil M16, no encontrado en los otros aislamientos también caracterizados con el Genotipo 3. El análisis RFLP de NOAP100N5 ampliado mediante el ensayo de otras endonucleasas, no reveló perfiles diferentes (Datos no mostrados) lo cual señalaría diferencias en su secuencia que no afecta los sitios de reconocimiento de las enzimas usadas en el análisis RFLP y que es necesario un análisis de la secuencia del gen ribosomal para caracterizar este nuevo perfil de DTGGE.

El perfil M9, uno de los dos perfiles encontrados con los aislamientos del Genotipo 4 fue idéntico al de la especie *B. elkanii*, mientras que el otro perfil, M15 no se corresponde con las especies del género ensayadas. En este caso tampoco se observaron diferencias en los perfiles de restricción mediante el análisis de ARDRA que fue ampliado de la misma forma que en el caso anterior.

5- Análisis tipo RFLP de la región intergénica 16S-23S ADNr

Se amplificó la región intergénica (IGS) de un conjunto de aislamientos representativos y de cepas de referencias. El tamaño del producto de PCR de los aislamientos de las cepas de referencia de *Bradyrhizobium* fue coincidente de aproximadamente 900 pb. Esto sugiere que muy probablemente tal como fuera encontrado en otros bradirizobios, nuestros aislamientos poseen un único operón (Vinuesa *et al.*, 1998). Los perfiles resultantes de la digestión del fragmento con las enzimas *HaeIII* y *AluI* nos permitieron definir los IGS-tipos para todos los aislamientos.

Los 28 IGS-tipos resultantes del análisis de 117 aislamientos y las leguminosas de donde fueron recuperados se muestran en la Figura 10 y en la Tabla 5.

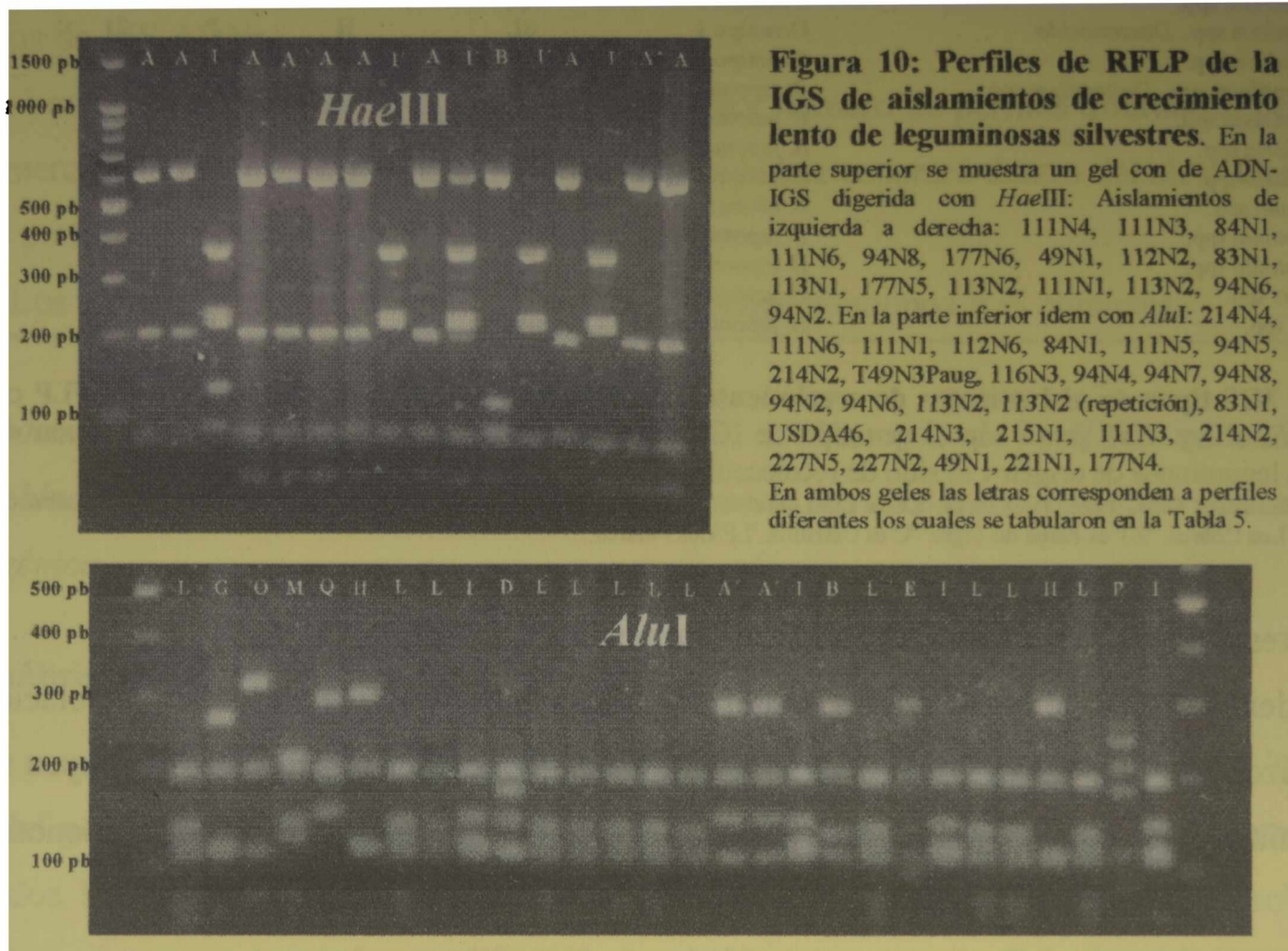


Figura 10: Perfiles de RFLP de la IGS de aislamientos de crecimiento lento de leguminosas silvestres. En la parte superior se muestra un gel con de ADN-IGS digerida con *HaeIII*: Aislamientos de izquierda a derecha: 111N4, 111N3, 84N1, 111N6, 94N8, 177N6, 49N1, 112N2, 83N1, 113N1, 177N5, 113N2, 111N1, 113N2, 94N6, 94N2. En la parte inferior ídem con *AluI*: 214N4, 111N6, 111N1, 112N6, 84N1, 111N5, 94N5, 214N2, T49N3Paug, 116N3, 94N4, 94N7, 94N8, 94N2, 94N6, 113N2, 113N2 (repetición), 83N1, USDA46, 214N3, 215N1, 111N3, 214N2, 227N5, 227N2, 49N1, 221N1, 177N4. En ambos gels las letras corresponden a perfiles diferentes los cuales se tabularon en la Tabla 5.

	Alelo de 16S ADNr	Sitio de recolección	<i>HaeIII</i>	<i>AluI</i>	IGS-tipo
Cepas de referencia					
USDA46, USDA76	<i>B. elkanii</i>		D	B	11
USDA94	<i>B. elkanii</i>		D'	K	16
USDA110	<i>B. japonicum</i>		G	A'	19
Aislamientos de las siguientes leguminosas:					
<i>Desmodium</i> spp., <i>Crotalaria</i> spp., <i>Calopogonium</i> spp., <i>P. augusti</i>	<i>B. japonicum</i>	QT ^a	A	G	1
<i>Centrosema</i> spp., <i>P. augusti</i>	Genotipo 3	QT	A	H	2
<i>Desmodium</i> spp., <i>P. augusti</i>	<i>B. japonicum</i>	QT	A	H	2
<i>Desmodium</i> spp., <i>P. augusti</i>	<i>B. japonicum</i>	QT	A	I	3
<i>Desmodium</i> spp., <i>Erythrina</i> spp., <i>P. augusti</i>	<i>B. japonicum</i>	QT, PB ^b , LL ^c	A	L	4
<i>Desmodium</i> spp., <i>Macroptilium</i> spp., <i>P. augusti</i>	<i>B. japonicum</i>	QT	A	O	5
<i>Desmodium</i> spp., <i>P. augusti</i>	<i>B. japonicum</i>	QT, LL	B	D	6
<i>Centrosema</i> spp., <i>Arachis</i> spp., <i>Neonotonia</i> spp., <i>P. augusti</i>	<i>B. japonicum</i>	QT, RB ^d	B	F	7
<i>P. augusti</i>	Genotipo 3	Yutumayo	B	F	7
<i>P. augusti</i>	<i>B. japonicum</i>	QT	B	H	8
<i>P. augusti</i>	Genotipo 3	QT	B	H	8
<i>Desmodium</i> spp., <i>Eriosema</i> spp., <i>Erythrina</i> spp., <i>P. augusti</i>	<i>B. japonicum</i>	SL ^e , QT	B	I	9
<i>Desconocido</i>	Genotipo 3	SL	B	I	9
<i>P. augusti</i>	<i>B. japonicum</i>	QT	C	I	10
<i>P. augusti</i>	Genotipo 2	PB	D	B	11
<i>P. augusti</i>	Genotipo 2	T60 ^f	D	E	12
<i>P. augusti</i>	Genotipo 2	QT	D	J	13
<i>Desmodium</i> spp., <i>Crotalaria</i> spp., <i>Vigna</i> spp., <i>Eriosema</i> spp., <i>P. augusti</i>	<i>B. elkanii</i>	QT, RB, ZT ^g , C ^h	D	J	13
<i>P. augusti</i>	<i>B. elkanii</i>	QT	D'	B	14
<i>P. augusti</i>	<i>B. elkanii</i>	QT, LP ⁱ	D'	K	16
<i>Desmodium</i> spp.	<i>B. japonicum</i>	QT	E	M	18

<i>Eriosema</i> spp.	<i>B. japonicum</i>	QT, SL	H	N	20
<i>Chamecrista</i> spp.	Genotipo 3	QT	H	N	20
<i>Desmodium</i> spp., <i>Desconocido</i>	Genotipo 3	SL	H	P	21
<i>Desmodium</i> spp.	Genotipo 3	QT	I	Q	22
<i>Macropodium</i> spp., <i>Desmodium</i> spp.	<i>B. japonicum</i>	QT	I'	A'	23
<i>Chamecrista</i> spp.	<i>B. japonicum</i>	San Lorenzo	J	R	24
<i>Crotalaria</i> spp.	<i>B. japonicum</i>	LL	B	S	26
<i>Crotalaria</i> spp.	Genotipo 3	LL	G	E	27
<i>Eriosema</i> spp.	<i>B. elkanii</i>	C	D	M	28
<i>Neonotonia</i> spp.	<i>B. japonicum</i>	C	J	O	29
<i>Neonotonia</i> spp.	<i>B. japonicum</i>	C	K	P	30
<i>Arachis</i> spp.	<i>B. japonicum</i>	LP	L	T	31
<i>Vigna</i> spp.	<i>B. japonicum</i>	ZT	B	E	32

Tabla 5: IGS-tipos de aislamientos de crecimiento lento del NOA. Se indican los perfiles de RFLP con las enzimas *Hae*III y *Alu*I, junto con el genotipo de IGS resultante. Además se incluyó la caracterización de 16S ADNr, la leguminosa de origen y el sitio de recolección.

^aQT es Quebrada del Toro. ^bPB es Peña Baya. ^cLL es Los Laureles. ^dRB es Río Blanco. ^eSL es San Luis. ^fT60 Quebrada del Toro, dirección San Antonio de Los Cobres. ^gZT es Zanja de Tigre. ^hC es Cerrillos. ⁱLP Los Pulares

Los resultados del análisis IGS-RFLP se resumen a continuación:

- 1- La identificación de 28 IGS-tipos demostró un alto índice de diversidad en la población de bradirizobios agrupados en sólo cuatro alelos de 16S ADNr. Los mismos se distribuyen según la siguiente proporción: Genotipo 1, 19/84; Genotipo 2, 3/12; Genotipo 3, 8/11 y Genotipo 4, 4/10.
- 2- No identificamos perfiles iguales al de la especie *B. japonicum*.
- 3- T46N1Paug , T46N2Paug, y *B. elkanii* USDA94 presentaron el mismo IGS-tipo. De la misma forma, los aislamientos del Genotipo 2 y las cepas *B. elkanii* USDA46 y USDA76 también comparten IGS-tipos.
- 4- Los aislamientos clasificados como Genotipos 1 y 3 compartieron sus IGS-tipos.
- 5- La población con el alelo de 16S ADNr de *B. japonicum* presentó el mayor número de perfiles de IGS diferentes, los mismos fueron encontrados distribuidos en distintas leguminosas y sitios geográficos (Tabla 5).
- 6- Se observó que el IGS-tipo 13 se encuentra en todos los aislamientos de *Desmodium* spp., *Crotalaria* spp., *Vigna* spp., *Eriosema* spp. y *P. augusti* que poseen el alelo de *B. elkanii* y Genotipo 2.
- 7- Los aislamientos identificados con el alelo de 16S ADNr Genotipo 2 mostraron IGS-tipos propios y característicos de una determinada región geográfica (Tabla 5). Así, los IGS-tipos 11, 12 y 13 fueron encontrados en Peña Baya, y en la Quebrada del Toro, respectivamente.
- 8- Los aislamientos de *Desmodium* spp. y *P. augusti*, con el alelo de 16S ADNr de *B. japonicum* mostraron la mayor diversidad de IGS-tipos (Tabla 5).

Los resultados del análisis de la región intergénica nos permiten concluir:

A- algunos genotipos de IGS son comunes a individuos pertenecientes a distintos grupos alélicos de 16S ADNr.

B- Los rizobios del Genotipo 1 presentan el mayor número de perfiles diferentes, pero dado el número de individuos analizados la mayor diversidad se encontró dentro del alelo Genotipo 3 con 8 perfiles diferentes en 11 individuos analizados.

C- Los aislamientos del Genotipo 2 y *B. elkanii* tienen genotipos IGS comunes.

Podemos concluir que dentro de los grupos alélicos de 16S ADNr se encuentran subpoblaciones que provienen de distintas leguminosas, los cuales se distinguen por su región intergénica.

6- Análisis RFLP de los genes *nifH* y *nodC*.

Se amplificaron respectivamente, un segmento del gen *nifH* de aproximadamente 784 pb y otro del gen *nodC* de aproximadamente 920 pb, usando el protocolo descrito en Materiales y Métodos. En el caso de algunos aislamientos, por ejemplo, el gen *nodC* de los bradirizobios del Genotipo 4, no se logró la amplificación probablemente por la baja homología entre la secuencia de esos aislamientos y los oligonucleótidos utilizados en la PCR.

Se analizaron el gen *nifH* y el gen *nodC* de 63 y 53 aislamientos, respectivamente

Los productos *nodC* y *nifH* fueron incubados separadamente con las enzimas *CfoI*, *MspI*, *HaeIII* y *CfoI*, *MspI* respectivamente, resultando en diversos perfiles electroforéticos que pudimos agrupar en 23 *nifH*-tipos y 15 *nodC*-tipos (Figuras 11 y 12; Tablas 6 y 7).

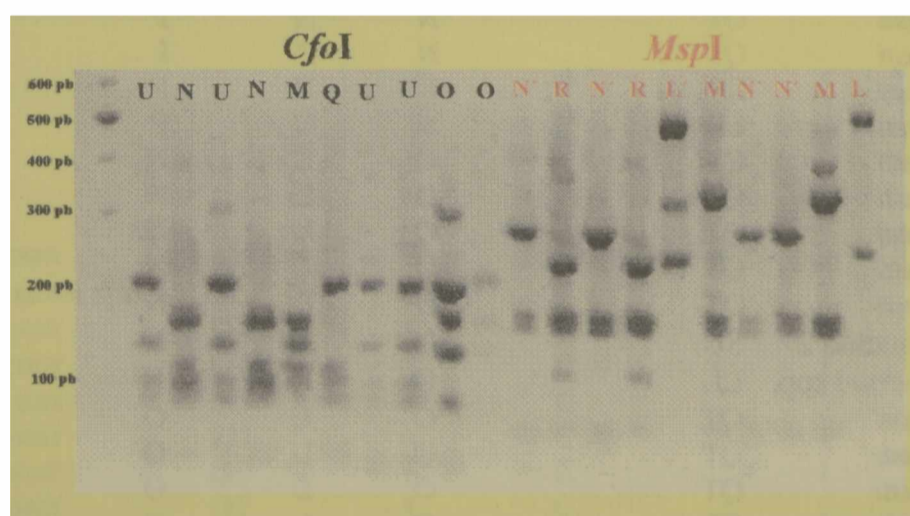


Figura 11: Perfiles de RFLP del gen *nifH* de aislamientos de leguminosas silvestres. La fotografía muestra los perfiles de algunos aislamientos de leguminosas silvestres obtenidos con las endonucleasas *CfoI* y *MspI*. Las letras utilizadas para distinguir los perfiles se corresponden con las de la Tabla 6. De izquierda a derecha se sembró: Ladder 100 pb (Promega), *CfoI*: NOAP224N2, T46N2Paug, NOAP222N1, T46N1Paug, NOAP229N1, NOAP166N1, NOAP232N3, NOAP225N5, NOAP232N1, NOAP224N3; *MspI*: NOAP224N2, T46N2Paug, NOAP22N1, T46N1Paug, NOAP229N1, NOAP166N1, NOAP232N3, NOAP225N5, NOAP232N1, NOAP224N3.

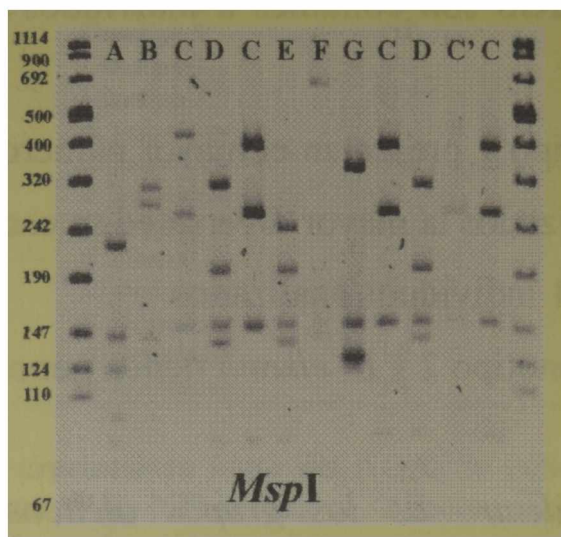


Figura 12: Perfiles de RFLP del gen *nodC* de aislamientos de leguminosas silvestres. En la figura se muestran los perfiles obtenidos con el fragmento amplificado de 12 aislamientos y digerido con la enzima *MspI*. Los 6 perfiles distintos fueron identificados con letras A a F.

Leguminosa	Sitio de recolección ^a	<i>CfoI</i>	<i>MspI</i>	<i>HaeIII</i>	Alelo de 16S ADN ^r	<i>nifH</i> -tipo	
<i>B. japonicum</i>							
USDA110		L	J	K	1	1	
<i>B. elkanii</i>							
USDA76		M	K	L	4	2	
Aislamientos							
NOAP7N1	<i>P. augusti</i>	Calilegua	M	L'	M	2	3
NOAP154N1	<i>P. augusti</i>	Peña Baya	M	L'	M	2	3
NOAP155N3	<i>P. augusti</i>	Peña Baya	M	L'	M	2	3
NOAP154N3	<i>P. augusti</i>	Peña Baya	M	L'	M	2	3
NOAP154N10	<i>P. augusti</i>	Peña Baya	M	L'	M	2	3
NOAP216N1	<i>P. augusti</i>	T60	M	L'	M	2	3
NOAP216N9	<i>P. augusti</i>	T60	M	L'	M	2	3
NOAP216N2	<i>P. augusti</i>	T60	M	L'	M	2	3
NOAP229N1	<i>P. augusti</i>	QT	M	L'	M	2	3
NOAP216N4	<i>P. augusti</i>	T60	M	L'	M	2	3
NOAP216N7	<i>P. augusti</i>	T60	M	L'	M	2	3
NOAP215N1	<i>P. augusti</i>	T60	M	L'	M	2	3
NOAP106N3	<i>P. augusti</i>	QT	N	N'	I	1	5
NOAP56N1	<i>P. augusti</i>	QT	N	N'	P	4	6
NOAP227N3	<i>P. augusti</i>	QT	N	P	I	1	7
T46N1Paug	<i>P. augusti</i>	LP	N	U	P	4	10
T46N2Paug	<i>P. augusti</i>	LP	N	U	P	4	10
NOAP97N6	<i>P. augusti</i>	QT	O	L	N	1	11
NOAP97N1	<i>P. augusti</i>	QT	O	L	N	1	11
T29N3Paug	<i>P. augusti</i>	QT	O	L	N	1	11
NOAP97N3	<i>P. augusti</i>	QT	O	L	N	1	11
NOAP104N4	<i>P. augusti</i>	QT	O'	L	N	1	11
NOAP224N3	Desconocido 2	SL	O	L	N	1	11
NOAP48N1	<i>Desmodium</i> spp.	LL	O	L	N	1	11
NOAP116N3	<i>P. augusti</i>	QT	O	L	O	1	12
T49N2Paug	<i>P. augusti</i>	QT	O	L	O	1	12
T49N3Paug	<i>P. augusti</i>	QT	O	L	O	1	12
NOAP228N5	<i>Desmodium</i> spp.	QT	O	L	O	1	12
NOAP223N2	Desconocido 1	SL	O	M	J		13
NOAP142N1	<i>P. augusti</i>	QT	O'	M	J	1	13
NOAP226N4	<i>Eriosema</i> spp.	SL	O	M	J	1	13
NOAP232N1	<i>Macropitium</i> spp.	QT	O	M	J	1	13
NOAP232N3	<i>Macropitium</i> spp.	QT	O	M	J	1	13
NOAP102N2	<i>P. augusti</i>	QT	P	M	J	1	14
NOAP106N4	<i>P. augusti</i>	QT	P	M	J	1	15

NOAP102N1	<i>P. augusti</i>	QT	P	M	J	1	15
T29N6Paug	<i>P. augusti</i>	QT	P	M	J	1	15
NOAP102N4	<i>P. augusti</i>	QT	Q	M	O	1	16
NOAP166N1	<i>P. augusti</i>	QT	Q	M	O	1	16
NOAP227N1	<i>P. augusti</i>	QT	Q	T	V	1	17
NOAP237N1	<i>Crotalaria</i> spp.	RB	Q	T	V	1	17
NOAP107N3	<i>P. augusti</i>	QT	R	N	I	1	18
NOAP153N1	<i>P. augusti</i>	QT	S		N	1	19
NOAP106N2	<i>P. augusti</i>	QT	S	O	N	1	19
NOAP156N1	<i>P. augusti</i>	PB	S	O	N	1	19
NOAP97N2	<i>P. augusti</i>	QT	S	O	N	1	19
T29N1Paug	<i>P. augusti</i>	QT	S	O	N	1	20
NOAP19N1	<i>P. augusti</i>	Yutumayo	T	-	Q	3	22
NOAP223N1	<i>Desconocido 1</i>	SL	M	Q	N	3	23
NOAP237N4	<i>Crotalaria</i> spp.	RB	N	P'	P	1	24
NOAP177N1	<i>Desmodium</i> spp.	QT	N	P'	P	4	24
NOAP244N1	<i>Macroptilium</i> spp.	San Lorenzo	N	P'	R		25
NOAP226N2	<i>Eriosema</i> spp.	SL	N	S	S	1	26
NOAP228N4	<i>Desmodium</i> spp.	QT	S	O	O	1	27
NOAP239N1	<i>Centrosema</i> spp.	RB	U	M	J	1	28
NOAP224N2	<i>Desconocido 2</i>	SL	U	N'	Q	3	29
NOAP225N5	<i>Desconocido 3</i>	SL	U	N'	Q	3	29
NOAP221N1	<i>Desmodium</i> spp.	SL	U	N'	Q	3	29
NOAP222N1	<i>Macroptilium</i> spp.	SL	U	N'	Q	3	29
NOAP241N1	<i>Chaemecristo</i> spp.	San Lorenzo	W	U	T	-	30
NOAP112N6	<i>Desmodium</i> spp.	QT	-	J	U	1	31
NOAP235N1	<i>Chaemecristo</i> spp.	QT	-	S	N	3	32

Tabla 6: Análisis RFLP del gen *nifH* de aislamientos de leguminosas silvestres. Se muestran los perfiles de restricción, de los bradirizobios aislados de leguminosas silvestres del NOA, obtenidos con las enzimas *MspI*, *CfoI* y *HaeIII*. Se indican también los genotipos de 16S ADNr y *nifH*-tipos, correspondientes.

* Los sitios fueron abreviados de la siguiente forma: QT es Quebrada del Toro. PB es Peña Baya. LL es Los Laureles. RB es Río Blanco. SL es San Luis. T60 Quebrada del Toro, dirección San Antonio de Los Cobres. C es Cerrillos. LP Los Pulares

Leguminosa	Sitios de recolección ^a	<i>MspI</i>	<i>CfoI</i>	Alelo de 16S ADNr	<i>nodC</i> -tipo	
Cepas						
USDA61		A	A	4	1	
USDA76		A	A	4	1	
USDA110		B	B	1	2	
Aislamientos						
NOAP19N1	<i>P. augusti</i>	Yutumayo	B	J	3	3
NOAP221N1	<i>Desmodium</i> spp.	SL	B	J	3	3
NOAP106N2	<i>P. augusti</i>	QT	C	C	1	4
NOAP97N2	<i>P. augusti</i>	QT	C	C	1	4
NOAP47N1	<i>P. augusti</i>	PB	C	C	1	4
NOAP156N1	<i>P. augusti</i>	PB	C	C	1	4
NOAP153N1	<i>P. augusti</i>	QT	C	C	1	4
T29N1Paug	<i>P. augusti</i>	QT	C	C	1	4
NOAP224N1	<i>Desconocido 2</i>	SL	C	E	-	5
NOAP97N1	<i>P. augusti</i>	QT	C	E	1	5
T29N3Paug	<i>P. augusti</i>	QT	C	E	1	5
NOAP104N4	<i>P. augusti</i>	QT	C	E	1	5
NOAP97N7	<i>P. augusti</i>	QT	C	E	1	5
T49N2Paug	<i>P. augusti</i>	QT	C	E	1	5
NOAP116N3	<i>P. augusti</i>	QT	C	E	1	5
NOAP97N6	<i>P. augusti</i>	QT	C	E	1	5
NOAP97N3	<i>P. augusti</i>	QT	C	E	1	5
T49N3Paug	<i>P. augusti</i>	QT	C	E	1	5

NOAP224N3	Desconocido 2	SL	C	E	1	5
NOAP228N5	<i>Desmodium</i> spp.	QT	C	E	1	5
NOAP48N1	<i>Desmodium</i> spp.	LL	C	E	1	5
NOAP177N5	<i>Desmodium</i> spp.	QT	C	E	1	5
NOAP83N1	<i>Desmodium</i> spp.	QT	C	E	1	5
T29N6Paug	<i>P. augusti</i>	QT	D	D	1	6
T48N1Paug	<i>P. augusti</i>	CB	D	D	1	6
NOAP142N1	<i>P. augusti</i>	QT	D	D	1	6
NOAP239N1	<i>Centrosema</i> spp.	RB	D	D	1	6
NOAP226N4	<i>Eriosema</i> spp.	SL	D	D	1	6
NOAP106N4	<i>P. augusti</i>	QT	E	D	1	7
NOAP102N1	<i>P. augusti</i>	QT	E	D	1	7
NOAP154N3	<i>P. augusti</i>	PB	F	F	2	8
NOAP154N10	<i>P. augusti</i>	PB	F	F	2	8
NOAP155N3	<i>P. augusti</i>	PB	F	F	2	8
NOAP215N1	<i>P. augusti</i>	T60	F	F	2	8
NOAP216N9	<i>P. augusti</i>	T60	F	F	2	8
NOAP216N1	<i>P. augusti</i>	T60	F	F	2	8
NOAP216N6	<i>P. augusti</i>	T60	F	F	2	8
NOAP216N4	<i>P. augusti</i>	T60	F	F	2	8
NOAP155N1	<i>P. augusti</i>	PB	F	F	2	8
NOAP154N2	<i>P. augusti</i>	PB	F	F	2	8
NOAP154N1	<i>P. augusti</i>	PB	F	F	2	8
NOAP106N3	<i>P. augusti</i>	QT	G	G	1	9
NOAP227N3	<i>P. augusti</i>	QT	G	G'	1	9
NOAP100N5	<i>P. augusti</i>	QT	G	H	3	10
NOAP80N1	<i>P. augusti</i>	QT	G	L	1	11
NOAP193N2	<i>P. augusti</i>	C	H	C	1	12
NOAP100N1	<i>P. augusti</i>	QT	H	H	1	13
NOAP227N1	<i>P. augusti</i>	QT	I	L	1	14
NOAP214N4	<i>P. augusti</i>	QT	K	M	1	15
NOAP94N2	<i>Desmodium</i> spp.	QT	K	M	1	15
NOAP94N6	<i>Desmodium</i> spp.	QT	K	M	1	15
NOAP228N3	<i>Desmodium</i> spp.	QT	K	N	-	16
NOAP225N6	<i>Desconocido</i> spp.	SL	M	O	3	17

Tabla 7: Análisis RFLP del gen *nodC* de aislamientos de leguminosas silvestres. Se muestran los perfiles de restricción de los bradirizobios aislados de leguminosas silvestres del NOA obtenidos con las enzimas *MspI* y *CfoI*. Se indican también los genotipos de 16S ADNr y *nodC*-tipos, correspondientes.

* Los sitios fueron abreviados de la siguiente forma: QT es Quebrada del Toro. PB es Peña Baya. LL es Los Laureles. RB es Río Blanco. SL es San Luis. T60 Quebrada del Toro, dirección San Antonio de Los Cobres. C es Cerrillos. LP es Los Pulares. CH es Chorro Blanco.

Las conclusiones del análisis de los datos de RFLP de los genes simbióticos se resumen a continuación:

1. Los perfiles de *nifH* y *nodC* de los aislamientos fueron diferentes a los de las cepas de referencia.
2. Los aislamientos pertenecientes a un grupo alélico de 16S ADNr presentaron sus propios genotipos de *nifH* y *nodC* (Tablas 6 y 7). Además, algunos fueron encontrados en aislamientos provenientes de leguminosas diferentes. Por ejemplo, el *nifH*-tipo 13 de aislamientos de *Macroptilium* spp., *Eriosema* spp., *P. augusti* y una especie de leguminosa no identificada, o el *nifH*-tipo 29 encontrado en distintas especies de leguminosas colectadas en San Luis, Salta, aunque la mayoría fue identificado en aislamientos provenientes de distintos sitios de recolección.

3. Observamos que los aislamientos de una misma planta, por ejemplo las plantas 224 y 228, presentaron distintos genotipos *nifH* y *nodC*, indicando que ciertos niveles de diversidad se encuentran en entornos muy pequeños.
4. Los bradirizobios con el alelo de *B. japonicum* representan la mayor diversidad de perfiles de *nifH* y *nodC* (Tablas 6 y 7), aunque el grado de variabilidad del *nodC* es menor que el del gen *nifH*. Así, algunos aislamientos tienen el mismo *nodC*-tipo pero diferente *nifH*-tipo. Por ejemplo, los aislamientos T29N3Paug y NOAP116N3 comparten el *nodC*-tipo 5 y difieren en sus *nifH*-tipos 11 y 12, respectivamente. Del mismo modo los aislamientos NOAP239N1, T29N6Paug, T48N1Paug, NOAP142N1 y NOAP226N4, comparten el *nodC*-tipo 6, sin embargo sus *nifH*-tipos son diferentes. Por lo tanto se podría concluir que los genes *nodC* y *nifH* no se encuentran ligados.
5. El grado de variabilidad de los genes *nodC* y *nifH* de la población aislada de *P. augusti* es superior al de los aislamientos de *P. vulgaris* que fuera presentado en el Capítulo 4. Efectivamente, en rizobios de poroto se identificaron cuatro genotipos de *nodC* y sólo uno de *nifH*, mientras que en los de *P. augusti* demostramos la ocurrencia de 15 alelos de *nifH* y 12 de *nodC*.
6. La mayoría de los aislamientos analizados provienen de leguminosas recolectados en una zona de la Quebrada del Toro acotada a unos pocos metros. Esto demuestra que la diversidad se revela como muy amplia aún en ecosistemas de dimensiones reducidas, y que esa región de la Quebrada del Toro encierra una germoplasma muy rico en secuencias simbióticas.

Caracterización de la molécula señal de los rizobios nodulantes de *P. augusti*

La cualidad de los rizobios de asociarse simbióticamente con leguminosas determina que su caracterización comprenda además ensayos que examinan rasgos asociados a esa propiedad, tales como el rango de planta hospedadora a través de ensayos de inoculación y la caracterización de las moléculas participantes en la asociación simbiótica (Spaink *et al.*, 1992). En este trabajo realizamos una caracterización preliminar del factor Nod de los bradirizobios aislados de *P. augusti* representativos de los Genotipos 16S ADNr 1, 2 y 3, para lo cual en primer término se evaluaron sustancias del tipo flavonoides y exudados radiculares en sus capacidades para inducir la producción de la molécula señal *in vitro*. En general, la inducción se logra incubando los rizobios provenientes de un cultivo en fase exponencial temprana en un medio suplementado con un flavonoide o exudado de raíz o semilla, y en

presencia de un precursor radiactivo. Posteriormente se realiza una extracción del medio con n-butanol, la cual se analiza por cromatografía en capa fina (TLC). El factor Nod se revela por autoradiografía de la placa TLC.

En un primer ensayo usamos el flavonoide genisteína, el cual fue usado por Spaink *et al.* con resultados satisfactorios en la inducción de bradirizobios (1992). El resultado de este ensayo se muestra en la Figura 14 A. Algunos aislamientos de los Genotipos 1 y 3 producen una o dos bandas de baja intensidad (Figura 14A). La banda hidrofílica, de mayor migración, fue observada en todos los aislamientos, pero no en *B. japonicum*, USDA110 (Datos no mostrados). *B. japonicum* presentó una banda muy débil en la posición correspondiente a las moléculas hidrofóbicas. En algunos casos (Por ejemplo NOAP6N1 y NOAP155N3) no se detectó señal alguna. Este resultado que lo atribuimos a una capacidad inductora baja, motivó el ensayo de otras sustancias inductoras.

En otro ensayo se usaron extractos de semillas de leguminosas (Barbour *et al.*, 1991). En este sentido el uso de semillas de *P. augusti* presentó el impedimento de su disponibilidad como para extraer cantidades suficientes. Dado que nuestros ensayos de nodulación mostraron que los aislamientos de *P. augusti* nodulan poroto (Ver más adelante página 170), lo cual indicó que poroto exuda compuestos que inducen la nodulación por esos aislamientos, se encaró entonces la preparación de extractos de semillas y exudado de raíces de *Phaseolus vulgaris* var. *vulgaris* para su ensayo como inductores.

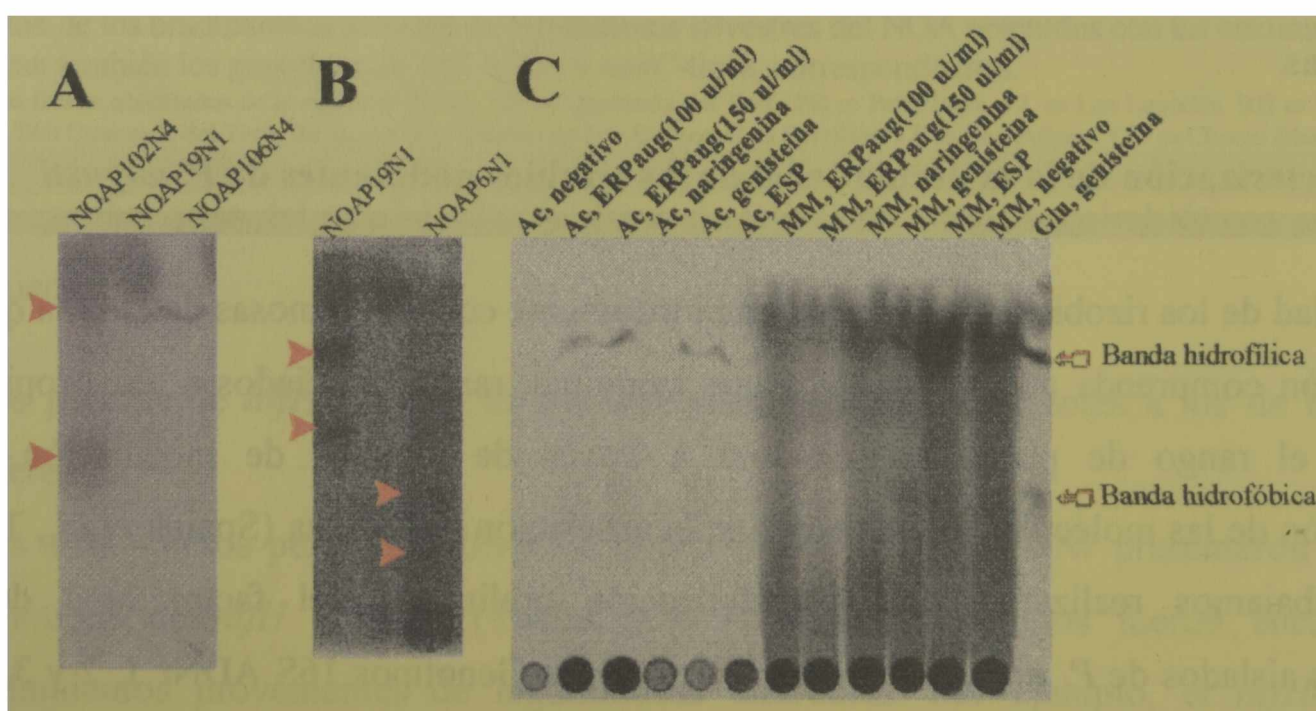


Figura 14: Caracterización de la molécula señal de aislamientos de *P. augusti* mediante TLC. Se muestran las autoradiografías de los perfiles del factor Nod de los aislamientos de *P. augusti*. A NOAP102N4 (Gentotipo 1), NOAP106N4 (Gentotipo 1) y NOAP19N1 inducidos con genisteína (Gentotipo 3). B- NOAP19N1 (Gentotipo 3) y NOAP6N1 (Gentotipo 2) inducidos con extracto de semillas de poroto. C NOAP19N1 (Gentotipo 3), inducido con exudado radical de *P. augusti* (ERPaug) con distintas concentraciones, naringenina, genisteina y exudado de semilla de poroto (ESP). Los precursores utilizados fueron: acetato (AC), metil metionina (MM) y glucosamina (Glu).

El resultado del ensayo mostró que la mayoría de los aislamientos acumularon factor Nod en respuesta al extracto de semilla de poroto. Contrariamente, el resultado con exudado de raíz fue negativo. El perfil del aislamiento Genotipo 2 NOAP6N1 consistió en dos bandas intensas pero de bordes difusos cuyas migraciones en la placa resultaron diferentes a las de las bandas inducidas por los aislamientos del Genotipo 1 y 3 (Figura 14B). Como fue descrito anteriormente el Genotipo 2 a diferencia de los otros genotipos identificados en nuestros bradirizobios, fue aislado únicamente de *P. augusti*. El resultado del análisis del factor Nod agrega otra característica que distingue al Genotipo 2. Se podría especular que ese factor Nod está asociado a la especificidad por *P. augusti*. Los perfiles de los aislamientos de los Genotipos 1 y 3 son iguales, y dado que estos aislamientos fueron obtenidos de varias leguminosas este resultado indica que ese perfil se correspondería con un factor(es) propio de un rizobio promiscuo tal como fuera encontrado con la cepa NGR234 (Pueppke y Broughton, 1999).

Se realizó un ensayo dirigido a evaluar el efecto de diferentes precursores e inductores sobre el perfil de bandas obtenido con los Genotipos 1 y 3. Con este propósito se ensayaron los precursores glucosamina, acetato y metil metionina y los inductores naringenina, genisteina, exudado radical de *P. augusti* y extracto de semillas de poroto. La autoradiografía de la Figura 14C muestra el resultado del ensayo con el aislamiento NOAP19N1 (Genotipo 3). En todos los casos se obtuvo el mismo perfil, lo cual indicaría que la naturaleza del precursor o del inductor utilizado no tiene efecto alguno sobre la calidad de los factores producidos. La incubación con metil-metionina resultó en perfiles con una pobre resolución, y además el control sin inductor también presentó bandas, indicando que fue incorporado a través de otras rutas metabólicas en compuestos distintos a metabolitos Nod.

*Podemos concluir que el factor de nodulación de los aislamientos genotipo 1 y 3 es similar al de *B. japonicum*, mientras que los aislamientos Genotipo 2 producen un factor de nodulación diferente al de Genotipo 1 o 3.*

Caracterización fenotípica: Utilización de hidratos de carbono y resistencia intrínseca a antibióticos

Se ensayaron algunos aislamientos en sus capacidades para utilizar monosacáridos como única fuente de carbono y para tolerar antibióticos. Se experimentaron los azúcares L-arabinosa, manitol, fructosa y glicerol que fueron seleccionados a partir de trabajos realizados por otros

investigadores para caracterizar el género *Bradyrhizobium* (Marsudi *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 1995; Kuykendall *et al.*, 1988 y 1992, Stower *et al.*, 1985).

El resultado del análisis de 17 aislamientos de *P. augusti*, representantes de los cuatro alelos de 16S ADN_r, mostró que todos fueron capaces de crecer con los azúcares ensayados (Tabla 8). Se observó que el crecimiento de algunos aislamientos fue más pobre con L-arabinosa. Este resultado está de acuerdo con Marsudi *et al.* (1999) quienes describen un crecimiento escaso a moderado cuando ensayan aislamientos de crecimiento rápido o lento con L-arabinosa. Por otra parte, según lo descrito por Xu *et al.*, (1995) los bradirizobios de la especie *B. liaoningense* son incapaces de utilizar fructosa, manitol y glicerol, mientras que en nuestro caso los aislamientos de *P. augusti* utilizan todos estos azúcares excluyendo la posibilidad de que alguno de nuestros aislamientos pertenezca a esa especie.

Se ha demostrado que algunas cepas de la especie *B. elkanii*, a diferencia de *B. japonicum*, toleran concentraciones altas de antibióticos (Kuykendall *et al.*, 1988 y 1992). Esta característica fue evaluada en los aislamientos agrupados en los alelos 16S ADN_r de *B. elkanii* y *B. japonicum*. Por otro lado, se ensayaron concentraciones de antibióticos menores para estudiar la diversidad en la población clasificada como *B. japonicum*. Se evaluó el crecimiento en medio YEM-rc suplementado con los siguientes antibióticos (Las concentraciones están dadas en µg/ml): Rifampicina (50 y 500), ácido nalidíxico (25 y 50), estreptomina (10, 100), tetraciclina (100) y cloramfenicol (500).

Se encontró que el aislamiento NOAP56N1 (Genotipo 4) tolera todos los antibióticos en las concentraciones ensayadas, de manera similar a la cepa de referencia USDA76; esto muestra la correlación entre rasgos fenotípicos y genotípicos. Por otro lado, se observó también que la cepa *B. elkanii* USDA94 es sensible a ácido nalidíxico (50 µg/ml) tal como fuera descrito por Kuykendall *et al.* (1988). Los aislamientos Genotipos 1, 2 y 3 ensayados, resultaron en su mayoría susceptibles a las concentraciones elevadas de antibióticos, y sólo unos pocos toleraron 50 µg/ml de ácido nalidíxico, y 100 µg/ml tetraciclina, respectivamente. El resultado de la resistencia a las tres concentraciones menores de los antibióticos que fueron ensayadas (estreptomina 10 µg/ml, ácido nalidíxico 25 µg/ml y rifampicina 50 µg/ml) mostró mayor variabilidad entre aislamientos cuyo alelo de ARDRA corresponde con el Genotipo 1 (Tabla 8).

Características testadas	Genotipos definidos por ARDRA				<i>B. japonicum</i> ^b	<i>B. elkanii</i> ^c
	1 (n=10) ^a	2 (n=5)	3 (n=1)	4 (n=1)		
Utilización como única fuente de carbono:						
L- Arabinosa	+ ^d	+	+	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+	+	+
D-Fuctosa	+	+	+	+	+	+
Resistencia a antibióticos:						
Rifampicina (50 µg . ml ⁻¹)	(6/10) ^e	-	- ^d	+	(1/2)	+
Rifampicina (500 µg . ml ⁻¹)	-	-	-	+	-	+
Acido Nalidixico (25 µg . ml ⁻¹)	(5/10)	(3/5)	+	+	+	+
Acido Nalidixico (50 µg . ml ⁻¹)	(4/10)	-	+	+	-	+ ^f
Estreptomina (10 µg . ml ⁻¹)	(6/10)	+	+	+	+	+
Estreptomina (100 µg . ml ⁻¹)	(2/10)	-	-	+	-	+
Tetraciclina (100 µg . ml ⁻¹)	(3/10)	(3/5)	-	+	-	+
Cloranfenicol (500 µg . ml ⁻¹)	(1/10)	(2/5)	-	+	-	+

Tabla 8: Caracterización fenotípica de la población de rizobios nodulantes de *P. augusti*. Resultados de los ensayos de caracterización fenotípica de los aislamientos de *P. augusti*.

^a n es el número de aislamientos examinados

^b cepas USDA110 y USDA59.

^c Cepas USDA76, y USDA94.

^d Con los signos + o - se indica que todos los n resultaron positivos o negativos, respectivamente.

^e Se indica la proporción de aislamientos positivos

^f La cepa USDA94 no fue capaz de crecer en ácido nalidixico (50 µg . ml⁻¹)

Los resultados de un ensayo similar realizado con los aislamientos de *Crotalaria* spp., *Desmodium* spp. y *Vigna* spp. se muestran en la Tabla 9. Las únicas diferencias observadas con respecto a los aislamientos de *P. augusti* fueron en los niveles de tolerancia a los antibióticos. Así por ejemplo, se encontró que dos aislamientos con el alelo de *B. japonicum* toleraron hasta 500 µg. ml⁻¹ de rifampicina.

Características ensayadas	Genotipos definidos por 16S ADN _r -RFLP			<i>B. japonicum</i>	<i>B. elkanii</i>
	1 (n=7) ^a	3 (n=2)	4 (n=9)		
Utilización como única fuente de carbono:					
L- Arabinosa	+ ^b	+	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+	+
D-Fructosa	+	+	+	+	+
Resistencia a antibióticos (µg ml⁻¹):					
Rifampicina (500)	(2/7) ^c	+	(7/9)	-	+
Acido Nalidixico (50)	(3/7)	+	(8/9)	-	+
Estreptomina (10)	+	(1/2)	+	+	+
Estreptomina (100)	-	-	+	-	+
Tetraciclina (100)	-	(1/2)	(8/9)	-	+

Tabla 9: Resultados del análisis fenotípico de bradirizobios aislados de leguminosas silvestres en el NOA. Los aislamientos analizados fueron agrupados según la clasificación de 16S ADN_r.

^a n es el número de aislamientos examinados.

^b Con los signos + o - se indica que todos los n resultaron positivos o negativos, respectivamente.

^c Se indica la proporción de aislamientos positivos

Las características fenotípicas de los rizobios de crecimiento lento, representantes de los aislamientos de distintas leguminosas silvestres, confirmaron su ubicación dentro del género *Bradyrhizobium* y demostraron que los grupos Genotipo 1 y Genotipo 3 presentan rasgos que caracterizan a la especie *B. japonicum*, mientras que los aislamientos de Genotipo 4 de *B. elkanii*.

Rango de planta hospedante

Se realizaron ensayos de inoculación de varias leguminosas para determinar el rango de planta hospedante de los aislamientos representativos de los cuatro alelos de 16S ADNr de *P. augusti*. Se ensayó la capacidad de nodular *Phaseolus vulgaris*, *Glicine max* (cultivares comerciales y el primitivo Peking), *Medicago sativa*, *Lupinus albus*, *Lupinus mutabilis*, *Macroptilium* spp., *Arachis hypogea*, *Crotalaria* spp, *Leucaena leucocephala*, *Phaseolus lunatus* y *Vigna* spp. Los resultados de los ensayos se muestran en la Tabla 10. En cada ensayo se incluyeron controles positivos (cepas conocidas que nodulan la leguminosa) y negativos (sin inocular).

Hospedador	Genotipo 1	Genotipo 2	Genotipo 3	Genotipo 4
<i>P. augusti</i>	+ ^a	+	+	+
<i>Macroptilium atropurpureum</i>	+	+	+	+
<i>P. vulgaris</i> ^c	+ (80) ^b	+	+	+
<i>P. lunatus</i>	+	nd	+	+
<i>Medicago sativa</i>				
<i>Vigna</i> spp.	+ (70) ^b	+ (50) ^b	+	+
<i>Lupinus albus</i>	+ (20) ^b		+	
<i>Lupinus mutabilis</i>	+		+	nd ^d
<i>Leucaena leucocephala</i>				
<i>Glycine max</i> , williams				+
<i>Glycine max</i> , Peking	+	+	+	+
<i>Arachis hypogea</i>	+		+	

Tabla 10: Rango de planta hospedante de los aislamientos de *P. augusti*. Resultados de los ensayos de nodulación con los aislamientos representativos de cada Genotipo de 16S ADNr.

^a Todos los aislamientos estudiados establecieron simbiosis con esa leguminosa

^b Se indica la proporción de aislamientos positivos

^c Los nódulos formados con esta leguminosa fueron pequeños, con el interior blanco y en algunos caso deformes pero de mayor tamaño.

^d No determinado

Todos los aislamientos confirmaron la capacidad de nodular la planta de origen. La mayoría de los aislamientos fueron capaces de nodular *P. vulgaris*, *P. lunatus*, *Vigna* spp., *Arachis hypogea*, *Macroptilium* spp. y soja (cultivar Peking).

El tamaño de los nódulos formados en poroto fue variable con el interior de color blanco (Figura 15A y B). El examen microscópico de un corte transversal permitió observar células del

nódulo vacías, sin bacteroides características de los nódulos inefectivos (Figura 15C). En contraste las células de un nódulo de *P. augusti* se encuentran ocupadas por bacteroides (Figura 15D).

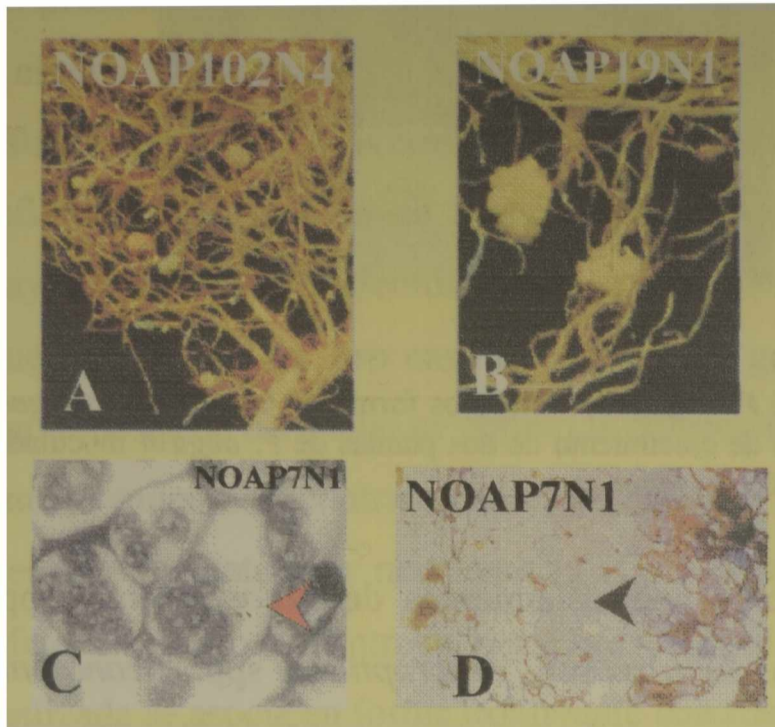


Figura 15: Ensayos de nodulación con aislamientos de *P. augusti*. En los paneles A y B se muestran los nódulos formados en poroto por dos aislamientos de *P. augusti*: NOAP102N4 (Genotipo 1) y NOAP19N1 (Genotipo 3). Se observan nódulos blancos unos pequeños y otros grandes en forma de racimos. En los paneles C y D se muestran las observaciones microscópicas de dos cortes transversales de nódulos de *P. vulgaris* y *P. augusti* respectivamente, que fueron inoculados con el mismo aislamiento (NOAP7N1). Con una punta de flecha se muestran las células de los nódulos. En el caso de *P. augusti* las mismas se ven azules por la presencia de bacteroides en su interior, mientras que las de poroto se ven vacías de bacteroides.

Contrariamente a lo observado con *P. vulgaris*, los nódulos formados en *P. lunatus*, una leguminosa filogenéticamente más cercana a *P. augusti* (Delgado-Salinas *et al.*, 1999) presentaron un aspecto característico de los nódulos efectivos.

Se encontró que los rizobios del Genotipo 1 y 3 nodulan maní, resultando en nódulos pequeños de color marrón (Figura 16A). Los aislamientos del Genotipo 2 y 4 en cambio, no nodularon maní. Ningún aislamiento fue capaz de establecer simbiosis con los cultivares comerciales de soja.

De manera recíproca se evaluó a *P. augusti* en su capacidad para establecer simbiosis con rizobios pertenecientes a especies que se encuentran formando parte de la comunidad de los suelos del NOA. Así, *P. augusti* fue inoculado con *R. etli*, *R. tropici* B, *S. teranga*, *B. elkanii*, *S. fredii*, *B. japonicum*, *S. saheli* y *R. leguminosarum*. El resultado de este ensayo mostró que las especies *R. etli*, *B. elkanii*, *B. japonicum*, *S. fredii* y *R. tropici* son capaces de formar nódulos en *P. augusti*. No se observó nodulación con *S. teranga*, *S. saheli* o *R. leguminosarum*. Los aislamientos caracterizados como *R. etli*, *S. fredii* y *R. tropici* formaron nódulos blancos y de aspecto similar a los nódulos inefectivos, lo cual se correlacionó con un crecimiento deficiente de la planta, hojas cloróticas y tamaño pequeño (Figura 16B).

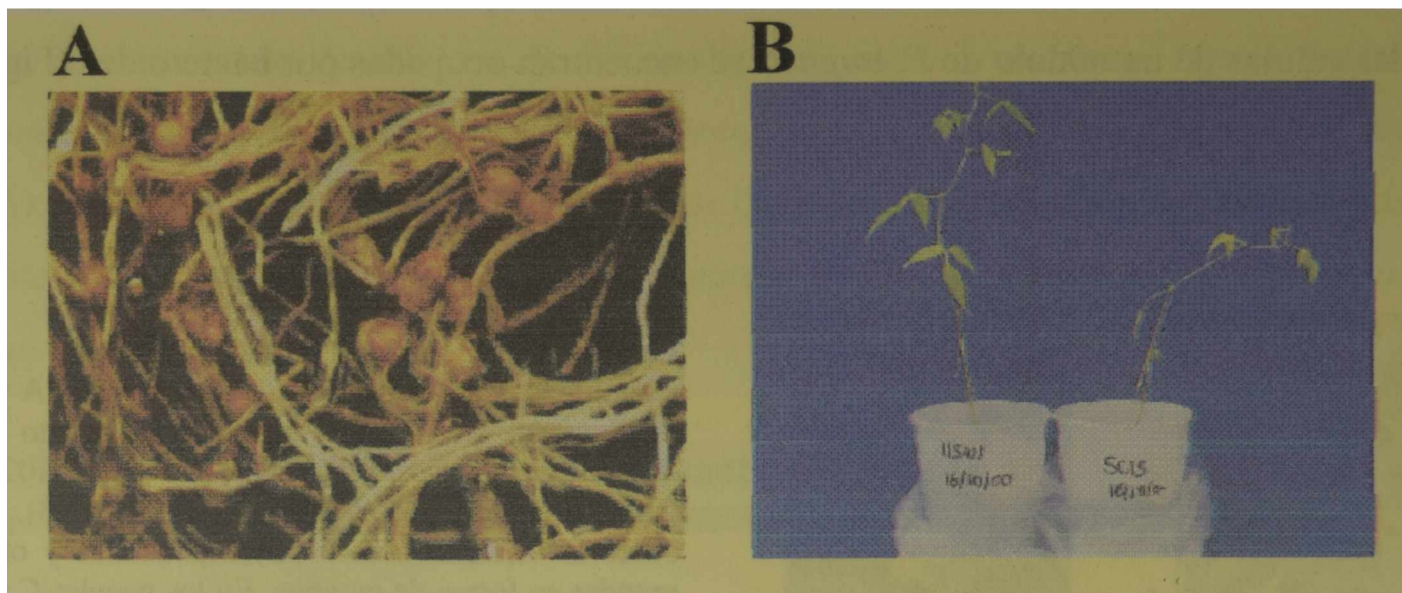


Figura 16: Ensayos de nodulación con aislamientos de *P. augusti*. A- Nódulos formados en *Arachis hypogaea* inoculada con NOAP227N1. B- Se muestra la diferencia de crecimiento de dos plantas de *P. augusti* inoculadas con NOAP115N1 (aislado de *P. augusti*) y Sc15 (aislado de *P. vulgaris*).

Se realizaron también, ensayos de inoculación con aislamientos de *Calopogonium* spp., *Crotalaria* spp., *Desmodium* spp., *Eriosema* spp., *Eritrina* spp., *Macroptilium* spp., *Neonotonia* spp., *Vigna* spp.. Los resultados de estos ensayos mostraron que en general los aislamientos de crecimiento lento nodulan *P. vulgaris*, con nódulos pequeños de color blanco iguales a los observados usando aislamientos de *P. augusti* (Datos no mostrados).

Estos bradirizobios no nodulan, excepto el aislamiento NOAP94N4 de *Desmodium* spp. Los aislamientos ensayados formaron nódulos efectivos en *Arachis* spp., lupinus, *Macroptilium* spp. y *Vigna* spp.. Ningún aislamiento noduló los cultivares comerciales de soja, per, algunos nodularon efectivamente el cultivar más primitivo Peking. Este grupo de bradirizobios y los aislamientos de *M. polimorpha* no nodularon alfalfa (*Medicago sativa*).

Discusión

En el capítulo anterior se examinó la diversidad de la población asociada a *Phaseolus vulgaris* en el NOA y el resultado indicó que la diversidad está restringida a la variabilidad intraespecífica de *R. etli* y *R. leguminosarum*. Dado que el NOA aloja a una flora muy rica de leguminosas, se espera que *P. vulgaris* tenga la potencialidad de interactuar con los microsimbiontes de esas leguminosas y otros presentes en el suelo, lo cual probablemente represente una proporción grande de la diversidad rizobiana. Con el propósito de aproximarnos a la descripción de esa diversidad que permanece al margen de la revelada por *P. vulgaris*, encaramos el estudio de 335 aislamientos obtenidos de leguminosas silvestres anuales y

perennes, herbáceas y arbustivas. Los resultados presentados en este capítulo nos permitieron avanzar en los objetivos propuestos. Aplicamos en esta tarea, procedimientos similares a los usados en el Capítulo 4 sobre los aislamientos de poroto. Sin embargo, la ubicación taxonómica e identificación de filogenias presentó ciertas limitaciones. El género *Rhizobium* se caracteriza por presentar una variabilidad del gen 16S ARNr que permite una clasificación que acompaña a la especiación. Por el contrario, el gen 16S ARNr de bradirizobios es muy poco polimórfico, y aislamientos de muy diversas leguminosas convergen en unos pocos alelos. Así, sólo han sido definidas tres especies de bradirizobios (*B. japonicum*, *B. elkanii* y *B. liaoningense*). La mayoría de los aislamientos fueron bradirizobios agrupados en cuatro alelos de 16S ARNr. Nuevamente, en nuestro caso el análisis del gen 16S ARNr no acompaña a la diversidad de leguminosas de las cuales se obtuvo la colección pero es coincidente con los resultados de otros autores quienes encontraron que las especies de leguminosas que se asocian a rizobios de crecimiento lento son mayoritarias (Gao *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1997). Sin embargo, a diferencia de lo encontrado por Gao *et al.* (1994) en el NOA cada especie de leguminosa analizada se asocia en forma excluyente con rizobios o bradirizobios.

Dos de los cuatro alelos de 16S ARNr son asimilables a las especies *B. japonicum* y *B. elkanii*, nodulantes de soja. Si bien, demostramos que estos aislamientos son capaces de formar nódulos en varias leguminosas, no formaron nódulos en cultivares comerciales de soja concordante con lo descrito por otros investigadores sobre los bradirizobios aislados de leguminosas distintas de soja (Barrera *et al.*, 1997; Urtz *et al.*, 1996). Este resultado oscurece la clasificación de los bradirizobios, puesto que las especies *B. japonicum* y *B. elkanii* fueron descritas inicialmente como noduladoras de soja, y los rizobios del NOA carecen de esta propiedad, por lo tanto la clasificación taxonómica no refleja las propiedades simbióticas. Sin embargo, nuestros aislamientos nodulan el cultivar de soja más primitivo indicando que este sería más permisivo que los cultivares de soja comerciales. Uno de los otros dos alelos de 16S ARNr no presentó identidad con especies conocidas, mientras que el restante presenta una secuencia quimera con partes de las secuencias de *B. japonicum* y *B. elkanii* y solamente fue encontrado asociado a plantas de *P. augusti*. El alelo de *B. japonicum* fue encontrado predominante en nuestra colección. Resultados similares fueron descritos para aislamientos de *Arachis* spp. y *Vigna* spp., lo cual indicaría que dentro de ese alelo se encuentran comprendidas poblaciones muy heterogéneas con capacidad de nodular una diversidad de leguminosas.

Para superar la limitada divergencia del gen 16S ARNr de bradirizobios, se ha propuesto como criterio alternativo, el análisis de la región intergénica entre los genes ribosomales 16S y 23S ADNr (van Berkum *et al.* 2000). Basados en el análisis de la secuencia intergénica (IGS)

de 62 cepas de bradyrizobios, Willems *et al.* han definido siete genoespecies que muestran una buena correlación cuando se las compara con el agrupamiento resultante del análisis AFLP y homología ADN:ADN (2001). El análisis de la región IGS nos permitió ampliar la diversidad genotípica de los bradirizobios del NOA dentro de cada grupo alélico 16S ARNr y dentro de los aislamientos de una misma leguminosa. Identificamos 28 perfiles de IGS en una población de 117 aislamientos.

La disponibilidad de mayor información de la secuencia intergénica de los aislamientos representativos de cada IGS permitiría realizar comparaciones que podrían resultar en agrupamientos y eventualmente en el establecimiento de relaciones de parentesco. Por ejemplo, en nuestro análisis encontramos que los 9 aislamientos del genotipo 1 que fueron estudiados, caen en dos perfiles RFLP resultantes de la incubación con *HaeIII* pero en 9 perfiles distintos con la enzima *AluI*. De la misma manera, los tres aislamientos examinados pertenecientes al genotipo 2 presentaron el mismo perfil con *HaeIII* pero diferentes perfiles con *AluI*. Esto sugiere que el estudio comparativo y detallado de la IGS podría proveer un número mayor de rasgos basado en variaciones de la secuencia IGS para encarar un agrupamiento.

Aceptando que la probabilidad de experimentar modificación heredable en la secuencia de 16S ADNr es mucho más baja que en la región separadora 16S-23S ADNr, los IGS-tipos compartidos entre los aislamientos con los alelos de 16S ADNr de *B. japonicum* y Genotipo 3, podrían señalar la ocurrencia de un fenómeno de especiación en el cual la secuencia del gen 16S ADNr se modificó antes que la IGS. Por otra parte, también podría señalar que *B. japonicum* y Genotipo 3 representan variantes alélicas de la misma especie.

Se observó también, que algunos aislamientos Genotipo 2 y las cepas de *B. elkanii* USDA46 y USDA76 tienen el mismo IGS-tipo, y algunos aislamientos con el alelo de *B. elkanii* y la cepa USDA94 comparten el IGS-tipo. Como fue demostrado en la página 151, la secuencia de un aislamiento Genotipo 2, constituye una secuencia híbrida entre las especies *B. japonicum* y *B. elkanii*. Sobre la base de estas observaciones proponemos que durante el evento de recombinación de regiones ribosomales la IGS acompañó la translocación de la secuencia de 16S ADNr homóloga a *B. elkanii*.

El análisis de 31 especies de leguminosas silvestres cosechadas en el sitio de la Quebrada del Toro nos permitió elaborar relaciones entre las distintas poblaciones de rizobios. En el caso particular del análisis de la IGS, encontramos perfiles iguales de RFLP entre los aislamientos de distintas especies de leguminosas, lo cual indicaría que un mismo genotipo nodula distintas especies de leguminosas. Por otra parte, muchos de los IGS-tipos que fueron encontrados en los aislamientos de Quebrada del Toro, también fueron hallados en aislamientos provenientes de

otros sitios y recuperados de diferentes leguminosas, demostrando su ubicuidad en la población de bradirizobios. Podemos concluir que en el NOA existe una población de bradirizobios con el mismo nivel de variabilidad intraespecífica que se asocia a distintas leguminosas.

Se estudió la diversidad de los genes *nifH* y *nodC* en los aislamientos de crecimiento lento de varios sitios del NOA y de varias leguminosas silvestres, predominantemente *P. augusti*. El análisis de genes simbióticos ha sido utilizado para establecer relaciones filogenéticas en aislamientos de leguminosas arbóreas de África y América, y en los rizobios nodulantes de poroto (Haukka *et al.*, 1998; Laguerre *et al.*, 2001). Este tipo de análisis no ha sido aplicado al estudio de poblaciones de bradirizobios, y en el estudio descrito en este trabajo hemos ensayado endonucleasas que han permitido en trabajos descritos por otros autores, revelar polimorfismos dentro las secuencias *nodC* y *nifH*. Los resultados demostraron que las poblaciones del NOA representan distintos linajes simbióticos capaces de nodular la misma leguminosa (Por ejemplo *P. augusti*), y que cada fondo genético de alelo 16S ARNr comprende varios linajes simbióticos. Esta incongruencia no fue encontrada entre los aislamientos pertenecientes al genotipo 2, los cuales constituyeron un grupo homogéneo. Las especies *S. fredii* y *B. japonicum* demuestran que es posible encontrar en la naturaleza a dos especies de rizobios con diferentes genotipos *nifH* y *nodC* que son capaces de nodular la misma leguminosa.

Se ha sugerido que la expectativa de encontrar paralelismos entre las filogenias de *nifH* y *nodC*, es baja ya que la filogenia de *nifH* sigue la de 16S ARNr mientras que la de *nodC* se encuentra relacionada con la filogenia de la respectiva planta hospedadora (Dobert *et al.*, 1994). Esta hipótesis parece cumplirse más en bradirizobios que en rizobios de crecimiento rápido, cuyos plásmidos con genes simbióticos facilitan la transferencia genética horizontal. Sin embargo, los resultados del análisis de los aislamientos de cada uno de los fondos genéticos definidos por los alelos de 16S ARNr que denominamos Genotipos 1, 3 y 4, muestran que no necesariamente poseen alelos *nifH* similares. Por otro lado hemos identificado en muchos casos, una asociación entre los genotipos *nifH* y *nodC* en aislamientos pertenecientes a distintos alelos 16S ARNr. Por ejemplo, los aislamientos del Genotipo 1 presentan tipos *nifH* 11 y 12 asociados al tipo *nodC* 5. Esta observación indica que en esos casos los dos genes simbióticos se encontrarían físicamente ligados, y el hecho que esas combinaciones de tipos simbióticos no las hayamos encontrado en más de un fondo genético de 16S ARNr, no nos permite especular en la posibilidad de eventos de transferencia lateral de genes simbióticos entre nuestros aislamientos.

El análisis de los genes *nifH* y *nodC* demostró que ambos son altamente polimórficos en la población de bradirizobios nodulantes de *P. augusti*. Este resultado difiere del obtenido por Laguerre *et al.*, quienes analizaron cepas de bradirizobios de *Lupinus* spp., encontrando que

mientras el gen *nodC* es polimórfico, el gen *nifH* es conservado (2001). Se podría correlacionar esta variabilidad con la capacidad que tienen los aislamientos para nodular la mayoría de las especies leguminosas silvestres recolectadas en el NOA.

Urtz *et al.* (1996) describió la variabilidad de los genes *nifDK* en aislamientos de maní, resultando en una diversidad de perfiles de hibridación. Los autores concluyen que grupos del mismo perfil simbiótico tienen un alto grado de homología al estudiar otras zonas del cromosoma. En contraste con ese hallazgo, los aislamientos del NOA agrupados con el mismo perfil simbiótico mostraron variabilidad en su secuencia intergénica y en los perfiles de *fingerprints*. Ueda *et al.* (1995) examinaron la secuencia de una parte del gen *nodC* (un tercio de la secuencia analizada en este trabajo) de cepas de *B. japonicum* y *B. elkanii*, encontrando que esas poblaciones tienen secuencias diferentes entre sí. Yokoyama *et al.* (1996) encontraron diversidad en los perfiles de hibridación de ADN con una sonda del gen *nodDYABC* en aislamientos provenientes de Thai y Japon. Estos trabajos ponen en evidencia el alto grado de diversidad en los genes simbióticos de los bradirizobios, el cual también fue observado en el NOA.

Las poblaciones de rizobios que en el NOA nodulan *P. augusti* y *P. vulgaris* son diferentes a nivel de género rizobiano. Sin embargo, la asociación simbiótica de ambas leguminosas mostró características comunes, como la de asociarse a una especie predominante, *B. japonicum* y *R. etli* respectivamente, con alto índice de diversidad intraespecífica. Si se comparan los aislamientos *B. japonicum* y *R. etli* del NOA, se encuentra que los bradirizobios son mucho más diversos a nivel de sus genes simbióticos que los aislamientos de *R. etli*. Los ensayos de inoculación en el laboratorio con aislamientos de las dos especies demostraron que se establece nodulación cruzada, lo cual estaría de acuerdo con la producción del factor Nod en respuesta a la incubación con exudado de semilla de poroto. En el NOA, esta nodulación cruzada, no fue observada. Probablemente porque ambas poblaciones nodulan la otra leguminosa de forma inefectiva con lo cual, sería la planta la que seleccione al rizobio efectivo para la fijación de nitrógeno.

En general, concluimos que los resultados de este capítulo enriquecen la base de información sobre la diversidad rizobiana en el NOA. Hemos demostrado que una población de bradirizobios muy heterogénea en sus linajes simbióticos nodulan diversas leguminosas silvestres.

Bibliografía

1. Barbour, W. M., Dennis R. Hattermann, and G. Stacey. 1991. Chemotaxis of *Bradyrhizobium japonicum* to soybean exudates. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2635-2639.
2. Barrera, L. L., M. E. Trujillo, M. Goodfellow, F. J. García, I. Hernández-Lucas, G. Dávila, P. van Berkum, and E. Martínez-Romero. 1997. Biodiversity of bradyrhizobia nodulating *Lupinus* spp. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47:1086-1091.
3. Chen, W. X., Z. Y. Tan, J. L. Gao, Y. Li, and E. T. Wang. 1997. *Rhizobium hainanense* sp. nov., isolated from tropical legumes. *Int J Syst Microbiol.* 47:870-873.
4. (A)de Lajudie, P., A. Willems, G. Nick, F. Moreira, F. Molouba, B. Hoste, U. Torck, M. Neyra, M. D. Collins, K. Lindström, B. Dreyfus, and M. Gillis. 1998. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. *Int J Syst Microbiol.* 48:369-382.
5. (B)de Lajudie, P., E. Laurent-Fulele, A. Willems, U. Torck, R. Coopman, M. D. Collins, K. Kesters, B. Dreyfus, and M. Gillis. 1998. *Allorhizobium undicolla* gen. nov., sp. nov. nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. *Int J Syst Microbiol.* 48:1277-1290.
6. Delgado-Salinas, A., T. Turley, A. Richman, and M. Lavin. 1999. Phylogenetic analysis of the cultivated and wild species of *Phaseolus* (Fabaceae). *Systematic Botanic.* 24:438-460.
7. Dorbert, R. C., B. T. Breil, and E. W. Triplett. 1994. DNA sequence of the common nodulation genes of *Bradyrhizobium elkanii* and their phylogenetic relationship to those of other nodulating bacteria. *MPMI.* 7:564-572.
8. Gao, J. L., J. G. Sun, Y. Li, E. T. Wang, and W. X. Chen. 1994. Numerical taxonomy and DNA relatedness of tropical rhizobia isolated from Hainan province, China. *Int J. Syst Bacteriol.* 44:151-158.
9. Haukka, K., K. Lindström, and J. P. W. Young. 1998. Three phylogenetic groups of *nodA* and *nifH* genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolates from leguminous trees growing in Africa and Latin America. *Appl. Env. Microbiol.* 64:419-426.
10. Judd, A. K., M. Schneider, M. J. Sadowsky, and F. J. de Bruijn. 1993. Use of repetitive sequences and the polymerase chain reaction technique to classify genetically related *Bradyrhizobium japonicum* serocluster 123 strains. *Appl. Env. Microbiol.* 59:1702-1708.
11. Kuykendall L. D., M. A. Roy, J. J. O'Neill, and T. E. Devine. 1988. Fatty acids, antibiotic resistance, and deoxyribonucleic acid homology groups of *Bradyrhizobium japonicum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38:358-361.
12. Kuykendall, L. D., and B. Saxena. 1992. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* 38:501-505.
13. Maidak, B. L., G. J. Olsen, N. Larsen, R. Overbeek, M. J. McCaughey, and C. R. Woese. 1997. The RDP (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res.* 25:109-110.
14. Marsudi, N. D. S., A. R. Glenn, and M. J. Dilworth. 1999. Identification and characterization of fast- and slow-growing root nodule bacteria from South-Western Australian soils able to nodulate *Acacia saligna*. *Soil Biology and Biochemistry.* 31:1229-1238.
15. Nick, G., P. de Lajudie, B. D. Eardly, S. Suomalainen, L. Paulin, X. Zhang, M. Gillis, and K. Lindström. 1999. *Sinorhizobium arboris* sp. nov. and *Sinorhizobium kostiense* sp. nov., isolated from leguminous trees in Sudan and Kenya. *Int J Syst Microbiol.* 49:1359-1368.
16. Pueppke, S. G., and W. J. Broughton. 1999. *Rhizobium* sp. Strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *MPMI.* 12:293-318.
17. Rademaker, J. L. W., B. Hoste, F. J. Louws, K. Kesters, J. Swings, P. Vauterin, and F. J. de Bruijn. 2000. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *Int J syst Evol Microbiol.* 50:665-677
18. Rohlf FJ, 1994. NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system, v. 1.80. Exe. Exeter Software, New York, USA.
19. Rothschild, D. I. 1970. Nodulación en leguminosas subtropicales de la flora argentina. Museo argentino de ciencias Naturales.-Bernardino Rivadavia. Botánica. Tomo III, No 8.
20. Spaink, H. P., A. Aarts, G. Stacey, G. V. Bloemberg, B. J. J. Lugtenberg and E. P. Kennedy. 1992. Detection and separation of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* Nod metabolites using Thin-Layer Chromatography. *MPMI.* 5:72-80.
21. Stoltzfus, J. R., R. So., P. P. Malarvithi, J. K. Ladha, and F. de Bruijn. 1997. Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biological nitrogen fixation. *Plant and Soil.* 197:25-36.
22. Stowers M. D. 1985. Carbon Metabolism in *Rhizobium* species. *Ann. Rev. Microbiol.* 39:89-108.
23. Ueda, T., Y. Suga, N. Yahiro, and T. Matssuguchi. 1995. Phylogeny of Sym plasmids of rhizobia by PCR-based sequencing of a *nodC'* segment. *J. Bacteriol.* 177:468-472.

-
24. Urtz, B. E., and G. H. Elkan. 1996. Genetic diversity among *Bradyrhizobium* isolates that effectively nodulate peanut. *Can. J. Microbiol.* 42:1121-1130.
 25. van Berkum, P., and J. J. Fuhrmann. 2000. Evolutionary relationships among the soybean bradyrhizobia reconstructed from 16S ARNr gene and internally transcribed spacer region sequence divergence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50:2165-2172.
 26. Vinuesa, P., J. W. Rademaker, F. J. de Bruijn, and D. Werner. 1998. Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-Restriction Fragment length Polymorphism Analysis of genes encoding 16S ARNr(16S rDNA) and 16S-23S rDNA Intergenic Spacers, Repetitive extragenic Palindromic PCR genomic fingerprinting and partial 16S rDNA sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2096-2104.
 27. Wang, E. T., P. van Berkum, D. Beyene, X. H. Sui, O. Dorado, W. X. Chen, and E. Martinez-Romero. 1998. *Rhizobium huautlense* sp. nov., symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*. *Int J Syst Microbiol.* 48:687-699.
 28. Wang, E. T., P. van Berkum, X. H. Sui, D. Beyene, W. X. Chen, and E. Martinez-Romero. 1999. Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from Chinese soils and description of *Mesorhizobium amorphae* sp. nov. *Int J Syst Microbiol.* 49:51-65.
 29. Xu, L. M., C. Ge, Z. Cui, J. Li, and H. Fan. 1995. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybean. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45:706-711.
 30. Yokoyama T., S. Ando, T. Murakami, and H. Imai. 1996. Genetic variability of the common *nod* gene in soybean bradyrhizobia isolated in Thailand and Japan. *Can. J. Microbiol.* 42:1209-1218.

Capítulo 6



Capítulo 6

Caracterización de las poblaciones de rizobios nodulantes de *Leucaena leucocephala*

Introducción

La mayoría de las leguminosas tienen la capacidad de asociarse con un grupo genéticamente definido y restringido de rizobios, lo cual significa que el análisis de nódulos de leguminosas silvestres muy probablemente describa las características de los rizobios capaces de nodularlas pero, ignora a otras poblaciones presentes en los suelos. Así, en los capítulos anteriores describimos las poblaciones de rizobios que se encontraron asociadas a *P. vulgaris* var *aborigineus* y otras leguminosas silvestres presentes en el NOA. Con el propósito de estudiar otras poblaciones que también forman parte de la comunidad de los suelos del NOA usamos *Leucaena leucocephala*, un hospedador de amplio rango para recuperar los rizobios de los suelos. Se ha descrito la capacidad de *Leucaena leucocephala* para asociarse a diversos genotipos de rizobios comprendiendo a todos los géneros rizobianos y a algunas de las especies nodulantes de poroto (Sanginga *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1999; de Lajudie *et al.*, 1998; Moreira *et al.*, 1993; Bromanfield *et al.*, 1990). Esta característica justifica el uso de *Leucaena leucocephala* para recuperar del suelo rizobios que no alcanzan a revelarse a través del análisis de los nódulos de poroto ya sea cosechados del campo o en el laboratorio.

Leucaena leucocephala es una leguminosa arbórea originaria de América Tropical perteneciente a la subfamilia *Mimosoideae*, que fue introducida en una región amplia que comprende desde los Estados Unidos hasta América del Sur (CATIE, 1997). Se caracteriza por su crecimiento, con buena adaptación a las tierras bajas desde el nivel del mar hasta los 900 metros de altura y se usa para reforestación en América y otros continentes (Wang *et al.*, 1999). Posee hojas ricas en proteínas (relación C/N 9,80), que son usadas en algunos países como forraje, y obtiene el 59-100% de su nitrógeno de la simbiosis fijadora de nitrógeno (Sanginga *et al.*, 1995). Presenta nodulación cruzada con los rizobios simbiontes de los géneros *Mimosa*, *Acacia*, *Sesbania*, *Vigna*, *Lablab* y *Phaseolus* entre otras (Trinick, 1980) y por esta característica *L. leucocephala* fue sugerida como uno de los huéspedes para definir el rango de huésped de una nueva especie rizobiana (Graham *et al.* 1991). Además, dado que *R. etli* a diferencia de *R. tropici*, no nodula *L. leucocephala*, el ensayo de inoculación con *L. leucocephala* permite distinguirlos (Martínez-Romero *et al.*, 1991, Segovia *et al.*, 1993).

Aislamientos de rizobios nodulantes de *Leucaena leucocephala*

Se analizó una colección de rizobios aislados de plantas *Leucaena leucocephala* inoculadas con muestras de suelo en el laboratorio. Se inocularon individualmente grupos de 5 plantas con suspensiones de las muestras de suelo descritas en la Tabla 1. Se obtuvieron 154 aislamientos, los cuales se describen en el Apéndice 5. La mayoría de estos aislamientos fueron de crecimiento rápido (2 ó 3 días), mientras que unos pocos crecieron luego de los tres días. El aspecto de las colonias en medio YEM-rc resultó muy variado. Las tonalidades fueron rosa claro y oscuro, además muchas presentaron abundante mucosidad con consistencia laxa y crecimiento transparente que impedía la delimitación en colonias aisladas o en otros casos con consistencia más densa y crecimiento opaco.

En la colección estudiada en este capítulo incluimos también a tres aislamientos recuperados de plantas de *Acacia aroma* y los ya descritos en el Capítulo 5 de *Mimosa* spp., *Vicia benzodermis* y *M. polymorpha*.

Lugar	Denominación de la muestra
Castellanos, Salta	T61
Cerrillos, Salta	T24, T51, T32, T69, T39
Chorro Blanco, Salta	T48
Embarcación, Salta	T53
Los Pulares, Salta	T46
Metan-Yatasto, Salta	T23, T52, T62
Peña Baya, Salta	T50
Pichanal, Salta	T1, T20, T21, T25, T54, T55
Quebrada del Toro, Salta	T29, T58, T60
Rio Blanco, Salta	T66
Rosario de Lerma, Salta	T56 (camino entre Rosario de Lerma y Campo Quijano), T42, T57
San Luis, Salta	T65, T64
Santa Clara, Jujuy	T27, T37
Valle Grande, Salta	T3

Tabla 1: Muestras de suelo de campo utilizadas para aislar rizobios usando leucaena como leguminosa atrapante. Se describen los lugares en donde se tomaron las muestras de suelos, la mayoría de los sitios fueron explorados durante años consecutivos (Ver también Apéndice 1).

Caracterización genotípica

1- Diversidad a través de perfiles de *fingerprints* de ADN

El primer análisis a que fue sometida la colección consistió en la obtención de los respectivos *fingerprints* ERIC y/o REP resultando en 101 perfiles diferentes que se muestran en el Apéndice 5.

Los perfiles de aislamientos de un mismo sitio de muestreo resultaron menos diversos que en los casos de los aislamientos correspondientes de *P. vulgaris* o *P. augusti*. Por ejemplo, los perfiles de los aislamientos de la zona de Pichanal mostraron similitud del 80%, mientras que los perfiles de las plantas de poroto cosechada en esa zona presentaron un 25% de similitud (Datos no mostrados). Los perfiles correspondientes a algunos aislamientos obtenidos en años sucesivos resultaron iguales demostrando su persistencia en el curso del tiempo. Cuando se compararon los perfiles de aislamientos de lugares distintos se encontró similitudes menores, de 10 a 50%, sin embargo se identificaron amplicones compartidos. Esta observación se ilustra en la Figura 1A con los aislamientos de Pichanal de los años 1996 y 1997 y de Santa Clara de 1997.

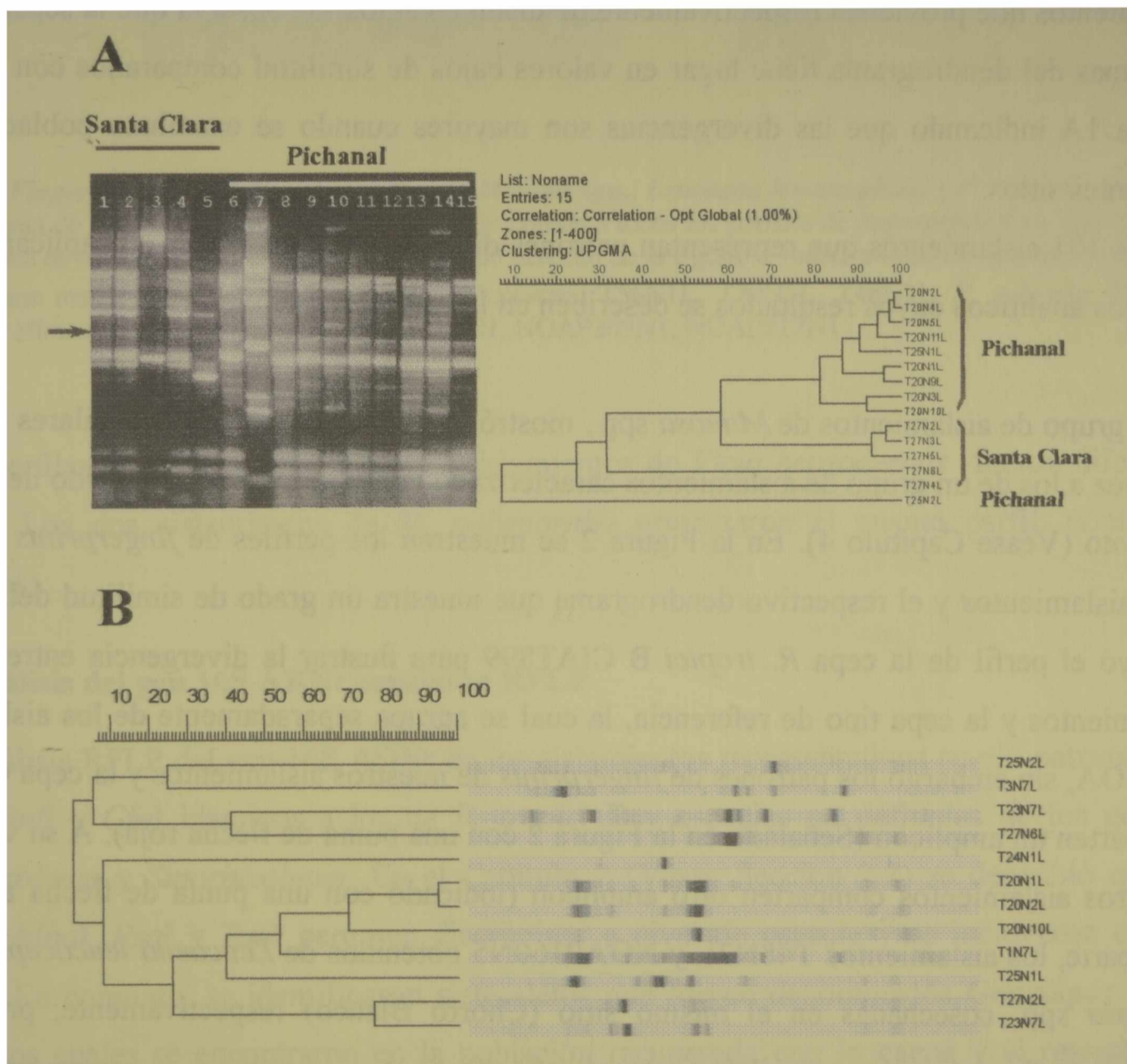


Figura 1: Perfiles de fingerprints de aislamientos de *Leucaena leucocephala*. A- Se muestran los perfiles electroforéticos de los fingerprints y el correspondiente dendrograma de los aislamientos de Pichanal y Santa Clara. Calles: 1-T27N2L, 2-T27N3L, 3-T27N4L, 4-T27N5L, 5-T27N6L, 6-T25N1L, 7-T25N2L, 8-T20N1L, 9-T20N2L, 10-T20N3L, 11-T20N4L, 12-T20N5L, 13-T20N9L, 14-T20N10L, 15-T20N11L. Con una punta de flecha se indica el amplicón común en todos los aislamientos, exceptuando a T25N2L. **B-** Dendrograma calculado a partir de los perfiles de ERIC-fingerprints de aislamientos de distintos lugares. Pichanal (T25N1L, T25N2L, T20N1L, T20N2L, T1N7L y T20N10L), Santa Clara (T27N6L, T27N2L), Valle Grande (T3N7L), Metan (T23N7L) y Cerrillos (T24N1L).

Los aislamientos de Pichanal fueron agrupados con un porcentaje de similitud de 81% con la excepción del aislamiento T25N2L cuyo grado de similitud fue menor al 10%. Mientras que tres de los cinco aislamientos de Santa Clara analizados fueron agrupados con una similitud de 93%, los otros dos no se ubicaron en ningún *cluster*. Los perfiles de ERIC-*fingerprints* de los aislamientos de la Quebrada del Toro y de un sitio próximo a Rosario de Lerma fueron muy similares entre sí. La caracterización del gen 16S ARNr de estos aislamientos demostró que se trata del mismo genotipo.

La Figura 1B muestra el dendrograma resultante de examinar los perfiles ERIC de aislamientos que provienen respectivamente de distintos sitios. Se observa que la separación de las ramas del dendrograma tiene lugar en valores bajos de similitud comparados con los de la Figura 1A indicando que las divergencias son mayores cuando se examinan poblaciones de diferentes sitios.

Los 101 aislamientos que representan patrones diferentes fueron estudiados aplicando otros criterios analíticos cuyos resultados se describen en las secciones siguientes.

El grupo de aislamientos de *Mimosa* spp., mostró perfiles de *fingerprints* similares entre sí y a su vez a los de un grupo de aislamientos caracterizado como *R. tropici* B obtenido de leucaena y poroto (Véase Capítulo 4). En la Figura 2 se muestran los perfiles de *fingerprints* ERIC de esos aislamientos y el respectivo dendrograma que muestra un grado de similitud del 50%. Se incluyó el perfil de la cepa *R. tropici* B CIAT899 para ilustrar la divergencia entre nuestros aislamientos y la cepa tipo de referencia, la cual se agrupa separadamente de los aislamientos del NOA, sin embargo los patrones de *fingerprints* de nuestros aislamientos y la cepa CIAT899 comparten un amplicón (Señalado en la Figura 2 con una punta de flecha roja). A su vez, todos nuestros aislamientos comparten otro amplicón (indicado con una punta de flecha azul). Por otra parte, los aislamientos T48N2L y NOAP160N5 obtenidos de *Leucaena leucocephala* y de *Mimosa* spp. cosechadas en el mismo sitio (Chorro Blanco) respectivamente, presentaron perfiles de *fingerprint* muy similares entre sí.

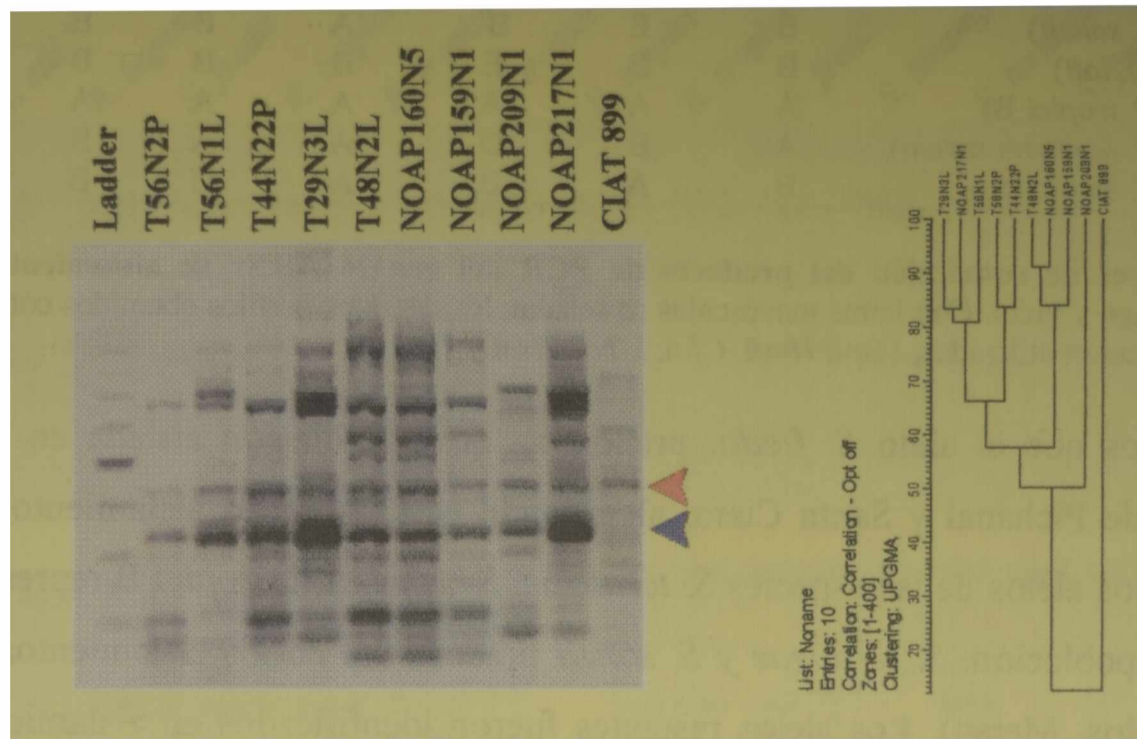


Figura 2: *Fingerprints* ERIC de aislamientos de *Mimosa* spp., *Leucaena leucocephala* y *P. vulgaris*. Se indica con una punta de flecha roja la posición del amplicón común a todos los perfiles de *fingerprints* y en azul la banda característica de los aislamientos del NOA. En el lado derecho de la figura se muestra el dendrograma construido a partir de una matriz UPGMA. Aislamientos de: leucaena, T56N1L, T29N3L, T48N2L, *P. vulgaris*, T56N2P, T44N22P, *Mimosa* spp., NOAP160N5, NOAP159N1, NOAP209N1, NOAP217N1.

Los perfiles de *fingerprints* de los 11 aislamientos de *Vicia benzodermis* fueron diferentes entre sí. Los dos aislamientos de *M. polymorpha* presentaron el mismo perfil. (Datos no mostrados).

2- El análisis del gen 16S ARNr mediante RFLP

El análisis RFLP del gen 16S ADNr de los aislamientos representativos reveló patrones con *MspI*, *HinfI* y *CfoI* idénticos a los de *R. tropici* B y especies no definidas de los géneros *Mesorhizobium* y *Sinorhizobium*. En el Capítulo 2 (Véase Sección 2.2) se describió que las enzimas *MboI*, *RsaI* y *TaqI* permiten discriminar a nivel de especie y se incluyeron en este análisis. En conjunto, se identificaron siete alelos que fueron denominados **Genotipos 1 a 7**, seis de los cuales se encontraron en la población recuperada con leucaena y el restante con *Medicago polymorpha*. Los **Genotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7** se corresponden respectivamente con las especies *S. fredii* (USDA191), *S. teranga* (USDA4894), *S. saheli* (USDA4893), *M. loti* (USDA3455), *R. tropici* B (CIAT899), *R. leguminosarum* (USDA2671) y *S. meliloti* (Cepa 1021) como se muestra en la Tabla 2.

Genotipo	<i>Hinf</i> I	<i>Msp</i> I	<i>Mbo</i> I	<i>Rsa</i> I	<i>Taq</i> I	<i>Cfo</i> I
1 (<i>S. fredii</i>)	B	D	B	B	B	B
2 (<i>S. terangae</i>)	B	E	C	A	B	B
3 (<i>S. saheli</i>)	B	E	B'	A	B	B
4 (<i>M. loti</i>)	B	E	E	B	B	B
5 (<i>R. tropici</i> B)	A	A	A	A	A	A
6 (<i>R. leguminosarum</i>)	A	B	D	A	A	B
7 (<i>S. meliloti</i>)	B	A	B	A	B	B

Tabla 2: Patrones de restricción del producto de PCR del gen 16 ARNr de aislamientos de leucaena, mimosa, medicago y vicia. Con letras mayúsculas se señalan los distintos perfiles obtenidos con cada una de las enzimas de restricción utilizadas, *Msp*I, *Hinf*I, *Cfo*I, *Mbo*I, *Rsa*I y *Taq*I.

Encontramos que el alelo *S. fredii*, predomina en la población aislada en el norte de la región, zona de Pichanal y Santa Clara, alcanzando el 43% de los aislamientos examinados, mientras que los alelos de las especies *S. terangae*, *S. saheli* y *R. tropici* B representa cada uno el 10% de la población. *S. terangae* y *S. saheli* predominan en los aislamientos del sur de la región (Cerrillos, Metan). Los alelos restantes fueron identificados en aislamientos de 1 ó 2 sitios y su representación fue menor al 5% de los aislamientos.

Los perfiles de RFLP de 16S ADNr de los aislamientos de *Medicago polymorpha* y *Vicia benzodermis* fueron iguales a *S. meliloti* y *R. leguminosarum*, respectivamente.

Los 15 aislamientos de *Mimosa* spp. fueron clasificados en su casi totalidad como *R. tropici* B y sólo uno como *S. fredii*.

Podemos concluir que los rizobios recuperados de suelo usando Leucaena leucocephala constituyen un grupo heterogéneo, algunos de los cuales también se aislaron a partir de nódulos de Mimosa spp. formados en el ambiente natural del NOA.

3- Análisis de DTGGE

Utilizando la técnica de DTGGE se analizaron 54 aislamientos representativos de los 6 alelos de 16S ADNr recuperados con leucaena (4 de *M. loti*, 22 de *S. fredii*, 6 de *S. saheli*, 14 de *S. terangae*, 3 de *R. leguminosarum* y 5 de *R. tropici* B) y tres con *Mimosa* spp. (1 de *S. fredii* y 2 de *R. tropici* B). El resultado de este análisis se muestra en la Figura 3 y Tabla 3.

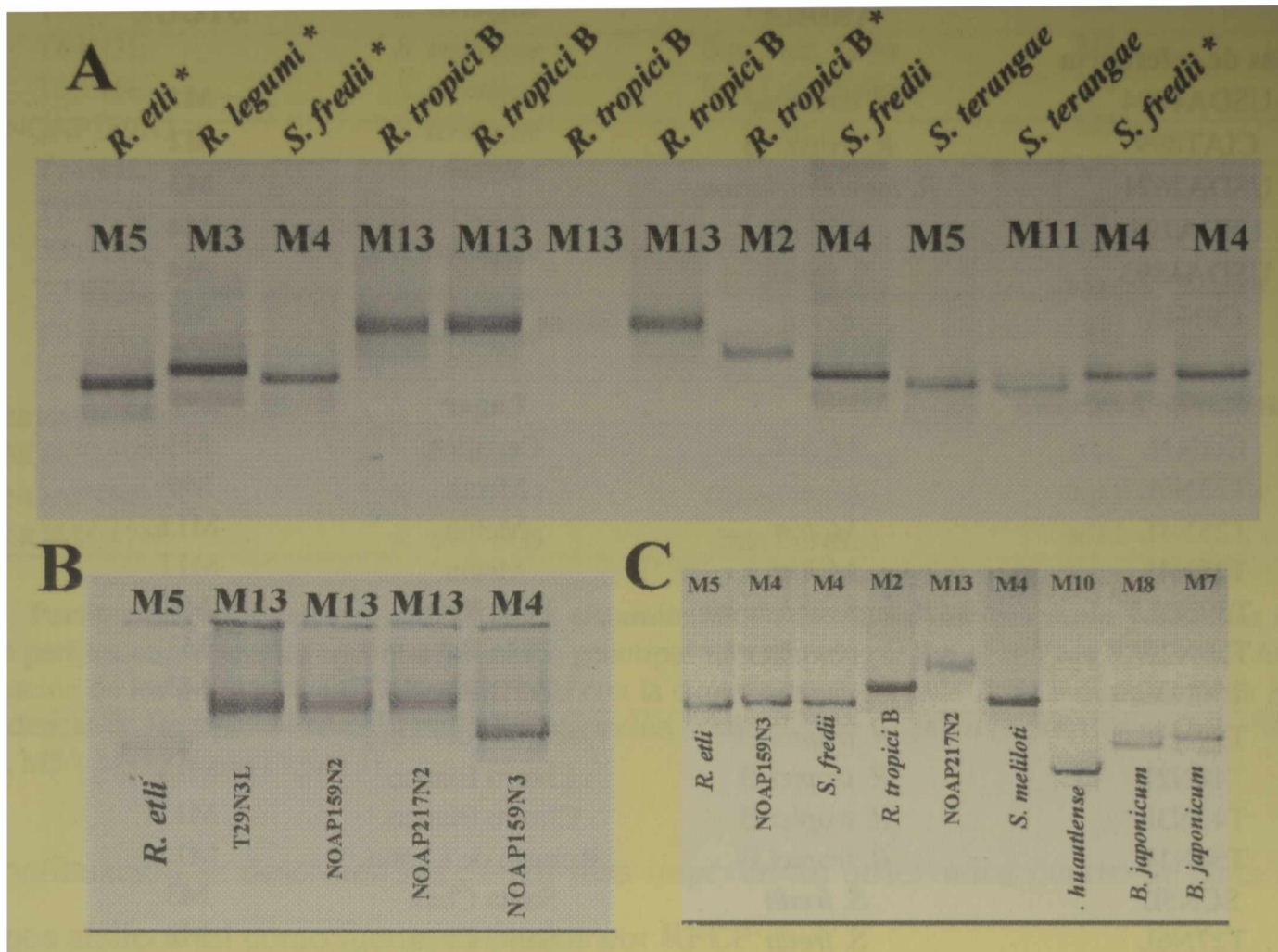


Figura 3: Perfiles de DTGGE de aislamientos de *Leucaena leucocephala*. Los perfiles se corresponden con los descritos en la Tabla 3. **A-** De izquierda a derecha se sembraron los productos de la amplificación con *dgefo/dgere* de los siguientes aislamientos y cepas de referencia: *R. etli* CFN42, *R. leguminosarum* USDA2671, *S. fredii* USDA191, T48N3L, T29N3L, T56N1L, T44N22P, CIAT899, T54N3L, T51N3L, T23N7L, HH103 y CER1L. Las cepas de referencia están señaladas con un asterisco. **B-** Perfiles migracionales de los aislamientos de *Mimosa* spp. NOAP159N2, NOAP217N2 y NOAP159N3, leucaena T29N3L y la cepa *R. etli* CFN42. **C-** Perfiles migracionales de los aislamientos de *Mimosa* spp. con los alelos de *S. fredii* y *R. tropici* B

Los perfiles de algunos aislamientos fueron diferentes a la de las correspondientes cepas de referencia. Por ejemplo, el perfil de la cepa *R. tropici* CIAT899 (M2) resultó diferente al de los aislamientos caracterizados por un RFLP de *R. tropici* B (M13). Por el contrario, los aislamientos con RFLP de *S. fredii* fueron coincidentes con los de la respectiva cepa de referencia. También, este análisis reveló una variabilidad mayor a la encontrada con ARDRA, puesto que un mismo alelo de 16S ADNr dio lugar a más de un perfil de DTGGE. Excepto los aislamientos con el genotipo ribosomal *R. tropici*, todos los genotipos restantes identificados en nuestros aislamientos presentaron más de un perfil migracional DTGGE.

	ARDRA	DTGGE
Cepas de referencia		
USDA4894	<i>S. teranga</i>	M1
CIAT899	<i>R. tropici</i> B	M2
USDA2671	<i>R. leguminosarum</i>	M3
USDA191	<i>S. fredii</i>	M4
USDA4893	<i>S. saheli</i>	M4
CFN42	<i>R. etli</i>	M5

Aislamientos de <i>Leucaena</i>		Lugar	
CerN1L	<i>M. loti</i>	Cerrillos	M4
T23N6L	<i>M. loti</i>	Metán	M4
T23N1L	<i>M. loti</i>	Metán	M11
T23N4L	<i>M. loti</i>	Metán	M11
T50N1L'	<i>R. leguminosarum</i>	Peña Baya	M3
T50N2L'	<i>R. leguminosarum</i>	Peña Baya	M3
T50N3L	<i>R. leguminosarum</i>	Peña Baya	M3
T29N3L	<i>R. tropici</i> B	Quebrada del Toro	M13
T48N2L	<i>R. tropici</i> B	Chorro Blanco	M13
T48N3L	<i>R. tropici</i> B	Chorro Blanco	M13
T56N1L	<i>R. tropici</i> B	Rosario de Lerma	M13
SCN5L	<i>S. fredii</i>	Santa Clara	M3
T27N6L	<i>S. fredii</i>	Santa Clara	M3
T40N4L	<i>S. fredii</i>	Cerrillos	M3
T42N8L	<i>S. fredii</i>	Rosario de Lerma	M3
T46N1L	<i>S. fredii</i>	Los Pulares	M3
T53N1L	<i>S. fredii</i>	Embarcación	M3
T54N1L	<i>S. fredii</i>	Pichanal	M3
T55N1L	<i>S. fredii</i>	Pichanal	M3
T55N3L	<i>S. fredii</i>	Pichanal	M3
T64N7L	<i>S. fredii</i>	San Luis, Salta	M3
T65N11L	<i>S. fredii</i>	San Luis, Salta	M3
T65N13L	<i>S. fredii</i>	San Luis, Salta	M3
T65N1L	<i>S. fredii</i>	San Luis, Salta	M3
T65N6L	<i>S. fredii</i>	San Luis, Salta	M3
NOAP51N1	<i>S. fredii</i>	Quebrada del Toro	M4
T1N7L	<i>S. fredii</i>	Pichanal	M4
T20N1L	<i>S. fredii</i>	Pichanal	M4
T25N1L	<i>S. fredii</i>	Pichanal	M4
T31N1L	<i>S. fredii</i>	Cerrillos	M4
T54N3L	<i>S. fredii</i>	Pichanal	M4
T65N4L	<i>S. fredii</i>	San Luis, Salta	M4
T24N1L	<i>S. saheli</i>	Cerrillos	M3
T24N1L	<i>S. saheli</i>	Cerrillos	M3
T42N11L	<i>S. saheli</i>	Rosario de Lerma	M3
T64N1L	<i>S. saheli</i>	San Luis, Salta	M3
T23N5L	<i>S. saheli</i>	Metán	M4
T53N2L	<i>S. saheli</i>	Embarcación	M4
T52N3L	<i>S. teranga</i>	Metán	M3
T65N5L	<i>S. teranga</i>	San Luis, Salta	M3
T3N7L	<i>S. teranga</i>	Valle Grande	M4
T51N3L	<i>S. teranga</i>	Cerrillos, INTA	M4

T52N2L	<i>S. teranga</i>	Metán	M4
T55N8L	<i>S. teranga</i>	Pichanal	M4
T64N3L	<i>S. teranga</i>	San Luis, Salta	M4
T65N5L	<i>S. teranga</i>	San Luis, Salta	M4
NOAP189N1	<i>S. teranga</i>	Cerrillos	M5
T24N4L	<i>S. teranga</i>	Cerrillos	M5
T25N2L	<i>S. teranga</i>	Pichanal	M5
T31N4L	<i>S. teranga</i>	Cerrillos	M5
T23N7L	<i>S. teranga</i>	Metán	M11
T51N4L	<i>S. teranga</i>	Cerrillos, INTA	M11
Aislamientos de <i>Mimosa</i> spp			
NOAP159N3	<i>S. fredii</i>	Chorro Blanco	M4
NOAP159N2	<i>R. tropici</i> B	Chorro Blanco	M13
NOAP217N2	<i>R. tropici</i> B	San Lorenzo	M13

Tabla 3: Perfiles migracionales de DTGGE de aislamientos de *Leucaena leucocephala* y *Mimosa* spp.. Se muestran perfiles migracionales encontrados en los genotipos identificados según el análisis RFLP-16S ADNr. La denominación de los perfiles de DTGGE concuerda con la descrita en el Capítulo 2. Se indican también los sitios de procedencia de los aislamientos. El orden de migración desde el polo negativo al positivo es: M1, M13, M2, M3, M4, M5 y M11 (Véase Figura 3).

A continuación se describen los rasgos más importantes observados dentro de cada uno de los grupos alélicos tal como fueran definidos por RFLP:

- A. Los perfiles M4 y M11, se encontraron en los aislamientos con los alelos de *M. loti*, *S. fredii*, *S. saheli* y *S. teranga* respectivamente (Figura 3A).
- B. No se encontró variabilidad dentro de los aislamientos con el alelo de *R. leguminosarum*, y además sus perfiles de migración fueron idénticos a la cepa de *R. leguminosarum* USDA2671 (M3).
- C. Los aislamientos de *Leucaena leucocephala* y *Mimosa* spp. asignados a la especie *R. tropici* B, presentaron un único perfil, M13, que fue diferente al de la cepa de referencia CIAT899 (M2). Además, el perfil M13 fue encontrado en los aislamientos de *P. vulgaris* con el perfil de RFLP-16S ADNr de *R. tropici* B (Por ejemplo T44N22P) (Figura 3A, B y C).
- D. La población con el alelo de *S. fredii* presentó 2 perfiles de migración, M3 y M4. El perfil M4, que también fue encontrado en uno de los aislamientos de *Mimosa* spp., es igual al de la especie *S. fredii* (USDA191) como se muestra en la Figura 3A.
- E. Algunos perfiles fueron encontrados en los tres genotipos *S. saheli*, *S. fredii* y *S. teranga*.
- F. Los perfiles M3, M4, M5 y M11, encontrados en los aislamientos caracterizados como *S. teranga* fueron diferentes al perfil de la cepa de referencia *S. teranga* USDA 4894 (M1).

Se observó que diferentes alelos 16S ADNr coincidieron en el perfil migracional de DTGGE, como por ejemplo *R. leguminosarum* y *S. terangae*. La comigración de dos fragmentos en un gel de DTGGE implica la coincidencia de las condiciones desnaturalizantes del dominio de las secuencias de menor temperatura de fusión, pero no necesariamente la identidad. Es por ello que el uso combinado de ARDRA y DTGGE permite revelar una mayor diversidad alélica, que mediante el uso de uno sólo de ellos. La combinación de ambos resultados que se presenta en la Tabla 4, demuestra que los aislamientos de leucaena se agrupan en 12 variantes alélicas del gen 16S ARNr. Estas otras variaciones estarían dadas por posiciones no comprendidas en las secuencias de reconocimiento para las enzimas ensayadas en el análisis de RFLP.

Alelos definidos mediante ARDRA	Perfil migracional de DTGGE
<i>Cepas de referencia</i>	
<i>S. terangae</i>	M1
<i>R. tropici B</i>	M2
<i>R. leguminosarum</i>	M3
<i>S. fredii</i>	M4
<i>S. saheli</i>	M4
<i>Aislamientos del NOA</i>	
<i>S. fredii</i>	M3
	M4
<i>S. saheli</i>	M3
	M4
<i>S. terangae</i>	M3
	M4
	M5
<i>M. loti</i>	M11
	M4
	M11
<i>R. leguminosarum</i>	M3
<i>R. tropici B</i>	M13

Tabla 4: Comparación de los resultados de ARDRA y DTGGE. En la tabla se muestran los perfiles de DTGGE para cada una de las cepas de referencia y de los alelos ribosomales de los aislamientos de leucaena y mimosa.

El uso de DTGGE demostró una mayor heterogeneidad en el gen 16S ARNr que la encontrada con análisis de RFLP. Un grupo de aislamientos obtenidos de mimosa, leucaena y P. vulgaris comparten el mismo RFLP con R. tropici B CIAT899 pero difieren en el perfil DTGGE que los caracteriza a todos ellos. Esta población podría representar un genotipo propio del NOA emparentado con R. tropici B.

4- Análisis de la secuencia de 260 pb del gen 16S ARNr

Se analizó la secuencia de 15 aislamientos de leucaena representantes de poblaciones que analizadas con criterios analíticos tales como DTGGE y *fingerprinting*, resultaron diferentes. Llevamos a cabo la secuenciación del fragmento de 260 pb del gen 16S ARNr de 14 aislamientos y 1500 pb del aislamiento T29N3L, todos provenientes de la amplificación por PCR del gen 16S ARNr. El resultado de alinear las secuencias consenso y las extraídas de bancos de datos se muestra en el Apéndice 7, mientras que en la Figura 4 se muestra el dendrograma de similitud construido a partir del mismo.

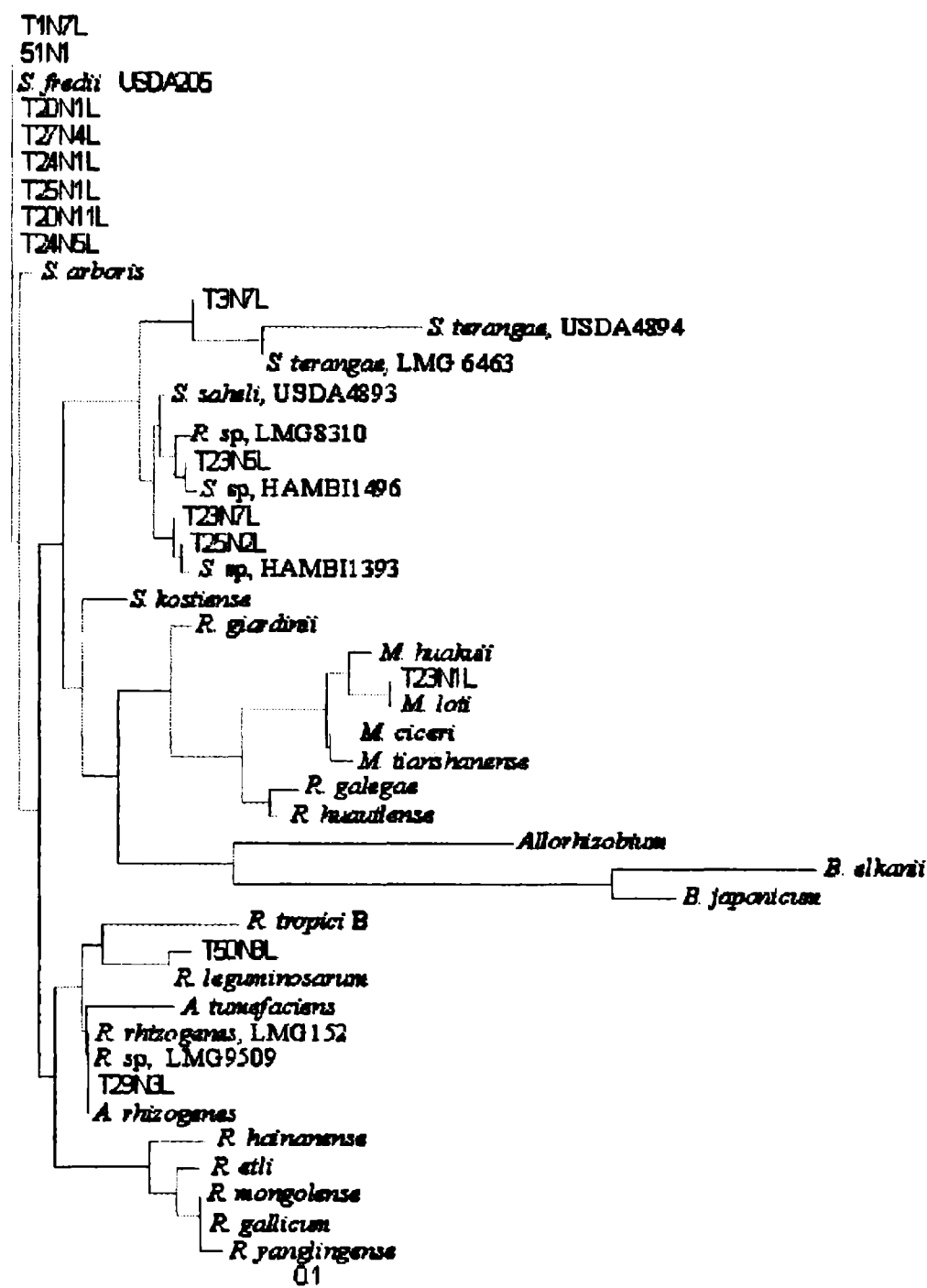


Figura 4: Comparación de las secuencias de 16S ADNr de aislamientos de leucaena. Dendrograma de similitud obtenido a partir del alineamiento de las secuencias de especies conocidas y de aislamientos de leucaena. Los códigos de acceso a los bancos de datos se indican a continuación: *Allorhizobium* (Y17047), *M. ciceri* (U07934), *R. galegae* (D12793), *R. gallicum* (U86343), *R. giardinii* (U86344), *R. hainanense* (U71078), *M. huakuii* (D12797), *R. huananense* (AF025852), *M. loti* (D14514), *R. mongolense* (U89817), *S. teranga* (USDA4894, X68388), *S. teranga* (LMG6463, X68387), *S. fredii* (USDA205, X67231), *R. etli* (U28910), *S. saheli* (USDA4893, X68390), *S. sp.* (HAMBI1393, X90810), *S. sp.* (HAMBI1496, X90813), *R. tropici* B (U89832), *R. leguminosarum* (USDA2671, U29388), *A. tumefaciens* (D14505), *R. rhizogenes* (LMG152), *R. sp.* (LMG9509, X67232), *R. sp.* (LMG8310, X77120), *R. yanglingense* (AF 003375), *M. tianshanense* (U71079), *B. elkanii* (U35000), *B. japonicum* (Z35330), *S. arboris* (Z78204), *S. kostiansae* (Z78203).

Las conclusiones que extraemos de esta comparación teniendo en cuenta la asignación de especie que resultara del análisis ARDRA, agrupadas en similitudes y divergencias, son las siguientes:

Similaridades

- A. Las secuencias de los aislamientos caracterizados como *S. fredii* y la cepa de referencia de esta especie son idénticas.
- B. Las secuencias del aislamiento T23N1L, caracterizado como *M. loti*, y de la cepa de referencia de la especie *M. loti* USDA3455 son idénticas.
- C. Los aislamientos caracterizados como *S. saheli* y *S. terangae* se agruparon junto con las respectivas cepas de referencia, si bien como se alcanza a observar en el dendrograma no constituyen un grupo homogéneo tal como los genotipos *S. fredii*.
- D. Las secuencias del aislamiento T50N3L, caracterizado como *R. leguminosarum*, y la cepa de referencia *R. leguminosarum* (USDA2671) son idénticas.

Divergencias

- A. Los aislamientos T24N1L y T24N5L, ambos caracterizados como *S. saheli*, excepcionalmente fueron agrupados con la cepa de *S. fredii*.
- B. Los aislamientos T23N7L y T25N2L, caracterizados como *S. terangae*, no fueron agrupados con *S. terangae*, sugiriendo que estos aislamientos podrían representar a una nueva especie de *Sinorhizobium*, muy relacionada con *S. terangae*. En este sentido, la secuencia completa del gen aportaría información sobre su ubicación taxonómica.
- C. La secuencia del aislamiento T3N7L caracterizado como *S. terangae* difiere en 3 nucleótidos con respecto a las secuencias de las especies *S. terangae* y *S. saheli*. Sin embargo, el dendrograma agrupa a T3N7L con *S. terangae*. Este resultado nos llevó a realizar otro análisis consistente en comparar tramos cortos de la secuencia en forma progresiva desde el extremo 5'. Con este propósito usamos el programa CHIMERA_CHECK version 2.7, el cual permite identificar posibles cambios significativos en el grado de homología (“puntos de quiebre”). El resultado del análisis, que se muestra en la Figura 5, indica que las 60 pb próximas al extremo 5' y las 190 pb restantes son homólogas a especies distintas de *Sinorhizobium*, respectivamente. De esta manera se estaría demostrando que T3N7L tiene una secuencia quimera.
- D. La secuencia del aislamiento T29N3L, caracterizado como *R. tropici* B, resultó agrupada junto con las de *Agrobacterium rhizogenes* y *Rhizobium* sp. El resultado fue confirmado con análisis de la secuencia total de 1500 pb. Además, presenta total homología con la secuencia

parcial de 16S ADNr de la cepa GR84 aislada de poroto en Granada, España (Herrera Cervera *et al.*, 1999). En la Tabla 5 se muestra el grado de similitud entre la secuencia de T29N3L y las especies de *Agrobacterium*, así como también *Rhizobium* sp. La mayor homología encontrada fue del 98,5 % con 1351 pb de la secuencia correspondiente a la cepa LMG 9509 de *Rhizobium* sp. Sin embargo, con una homología similar se encontraron secuencias de especies del género *Agrobacterium*. También, con un valor relativamente alto la secuencia de T29N3L resultó agrupada con 253 pb de *Rhizobium* sp TAL 1145 aislado de *Leucaena*. Este resultado mostrado en la Tabla 5 señala que un grupo de aislamientos de leguminosas caracterizados como *R. tropici*, *R. leguminosarum* y *Rhizobium* sp. mantienen una estrecha homología con especies del género *Agrobacterium*.

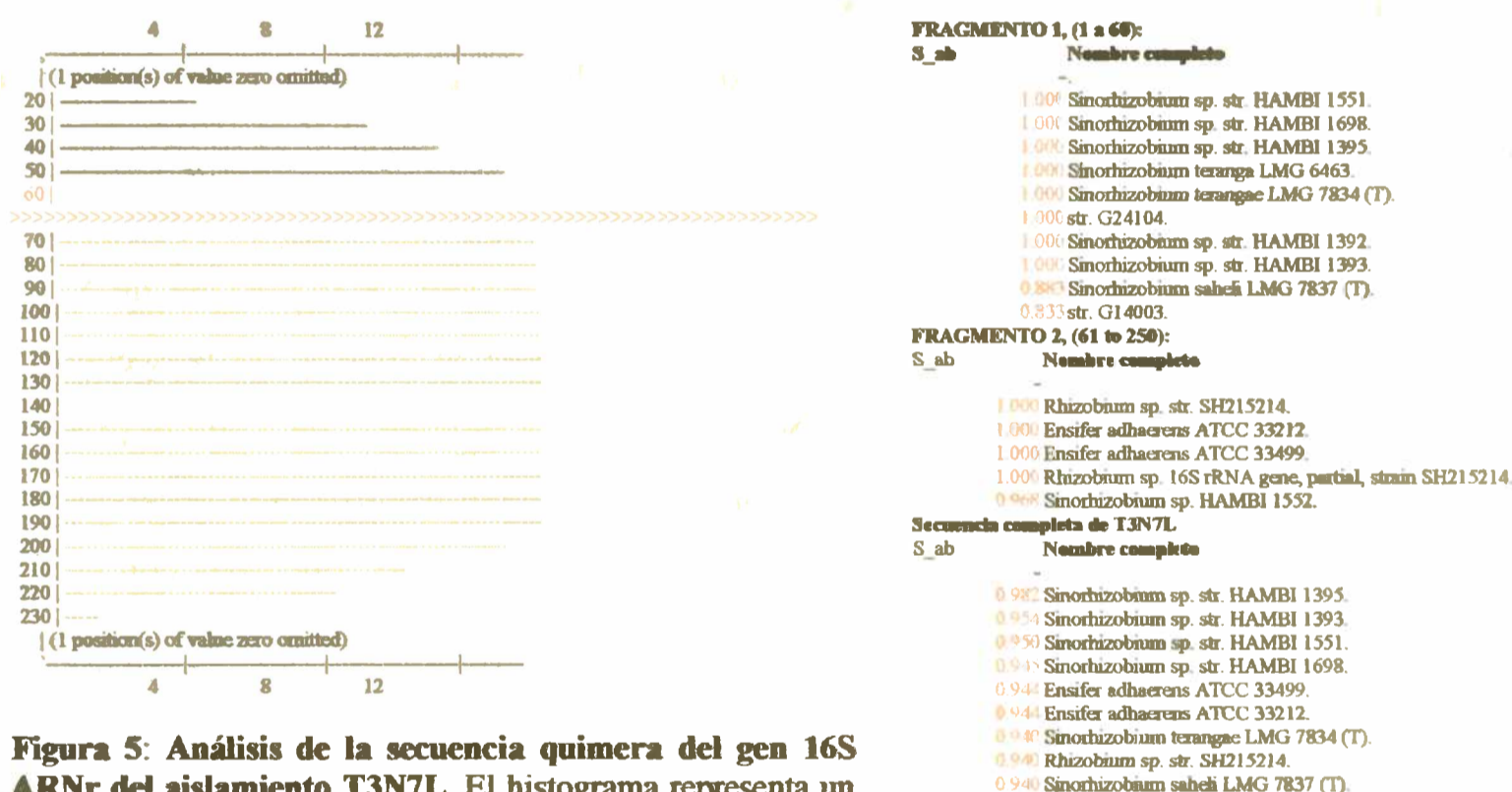


Figura 5: Análisis de la secuencia quimera del gen 16S ARNr del aislamiento T3N7L. El histograma representa un plot de valores de $N1 + N2 - N$ por cada 10^{3a} posición de la secuencia, en donde N1 es el número de oligómeros comunes entre el Fragmento 1 de la secuencia de T3N7L y una secuencia del banco de datos que resultó homóloga, de la misma manera N2 representa el número de oligómeros comunes entre el Fragmento 2 y una secuencia del banco de datos. N es el número de oligómeros comunes a una secuencia del banco de datos. El punto de quiebre se muestra en color rojo. S_{AP} es un score de similitud del programa. Se indican en color rojo algunas de las similitudes encontradas con cada uno de los fragmentos.

Cepa de rizobio	Similitud ^a	Nº de nucleótidos ^b
<i>Rhizobium</i> sp. LMG 9509	0.985	1351
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. Ch-Ag-4	0.982	1390
<i>Agrobacterium rhizogenes</i> LMG 152	0.979	1354
<i>Agrobacterium rhizogenes</i> IFO 13257 (T)	0.978	1392
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. K-Ag-3	0.975	1392
<i>Rhizobium</i> genosp. Q str. BDV5102	0.975	1330
<i>Rhizobium</i> sp. str. (<i>Leucaena</i>) TAL 1145	0.972	253
<i>Rhizobium tropici</i> str. IIA LMG 9517	0.969	1429
<i>Agrobacterium rhizogenes</i> IAM 13570	0.967	1353
<i>Rhizobium leguminosarum</i> str. C-O5 LMG 9518	0.965	1353
<i>Rhizobium tropici</i>	0.959	1398
<i>Rhizobium tropici</i> IFO 15247 (T)	0.953	1392

Tabla 5: Grado de similitud entre la secuencia de T29N3L y especies de *Agrobacterium* y *Rhizobium*.

^a Valor de similitud dado por el programa SEQUENCE_MATCH version 2.7 ^b Número de nucleótidos comparados de las secuencias.

Los resultados de los geles DGGE constituyen otro ángulo posible para analizar las secuencias 16S ADNr de los aislamientos. Los datos de secuenciación, y en particular del dominio de menor temperatura de fusión comprendido entre las posiciones 72 y 128, nos permiten predecir la migración relativa de los fragmentos en un gel DGGE. El orden de menor a mayor migración sería el siguiente:

- I. *S. terangae*, *A. rhizogenes*, T29N3L
- II. *R. leguminosarum*, T23N1L, T50N3L
- III. *R. tropici* B
- IV. *S. fredii*, *S. saheli*, T1N7L, T27N4L, T20N1L, T20N11L, T25N1L, NOAP51N1, T25N2L, T3N7L, T23N7L, T24N1L, T24N5L, T23N5L.

Los resultados experimentales fueron coincidentes sólo en algunos de los casos, tal como se detalla a continuación:

- 1- El producto de amplificación del aislamiento T23N5L (Alelo de 16S ADNr de *S. saheli*) migra con el perfil M4 de *S. fredii* y coincidentemente el análisis de la secuencia del dominio de menor temperatura de T23N5L y la cepa de referencia de *S. fredii* predice que migrarán con el mismo perfil. De igual forma, el resultado experimental observado en un gel de DTGGE de T3N7L (Alelo de 16S ADNr de *S. terangae*) concuerda con el dato de secuencia. Estos dos hechos nos permiten concluir que los dominios de menor temperatura de fusión del fragmento examinado son coincidentes en especies distintas del género *Sinorhizobium*.
- 2- Los aislamientos T23N7L (*S. terangae*), T25N2L (*S. terangae*) y T24N1L (*S. saheli*) presentaron respectivamente los perfiles M11, M5 y M3, diferentes al teórico M4. Este resultado demuestra que la migración de algunos de los fragmentos de ADN estaría determinada también por otras propiedades fisicoquímicas que las consideradas en el Capítulo 2.
- 3- Los perfiles teórico y experimental del aislamiento T23N1L fueron diferentes entre sí. Este caso se explicaría de igual forma que el punto 2.
- 4- El perfil migratorio teórico del aislamiento T29N3L es igual al de *S. terangae*, lo cual se corresponde con un fragmento que experimenta una desnaturalización temprana. El resultado del ensayo mostró que efectivamente el fragmento se desnaturalizó tempranamente aunque la migración fue diferente al de la especie *S. terangae* (Ver

fotografía del gel de la Figura 8 del Capítulo 2, en la cual se muestra la corrida electroforética de T29N3L).

- 5- Experimentalmente se observó que todos los aislamientos que mostraron el alelo de 16S ADNr de *S. fredii* (Datos de ARDRA y de secuencia) migran con el perfil M4 de la cepa de referencia. Aquellos aislamientos que fueron caracterizados como *S. fredii* y con perfil de DTGGE diferente a M4 no se secuenciaron y por lo tanto no fueron incluidos en este análisis.

Concluimos que el análisis de DTGGE es muy sensible y presenta mayor poder de resolución que el de RFLP, sin embargo para garantizar la descripción de la diversidad DTGGE debe ser interpretado junto con otro análisis como por ejemplo el de 16S ADNr-RFLP.

5- Análisis RFLP de la región intergénica 16S-23S ADNr

Se analizó la región comprendida entre los genes 16S-23S ARNr de 54 aislamientos de leucaena representativos de la colección. El análisis de restricción del producto de amplificación cuyos tamaños estuvieron en el rango entre 1200 y 1400 pb resultó en 32 perfiles electroforéticos denominados aquí como IGS-tipos. En la Tabla 6 se muestran los perfiles resultantes de la digestión con las enzimas *HaeIII* y *MspI*, respectivamente. Los perfiles electroforéticos obtenidos con la enzima *MspI*, que reveló el mayor polimorfismo, se muestran en la Figura 6.

Denominación	<i>HaeIII</i>	<i>MspI</i>	Alelo de 16S ARNr	IGS-tipo
Cepas de referencia				
USDA191	g	X	<i>S. fredii</i>	33
CIAT899	f	f	<i>R. tropici</i> B	34
USDA4894	d	d	<i>S. teranga</i> e	35
USDA4893	e	e	<i>S. saheli</i>	36
Aislamientos de <i>Acacia</i> y <i>Leucaena</i> del NOA				
T23N1L	b	b	<i>M. loti</i>	31
T50N3L	M	O	<i>R. leguminosarum</i>	18
T61N1L	U	W	<i>R. leguminosarum</i>	23
T50N3L	a	a	<i>R. leguminosarum</i>	30
T50N2L	c	c	<i>R. leguminosarum</i>	32
T29N3L, T56N1L	K	P	<i>R. tropici</i> B	16
T48N2L, T48N3L	L	Q	<i>R. tropici</i> B	17
T42N6L	C	E	<i>S. fredii</i>	5
T40N4L	D	F	<i>S. fredii</i>	6
T46N1L	P	R	<i>S. fredii</i>	19
CerN4L	Q	T	<i>S. fredii</i>	20
NOAP51N1, T65N2L	R	B	<i>S. fredii</i>	21
T52N6L	T	V	<i>S. fredii</i>	22
NOAP220N2	X	B	<i>S. fredii</i>	26

T65N9L	Y	X	<i>S. fredii</i>	27
T53N1L	Z	Z	<i>S. fredii</i>	29
T54N4L, T42N3L ^b , T27N3L, T27N2L, T25N1L, T20N2L, T20N1L, T1N7L	A	A	<i>S. fredii</i> (N) ^a	1
T20N10L	B	B	<i>S. fredii</i> (N) ^a	2
ScN3L, ScN9L, T27N6L, T55N1L	B	C	<i>S. fredii</i> (N) ^a	3
T54N1L	V	A	<i>S. fredii</i> (N) ^a	24
ScN4L, T27N4L	B	D	<i>S. fredii</i> (N) ^a	4
T24N1L, T24N5L	E	G	<i>S. saheli</i>	7
T23N5L	F	H	<i>S. saheli</i>	8
T42N11L	G	I	<i>S. saheli</i>	9
T23N7L	H	K	<i>S. teranga</i>	11
T25N2L	H	L	<i>S. teranga</i>	12
T31N4L	I	J	<i>S. teranga</i>	13
T32N3L	I	M	<i>S. teranga</i>	14
T31N2L	J	N	<i>S. teranga</i>	15
T52N2L, T51N3L	H	Y	<i>S. teranga</i>	28
T3N7L	H	J	<i>S. teranga</i> (N) ^a	10
T54N2L	W	D	<i>S. teranga</i> (N) ^a	25

Tabla 6: IGS-tipos de aislamientos de *Leucaena leucocephala*. Perfiles de restricción de la IGS obtenidos con las enzimas *HaeIII* y *MspI*. Se muestran también los IGS-tipos resultantes asociados a cada alelo ribosomal. La mayoría de los perfiles fueron identificados con letras mayúsculas y unos pocos con letras minúsculas.

^a (N) significa que este genotipo fue encontrado en la región norte del NOA.

^b El aislamiento T42N3L fue recuperado de un suelo del sur de la región.

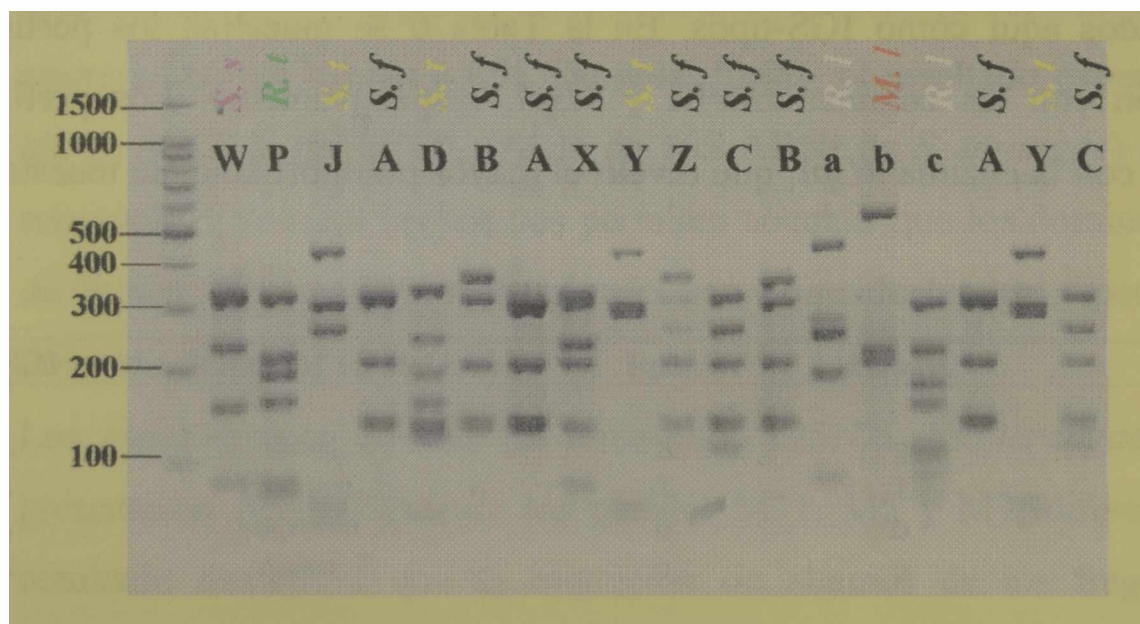


Figura 6: IGS-tipos de aislamientos de *Leucaena leucocephala*. Se muestran algunos de los perfiles obtenidos por digestión con *MspI* del producto de amplificación de la región intergénica. Los perfiles fueron identificados con las letras de la Tabla 6. Se incluyó en la figura el resultado de la caracterización de 16S ADNr, para ello se utilizaron las siguientes

abreviaciones: *S. s* (*S. saheli*), *R. t* (*R. tropici* B), *S. f* (*S. fredii*), *R. l* (*R. leguminosarum*) y *M. l* (*M. loti*).

Como puede observarse en la Figura 6 los aislamientos de leucaena no comparten sus IGS-tipos con las cepas de referencia analizadas. A su vez, cada alelo de 16S ADNr presentó sus propios IGS-tipos. Tampoco encontramos una asociación entre los IGS-tipo y los sitios de muestreo.

La diversidad de la IGS de los aislamientos caracterizados como *S. fredii* de la región norte fue menor comparada con los aislamientos de la región sur. El IGS-tipo 1 fue encontrado

predominante en la región norte (Tabla 6) y algunos de los aislamientos con el IGS-tipo 1 presentan el perfil M4 de DTGGE. Con la excepción del caso anterior no se encontró otra relación tan estrecha entre IGS y perfil de DTGGE. Se encontró que los aislamientos NOAP51N1 y T65N2L de *Acacia aroma* y *Leucaena leucocephala*, respectivamente tienen el mismo IGS-tipo.

Los cuatro aislamientos con el alelo de *R. leguminosarum* resultaron en cuatro IGS-tipos diferentes, respectivamente y tres de ellos fueron recuperados de la misma muestra de suelo. Dos de los perfiles obtenidos con la enzima *MspI* se muestran en la Figura 6 (Perfiles a y c).

Se encontró que la región intergénica de los aislamientos con el alelo de 16S ADN_r de *S. teranga* fue muy diversa. Prácticamente cada aislamiento fue asociado a un IGS-tipo propio.

El análisis de La región intergénica de 8 aislamientos de *Mimosa* spp. resultó en 5 IGS-tipos diferentes. Se comparó la región intergénica entre los aislamientos caracterizados por una secuencia 16S ADN_r emparentada a *R. tropici* provenientes de mimosa, leucaena y *P. vulgaris*. En este análisis se incluyeron las cepas de referencia de *R. tropici* A y B y algunas especies capaces de nodular leucaena. Los resultados se muestran en la Figura 7 y Tabla 7.

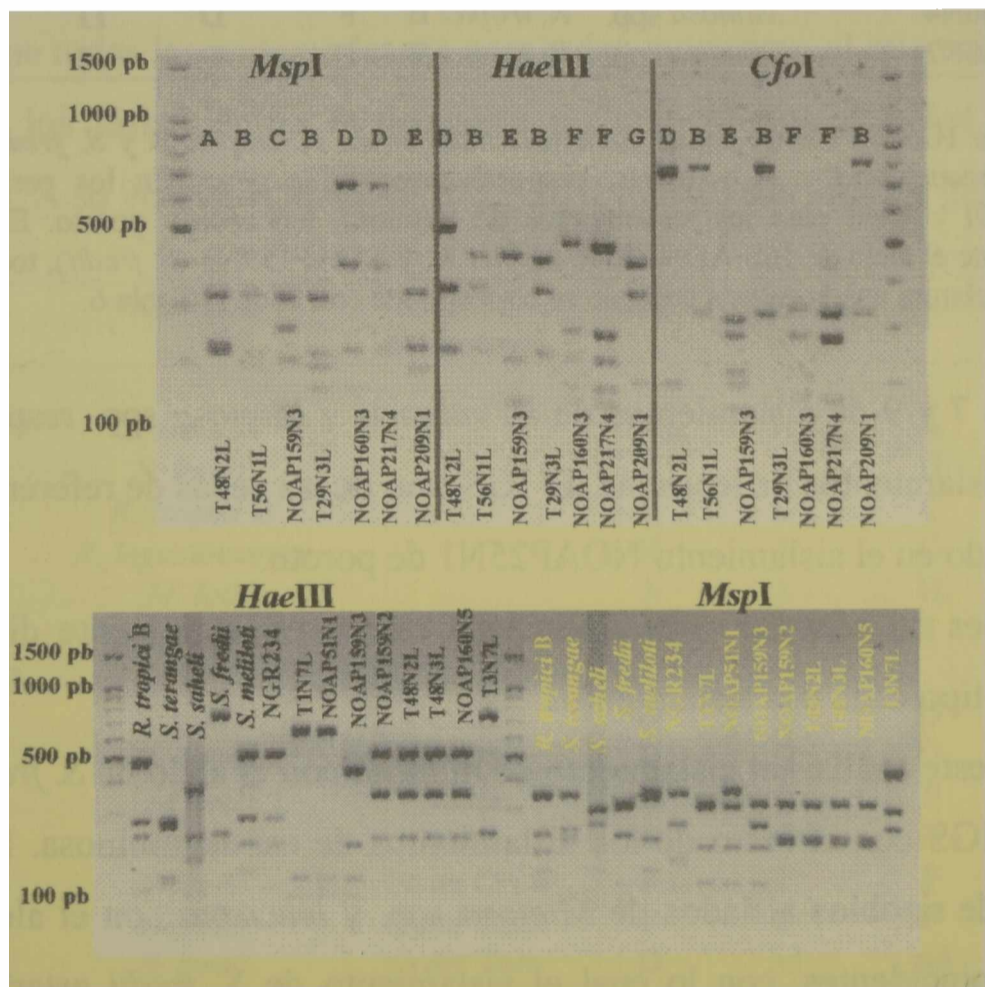


Figura 7: Perfiles de IGS-RFLP de aislamientos con alelo de 16S ADN_r de *R. tropici* B. En la fotografía se muestran algunos de los perfiles de RFLP de la región intergénica 16S-23S ADN_r de aislamientos de *Mimosa* spp, *Leucaena leucocephala* y *P. vulgaris*. Las letras corresponden a los perfiles descritos en la Tabla 7.

	Leguminosa	Alelo de 16S ADNr	HaeIII	MspI	IGS-tipo
Cepa de referencia					
CFN299		<i>R. tropici</i> A	A	E	1
CIAT899		<i>R. tropici</i> B	A	E	1
HH103		<i>S. fredii</i>	G	F	2
Cepa 1021		<i>S. meliloti</i>	H	G	3
NGR234		<i>R. sp</i>	I	H	4
USDA4894		<i>S. teranga</i>	J	I	5
USDA4893		<i>S. saheli</i>	K	J	6
Aislamiento					
NOAP25N1	<i>P. vulgaris</i>	<i>R. tropici</i> A	A	E	1
T56N1L	Leucaena	<i>R. tropici</i> B	B	B	7
T29N3L	Leucaena	<i>R. tropici</i> B	B	B	7
T56N2P	<i>P. vulgaris</i>	<i>R. tropici</i> B	B	B	7
T56N4P	<i>P. vulgaris</i>	<i>R. tropici</i> B	B	B	7
T44N22P	<i>P. vulgaris</i>	<i>R. tropici</i> B	B	B	7
NOAP209N1	<i>Mimosa</i> spp.	<i>R. tropici</i> B	G	E	8
T48N2L	Leucaena	<i>R. tropici</i> B	D	A	9
T48N3L	Leucaena	<i>R. tropici</i> B	D	A	9
NOAP160N5	<i>Mimosa</i> spp.	<i>R. tropici</i> B	D	A	9
NOAP159N2	<i>Mimosa</i> spp.	<i>R. tropici</i> B	D	A	9
NOAP159N3	<i>Mimosa</i> spp.	<i>S. fredii</i>	E	C	10
NOAP160N3	<i>Mimosa</i> spp.	<i>R. tropici</i> B	F	D	11
NOAP217N4	<i>Mimosa</i> spp.	<i>R. tropici</i> B	F	D	11
NOAP160N4	<i>Mimosa</i> spp.	<i>R. tropici</i> B	F	D	11
NOAP160N2	<i>Mimosa</i> spp.	<i>R. tropici</i> B	H	D	12

Tabla 7: Perfiles de IGS-RFLP de cepas caracterizados como *R. tropici* B y *S. fredii*, aislados de *Mimosa* spp., *Leucaena leucocephala* y *P. vulgaris*, respectivamente. Se describen los perfiles obtenidos con las endonucleasas *HaeIII* y *MspI* para los aislamientos de mimosa, leucaena y poroto. Excepto los aislamientos NOAP25N1, que tiene el alelo de 16S ADNr de *R. tropici* A, y NOAP159N3 (*S. fredii*), todos portan el alelo de *R. tropici* B. La nomenclatura usada en esta tabla no se corresponde con la de la Tabla 6.

Los IGS-tipos 7 y 9 de aislamientos de *P. vulgaris* y *Mimosa* spp. respectivamente, fueron encontrados en aislamientos de leucaena. El IGS-tipo de las cepas de referencia *R. tropici* A y B sólo fue encontrado en el aislamiento NOAP25N1 de poroto.

Las poblaciones de *Mimosa* spp. y leucaena resultaron igualmente diversas dado que se encontró un IGS-tipo cada dos aislamientos.

Se incluyó en este análisis el aislamiento de mimosa con el alelo de *S. fredii* con el propósito de comparar su IGS con el resto de los aislamientos de esa leguminosa. Se encontró que los perfiles de IGS de rizobios aislados de *Mimosa* spp. y *leucaena* con el alelo de *S. fredii* y *R. tropici* no son coincidentes, con lo cual el aislamiento de *S. fredii* estaría representando un componente más de la diversidad de este alelo encontrada en el NOA.

6- Diversidad de los genes simbióticos *nodC* y *nifH*

Nuevamente en este capítulo aplicamos el mismo criterio de análisis de los genes *nifH* y *nodC* para revelar diversidad en esta colección de aislamientos.

nodC- La amplificación del gen *nodC* resultó satisfactoria para los aislamientos de los genotipos de 16S ADNr *S. teranga*, *S. saheli*, *M. loti* y *R. leguminosarum*. Contrariamente, no se obtuvo producto en el caso de los aislamientos *R. tropici* B-like o el mismo consistió en dos fragmentos en el caso de los aislamientos con el alelo ribosomal de *S. fredii*. La imposibilidad de amplificar el gen *nodC* de los aislamientos *R. tropici*-like en las condiciones que *R. tropici* CIAT899 lo fue, señala una diferencia a nivel de la secuencia. En la mayoría de los aislamientos caracterizados con el alelo de *S. fredii* la amplificación del gen *nodC* resultó en dos productos de 930 pb y 1400 pb aproximadamente. Se intentaron variantes en las condiciones de reacción de PCR resultando nuevamente las dos bandas. Probablemente los *primers nodC* utilizados, con insuficiente especificidad amplifican además otras regiones del genoma. Resultados similares fueron descritos por Laguerre *et al.* (2001).

En la Tabla 8 y la Figura 8 se muestran respectivamente los perfiles obtenidos con las enzimas *HinfI*, *MspI*, *RsaI* y *HaeIII* y la fotografía de los perfiles electroforéticos obtenidos con *RsaI*. Se encontró que todas las endonucleasas ensayadas mostraron el mismo poder resolutivo. Los *nodC*-tipos de los aislamientos de leucaena no coincidieron con los de las cepas de referencia utilizadas. A su vez, cada alelo de 16S ADNr mostró sus propios genotipos de *nodC*.

	ARDRA	Lugar de aislamiento	<i>HinfI</i>	<i>MspI</i>	<i>RsaI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>nodC</i> -tipo
Cepas de referencia							
<i>S. meliloti</i> (1021)	<i>S. meliloti</i>		A	A	A	A	1
<i>S. fredii</i> (HH103)	<i>S. fredii</i>		B	B	B	B	2
<i>R. tropici</i> B (CIAT899)	<i>R. tropici</i> B		C	C	C	C	3
<i>R. leguminosarum</i>	<i>R. leguminosarum</i>		H	I	G	H	11
NZP2213 ^a	<i>M. loti</i>		J	J	H	I	12
ORS 1009 ^a	<i>S. teranga</i>		I	K	I	J	13
Aislamientos del NOA							
T24N1L	<i>S. saheli</i>	Cerrillos	D	D	D	D	4
T24N5L	<i>S. saheli</i>	Cerrillos	D	D	D	D	4
T23N1L	<i>M. loti</i>	Metán	E	E	E	E	5
T23N3L	<i>M. loti</i>	Metán	E	E	E	F	6
T27N4L	<i>S. fredii</i>	Santa Clara	F	F	F	G	7
T27N6L	<i>S. fredii</i>	Santa Clara	F	F	F	G	7
NOAP51N1	<i>S. fredii</i>	Q del Toro	D	nd	nd	G	8
T3N7L	<i>S. teranga</i>	Valle Grande	D	G	nd	nd	9
T50N1L	<i>R. leguminosarum</i>	Peña Baya	G	H	nd	nd	10
T50N2L	<i>R. leguminosarum</i>	Peña Baya	G	H	nd	nd	10

Tabla 8: Perfiles de RFLP *nodC* de los aislamientos nodulantes de *Leucaena*. Se incluyeron cepas de referencia de los géneros *Sinorhizobium* y *R. tropici* B.

^a La fuente de estos resultados es la publicación de Laguerre *et al.* (2001). Nd, no determinado

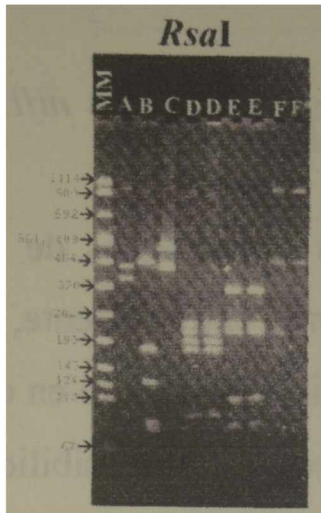


Figura 8: *nodC*-tipos encontrados en los aislamientos de *Leucaena leucocephala* representantes de los distintos genotipos de 16S ADNr encontrados en el NOA. Perfiles de restricción obtenidos por incubación del fragmento de 930 pb del gen *nodC* con la enzima *RsaI*. Las letras distinguen los perfiles de la Tabla 8.

nifH- En la mayoría de casos la amplificación del fragmento de 784 pb del gen *nifH*, fue exitosa, lo cual indicaría su mayor conservación entre nuestros aislamientos a diferencia de lo observado con el gen *nodC*. El producto de PCR fue incubado individualmente con las endonucleasas *HinfI*, *MspI*, *RsaI*, *HaeIII* y *CfoI*, resultando digerido por todas las enzimas menos *RsaI*.

El análisis de 18 aislamientos representativos permitió identificar 12 *nifH*-tipos. Los patrones de las cepas de referencia no se correlacionaron con los patrones generados por los aislamientos agrupados con el mismo alelo de 16S ADNr (Tabla 9). Esto indica que desde el punto de vista de la secuencia *nif*, nuestros aislamientos divergen de especies conocidas. Así, los perfiles de los aislamientos con el alelo ribosomal de *R. leguminosarum* fueron diferentes al de la cepa de referencia de esta especie. Los aislamientos de poroto con el alelo de *R. leguminosarum*, (Capítulo 4, página 129) mostraron todos el mismo *nifH*-tipo, el cual es diferente al de los aislamientos de leucaena (Datos no mostrados). Además, los aislamientos de leucaena *R. leguminosarum* dieron resultado negativo cuando se los ensayó con los *primers nifH* específicos para el Tipo I (Aguilar *et al*, 1998), estos resultados sugieren que el plásmido simbiótico es diferente al de la biovariedad phaseoli.

Entre los aislamientos de leucaena con el alelo de 16S ADNr de *S. fredii* se identificaron 4 genotipos *nifH* que no se corresponden con las dos cepas de referencia aisladas de soja incluidas en nuestro estudio. Posteriormente, los resultados de los ensayos de nodulación mostraron que estos aislamientos no forman nódulos en soja (Véase la Sección 6-5 de este capítulo) lo que agrega otra evidencia para concluir que se trataría de plásmidos simbióticos diferentes. Por otra parte, si sólo consideramos los datos obtenidos con las endonucleasas *HinfI* y *MspI*, estos aislamientos presentarían un perfil idéntico a la especie *R. tropici* B, lo cual indicaría un cierto grado de parentesco entre los genes *nifH* de ambos alelos.

	ARDRA	HinfI	MspI	HaeIII	CfoI	nifH-tipo
Cepas de referencia						
<i>S. fredii</i> (HH103)	<i>S. fredii</i>	A	A	H	A	A
<i>S. fredii</i> (USDA257)	<i>S. fredii</i>	A	A	H	A	A
<i>R. tropici</i> B (CIAT899)	<i>R. tropici</i>	A	E	B		B
<i>S. meliloti</i> (1021)	<i>S. meliloti</i>	A	B	I	B	C
<i>R. leguminosarum</i> (USDA 2671)	<i>R. leguminosarum</i>	A	C			O
ORS 609 ^a	<i>S. saheli</i>	nd	D	F	nd	P
ORS 1009 ^a	<i>S. terangaie</i>	nd	D	G	nd	Q
NZP2213 ^a	<i>M. loti</i>	E	M	H	L	R
Aislamientos del NOA						
T23N3L	<i>M. loti</i>	A	D	K	J	E
T23N1L	<i>M. loti</i>	A	D	K	J	E
T50N1L	<i>R. leguminosarum</i>	A	J	nd	nd	L
T50N3L	<i>R. leguminosarum</i>	A	J	nd	nd	L
T29N3L	<i>R. tropici</i> B	D	I	B	E	K
T56N1L	<i>R. tropici</i> B	D	I	B	E	K
NOAP51N1	<i>S. fredii</i>	A	B	D	F	D
T27N4L	<i>S. fredii</i>	A	E	F	D	F
T1N7L	<i>S. fredii</i>	A	E	C	C	G
T27N2L	<i>S. fredii</i>	A	E	C	C	G
T20N1L	<i>S. fredii</i>	A	E	C	C	G
T25N1L	<i>S. fredii</i>	A	E	C	C	G
T27N6L	<i>S. fredii</i>	B	F	C	K	H
T24N1L	<i>S. saheli</i>	A	G	D	E	I
T24N5L	<i>S. saheli</i>	C	H	E	F	J
T25N2L	<i>S. terangaie</i>	A	E	nd	nd	F/G
T3N7L	<i>S. terangaie</i>	A	F	nd	nd	M
T53N3L	<i>S. terangaie</i>	A	L	nd	nd	N

Tabla 9: Perfiles de RFLP de un fragmento de 784 pb del gen *nifH*.

^a Estos resultados fueron sacados de los resultados de Laguerre *et al.* (2001).

nd, no determinado

Los perfiles de RFLP con las enzimas *HinfI* y *MspI* del aislamiento de *A. aroma* NOAP51N1 resultaron idénticos a los perfiles de *S. meliloti*, lo cual diferencia a este aislamiento de los rizobios aislados de leucaena que portan el mismo alelo ribosomal.

Los tres aislamientos agrupados con el alelo de *S. terangaie* presentaron genotipos *nifH* diferentes entre sí, mostrando un índice alto de diversidad, el cual también fue observado previamente en el análisis de IGS. Uno de los *nifH*-tipos fue encontrado también en aislamientos con el alelo de *S. fredii*, lo cual indicaría que estos aislamientos con diferentes alelos de 16S ADNr comparten secuencias de genes simbióticos, o expresado de otra manera sus plásmidos simbióticos son similares.

Los dos aislamientos con el alelo de 16S ADNr de *M. loti* mostraron el mismo genotipo, el cual fue diferente del resto.



El análisis de RFLP-*nifH* de las poblaciones aisladas de *P. vulgaris*, *Mimosa* spp. y *Leucaena leucocephala* con el alelo ribosomal de *R. tropici* B se realizó en forma conjunta. Los resultados se resumen en la Tabla 10 y Figura 9.

Los perfiles de los aislamientos de *P. vulgaris*, leucaena y mimosa son diferentes a los de las especies *S. fredii*, *R. tropici* B, *S. teranga*, *S. sahelii* y *Rhizobium* sp. NGR234 de amplio rango de hospedador. Encontramos que los perfiles 3 y 4 se comparten entre los aislamientos de leucaena y mimosa y mientras que los aislamientos de poroto presentan perfiles de *nifH* propios. El aislamiento de *Mimosa* spp. caracterizado como *S. fredii* fue comparado con los aislamientos de leucaena, asignados con el mismo alelo de 16S ADN_r, en la Tabla 9 se incluyó el aislamiento de leucaena T1N7L para demostrar que no encontramos correlación de los perfiles de *nifH*.

NOAP25N1 es el único aislamiento cuyo perfil de RFLP es igual a una de las cepas de referencia. Perfiles de RFLP idénticos entre cepas sugiere que podría tratarse de la misma secuencia, pero la aparición de perfiles diferentes asegura secuencias divergentes. Dado que los genes simbióticos de *Rhizobium* y *Sinorhizobium* están en el plásmido simbiótico y teniendo en cuenta que los perfiles RFLP de *nifH* son diferentes, entonces podríamos concluir que el plásmido simbiótico de los aislamientos *R. tropici* B-like es distinto de la cepa de referencia.

	Alelo de 16S ADN _r	CfoI	HaeIII	<i>nifH</i> -tipo
Cepas de referencia				
CFN299	<i>R. tropici</i> A	A	A	1
CIAT899	<i>R. tropici</i> B	A	A	1
USDA4893	<i>S. sahelii</i>	E	F	6
USDA4894	<i>S. teranga</i>	F	G	7
HH103	<i>S. fredii</i>	G	H	8
I021	<i>S. meliloti</i>	H	I	9
NGR234	<i>R. sp</i>	I	J	10
Aislamientos de <i>P. vulgaris</i> del NOA				
NOAP25N1	<i>R. tropici</i> A	A	A	1
T44N22P	<i>R. tropici</i> B	B	B	2
T56N6P	<i>R. tropici</i> B	B	B	2
Aislamientos de leucaena del NOA				
T29N3L	<i>R. tropici</i> B	C	C	3
T56N1L	<i>R. tropici</i> B	C	C	3
T48N3L	<i>R. tropici</i> B	B	D	4
T48N2L	<i>R. tropici</i> B	B	D	4
T1N7L	<i>S. fredii</i>	J	K	6
Aislamientos de <i>Mimosa</i> spp. del NOA				
NOAP217N1	<i>R. tropici</i> B	C	C	3
NOAP159N2	<i>R. tropici</i> B	B	D	4
NOAP160N5	<i>R. tropici</i> B	B	D	4
NOAP159N3	<i>S. fredii</i>	D	E	5

Tabla 9: Perfiles de RFLP del gen *nifH* de aislamientos caracterizados con el alelo de 16S ADN_r de *R. tropici* B de *P. vulgaris*, leucaena y mimosa.

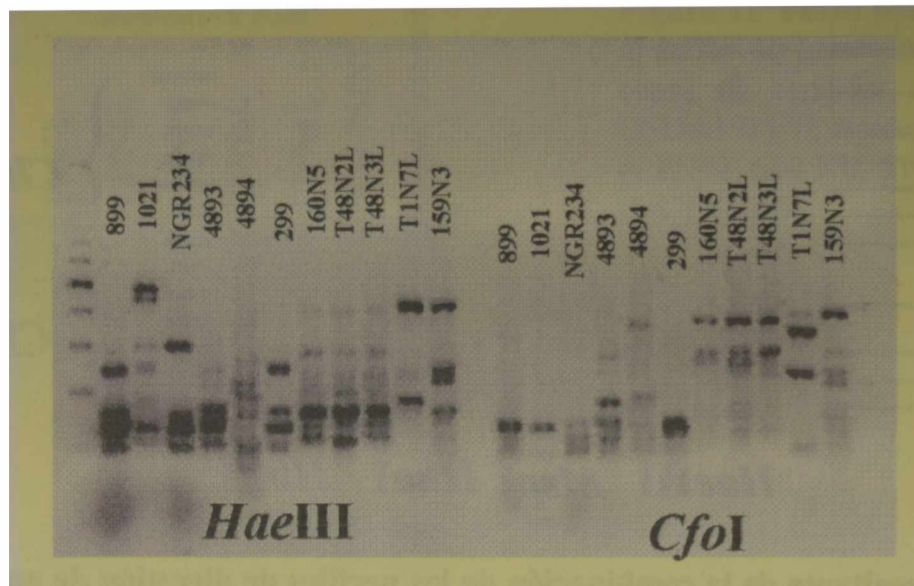


Figura 9: Perfiles de RFLP del gen *nifH* de aislamientos de *Mimosa* spp. y *Leucaena leucocephala*. Perfiles de restricción con las enzimas *HaeIII* y *CfoI* de un fragmento de 780 pb de aislamientos de mimosa y leucaena. Se incluyeron los perfiles de algunas cepas de referencia.

A partir del análisis de los perfiles resultantes de la combinación de los perfiles individuales de cada una de las cuatro enzimas, se obtuvo el dendrograma de similitud mostrado en la Figura 10, el cual está constituido por dos *cluster* principales, I y II. El *cluster* I agrupara a todos los aislamientos de leucaena con el alelo de *S. fredii*. El aislamiento *S. fredii* NOAP51N1 de *A. aroma* se agrupó en el *cluster* II. Ninguno de ellos fue agrupado con las cepas de referencia. El agrupamiento de los aislamientos *S. fredii* en un único *cluster* señalaría una relación de parentesco entre las secuencias de *nifH* de estos aislamientos la cual podría extenderse a los plásmidos simbióticos de esos aislamientos de leucaena. Los dos aislamientos con el alelo de *S. saheli* se agruparon en el mismo *subcluster* junto con el aislamiento NOAP51N1, señalando una relación de parentesco entre estos rizobios. El aislamiento T29N3L representativo del alelo ribosomal *R. tropici* B se agrupó en forma separada dentro del *cluster* II. Con un valor de similitud del 50% se agruparon las cepas de referencia de *S. fredii* y el aislamiento T23N1L representativo de *M. loti*. Estos resultados nos permiten concluir que cada alelo ribosomal se asocia a un determinado alelo de *nifH*, el cual no es compartido con la especie de referencia.

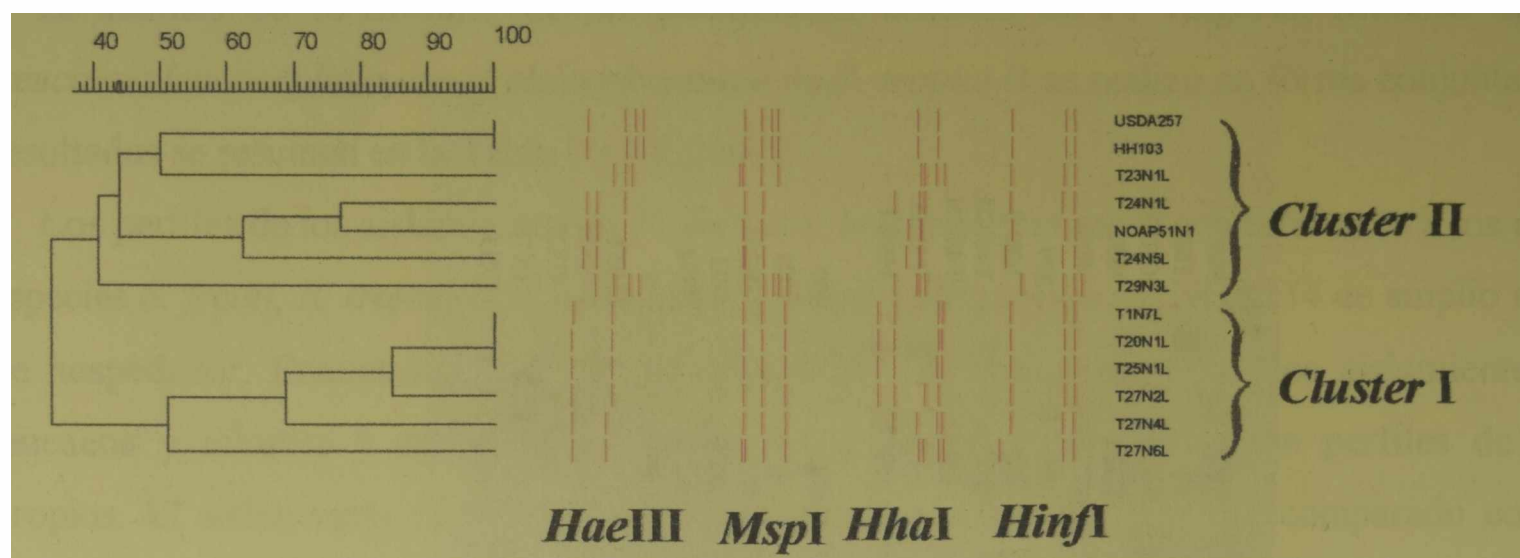


Figura 10: Dendrograma resultante de la combinación de los perfiles de digestión de un fragmento del gen *nifH*. Se incluyeron los resultados de las cepas de referencia de *S. fredii* (USDA257 y HH103). Los aislamientos con el genotipo ribosomal de *S. fredii* son T1N7L, T20N1L, T25N1L, T27N2L, T27N4L, T27N6L, NOAP51N1. *M. loti* T23N1L, *R. tropici* T29N3L, *S. saheli* T24N1L y T24N5L.

7- Perfil plasmídico

Se examinó el perfil plasmídico de la población de aislamientos encontrando en general plásmidos en un número variable entre 1 y 3. La mayoría de los aislamientos del genotipo de 16S ADN_r de *S. fredii* mostró un plásmido con la misma propiedad migracional. En la Figura 11 se ilustran algunos de los perfiles plasmídicos que se han caracterizado. Se encontró que el plásmido de menor movilidad de los aislamientos tipo *S. fredii* comigra con uno de los plásmidos de las cepas de referencia USDA191 y HH103. Esta coincidencia en el tamaño de los plásmidos no pudo ser correlacionada con los perfiles de RFLP de los genes simbióticos *nifH* y *nodC*. Demostrando, por lo tanto que la variabilidad en las regiones simbióticas no es reflejada en el perfil plasmídico de los aislamientos. Otro grupo numeroso de aislamientos presenta un único plásmido el cual suponemos se trataría del plásmido simbiótico.

Se estudiaron aislamientos representativos de los genotipos de ARDRA *S. teranga*e y *S. saheli* (Tabla 10) y se encontraron dos plásmidos con la excepción de T3N7L que presentó un único plásmido.

No se observaron plásmidos en dos aislamientos representativos del alelo de 16S ADN_r de *M. loti*.

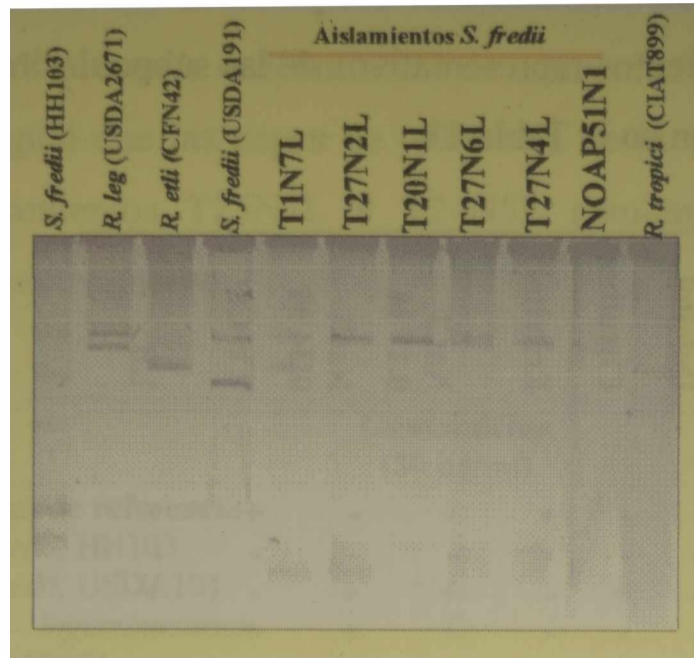


Figura 11: Perfil plasmídico de algunos genotipos aislados de *Leucaena leucocephala*. Se incluyeron cepas de especies conocidas: *S. fredii* (HH103, USDA191), *R. leguminosarum* (USDA2671), *R. etli* (CFN42, 630 Kb, 510, 392, 270 y 150) y *R. tropici* B (CIAT899).

Aislamiento	ARDRA	Perfil plasmídico
T29N3L	<i>R. tropici</i> B	2 plásmidos
T56N1L	<i>R. tropici</i> B	3 plásmidos
T1N7L	<i>S. fredii</i>	2 plásmidos
T27N6L	<i>S. fredii</i>	2 plásmido
T27N4L	<i>S. fredii</i>	1 plásmido
T20N1L	<i>S. fredii</i>	1 plásmido
T27N2L	<i>S. fredii</i>	1 plásmido
T23N5L	<i>S. saheli</i>	2 plásmidos
T25N2L	<i>S. terangae</i>	2 plásmidos
T23N7L	<i>S. terangae</i>	2 plásmidos
T3N7L	<i>S. terangae</i>	1 plásmido

Tabla 10: Perfil plasmídico de aislamientos de *Leucaena leucocephala*. Se indica el número de plásmidos revelados en geles de agarosa.

Caracterización fenotípica

Algunas publicaciones describen el uso de diferentes ensayos que resultan de utilidad para diferenciar entre las especies de crecimiento rápido capaces de nodular leucaena. Así por ejemplo, de Lajudie *et al.* (1994) describieron la utilización de las fuentes carbonadas xilitol y L-citrulina para distinguir entre las especies *S. terangae*, *S. saheli* y *S. fredii* y L-lisina como fuente de C y nitrógeno. Amarger *et al.* (1997) encontraron que *S. terangae*, *S. saheli* y *S. fredii* también presentan respuestas diferentes de crecimiento en condiciones de estrés tales como limitación en Ca, y presencia de altas concentraciones de NaCl. Por otra parte, cuando Scholla *et al* definieron la especie *S. fredii* en 1984 describieron como una de las características a su susceptibilidad a las siguientes concentraciones de antibióticos (µg/ml): Ácido nalidixico (40), gentamicina (30), rimfampicina (5), neomicina (100) y estreptomycin (10). Estos resultados demuestran la utilidad de algunos ensayos fenotípicos ya que algunos rasgos se encuentran ligados a una especie determinada.

Con el propósito de aplicar estos criterios de análisis se examinó la capacidad de utilización de las fuentes de carbono en un grupo de 15 aislamientos representativos de las subpoblaciones definidas por 16S ADNr y los resultados se muestran en la Tabla 11.

	TY-ox	Lactato	Lisina	xilitol	Dulcitol	Citrulina	Eritritol	NaCl 0.17 M	NaCl 0.34 M	TY-Ca	LB
Cepas de referencia											
<i>R. tropici</i> B, CIAT899	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
<i>R. tropici</i> A, CFN299	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. saheli</i> , USDA4893	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+
<i>S. terangae</i> , USDA4894	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
<i>S. fredii</i> , USDA191	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
Alelos de 16S ADNr de los aislamientos del NOA											
<i>S. fredii</i>	+ ^a	30 ^b	+	+	+	+	+	40	20	60	60
<i>S. terangae</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. saheli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	30
<i>M. loti</i>	+	- ^c	+	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>R. tropici</i> B	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-

Tabla 11: Resultados de la caracterización fenotípica de 15 aislamientos de leucaena.

^a +, más del 95% de los aislamientos son positivos

^b Con un número se indica el % de positivos;

^c -, menos del 5% de los aislamientos son positivos

Los aislamientos del NOA, son capaces de utilizar la mayoría de las fuentes de carbono ensayadas. Se encontraron diferencias en el crecimiento con lactato puesto que los aislamientos *S. terangae* y *M. loti* no son capaces de utilizarlo, sólo el 30% de los aislamientos caracterizados como *S. fredii* crecen con lactato y todos los aislamientos *S. saheli* lo utilizan como única fuente de carbono. La otra diferencia fue encontrada en el medio LB. El crecimiento en medio LB constituye un rasgo que diferencia a *R. tropici* B de *R. tropici* A, el cual no es capaz de desarrollarse en medio LB. El aislamiento caracterizado como *R. tropici* B (T29N3L) no crece en medio LB con lo cual es una característica más que lo distingue de *R. tropici* B. Por otro lado, de Lajudie *et al.* (1994) describieron que la especie *S. terangae* utiliza xilitol pero no L-citrulina, mientras que *S. saheli* lo hace exactamente al revés, como se puede observar en los resultados de la Tabla 11 los aislamientos del NOA no comparten esta propiedad.

La respuesta al crecimiento de los rizobios frente a distintas condiciones de estrés salino resultó variable, sin embargo, la mayoría fue capaz de crecer en un medio suplementado con 0,17 M de NaCl.

Todos los aislamientos caracterizados como *S. fredii*, *S. saheli* y *M. loti* toleraron el ácido nalidíxico en la concentración de ensayada (Tabla 11) y fueron sensibles a los otros antibióticos al igual que las cepas de referencia de la especie *S. fredii* (Tabla 12). Excepcionalmente los aislamientos T25N1L y T24N5L resultaron tolerantes a estreptomicina y rimfampicina, respectivamente.

	Gentamicina (30 µg/ml)	Neomicina (100 µg/ml)	Estreptomicina (10 µg/ml)	Rimfampicina (5 µg/ml)
Cepas de referencia				
<i>S. fredii</i> , HH103	S	S	R	S
<i>S. fredii</i> , USDA191	S	S	S	S
<i>R. leguminosarum</i> , USDA2671	S	S	S	R
<i>R. etli</i> , CFN42	S	S	R	S
<i>R. tropici</i> , CIAT899	S	S	R	S
Aislamiento con alelo de <i>S. fredii</i>				
T27N2L	S	S	S	S
T27N4L	S	S	S	S
T20N1L	S	S	S	S
NOAP51N1	S	S	S	S
T27N6L	S	S	S	S
T1N7L	S	S	S	S
T25N1L	S	S	R	S
Aislamientos con alelo de <i>S. saheli</i>				
T24N1L	S	S	S	S
T24N5L	S	S	S	R
Aislamientos con alelo de <i>M. loti</i>				
T23N1L	S	S	S	S
T23N3L	S	S	S	S

Tabla 12: Resistencia intrínseca a antibióticos de los aislamientos de leucaena. R y S indican tolerancia y sensibilidad a las concentraciones de antibióticos descritas.

Rango de planta hospedante

Con el propósito de determinar si los rizobios aislados son capaces de nodular otras leguminosas distintas a aquellas de las cuales fueron aisladas, se realizaron ensayos de inoculación. Los resultados se muestran en la Tabla 13

Todos los aislamientos fueron capaces de nodular poroto en forma efectiva. No nodularon *Glicine max*, *Medicago sativa*, *Arachis hypogea*, *Vigna* spp. ni *Sesbania* spp.. Los aislamientos caracterizados como *S. fredii* formaron nódulos en plantas de *Acacia aroma* pero no se observó nodulación en *Acacia mágnim* (Resultados no incluidos en la Tabla 13).

Se observó diferencia en el número de nódulos formados por los aislamientos del género *Sinorhizobium* y *R. tropici* en *Leucaena leucocephala*. Los primeros forman una mayor cantidad de nódulos (Aproximadamente 15) que los segundos (Entre 2 y 6 nódulos). En la Figura 12 se ilustra esta diferente respuesta a la nodulación.

Se encontró que todos los aislamientos de *Mimosa* spp. forman nódulos efectivos con *P. vulgaris* y *Leucaena leucocephala*.

Leguminosa	Alelos de 16S ADNr				
	<i>S. fredii</i>	<i>S. teranga</i>	<i>S. saheli</i>	<i>R. tropici</i> B	<i>M. loti</i>
<i>Leucaena leucocephala</i>	+	+	+	+	+
<i>Phaseolus vulgaris</i>	+	+	+	+	+
<i>Glicine max</i>	-	-	-	-	-
<i>Glicine max</i> var <i>Peking</i>	-	-	-	-	-
<i>Arachis hypogea</i>	-	-	-	-	-
<i>Vigna</i> spp	-	-	-	-	-
<i>Sesbania virgata</i>	-	-	-	-	-
<i>Sesbania punicea</i>	-	-	-	-	-
<i>Medicago sativa</i>	-	-	-	-	-

Tabla 13: Resultados del ensayo de inoculación de diversas leguminosas con aislamientos de *Leucaena leucocephala*. Se indica con los signos + y - la capacidad o no de los aislamientos de nodular las leguminosas.



Figura 12: Raíces de leucaena inoculadas con diferentes alelos de 16S ADNr. A- Planta de leucaena inoculada con un aislamiento caracterizado como *R. tropici* B. Se observan 2 nódulos. En el costado izquierdo se muestra una magnificación de la raíz a los efectos de mostrar el aspecto de los nódulos. B- Raíz de leucaena inoculada con un aislamiento *S. fredii*, en la cual se obtiene una abundante nodulación.

Estudio de la molécula señal de la nodulación

Los ensayos *in vitro* de inducción del factor Nod fueron realizados en presencia del inductor, seleccionado en un ensayo previo. En este ensayo previo el aislamiento de *Leucaena leucocephala* T25N1L, con el plásmido pMP154 el cual porta el promotor del gen *nodA* fusionado al gen reportero de la enzima β galactosidasa, fue incubado con diferentes compuestos potencialmente inductores. La capacidad inductora fue evaluada a través de los

niveles de la actividad β galactosidasa. Los resultados de los tres ensayos de inducción usando distintos flavonoides y exudados de raíz y semilla, respectivamente se muestran en el gráfico de la Figura 13.

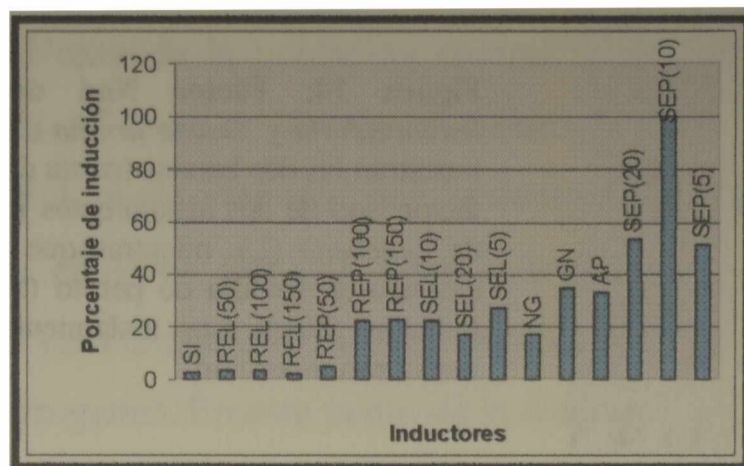


Figura 13: Actividad inductora *in vitro* de flavonoides y exudados de semilla y raíz. SI (sin inducir), REL (exudado radical de leucaena), REP (exudado radical de poroto), SEP (exudado de semillas de leucaena), SEP (exudado de semillas de poroto), NG (naringenina), GN (genisteína), AP (apigenina). Entre paréntesis se indica la cantidad agregada (en μ l de inductor/ml de medio). Todos los ensayos fueron realizados por triplicado con la mismas preparaciones de exudados y extractos.

El valor más alto de unidades Miller obtenido fue considerado el 100% de inducción y usado para referir los restantes valores. El extracto preparado de semillas de poroto mostró el mayor poder inductivo, mientras que el de semillas de leucaena (Hospedador de origen) resultó en una inducción 5 veces más baja. El gráfico de la Figura 13 muestra que la inducción disminuye al aumentar la cantidad de extracto de semilla de poroto por encima de 10 μ l/ml, probablemente por la presencia de alguna sustancia inhibitoria presente en el extracto. Ninguno de los dos exudados radicales ensayados tuvieron un poder inductor significativo, una explicación posible sería que durante la extracción no se concentró suficientemente el exudado o que simplemente este no tenga gran actividad inductora. Dado que no se tituló el principio inductor no se puede descartar que la baja inducción sea a un extracto diluido en factor.

Los metabolitos Nod fueron caracterizados mediante análisis cromatográfico en placas delgadas (TLC). Los resultados de los aislamientos caracterizados con el alelo de *S. fredii* y *M. loti* se muestran en las Figura 14 y 15 respectivamente. Algunos de los aislamientos *S. fredii*, mostraron baja respuesta a la incubación con extracto de semilla de leucaena, esto fue revelado por la presencia de una banda hidrofílica de baja intensidad en la placa de TLC, mientras que en otros, no se observó la acumulación del factor Nod. Además, la única banda observada fue cuando se utilizó como inductor el extracto de semillas de leucaena y no el de poroto, contrariamente a lo esperado según el ensayo de inducción cuyo resultado se muestra en la

Figura 13. No detectamos producción de factor Nod en los casos del aislamiento de *A. aroma*, NOAP51N1, y algunos aislamientos de leucaena.

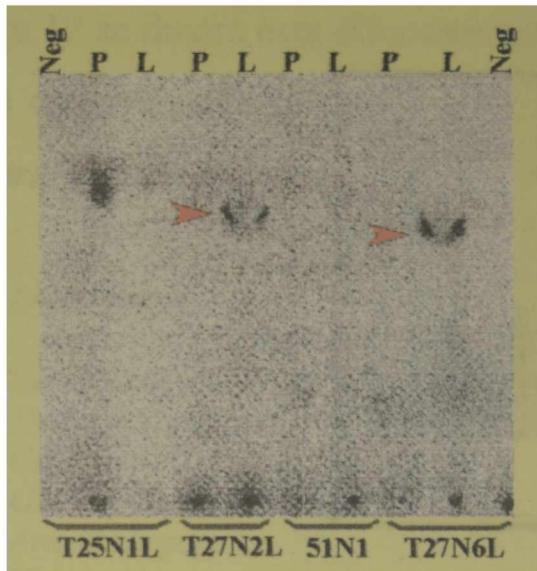


Figura 14: Factor Nod de aislamientos de *Leucaena leucocephala* y *Acacia aroma* caracterizados como *S. fredii*. Se muestran las dos bandas (punta de flecha roja) correspondientes al factor Nod de dos aislamientos inducidos con extracto de semilla de *Leucaena* (L), mientras que no se observa respuesta con el extracto de semilla de poroto (P) al igual que los controles sin inductor (Neg). Los aislamientos T25N1L y NOAP51N1 no mostraron inducción.

Contrariamente, dos aislamientos caracterizados como *M. loti* mostraron un perfil de 5 bandas y fueron capaces de ser inducidos con exudado de raíz de poroto, exudado radical de leucaena (Menor inducción) y naringenina.

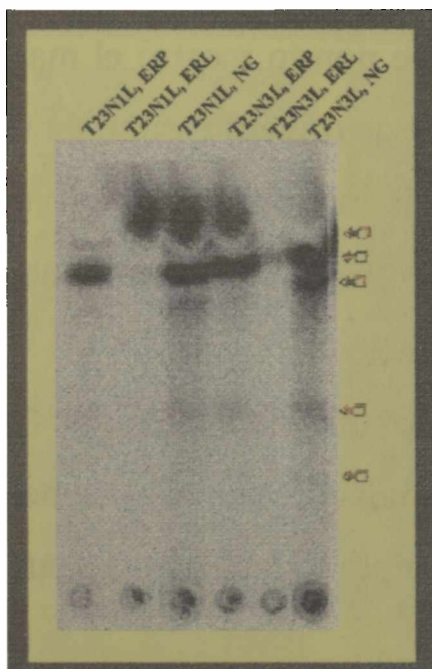


Figura 15: Autoradiografía de la TLC de dos aislamientos de *Leucaena leucocephala* con el alelo de 16S ADNr de *M. loti*. Los aislamientos fueron incubados en presencia de exudado radical de poroto (ERP), exudado radical de leucaena (ERL) y naringenina (NG) y los perfiles de bandas encontrados se señalan con flechas. La molécula precursora fue glucosamina radioactiva

Discusión

En este capítulo se presenta la caracterización de las poblaciones del suelo recuperadas en el laboratorio usando *Leucaena leucocephala* como planta atrapante. La población aunque cuantitativamente menor es más diversa que la aislada de *P. vulgaris*, demostrando que leucaena es una leguminosa apropiada para revelar heterogeneidad poblacional en suelos. Además, todos los aislamientos de leucaena nodulan efectivamente *P. vulgaris*, lo cual es interesante porque demuestra que en los suelos del NOA hay otras poblaciones con la potencialidad para nodular poroto.

El análisis de RFLP del gen 16S ARNr permitió agrupar a la colección en poblaciones idénticas a las especies *R. tropici* B, *R. leguminosarum*, *S. fredii*, *S. teranga*, *S. saheli*, y *M. loti*. Sin embargo, los resultados de análisis tales como DTGGE, secuencia del gen 16S ARNr y factor de nodulación demostraron divergencia y diversidad a nivel de esos alelos definidos por RFLP. Merece destacarse el caso de la población caracterizada como *R. tropici* B, el cual presenta un perfil de DTGGE diferente de la cepa de referencia de *R. tropici* B CIAT899 y el análisis de la secuencia parcial revela identidad con la de un aislamiento de poroto y descrito por Herrera-Cervecerá *et al.* en 1999. Por otro lado, si se tiene en cuenta la totalidad de la secuencia del gen 16S ARNr resulta que estos aislamientos comparten un 98% de similitud con la especie *Agrobacterium rhizogenes*. En este punto de la discusión creemos válido remarcar la utilidad del análisis de DTGGE para poner de manifiesto variaciones en una población que inicialmente resultó muy similar a la especie *R. tropici* B. De esta manera, como se mencionó en la sección de resultados, RFLP-16S ADNr y DTGGE podrían constituir dos criterios de análisis que considerados en forma aditiva refuercen la caracterización de los aislamientos.

El hallazgo que la secuencia del gen 16S ADNr de una de las poblaciones es muy similar a *A. rhizogenes* nos resultó muy curioso, teniendo en cuenta que el género *Agrobacterium* está comprendido por bacterias fitopatógenas presentes en los suelos y que no forman nódulos en leguminosas aunque, como *Rhizobium* está considerado dentro de las *Rhizobiaceas*. El género *Agrobacterium* fue descrito por primera vez en 1907 donde se propuso el nombre de *Agrobacterium tumefaciens* teniendo en cuenta sus propiedades patogénicas. En 1930 se describió otra especie denominada *A. rhizogenes*, que se caracteriza por inducir una reacción rizogénica. En la actualidad, la clasificación del género *Agrobacterium* está en revisión y dado que los datos de patrones proteicos, RFLP-IGS, 16S ADNr, utilización de fuentes de carbono no sustentan la discriminación de las especies en los géneros *Agrobacterium*, *Allorhizobium* y *Rhizobium* se ha propuesto la fusión de los géneros *Agrobacterium*, *Allorhizobium*, y *Rhizobium* (Young *et al.*, 2001; de Lajudie *et al.*, 1998; Willems y Collins, 1993; Lindstrom, 1989). Además, se ha demostrado que *Allorhizobium undicola* y *Agrobacterium vitis* presentan características comunes entre sí, con lo cual Young *et al.* (2001) proponen que ambas especies formen parte del género *Rhizobium*. De igual manera, *R. tropici* y *A. rhizogenes* se agruparían y el segundo cambiaría su nombre a *R. rhizogenes*. Esta clasificación se basó principalmente en los datos de secuencia de 16S ADNr y demuestra cuan cercanas son las especies de *R. tropici* y *Agrobacterium*. Lo novedoso de nuestro trabajo es que se demuestra por primera vez la capacidad noduladora de aislamientos asignados como *R. rhizogenes*. Este, sin embargo, no sería una característica propia del NOA, puesto que Wang *et al.* describieron aislamientos

mexicanos de leucaena denominados 'Tipo 9' que tienen perfil de 16S ADNr-RLFP de *R. tropici* B y que se agrupan junto a *R. rhizogenes* (1999). Dado que no contamos con la secuencia de 16S ADNr de los aislamientos 'Tipo 9' de Wang no podemos asignar un valor de similitud entre nuestros aislamientos y los mexicanos que nos permita conocer el grado de parentesco. Concluimos que los aislamientos del NOA de leucaena y mimosa, los cuales nodulan en forma efectiva *P. vulgaris* constituyen un nuevo genotipo emparentado con *R. rhizogenes* el cual ha adquirido la capacidad de nodular y al que nombraremos **genotipo salteño**.

Otro resultado interesante lo constituye las aparentes secuencias quimeras de algunos aislamientos, las cuales dificultaron la clasificación. Por ejemplo, T3N7L presenta un perfil de ARDRA de *S. teranga* pero su secuencia parcial difiere por igual de las especies *S. teranga* y *S. saheli*. En relación con estas especies, Haukka *et al.* (1996) plantearon en base a la secuencia de 16S ADNr que las especies *S. saheli* y *S. teranga* tienen un ancestro común y que luego han sufrido recombinaciones con otros genes de 16S ARNr que fueron independientes en cada especie. De esta manera el hallazgo de secuencias quimeras entre ambas especies o con alguna otra especie de rizobio podría constituir un evento mas o menos común dentro de *Sinorhizobium*.

Estudiando una colección de 150 aislamientos de leucaena en México, Wang *et al.* encontraron que la mayoría pertenecían al género *Sinorhizobium* (1999). Con resultados semejantes, demostramos en este trabajo que el alelo de *S. fredii* fue predominante en la población de los suelos del NOA. Sin embargo, se observaron diferencias en las estructuras poblacionales de los distintos sitios del NOA. Por ejemplo, *S. fredii* se encontró principalmente en los campos de cultivo de Pichanal y Santa Clara de la región norteña y *S. saheli* y *S. teranga* en el Valle de Lerma, esto lleva a suponer que el cultivo de la región tenga influencia en la composición de dichas poblaciones (Coutinho *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999). Por otra parte, las diferentes características fisicoquímicas de los suelos del norte y sur de la región podrían a su vez, afectar a la diversidad bacteriana.

Los rizobios pertenecientes a la especie *S. fredii* fueron aislados en Asia por primera vez en 1982 de nódulos de cultivares asiáticos de soja (Scholla *et al.*, 1984). En el NOA el cultivo de soja fue introducido en 1882 (Burkat, 1952) con lo cual sería improbable concluir que la diversidad de los rizobios con el alelo ribosomal de *S. fredii* se deba a la evolución de las bacterias que llegaron adheridas a las semillas. Es por ello que otra tiene que ser la razón por la cual la población de *S. fredii* sea tan abundante y diversa. Se ha descrito en trabajos anteriores que rizobios clasificados como *S. fredii* son capaces de nodular poroto (Herrera-Cervera *et al.*,

1999, Sadowsky *et al.*, 1988, Moreira *et al.*, 1993). Por otro lado, también se aislaron rizobios con el alelo de 16S ADNr de *S. fredii* a partir de nódulos cosechados en América, África y Europa (Haukka *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1999; de Lajudie *et al.*, 1998; Herrera-Cervera *et al.*, 1999). Coincidentemente con nuestros resultados la mayoría de estos aislamientos tienen la capacidad de nodular poroto y leucaena, pero no soja. Este resultado y la caracterización de los genes de *nodC* y *nifH* señalan que los aislamientos constituirían un nuevo biovar (*S. fredii* var acacia), que cuenta con el potencial simbiótico para asociarse a *Mimosa* spp., *Leucaena leucocephala* y *P. vulgaris*. En general se asume que la presencia de una población muy diversa se asocia con la leguminosa hospedadora y ambos coevolucionan, por analogía este nuevo biovar estaría asociado a una leguminosa hospedadora la cual data de varios años en el NOA dando lugar a la evolución del microsimbionte que hemos observado en este trabajo (Lie *et al.*, 1987). Otro punto de vista sería considerar que aquellos aislamientos *S. fredii* de soja aislados en Asia, que fueron estudiados cronológicamente con anterioridad, pueden haber resultado de la adaptación simbiótica de la especie en un ambiente con soja.

Segovia *et al.* (1993) usaron leucaena para distinguir las especies *R. tropici* y *R. etli* ambas nodulantes de poroto. La especie *R. etli* a diferencia de *R. tropici* no nodula leucaena. Posteriormente, en México se aislaron de *Mimosa affinis* rizobios que fueron caracterizados como *R. etli* bv. *mimosae* los cuales también nodulan efectivamente leucaena (Wang *et al.*, 1999b). Este resultado demuestra que dentro de la especie *R. etli* se encuentran biovariedades. Una situación semejante se daría con los aislamientos de leucaena caracterizados con el alelo ribosomal *R. leguminosarum*, los cuales por analogía podrían constituir una biovariedad nueva dentro de la especie que podría denominarse *R. leguminosarum* bv. leucaena.

Las leguminosas pertenecientes a los géneros tropicales *Mimosa*, *Leucaena* y *Acacia* son consideradas hospedadores promiscuos (Campelo *et al.*, 1969, Dupuy *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1999; de Lajudie *et al.*, 1994 y 1998; Oyaizu *et al.*, 1993; Trinick *et al.*, 1980). En este trabajo hemos demostrado que *Mimosa* spp. se encuentra asociada simbióticamente a rizobios con alelos de 16S ADNr de las especies *R. tropici* B y *S. fredii*, con lo cual no podríamos considerarla tan promiscua. El número de aislamientos con alelo de 16S ADNr de *S. fredii* se limitó a uno, el cual presentó características propias diferentes de los aislamientos tipo *S. fredii* de leucaena. Esto pondría en evidencia que las poblaciones de *S. fredii* nodulantes de *Leucaena leucocephala* y *Mimosa* spp. son diferentes.

La caracterización realizada mediante el uso de *fingerprints* de ADN y DTGGE, de los aislamientos con el alelo de *R. tropici* B de mimosa, leucaena y *P. vulgaris*, mostró un nivel bajo de diversidad. Estos aislamientos se diferencian principalmente en la región intergénica y

genotipos de *nifH*. Se concluye, a partir de esta similitud, que la población asignada como genotipo salteño, tiene capacidad de asociarse simbióticamente a las tres leguminosas. La diversidad encontrada en el gen *nifH* podría asociarse con biovares diferentes de esta nueva especie propuesta. Por otra parte encontramos que mimosa fue la única leguminosa nodulada en el NOA por el genotipo salteño (los aislamientos de leucaena y poroto fueron recuperados en el laboratorio), probablemente esta especie sea el microsimbionte natural de la leguminosa.

Nuestros aislamientos de mimosa tienen la propiedad de nodular leucaena que también fue observada por otros investigadores, lo cual sería una característica de los aislamientos de *Mimosa* spp. en forma independiente del alelo de 16S ADNr al cual pertenezcan (Wang *et al.*, 1999; Trinck *et al.*, 1980). Además, el genotipo salteño y *S. fredii* fueron recuperados con plantas de *Leucaena leucocephala* inoculadas con suelos del NOA, señalando que estas especies son capaces de competir exitosamente con otros rizobios por la nodulación de leucaena en las condiciones de laboratorio.

En este trabajo la utilización de leucaena, un hospedador promiscuo, nos permitió a través de su inoculación en el laboratorio con suspensiones de suelo, demostrar la existencia de poblaciones de rizobios nodulantes de *P. vulgaris* que no alcanzamos revelar con *P. vulgaris* u otras leguminosas silvestres examinadas. Concluimos que leucaena es un elemento útil que contribuye al conocimiento de la estructura poblacional de los rizobios del NOA.

Bibliografía

1. Aguilar, O. M., D. H. Grasso, P. M. Riccillo, M. V. López, and E. Szafer. 1998. Rapid identification of bean rhizobial isolates type I by a *nifH*-PCR assay. *Soil Biol. Biochem.* 30:1655-1661
2. Aguilar, O. M., M. V. López, P. M. Riccillo, R. A. Gonzales, M. Pagano, D. H. Grasso, A. Pühler, and G. Favelukes. 1998. Prevalence of the *Rhizobium etli*-like allele in genes coding for 16S rRNA among the indigenous rhizobial populations found associated with wild beans from the Southern Andes in Argentina. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3520-3524.
3. Amarger, N., M. Bours, F. Revoy, M. R. Allard, and G. Laguerre. 1994. *Rhizobium tropici* nodulates field-grown *Phaseolus vulgaris* in France. *Plant and Soil.* 161:147-156.
4. Amarger, N., V. Macheret, and G. Laguerre. 1997. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47:996-1006.
5. Anyango, B., K. J. Wilson, J. L. Beynon, and K. E. Giller. 1995. Diversity of rhizobia nodulating *Phaseolus vulgaris* L. in two Kenyan soils with contrasting pHs. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4016-4021.
6. Bromfield, E. S. P., and L. R. Barran. 1990. Promiscuous nodulation of *Phaseolus vulgaris*, *Macroptilium atropurpureum*, and *Leucaena leucocephala* by indigenous *Rhizobium meliloti*. *Can. J. Microbiol.* 36:369-372.
7. Burkart, A. 1952. Las leguminosas argentinas silvestres y cultivadas. Ediciones Acme Agency.
8. CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza). 1997. Nota técnica sobre el manejo de semillas forestales. Colección guías silviculturales No 14. p 52.
9. Campelo, A. B., and J. Döbereiner. 1969. Estudo sobre inoculação cruzada de algumas leguminosas florestais. *Pesq. Agropec. Bras.* 4:67-72.
10. Countinho, H. L. C., V. M. Oliveira, A. Lovato, A. H. N. Maia, and G. P. Manson. 1999. Evaluation of the diversity of rhizobia in Brazilian agricultural soils cultivated with soybeans. *Appl. Soil Ecology.* 13:159-167
11. de Lajudie, P., A. Willems, G. Nick, F. Moreira, F. Molouba, B. Hoste, U. Torck, M. Neyra, M. D. Collins, K. Lindström, B. Dreyfus, and M. Gillis. 1998. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp nov. *Int J Syst Microbiol.* 48:369-382.

12. de Lajudie, P., A. Willems, B. Pot, D. Dewettinck, G. Maestrojuan, M. Neyra, M. D. Collins, B. Dreyfus, K. Kersters, and M. Gillis. 1994. Polyphasic taxonomy of rhizobia: Enmendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44:715-733.
13. de Lajudie, P., E. Laurent-Fulele, A. Willems, U. Torck, R. Coopman, M. D. Collins, K. Kersters, B. Dreyfus, and M. Gillis. 1998. *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. *Int J Syst Microbiol.* 48:1277-1290.
14. Dupuy, N., A. Willems, B. Pot, D. Dewettinck, L. vandenbruaene, G. Maestrojuan, B. Dreyfus, K. Kersters, M. D. Collins, and M. Gillis. 1994. Phenotypic and genotypic characterization of bradyrhizobia nodulating the leguminous tree *Acacia albida*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44:461-473.
15. George, M. L. C., J. P. W. Young, and D. Borthakur. 1993. Genetic characterization of *Rhizobium* sp. Strain TAL1145 that nodulates tree legumes. *Canadian Journal of Microbiology* 40:208-215.
16. Graham, P. H., M. J. Sadowsky, H. H. Keyser, Y. M. Barnet, R. S. Bradley, J. E. Cooper, D. J. De Ley, B. D. W. Jarvis, E. B. Roslycky, B. W. Strijdom, and J. P. W. Young. 1991. Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root-and stem-nodulating bacteria. *Int J. Syst Bact* 41:582-587
17. Haukka, K., K. Lindström, and J. P. W. Young. 1996. Diversity of partial 16S rRNA sequences among and within strains of African rhizobia isolated from *Acacia* and *Prosopis*. *System. Appl. Microbiol.* 19:352-359
18. Herrera-Cervera, J. A., J. Caballero-Mechado, G. Laguerre, H. V. Tichy, N. Requena, N. Amarger, E. Martinez-Romero, J. Olivares, and J. Sanjuan. 1999. At least five rhizobial species nodulating *Phaseolus vulgaris* in Spanish soil. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 30:87-97.
19. Kaneko, T., Y. Nakamura, S. Sato, E. Asamizu, T. Kato, S. Sasamoto, A. Watanabe, K. Idesawa, A. Ishikawa, K. Kawashima, T. Kimura, Y. Kishida, C. Kiyokawa, M. Kohara, M. Matsumoto, A. Matsuno, Y. Mochizuki, S. Nakayama, N. Nakazaki, S. Shimpo, M. Sugimoto, C. Takeuchi, M. Yamada, and S. Tabata. 2000. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium*. *DNA Res.* 7:331-338.
20. Laguerre, G., S. M. Nour, V. Macheret, J. Sanjuan, P. Drouin, and N. Amarger. 2001. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology.* 147: 981-993.
21. Lie, T. A., D. Goktan, M. Engin, J. Pijnenborg, and A. Anlarsal. 1987. Co-evolution of the legume-rhizobium association. *Plant Soil.* 100:171-181.
22. Lindstrom, K. 1989. *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. *Int J Syst Bacteriol.* 39:365-367.
23. Martinez-Romero, E., L. Segovia, F. M. Mercante, A. A. Franco, P. Graham, and M. A. Pardo. 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* spp trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41:417-426.
24. Moreira, F. M. S., M. Gillis, B. Pot, K. Kersters, and A. A. Franco. 1993. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. *System. Appl. Microbiol.* 16:135-146.
25. Oyaizu, H., S. Matsumoto, K. Minamisawam and T. Gamou. 1993. Distribution of rhizobia in leguminous plants surveyed by phylogenetic identification. *J Gen Appl Microbiol.* 39:339-354.
26. Peoples, M. B., J. K. Ladha, and D. F. Herridge. 1995. Enhancing legume N₂ fixation through plant and soil management. *Plant and Soil.* 174:83-101.
27. Sadowsky, M. J., P. B. Cregan, and H. H. Keyser. 1988. Nodulation and nitrogen fixation efficacy of *Rhizobium fredii* with *Phaseolus vulgaris* genotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1907-1910.
28. Sanginga, N., B. Valauwe, and S. K. A. Danso. 1995. Management of biological N₂ fixation in alley cropping systems: Estimation and contribution to N balance. *Plant and Soil.* 174:119-141.
29. Scholla, M. H., and G. H. Elkan. 1984. *Rhizobium fredii* sp. nov., a fast-growing species that effectively nodulates soybeans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34:484-486.
30. Segovia, L., J. P. Young, and E. Martinez Romero. 1993. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strain as *Rhizobium etli* sp. Nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43:374-377.
31. Spaink, H. P., J. H. Robert, C. A. Okker, Ell Wijffelman, Pees and Ben J. J. Lugtenberg. 1987. Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1J1. *Plant Mol Biol.* 9:27-39.
32. Trinick, M. J. 1980. Relationships among the fast-growing rhizobia of *Lablab purpureus*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa* spp., *Acacia farnesiana* and *Sesbania grandiflora* and their affinities with other *Rhizobium* groups. *J Appl Bacteriol.* 49:39-53.
33. Wang, E. T., I Toledo-García, M. A. Rogel, and E. Martinez-Romero. 1999. Rhizobial populations nodulating *Leucaena leucocephala*, *Mimosa affinis* and *Sesbania herbacea* in de mexican soils. *Proceedings of the 12th International Congress on Nitrogen Fixation, Foz do Iguacu, Paraná, September 12-17, 1999.*
34. Wang, E. T., J. Martinez-Romero, and E. Martinez-Romero, 1999. Genetic diversity of rhizobia nodulating *Leucaena leucocephala* in Mexican soils. *Mol Ecol* 8:711-724

-
35. Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier, and D. J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**:697-703.
 36. Willems, A., and M. D. Collins. 1993. Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences. *Int J Syst Bacteriol.* **43**:305-313.
 37. Young, J. M., L. D. Kuykendall, E. Martinez-Romero, A. Kerr, and H. Sawada. 2001. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *Int J Syst Microbiol.* **51**:89-103.
 38. Young, J. P. W., H. L. Downer, and B. D. Eardly. 1991. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAi1 by Polymerase Chain Reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. *J. Bacteriol.* **173**:2271-2277.

Capítulo 7



Capítulo 7

Aplicaciones del estudio de la diversidad de los rizobios nodulantes de poroto en la selección de aislamientos que mejoren la productividad del cultivo

Introducción

El NOA es la región de la Argentina donde aún coexisten áreas de tierras vírgenes y cultivadas de *Phaseolus vulgaris*. La producción anual de poroto, en esta región, es de unas 300000 toneladas (Burkart, 1952). La forma de cultivo depende de la región, desde sistemas con alta tecnología en el NOA, hasta sistemas pobres usados para subsistir en Africa y América central. Los requerimientos de nitrógeno de los cultivos pueden ser encontrados en el suelo como nitrógeno inorgánico, aplicado como fertilizante químico o bien, en el caso de las leguminosas también, mediante la fijación biológica de nitrógeno (BNF, *Biological Nitrogen Fixation*) la cual resulta de la asociación simbiótica con las bacterias del suelo, rizobios.

En el Capítulo 4 se describió la diversidad de los rizobios nodulantes de las variedades silvestre y comercial de poroto estudiando una colección de 695 aislamientos, de los cuales 400 se encontraron asociados a poroto común. *R. etli* es la especie aislada predominantemente de los nódulos de poroto y fue encontrada asociada a un alto grado de diversidad. Se encontraron otros genotipos nodulantes de poroto que fueron recuperados con *Leucaena leucocephala* como leguminosa atrapante y cuyos alelos de 16S ADNr son los de las especies *S. fredii*, *S. saheli*, *S. teranga*, *Mesorhizobium loti* y *R. tropici* B.

Con el propósito de incrementar la producción de poroto una de las prácticas que se trata de llevar a cabo es la inoculación con rizobios. *Phaseolus vulgaris* es considerado un cultivo pobre en fijación de nitrógeno, sin embargo algunos trabajos indican que se puede obtener altos niveles de fijación utilizando cepas rizobios muy eficientes (Buttery *et al.*, 1992; Hungria *et al.*, 2000).

El objetivo de este capítulo fue seleccionar aislamientos nodulantes de poroto, a partir de la diversidad encontrada, que resulten eficientes en la fijación biológica de nitrógeno para ensayos en condiciones de campo en la región del NOA.

Colección aislamientos de poroto a partir de la cual se seleccionaron cepas para la inoculación

La selección de los aislamientos para los ensayos de campos fue realizada a partir de la colección de rizobios nodulantes de poroto recuperados de 5 regiones del NOA que se caracterizan por ser lugares de producción de poroto (Véase Capítulo 4). También se incluyeron en este grupo aislamientos de leucaena que nodulan poroto y 400 aislamientos de poroto que provienen de uno de los ensayos de campo realizado en Cerrillos.

La caracterización de los aislamientos realizada en los Capítulos 4 y 6 mostró:

- 1- Los aislamientos de la regiones productoras de poroto tienen el alelo de 16S ADN_r de *R. etli*
- 2- Los aislamientos de leucaena fueron más diversos, asignando los alelos de 16S ADN_r a las especies *S. fredii*, *S. saheli*, *S. teranga*, *R. tropici* B, *R. leguminosarum* y *M. loti*. Todos estos genotipos fueron capaces de inducir la formación de nódulos efectivos en poroto en el laboratorio, indicando que en la comunidad rizobiana del suelo del NOA otras especies diferentes a *R. etli* pueden establecer simbiosis con *P. vulgaris*.

Caracterización de las poblaciones en los suelos cultivados con poroto

Con el fin de analizar las poblaciones de rizobios nodulantes de poroto que habitan el mismo suelo pero conviven con diferentes plantas leguminosas y no leguminosas, se llevó a cabo un ensayo con suelos de Cerrillos (Salta) y Santa Clara (Jujuy), lugares donde se cultiva poroto habitualmente.

En cada sitio, se evaluaron los niveles de rizobios nodulantes de poroto en las muestras de suelo de dos parcelas vecinas con cultivos diferentes, tomadas durante los meses de marzo y mayo de 1998. Estos meses se corresponden con la época anterior y posterior a la siembra de poroto, respectivamente. Además, se cosecharon plantas de la mayor y la menor dilución nodulada del ensayo del NMP de los suelos tomados en el segundo muestreo. Se analizaron 4 plantas por dilución y 10 nódulos de la corona de la raíz de cada planta. Los aislamientos obtenidos fueron caracterizados por *fingerprint* ERIC y 16S ADN_r

En **Cerrillos** se analizaron un campo con poroto y una parcela con maíz. Las densidades de rizobios de las parcelas se muestran en la Tabla 1

Muestra	NMP	Fecha
Campo con poroto	6.7 10 ⁴	3/98
	7.8 10 ⁵	5/98
Campo con maíz	1.3 10 ⁴	3/98
	2.2 10 ⁵	5/98

Tabla 1: Resultados del NMP en muestras de suelo de Cerrillos. La densidad de rizobios nodulantes de poroto se expresa en UFN/gr de suelo seco.

Se observó un aumento de un orden de magnitud, en los niveles de rizobios nodulantes de poroto, en ambas parcelas luego de la siembra de poroto. Sin embargo, no se encontraron diferencias en los niveles de rizobios nodulantes de poroto de ambas las parcelas, en ninguno de los dos muestreos. El análisis de perfiles de *fingerprints* permitió diferenciar los genotipos de los aislamientos de poroto de las dos parcelas. Tal como muestra la Figura 1, se encontró mayor diversidad de genotipos en la parcela de poroto, mientras que en el campo de maíz predominó el genotipo H. El genotipo H también fue encontrado en el campo de poroto pero en una proporción menor. Algunos genotipos no fueron aislados del suelo de una parcela y si de la otra indicando una distribución desigual de los rizobios a los cuales representan. Por análisis de RFLP del gen 16S ARNr se encontró que todos estos genotipos tienen el alelo de *R. etli*.

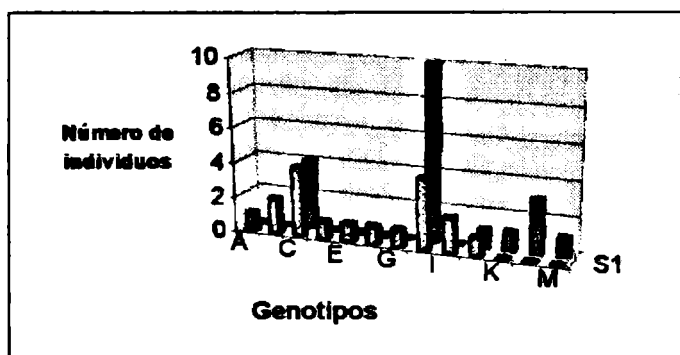


Figura 1: Distribución porcentual de perfiles de fingerprints entre las poblaciones asociadas a un campo de poroto o de maíz. Diagrama de barras que muestra la relación observada entre los distintos genotipos encontrados en la muestra de suelo. Cada barra corresponde a un genotipo, en color verde se representan los encontrados en el campo de poroto y en azul los encontrados en el campo de maíz.

Santa Clara: Las muestras de suelo estudiadas fueron de una parcela con poroto y otra con cultivo de plantas de citrus. Las densidades rizobianas de cada muestra de suelo se muestran en la Tabla 2.

Muestra	NMP	Fecha
Campo con poroto	5.3 10 ³	3/98
	5.3 10 ⁴	5/98
Campo con citrus	3.7 10 ³	3/98
	1.2 10 ²	5/98

Tabla 2: Resultados del NMP en muestras de suelo de Santa Clara. La densidad de rizobios nodulantes de poroto se expresa en UFN/gr de suelo seco.

En el campo con poroto los rizobios aumentan en un orden de magnitud entre la primera toma de muestra y la segunda. Por el contrario, el suelo sembrado con citrus presentó una

marcada disminución de rizobios. La diferencia observada en ambas parcelas indicaría que la presencia de la planta de poroto favorece el desarrollo de los rizobios que se encuentran en ese campo. Una explicación posible sería que mientras no se siembre poroto ambas poblaciones se equilibran cuantitativamente, pero luego de la siembra la planta de poroto favorece la proliferación de la población. El análisis de los perfiles de *fingerprints* de los aislamientos recuperados de las dos parcelas se muestra en la Figura 2.

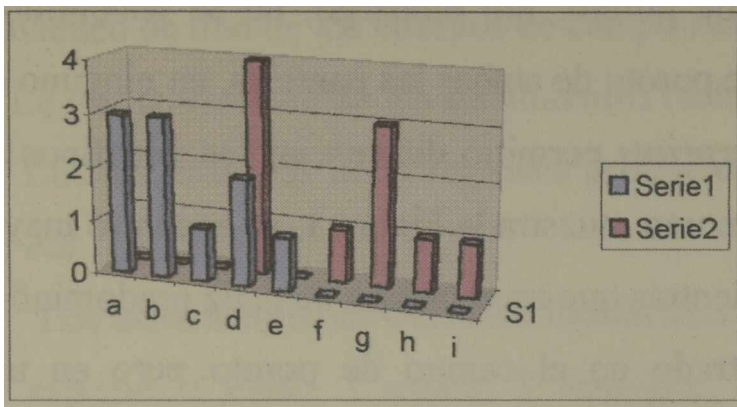


Figura 2: Distribución porcentual de los genotipos encontrados en las parcelas de poroto y citrus en Santa Clara. En color celeste se muestran los genotipos aislados de la parcela con poroto y en bordeau el campo con planta de citrus.

Se encontró diferentes genotipos en ambos campos, con la excepción del genotipo d. La diversidad encontrada en este suelo de Santa Clara es menor que en Cerrillos. Los aislamientos representativos de cada perfil de *fingerprint* fueron caracterizados y se encontró por PCR-RFLP de 16S ADNr que todos tienen el alelo de la especie *R. etli*.

Se concluye que el cultivo de poroto favorece la proliferación de los rizobios en el suelo y en algunos casos aumenta la diversidad.

Selección de aislamientos en condiciones de invernadero

Se adoptaron 8 criterios para seleccionar los rizobios de la colección de aislamientos, que fueron probados para la eficiencia en el rendimiento de poroto:

- 1- Se recuperaron rizobios de plantas de poroto inoculadas en el laboratorio con diluciones seriadas de suspensiones de suelos de las regiones poroterías Campichuelo y Santa Clara. Cuatro semanas después de la inoculación se cosecharon los nódulos de las plantas inoculadas con las diluciones extremas de suelo y se aislaron los rizobios asociados. Los aislamientos fueron caracterizados por *rep-fingerprint* y los que compartieron el mismo perfil de *fingerprint* fueron considerados idénticos. Los aislamientos con el mismo genotipo que fueron encontrados presentes en ambas diluciones de suelo representan a los rizobios más competitivos y abundantes en la población de rizobios y fueron seleccionados para los ensayos posteriores. Con este ensayo se seleccionaron los aislamientos Sc15 y Camp11

- 2- Fueron seleccionados aislamientos de la misma planta que representan a diferentes genotipos de *nodC*. En este caso eligieron NOAP194N8 (genotipo C) y NOAP194N15 (Genotipo D).
- 3- Fueron seleccionados aislamientos de poroto, provenientes de dos parcelas de Santa Clara, cuyos genotipos fueron predominantes y presentes en ambos campos (Ver ensayo de descrito en la página 216). Los aislamientos fueron T33N2P y T34N2P.
- 4- A partir de plantas cosechadas en el ensayo de 1999 en Cerrillos, se compararon mediante *rep-fingerprints* las poblaciones de rizobios aisladas del tratamiento sin inocular y el tratamiento inoculado con uno de los rizobios del NOA ensayado (porcentaje de ocupancia 20%). Aquellos perfiles que aparecían en altas concentraciones en ambos tratamientos (diferentes del rizobio ensayado como inoculante) fueron considerados abundantes y competitivos y se seleccionaron para la próxima rueda de estudios los aislamientos 77, 321 y 152. Los aislamientos de este ensayo fueron nombrados con números para distinguirlos de toda la colección, en la cual no se incluyeron.
- 5- Idem al anterior pero en un ensayo realizado en Embarcación durante el año 1999. Se recolectaron plantas de dos tratamientos, uno inoculado con Sc15 y otro sin inocular y de cada uno se tomó un aislamiento NOAP205N9 y NOAP207N1, respectivamente.
- 6- Se inocularon en el laboratorio diferentes variedades comerciales de poroto (*Phaseolus vulgaris* L. poroto negro cultivares Camilo y NAG 12; poroto blanco cultivar Perla, INTA Estación Experimental Salta, Argentina) con suspensiones de 5 suelos de regiones poroterías del NOA (Ver Capítulo 4, página 113). Los rizobios cosechados de los nódulos de los distintos cultivares inoculados con el mismo suelo fueron analizados mediante *rep-fingerprints*. Aquellos genotipos de rizobios que aparecieron en todos los cultivares fueron seleccionados por tener la capacidad de nodular diversos cultivares comerciales de poroto. Los aislamientos seleccionados fueron T52N5PN y T51N5PP.
- 7- Aislamientos provenientes de la zona de Pichanal, la cual se caracteriza por no presentar respuestas positivas a la práctica de la inoculación. El aislamiento seleccionado es NOAP195N5.
- 8- Dado que *R. tropici* B CIAT899, está siendo usada como inoculante en otros países como Brasil (Hungria *et al.*, 2000), se seleccionaron aislamientos de poroto que fueron caracterizados con el alelo de 16S ADNr de *R. tropici* B (también llamado genotipo salteño). En este caso se seleccionó T44N22P.

Los aislamientos seleccionados con estos 8 criterios fueron ensayados por su eficiencia en la inoculación de poroto, la cual fue determinada por el peso seco de la parte aérea de la leguminosa crecida en una cámaras de cultivo vegetal (Figura 3).

Figura 3: Ensayo de inoculación en cámara de crecimiento vegetal. Las plantas fueron incubadas en esta cámara con condiciones controladas de temperatura (28 °C) y humedad (60%). Se indica en cada hilera el tratamiento de inoculación aplicado. Se observan diferencias en el crecimiento entre plantas inoculadas (en los extremos) y no inoculadas (centro), además se observan diferencias entre los distintos tratamientos de inoculación.



La mayoría de los ensayos fueron realizados en un cámara con condiciones controladas de temperatura y humedad como se muestra en la Figura 3. Sin embargo, algunos se llevaron a cabo en otra cámara sin estas condiciones y se encontraron diferencias en los pesos de la parte aérea de los tratamientos sin inocular incubados en diferentes condiciones. Con el fin de comparar los resultados de los distintos ensayos se normalizó el peso seco de cada ensayo mediante la relación de los promedios: $\text{Peso seco del tratamiento X} / \text{Peso seco del tratamiento sin inocular}$.

En la Tabla 3 se muestran los resultados de los distintos tratamientos. Dos de ellos presentan valores menores a la unidad, pero el error en las determinaciones indica que bien podrían ser iguales a la unidad. Los aislamientos T52N5PN, Sc15 y T51N5PP recuperados de muestras de suelo de Metán, Santa Clara y Cerrillos, respectivamente fueron los que produjeron mayor acumulación de la parte aérea. De los tres se seleccionó Sc15 por provenir de un suelo con características diferentes. Camp11 no mostró un valor tan alto de peso seco relativo, sin embargo fue el único de Campichuelo y fue seleccionado también. Finalmente se seleccionó T44N22P por su alelo ribosomal de *R. tropici* B (caracterizado en este trabajo como genotipo salteño).

Aislamientos/ Cepas	Genotipo de 16S rRNA	Peso seco relativo de la parte aérea	Desviación estándar del peso seco
T52N5PN	<i>R. etli</i>	2.79	0.005
Sc15	<i>R. etli</i>	2.44	0.063
T51N5PP	<i>R. etli</i>	2.40	0.019
77	<i>R. etli</i>	1.79	0.068
321	<i>R. etli</i>	1.64	0.029
NOAP205N9	<i>R. etli</i>	1.62	0.122
NOAP195N5	<i>R. etli</i>	1.57	0.057
NOAP207N1	<i>R. etli</i>	1.55	0.152
Camp11	<i>R. etli</i>	1.44	0.148
152	<i>R. etli</i>	1.44	0.073
T33N2P	<i>R. etli</i>	1.35	0.078
T44N22P	<i>R. tropici</i> B	1.32	0.111
NOAP194N8	<i>R. etli</i>	1.19	0.119
CFN42	<i>R. etli</i>	1.13	0.080
T34N2P	<i>R. etli</i>	1.02	0.001
CIAT899	<i>R. tropici</i> B	0.99	0.079
NOAP194N15	<i>R. etli</i>	0.91	0.009

Tabla 3: Efectividad de los aislamientos de poroto del NOA utilizados como inoculantes. Se determinó el peso seco de la parte aérea de cinco plantas y la efectividad fue calculada como la relación entre el peso de la planta inoculada y el peso de la planta no inoculada. El genotipo de 16S ARNr fue establecido por RFLP como se describe en la sección materiales y métodos. Se muestra la desviación estándar de los cinco valores del peso seco de las plantas inoculadas con un tratamiento.

Ensayos de campo

Los ensayos de campo fueron realizados en Cerrillos en la provincia de Salta (24°55'S, 65°29'), lugar donde el poroto fue cultivado al menos durante los últimos 4 años. El diseño experimental consistió en 4 réplicas de microparcels randomizadas como se describe en Materiales y Métodos. Cinco aislamientos de poroto que representan diferentes genotipos fueron ensayados y se evaluó la producción de grano. Tres de los aislamientos fueron seleccionados a través de los ensayos de peso seco (Sc15, Camp11 y T44N22P) y dos por su alelo de 16S ADNr: NOAP25N1 (*R. tropici* A) y T1N7L (*S. fredii*). Se incluyó también, a pesar de no haber mostrado un alto valor de peso seco, la cepa de probada eficiencia en campo *R. tropici* B CIAT899.

Se determinó el NMP en el suelo utilizado para los ensayos estimando una densidad de 10^4 rizobios/gr de suelo seco. Los niveles de los rizobios viables adheridos a las semillas después del tratamiento con el inoculante fue de 10^6 por semilla. En el primer año del experimento de inoculación se observó un aumento en la producción estadísticamente significativa (20% al 30% sobre el control no inoculado) en el caso de las cepas *R. tropici* B CIAT899, *R. etli* Sc15 y *R. tropici* A NOAP25N1 como muestra la Figura 4.

Dado que *R. tropici* CIAT899 y NOAP25N1 pueden ser distinguidas de la población nativa de *R. etli* mediante una reacción de PCR con *primers* específicos del gen *nifH* (Aguilar *et al.*, 1998a) se estimó la ocupancia de los nódulos de las plantas inoculadas con estos dos rizobios. El resultado de la ocupancia de CIAT899 y NOAP25N1 fue de 18% y 16%, respectivamente. Este bajo valor está de acuerdo con otros trabajos en donde se menciona el problema de la dominancia de la población indígena (Streeter, 1994), también está de acuerdo con nuestros resultados en los cuales la población nativa nodulante de poroto es de *R. etli* (Aguilar *et al.* 1998b).

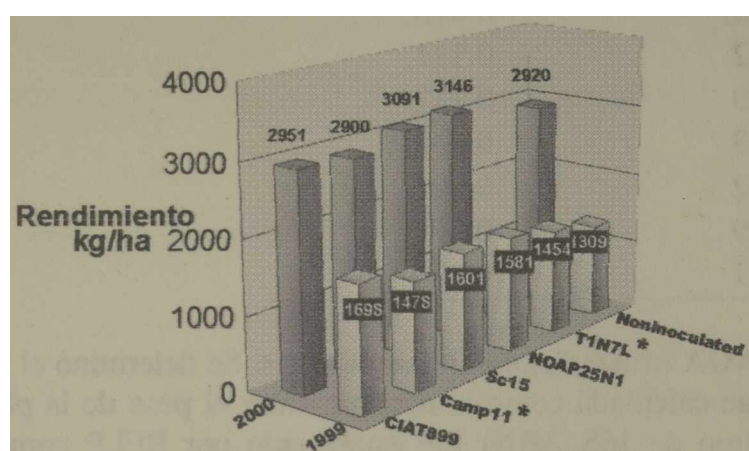


Figura 4: Rendimiento de poroto en ensayos de inoculación en campo. Los ensayos en campo en el NOA fueron realizados durante los años 1999 y 2000. Las barras indican la producción en Kg. ha^{-1} . Los asteriscos denotan valores no significativamente diferentes (Turkey, $P < 0.05$) para el ensayo del año 1999. Los valores del ensayo 2000 no mostraron diferencias estadísticamente significantes. El aislamiento TIN7L no fue ensayado durante al año 2000.

El ensayo de inoculación del año siguiente (2000), realizado en otra parcela de Cerrillos, no resultó en una respuesta significativa de aumento de producción. Por desgracia, las condiciones adversas del clima, tal como copiosas lluvias inmediatamente de la siembra determinaron el lavado del inoculante adherido a la semilla. Se avaluó la ocupancia y esta llegó al 3%, sin embargo los valores de los rendimientos fueron superiores a los obtenidos en la estación previa (Figura 4).

Discusión

En el NOA el cultivo de poroto se encuentra nodulado en forma natural, sin embargo su rendimiento no es bueno y sólo se logra aumentarlo a través de la práctica de la fertilización con urea. Por lo tanto, es necesario la introducción, mediante inoculación, de cepas eficientes en la fijación de nitrógeno para evitar la fertilización química. Estas cepas, no sólo deben resultar eficientes, sino que también deben tener la capacidad de competir con la población indígena que se encuentra en los suelos del NOA. En este capítulo se demostró que el cultivo de poroto favorece por un lado la proliferación de los rizobios y por otro incrementa la diversidad de genotipos de *R. etli* presentes en el suelo. De esta manera, se aumentan las probabilidades de

competencia con una cepa introducida disminuyendo las posibilidades de una inoculación exitosa. Una forma de revertir esta situación es a través de la selección de cepas que provengan del mismo ambiente en donde se desarrolla la práctica de la inoculación. Es por ello, que nos propusimos la selección de aislamientos para utilizar como inoculantes de nuestra colección de rizobios del NOA. Se utilizaron distintos criterios tendientes a distinguir los aislamientos por sus genotipos de *nodC*, predominancia en el suelo, alelo de 16S ADNr, capacidad de nodulación de variedades comerciales de poroto y presencia en un determinado lugar. Posteriormente se probó la eficiencia en la fijación, de estos aislamientos seleccionados, evaluando el peso seco de la parte aérea de la planta. Se encontró que algunos de ellos resultaron más eficientes en el rendimiento de poroto y fueron utilizados para inocular cultivos de la leguminosa en experimentos de campo en el NOA.

La conclusión del ensayo de campo es que es a pesar de lo dificultoso que es desplazar la población nativa del suelo, una baja ocupancia del inoculante puede aumentar el aumento de la productividad.

La cepa *R. tropici* B CIAT899, que ha sido descrita como un rizobio con un buen comportamiento simbiótico bajo condiciones adversas como acidez de suelo o altos niveles de aluminio está siendo usada como inoculante en otros países como Brasil (Hungria *et al.*, 2000), este mismo comportamiento se confirma en nuestros ensayos en donde el pH del suelo es cercano a la neutralidad y los niveles de rizobios nodulantes de poroto son altos. Las otras cepas ensayadas en nuestro experimento de campo tuvieron comportamientos simbióticos similares a CIAT899. Este resultado avala la exploración de la diversidad de rizobios para su utilización como inoculantes y favorecer la producción de poroto.

Teniendo en cuenta los resultados de los dos ensayos es posible concluir que la respuesta a la inoculación puede aumentar la producción, y por lo tanto entre otras cosas un programa para la selección de cepas e inoculación de poroto representa hasta el momento una herramienta para revertir los bajos rendimientos y la baja concentración de N en los suelos (Buttery *et al.*, 1992).

Bibliografía

1. Aguilar, O. M., D. H. Grasso, P. M. Riccillo, M. V. López, and E. Szafer. 1998a. Rapid identification of bean rhizobial isolates type I by a *nifH*-PCR assay. *Soil Biol. Biochem.* 30:1655-1661.
2. Aguilar, O. M., M. V. López, P. M. Riccillo, R. A. González, M. Pagano, D. H. Grasso, A. Pühler, and G. Favelukes. 1998b. Prevalence of the *Rhizobium etli*-like allele in genes coding for 16S rRNA among the indigenous rhizobial populations found associated with wild beans from the Southern Andes in Argentina. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3520-3524.
3. Amarger, N., M. Bours, F. Revoy, M. R. Allard, and G. Laguerrre. 1994. *Rhizobium tropici* nodulates field-grown *Phaseolus vulgaris* in France. *Plant Soil* 161: 147-156.

4. **Amarger, N., V. Macheret, G. Laguerre.** 1997. *Rhizobium gallicum* sp.nov. and *Rhizobium gardinii* sp.nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. Intl.J. of Systematic Bacteriology 47: 996-1006.
5. **Anyango, B., K. L. Wilson, J. L. Beynon, and K. E. Giller.** 1995 Diversity of rhizobia nodulating *Phaseolus vulgaris* L. in two Kenyan soils with contrasting pHs. Appl. Environ. Microbiol.40:4016-4021.
6. **Burkart, A.** 1952. Las leguminosas argentinas silvestres y cultivadas. Ediciones Acme Agency.
7. **Buttery, B.R., S. J. Park, and D. J. Hume.** 1992. Potential for increasing nitrogen fixation in grain legumes. Can. J. Plant Sci. 72: 323-349.
8. **de Bruijn, F. J.** 1992. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. Appl. Env. Microbiol, 58:2180-2187.
9. **Gepts, P, and F. A. Bliss.** 1988. Dissemination pathways of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae) deduced from phaseolin electrophoretic variability. II. Europe and Africa. Econ. Bot. 42:86-104.
10. **Gepts, P.** 1990 Biochemical evidence bearing on the domestication of *Phaseolus* (Fabaceae) beans. Econ. Bot. 44:28-38.
11. **Herrera-Cervera, J.A., J. Caballero-Mellado, G. Laguerre, H. V. Tichy, N. Requena, N. Amarger, E. Martínez-Romero, J. Olivares, and J. Sanjuán.** 1999. At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. FEMS Microbiol. Ecol. 30: 87-97.
12. **Hungría, M., S. D. Andrade, L. M. Chuceire, A. Probanza, F. J. Guitierrez-Mañero, and M. Megías.** 2000. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. Soil Biol.Biochem. 21:1515-1528.
13. **Kami, J., Becerra-Velasquez, D.G. Debouck, , and P. Gepts.** 1995. Identification of presumed ancestral DNA sequences of phaseolin in *Phaseolus vulgaris*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 1101-1104.
14. **Laguerre, G., M. R. Allard, F. Revoy, and N. Amarger.** 1994. Rapid identification of rizobia by Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. Appl. Environ. Microbiol. 60:56-63.
15. **Lie, T.A., M. Goktan, M. Engin, J. Pijnenborg, and E. Anlarsal.** 1987 Co-evolution of the legume-rhizobium association. Plant Soil 100: 171-181.
16. **Martínez-Romero, E., L. Segovia, F. M. Mercante, A. A. Franco, P. Graham, and M. A. Pardo.** 1991 *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp.trees. Int. J. Syst.Bacteriol. 41: 417-426
17. **Segovia, L., J. P. W. Young, and E. Martínez-Romero.** 199). Reclasificación of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 43:374-377
18. **Streeter, J. G.** 1994. Failure of inoculant rhizobia to overcome the dominance of indigenous strains for nodule formation. Can. J. Microbiol. 40:513-522.
19. **Vincent, J. M.** 1970. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. IBP Handbook No 15. Blackwell scientific Publications, Oxford, United Kingdom.

Capítulo 8

Análisis de la diversidad de la colección de aislamientos de leguminosas del NOA

Introducción

La diversidad de una comunidad biológica es un concepto clave en ecología puesto que permite la caracterización de la misma y su cuantificación es fundamental para analizar fenómenos tales como, la sucesión, colonización, respuesta a cambios ambientales y competencia entre microorganismos. Los ecólogos han desarrollado diferentes herramientas para medir la biodiversidad y describir mediante parámetros estadísticos a una comunidad de individuos (Borneman *et al.*, 1996; Eichner *et al.*, 1999).

La distribución de abundancia de especies de una comunidad biológica puede ajustarse a series teóricas del tipo normal logarítmica, binomial negativa, series logarítmicas, Poison, etc. Sin embargo, en muchos casos esto no sucede y conduce a la pregunta ¿Qué es lo que se requiere para describir estadísticamente a una comunidad para la cual no se conoce la distribución de la abundancia de especies o los datos experimentales no se ajustan a ninguna serie teórica? Para respondernos a esta pregunta debemos en primer lugar definir cuales son las propiedades de cualquier colección de individuos que son necesarias para describir a la colección. Estas dos propiedades son:

- A- El número de clases (especies, genotipos, clases) que contiene (**S**). En el caso de representar a la colección por un histograma, S sería el ancho del mismo.
- B- Algún parámetro estadístico que sea análogo a la varianza.

Con estos dos parámetros se clasifica a los individuos de una colección en clases sin ningún orden particular. Se grafican un histogramas que representan la abundancia de clases como los mostrados en la Figura 1. Los histogramas se describen según la igualdad u homogeneidad de altura de las barras que lo componen. Entonces, la distribución tendrá su máxima *igualdad* cuando la abundancia de todas sus especies (N_j) es la misma (Figura 1A) y la mínima *igualdad* cuando sea máxima la disparidad de abundancias de especies (Figura 1B).

La diversidad de una colección no se considera solamente en términos del número de clases que la componen, sino que tendrá en cuenta también la abundancia de las mismas esto es, el número de individuos agrupados dentro de una clase. Así, una colección será más diversa cuando tenga el mismo valor de abundancias para todas las clases.

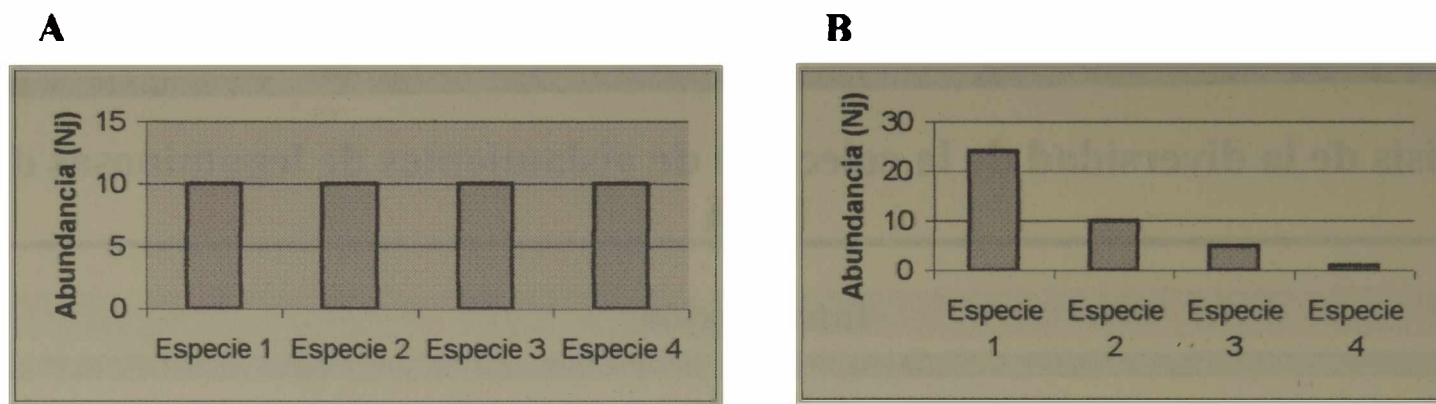


Figura 1: Histogramas de frecuencias de especies de una supuesta colección. A-Se muestra la mayor *igualdad* que se presenta cuando todas las especies tienen la misma frecuencia. B- Una menor *igualdad* de altura de bandas se traduce en una menor diversidad. Para este ejemplo en particular las clases fueron denominadas especies.

Existen diferentes medidas de la diversidad de una población, nos vamos a referir en este capítulo a dos de ellas: La diversidad según Simpson y según Shannon (Pielou, 1969).

1- Medida de la diversidad según Simpson.

Supongamos una colección de N individuos compuesta por S especies, siendo N_j el número de individuos de la especie j, para j=1, 2, ..., S la $\sum_j N_j=N$. Si de esta colección se sacan dos individuos al azar y la probabilidad de que ambos pertenezcan a la misma especie es grande, se puede decir que la diversidad de la colección es baja.

Esta probabilidad esta dada por

$$Probabilidad = \sum_j \frac{N_j \cdot (N_j - 1)}{N(N - 1)}$$

y la diversidad D, definida por Simpson es:

$$D(Diversidad) = 1 - \sum_j \frac{N_j \cdot (N_j - 1)}{N(N - 1)}$$

2- El índice de diversidad de Shannon-Weaver

Consideremos una población compuesta por S clases o especies de organismos A₁, A₂, A₃, ..., A_s y cada individuo pertenece a sólo una clase. La probabilidad de que al azar se seleccione un individuo que pertenece a la clase A_j es P_j, entonces

$$\sum_j P_j = 1$$

El coeficiente que mide la diversidad es H y se define de la siguiente manera:

$$Diversidad = H (P_1, P_2, P_3, \dots, P_s) = - C \sum_j P_j \cdot \log P_j$$

Shannon propuso esta fórmula como una medida de la información contenida por símbolo en un código de símbolos discretos compuesto por S clases de las cuales las probabilidades de ocurrencia son $P_1, P_2, P_3, \dots, P_S$. En el contexto ecológico H es una medida de la diversidad por individuo en una población compuesta por muchas especies. Las unidades de la diversidad dependen de la constante C, que normalmente toma el valor 1 y de la base del logaritmo utilizado.

En este capítulo utilizamos los datos de los capítulos anteriores para aplicarlos a un tratamiento estadístico que nos permite cuantificar la diversidad de la colección de aislamientos del NOA a través de los coeficientes D y H.

Análisis global de la colección de rizobios del NOA

1- Consideraciones generales: Nuestra colección de aislamientos proveniente de diversas leguminosas, fue agrupada de acuerdo a sus alelos de 16S ADNr. Por conveniencia en este análisis, se considera a las tres biovariedades de la especie *R. leguminosarum* (phaseoli, vicea y leucaena) como alelos diferentes. Consecuentemente, la colección de aislamientos está compuesta por 15 genotipos ribosomales cuya frecuencia de ocurrencia se muestra en la Tabla 1. Dicha frecuencia se calculó a partir de los datos de 758 aislamientos representativos de los 1182 que componen la colección. El histograma de abundancia de genotipos se muestra en la Figura 2. Se destaca el porcentaje mayoritario de las especies *R. etli*, *R. leguminosarum* bv phaseoli, *B. japonicum* y *S. fredii*.

Alelos de 16S ADNr	Número de
<i>Bradyrhizobium</i>	350
Genotipo 2	
Genotipo 3	
<i>Bradyrhizobium</i>	20
<i>M. loti</i>	
<i>R. leguminosaru</i>	
<i>R. leguminosaru</i>	1
<i>Rhizobium etli</i>	
<i>Rhizobium tropici B</i>	
<i>Rhizobium tropici A</i>	2
<i>Shinorhizobium meliloti</i>	
<i>Sinorhizobium fredii</i>	
<i>Sinorhizobium saheli</i>	53
<i>Sinorhizobium terangae</i>	
	10
	10

Tabla 1: Número de aislamientos que fueron agrupados en 15 alelos de 16S ADNr. Los alelos ribosomales de *R. leguminosarum* resultaron idénticos pero se considera las biovariedades que fueron definidas anteriormente y la nueva encontrada en este trabajo.

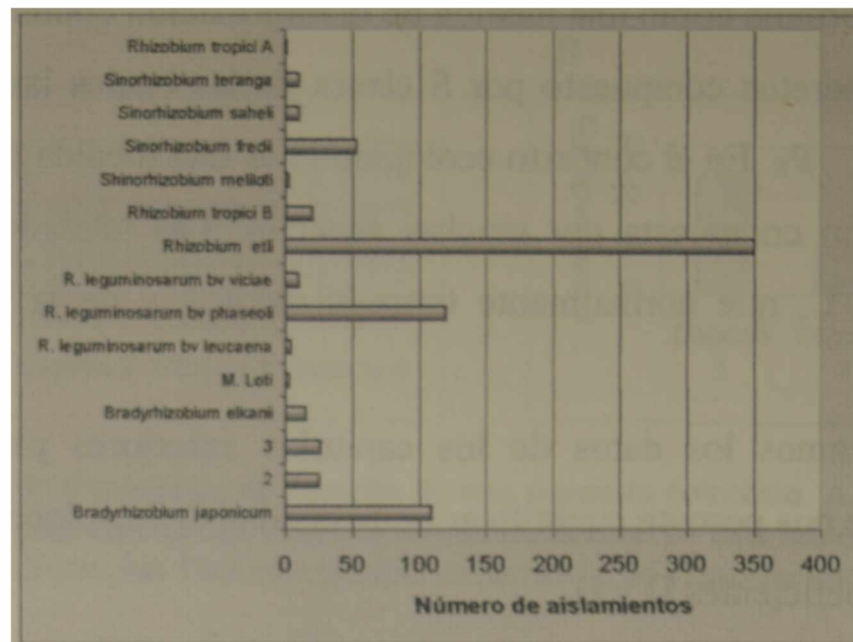


Figura 2: Abundancia de los alelos de 16S ADNr del NOA. Histograma de frecuencias de especies de rizobios aisladas en el NOA a partir de diferentes leguminosas silvestres.

Los siguientes argumentos nos permiten afirmar que esta distribución de abundancias de genotipos de 16S ADNr es más o menos representativa de la comunidad de rizobios del NOA:

- A. En la mayoría de los casos, se estudiaron 20 nódulos o más por especie de leguminosa, número que resulta suficiente para inferir que tipo de microsimbionte se encuentra asociado (Coutinho *et al.*, 1999).
- B. Muchas de las leguminosas que no alcanzaron ese número mínimo de nódulos, fueron encontradas asociadas con la especie *B. japonicum* y como fue postulado en capítulos anteriores estos aislamientos formarían parte de un pool de *B. japonicum* que es capaz de nodular distintas especies de leguminosas. En este caso el error que se cometería es por defecto puesto que al analizar un número menor de aislamientos disminuye la probabilidad de encontrar especies nuevas, pero no modifica significativamente la distribución de abundancias de *B. japonicum*.
- C. El predominio de la especie *R. etli* fue corroborado por su alta densidad en los suelos del NOA.
- D. La abundancia del alelo *R. leguminosarum* bv *phaseoli* es elevada porque se incluyeron muchos aislamientos de Quebrada del Toro y está representando de forma sobrevaluada su presencia en el NOA.

2- La distribución de los alelos ribosomales entre los diferentes sitios del NOA: Se encontró que la diversidad de ecosistemas del NOA alberga poblaciones de rizobios compuestas por diferentes alelos de 16S ADNr. En la Figura 3 se muestra la distribución de los alelos ribosomales en los distintos sitios.

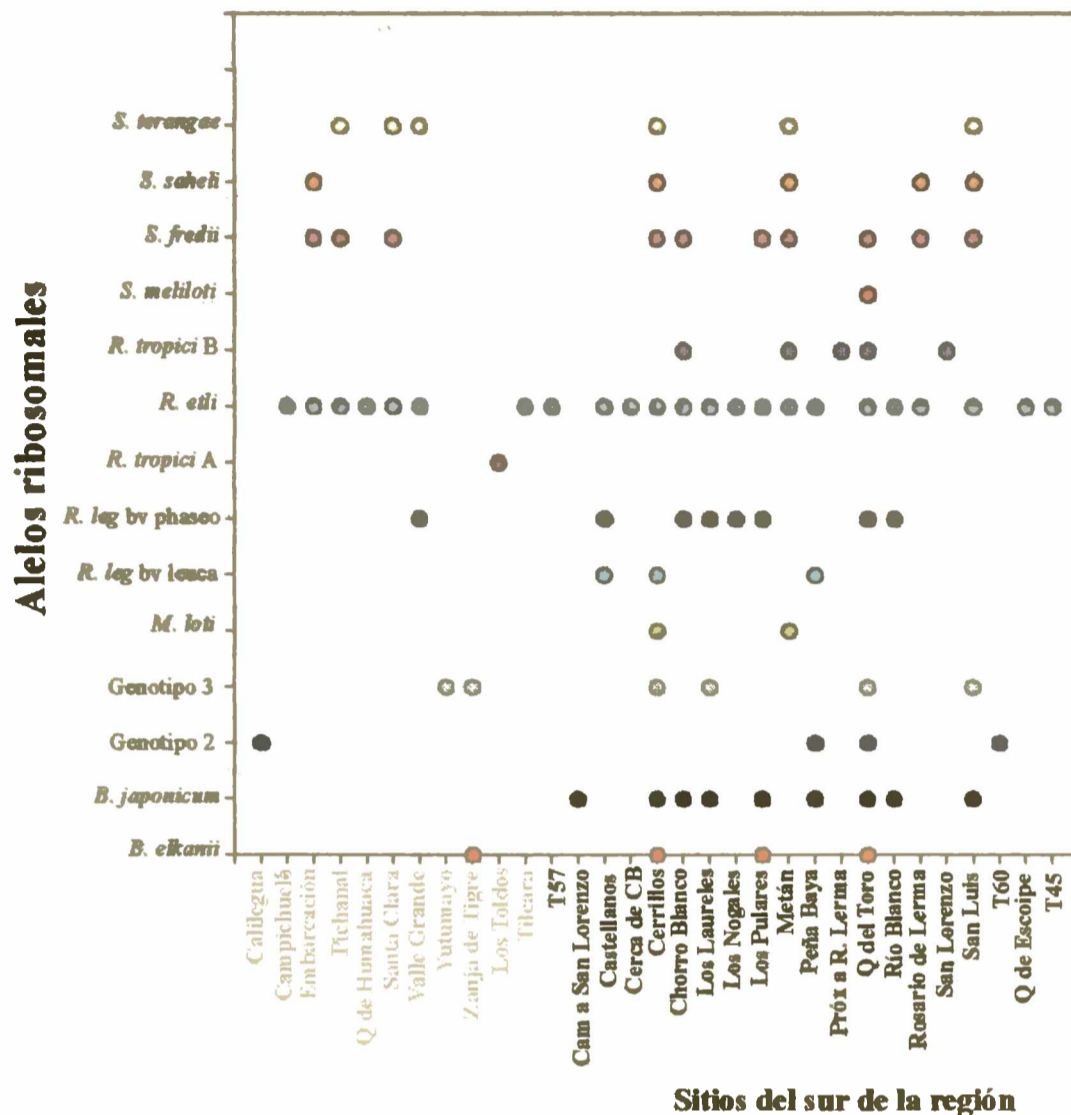


Figura 3: Correlación entre alelo y sitio de aislamiento. Se representan, en un sistema de ejes cartesianos, los 15 alelos encontrados según el sitio de aislamiento. Los lugares T57 y T45 se corresponden con un sitio cercano a Rosario de Lerma, a 5 km del campo nombrado como Próximo a Rosario de Lerma. T60 es una muestra de suelo a 1Km de Quebrada del Toro en dirección a San Antonio de los Cobres

En la Figura 3 se puede observar que:

- A. La especie *R. etli* fue aislada en la mayor parte de los sitios estudiados, en contraste el alelo de la especie *R. tropici A* fue aislado solamente en Los Toldos, una localidad que se encuentra en el límite norte del país.
- B. Mientras que en algunos lugares como Chorro Blanco, Cerrillos, Quebrada del Toro y San Luis, la diversidad de especies de rizobios resultó alta, en otros como Castellanos o el sitio próximo a Rosario de Lerma se aislaron escasas especies rizobianas.
- C. En la mayoría de los sitios explorados fueron aislados los aislamientos con el alelo ribosomal de *B. japonicum*, mientras que en escasos sitios fueron obtenidos los alelos de *B. elkanii* y Genotipo 2. El alelo Genotipo 3 de los aislamientos de crecimiento lento fue encontrado como el segundo más diseminado en la región luego de *B. japonicum*.
- D. Si se comparan los sitios correspondientes a las subregiones norte y sur se observa que en el norte los alelos de *R. leguminosarum* bv. phaseoli, *M. loti*, *R. tropici B*, *B. japonicum* y *B. elkanii* se recuperan en menor cantidad de lugares.

E. Castellanos es el único sitio en donde se aisló *R. leguminosarum* bv leucaena y *R. leguminosarum* bv. phaseoli.

3- Distribución de los alelos ribosomales según su relación filogenética. Utilizando los programas de filogenia Diverge y Distances (GCG) se estableció la relación de distancias entre las secuencias de los 15 alelos ribosomales encontrados en el NOA. Los valores de estas distancias filogenéticas que se muestran en la Tabla 2 resultaron similares para una misma especie.

Alelos de 16S ADNr	A ¹	B ²	C ³
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	2.35	3.22	3.22
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	0	0	0
Genotipo 2	1	1.5	1.5
Genotipo 3	0	0	0
<i>M. loti</i>	12.21	12.4	12.36
<i>R. leguminosarum</i> bv. leucaena	12.17	12.68	12.64
<i>R. leguminosarum</i> bv. phaseoli	12.17	12.68	12.64
<i>R. leguminosarum</i> bv. vicia	12.17	12.68	12.64
<i>R. tropici</i> A	12.03	12.79	12.74
<i>Rhizobium etli</i>	11.8	11.92	11.88
<i>Rhizobium tropici</i> B (genotipo saltcoño)	12.09	12.85	12.97
<i>Shinorhizobium meliloti</i>	11.58	12.39	12.34
<i>Sinorhizobium fredii</i>	10.52	11.42	11.61
<i>Sinorhizobium saheli</i>	11.9	12.47	12.49
<i>Sinorhizobium teranga</i>	11.32	12.31	12.25

Tabla 2: Relaciones filogenéticas entre los alelos de 16S ADNr encontrados en el NOA.
¹El coeficiente A fue calculado con el programa Diverge de GCG.
²El coeficiente B fue calculado con el programa Distances de GCG, utilizando el método de corrección Kimura-2 parámetros.
³El coeficiente C fue calculado con el programa Distances de GCG, utilizando el método de corrección Jukes-Cantor.

Con el propósito de estudiar la distribución de los alelos ribosomales en la región del NOA teniendo en cuenta su relación filogenética se construyeron los gráficos que se muestran en las Figuras 4 y 5.

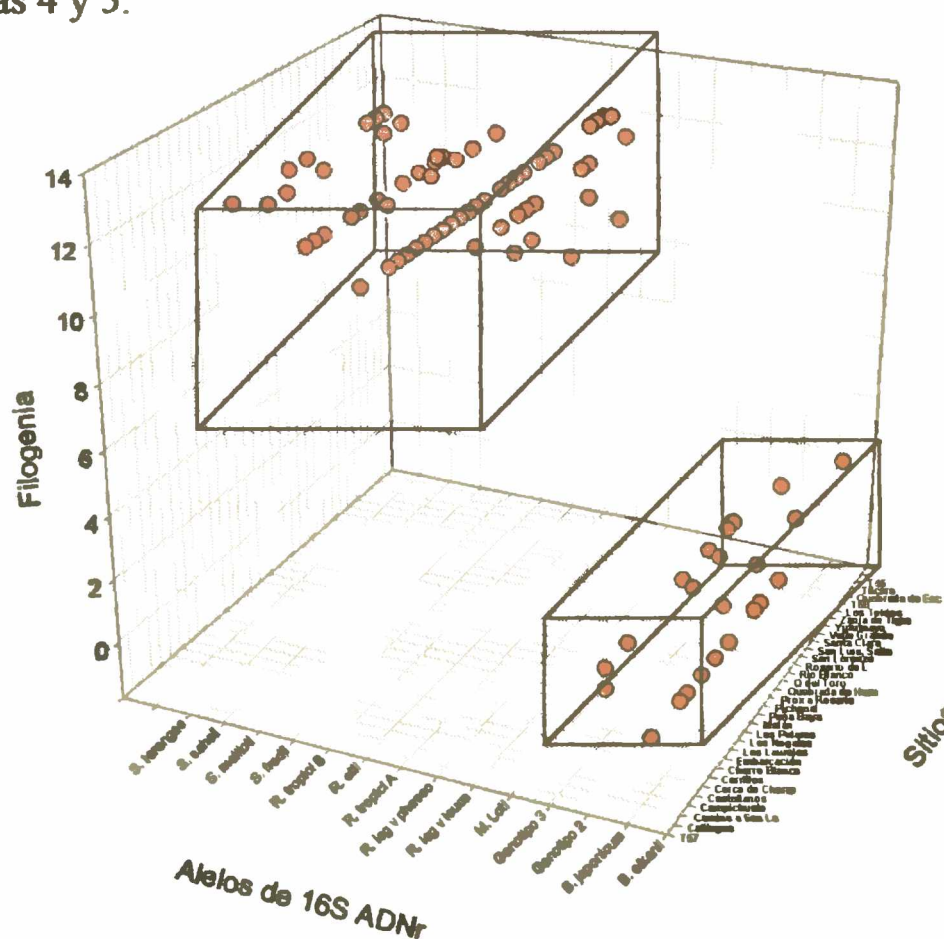


Figura 4: Distribución de los alelos ribosomales según los sitios de aislamiento y su relación filogenética. Se muestra la distribución de los alelos según los sitios de donde se aislaron y teniendo en cuenta la relación filogenética de las secuencias de 16S ADNr de cada alelo. La distancia filogenética que se utilizó para la construcción del diagrama tridimensional es la calculada por el programa Distances utilizando la corrección Kimura (Ver Tabla 2). A fin de facilitar la visualización del gráfico se graficaron dos cajas rectangulares que agrupan a los dos grupos más importantes.

La distribución espacial mostrada en la Figura 4 se obtuvo adaptando un código numérico para los alelos de 16S ADN_r, el mismo fue elegido según la relación filogenética de los alelos. Para poder graficar los sitios del NOA también fue necesario codificarlos, pero esto se realizó en forma azarosa. De esta manera se podría considerar que las variables Z (filogenia) e Y (alelos) no son independientes, puesto que $Y=f(Z)$, Y es una función de Z. Se eligió esta forma de representación para mostrar las diferencias entre los dos grupos de rizobios señalados con una caja rectangular en la Figura 4. El grupo de la parte superior del diagrama representa a la población de crecimiento rápido y moderado, mientras que el grupo de la parte inferior representa a la población de crecimiento lento. Desde el punto de vista biológico se esperaría una distribución continua que una en forma de 'S' las dos poblaciones de rizobios y se podría explicar a este plano como el originado por la evolución divergente de los rizobios a partir de un ancestro común. Los datos de este trabajo muestran que en el NOA no existe tal distribución. Se incluyeron entonces, secuencias de especies de rizobios que no fueron aisladas en el NOA y no se encontraron valores de distancias entre 3 y 10, denotando la ausencia de rizobios con ese nivel de filogenia no solamente en el NOA, sino en otras partes del mundo (Dato no mostrado). Probablemente el grupo de rizobios que estaría faltando no sería viable o ha evolucionado perdiendo las propiedades simbióticas excluyéndolo de cualquier análisis de carácter rizobiológico.

Para evidenciar de otro modo que estos dos grupos representan poblaciones diferentes graficamos en la Figura 5 la relación filogenética que representa a cada alelo y la cantidad de individuos de cada grupo alélico.

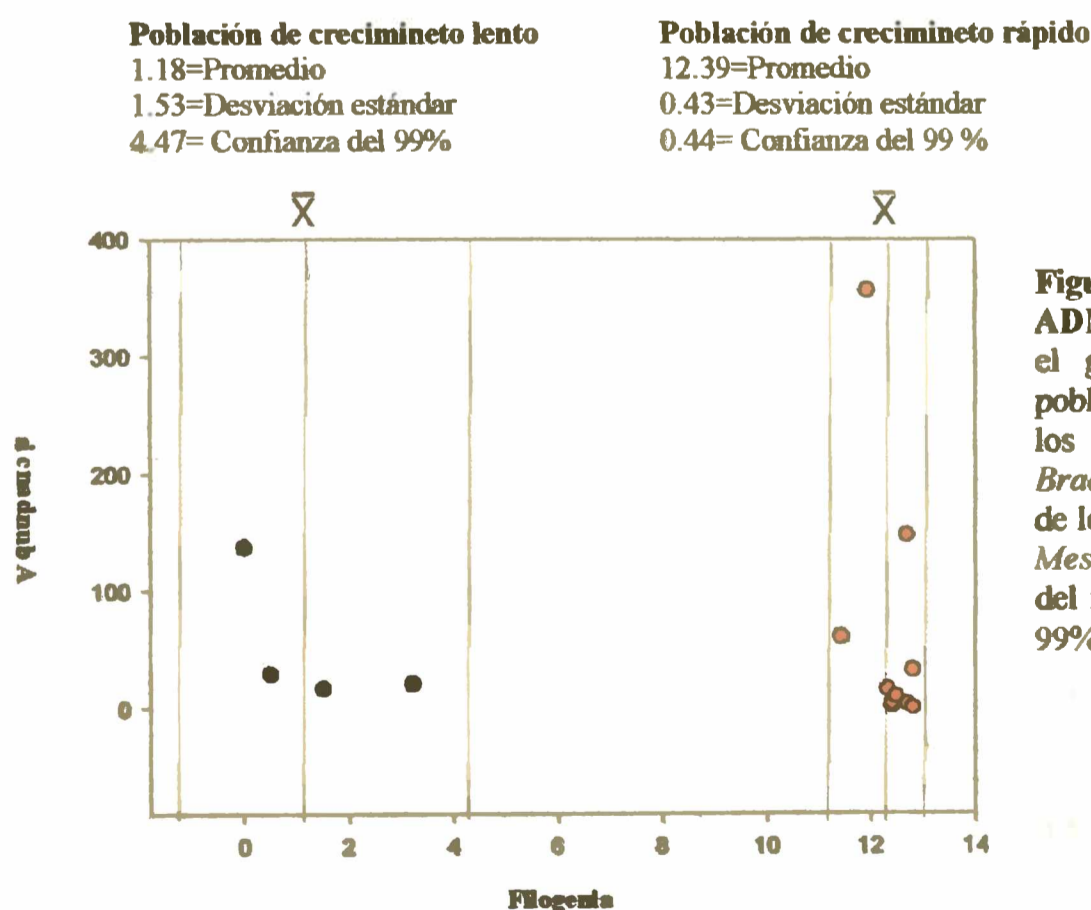


Figura 5: Abundancias de alelos de 16S ADN_r según su relación filogenética. En el gráfico se muestran los dos grupos poblacionales, en negro se representaron los aislamientos del género *Bradyrhizobium* y en rojo los aislamientos de los géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* y *Mesorhizobium*. Se señala el punto medio del intervalo y el intervalo que contiene al 99% de los puntos.

La desviación estándar fue calculada con la siguiente formula:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2}{N - 1}}$$

Y el valor del intervalo del 99 % corresponde a los puntos del intervalo computados por

$$\bar{X} \pm t^{(z)} \frac{s}{\sqrt{N}}$$

t es el estadístico de Student t(v,z) para v=N-1 grados de libertad y z=2.576 (equivalente del percentil de la normal estándar para 99 %).

Los promedios de ambas distribuciones son 1,18 y 12,39 y teniendo en cuenta los intervalos de confianza del 99% para ambas de 4,47 y 0,44 la diferencia entre las medias es mayor que la obtenida por la suma de ambos intervalos; con lo cual se demuestra en forma matemática que cada grupo representa a poblaciones diferentes.

4- Distribución de los alelos ribosomales en los distintos sitios según su hospedador de origen. Los aislamientos de la colección provienen de diferentes sitios y especies de leguminosas (Tabla 3). Dada la diversidad de ecosistemas estudiados no se tomaron muestras de la totalidad de especies de leguminosas en todos los sitios, ni se utilizaron todas las leguminosas como atrapantes en las muestras de suelo que fueron analizadas en el laboratorio.

Alelos de 16S ADNr	Sitio de recolección	Leguminosas exploradas
<i>Rhizobium etli</i>	Campo Quijano	<i>P. vulgaris</i>
Genotipo 2	Calilegua	<i>P. augusti</i>
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Camino a San Lorenzo	<i>Chamaecrista spp., Macroptilium spp., Stylosanthes</i>
<i>Rhizobium etli</i>	Campichuelo	<i>P. vulgaris</i>
<i>R. leguminosarum bv phaseoli</i>	Castellanos	<i>P. vulgaris</i>
<i>Rhizobium etli</i>	Castellanos	<i>P. vulgaris</i>
<i>Rhizobium etli</i>	Cerca de Chorro Blanco	<i>P. vulgaris</i>
<i>M. loti</i>	Cerrillos	<i>L. leucocephala</i>
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	Cerrillos	<i>Vigna</i>
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Cerrillos	<i>P. augusti, Neonotonia wightii</i>
<i>Rhizobium etli</i>	Cerrillos	<i>P. vulgaris</i>
<i>Rhizobium tropici B</i>	Cerrillos	<i>L. leucocephala</i>
<i>Sinorhizobium fredii</i>	Cerrillos	<i>L. leucocephala</i>
<i>Sinorhizobium saheli</i>	Cerrillos	<i>L. leucocephala</i>
<i>Sinorhizobium teranga</i>	Cerrillos	<i>L. leucocephala</i>
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Chorro Blanco	<i>Vigna spp.</i>
<i>R. leguminosarum bv phaseoli</i>	Chorro Blanco	<i>P. vulgaris</i>
<i>Rhizobium etli</i>	Chorro Blanco	<i>P. vulgaris</i>
<i>Rhizobium tropici B</i>	Chorro Blanco	<i>L. leucocephala, Mimosa</i>
<i>Sinorhizobium fredii</i>	Chorro Blanco	<i>Mimosa spp.</i>
<i>Rhizobium etli</i>	Embarcación	<i>P. vulgaris</i>
<i>Shinorhizobium teranga</i>	Embarcación	<i>L. leucocephala</i>
<i>Sinorhizobium fredii</i>	Embarcación	<i>L. leucocephala</i>
Genotipo 3	Los Laureles	<i>Crotalaria spp.</i>

<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Los Laureles	<i>Crotalaria</i> spp., <i>Desmodium</i> spp.
<i>R. leguminosarum</i> bv <i>phaseoli</i>	Los Laureles	<i>P. vulgaris</i>
<i>Rhizobium etli</i>	Los Laureles	<i>P. vulgaris</i>
<i>R. leguminosarum</i> bv <i>phaseoli</i>	Los Nogales	<i>P. vulgaris</i>
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Los Pulares	<i>Arachis hypogaea</i>
<i>R. leguminosarum</i> bv <i>phaseoli</i>	Los Pulares	<i>P. vulgaris</i>
<i>Rhizobium etli</i>	Los Pulares	<i>P. vulgaris</i>
<i>M. Loti</i>	Metán	<i>L. leucocephala</i>
<i>Rhizobium etli</i>	Metán	<i>P. vulgaris</i>
<i>Sinorhizobium saheli</i>	Metán	<i>L. leucocephala</i>
<i>Sinorhizobium teranga</i>	Metán	<i>L. leucocephala</i>
Genotipo 2	Peña Baya	<i>P. augusti</i>
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Peña Baya	<i>P. augusti</i>
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>leucaena</i>	Peña Baya	<i>L. leucephala</i>
<i>Rhizobium etli</i>	Peña Baya	<i>P. vulgaris</i>
<i>Rhizobium etli</i>	Pichanal	<i>P. vulgaris</i>
<i>Sinorhizobium fredii</i>	Pichanal	<i>L. leucephala</i>
<i>Sinorhizobium teranga</i>	Pichanal	<i>L. leucephala</i>
<i>Rhizobium tropici</i> B	Prox a Rosario de Lerma	<i>L. leucephala</i> , <i>P. vulgaris</i>
<i>Rhizobium etli</i>	Quebrada de Humahuaca	<i>P. vulgaris</i>
Genotipo 2	Quebrada del Toro	<i>P. augusti</i>
Genotipo 3	Quebrada del Toro	<i>Macroptilium</i> spp., <i>Desmodium</i> spp., <i>Crotalaria</i> spp., <i>Centrosema</i> spp.
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	Quebrada del Toro	<i>Macroptilium</i> spp., <i>Desmodium</i> spp., <i>Vigna</i> spp.
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Quebrada del Toro	<i>Macroptilium</i> spp., <i>Desmodium</i> spp., <i>Crotalaria</i> spp., <i>Centrosema</i> spp., <i>Vigna</i> spp., <i>P. augusti</i> , <i>Tipuana tipa</i> , <i>Eritrina</i> spp., <i>Eriosema</i> spp., <i>Desmodium</i> spp., <i>Crotalaria</i> spp., <i>Chaemecrista</i> spp., <i>Calopogonium</i> spp.
<i>R. leguminosarum</i> bv <i>phaseoli</i>	Quebrada del Toro	<i>P. vulgaris</i>
<i>R. leguminosarum</i> bv <i>viciae</i>	Quebrada del Toro	<i>Vicia benzodermis</i>
<i>Rhizobium etli</i>	Quebrada del Toro	<i>P. vulgaris</i>
<i>Rhizobium tropici</i> B	Quebrada del Toro	<i>L. leucocephala</i>
<i>Shinorhizobium meliloti</i>	Quebrada del Toro	<i>Medicago polymorphae</i>
<i>Sinorhizobium fredii</i>	Quebrada del Toro	<i>Acacia aroma</i>
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Río Blanco	<i>Centrosema</i> spp., <i>Desmodium</i> spp., <i>Crotalaria</i> spp.
<i>Rhizobium etli</i>	Río Blanco	<i>P. vulgaris</i>
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Río Blanco	<i>P. vulgaris</i>
<i>Rhizobium etli</i>	Rosario de Lerma	<i>P. vulgaris</i>
<i>Sinorhizobium saheli</i>	Rosario de Lerma	<i>L. leucocephala</i>
<i>Rhizobium tropici</i> B	San Lorenzo	<i>Mimosa</i> spp.
Genotipo 3	San Luis, Salta	<i>Desconocido 3</i> , <i>Macroptilium</i> spp.
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	San Luis, Salta	<i>Eriosema</i> spp., <i>Desmodium</i> spp., <i>Macroptilium</i> spp.
<i>Rhizobium etli</i>	San Luis, Salta	<i>P. vulgaris</i>
<i>Sinorhizobium fredii</i>	San Luis, Salta	<i>Acacia aroma</i> , <i>L. leucocephala</i>
<i>Rhizobium etli</i>	Santa Clara	<i>P. vulgaris</i>
<i>Sinorhizobium fredii</i>	Santa Clara	<i>L. leucocephala</i>
<i>Sinorhizobium teranga</i>	Santa Clara	<i>L. leucocephala</i>
<i>R. leguminosarum</i> bv <i>phaseoli</i>	Valle Grande	<i>P. vulgaris</i>
<i>Rhizobium etli</i>	Valle Grande	<i>P. vulgaris</i>
<i>Sinorhizobium teranga</i>	Valle Grande	<i>L. leucocephala</i>
Genotipo 3	Yutumayo	<i>P. augusti</i>
Genotipo 3	Zanja de Tigre	<i>Vigna</i> spp.
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	Zanja de Tigre	<i>Vigna</i> spp.

Tabla 3: Alelos de 16S ADNr agrupados por sitio de recolección y leguminosa

En la Figura 6 se esquematiza la relación entre los alelos ribosomales, las leguminosas y los sitios de recolección mediante un diagrama en tres dimensiones. Nuevamente se utilizó un sistema de códigos para realizar el diagrama, las leguminosas y los sitios fueron codificadas arbitrariamente y los alelos ribosomales según su relación filogenética.

En esta figura se puede observar la especificidad de la simbiosis de las especies de leguminosas estudiadas y la distribución de los alelos ribosomales en la región del NOA. Así por ejemplo, las especies *R. etli* y *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* sólo fueron aisladas de nódulos de *P. vulgaris* en todos los lugares explorados mientras que *B. japonicum* no sólo fue encontrada en diversos sitios, sino que fue recuperada de nódulos de distintas especies de leguminosas.

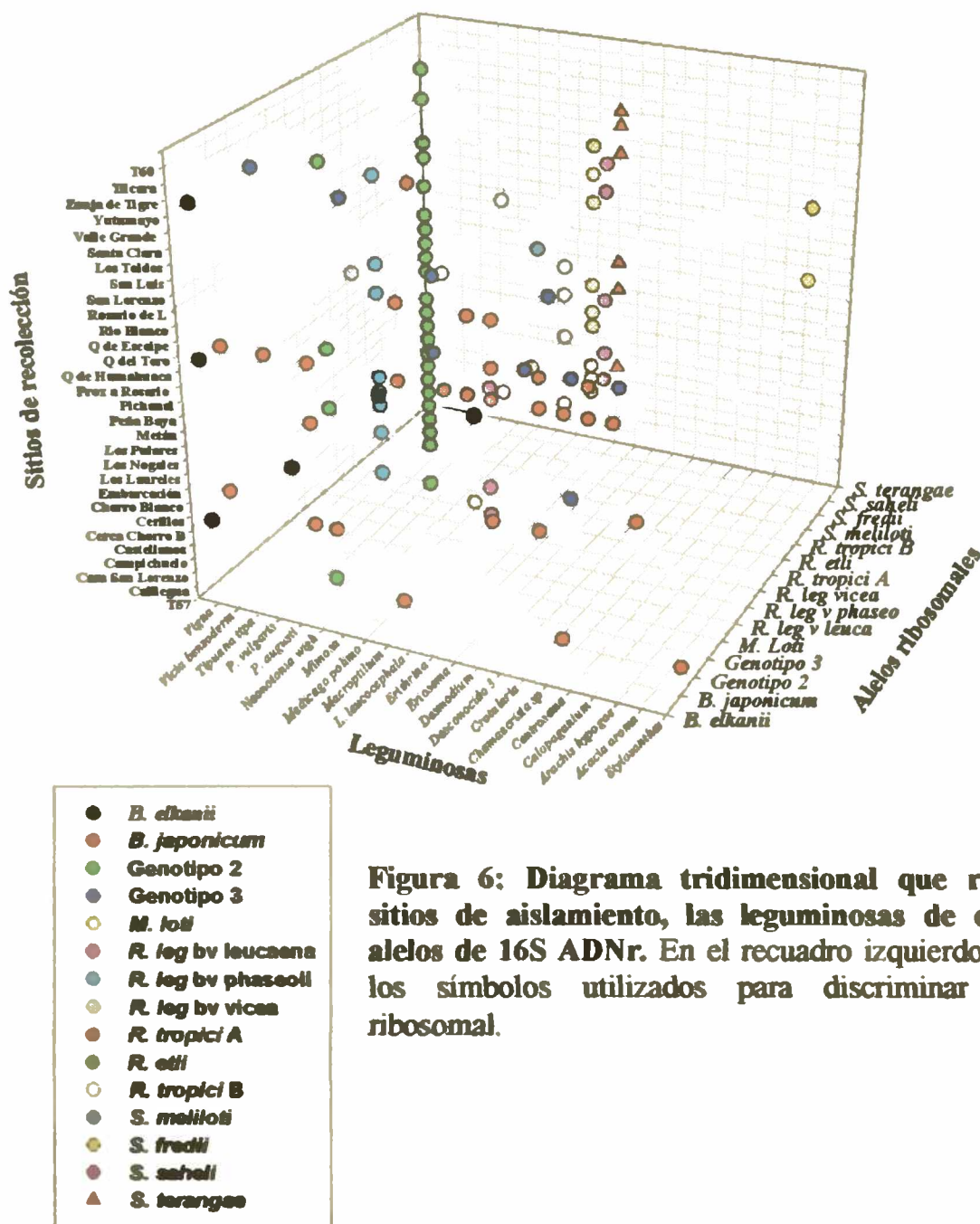


Figura 6: Diagrama tridimensional que relaciona los sitios de aislamiento, las leguminosas de origen y los alelos de 16S ADNr. En el recuadro izquierdo se muestran los símbolos utilizados para discriminar cada alelo ribosomal.

Cuantificación de la diversidad entre los aislamientos de la colección

Se calcularon los Coeficientes de diversidad H (Shannon) y D (Simpson) con los datos de el número de alelos y su representación en cada sitio del NOA. Sólo se tuvieron en cuenta aquellos sitios en donde se aisló más de un alelo ribosomal. Los resultados se muestran en la Figura 7 y en la Tabla 4. Los valores del coeficiente D resultaron menores a 1 mientras que los valores de H promediaron en 1.2. En general ambos coeficientes se comportaron de manera similar. El sitio que resultó con mayor índice de diversidad fue San Luis, el cual coincide junto con Quebrada del Toro en la abundancia de especies de leguminosas que se han explorado y que habitan las respectivas regiones.

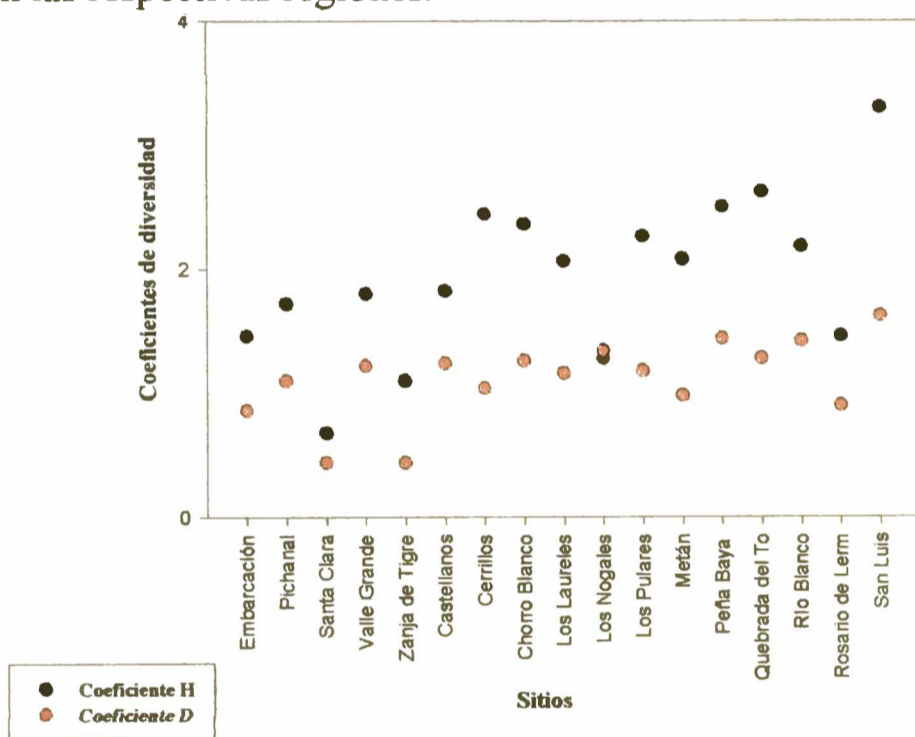


Figura 7: Coeficientes de diversidad H y D de cada sitio del NOA.

Sitio	Coeficiente H	Coeficiente D
Embarcación	0.73	0.43
Pichanal	0.86	0.55
Santa Clara	0.34	0.22
Valle Grande	0.9	0.61
Zanja de Tigre	0.55	0.22
Castellanos	0.91	0.62
Cerrillos	1.22	0.52
Chorro Blanco	1.18	0.63
Los Laureles	1.03	0.58
Los Nogales	0.64	0.67
Los Pulares	1.13	0.59
Metán	1.04	0.49
Peña Baya	1.25	0.72
Quebrada del Toro	1.31	0.64
Río Blanco	1.09	0.71
Rosario de Lerma	0.73	0.45
San Luis	1.65	0.81

Tabla 4: Coeficientes H y D calculados para cada sitio del NOA.

La correlación de ambos índices se muestra en la Figura 8. sin considerar el valor para “Los Nogales” los resultados muestran una buena correlación ($R^2=0,77$). Dado que el coeficiente D toma valores entre 0 y 1, se podría cuantificar a la diversidad en forma porcentual y los distintos sitios del NOA tienen una diversidad muy variada entre 22 y 81 %. Los valores de ambos coeficientes calculados con los datos de toda la colección son $H=1.83$ y $D=0.76$, evidenciando altos niveles de diversidad, aún con el predominio de la especie *R. etli*.

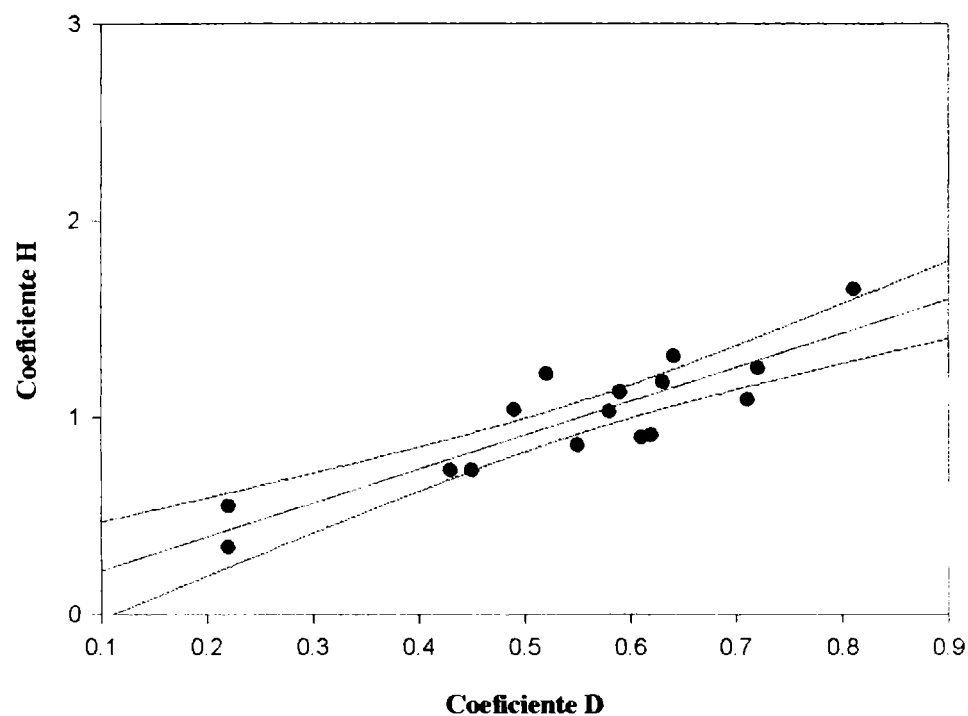


Figura 8: Relación lineal entre los coeficientes de diversidad D y H. Se muestran los parámetros A y b que definen su relación lineal y el coeficiente de correlación r^2

Análisis de la diversidad intraespecífica de la colección a través de la región IGS

Con el propósito de cuantificar la diversidad intraespecífica de la población se determinaron los coeficientes H y D a partir de los datos de los perfiles de la región IGS (IGS-tipo) de cada grupo alélico de 16S ADNr. No se incluyeron en este análisis aquellos alelos para los cuales se tenían menos de 3 datos de IGS-tipo. En la Tabla 5 se muestran los coeficientes calculados y en la Figura 9 se graficaron H y D para cada especie rizobiana.

Alelo 16S	Número de aislamientos	Número de IGS-tipos	Coefficiente H	Coefficiente D
Genotipo 2	10	2	0.61	0.47
<i>B. elkanii</i>	4	2	0.69	0.67
<i>S. sahelii</i>	4	3	1.04	0.83
<i>R. legum</i> bv. <i>leucaena</i>	3	3	1.09	1.00
<i>R. tropici</i>	15	7	1.63	0.81
Genotipo 3	8	6	1.73	0.93
<i>R. etli</i>	37	11	2.06	0.86
<i>S. terengae</i>	10	9	2.16	0.98
<i>B. japonicum</i>	71	14	2.31	0.88
<i>S. fredii</i>	28	16	2.44	0.91
<i>R. legum</i> bv. <i>phaseoli</i>	26	16	2.60	0.95

Tabla 5: Diversidad intraespecífica de la colección. Se utilizaron los coeficientes de H y D para cuantificar la diversidad intraespecífica de cada alelo ribosomal, utilizando los datos de los genotipos de la región intergénica 16S-23S ADNr.

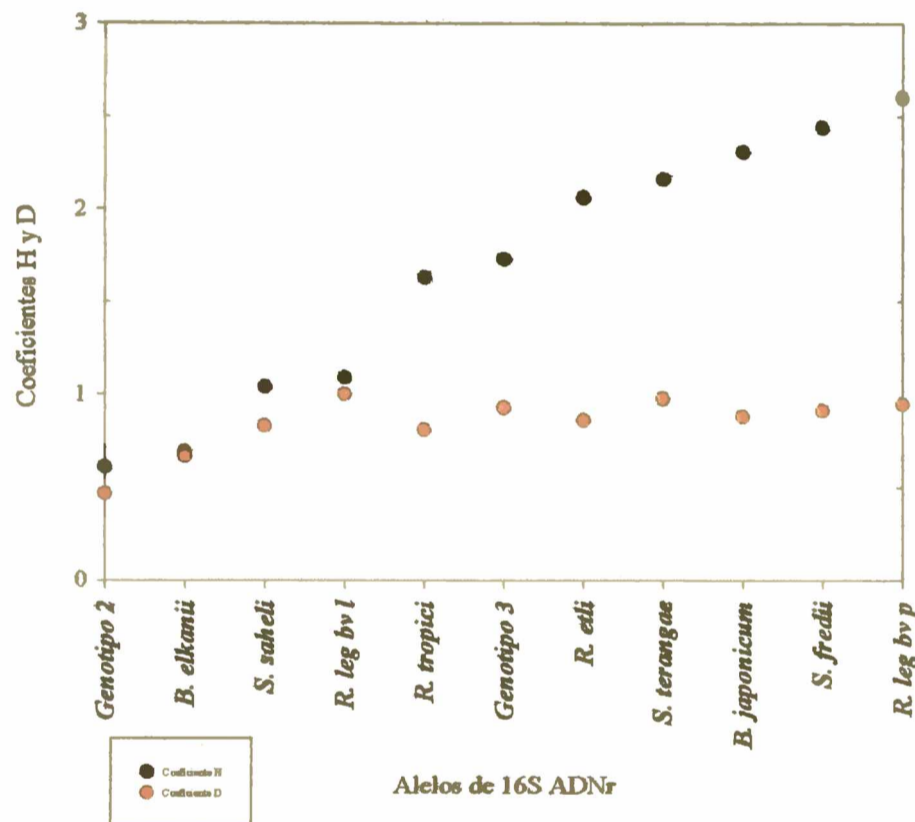


Figura 9: Diversidad intraespecífica. Coeficientes de diversidad H y D para los datos de la región intergénica 16S-23S ADNr de cada grupo de alelos ribosomales.

Se alcanzaron valores de los coeficientes de diversidad mayores que mediante la mera consideración de los alelos ribosomales. Esto está de acuerdo con lo descrito en los capítulos anteriores en donde se observó que el estudio de la región intergénica permitía la separación de un grupo formado por análisis del gen 16S ARNr, en otras palabras se puede cuantificar la mayor diversidad evidenciada.

Se encontró que los grupos formados por menos de 10 aislamientos en general presentan incongruencias entre los dos coeficientes de diversidad utilizados. Tal es el caso de *R. leguminosarum* bv. *leucaena*, que con el coeficiente D tiene el valor máximo de diversidad, pero no con el coeficiente H; si bien se encontró un IGS-tipo para cada aislamiento lo que le

permite obtener el máximo valor de diversidad, el coeficiente de diversidad debería poder utilizarse para predicción y en este caso el coeficiente H parecería que se ajusta mejor a muestras con pocos datos. Con estos resultados no se logró encontrar una relación entre la diversidad intraespecífica y la relación filogenética de los alelos ribosomales.

Los tres grupos de aislamientos con mayor índice de diversidad resultaron ser, la población de aislamientos de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* y en segundo lugar *S. fredii* y *B. japonicum*. Contrariamente a lo que se esperaba la población de aislamientos de *R. etli* no se encontró entre los tres primeros puestos denotando que la variabilidad en su región intergénica no es tan importante como la encontrada en otros alelos ribosomales en el NOA.

Discusión

En este capítulo se aplicaron algunos conceptos de la estadística para el estudio global de la colección de aislamientos del NOA. Cuando se describió la procedencia de la colección (Capítulo 1) se consideró que la misma era representativa de la población de rizobios asociados a leguminosas silvestres del NOA. En este trabajo se avanzó un poco más y se probó que la distribución de abundancias de especies es similar a la encontrada en el NOA. Existe un predominio de la especie *R. etli*, el cual está de acuerdo con otros resultados experimentales como la alta densidad rizobiana nodulante de poroto. Además, los aislamientos con el alelo de *B. japonicum* constituyen otro grupo de rizobios que se aísla en altas proporciones. Las distintas especies nodulantes de *Leucaena leucocephala* fueron aisladas en menor proporción a excepción de *S. fredii*, indicando su alta concentración en el suelo o su mayor capacidad de adaptación para nodular leucaena.

La diferencia en la distribución de especies en los distintos sitios analizados se debió principalmente a la menor variedad de leguminosas exploradas en el norte de la región, en parte por la escasa abundancia de especies en la zona de Pichanal y en parte a la falta de utilización de esas especies como atrapantes en el laboratorio. Se encontró que algunos alelos ribosomales se encuentran en el NOA en zonas como si estas fueran oasis de esas especies, tal es el caso de *B. elkanii*, Genotipo 2, *M. loti*, *R. tropici* A y *R. leguminosarum* bv *leucaena*. Un caso especial es el de *R. leguminosarum* bv *phaseoli* que desde el punto de vista planteado en el Capítulo 4 el mismo también se encontraría en pequeñas islas dentro de la región del NOA, sin embargo en este esquema general aparece como una especie más diseminada. El mayor número de nódulos de poroto analizado nos permite continuar con la propuesta iniciada en el Capítulo 4. Se podría concluir que algunas especies rizobianas se encuentran distribuidas de forma cosmopolita

independientemente del rango de planta hospedante como sucede con *R. etli* (sólo nodula poroto) y *B. japonicum* (asociado a diversas especies de leguminosas). Mientras que otras, se encuentran en forma endémica dentro de la región.

La población de rizobios del NOA esta formada por dos grupos claramente separados filogenéticamente, uno compuesto por las especies del género *Bradyrhizobium* y el otro por las especies de los géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* y *Mesorhizobium*. Estos dos grupos no se encuentran compartiendo el mismo hospedador, pero se ha observado que las especies de los géneros de crecimiento rápido son capaces de compartir la misma leguminosa huésped.

Teniendo en cuenta los datos de los alelos ribosomales se cuantificó la diversidad de la colección en cada sitio de recolección de ejemplares, utilizando para ello dos coeficientes de diversidad descritos en la bibliografía, H (Shannon) y D (Simpson). Se observó una correlación lineal entre ambos coeficientes, la cual se distorsiona si se incluyen en el análisis muestras con menos de 10 datos. El coeficiente D resulta de utilidad para dar un valor porcentual de la diversidad, mientras que se observó que el coeficiente H resulta menos susceptible a variaciones en el número de datos utilizados, el cual resultaría de elección para un número pequeño de datos. Los valores de diversidad de la colección resultaron variables en los distintos sitios de origen, siendo la diversidad general del orden del 75 %.

En los capítulos anteriores se encontró que cada población de especies presentaba variabilidad en su región intergénica, la misma fue cuantificada con los coeficientes H y D, encontrando que efectivamente los valores son sustancialmente mayores que cuando se considera el alelo de 16S ADNr sólo y la diversidad intraespecífica se encuentra en el orden del 85 %.

Bibliografía

- 1- **Borneman, J., P. W. Skroch, K. M. O'Sullivan, J. A. Palus, N. G. Rumjanek, J. L. Jansen, J. Nienhuis, and E. W. Triplett.** 1996. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *App Env Microbiol.* **62**:1935-1943.
- 2- **Eichner, C. A, R. W. Erb, K. N. Timmis, and L. Wagner-Dobler.** 1999. Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from shocks in the activated sludge microbial community. *App Env Microbiol.* **65**:102-109.
- 3- **Pielou, E. C.** 1969. *An Introduction to Mathematical Ecology.* Wiley, New York.
- 4- **Coutinho, H. L. C., V. M. Olivera, A. Lovato, A. H. N. Maia, and G. P. Manfio.** 1999. Evaluation of the diversity of rhizobia in Brazilian agricultural soils cultivated with soybeans. *Appl Soil Ecol.* **13**:159-167

Discusión General y Conclusiones



Discusión y Conclusiones Generales

Discusión

La región del NOA presenta un conjunto de ecosistemas muy atractivos para llevar a cabo estudios de la diversidad rizobiana. Se caracteriza por ser parte del centro sudamericano de domesticación de *Phaseolus vulgaris* y poseer una rica variedad de especies de leguminosas tanto herbáceas como arbóreas. Además, El NOA es la región de producción de poroto en la Argentina con aproximadamente 300.000 hectáreas cultivadas. En este trabajo se encaró el estudio de la comunidad de rizobios del NOA centrado principalmente en la descripción de la diversidad de las poblaciones de rizobios nodulantes de poroto. Se inició entonces, el establecimiento de una colección amplia que comprendiera a los rizobios que nodulan naturalmente tanto a las formas primitivas y cultivables de poroto como a otras leguminosas silvestres que se encuentran compartiendo el hábitat de poroto. Además, se incluyó a aquellos rizobios que se encuentran en los suelos y no alcanzan a revelarse a través de su asociación con leguminosas del NOA.

Es pertinente preguntarse en este trabajo, si la colección representa a las poblaciones de rizobio del NOA. Resulta difícil en nuestro caso como también lo fue para otros autores, definir el tamaño aceptable de la muestra que permita generalizar las conclusiones sobre diversidad poblacional. Obviamente, es esperable que a medida que se incrementa el tamaño de la muestra, también aumenten las posibilidades de detectar nuevos genotipos y afianzar las conclusiones sobre las predominancias de especies encontradas. Por ejemplo, el estudio de las poblaciones nodulantes de América condujo a la definición taxonómica de las especies *R. etli* y *R. tropici*, las cuales se sumaron a *R. leguminosarum* bv *phaseoli* aislado e identificado con anterioridad en Europa. Estos resultados definieron hasta ese momento la diversidad de genotipos nodulantes de poroto. Sin embargo, Laguerre *et al.* en el año 1993, después de examinar 72 aislamientos obtenidos de poroto cultivado en suelos de Francia, identificó algunos genotipos dentro de la heterogeneidad encontrada que no se correspondieron con las especies mencionadas. Este hallazgo que condujo a la definición de las nuevas especies *R. giardinii* y *R. gallicum*, amplió la diversidad conocida de rizobios nodulantes de poroto y demostró la importancia del aumento del tamaño de una muestra. En este trabajo fueron analizados 1182

aislamientos los cuales provienen de diversas regiones del NOA con sus propias características climáticas y edáficas, y a su vez de distintas leguminosas taxonómicamente distantes entre sí. Estas características nos permiten concluir que la colección es representativa de los rizobios del NOA.

Las poblaciones de rizobio de los suelos del NOA que nodulan respectivamente diferentes leguminosas se diferencian entre sí por su representación cuantitativa. Los niveles de rizobios nodulantes de poroto son altos en todo el NOA, mientras que los nodulantes de otras leguminosas son comparativamente bajos. Esto se puso en evidencia en la distribución de abundancias de alelos de 16S ADN_r que hemos encontrado en nuestra colección de aislamientos.

La diversidad encontrada dentro de la población de rizobios nodulante de poroto comprende a las especies *R. etli*, *R. leguminosarum* y *R. tropici*, con predominancia de *R. etli*. También, se encuentra que *R. etli* es predominante tanto en los nódulos cosechados en el NOA a partir de las variedades primitiva y cultivadas de *P. vulgaris* como en aquellos formados en poroto inoculado en el laboratorio con suspensiones de suelo. Además, *R. etli* fue solamente encontrada en nódulos de poroto, mientras que el resto de las especies también capaces de nodular a *P. vulgaris* fueron aisladas de otras leguminosas. La caracterización de los aislamientos de la forma primitiva y de los cultivares modernos de *P. vulgaris* sugieren que el proceso de fitomejoramiento no ha afectado esa afinidad entre *P. vulgaris* y *R. etli*. Los niveles altos de *R. etli* en suelo estarían dados por la característica de esta especie que le permite inducir competitivamente la formación de nódulos y acceder eficientemente a la fase simbiótica del rizobio; durante la cual los rizobios se multiplican y finalmente se liberan al suelo. Mediante este mecanismo se explicaría también la predominancia de *R. leguminosarum* en aquellos pocos sitios del NOA donde fue demostrada su presencia en la ocupación de los nódulos.

Otra conclusión de estos estudios, es que si bien la población asignada a la especie *R. etli* es predominante en los nódulos de poroto formados en el NOA hay otras poblaciones presentes en los suelos que son potencialmente capaces de nodular eficientemente a poroto. Así por ejemplo, el *genotipo salteño* que fue aislado de nódulos de la leguminosa silvestre *Mimosa* spp. y recuperado de suelo usando *Leucaena leucocephala* como atrapante.

El resto de las especies que resultaron efectivas en la nodulación de poroto en el laboratorio fueron recuperadas de muestras de suelo usando *Leucaena leucocephala* como planta atrapante. Estas especies representantes de los tres géneros de crecimiento rápido, se encuentran en el NOA en muy baja proporción, con la excepción de *S. fredii*. Además, los aislamientos con el alelo de *S. fredii* resultaron ser de carácter cosmopolita y altamente diversos. El genotipo de *S.*

fredii fue aislado en el NOA también de *Mimosa* spp. y *Acacia aroma* denotando su afinidad por las leguminosas arbóreas de la familia *Mimosoideae*. En otros lugares del mundo se aislaron rizobios con el alelo ribosomal de *S. fredii* con características similares a las descritas aquí, sugiriendo que podría tratarse de una población de rizobios cosmopolita. Encontramos llamativo los resultados de Herrera-Cervecera *et al.* (1999), quienes describieron el aislamiento de un rizobio de poroto con el genotipo *S. fredii* en Granada, España. En nuestro trabajo no aislamos *S. fredii* de nódulos de *P. vulgaris*, formados en condiciones de campo y el laboratorio. Además, la inoculación de poroto con un aislamiento representativo de la población de *S. fredii* resultó positiva aunque no provocó un aumento en el rendimiento, avalando por un lado los ensayos de competencia entre estos aislamientos y *R. etli* que mostraron que más del 98 % de los nódulos de poroto estaban ocupados por *R. etli*; y por otro lado, que no hayamos encontrado nódulos de *P. vulgaris* ocupados con *S. fredii*. Nuestros resultados nos permiten concluir que la población de *S. fredii* del NOA capaz de nodular poroto en condiciones de laboratorio no es competente en las condiciones del NOA.

Los otros rizobios aislados de *Leucaena leucocephala*, también nodulantes de poroto, se caracterizaron por su diversidad, siendo esta muy marcada en los agrupados por el alelo ribosomal de *S. terangae*. Además, algunas de las poblaciones con características similares a los sinorizobios podrían constituir nuevas especies emparentadas con *S. terangae* y *S. saheli*.

En general, la filogenia asume normalmente que los taxos bacterianos son monofiléticos y que no hay suficiente intercambio de material genético, ya sea por recombinación o transformación entre taxos diferentes que resulten significativos para oscurecer las interpretaciones filogenéticas. Sin embargo, el intercambio es un fenómeno que está ampliamente distribuido y documentado (Ver referencias de la revisión de Young, 2001). Las transferencias más estudiadas son las resistencias a antibióticos y metales pesados, o en el caso de los rizobios, los genes involucrados en la simbiosis fijadora de nitrógeno (Young, 2001). Quizás la evidencia más sorprendente es la transferencia de un segmento del gen 16S ARNr entre especies de *Aeromonas* (Sneath, 1993). La alta conservación entre los genes 16S ARNr los coloca como candidatos para mediar recombinaciones y estos fenómenos están impactando en la taxonomía (Wang *et al.*, 1997; Young, 2001). Todas estas consideraciones sobre otros procesos que también están involucrados en la generación de la diversidad microbiana implican la necesidad de adoptar una actitud criteriosa en el tratamiento de los datos y sus conclusiones.

Hemos observado, al igual que otros investigadores, que para poner en evidencia la diversidad presente en poblaciones aparentemente homogéneas es necesario llevar a cabo una identificación polifásica consistente en la aplicación de distintos procedimientos de análisis. En

general, estos procedimientos alcanzan diferentes grados de resolución y dado que cada uno examina un aspecto distinto, las agrupaciones obtenidas no siempre concuerdan. Así por ejemplo, el análisis de RFLP de 16S ADNr de algunos de los aislamientos de poroto permitió agruparlos con la especie *R. etli*, mientras que el análisis de DTGGE mostró variantes alélicas de 16S ARNr. Desde el punto de vista simbiótico, la población de rizobios de la especie *R. etli* del NOA está compuesta por tres linajes, determinados por variaciones alélicas del gen *nodC*. Teniendo en cuenta esta variabilidad el agrupamiento alcanzado difiere del obtenido usando los datos de variabilidad alélica de 16S ADNr evidenciadas por DTGGE. Dentro de este marco se podría dividir a los diferentes estudios en aquellos que analizan el cromosoma y aquellos que exploran las propiedades simbióticas del rizobio. Dado que la transferencia del material simbiótico entre rizobios es un evento que ocurre en la naturaleza, su consideración como elemento determinante de la clasificación lleva a agrupamientos que no coinciden con otros que utilizan marcadores genómicos más estables. En este trabajo se encontraron dos poblaciones de rizobios del NOA que portan el alelo ribosomal de *R. leguminosarum* con dos linajes plasmídicos diferentes y mientras que una de ellas nodula exclusivamente poroto, la otra, aislada de *Leucaena leucocephala*, puede nodular ambas leguminosas. Dadas las distintas biovariedades encontradas de *R. leguminosarum* (*phaseoli*, *vicea*, *trifolii*), incluyendo leucaena que ha sido descrita en este trabajo, se podría concluir que esta especie de rizobio está altamente capacitada para intercambiar su material simbiótico, lo cual favorecería su persistencia en ambientes naturales que experimentan cambios en su flora de leguminosas a lo largo del tiempo.

Es de esperar que aquellas especies de rizobios que porten el material simbiótico en su cromosoma sean menos susceptibles de sufrir alteraciones por transferencia horizontal. Sin embargo, la población de aislamientos de crecimiento lento del NOA, en la cual dominó el alelo ribosomal de la especie *B. japonicum*, presentó una diversidad de genotipos de genes simbióticos *nodC* y *nifH*. Este hallazgo nos sugeriría que los genomas de nuestros aislamientos de crecimiento lento son modificados por transferencia de material simbiótico.

Dentro de las leguminosas silvestres estudiadas hemos incluido a *P. augusti* cuyo microsimbionte no había sido caracterizado. En este trabajo pudimos demostrar que *P. augusti* se asocia a bradirizobios con alelos ribosomales de las especies *B. japonicum* y *B. elkanii* y a un tercer grupo denominado Genotipo 2. El gen 16S ADNr de los aislamientos Genotipo 2 es un híbrido entre los alelos de *B. japonicum* y *B. elkanii* y constituiría a nuestro entender una nueva especie con especificidad por *P. augusti*. Las características de los aislamientos de *P. augusti*, con la excepción del Genotipo 2, no nos permitieron distinguirlos de los bradirizobios

provenientes de otros hospedadores. Más aún, hemos encontrado que estos bradirizobios comparten las secuencias simbióticas *nifH* y *nodC*, las de la región intergénica, y además el rango de hospedadores.

Delgado-Salinas *et al.*, (1999) analizaron el parentesco de la familia de los *Phaseolus* y agruparon a las especies *P. augusti* y *P. vulgaris* var. *aborigineus* en posiciones filogenéticamente distantes, aunque proponen que han evolucionado a partir de un ancestro común. *P. augusti* y *P. vulgaris* var. *aborigineus* comparten las tierras vírgenes del NOA, pero las poblaciones de rizobios que nodulan ambas leguminosas presentan características muy distintas entre sí. Es posible especular que durante la evolución de estas leguminosas sus microsimbiontes coevolucionaron hacia genotipos diferentes tal como los que encontramos en el NOA.

En este trabajo se exploró la diversidad de las poblaciones rizobianas del NOA mediante la caracterización de nódulos cosechados en el campo y la utilización de leguminosas atrapantes en el laboratorio. Se adoptó también, el protocolo de geles desnaturalizantes para estudiar las poblaciones directamente de muestras de suelo. Dado que esta técnica no había sido aplicada con éxito en el estudio de las poblaciones de rizobios, se modificaron los protocolos existentes, logrando la resolución de una mezcla de especies provenientes de cultivos puros. Su aplicación al análisis de muestras de suelo nos permitió inferir que la composición de comunidades (de rizobios y no rizobios) de suelos distintos es variable pudiendo superar a la esperada con los métodos tradicionales.

A continuación se transcriben las principales conclusiones que se extraen de este trabajo.

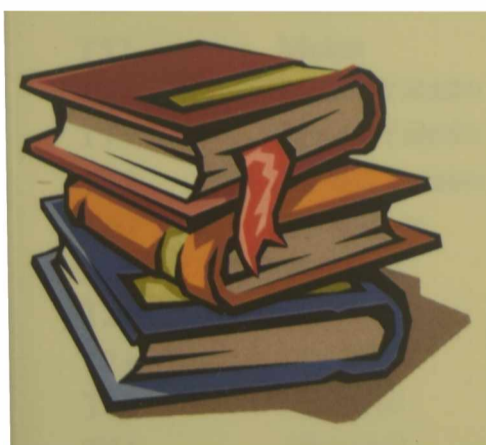
Conclusiones

- ✓ *Proponemos el siguiente protocolo analítico para el análisis eficiente de un número grande de aislamientos de leguminosas: 1- Selección de aislamientos representativos mediante perfiles de fingerprints. 2- Agrupación de la colección de aislamientos representativos mediante ARDRA. 3- Utilización de los perfiles de fingerprints de cada alelo de 16S ADNr definido para seleccionar nuevos aislamientos representativos. 4- Análisis de los aislamientos representativos mediante DTGGE. 5- Selección de perfiles migracionales diferentes. 5- Secuenciación de los aislamientos con perfiles migracionales diferentes.*
- ✓ *La población indígena capaz de nodular poroto es cuantitativamente superior a la población nodulante de *Leucaena leucocephala* y también a las otras leguminosas utilizadas en este trabajo, constituyendo una característica del NOA.*

-
- ✓ *La especie R. etli es el componente mayoritario en la población aislada de P. vulgaris del NOA.*
 - ✓ *R. etli es una especie cosmopolita que se distribuye en toda la región del NOA y R. leguminosarum una especie endémica que se la encuentra en un número reducido de lugares.*
 - ✓ *El hallazgo de que los cultivares primitivo y comercial de poroto están nodulados por el mismo genotipo nos permite concluir que el proceso de fitomejoramiento de poroto no ha afectado la afinidad que se observa entre la forma primitiva de poroto y rizobio.*
 - ✓ *El gen de nodulación nodC de la población de aislamientos de Tipo I (R. etli y R. leguminosarum) tiene una diversidad consistente en 4 alelos, dos de los cuales serían propios del NOA.*
 - ✓ *La densidad poblacional de rizobios nodulantes de leucaena es inferior a la encontrada nodulando P. vulgaris, sin embargo, la población de leucaena resultó más diversa a nivel de alelos de 16S ADNr que la de poroto.*
 - ✓ *Las variaciones del gen 16S ARNr encontradas en algunos aislamientos de Leucaena leucocephala relacionados con las especies S. fredii, S. teranga y S. saheli podrían representar a nuevas especies.*
 - ✓ *A partir de la distribución de alelos de 16S ADNr encontrada entre los rizobios recuperados con leucaena concluimos que su microsimbionte dominante en suelos del NOA es un genotipo que posee el alelo ribosomal de S. fredii.*
 - ✓ *Los aislamientos de Leucaena leucocephala caracterizados como R. leguminosarum constituirían una nueva biovariedad para la cual se propone el nombre de R. leguminosarum bv. leucaena.*
 - ✓ *Una misma población de rizobios con el genotipo salteño y cierta diversidad en la región intergénica y el gen nifH fue aislada de Phaseolus vulgaris, Mimosa spp. y Leucaena leucocephala.*
 - ✓ *P. augusti es una leguminosa promiscua que se asocia naturalmente a rizobios de género Bradyrhizobium.*
 - ✓ *El microsimbionte natural de Phaseolus augusti comprendería a tres genotipos B. japonicum, B. elkanii y una especie aún no definida denominada Genotipo 2. Se caracterizan por no nodular soja, pero se asocian efectivamente a géneros de leguminosas presentes en la región del NOA, con la excepción de P. vulgaris, con la cual forman nódulos inefectivos.*

- ✓ *Sólo algunos de los bradirizobios aislados en el NOA, que comparten en forma cruzada el hospedador, también comparten los genotipos de los genes nodC y nifH.*
- ✓ *Las leguminosas silvestres del NOA tienen preferencias de asociación con bradirizobios de un determinado alelo de 16S ADNr.*
- ✓ *A partir de nuestros resultados de inoculación en campo con una cepa de probada eficiencia en el laboratorio, concluimos que es muy difícil desplazar a los rizobios indígenas en la formación del nódulos.*
- ✓ *Aún con una baja respuesta a la inoculación es posible observar aumentos en la productividad de poroto.*
- ✓ *Mediante el análisis de fingerprints se reveló la diversidad genómica que no guardó una relación directa con la variabilidad de la región simbiótica o la variabilidad alélica del gen 16S ARNr.*
- ✓ *DTGGE nos permitió revelar heterogeneidad alélica de 16S ARNr en poblaciones aparentemente homogéneas de acuerdo a la aplicación de otros criterios.*

Apéndices



Apéndice 1

Muestras de suelos tomadas en la región del NOA

Se indican los años de recolección, la localización y el código con que fueron denominadas las muestras del suelo tomadas en el NOA. Se determinaron los valores de pH de todas las muestras de suelo. Además, algunas fueron utilizadas para determinar los niveles de rizobios nodulantes de poroto y leucaena.

Código de Muestra	Localización	pH	NMP poroto ^a	NMP leucaena ^a	Año de muestreo
T45	1 km al oeste de T44	7.37			1998
T68	Abasto, prov de Buenos Aires	5.88	0		2000
T70	Bolivar, prov de Buenos Aires	8.96	0		2000
T44	Camino a Rosario de Lerma (2 Km al este de Campo Quijano)	5.20			1998
T56	Camino a Rosario de Lerma (idem44)	6.06			2000
T67	San Lorenzo	5.93			2000
T28	Campichuelo	6.20	2.1*10 ⁴		1997
T61	Castellanos	5.53			2000
T47	Cerca De Chorro Blanco	7.95			1999
T24	Cerrillos	7.00	9.0*10 ²	5,3*10 ^{2b}	1997
T51	Cerrillos	6.65			1999
T36	Cerrillos (ensayo 1997)	nd ^c	1.8*10 ⁵	5.7*10 ²	1998
T32	Cerrillos, tierra del ensayo 1998	nd	6.7*10 ⁴	9.3*10 ¹	1998
T40	Cerrillos, parcela de maiz	nd	2.2*10 ⁵	6.3*10 ⁰	1998
T31	Cerrillos, parcela de maiz	nd	1.3*10 ⁴	5.3*10 ²	1998
T69	Cerrillos, previa al ensayo 2000	6.40	1.13*10 ⁵		2000
T39	Cerrillos, tratamiento 8 año 1998	nd	7.8*10 ⁵	1.2*10 ²	1998
T48	Chorro Blanco	7.32	6.7*10 ²		1999
T53	Embarcación, finca Las juntas	7.60	13.3*10 ²		1999
T46	Los Pulares	7.06			1999
T23	Metan	6.03	1,3*10 ³	1.1	1997
T52	Metan	6.24			1999
T62	Metan/Yatasto	6.65			2000
T35	Metan/Yatasto	nd	1.2*10 ⁴	3.3*10 ⁰	1998
T63	Metan/Yatasto (a 50 metros de T62)	6.75			2000
T50	Peña Baya	7.90			1999
P208	Pichanal	7.80			1999
T20	Pichanal	7.19	5.0*10 ³	4.6*10 ²	1997
T21	Pichanal	7.39			1997
T25	Pichanal	6.30		1,4*10 ²	1997
T54	Pichanal	7.78			1999
T55	Pichanal	7.34			1999
T29	Quebrada del Toro	5.43	1.5*10 ⁴	6.0*10 ¹	1998
T41	Quebrada del Toro	5.31			1998
T43	Quebrada del Toro	5.56			1998

T49	Quebrada del Toro	6.06	$6.7 \cdot 10^2$		1999
T58	Quebrada del Toro	5.8			2000
T59	Quebrada del Toro	6.65			2000
T60	Quebrada del Toro, dirección SAC ^d	7.75			2000
T66	Río Blanco, QT	7.01			2000
T42	Rosario de Lerma	7.35			1998
T57	Idem 45	8.04			2000
T65	San Luis, Salta ^e	8.15			2000
T64	San Luis, Salta ^f	8.18			2000
T27	Santa Clara	7.33	$7.3 \cdot 10^3$		1997
T34	Santa Clara ^g	7.26	$3.7 \cdot 10^3$	0	1998
T38	Santa Clara ^g	6.90	$1.2 \cdot 10^2$	0	1998
T33	Santa Clara ^h	7.22	$5.3 \cdot 10^3$	0	1998
T37	Santa Clara ^h	7.09	$5.3 \cdot 10^4$	0	1998
T22	Trópico Capricornio (Jujuy)	7.27			1997

^a La unidad que se utiliza es UNF/gr, unidades formadoras de nódulos por gramo de suelo seco.

^b En los casos en los que fueron analizadas más de una leguminosa los ensayos se realizaron en paralelo, utilizando la misma dilución de suelo para inocular las distintas plantas.

^c nd es no determinado.

^d SAC es San Antonio de Los Cobres.

^e Lugar con plantas de *Acacias*.

^f Lugar con plantas de *Arachis*.

^g Campo de citrus.

^h Campo de poroto.

Apéndice 2

Aislamientos del NOA de *Phaseolus vulgaris*

Población de aislamientos de *P. vulgaris*. La tabla muestra el cultivar de poroto utilizado, el sitio de origen, el genotipo de 16S ADN_r, y la fecha de recolección.

Aislamientos	Variedad de poroto	Lugar de recolección	Alelo de 16S ADN _r	Fecha
Camp1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Campichuelo	<i>Rhizobium etli</i>	13/10/97
Camp10	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Campichuelo	<i>Rhizobium etli</i>	13/10/97
Camp11	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Campichuelo	<i>Rhizobium etli</i>	13/10/97
Camp12	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Campichuelo	<i>Rhizobium etli</i>	13/10/97
Camp13	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Campichuelo	<i>Rhizobium etli</i>	13/10/97
Camp14	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Campichuelo	<i>Rhizobium etli</i>	13/10/97
Camp15	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Campichuelo	<i>Rhizobium etli</i>	13/10/97
Camp16	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Campichuelo	<i>Rhizobium etli</i>	13/10/97
Camp17	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Campichuelo	<i>Rhizobium etli</i>	13/10/97
Camp18	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Campichuelo	<i>Rhizobium etli</i>	13/10/97
Camp19	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Campichuelo	<i>Rhizobium etli</i>	13/10/97
Camp2	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Campichuelo	<i>Rhizobium etli</i>	13/10/97
Camp20	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Campichuelo	<i>Rhizobium etli</i>	13/10/97
Camp21	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Campichuelo	<i>Rhizobium etli</i>	13/10/97
Camp3	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Campichuelo	<i>Rhizobium etli</i>	13/10/97
Camp4	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Campichuelo	<i>Rhizobium etli</i>	13/10/97
Camp5	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Campichuelo	<i>Rhizobium etli</i>	13/10/97
Camp6	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Campichuelo	<i>Rhizobium etli</i>	13/10/97
Camp7	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Campichuelo	<i>Rhizobium etli</i>	13/10/97
Camp8	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Campichuelo	<i>Rhizobium etli</i>	13/10/97
Camp9	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Campichuelo	<i>Rhizobium etli</i>	13/10/97
NOAP101N1	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	Quebrada del Toro, Sector 2 ^a	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	05/03/98
NOAP101N10	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	Quebrada del Toro, Sector 2	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	05/03/98
NOAP101N11	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	Quebrada del Toro, Sector 2	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	05/03/98
NOAP101N12	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	Quebrada del Toro, Sector 2	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	05/03/98
NOAP101N13	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	Quebrada del Toro, Sector 2	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	05/03/98
NOAP101N14	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	Quebrada del Toro, Sector 2	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	05/03/98
NOAP101N15	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	Quebrada del Toro, Sector 2	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	05/03/98
NOAP101N16	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	Quebrada del Toro, Sector 2	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	05/03/98
NOAP101N2	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	Quebrada del Toro, Sector 2	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	05/03/98
NOAP101N3	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	Quebrada del Toro, Sector 2	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	05/03/98
NOAP101N4	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	Quebrada del Toro, Sector 2	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	05/03/98
NOAP101N5	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	Quebrada del Toro, Sector 2	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	05/03/98
NOAP101N6	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	Quebrada del Toro, Sector 2	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	05/03/98
NOAP101N7	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	Quebrada del Toro, Sector 2	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	05/03/98
NOAP101N8	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	Quebrada del Toro, Sector 2	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	05/03/98
NOAP101N9	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	Quebrada del Toro, Sector 2	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	05/03/98
NOAP103N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro, Sector3	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	05/03/98
NOAP103N2	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro, Sector3	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	05/03/98
NOAP103N3	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro, Sector3	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	05/03/98
NOAP105N1	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	Quebrada del Toro, Sector3	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	05/03/98
NOAP105N2	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	Quebrada del Toro, Sector3	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	05/03/98

NOAP105N3	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Quebrada del Toro, Sector3	<i>R. leguminosarum bv. phaseoli</i>	05/03/98
NOAP105N4	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Quebrada del Toro, Sector3		05/03/98
NOAP108N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro, Sector 2	<i>R. leguminosarum bv. phaseoli</i>	05/03/98
NOAP108N2	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro, Sector 2	<i>R. leguminosarum bv. phaseoli</i>	05/03/98
NOAP108N3	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro, Sector 2	<i>R. leguminosarum bv. phaseoli</i>	05/03/98
NOAP108N4	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro, Sector 2		05/03/98
NOAP117N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro, Sector 2	<i>R. leguminosarum bv. phaseoli</i>	17/04/98
NOAP117N2	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro, Sector 2	<i>R. leguminosarum bv. phaseoli</i>	17/04/98
NOAP118N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro, Sector 2	<i>R. leguminosarum bv. phaseoli</i>	17/04/98
NOAP118N2	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro, Sector 2	<i>R. leguminosarum bv. phaseoli</i>	17/04/98
NOAP118N3	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro, Sector 2	<i>R. leguminosarum bv. phaseoli</i>	17/04/98
NOAP118N4	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro, Sector 2	<i>R. leguminosarum bv. phaseoli</i>	17/04/98
NOAP11N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Valle Grande	<i>Rhizobium etli</i>	1996
NOAP11N2	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Valle Grande	<i>Rhizobium etli</i>	1996
NOAP11N3	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Valle Grande	<i>Rhizobium etli</i>	1996
NOAP120N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro		17/04/98
NOAP121N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum bv. phaseoli</i>	17/04/98
NOAP121N2	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum bv. phaseoli</i>	17/04/98
NOAP121N3	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum bv. phaseoli</i>	17/04/98
NOAP121N4	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum bv. phaseoli</i>	17/04/98
NOAP122N1	<i>Phaseolus vulgaris, Alubia</i>	Cerrillos, INTA	<i>Rhizobium etli</i>	17/04/98
NOAP122N2	<i>Phaseolus vulgaris, Alubia</i>	Cerrillos, INTA	<i>Rhizobium etli</i>	17/04/98
NOAP122N3	<i>Phaseolus vulgaris, Alubia</i>	Cerrillos, INTA	<i>Rhizobium etli</i>	17/04/98
NOAP122N4	<i>Phaseolus vulgaris, Alubia</i>	Cerrillos, INTA	<i>Rhizobium etli</i>	17/04/98
NOAP122N5	<i>Phaseolus vulgaris, Alubia</i>	Cerrillos, INTA	<i>Rhizobium etli</i>	17/04/98
NOAP122N6	<i>Phaseolus vulgaris, Alubia</i>	Cerrillos, INTA	<i>Rhizobium etli</i>	17/04/98
NOAP122N7	<i>Phaseolus vulgaris, Alubia</i>	Cerrillos, INTA	<i>Rhizobium etli</i>	17/04/98
NOAP124N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Los Pulares	<i>Rhizobium etli</i>	27/01/99
NOAP124N2	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Los Pulares	<i>Rhizobium etli</i>	27/01/99
NOAP124N3	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Los Pulares	<i>Rhizobium etli</i>	27/01/99
NOAP124N4	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Los Pulares	<i>Rhizobium etli</i>	27/01/99
NOAP125N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Los Pulares	<i>Rhizobium etli</i>	27/01/99
NOAP125N2	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Los Pulares	<i>Rhizobium etli</i>	27/01/99
NOAP125N3	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Los Pulares	<i>R. leguminosarum bv. phaseoli</i>	27/01/99
NOAP126N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Los Pulares	<i>Rhizobium etli</i>	27/01/99
NOAP126N2	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Los Pulares	<i>Rhizobium etli</i>	27/01/99
NOAP126N3	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Los Pulares	<i>Rhizobium etli</i>	27/01/99
NOAP126N4	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Los Pulares	<i>Rhizobium etli</i>	27/01/99
NOAP128N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Los Pulares	<i>Rhizobium etli</i>	27/01/99
NOAP130N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Los Laureles	<i>Rhizobium etli</i>	27/01/99
NOAP130N2	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Los Laureles	<i>Rhizobium etli</i>	27/01/99
NOAP130N3	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Los Laureles	<i>R. leguminosarum bv. phaseoli</i>	27/01/99
NOAP135N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Cerca de Chorro Blanco	<i>Rhizobium etli</i>	27/01/99
NOAP135N2	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Cerca de Chorro Blanco		27/01/99
NOAP136N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Cerca de Chorro Blanco	<i>Rhizobium etli</i>	27/01/99
NOAP136N2	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Cerca de Chorro Blanco		27/01/99
NOAP136N3	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Cerca de Chorro Blanco	<i>Rhizobium etli</i>	27/01/99
NOAP136N4	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Cerca de Chorro Blanco	<i>Rhizobium etli</i>	27/01/99
NOAP138N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Chorro Blanco	<i>R. leguminosarum bv. phaseoli</i>	27/01/99
NOAP138N2	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Chorro Blanco	<i>Rhizobium etli</i>	27/01/99
NOAP139N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Chorro Blanco	<i>Rhizobium etli</i>	27/01/99
NOAP139N2	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Chorro Blanco	<i>Rhizobium etli</i>	27/01/99
NOAP140N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Chorro Blanco	<i>Rhizobium etli</i>	27/01/99
NOAP140N2	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Chorro Blanco	<i>Rhizobium etli</i>	27/01/99

NOAP141N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Chorro Blanco	<i>Rhizobium etli</i>	27/01/99
NOAP141N2	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Chorro Blanco		27/01/99
NOAP141N3	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Chorro Blanco		27/01/99
NOAP141N4	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Chorro Blanco	<i>Rhizobium etli</i>	27/01/99
NOAP141N5	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Chorro Blanco		27/01/99
NOAP144N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	27/01/99
NOAP144N2	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro		27/01/99
NOAP144N3	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	27/01/99
NOAP145N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	27/01/99
NOAP145N2	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	27/01/99
NOAP146N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	27/01/99
NOAP146N2	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro		27/01/99
NOAP146N3	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	27/01/99
NOAP149N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Castellanos	<i>Rhizobium etli</i>	28/01/99
NOAP14N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Valle Grande	<i>Rhizobium etli</i>	1996
NOAP151N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Castellanos	<i>Rhizobium etli</i>	28/01/99
NOAP151N2	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Castellanos	<i>Rhizobium etli</i>	28/01/99
NOAP151N3	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Castellanos	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	28/01/99
NOAP151N4	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Castellanos	<i>Rhizobium etli</i>	28/01/99
NOAP151N5	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Castellanos	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	28/01/99
NOAP151N6	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Castellanos	<i>Rhizobium etli</i>	28/01/99
NOAP151N7	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Castellanos	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	28/01/99
NOAP151N8	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Castellanos	<i>Rhizobium etli</i>	28/01/99
NOAP151N9	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Castellanos	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	28/01/99
NOAP152N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Peña Baya	<i>Rhizobium etli</i>	28/01/99
NOAP152N2	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Peña Baya	<i>Rhizobium etli</i>	28/01/99
NOAP152N3	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Peña Baya	<i>Rhizobium etli</i>	28/01/99
NOAP152N4	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Peña Baya		28/01/99
NOAP161N1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	08/03/99
NOAP161N2	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	08/03/99
NOAP161N3	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	08/03/99
NOAP161N4	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	08/03/99
NOAP162N1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	08/03/99
NOAP164N1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	08/03/99
NOAP164N2	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro		08/03/99
NOAP164N3	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	08/03/99
NOAP164N4	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	08/03/99
NOAP165N1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	08/03/99
NOAP165N2	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro		08/03/99
NOAP165N3	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	08/03/99
NOAP165N4	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	08/03/99
NOAP168N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	08/03/99
NOAP168N2	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro		08/03/99
NOAP169N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro		08/03/99
NOAP170N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	08/03/99
NOAP170N2	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	08/03/99
NOAP17N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Tilcara	<i>Rhizobium etli</i>	1996
NOAP17N2	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Tilcara	<i>Rhizobium etli</i>	1996
NOAP184N1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Cerrillos	<i>Rhizobium etli</i>	10/03/99
NOAP185N1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Cerrillos		10/03/99
NOAP185N2	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Cerrillos		10/03/99
NOAP186N1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Cerrillos	<i>Rhizobium etli</i>	10/03/99
NOAP186N2	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Cerrillos		10/03/99
NOAP187N1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Cerrillos	<i>Rhizobium etli</i>	10/03/99

NOAP188N1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Cerrillos	<i>Rhizobium etli</i>	10/03/99
NOAP188N10	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Cerrillos	<i>Rhizobium etli</i>	10/03/99
NOAP188N2	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Cerrillos		10/03/99
NOAP188N3	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Cerrillos		10/03/99
NOAP188N4	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Cerrillos	<i>Rhizobium etli</i>	10/03/99
NOAP188N5	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Cerrillos		10/03/99
NOAP188N6	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Cerrillos	<i>Rhizobium etli</i>	10/03/99
NOAP188N7	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Cerrillos		10/03/99
NOAP188N8	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Cerrillos		10/03/99
NOAP188N9	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Cerrillos		10/03/99
NOAP189N1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Cerrillos		10/03/99
NOAP190N1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Cerrillos		10/03/99
NOAP190N2	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Cerrillos		10/03/99
NOAP190N3	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Cerrillos		10/03/99
NOAP190N4	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Cerrillos		10/03/99
NOAP190N5	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Cerrillos		10/03/99
NOAP191N1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Cerrillos		10/03/99
NOAP191N2	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Cerrillos		10/03/99
NOAP191N3	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Cerrillos		10/03/99
NOAP191N4	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Cerrillos		10/03/99
NOAP194N1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Pichanal	<i>Rhizobium etli</i>	30/04/99
NOAP194N10	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Pichanal	<i>Rhizobium etli</i>	30/04/99
NOAP194N13	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Pichanal	<i>Rhizobium etli</i>	30/04/99
NOAP194N14	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Pichanal	<i>Rhizobium etli</i>	30/04/99
NOAP194N15	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Pichanal	<i>Rhizobium etli</i>	30/04/99
NOAP194N17	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Pichanal	<i>Rhizobium etli</i>	30/04/99
NOAP194N18	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Pichanal	<i>Rhizobium etli</i>	30/04/99
NOAP194N2	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Pichanal	<i>Rhizobium etli</i>	30/04/99
NOAP194N3	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Pichanal	<i>Rhizobium etli</i>	30/04/99
NOAP194N4	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Pichanal	<i>Rhizobium etli</i>	30/04/99
NOAP194N5	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Pichanal	<i>Rhizobium etli</i>	30/04/99
NOAP194N6	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Pichanal	<i>Rhizobium etli</i>	30/04/99
NOAP194N7	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Pichanal	<i>Rhizobium etli</i>	30/04/99
NOAP194N8	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Pichanal	<i>Rhizobium etli</i>	30/04/99
NOAP194N9	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Pichanal	<i>Rhizobium etli</i>	30/04/99
NOAP195N1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Metan, campo vecino a Ens		29/04/99
NOAP195N2	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Metan, campo vecino a Ens		29/04/99
NOAP195N3	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Metan, campo vecino a Ens		29/04/99
NOAP195N4	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Metan, campo vecino a Ens		29/04/99
NOAP195N5	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Metan, campo vecino a Ens		29/04/99
NOAP195N6	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Metan, campo vecino a Ens		29/04/99
NOAP195N7	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Metan, campo vecino a Ens		29/04/99
NOAP196N2	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Metan, campo vecino a Ens		29/04/99
NOAP196N4	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Metan, campo vecino a Ens		29/04/99
NOAP197N1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Metan, campo vecino a Ens		29/04/99
NOAP197N2	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Metan, campo vecino a Ens		29/04/99
NOAP198N2	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Metan, Tratamiento 8		29/04/99
NOAP198N3	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Metan, Tratamiento 8		29/04/99
NOAP199N1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Metan, Tratamiento 8		29/04/99
NOAP199N2	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Metan, Tratamiento 8		29/04/99
NOAP199N3	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Metan, Tratamiento 8		29/04/99
NOAP199N8	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Metan, Tratamiento 8		29/04/99
NOAP200N1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Metan, productor		29/04/99
NOAP200N2	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Metan, productor		29/04/99

NOAP200N4	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Metán, productor		29/04/99
NOAP201N1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Metán, productor		29/04/99
NOAP202N1	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Embarcacion, Trata 1		29/04/99
NOAP202N10	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Embarcacion, Trata 1		29/04/99
NOAP202N2	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Embarcacion, Trata 1		29/04/99
NOAP202N3	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Embarcacion, Trata 1		29/04/99
NOAP202N4	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Embarcacion, Trata 1		29/04/99
NOAP202N5	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Embarcacion, Trata 1		29/04/99
NOAP202N6	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Embarcacion, Trata 1		29/04/99
NOAP202N9	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Embarcacion, Trata 1		29/04/99
NOAP203N1	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Embarcacion, Trata 1		29/04/99
NOAP203N2	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Embarcacion, Trata 1		29/04/99
NOAP203N3	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Embarcacion, Trata 1		29/04/99
NOAP204N1	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Embarcacion, Trata 1		29/04/99
NOAP204N2	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Embarcacion, Trata 1		29/04/99
NOAP205N1	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Embarcacion, Trata 4		29/04/99
NOAP205N2	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Embarcacion, Trata 4		29/04/99
NOAP205N3	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Embarcacion, Trata 4		29/04/99
NOAP205N4	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Embarcacion, Trata 4		29/04/99
NOAP205N5	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Embarcacion, Trata 4		29/04/99
NOAP205N6	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Embarcacion, Trata 4		29/04/99
NOAP205N7	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Embarcacion, Trata 4		29/04/99
NOAP205N8	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Embarcacion, Trata 4		29/04/99
NOAP205N9	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Embarcacion, Trata 4	<i>Rhizobium etli</i>	29/04/99
NOAP206N1	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Embarcacion, Trata 4		29/04/99
NOAP207N1	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Embarcacion, Trata 8	<i>Rhizobium etli</i>	29/04/99
NOAP207N2	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Embarcacion, Trata 8		29/04/99
NOAP207N3	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Embarcacion, Trata 8		29/04/99
NOAP207N4	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Embarcacion, Trata 8		29/04/99
NOAP207N6	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Embarcacion, Trata 8		29/04/99
NOAP207N7	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Embarcacion, Trata 8		29/04/99
NOAP207N8	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Embarcacion, Trata 8		29/04/99
NOAP208N1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Pichanal, productor		29/04/99
NOAP210N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	25/1/00
NOAP210N2	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	25/1/00
NOAP210N3	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	25/1/00
NOAP210N4	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	25/1/00
NOAP210N5	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	25/1/00
NOAP210N6	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	25/1/00
NOAP210N7	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	25/1/00
NOAP211N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	25/1/00
NOAP211N2	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	25/1/00
NOAP212N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	25/1/00
NOAP212N2	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	25/1/00
NOAP212N3	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro		25/1/00
NOAP212N4	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	25/1/00
NOAP213N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro		25/1/00
NOAP236N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Río Blanco	<i>Rhizobium etli</i>	27/1/00
NOAP236N2	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Río Blanco	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	27/1/00
NOAP236N3	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Río Blanco	<i>Rhizobium etli</i>	27/1/00
NOAP236N4	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Río Blanco	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	27/1/00
NOAP236N5	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Río Blanco	<i>Rhizobium etli</i>	27/1/00
NOAP238N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Río Blanco	<i>Rhizobium etli</i>	27/1/00
NOAP238N2	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Río Blanco		27/1/00

NOAP238N3	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Río Blanco	<i>Rhizobium etli</i>	27/1/00
NOAP25N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Los Toldos	<i>R. tropici A</i>	1996
NOAP34N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Cerrillos	<i>Rhizobium etli</i>	1996
NOAP35N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Cerrillos	<i>Rhizobium etli</i>	1996
NOAP37N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Los Laureles	<i>Rhizobium etli</i>	1996
NOAP3N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Pichanal	<i>Rhizobium etli</i>	1996
NOAP40N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Los Laureles	<i>Rhizobium etli</i>	1996
NOAP41N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Los Laureles	<i>Rhizobium etli</i>	1996
NOAP42N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Los Laureles	<i>Rhizobium etli</i>	1996
NOAP43N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Chorro Blanco	<i>Rhizobium etli</i>	1996
NOAP45N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Chorro Blanco	<i>R. leguminosarum bv. phaseoli</i>	1996
NOAP46N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Chorro Blanco	<i>Rhizobium etli</i>	1996
NOAP55N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro	<i>Rhizobium etli</i>	1996
NOAP62N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Pulares	<i>Rhizobium etli</i>	1996
NOAP64N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Pulares	<i>R. leguminosarum bv. phaseoli</i>	1996
NOAP65N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Los Nogales	<i>Rhizobium etli</i>	1996
NOAP66N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Los Nogales	<i>R. leguminosarum bv. phaseoli</i>	1996
NOAP67N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Los Nogales	<i>Rhizobium etli</i>	1996
NOAP71N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro		21/02/97
NOAP79N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro		21/02/97
NOAP79N2	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro		21/02/97
NOAP8N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Valle Grande	<i>R. leguminosarum bv. phaseoli</i>	1996
NOAP8N2	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Valle Grande	<i>Rhizobium etli</i>	1996
NOAP8N3	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Valle Grande	<i>R. leguminosarum bv. phaseoli</i>	1996
NOAP90N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Chorro Blanco	<i>Rhizobium etli</i>	1997
NOAP90N2	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Chorro Blanco	<i>Rhizobium etli</i>	1997
NOAP90N3	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Chorro Blanco	<i>Rhizobium etli</i>	1997
NOAP90N4	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Chorro Blanco	<i>Rhizobium etli</i>	1997
NOAP90N5	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Chorro Blanco	<i>Rhizobium etli</i>	1997
NOAP90N6	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Chorro Blanco	<i>Rhizobium etli</i>	1997
NOAP91N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada de Escoipe	<i>Rhizobium etli</i>	1996
NOAP91N2	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada de Escoipe	<i>Rhizobium etli</i>	1996
NOAP91N3	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada de Escoipe	<i>Rhizobium etli</i>	1996
NOAP91N4	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada de Escoipe	<i>Rhizobium etli</i>	1996
NOAP91N5	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada de Escoipe	<i>Rhizobium etli</i>	1996
NOAP91N6	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada de Escoipe	<i>Rhizobium etli</i>	1996
NOAP93N1	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum bv. phaseoli</i>	30/01/98
NOAP93N10	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum bv. phaseoli</i>	30/01/98
NOAP93N11	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum bv. phaseoli</i>	30/01/98
NOAP93N2	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum bv. phaseoli</i>	30/01/98
NOAP93N3	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum bv. phaseoli</i>	30/01/98
NOAP93N4	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum bv. phaseoli</i>	30/01/98
NOAP93N5	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum bv. phaseoli</i>	30/01/98
NOAP93N6	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum bv. phaseoli</i>	30/01/98
NOAP93N7	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum bv. phaseoli</i>	30/01/98
NOAP93N8	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro	<i>Rhizobium etli</i>	30/01/98
NOAP93N9	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum bv. phaseoli</i>	30/01/98
Sc1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	13/10/97
Sc10	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	13/10/97
Sc11	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	13/10/97
Sc12	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	13/10/97
Sc13	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	13/10/97
Sc14	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	13/10/97
Sc15	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	13/10/97

Sc16	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	13/10/97
Sc17	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	13/10/97
Sc18	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	13/10/97
Sc19	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	13/10/98
Sc2	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	13/10/97
Sc20	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	13/10/97
Sc21	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	13/10/97
Sc22	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	13/10/97
Sc23	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	13/10/97
Sc24	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	13/10/97
Sc25	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	13/10/97
Sc26	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	13/10/97
Sc27	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	13/10/97
Sc3	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	13/10/97
Sc4	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	13/10/97
Sc5	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	13/10/97
Sc6	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	13/10/97
Sc7	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	13/10/97
Sc8	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	13/10/97
Sc9	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	13/10/97
T22N1P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada de Humahuaca	<i>Rhizobium etli</i>	24/04/97
T22N2P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada de Humahuaca	<i>Rhizobium etli</i>	24/04/97
T22N3P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada de Humahuaca	<i>Rhizobium etli</i>	24/04/97
T22N4P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada de Humahuaca	<i>Rhizobium etli</i>	24/04/97
T23N1P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Metán	<i>Rhizobium etli</i>	24/04/97
T23N2P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Metán		24/04/97
T24N1P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Cerrillos	<i>Rhizobium etli</i>	24/04/97
T24N1Pab	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Cerrillos	<i>Rhizobium etli</i>	24/04/97
T24N2P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Cerrillos	<i>Rhizobium etli</i>	24/04/97
T24N2Pab	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Cerrillos	<i>Rhizobium etli</i>	24/04/97
T25N1Pab	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Pichanal	<i>Rhizobium etli</i>	24/04/97
T25N2Pab	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Pichanal	<i>Rhizobium etli</i>	24/04/97
T27N1Pab	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	24/04/97
T27N2Pab	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	24/04/97
T28N1P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Campichuelo	<i>Rhizobium etli</i>	24/04/97
T28N2P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Campichuelo	<i>Rhizobium etli</i>	24/04/97
T29-1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	13/10/97
T29-10	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	13/10/97
T29-11	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	13/10/97
T29-12	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	13/10/97
T29-13	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	13/10/97
T29-14	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	13/10/97
T29-15	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>Rhizobium etli</i>	13/10/97
T29-16	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	13/10/97
T29-17	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	13/10/97
T29-18	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	13/10/97
T29-19	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	13/10/97
T29-2	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	13/10/97
T29-20	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	13/10/97
T29-3	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	13/10/97
T29-4	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	13/10/97
T29-5	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	13/10/97
T29-8	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	13/10/97
T29-9	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	13/10/97

T29N10P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	08/09/97
T29N11P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	08/09/97
T29N1P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	11/08/97
T29N1Pab	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	11/08/97
T29N2P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	11/08/97
T29N2Pab	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	11/08/97
T29N3P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	11/08/97
T29N3Pab	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	11/08/97
T29N4P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	08/09/97
T29N5P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	08/09/97
T29N6P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	08/09/97
T29N7P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	08/09/97
T29N8P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	08/09/97
T29N9P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	08/09/97
T33N10P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	22/09/98
T33N1P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	22/09/98
T33N2P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	22/09/98
T33N3P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	22/09/98
T33N4P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	22/09/98
T33N5P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	22/09/98
T33N6P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	22/09/98
T33N7P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	22/09/98
T33N8P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	22/09/98
T33N9P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	22/09/98
T34N10P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	22/09/98
T34N1P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	22/09/98
T34N2P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	22/09/98
T34N3P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	22/09/98
T34N4P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	22/09/98
T34N5P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	22/09/98
T34N6P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	22/09/98
T34N7P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	22/09/98
T34N8P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	22/09/98
T34N9P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	22/09/98
T37N10P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara		26/06/98
T37N1P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	26/06/98
T37N21P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	22/09/98
T37N23P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	22/09/98
T37N24P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	22/09/98
T37N25P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	22/09/98
T37N26P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	22/09/98
T37N27P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	22/09/98
T37N28P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	22/09/98
T37N29P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	22/09/98
T37N2P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara		26/06/98
T37N30P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	22/09/98
T37N31P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	22/09/98
T37N32P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	22/09/98
T37N33P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	22/09/98
T37N3P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	26/06/98
T37N4P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	26/06/98
T37N5P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	26/06/98
T37N6P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	26/06/98
T37N7P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Santa Clara	<i>Rhizobium etli</i>	26/06/98

T40N8P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Cerrillos	<i>Rhizobium etli</i>	12/06/98
T40N9P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Cerrillos	<i>Rhizobium etli</i>	12/06/98
T41N10P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> <i>bv. phaseoli</i>	29/06/98
T41N1P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> <i>bv. phaseoli</i>	29/06/98
T41N2P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> <i>bv. phaseoli</i>	29/06/98
T41N3P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> <i>bv. phaseoli</i>	29/06/98
T41N4P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> <i>bv. phaseoli</i>	29/06/98
T41N5P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> <i>bv. phaseoli</i>	29/06/98
T41N6P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> <i>bv. phaseoli</i>	29/06/98
T41N7P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> <i>bv. phaseoli</i>	29/06/98
T41N8P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> <i>bv. phaseoli</i>	29/06/98
T41N9P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> <i>bv. phaseoli</i>	29/06/98
T42N10P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Rosario de Lerma	<i>Rhizobium etli</i>	29/06/98
T42N11P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Rosario de Lerma	<i>Rhizobium etli</i>	29/06/98
T42N1P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Rosario de Lerma	<i>Rhizobium etli</i>	29/06/98
T42N2P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Rosario de Lerma	<i>Rhizobium etli</i>	29/06/98
T42N3P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Rosario de Lerma	<i>Rhizobium etli</i>	29/06/98
T42N4P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Rosario de Lerma	<i>Rhizobium etli</i>	29/06/98
T42N5P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Rosario de Lerma	<i>Rhizobium etli</i>	29/06/98
T42N6P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Rosario de Lerma	<i>Rhizobium etli</i>	29/06/98
T42N7P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Rosario de Lerma	<i>Rhizobium etli</i>	29/06/98
T42N8P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Rosario de Lerma	<i>Rhizobium etli</i>	29/06/98
T42N9P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Rosario de Lerma	<i>Rhizobium etli</i>	29/06/98
T43N23P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> <i>bv. phaseoli</i>	28/10/98
T43N24P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> <i>bv. phaseoli</i>	28/10/98
T43N25P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> <i>bv. phaseoli</i>	28/10/98
T43N26P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> <i>bv. phaseoli</i>	28/10/98
T43N27P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> <i>bv. phaseoli</i>	28/10/98
T43N28P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> <i>bv. phaseoli</i>	28/10/98
T43N29P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> <i>bv. phaseoli</i>	28/10/98
T43N30P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> <i>bv. phaseoli</i>	28/10/98
T43N31P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> <i>bv. phaseoli</i>	28/10/98
T43N32P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> <i>bv. phaseoli</i>	28/10/98
T44N20P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Prox a Rosario de Lerma		28/10/98
T44N21P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Prox a Rosario de Lerma	<i>Rhizobium tropici</i> B?	28/10/98
T44N22P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Prox a Rosario de Lerma	<i>Rhizobium tropici</i> B?	28/10/98
T44N23P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Prox a Rosario de Lerma	<i>Rhizobium tropici</i> B?	28/10/98
T44N24P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Prox a Rosario de Lerma		28/10/98
T45N23P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Prox a Quebrada del Toro		28/10/98
T45N24P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Prox a Quebrada del Toro	<i>Rhizobium etli</i>	28/10/98
T45N25P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Prox a Quebrada del Toro	<i>Rhizobium etli</i>	28/10/98
T45N26P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Prox a Quebrada del Toro	<i>Rhizobium etli</i>	28/10/98
T45N27P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Prox a Quebrada del Toro	<i>Rhizobium etli</i>	28/10/98
T46N1P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Los Pulares		04/03/99
T46N1Pab	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Los Pulares		04/03/99
T46N2P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Los Pulares		04/03/99
T46N2Pab	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Los Pulares		04/03/99
T46N3P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Los Pulares		04/03/99
T46N4P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Los Pulares		04/03/99
T46N5P?	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Los Pulares		04/03/99
T48-1P	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	Chorro Blanco		29/03/99
T48N1P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Chorro Blanco		04/03/99
T48N1Pab	<i>Phaseolus aborigineus</i>	Chorro Blanco		04/03/99
T48N2P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Chorro Blanco		04/03/99

T48N3P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Chorro Blanco		04/03/99
T48N4P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Chorro Blanco		04/03/99
T48N5P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Chorro Blanco		04/03/99
T49-10P	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Quebrada del Toro		29/03/99
T49-11P	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Quebrada del Toro		29/03/99
T49-15P	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Quebrada del Toro		29/03/99
T49-1P	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Quebrada del Toro		29/03/99
T49-2P	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Quebrada del Toro		29/03/99
T49-3P	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Quebrada del Toro		29/03/99
T49-3P	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Quebrada del Toro		29/03/99
T49-4P	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Quebrada del Toro		29/03/99
T49-5P	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Quebrada del Toro		29/03/99
T49-6P	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Quebrada del Toro		29/03/99
T49-7P	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Quebrada del Toro		29/03/99
T49-8P	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Quebrada del Toro		29/03/99
T49-9P	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Quebrada del Toro		29/03/99
T49N1P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Quebrada del Toro	<i>Rhizobium etli</i>	04/03/99
T50N1PC	<i>Phaseolus vulgaris, Camilo</i>	Peña Baya	<i>Rhizobium etli</i>	10/12/99
T50N2PC	<i>Phaseolus vulgaris, Camilo</i>	Peña Baya	<i>Rhizobium etli</i>	10/12/99
T50N3PC	<i>Phaseolus vulgaris, Camilo</i>	Peña Baya	<i>Rhizobium etli</i>	10/12/99
T50N4PC	<i>Phaseolus vulgaris, Camilo</i>	Peña Baya	<i>Rhizobium etli</i>	10/12/99
T51N10PN	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Cerrillos, INTA		12/10/99
T51N1PC	<i>Phaseolus vulgaris, Camilo</i>	Cerrillos, INTA		12/10/99
T51N1PN	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Cerrillos, INTA		12/10/99
T51N1PP	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Cerrillos, INTA		12/10/99
T51N2PC	<i>Phaseolus vulgaris, Camilo</i>	Cerrillos, INTA		12/10/99
T51N2PN	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Cerrillos, INTA		12/10/99
T51N2PP	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Cerrillos, INTA	<i>Rhizobium etli</i>	12/10/99
T51N3PC	<i>Phaseolus vulgaris, Camilo</i>	Cerrillos, INTA	<i>Rhizobium etli</i>	12/10/99
T51N3PN	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Cerrillos, INTA		12/10/99
T51N3PP	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Cerrillos, INTA	<i>Rhizobium etli</i>	12/10/99
T51N4PC	<i>Phaseolus vulgaris, Camilo</i>	Cerrillos, INTA	<i>Rhizobium etli</i>	12/10/99
T51N4PN	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Cerrillos, INTA		12/10/99
T51N4PP	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Cerrillos, INTA		12/10/99
T51N5PN	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Cerrillos, INTA		12/10/99
T51N5PP	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Cerrillos, INTA	<i>Rhizobium etli</i>	12/10/99
T51N6PN	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Cerrillos, INTA		12/10/99
T51N7PN	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Cerrillos, INTA		12/10/99
T51N8PN	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Cerrillos, INTA		12/10/99
T51N9PN	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Cerrillos, INTA		12/10/99
T52N10PN	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Metán	<i>Rhizobium etli</i>	12/10/99
T52N1PC	<i>Phaseolus vulgaris, Camilo</i>	Metán	<i>Rhizobium etli</i>	12/10/99
T52N1PN	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Metán		12/10/99
T52N1PP	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Metán	<i>Rhizobium etli</i>	12/10/99
T52N2PC	<i>Phaseolus vulgaris, Camilo</i>	Metán		12/10/99
T52N2PN	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Metán		12/10/99
T52N2PP	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Metán	<i>Rhizobium etli</i>	12/10/99
T52N3PC	<i>Phaseolus vulgaris, Camilo</i>	Metán	<i>Rhizobium etli</i>	12/10/99
T52N3PN	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Metán	<i>Rhizobium etli</i>	12/10/99
T52N3PP	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Metán	<i>Rhizobium etli</i>	12/10/99
T52N4PC	<i>Phaseolus vulgaris, Camilo</i>	Metán	<i>Rhizobium etli</i>	12/10/99
T52N4PN	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Metán		12/10/99
T52N4PP	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Metán	<i>Rhizobium etli</i>	12/10/99
T52N5PC	<i>Phaseolus vulgaris, Camilo</i>	Metán	<i>Rhizobium etli</i>	12/10/99

T52N5PN	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Metán	<i>Rhizobium etli</i>	12/10/99
T52N5PP	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Metán	<i>Rhizobium etli</i>	12/10/99
T52N6PC	<i>Phaseolus vulgaris, Camilo</i>	Metán	<i>Rhizobium etli</i>	12/10/99
T52N6PN	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Metán	<i>Rhizobium etli</i>	12/10/99
T52N6PP	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Metán	<i>Rhizobium etli</i>	12/10/99
T52N7PN	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Metán	<i>Rhizobium etli</i>	12/10/99
T52N8PN	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Metán		12/10/99
T52N9PN	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Metán	<i>Rhizobium etli</i>	12/10/99
T53N10PN	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Embarcación		12/10/99
T53N1PN	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Embarcación	<i>Rhizobium etli</i>	12/10/99
T53N1PP	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Embarcación		10/12/99
T53N2PN	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Embarcación		12/10/99
T53N2PP	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Embarcación	<i>Rhizobium etli</i>	10/12/99
T53N3PN	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Embarcación		12/10/99
T53N3PP	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Embarcación	<i>Rhizobium etli</i>	10/12/99
T53N4PN	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Embarcación		12/10/99
T53N4PP	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Embarcación	<i>Rhizobium etli</i>	10/12/99
T53N5PN	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Embarcación		12/10/99
T53N5PP	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Embarcación	<i>Rhizobium etli</i>	10/12/99
T53N6PN	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Embarcación		12/10/99
T53N6PP	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Embarcación	<i>Rhizobium etli</i>	10/12/99
T53N7PN	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Embarcación	<i>Rhizobium etli</i>	12/10/99
T53N7PP	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Embarcación	<i>Rhizobium etli</i>	10/12/99
T53N8PN	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Embarcación	<i>Rhizobium etli</i>	12/10/99
T53N8PP	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Embarcación	<i>Rhizobium etli</i>	10/12/99
T53N9PN	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Embarcación		12/10/99
T54N1PN	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Pichanal	<i>Rhizobium etli</i>	10/12/99
T54N2PN	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Pichanal	<i>Rhizobium etli</i>	10/12/99
T54N3PN	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Pichanal	<i>Rhizobium etli</i>	10/12/99
T54N4PN	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Pichanal		10/12/99
T54N5PN	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Pichanal		10/12/99
T54N6PN	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Pichanal		10/12/99
T54N7PN	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Pichanal		10/12/99
T54N8PN	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Pichanal	<i>Rhizobium etli</i>	10/12/99
T55N1PC	<i>Phaseolus vulgaris, Camilo</i>	Pichanal		10/12/99
T55N1PP	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Pichanal		10/12/99
T55N2PC	<i>Phaseolus vulgaris, Camilo</i>	Pichanal		10/12/99
T55N2PP	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Pichanal	<i>Rhizobium etli</i>	10/12/99
T55N3PC	<i>Phaseolus vulgaris, Camilo</i>	Pichanal		10/12/99
T55N3PP	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Pichanal	<i>Rhizobium etli</i>	10/12/99
T55N4PC	<i>Phaseolus vulgaris, Camilo</i>	Pichanal		10/12/99
T55N4PP	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Pichanal	<i>Rhizobium etli</i>	10/12/99
T55N5PC	<i>Phaseolus vulgaris, Camilo</i>	Pichanal	<i>Rhizobium etli</i>	10/12/99
T55N5PP	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Pichanal	<i>Rhizobium etli</i>	10/12/99
T55N6PC	<i>Phaseolus vulgaris, Camilo</i>	Pichanal		10/12/99
T55N6PP	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Pichanal		10/12/99
T55N7PC	<i>Phaseolus vulgaris, Camilo</i>	Pichanal	<i>Rhizobium etli</i>	10/12/99
T55N7PP	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Pichanal	<i>Rhizobium etli</i>	10/12/99
T55N8PC	<i>Phaseolus vulgaris, Camilo</i>	Pichanal		10/12/99
T55N8PP	<i>Phaseolus vulgaris, Paloma</i>	Pichanal		10/12/99
T56N10P	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Camino a Rosario de Lerma	<i>Rhizobium tropici B?</i>	17/04/00
T56N1P	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Camino a Rosario de Lerma	<i>Rhizobium tropici B?</i>	17/04/00
T56N2P	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Camino a Rosario de Lerma	<i>Rhizobium tropici B?</i>	17/04/00
T56N3P	<i>Phaseolus vulgaris, Nag12</i>	Camino a Rosario de Lerma	<i>Rhizobium tropici B?</i>	17/04/00

T56N4P	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	Camino a Rosario de Lerma	<i>Rhizobium tropici</i> B?	17/04/00
T56N5P	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	Camino a Rosario de Lerma	<i>Rhizobium tropici</i> B?	17/04/00
T56N6P	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	Camino a Rosario de Lerma	<i>Rhizobium tropici</i> B?	17/04/00
T56N7P	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	Camino a Rosario de Lerma	<i>Rhizobium tropici</i> B?	17/04/00
T56N8P	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	Camino a Rosario de Lerma	<i>Rhizobium tropici</i> B?	17/04/00
T56N9P	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	Camino a Rosario de Lerma	<i>Rhizobium tropici</i> B?	17/04/00
T57N1P	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	A 5 km de tierra 56	<i>Rhizobium etli</i>	17/04/00
T57N2P	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	A 5 km de tierra 56	<i>Rhizobium etli</i>	17/04/00
T57N3P	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	A 5 km de tierra 56	<i>Rhizobium etli</i>	17/04/00
T57N4P	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	A 5 km de tierra 56	<i>Rhizobium etli</i>	17/04/00
T57N5P	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	A 5 km de tierra 56	<i>Rhizobium etli</i>	17/04/00
T57N6P	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	A 5 km de tierra 56	<i>Rhizobium etli</i>	17/04/00
T57N7P	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	A 5 km de tierra 56	<i>Rhizobium etli</i>	17/04/00
T57N8P	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	A 5 km de tierra 56	<i>Rhizobium etli</i>	17/04/00
T58N1P	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	Quebrada del Toro		17/04/00
T58N2P	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	17/04/00
T58N3P	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	17/04/00
T58N4P	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	17/04/00
T58N5P	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	17/04/00
T58N6P	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	Quebrada del Toro	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	17/04/00
T62N10P	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	Yatasto	<i>Rhizobium etli</i>	17/04/00
T62N1P	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	Yatasto	<i>Rhizobium etli</i>	17/04/00
T62N2P	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	Yatasto	<i>Rhizobium etli</i>	17/04/00
T62N3P	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	Yatasto	<i>Rhizobium etli</i>	17/04/00
T62N4P	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	Yatasto	<i>Rhizobium etli</i>	17/04/00
T62N5P	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	Yatasto	<i>Rhizobium etli</i>	17/04/00
T62N6P	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	Yatasto	<i>Rhizobium etli</i>	17/04/00
T62N7P	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	Yatasto	<i>Rhizobium etli</i>	17/04/00
T62N8P	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	Yatasto	<i>Rhizobium etli</i>	17/04/00
T62N9P	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	Yatasto	<i>Rhizobium etli</i>	17/04/00
T64N1P	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	San Luis, Salta	<i>Rhizobium etli</i>	17/04/00
T64N2P	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	San Luis, Salta	<i>Rhizobium etli</i>	17/04/00
T64N3P	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	San Luis, Salta	<i>Rhizobium etli</i>	17/04/00
T64N4P	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	San Luis, Salta	<i>Rhizobium etli</i>	17/04/00
T64N5P	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	San Luis, Salta	<i>Rhizobium etli</i>	17/04/00
T64N6P	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	San Luis, Salta	<i>Rhizobium etli</i>	17/04/00
T65N1P	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	San Luis, Salta (Acacias)	<i>Rhizobium etli</i>	17/04/00
T65N2P	-- <i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	San Luis, Salta (Acacias)		17/04/00
T65N3P	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	San Luis, Salta (Acacias)		17/04/00
T65N4P	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	San Luis, Salta (Acacias)	<i>Rhizobium etli</i>	17/04/00
T65N5P	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	San Luis, Salta (Acacias)		17/04/00
T65N6P	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	San Luis, Salta (Acacias)	<i>Rhizobium etli</i>	17/04/00
T66N1P	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	Río Blanco	<i>Rhizobium etli</i>	17/04/00
T66N2P	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	Río Blanco	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	17/04/00
T66N3P	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	Río Blanco	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	17/04/00
T66N4P	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	Río Blanco	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	17/04/00
T66N5P	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	Río Blanco	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	17/04/00
T66N6P	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Nag12	Río Blanco		17/04/00
T9N16P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Los Laureles	<i>Rhizobium etli</i>	1996
T9N1P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Los Laureles	<i>Rhizobium etli</i>	1996
T9N20P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Los Laureles	<i>Rhizobium etli</i>	1996
T9N2P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Los Laureles	<i>Rhizobium etli</i>	1996
T9N3P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Los Laureles	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	1996
T9N4P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Los Laureles	<i>Rhizobium etli</i>	1996

T9N5P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Los Laureles	<i>R. leguminosarum</i> <i>bv. phaseoli</i>	1996
T9N6P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Los Laureles	<i>Rhizobium etli</i>	1996
T9N9P	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Los Laureles	<i>Rhizobium etli</i>	1996

^a Se indica el número del sector, una región de la Quebrada del Toro se sectorizó para facilitar el reconocimiento de los lugares cercanos en los años sucesivos de muestreo.

Apéndice 3

Aislamientos del NOA de *Phaseolus augusti*

Población de aislamientos de *P. augusti*. La tabla muestra el sitio de origen, el genotipo de: 16S ADNr, *nodC*-RFLP, *nifH*-RFLP IGS-RFLP y perfiles de *fingerprints*.

Aislamiento	Origen	ARDRA	<i>nodC</i>	<i>nifH</i>	IGS	<i>Fingerprint</i>
1-NOAP6N1	Calilegua (96) ^a	2			11	1
2-NOAP7N1	Calilegua (96)	2		1	11	2
3-NOAP19N1	Yutumayo (96)	3	1	14	7	3
4-NOAP47N1	Peña Baya (96)	1	2		4	4
5-NOAP56N1	Quebrada del Toro(96)	4		3	12	5
6-NOAP57N3	Quebrada del Toro(96)	1				6
7-NOAP80N1	Quebrada del Toro(97)	1	9		5	7
8-NOAP97N1	Quebrada del Toro (98)	1	3	6	9	8
9-NOAP97N2	Quebrada del Toro (98)	1	2	13	4	9
10-NOAP97N3	Quebrada del Toro (98)	1	3	6		8
11-NOAP97N4	Quebrada del Toro (98)					8
12-NOAP97N5	Quebrada del Toro (98)					8
13-NOAP97N6	Quebrada del Toro (98)	1	3	6	1	10
14-NOAP97N7	Quebrada del Toro (98)	1	3		9	8
15-NOAP97N8	Quebrada del Toro (98)					8
16-NOAP97N9	Quebrada del Toro (98)					11
17-NOAP100N1	Quebrada del Toro (98)	1	11		8	12
18-NOAP100N2	Quebrada del Toro (98)					12
19-NOAP100N3	Quebrada del Toro (98)	1				12a
20-NOAP100N4	Quebrada del Toro (98)					12b
21-NOAP100N5	Quebrada del Toro (98)	3	8		8	12
22-NOAP102N1	Quebrada del Toro (98)	1	5	9	1	13
23-NOAP102N2	Quebrada del Toro (98)			9	1	13
24-NOAP102N3	Quebrada del Toro (98)	1			6	14
25-NOAP102N4	Quebrada del Toro (98)	1		10	6	14
26-NOAP104N1	Quebrada del Toro (98)					13a
27-NOAP104N2	Quebrada del Toro (98)	1				13a
28-NOAP104N3	Quebrada del Toro, (98)					13b
29-NOAP104N4	Quebrada del Toro, (98)	1	3	6	6	15
30-NOAP106N1	Quebrada del Toro, (98)					16
31-NOAP106N2	Quebrada del Toro, (98)		2	13	4	17
32-NOAP106N3	Quebrada del Toro, (98)	1	7	2	9	18
33-NOAP106N4	Quebrada del Toro, (98)	1	5	9	1	19
34-NOAP106N5	Quebrada del Toro, (98)					16
35-NOAP106N6	Quebrada del Toro, (98)					20
36-NOAP106N7	Quebrada del Toro, (98)					21
37-NOAP106N8	Quebrada del Toro, (98)					17
38-NOAP107N1	Quebrada del Toro, (98)	1				18
39-NOAP107N2	Quebrada del Toro, (98)					18

40-NOAP107N3	Quebrada del Toro, (98)	1		12	3	18a
41-NOAP107N4	Quebrada del Toro, (98)					18a
42-NOAP115N1	Quebrada del Toro, (98)					22
43-NOAP115N2	Quebrada del Toro, (98)					23
44-NOAP115N3	Quebrada del Toro, (98)					24?
45-NOAP116N1	Quebrada del Toro, (98)					20a
46-NOAP116N2	Quebrada del Toro, (98)					25
47-NOAP116N3	Quebrada del Toro, (98)	1	3	7	6	
48-NOAP119N1	Quebrada del Toro (98)					26
49-NOAP119N2	Quebrada del Toro (98)					26
50-NOAP119N3	Quebrada del Toro (98)					
51-NOAP142N1	Quebrada del Toro (99)	1	4	8		27
52-NOAP153N1	Quebrada del Toro (99)	1	2	13	16	28
53-NOAP154N1	Peña Baya (99)	2	6	1	10	29
54-NOAP154N2	Peña Baya (99)	2	6			29
55-NOAP154N3	Peña Baya (99)	2	6	1	10	29
56-NOAP154N4	Peña Baya (99)					29
57-NOAP154N5	Peña Baya (99)					29
58-NOAP154N6	Peña Baya (99)					29
59-NOAP154N7	Peña Baya (99)					29
60-NOAP154N8	Peña Baya (99)	2				29
61-NOAP154N9	Peña Baya (99)					29
62-NOAP154N10	Peña Baya (99)	2	6	1	10	29
63-NOAP154N11	Peña Baya (99)					29
64-NOAP154N12	Peña Baya (99)					29
65-NOAP155N1	Peña Baya (99)	2				29
66-NOAP155N2	Peña Baya (99)					29
67-NOAP155N3	Peña Baya (99)	2	6	1		29
68-NOAP155N4	Peña Baya (99)	2				29
69-NOAP155N5	Peña Baya (99)					29
70-NOAP155N6	Peña Baya (99)					29
71-NOAP156N1	Peña Baya (99)	1	3	13	16	30
72-NOAP166N1	Quebrada del Toro (99)	1		10	5	20b
73-NOAP166N2	Quebrada del Toro (99)					31
74-NOAP192N1	Cerrillos (99)					32
75-NOAP193N1	Cerrillos (99)	4				
76-NOAP193N2	Cerrillos (99)	4	10			33
77-T29N1Paug	Quebrada del Toro (97)	1	2	13	4	34
78-T29N2Paug	Quebrada del Toro (97)					35
79-T29N3Paug	Quebrada del Toro (97)	1	3	6	6	36
80-T29N4Paug	Quebrada del Toro (97)					34a
81-T29N5Paug	Quebrada del Toro (97)					37
82-T29N6Paug	Quebrada del Toro (97)		4	9'	7	38
83-T29N7Paug	Quebrada del Toro (97)	1			2	39
84-T46N1Paug	Los Pulares (99)	4		5	14	40
85-T46N2Paug	Los Pulares (99)	4		5	14	41
86-T48N1Paug	Chorro Blanco (99)	1	4		15	42
87-T48N2Paug	Chorro Blanco (99)					
88-T49N1Paug	Quebrada del Toro (99)	1		7		43
89-T49N2Paug	Quebrada del Toro (99)		3		3	43a

90-T49N3Paug	Quebrada del Toro (99)	1	3	7	3	43b
91-NOAP214N1	Quebrada del Toro(00)	1			9	44
92-NOAP214N2	Quebrada del Toro(00)	1			4	45
93-NOAP214N3	Quebrada del Toro(00)	1			4	46
94-NOAP214N4	Quebrada del Toro(00)	1	13		4	46
95-NOAP214N5	Quebrada del Toro(00)					46a
96-NOAP214N6	Quebrada del Toro(00)	1			3	46b
97-NOAP214N7	Quebrada del Toro(00)	1			4	
98-NOAP215N1	T60(00)	2	6	1	13	47
99-NOAP216N1	T60(00)	2	6	1	13	
100-NOAP216N2	T60(00)	2		1	13	
101-NOAP216N3	T60(00)		6	1	13	47a
102-NOAP216N4	T60(00)	2				49
103-NOAP216N5	T60(00)					
104-NOAP216N6	T60(00)	2				
105-NOAP216N7	T60(00)	2		1	13	
106-NOAP216N8	T60(00)					49a
107-NOAP216N9	T60(00)	2	6	1	13	47b
108-NOAP216N10	T60(00)	2				49
109-NOAP227N1	Quebrada del Toro(00)	1	12	11		50
110-NOAP227N2	Quebrada del Toro(00)	1			2	51
111-NOAP227N3	Quebrada del Toro(00)	1	7	4	6	52
112-NOAP227N4	Quebrada del Toro(00)					53
113-NOAP227N5	Quebrada del Toro(00)	1			4	54
114-NOAP229N1	Quebrada del Toro(00)	2		1		55

^a Año de aislamiento

Apéndice 4

Aislamientos del NOA de otras leguminosas silvestres

Población de aislamientos de diversas leguminosas silvestres. La tabla muestra el hospedador de origen, el sitio y la fecha de recolección y el genotipo de 16S ADNr.

Aislamiento	Leguminosa hospedante	Sitio de recolección	Alcorno de 16S ADNr *	Fecha
NOAP218N1	<i>Arachis duranesis</i>	San Luis, Salta	3	27/01/00
NOAP218N2	<i>Arachis duranesis</i>	San Luis, Salta	1	27/01/00
T46N1Man	<i>Arachis hypogea</i>	Los Pulares	1	05/03/99
T46N2Man	<i>Arachis hypogea</i>	Los Pulares	1	05/03/99
T49N1Man	<i>Arachis hypogea</i>	Quebrada del Toro	1	05/03/99
NOAP110N1	<i>Calopogonium</i> spp.	Quebrada del Toro	1	05/03/98
NOAP110N2	<i>Calopogonium</i> spp.	Quebrada del Toro	1	05/03/98
NOAP110N3	<i>Calopogonium</i> spp.	Quebrada del Toro	1	05/03/98
NOAP110N4	<i>Calopogonium</i> spp.	Quebrada del Toro	1	05/03/98
NOAP110N5	<i>Calopogonium</i> spp.	Quebrada del Toro	1	05/03/98
NOAP110N6	<i>Calopogonium</i> spp.	Quebrada del Toro	1	05/03/98
T29N1Ce	<i>Centrocrema</i> spp.	Quebrada del Toro	1	11/08/97
T29N2Ce	<i>Centrocrema</i> spp.	Quebrada del Toro	3	11/08/97
T29N3Ce	<i>Centrocrema</i> spp.	Quebrada del Toro	1	11/08/97
T29N4Ce	<i>Centrocrema</i> spp.	Quebrada del Toro	1	11/08/97
T29N5Ce	<i>Centrocrema</i> spp.	Quebrada del Toro		11/08/97
T29N5Ce	<i>Centrocrema</i> spp.	Quebrada del Toro	1	11/08/97
T29N6Ce	<i>Centrocrema</i> spp.	Quebrada del Toro	1	11/08/97
NOAP239N1	<i>Centrocrema</i> spp.	Rio Blanco	1	27/01/00
NOAP239N2	<i>Centrocrema</i> spp.	Rio Blanco	1	27/01/00
NOAP235N1	<i>Chamaecrista</i> spp.	Quebrada del Toro	3	27/01/00
NOAP235N2	<i>Chamaecrista</i> spp.	Quebrada del Toro	3	27/01/00
NOAP241N1	<i>Chamaecrista</i> spp.	Camino a San Lorenzo		27/01/00
NOAP174N1	<i>Crotalaria</i> spp.	Quebrada del Toro	3	10/03/99
NOAP174N2	<i>Crotalaria</i> spp.	Quebrada del Toro	3	10/03/99
NOAP180N1	<i>Crotalaria</i> spp.	Quebrada del Toro		10/03/99
NOAP180N2	<i>Crotalaria</i> spp.	Quebrada del Toro	3	10/03/99
NOAP38N1	<i>Crotalaria</i> spp.	Los Laureles	1	Feb-96
NOAP39N1	<i>Crotalaria</i> spp.	Los Laureles	1	Feb-96
NOAP39N2	<i>Crotalaria</i> spp.	Los Laureles	3	Feb-96
NOAP95N1	<i>Crotalaria</i> spp.	Quebrada del Toro	1	28/01/98
NOAP95N2	<i>Crotalaria</i> spp.	Quebrada del Toro		28/01/98
NOAP96N1	<i>Crotalaria</i> spp.	Quebrada del Toro	1	28/01/98
NOAP96N2	<i>Crotalaria</i> spp.	Quebrada del Toro		28/01/98
NOAP231N1	<i>Crotalaria anagyroides</i>	Quebrada del Toro	1	27/01/00
NOAP231N2	<i>Crotalaria anagyroides</i>	Quebrada del Toro		27/01/00
NOAP231N3	<i>Crotalaria anagyroides</i>	Quebrada del Toro	1	27/01/00
NOAP231N4	<i>Crotalaria anagyroides</i>	Quebrada del Toro	1	27/01/00
NOAP237N1	<i>Crotalaria anagyroides</i>	Rio Blanco	1	27/01/00
NOAP237N2	<i>Crotalaria anagyroides</i>	Rio Blanco	1	27/01/00
NOAP237N3	<i>Crotalaria anagyroides</i>	Rio Blanco	1	27/01/00
NOAP237N4	<i>Crotalaria anagyroides</i>	Rio Blanco		27/01/00

NOAP223N1	<i>Desconocido 1</i>	San Luis, Salta	3	27/01/00
NOAP223N2	<i>Desconocido 1</i>	San Luis, Salta		27/01/00
NOAP223N3	<i>Desconocido 1</i>	San Luis, Salta	1	27/01/00
NOAP223N4	<i>Desconocido 1</i>	San Luis, Salta	1	27/01/00
NOAP223N5	<i>Desconocido 1</i>	San Luis, Salta	1	27/01/00
NOAP224N1	<i>Desconocido 2</i>	San Luis, Salta		27/01/00
NOAP224N2	<i>Desconocido 2</i>	San Luis, Salta	3	27/01/00
NOAP224N3	<i>Desconocido 2</i>	San Luis, Salta	1	27/01/00
NOAP225N1	<i>Desconocido 3</i>	San Luis, Salta	3	27/01/00
NOAP225N2	<i>Desconocido 3</i>	San Luis, Salta	3	27/01/00
NOAP225N3	<i>Desconocido 3</i>	San Luis, Salta	3	27/01/00
NOAP225N4	<i>Desconocido 3</i>	San Luis, Salta	3	27/01/00
NOAP225N5	<i>Desconocido 3</i>	San Luis, Salta	3	27/01/00
NOAP225N6	<i>Desconocido 3</i>	San Luis, Salta	3	27/01/00
NOAP183N1	<i>Desmodium spp.</i>	Quebrada del Toro		03/10/99
NOAP112N1	<i>Desmodium canum</i>	Quebrada del Toro	1	05/03/98
NOAP112N2	<i>Desmodium canum</i>	Quebrada del Toro	1	05/03/98
NOAP112N3	<i>Desmodium canum</i>	Quebrada del Toro	1	05/03/98
NOAP112N4	<i>Desmodium canum</i>	Quebrada del Toro	1	05/03/98
NOAP112N5	<i>Desmodium canum</i>	Quebrada del Toro	1	05/03/98
NOAP112N6	<i>Desmodium canum</i>	Quebrada del Toro	1	05/03/98
NOAP113N1	<i>Desmodium canum</i>	Quebrada del Toro	1	05/03/98
NOAP113N2	<i>Desmodium canum</i>	Quebrada del Toro	1	05/03/98
NOAP113N3	<i>Desmodium canum</i>	Quebrada del Toro		05/03/98
NOAP221N1	<i>Desmodium canum</i>	San Luis, Salta	3	27/01/00
NOAP230N1	<i>Desmodium canum</i>	Quebrada del Toro		27/01/00
NOAP84N1	<i>Desmodium canum</i>	Quebrada del Toro	3	21/02/97
NOAP84N2	<i>Desmodium canum</i>	Quebrada del Toro	3	21/02/97
NOAP94N1	<i>Desmodium spp.</i>	Quebrada del Toro	1	02/02/98
NOAP94N2	<i>Desmodium spp.</i>	Quebrada del Toro	1	02/02/98
NOAP94N3	<i>Desmodium spp.</i>	Quebrada del Toro	1	02/02/98
NOAP94N4	<i>Desmodium spp.</i>	Quebrada del Toro	1	02/02/98
NOAP94N5	<i>Desmodium spp.</i>	Quebrada del Toro	1	02/02/98
NOAP94N6	<i>Desmodium spp.</i>	Quebrada del Toro	1	02/02/98
NOAP94N7	<i>Desmodium spp.</i>	Quebrada del Toro	1	02/02/98
NOAP94N8	<i>Desmodium spp.</i>	Quebrada del Toro	1	02/02/98
NOAP177N1	<i>Desmodium spp.</i>	Quebrada del Toro	4	10/03/99
NOAP177N2	<i>Desmodium spp.</i>	Quebrada del Toro	1	10/03/99
NOAP177N3	<i>Desmodium spp.</i>	Quebrada del Toro		10/03/99
NOAP177N4	<i>Desmodium spp.</i>	Quebrada del Toro	4	10/03/99
NOAP177N5	<i>Desmodium spp.</i>	Quebrada del Toro	1	10/03/99
NOAP177N6	<i>Desmodium spp.</i>	Quebrada del Toro	1	10/03/99
NOAP240N1	<i>Desmodium spp.</i>	Rio Blanco	1	27/01/00
NOAP111N1	<i>Desmodium uncinatum</i>	Quebrada del Toro	1	05/03/98
NOAP111N2	<i>Desmodium uncinatum</i>	Quebrada del Toro		05/03/98
NOAP111N3	<i>Desmodium uncinatum</i>	Quebrada del Toro	1	05/03/98
NOAP111N4	<i>Desmodium uncinatum</i>	Quebrada del Toro		05/03/98
NOAP111N5	<i>Desmodium uncinatum</i>	Quebrada del Toro	1	05/03/98
NOAP111N6	<i>Desmodium uncinatum</i>	Quebrada del Toro	1	05/03/98
NOAP111N7	<i>Desmodium uncinatum</i>	Quebrada del Toro	1	05/03/98
NOAP111N9	<i>Desmodium uncinatum</i>	Quebrada del Toro	1	05/03/98
NOAP228N1	<i>Desmodium uncinatum</i>	Quebrada del Toro	1	27/01/00
NOAP228N2	<i>Desmodium uncinatum</i>	Quebrada del Toro		27/01/00
NOAP228N3	<i>Desmodium uncinatum</i>	Quebrada del Toro		27/01/00

NOAP228N4	<i>Desmodium uncinatum</i>	Quebrada del Toro	1	27/01/00
NOAP228N5	<i>Desmodium uncinatum</i>	Quebrada del Toro	1	27/01/00
NOAP48N1	<i>Desmodium uncinatum</i>	Los Laureles	1	Feb-96
NOAP49N1	<i>Desmodium uncinatum</i>	Los Laureles	1	Feb-96
NOAP82N1	<i>Desmodium uncinatum</i>	Quebrada del Toro	1	21/02/97
NOAP83N1	<i>Desmodium uncinatum</i>	Quebrada del Toro	1	21/02/97
NOAP81N1	<i>Eriosema</i> spp.	Quebrada del Toro		21/02/97
NOAP226N1	<i>Eriosema edule</i>	San Luis, Salta	1	27/01/00
NOAP226N2	<i>Eriosema edule</i>	San Luis, Salta	1	27/01/00
NOAP226N3	<i>Eriosema edule</i>	San Luis, Salta	1	27/01/00
NOAP226N4	<i>Eriosema edule</i>	San Luis, Salta	1	27/01/00
NOAP226N5	<i>Eriosema edule</i>	San Luis, Salta		27/01/00
NOAP226N6	<i>Eriosema edule</i>	San Luis, Salta		27/01/00
NOAP226N7	<i>Eriosema edule</i>	San Luis, Salta	1	27/01/00
NOAP68N1	<i>Eriosema edule</i>	Cerrillos		18/4/96
NOAP69N3	<i>Eriosema edule</i>	Cerrillos	4	18/4/96
NOAP70N1	<i>Eriosema edule</i>	Cerrillos	4	18/4/96
NOAP85N1	<i>Erithrina falcata</i>	Quebrada del Toro	1	21/02/97
NOAP85N2	<i>Erithrina falcata</i>	Quebrada del Toro		21/02/97
NOAP85N3	<i>Erithrina falcata</i>	Quebrada del Toro	1	21/02/97
NOAP85N4	<i>Erithrina falcata</i>	Quebrada del Toro	1	21/02/97
NOAP109N1	<i>Erythrina</i> spp.	Quebrada del Toro	1	05/03/98
NOAP109N2	<i>Erythrina</i> spp.	Quebrada del Toro		05/03/98
NOAP175N1	<i>Macroptilium</i> spp.	Quebrada del Toro	3	10/03/99
NOAP175N3	<i>Macroptilium</i> spp.	Quebrada del Toro	3	10/03/99
NOAP175N4	<i>Macroptilium</i> spp.	Quebrada del Toro	3	10/03/99
T29N2M	<i>Macroptilium atropurpureus</i>	Quebrada del Toro	4	11/08/97
T29N3M	<i>Macroptilium atropurpureus</i>	Quebrada del Toro	1	11/08/97
NOAP173N1	<i>Macroptilium</i> spp.	Quebrada del Toro	1	10/03/99
NOAP173N2	<i>Macroptilium</i> spp.	Quebrada del Toro	1	10/03/99
NOAP173N3	<i>Macroptilium</i> spp.	Quebrada del Toro	3	10/03/99
NOAP173N4	<i>Macroptilium</i> spp.	Quebrada del Toro	1	10/03/99
NOAP173N5	<i>Macroptilium</i> spp.	Quebrada del Toro	1	10/03/99
NOAP232N1	<i>Macroptilium erythroloma</i>	Quebrada del Toro	1	27/01/00
NOAP232N2	<i>Macroptilium erythroloma</i>	Quebrada del Toro		27/01/00
NOAP232N3	<i>Macroptilium erythroloma</i>	Quebrada del Toro	1	27/01/00
NOAP222N1	<i>Macroptilium fraternum</i>	San Luis, Salta	3	27/01/00
NOAP222N2	<i>Macroptilium fraternum</i>	San Luis, Salta	1	27/01/00
NOAP222N3	<i>Macroptilium fraternum</i>	San Luis, Salta		27/01/00
NOAP222N4	<i>Macroptilium fraternum</i>	San Luis, Salta	3	27/01/00
NOAP222N5	<i>Macroptilium fraternum</i>	San Luis, Salta	3	27/01/00
NOAP222N6	<i>Macroptilium fraternum</i>	San Luis, Salta	3	27/01/00
NOAP222N7	<i>Macroptilium fraternum</i>	San Luis, Salta		27/01/00
NOAP244N1	<i>Macroptilium fraternum</i>	Camino a San Lorenzo		27/01/00
NOAP244N2	<i>Macroptilium fraternum</i>	Camino a San Lorenzo		27/01/00
Mpol1	<i>Medicago polimorfa</i>	Quebrada del Toro	S. meliloti	17/07/97
Mpol2	<i>Medicago polimorfa</i>	Quebrada del Toro	S. meliloti	17/07/97
NOAP159N1	<i>Mimosa</i> spp.	Chorro Blanco	R. tropici B	27/01/99
NOAP159N2	<i>Mimosa</i> spp.	Chorro Blanco	R. Tropicci B	27/01/99
NOAP159N3	<i>Mimosa</i> spp.	Chorro Blanco	S. fredii	27/01/99
NOAP160N1	<i>Mimosa</i> spp.	Chorro Blanco		27/01/99
NOAP160N2	<i>Mimosa</i> spp.	Chorro Blanco		27/01/99
NOAP160N3	<i>Mimosa</i> spp.	Chorro Blanco	R. Tropicci B	27/01/99
NOAP160N4	<i>Mimosa</i> spp.	Chorro Blanco	R. Tropicci B	27/01/99

NOAP160N5	<i>Mimosa</i> spp.	Chorro Blanco	R. Tropici B	27/01/99
NOAP209N1	<i>Mimosa</i> spp.	Camino a Rosario de Lerma, T56	R. Tropici B	25/1/00
NOAP217N1	<i>Mimosa</i> spp.	San Lorenzo	R. tropici B	25/1/00
NOAP217N2	<i>Mimosa</i> spp.	San Lorenzo	R. Tropici B	25/1/00
NOAP217N3	<i>Mimosa</i> spp.	San Lorenzo	R. tropici B	25/1/00
NOAP217N4	<i>Mimosa</i> spp.	San Lorenzo	R. Tropici B	25/1/00
NOAP217N5	<i>Mimosa</i> spp.	San Lorenzo		25/1/00
NOAP217N6	<i>Mimosa</i> spp.	San Lorenzo		25/1/00
NOAP98N1	<i>Neonotonia wightii</i>	Cerrillos, INTA	1	05/03/98
NOAP98N2	<i>Neonotonia wightii</i>	Cerrillos, INTA		05/03/98
NOAP98N3	<i>Neonotonia wightii</i>	Cerrillos, INTA	1	05/03/98
NOAP98N4	<i>Neonotonia wightii</i>	Cerrillos, INTA	1	05/03/98
NOAP98N5	<i>Neonotonia wightii</i>	Cerrillos, INTA		05/03/98
NOAP99N1	<i>Neonotonia wightii</i>	Cerrillos, INTA	1	05/03/98
NOAP99N2	<i>Neonotonia wightii</i>	Cerrillos, INTA	3	05/03/98
NOAP99N3	<i>Neonotonia wightii</i>	Cerrillos, INTA		05/03/98
NOAP243N1	<i>Stylosanthes</i> spp.	Camino a San Lorenzo	1	27/01/00
NOAP234N1	<i>Tipuana tipa</i>	Quebrada del Toro	1	27/01/00
Vb1	<i>Vicia benzodermis</i>	Quebrada del Toro	R. leg bv viciae	17/07/97
Vb10	<i>Vicia benzodermis</i>	Quebrada del Toro	R. leg bv viciae	17/07/97
Vb2	<i>Vicia benzodermis</i>	Quebrada del Toro	R. leg bv viciae	17/07/97
Vb3	<i>Vicia benzodermis</i>	Quebrada del Toro	R. leg bv viciae	17/07/97
Vb4	<i>Vicia benzodermis</i>	Quebrada del Toro	R. leg bv viciae	17/07/97
Vb5	<i>Vicia benzodermis</i>	Quebrada del Toro	R. leg bv viciae	17/07/97
Vb6	<i>Vicia benzodermis</i>	Quebrada del Toro	R. leg bv viciae	17/07/97
Vb7	<i>Vicia benzodermis</i>	Quebrada del Toro	R. leg bv viciae	17/07/97
Vb8	<i>Vicia benzodermis</i>	Quebrada del Toro	R. leg bv viciae	17/07/97
Vb9	<i>Vicia benzodermis</i>	Quebrada del Toro	R. leg bv viciae	17/07/97
NOAP86N1	<i>Vigna</i> spp.	Zanja del Tigre	4	03/05/97
NOAP86N2	<i>Vigna</i> spp.	Zanja del Tigre	4	03/05/97
NOAP86N3	<i>Vigna</i> spp.	Zanja del Tigre	4	03/05/97
NOAP86N4	<i>Vigna</i> spp.	Zanja del Tigre	4	03/05/97
NOAP87N1	<i>Vigna</i> spp.	Zanja del Tigre	4	03/05/97
NOAP87N2	<i>Vigna</i> spp.	Zanja del Tigre	3	03/05/97
NOAP87N3	<i>Vigna</i> spp.	Zanja del Tigre	4	03/05/97
NOAP87N4	<i>Vigna</i> spp.	Zanja del Tigre	4	03/05/97
NOAP88N1	<i>Vigna</i> spp.	Zanja del Tigre		03/05/97
NOAP88N2	<i>Vigna</i> spp.	Zanja del Tigre		03/05/97
NOAP88N3	<i>Vigna</i> spp.	Zanja del Tigre	4	03/05/97
NOAP88N4	<i>Vigna</i> spp.	Zanja del Tigre		03/05/97
T46N1V	<i>Vigna</i> spp.	Los Pulares	1	05/03/99
T48N2V	<i>Vigna</i> spp.	Chorro Blanco		04/03/99
T23N1V	<i>Vigna</i> spp.	Metán		24/04/97
T24N3V	<i>Vigna</i> spp.	Cerrillos		24/04/97
T29N3V	<i>Vigna</i> spp.	Quebrada del Toro	1	11/08/97
T48N1V	<i>Vigna</i> spp.	Chorro Blanco		05/03/99
T48N3V	<i>Vigna</i> spp.	Chorro Blanco	1	05/03/99
T49N1V	<i>Vigna</i> spp.	Quebrada del Toro	1	05/03/99
T49N2V	<i>Vigna</i> spp.	Quebrada del Toro	4	01/05/99
T24N1V	<i>Vigna</i> spp.	Cerrillos		24/04/97
T24N2V	<i>Vigna</i> spp.	Cerrillos	4	24/04/97
T29N1V	<i>Vigna</i> spp.	Quebrada del Toro	1	11/08/97
T29N2V	<i>Vigna</i> spp.	Quebrada del Toro	4	11/08/97
T29N4V	<i>Vigna</i> spp.	Quebrada del Toro	4	11/08/97

T29N5V	<i>Vigna</i> spp.	Quebrada del Toro	1	11/08/97
T29N6V	<i>Vigna</i> spp.	Quebrada del Toro	4	11/08/97
T29N7V	<i>Vigna</i> spp.	Quebrada del Toro	1	11/08/97
T58N1V	<i>Vigna</i> spp.	Quebrada del Toro		25/01/00
T58N2V	<i>Vigna</i> spp.	Quebrada del Toro		25/01/00
T58N3V	<i>Vigna</i> spp.	Quebrada del Toro	1	25/01/00
T58N4V	<i>Vigna</i> spp.	Quebrada del Toro	1	25/01/00
T58N5V	<i>Vigna</i> spp.	Quebrada del Toro	1	25/01/00
T58N6V	<i>Vigna</i> spp.	Quebrada del Toro	1	25/01/00
T58N7V	<i>Vigna</i> spp.	Quebrada del Toro	1	25/01/00
T58N8V	<i>Vigna</i> spp.	Quebrada del Toro		25/01/00
T58N9V	<i>Vigna</i> spp.	Quebrada del Toro		25/01/00
T60N2V	<i>Vigna</i> spp.	cerca de QT		25/01/00
T60N3V	<i>Vigna</i> spp.	cerca de QT	1	25/01/00

^a Los genotipos corresponden a Genotipo 1 (*B. japonicum*), Genotipo 2, Genotipo 3 y Genotipo 4 (*B. elkanii*).

Apéndice 5

Aislamientos del NOA de *Leucaena leucocephala*

Población de aislamientos de *Leucaena leucocephala*. La tabla muestra el genotipo de 16S ADN_r, el perfil de fingerprint, el sitio y la fecha de recolección.

Aislamiento	Alelo de 16S ADN _r	Perfil de <i>fingerprints</i>	Lugar de recolección	Año
CerN1L	<i>M. loti</i>	1	Cerrillos	1997
CerN2L		2	Cerrillos	1997
CerN3L		3	Cerrillos	1997
CerN4L	<i>S. fredii</i>	4	Cerrillos	1997
CerN5L		5	Cerrillos	1997
NOAP189N1	<i>S. teranga</i>	6	Cerrillos	1999
NOAP220N1 ^o	<i>S. saheli</i>	7	San Luis, Salta	2000
NOAP220N2 ^o	<i>S. fredii</i>	8	San Luis, Salta	2000
NOAP51N1 ^o	<i>S. fredii</i>	9	Quebrada del Toro	1996
ScN2L		10	Santa Clara	1997
ScN3L	<i>S. fredii</i>	10	Santa Clara	1997
ScN4L	<i>S. fredii</i>	11	Santa Clara	1997
ScN5L	<i>S. fredii</i>	12	Santa Clara	1997
ScN6L	<i>S. fredii</i>	13	Santa Clara	1997
ScN7L		13	Santa Clara	1997
ScN8L		14	Santa Clara	1997
ScN9L	<i>S. fredii</i>	14	Santa Clara	1997
T1N6L	<i>S. fredii</i>	15	Pichanal	1996
T1N7L	<i>S. fredii</i>	16	Pichanal	1996
T1N8L	<i>S. fredii</i>	17	Pichanal	1996
T20N10L	<i>S. fredii</i>	17a	Pichanal	1997
T20N11L	<i>S. fredii</i>	17b	Pichanal	1997
T20N1L	<i>S. fredii</i>	17c	Pichanal	1997
T20N2L	<i>S. fredii</i>	17b	Pichanal	1997
T20N3L	<i>S. fredii</i>	17a	Pichanal	1997
T20N4L	<i>S. fredii</i>	17b	Pichanal	1997
T20N5L	<i>S. fredii</i>	17b	Pichanal	1997
T20N6L	<i>S. fredii</i>	17d	Pichanal	1997
T20N7L	<i>S. fredii</i>	17d	Pichanal	1997
T20N8L	<i>S. fredii</i>	17c	Pichanal	1997
T20N9L	<i>S. fredii</i>	17c	Pichanal	1997
T23N1L	<i>M. loti</i>	18	Metán	1997
T23N2L		19	Metán	1997
T23N3L	<i>M. loti</i>	20	Metán	1997
T23N4L	<i>M. loti</i>	20	Metán	1997
T23N5L	<i>S. saheli</i>	21	Metán	1997
T23N6L	<i>M. loti</i>	22	Metán	1997
T23N7L	<i>S. teranga</i>	23	Metán	1997
T24N1L	<i>S. saheli</i>	24	Cerrillos	1997
T24N2L		25	Cerrillos	1997
T24N3L	<i>S. saheli</i>	24a	Cerrillos	1997
T24N4L	<i>S. teranga</i>	25	Cerrillos	1997

T24N5L	<i>S. saheli</i>	24a	Cerrillos	1997
T24N6L	<i>S. saheli</i>	24	Cerrillos	1997
T25N1L	<i>S. fredii</i>	17d	Pichanal	1997
T25N2L	<i>S. teranga</i>	26	Pichanal	1997
T27N1L	<i>S. fredii</i>	27	Santa Clara	1997
T27N2L	<i>S. fredii</i>	28	Santa Clara	1997
T27N3L	<i>S. fredii</i>	28	Santa Clara	1997
T27N4L	<i>S. fredii</i>	29	Santa Clara	1997
T27N5L	<i>S. fredii</i>	28	Santa Clara	1997
T27N6L	<i>S. fredii</i>	30	Santa Clara	1997
T29N10L	<i>R. tropici B</i>	31	Quebrada del Toro	1997
T29N1L	<i>R. tropici B</i>	32	Quebrada del Toro	1997
T29N2L	<i>R. tropici B</i>	32	Quebrada del Toro	1997
T29N3L	<i>R. tropici B</i>	32	Quebrada del Toro	1997
T29N4L	<i>R. tropici B</i>	32	Quebrada del Toro	1997
T29N5L		32	Quebrada del Toro	1997
T29N6L		32	Quebrada del Toro	1997
T29N7L		33	Quebrada del Toro	1997
T29N8L	<i>R. tropici B</i>	33	Quebrada del Toro	1997
T29N9L	<i>R. tropici B</i>	33	Quebrada del Toro	1997
T31N1L	<i>S. fredii</i>	34	Cerrillos	1998
T31N2L	<i>S. teranga</i>	35	Cerrillos	1998
T31N3L	<i>S. teranga</i>	36	Cerrillos	1998
T31N4L	<i>S. teranga</i>	36	Cerrillos	1998
T32N2L		37	Cerrillos	1998
T32N3L	<i>S. teranga</i>	35a	Cerrillos	1998
T37N1L	<i>S. fredii</i>	38	Santa Clara	1998
T39N1L	<i>S. saheli</i>	39	Cerrillos	1998
T39N2L		40	Cerrillos	1998
T39N3L	<i>R. leguminosarum</i>	41	Cerrillos	1998
T3N7L	<i>S. teranga</i>	42	Valle Grande	1996
T40N1L		43	Cerrillos	1998
T40N2L	<i>S. fredii</i>	34	Cerrillos	1998
T40N3L		44	Cerrillos	1998
T40N4L	<i>S. fredii</i>	34	Cerrillos	1998
T40N5L	<i>S. fredii</i>	45	Cerrillos	1998
T42N11L	<i>S. saheli</i>	46	Rosario de Lerma	1998
T42N1L		47	Rosario de Lerma	1998
T42N2L		48	Rosario de Lerma	1998
T42N3L	<i>S. fredii</i>	49	Rosario de Lerma	1998
T42N4L		50	Rosario de Lerma	1998
T42N5L	<i>S. fredii</i>	34a	Rosario de Lerma	1998
T42N6L	<i>S. fredii</i>	51	Rosario de Lerma	1998
T42N7L		52	Rosario de Lerma	1998
T42N8L	<i>S. fredii</i>	53	Rosario de Lerma	1998
T42N9L		53	Rosario de Lerma	1998
T46N1L	<i>S. fredii</i>	54	Los Pulares	1999
T48N1L		55	Chorro Blanco	1999
T48N2L	<i>R. tropici B</i>	56	Chorro Blanco	1999
T48N3L	<i>R. tropici B</i>	56a	Chorro Blanco	1999
T50N1L	<i>R. leguminosarum</i>	57	Peña Baya	1999
T50N2L	<i>R. leguminosarum</i>	58	Peña Baya	1999
T50N3L	<i>R. leguminosarum</i>	59	Peña Baya	1999
T51N1L		60	Cerrillos, INTA	1999

T51N2L		61	Cerrillos, INTA	1999
T51N3L	<i>S. teranga</i>	62	Cerrillos, INTA	1999
T51N4L	<i>S. teranga</i>	63	Cerrillos, INTA	1999
T51N5L		61	Cerrillos, INTA	1999
T51N6L		61	Cerrillos, INTA	1999
T52N1L	<i>R. tropici B</i>	64	Metán	1999
T52N2L	<i>S. teranga</i>	65	Metán	1999
T52N3L	<i>S. teranga</i>	66	Metán	1999
T52N4L	<i>S. fredii</i>	67	Metán	1999
T52N5L		66a	Metán	1999
T52N6L		68	Metán	1999
T52N7L	<i>S. fredii</i>	67	Metán	1999
T52N8L	<i>S. fredii</i>	69	Metán	1999
T53N1L	<i>S. fredii</i>	70	Embarcación	1999
T53N2L	<i>S. saheli</i>	71	Embarcación	1999
T53N3L	<i>S. fredii</i>	70a	Embarcación	1999
T53N4L	<i>S. saheli</i>	71	Embarcación	1999
T54N1L	<i>S. fredii</i>	72	Pichanal	1999
T54N2L	<i>S. teranga</i>	73	Pichanal	1999
T54N3L		74	Pichanal	1999
T54N4L	<i>S. fredii</i>	75	Pichanal	1999
T54N5L	<i>S. fredii</i>	75	Pichanal	1999
T54N6L		75a	Pichanal	1999
T55N1L	<i>S. fredii</i>	76	Pichanal	1999
T55N2L	<i>S. fredii</i>	76a	Pichanal	1999
T55N3L	<i>S. fredii</i>	77	Pichanal	1999
T55N4L		78	Pichanal	1999
T55N5L		79	Pichanal	1999
T55N6L		78	Pichanal	1999
T55N7L		80	Pichanal	1999
T55N8L	<i>S. teranga</i>	81	Pichanal	1999
T56N1L	<i>R. tropici B</i>	82	Camino a Rosario de Lerma	2000
T56N2L	<i>R. tropici B</i>	82	Camino a Rosario de Lerma	2000
T61N1L	<i>R. leguminosarum</i>	83	Castellanos	2000
T62N1L	<i>M. huakuii</i>	84	Metán	2000
T64N1L	<i>S. saheli</i>	85	San Luis, Salta	2000
T64N2L		86	San Luis, Salta	2000
T64N3L	<i>S. teranga</i>	87	San Luis, Salta	2000
T64N4L	<i>S. teranga</i>	88	San Luis, Salta	2000
T64N5L		89	San Luis, Salta	2000
T64N6L		90	San Luis, Salta	2000
T64N7L	<i>S. fredii</i>	91	San Luis, Salta	2000
T64N8L		91	San Luis, Salta	2000
T64N9L		92	San Luis, Salta	2000
T65N10L	<i>S. fredii</i>	93	San Luis, Salta	2000
T65N11L	<i>S. fredii</i>	94	San Luis, Salta	2000
T65N12L	<i>S. fredii</i>	93	San Luis, Salta	2000
T65N13L	<i>S. fredii</i>	93	San Luis, Salta	2000
T65N14L	<i>S. fredii</i>	95	San Luis, Salta	2000
T65N1L	<i>S. fredii</i>	96	San Luis, Salta	2000
T65N2L		97	San Luis, Salta	2000
T65N3L	<i>S. saheli</i>	98	San Luis, Salta	2000
T65N4L	<i>S. fredii</i>	99	San Luis, Salta	2000

T65N5L	<i>S. teranga</i>	100	San Luis, Salta	2000
T65N6L	<i>S. fredii</i>	101	San Luis, Salta	2000
T65N7L	<i>S. fredii</i>	93	San Luis, Salta	2000
T65N8L	<i>S. fredii</i>	95	San Luis, Salta	2000
T65N9L	<i>S. fredii</i>	94	San Luis, Salta	2000

^a Aislamientos de *Acacia aroma*.

Apéndice 6

Alineamiento de secuencias de 16S ADNr de bandas secuenciadas de DTGGE.

	1						66
<i>Bacillus</i> sp	~~ T	ACATGCAAGT	CGAGCGGACC	AAAGGGAGCT	TGCTCCTA.G	AGGTTAGCGG	CGAACGGGTG
<i>Bacillus megaterium</i>	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	GAAGCT	TGCTTCTATG	ACGTTAGCGG
<i>B. japonicum</i> (AF321213)	AGGCTT	AACACATGCA	AGTCGAGCGG	GTGT.....AGCAAT	ACATCAGCGG	CAGACGGGTG
<i>B. japonicum</i> (USDA110)	AGGCTT	AACACATGCA	AGTCGAGCGG	GCGT.....AGCAAT	ACGTCAGCGG	CAGACGGGTG
<i>B. elkanii</i> (USDA76)	AGGCTT	AACACATGCA	AGTCGATCGG	GCAT.....AGCAAT	ATGTCAGCGG	CAGACGGGTG
T50b1	ACGCC	CACACACACG	NCNCGCGCGC	GN.C.....CCTCG.	NNNGNAGTGG	CACACGGGTG
T69b2	ACGCC	CACACACACG	NCNCGCGCGC	GN.C.....CCTCG.	NNNGNAGTGG	CACACGGGTG
T69b1	ACGCC	CACACACACA	AGTCGCNCGN	GN.C.....CCTCG.	NNNNNAGTGG	CACACGGGTG
T69b3	ANNCT	NACACACACA	AGTCGCACGN	GN.C.....CCTCG.	NNNNNAGTGG	CACACGGGTG
<i>Porphyrobacter</i> (AB033325)	ATGCC	AACACATGCA	AGTCGAACGA	GA.C.....CTTCG.	GGTCTAGTGG	CGCACGGGTG
<i>P. tepidarius</i> (AB033328)	ATGCC	AACACATGCA	AGTCGAACGA	GA.C.....CTTCG.	GGTCTAGTGG	CGCACGGGTG
<i>Erythrobacter</i> sp (AJ39126)	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>Uncultured copper</i> (AF337830)	ATGCC	AACACATGCA	AGTCGAACGA	GA.C.....CTTCG.	GGTCTAGTGG	CGCACGGGTG
<i>S. adhaesiva</i> (D12722)	ATGCC	AACACATGCA	AGTCGAACGA	GA.T.....CTTCG.	GATCTAGTGG	CCCACGGGTG
<i>Afipia</i> sp (AGU87784)	ATGCC	AACACATGCA	AGTCGAACGA	AG.T.....CTTCG.	GACTTAGTGG	CGCACGGGTG
<i>Methylosinus</i> (AF150786)	AGGCTT	AACACATGCA	AGTCGAACGC	TG.T.....AGCAA.	TACAGAGTGG	CAGACGGGTG
<i>P. manganicum</i> (X97691)	AGGCTT	AACACATGCA	AGTCGAACGC	TC.C.....AGCAA.	TGGAGAGTGG	CAGACGGGTG
<i>K. adipata</i> (AY39817)	AGGCTT	AACACATGCA	AGTCGAACGC	TT.C.....CTTCG.	GGGACAGTGG	CAGACGGGTG
<i>Ochrobactrum</i> sp (D63836)	AGGCTT	AACACATGCA	AGTCGAGCGC	...C.....CCGCA.	A.GGGAGCGG	CAGACGGGTG
<i>Brucella</i> (U71005)	AGGCTT	AACACATGCA	AGTCGAGCGC	...C.....CCGCA.	AGGGGAGCGG	CAGACGGGTG
<i>R. galegae</i>	AGGCTT	AACACATGCA	AGTCGAGCGC	...C.....TCGCA.	AGAGGAGCGG	CAGACGGGTG
<i>R. giadinii</i>	AGGCTT	AACACATGCA	AGTCGAGCGC	...C.....CCGCA.	AGGGGAGCGG	CAGACGGGTG
<i>S. saheli</i>	AGGCTT	AACACATGCA	AGTCGAGCGC	...G.....TGGCA.	ATACGAGCGG	CAGACGGGTG
<i>S. terangae</i>	AGGCTT	AACACATGCA	AGTCGAGCGC	...G.....TAGCA.	ATACGAGCGG	CAGACGGGTG
<i>A. rhizogenes</i> (D12788)	AGGCTT	AACACATGCA	AGTCGAGCGC	...C.....CCGCA.	AGGGGAGCGG	CAGACGGGTG
<i>M. ciceri</i>	AGGCTT	AACACATGCA	AGTCGAGCGC	...C.....CCGCA.	AGGGGAGCGG	CAGACGGGTG
<i>S. arboris</i>	AGGCTT	AACACATGCA	AGTCGAGCGC	...C.....CCGCA.	AGGGGAGCGG	CAGACGGGTG
<i>S. fredii</i>	AGGCTT	AACACATGCA	AGTCGAGCGC	...C.....CCGCA.	AGNNNAGCGG	CAGACGGGTG
<i>S. xianjiangense</i>	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>R. etli</i>	AGGCTT	AACACATGCA	AGTCGAGCGC	...C.....CCGCA.	AGGGGAGCGG	CAGACGGGTG
<i>R. tropici</i>	AGGCTT	AACACATGCA	AGTCGAGCGC	...C.....CCGCA.	AGGGGAGCGG	CAGACGGGTG
<i>X. agilis</i> (X94198)	AGGCTT	AACACATGCA	AGTCGAGCGC	...C.....CAGCA.	ATGGGAGCGG	CAGACGGGTG
<i>M. loti</i>	AGGCTT	AACACATGCA	AGTCGAGCGC	...C.....TCGCA.	A...GAGCGG	CAGACGGGTG
<i>Bartonella</i> sp (AJ002139)	AGGCTT	AACACATGCA	AGTCGAGCGC	ACTC.....TTTTA.	GGGTGAGCGG	CAAACGGGTG
<i>A. baumannii</i> (AJ247198)	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>P. fluorescens</i> (AF228367)	AGGCTT	AACACATGCA	AGTCGAGCGG	TAGAGAGAAG	CTTGCTTCTC	TTGAGAGCGG	CGGACGGGTG
<i>N. nitrosa</i> (AF272425)	ATGCTT	TACACATGCA	AGTCGAACGG	NAGCACGGGG	GCAACCCTGG	TGGCAGTGG	CGAACGGGTG
<i>C. herbivovans</i> (L134418)	CGAACG	AAGCACTTGA	TTCTGATTCC	TTCTGGATGA	AGAATCTTGT	GACTGAGTGG	CGGACGGGTG

	67						136
<i>Bacillus</i> sp	AGTAACGCGT	GGGAACCTGCCTGGAAGAC	TGGCATAACA	TCGAGAAATC	GGTGCTAATA	CCGGATAATA	
<i>Bacillus megaterium</i>	AGTAACGCGT	GGGAACCTGCCTGTAAGAC	TGGGATAACT	TCGGGAAACC	GAAGCTAATA	CCGGATAGGA	
<i>B. japonicum</i> (AF321213)	AGTAACGCGT	GGGAACGTACCTTTTGGTT.	CGGAACAACA	CAGGGAAACT	TGTGCTAATA	CCGGATAAGC	
<i>B. japonicum</i> (USDA110)	AGTAACGCGT	GGGAACGTACCTTTTGGTT.	CGGAACAACA	CAGGGAAACT	TGTGCTAATA	CCGGATAAGC	
<i>B. elkanii</i> (USDA76)	AGTAACGCGT	GGGAACGTACCTTTTGGTT.	CGGAACAACA	GAGGGAAACT	TCAGCTAATA	CCGGATAAGC	
T50b1	AGTAACGCGT	GGGAANCTNCCCNNGGTT.	CGGAACAACA	CAGGGAAACT	TGAGCTAATA	CCGGATANGN	
T69b2	AGTAACGCGT	GGGAANCTNCCCNNGGTT.	CGGAACAACA	CAGGGAAACT	TGAGCTAATA	CCGGATANGN	
T69b1	NGTAACGCGT	GGGAATCTNCCNTAGGTT.	CGGAANAACA	CAGGGAAACT	TGAGCTAATA	CCGNATNANN	
T69b3	NGTAACGCGT	GGGAATCTNCCNTAGGTT.	CGGAANAACA	CAGGGAAACT	TGAGCTAATA	CCGNATNANN	
<i>Porphyrobacter</i> (AB033325)	CGTAACGCGT	GGGAACCTGCCCTTAGGTT.	CGGAATAACT	CAGAGAAATT	TGAGCTAATA	CCGGATAATG	
<i>P. tepidarius</i> (AB033328)	CGTAACGCGT	GGGAACCTGCCCTTAGGTT.	CGGAATAACT	CAGAGAAATT	TGAGCTAATA	CCGGATAATG	
<i>Erythrobacter</i> sp (AJ39126)	CGTAACGCGT	GGGAACCTGCCCTTAGGTT.	CGGAATAACT	CAGAGAAATT	TGAGCTAATA	CCGGATAATG	
<i>Uncultured copper</i> (AF337830)	CGTAACGCGT	GGGAATCTGCCCTTAGGTT.	CGGAATAACT	CAGGGAAACT	TGAGCTAATA	CCGGATAATG	
<i>S. adhaesiva</i> (D12722)	CGTAACGCGT	GGGAATCTGCCCTTAGGTT.	CGGAATAACT	CAGAGAAATT	TGTGCTAATA	CCGTATAATG	
<i>Afipia</i> sp (AGU87784)	CGTAACGCGT	GGGAATCTGCCCTTAGGTT.	CGGAATAACT	CATGGAAACG	TGTGCTAATA	CCGTATGATG	
<i>Methylosinus</i> (AF150786)	AGTAACGCGT	GGGAACGTACCCTTTCGGTT.	CGGAATAACT	CAGGGAAACT	TGAGCTAATA	CCGGATACGC	
<i>P. manganicum</i> (X97691)	AGTAACGCGT	GGGAACCTTCCCTATGGTT.	CGGAATAGCT	CAGGGAAACC	TGGGGTAATA	CCGGATAAGC	
<i>K. adipata</i> (AY39817)	AGTAACGCGT	GGGAATCTACCTTTGTGGTA.	CGGAACAACC	AAGGGAAACT	TTGGCTAATA	CCGTATGAGC	
<i>Ochrobactrum</i> sp (D63836)	AGTAACGCGT	GGGAATCTACCTTTTGCTA.	CGGAATAACT	CAGGGAAACT	TGTGCTAATA	CCGTATGTGC	
<i>Brucella</i> (U71005)	AGTAACGCGT	GGGAATCTACCTTTTGCTA.	CGNAATAACT	CAGGGAAACT	TGTGCTAATA	CCGTATGTGC	
<i>R. galegae</i>	AGTAACGCGT	GGGAATCTACCCATCCTA.	CGGAACAACA	CAGGGAAACT	GGAGCTAATA	CCGTATACGC	
<i>R. giadinii</i>	AGTAACGCGT	GGGAATCTACCCATCCTA.	CGGAATAACT	CAGGGAAACT	TGTGCTAATA	CCGTATACGC	
<i>S. saheli</i>	AGTAACGCGT	GGGAATCTACCCTTTTCTA.	CGGAATAACG	CAGGGAAACT	TGTGCTAATA	CCGTATGAGC	
<i>S. terangae</i>	AGTAACGCGT	GGGAATCTACCCTTTTCTA.	CGGAATAACG	CAGGGAAACT	TGTGCTAATA	CCGTATACGC	
<i>A. rhizogenes</i> (D12788)	AGTAACGCGT	GGGAATCTACCCTTTTCTA.	CGGAATAACG	CAGGGAAACT	TGTGCTAATA	CCGTATGTGT	
<i>M. ciceri</i>	AGTAACGCGT	GGGAATCTACCCTTTTCTA.	CGGAATAACG	CAGGGAAACT	TGTGCTAATA	CCGTATGTGT	
<i>S. arboris</i>	AGTAACGCGT	GGGAATCTACCCTTTTCTA.	CGGAATAACG	CAGGGAAACT	TGTGCTAATA	CCGTATAAGC	
<i>S. fredii</i>	AGTAACGCGT	GGGAATCTACCCTTTTCTA.	CGGAATAACG	CAGGGAAACT	TGTGCTAATA	CCGTATGAGC	
<i>S. xianjiangense</i>	AGTAACGCGT	GGGAATCTACCCTTTTCTA.	CGGAATAACG	CAGGGAAACT	TGTGCTAATA	CCGTATGAAC	
<i>R. etli</i>	AGTAACGCGT	GGGAACGTACCCTTTACTA.	CGGAATAACG	CAGGGAAACT	TGTGCTAATA	CCGTATGTGC	
<i>R. tropici</i>	AGTAACGCGT	GGGAATCTACCTTTTGCTAT	CGGAATAACG	CAGGGAAACT	TGTGCTAATA	CCGTATGTGT	
<i>X. agilis</i> (X94198)	AGTAACGCGT	GGGGATCTACCCATTGGTA.	CGGAATAACC	CAGGGAAACT	TGGACTAATA	CCGTATAAGC	
<i>M. loti</i>	AGTAACGCGT	GGGAATCTACCCATCCTA.	CGGAACAACA	CAGGGAAACT	GGAGCTAATA	CCGTATACGT	
<i>Bartonella</i> sp (AJ002139)	AGTAACGCGT	GGGAATCTACCCCTCCTA.	CGGAATAACA	CAGAGAAATT	TGTGCTAATA	CCGTATACGT	
<i>A. baumannii</i> (AJ247198)	AGTAATGCTT	AGGAATCTGCCTATTAGT.G	GGGGACAACA	TCTCGAAAGG	GATGCTAATA	CCGCATACGT	

P. fluorecens (AF228367) AGTAATGCCT AGGAATCTGCCTGGTAGT.G GGGGATAACG TTCGGAAACG GACGCTAATA CCGCATAACGT
N. nitrosa (AF272425) AGTAATACAT CGGAACGTGTCTTAAAGC.G GGGGATAACG CATCGAAAGA TGTGCTAATA CCGCATAATC
C. herbivovans (L134418) AGTAACGCGT GGGTAACCTGCCTCATACAG GGGGATAACA GCTGGAAACG GCTGCTAATA CCGCATAACC

137

Bacillus sp AAAAGAACTG CATGGTCTT TTTTGAAGA TGGTTTCGGC TATCACTTAA AGATGGGCC CCGGCCATT
Bacillus megaterium TCTTCTCCTT CATGGGAGAT GATTGAAAGA TGGTTTCGGC TATCACTTAC AGATGGGCC CCGGTCGATT
B. japonicum (AF321213) CCTTACGGG. GAA..... AGAT T..... TATCGCCGAA AGATCGGCC CCGTCTGATT
B. japonicum (USDA110) CCTTACGGG. GAA..... AGAT T..... TATCGCCGAA AGATCGGCC CCGTCTGATT
B. elkanii (USDA76) CCTTACGGG. GAA..... AGAT T..... TATCGCCGAA AGATCGGCC CCGTCTGATT
T50b1 CCNTCNGGN. CAA..... AGAT T..... TATCGCCAT NGATNGGCC CCGTNGGATT
T69b2 CCNTCNGGN. CAA..... AGAT T..... TATCGCCAT NGATNGGCC CCGTNGGATT
T69b1 CCTTCGGGN. CAA..... AGAT T..... TATCGCCNAN GGATGAGCC CCGTNGGATT
T69b3 CCTTCGGGN. CAA..... AGAT T..... TATCGCCNAN GGATGAGCC CCGTNGGATT
Porphyrobacter (AB033325) TCTTCGGAC. CAA..... AGAT T..... TATCGCCTT GGATGGGCC CCGTTGGATT
P. tepidarius (AB033328) TCTTCGGAC. CAA..... AGAT T..... TATCGCCTT GGATGGGCC CCGTTGGATT
Erythrobacter sp (AJ39126) TCTTCGGAC. CAA..... AGAT T..... TATCGCCTT GGATGGGCC CCGTAGGATT
Uncultured copper (AF337830) ACTTCGGTC. CAA..... AGAT T..... TATCGCCTAG GGATGAGCC CCGTCCGATT
S. adhaesiva (D12722) TCTTCGGAC. CAA..... AGAT T..... TATCGCCAA GGATGAGCC CCGTAGGATT
Afipia sp (AGU87784) TCTTCGGAC. CAA..... AGAT T..... TATCGCCTAG GGATGAGCC CCGTTGGATT
Methylosinus (AF150786) CCTTCGGGG. GAA..... AGAT T..... TATTGCCGAA GGATCGGCC CCGTCCGATT
P. manganicum (X97691) CCTTCGGGG. GAA..... AGAT T..... TATCGCCAT GGATGGGCC CCGTAGGATT
K. adipata (AY39817) CCTTCGGGG. GAA..... AGAT T..... TATCGCCATA AGATGAGCC CCGTAGGATT
Ochrobactrum sp (D63836) CCTTCGGGG. GAA..... AGAT T..... TATCGGCAA GGATGAGCC CCGTTGGATT
Brucella (U71005) CCTTCGGGG. GAA..... AGAT T..... TATCGGCAA GGATGAGCC CCGTTGGATT
R. galegae CCTTCGGGG. GAA..... AGAT T..... TATCGGGAT GGATGAGCC CCGTTGGATT
R. giadinii CCTTCGGGG. GAA..... AGAT T..... TATCGGAGAT GGATGAGCC CCGTTGGATT
S. sahelii CCTTCGGGG. GAA..... AGAT T..... TATCGGGAAA GGATGAGCC CCGTTGGATT
S. terangae CCTTTTGGG. GAA..... AGAT T..... TATCGGAGAA GGATGAGCC CCGTTGGATT
A. rhizogenes (D12788) CCTTCGGGA. GAA..... AGAT T..... TATCGGGAAA GGATGAGCC CCGTTGGATT
M. ciceri CCTTCGGGA. GAA..... AGAT T..... TATCGGGAAA GGATGAGCC CCGTTGGATT
S. arboris CCTTCGGGG. GAA..... AGAT T..... TATCGGGAAA GGATGAGCC CCGTTGGATT
S. fredii CCTTCGGGG. GAA..... AGAT T..... TATCGGGAAA GGATGAGCC CCGTTGGATT
S. xianjiangense CCTTCGGGG. GAA..... AGAT T..... TATCGGGAAA GGATGAGCC CCGTTGGATT
R. etli CCTTTGGGG. GAA..... AGAT T..... TATCGGTAAA GGATCGGCC CCGTTGGATT
R. tropici CCTTCGGGA. GAA..... AGAT T..... TATCGGCAAG AGATGAGCC CCGTTGGATT
X. agilis (X94198) CCTTCGGGG. GAA..... AGAT T..... TATCGCCAAT GGATGAACC CCGTCCGATT
M. loti .CTTCGGGA. GAA..... AGAT T..... TATCGGAGAT GGATGAGCC CCGTTGGATT
Bartonella sp (AJ002139) CCTACGGGGA GAA..... AGAT T..... TATCGGAGAT GGATGAGCC CCGTTGGATT
A. baumannii (AJ247198) CCTACGGGAG AAAGCAGGG ATCTTCGGAC C..... TTGCGCTAAT AGATGAGCC AAGTCCGATT
P. fluorecens (AF228367) CCTACGGGAG AAAGCAGGG ACCTTCGGGC C..... TTGCGCTATC AGATGAGCC AGGTCGGATT
N. nitrosa (AF272425) TCTANGGAG AAAGCAGGG ATCGNAAGAC C..... TTGCGCTTTT AGAGCGGCC ATGCCTGATT
C. herbivovans (L134418) CGATAGGCC CATGGCCTGG ACGGAAAAGA T..... TATCGGTATG AGATGGAYCC CCGTCTGATT

206

207

Bacillus sp AGCTAGTTGG TGAGGTAACG GCTCACCAAG GCGACGATGC GTA.CCGACC TGAGAGGGTG ATCCGCCACA
Bacillus megaterium AGCTAGTTGG TGAGGTAACG GCTCACCAAG GCAACGATGC ATAGCCGACC TGAGAGGGTG ATCCGCCACA
B. japonicum (AF321213) AGCTAGTTGG TGAGGTAACG GCTCACCAAG GCGACGATCA GTAGCTGGTC TGAGAGGATG ATCAGCCACA
B. japonicum (USDA110) AGCTAGTTGG TGAGGTAACG GCTCACCAAG GCGACGATCA GTAGCTGGTC TGAGAGGATG ATCAGCCACA
B. elkanii (USDA76) AGCTAGTTGG TGAGGTAATG GCTCACCAAG GCGACGATCA GTAGCTGGTC TGAGAGGATG ATCAGCCACA
T50b1 AACTAGTTGG TGNGGTAACG GCTCACCAAG GCGACGATCC GTAGCTGNTC TGAGAGGATG ATCAGCCACA
T69b2 AACTAGTTGG TGNGGTAACG GCTCACCAAG GCGACGATCC GTAGCTGNTC TGAGAGGATG ATCAGCCACA
T69b1 AGCTAGTTGG TGNGGTAAG GCTCACCAAG GCGACGATCC NTAGCTGGTC TGAGAGGATG ATCAGCCACA
T69b3 AGCTAGTTGG TGNGGTAAG GCTCACCAAG GCGACGATCC NTAGCTGGTC TGAGAGGATG ATCAGCCACA
Porphyrobacter (AB033325) AGCTAGTTGG TGGGGTAAG GCCTACCAAG GCGACGATCC ATAGCTGGTC TGAGAGGATG ATCAGCCACA
P. tepidarius (AB033328) AGCTAGTTGG TGGGGTAAG GCCTACCAAG GCGAAGATCC ATAGCTGGTC TGAGAGGATG ATCAGCCACA
Erythrobacter sp (AJ39126) AGGTAGTTGG TGGGGTAAG GCCTACCAAG CCGACGATCC TTAGCTGGTC TGAGAGGATG ATCAGCCACA
Uncultured copper (AF337830) AGCTAGTTGG TGAGGTAAGA GCTCACCAAG GCGACGATCC GTAGCTGGTC TGAGAGGATG ATCAGCCACA
S. adhaesiva (D12722) AGCTAGTTGG TGAGGTAAGA GCTCACCAAG GCGACGATCC TTAGCTGGTC TGAGAGGATG ATCAGCCACA
Afipia sp (AGU87784) AGCTAGTTGG TGAGGTAAG GCTCACCAAG GCGACGATCC ATAGCTGGTC TGAGAGGATG ATCAGCCACA
Methylosinus (AF150786) AGCTAGTTGG TGAGGTAACG GCTCACCAAG GCGACGATCC GTAGCTGGTC TGAGAGGATG ATCAGCCACA
P. manganicum (X97691) AGCTAGTTGG TGAGGTAACG GCTCACCAAG GCGACGATCC TTAGCTGGTC TGAGAGGATG ATCAGCCACA
K. adipata (AY39817) AGCTAGTTGG TGAGGTAAG GCTCACCAAG GCGACGATCC TTAGCTGGTC TGAGAGGATG ACCAGCCACA
Ochrobactrum sp (D63836) AGCTAGTTGG TGGGGTAAG GCCCACCAG GCGACGATCC ATAGCTGGTC TGAGAGGATG ATCAGCCACA
Brucella (U71005) AGCTAGTTGG TGGGGTAAG GCCCACCAG GCGACGATCC ATAGCTGGTC TGAGAGGATG ATCAGCCACA
R. galegae AGCTAGTTGG TGGGGTAAG GCCTACCAAG GCGACGATCC ATAGCTGGTC TGAGAGGATG ATCAGCCACA
R. giadinii AGCTAGTTGG TGGGGTAAG GCCTACCAAG GCGACGATCC ATAGCTGGTC TGAGAGGATG ATCAGCCACA
S. sahelii AGCTAGTTGG TGGGGTAAG GCCTACCAAG GCGACGATCC ATAGCTGGTC TGAGAGGATG ATCAGCCACA
S. terangae AGCTAGTTGG TGGGGTAAG GCCTACCAAG GCGACGATCC ATAGCTGGTC TGAGAGGATG ATCAGCCACA
A. rhizogenes (D12788) AGCTAGTTGG TGGGGTAAG GCCTACCAAG GCGACGATCC ATAGCTGGTC TGAGAGGATG ATCAGCCACA
M. ciceri AGCTAGTTGG TGGGGTAAG GCCTACCAAG GCGACGATCC ATAGCTGGTC TGAGAGGATG ATCAGCCACA
S. arboris AGCTAGTTGG TGGGGTAAG GCCTACCAAG GCGACGATCC ATAGCTGGTC TGAGAGGATG ATCAGCCACA
S. fredii AGCTAGTTGG TGGGGTAAG GCCTACCAAG GCGACGATCC ATAGCTGGTC TGAGAGGATG ATCAGCCACA
S. xianjiangense AGCTAGTTGG TGGGGTAAG GCCTACCAAG GCGACGATCC ATAGCTGGTC TGAGAGGATG ATCAGCCACA
R. etli AGCTAGTTGG TGGGGTAAG GCCTACCAAG GCGACGATCC ATAGCTGGTC TGAGAGGATG ATCAGCCACA
R. tropici AGCTAGTTGG TGGGGTAAG GCCTACCAAG GCGACGATCC ATAGCTGGTC TGAGAGGATG ATCAGCCACA
X. agilis (X94198) AGCTAGTTGG TGGGGTAAG GCTCACCAAG GCGACGATCC GTAGCTGGTC TGAGAGGATG ATCAGCCACA
M. loti AGCTAGTTGG TGGGGTAAG GCCTACCAAG GCGACGATCC ATAGCTGGTC TGAGAGGATG ATCAGCCACA
Bartonella sp (AJ002139) AGCTAGTTGG TGAGGTAATG GCTCCCAAG GCGACGATCC ATAGCTGGTC TGAGAGGATG ATCAGCCACA
A. baumannii (AJ247198) AGCTAGTTGG TGGGGTAAG GCCTACCAAG GCGACGATCT GTAGCGGGTC TGAGAGGATG ATCCGCCACA
P. fluorecens (AF228367) AGCTAGTTGG TGGGGTAATG GCTCACCAAG GCGACGATCC GTAAGTGGTC TGAGAGGATG ATCAGCCACA
N. nitrosa (AF272425) AGCTAGTTGG TAAGGTAATG GCTCACCAAG GCAACGATCA GTAGCTGGTC TGAGAGGATG ACCAGCCACA
C. herbivovans (L134418) AGCTAGTTGG AGGGGTAACG GCCCACCAG GCGACGAT~ ~~~~~ ~~~~~

276

	277	298
<i>Bacillus</i> sp	CTGGGACTGA	GACACGGCCC AG
<i>Baccillus megaterium</i>	CTGGGACTGA	GACACGGCCC AG
<i>B. japonicum</i> (AF321213)	TTGGGACTGA	GACACGGCCC AA
<i>B. japonicum</i> (USDA110)	TTGGGACTGA	GACACGGCCC AA
<i>B. elkanii</i> (USDA76)	TTGGGACTGA	GACACGGCCC AA
T50b1	CTGGGACTGA	GACACGGCCC A~
T69b2	CTGGGACTGA	GACACGGCCC A~
T69b1	CTGGGACTGA	GACACGGCCC AC
T69b3	CTGGGACTGA	GACACGGCCC A~
<i>Porphyrobacter</i> (AB033325)	CTGGGACTGA	GACACGGCCC AG
<i>P. tepidarius</i> (AB033328)	CTGGGACTGA	GACACGGCCC AG
<i>Erythrobacter</i> sp (AJ39126)	CTGGGACTGA	GACACGGCCC AG
<i>Unculter copper</i> (AF337830)	CTGGGACTGA	GACACGGCCC AG
<i>S. adhaesiva</i> (D12722)	CTGGGACTGA	GACACGGCCC AG
<i>Afipia</i> sp (AGU87784)	CTGGGACTGA	GACACGGCCC AG
<i>Methylosinus</i> (AF150786)	CTGGGACTGA	GACACGGCCC AG
<i>P. manganicum</i> (X97691)	CTGGGACTGA	GACACGGCCC AG
<i>K. adipata</i> (AY39817)	CTGGGACTGA	GACACGGCCC AG
<i>Ochrobactrum</i> sp (D63836)	CTGGGACTGA	GACACGGCCC AG
<i>Brucella</i> (U71005)	CTGGGACTGA	GACACGGCCC AG
<i>R. galegae</i>	TTGGGACTGA	GACACGGCCC AA
<i>R. giadinii</i>	TTGGGACTGA	GACACGGCCC AA
<i>S. sahelii</i>	TTGGGACTGA	GACACGGCCC AA
<i>S. teranga</i>	TTGGGACTGA	GACACGGCCC AA
<i>A. rhizogenes</i> (D12788)	TTGGGACTGA	GACACGGCCC AA
<i>M. ciceri</i>	TTGGGACTGA	GACACGGCCC AA
<i>S. arboris</i>	TTGGGACTGA	GACACGGCCC AA
<i>S. fredii</i>	TTGGGACTGA	GACACGGCCC AA
<i>S. xianjiangense</i>	TTGGGACTGA	GACACGGCCC AA
<i>R. etli</i>	TTGGGACTGA	GACACGGCCC AA
<i>R. tropici</i>	TTGGGACTGA	GACACGGCCC AA
<i>X. agilis</i> (X94198)	CTGGGACTGA	GACACGGCCC AG
<i>M. loti</i>	TTGGGACTGA	GACACGGCCC AA
<i>Bartonella</i> sp (AJ002139)	CTGGGACTGA	GACACGGCCC AG
<i>A. baumannii</i> (AJ247198)	CTGGGACTGA	GACACGGCCC AG
<i>P. fluorescens</i> (AF228367)	CTGGGACTGA	GACACGGTCC AG
<i>N. nitrosa</i> (AF272425)	CTGGGACTGA	GACACGGCCC AG
<i>C. herbivovans</i> (L134418)	~~~~~	~~~~~

Apéndice 7

Alineamiento de secuencias de 16S ADNr de aislamientos de *Leucaena leucocephala*

```

UNDICOLA      -AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGCATCCTTCGGGGTG--AGCGGCAGACGGGTGAGT
T23N1L      -AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGC--CCCGCAAGGGG--AGCGGCAGACGGGTGAGT
MLOTI       -AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGC--CCCGCAAGGGG--AGCGGCAGACGGGTGAGT
MHUAKUII    -AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGC--CCCGCAAGGGG--AGCGGCAGACGGGTGAGT
CICERI      -AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGC--CCCGCAAGGGG--AGCGGCAGACGGGTGAGT
GALEGAE     -AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGC--CTCGCAAGAGG--AGCGGCAGACGGGTGAGT
HUAUTLENSE -AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGC--CCCGCAAGGGG--AGCGGCAGACGGGTGAGT
GIARDINII   -AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGC--CCCGCAAGGGG--AGCGGCAGACGGGTGAGT
4894        ----CTTAACACATGCAAGTCGAGCGC--GTAGCAATACG--AGCGGCAGACGGGTGAGT
X68387_ST_  -AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGC--GTAGCAATACG--AGCGGCAGACGGGTGAGT
T3N7L       -----TTAACACATGCAAGTCGAGCGC--GTAGCAATACG--AGCGGCAGACGGGTGAGT
4893        -AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGC--GTGGCAATACG--AGCGGCAGACGGGTGAGT
X68390      -AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGC--GTGGCAATACG--AGCGGCAGACGGGTGAGT
T23N5L      -AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGC--GTGGCAACACG--AGCGGCAGACGGGTGAGT
X90813      -AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGC--GTGGCAACACG--AGCGGCAGACGGGTGAGT
X77120      AAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGC--GTGGCAACACG--AGCGGCAGACGGGTGAGT
T25N2L      -AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGC--GTAGCAATACG--AGCGGCAGACGGGTGAGT
X90810      -AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGC--GTAGCAATACG--AGCGGCAGACGGGTGAGT
T23N7L      -AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGC--GTAGCAATACG--AGCGGCAGACGGGTGAGT
T25N1L      ---GCTTAACACATGCAAGTCGAGCGC--CCCGCAAGGGG--AGCGGCAGACGGGTGAGT
T27N4L      -----ACACATGCAAGTCGAGCGC--CCCGCAAGGGG--AGCGGCAGACGGGTGAGT
51N1        -AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGC--CCCGCAAGGGG--AGCGGCAGACGGGTGAGT
T1N7L       -AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGC--CCCGCAAGGGG--AGCGGCAGACGGGTGAGT
USDA205     -AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGC--CCCGCAAGGGG--AGCGGCAGACGGGTGAGT
T20N1L      -AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGC--CCCGCAAGGGG--AGCGGCAGACGGGTGAGT
T24N1L      -AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGC--CCCGCAAGGGG--AGCGGCAGACGGGTGAGT
T20N11L     -AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGC--CCCGCAAGGGG--AGCGGCAGACGGGTGAGT
T24N5L      -AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGC--CCCGCAAGGGG--AGCGGCAGACGGGTGAGT
T50N3L      -AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGC--CCCGCAAGGGG--AGCGGCAGACGGGTGAGT
RLEGUMINSARUM -AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGC--CCCGCAAGGGG--AGCGGCAGACGGGTGAGT
RTRÓPICIB   -AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGC--CCCGCAAGGGG--AGCGGCAGACGGGTGAGT
T29N3L      -AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGC--CCCGCAAGGGG--AGCGGCAGACGGGTGAGT
ARHIZOGENES -AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGC--CCCGCAAGGGG--AGCGGCAGACGGGTGAGT
X67232      -AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGC--CCCGCAAGGGG--AGCGGCAGACGGGTGAGT
X67224      -AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGC--CCCGCAAGGGG--AGCGGCAGACGGGTGAGT
ATUMEFACIENS -AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGC--CCCGCAANNNN--AGCGGCAGACGGGTGAGT
GALLICUM    -AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGC--CCCGCAAGGGG--AGCGGCAGACGGGTGAGT
MONGOLENSE  -AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGC--CCCGCAAGGGG--AGCGGCAGACGGGTGAGT
RETLI       -AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGC--CCCGCAAGGGG--AGCGGCAGACGGGTGAGT
HAINANENSE  -AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGC--CCCGCAAGAGG--AGCGGCAGACGGGTGAGT
USDA76      -AGGCTTAACACATGCAAGTCGATCGGGCATAGCAATATGTGTCAGCGGCAGACGGGTGAGT
USDA110     -AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGGCGTAGCAATACGTGTCAGCGGCAGACGGGTGAGT

```

***** ** * *****

```

UNDICOLA      AACGCGTGGGAACGTACCCTTTTCTA-CGGAATAGCTCCGGGAAACTGGAATTAATACCG
T23N1L      AACGCGTGGGAATCTACCCATCTCTA-CGGAACAACCTCCGGGAAACTGGAGCTAATACCG
MLOTI       AACGCGTGGGAATCTACCCATCTCTA-CGGAACAACCTCCGGGAAACTGGAGCTAATACCG
MHUAKUII    AACGCGTGGGAATCTACCCATCTCTA-CGGAACAACCTCCGGGAAACTGGAGCTAATACCG
CICERI      AACGCGTGGGAATCTACCCATCTCTA-CGGAACAACCTCCGGGAAACTGGAGCTAATACCG
_GALEGAE     AACGCGTGGGAATCTACCCATCCCTA-CGGAACAACCTCCGGGAAACTGGAGCTAATACCG
HUAUTLENSE  AACGCGTGGGAATCTACCCATCCCTA-CGGAACAACCTCCGGGAAACTGGAGCTAATACCG
GIARDINII   AACGCGTGGGAATCTACCCATCTCTA-CGGAATAACTCAGGGGAAACTTGTGCTAATACCG
4894        AACGCGTGGGAATCTACCCTTTTCTA-CGGAATAACGCAGGGGAAACTTGTGCTAATACCG
X68387_ST_  AACGCGTGGGAATCTACCCTTTTCTA-CGGAATAACGCAGGGGAAACTTGTGCTAATACCG
T3N7L       AACGCGTGGGAATCTACCCTTTTCTA-CGGAATAACGCAGGGGAAACTTGTGCTAATACCG
4893        AACGCGTGGGAATCTACCCTTTTCTA-CGGAATAACGCAGGGGAAACTTGTGCTAATACCG
X68390      AACGCGTGGGAATCTACCCTTTTCTA-CGGAATAACGCAGGGGAAACTTGTGCTAATACCG
T23N5L      AACGCGTGGGAATCTACCCTTTTCTA-CGGAATAACGCAGGGGAAACTTGTGCTAATACCG
X90813      AACGCGTGGGAATCTACCCTTTTCTA-CGGAATAACGCAGGGGAAACTTGTGCTAATACCG
X77120      AACGCGTGGGAATCTACCCTTTTCTA-CGGAATAACGCAGGGGAAACTTGTGCTAATACCG
T25N2L      AACGCGTGGGAATCTACCCTTTTCTA-CGGAATAACGCAGGGGAAACTTGTGCTAATACCG
X90810      AACGCGTGGGAATCTACCCTTTTCTA-CGGAATAACGCAGGGGAAACTTGTGCTAATACCG
T23N7L      AACGCGTGGGAATCTACCCTTTTCTA-CGGAATAACGCAGGGGAAACTTGTGCTAATACCG
T25N1L      AACGCGTGGGAATCTACCCTTTTCTA-CGGAATAACGCAGGGGAAACTTGTGCTAATACCG
T27N4L      AACGCGTGGGAATCTACCCTTTTCTA-CGGAATAACGCAGGGGAAACTTGTGCTAATACCG
51N1        AACGCGTGGGAATCTACCCTTTTCTA-CGGAATAACGCAGGGGAAACTTGTGCTAATACCG

```


4893 AGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCA
X68390 AGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCA
T23N5L AGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCA
X90813 AGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGA-----
X77120 AGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCA
T25N2L AGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCA
X90810 AGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGA-----
T23N7L AGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCA
T25N1L AGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCA
T27N4L AGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCA
51N1 AGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCA
T1N7L AGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCA
USDA205 AGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCA
T20N1L AGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCA
T24N1L AGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCA
T20N11L AGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCA
T24N5L AGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCA
T50N3L AGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCA
RLEGUMINSARUM AGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCA
RTROPICIB AGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCA
T29N3L AGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCA
ARHIZOGENES AGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCA
X67232 AGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCA
X67224 AGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCA
ATUMEFACIENS AGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCA
GALLICUM AGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCA
MONGOLENSE AGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCA
RETLI AGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCA
HAINANENSE AGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCA
USDA76 AGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCA
USDA110 AGTTGGTAGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCA
***** **

UNDICOLA GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
T23N1L GCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAA
MLOTI GCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAA
MHUAKUII GCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAG
CICERI GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
GALEGAE GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
HUAUTLENSE GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
GIARDINII GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
4894 GSCACATTGGGACTGATACACGGGCCAA
X68387_ST_ GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
T3N7L GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
4893 GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
X68390 GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
T23N5L GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
X90813 -----
X77120 GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
T25N2L GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
X90810 -----
T23N7L GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
T25N1L GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
T27N4L GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
51N1 GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
T1N7L GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
USDA205 GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
T20N1L GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
T24N1L GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
T20N11L GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
T24N5L GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
T50N3L GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAM
RLEGUMINSARUM GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
RTROPICIB TCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
T29N3L GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
ARHIZOGENES GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
X67232 GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
X67224 GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
ATUMEFACIENS GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
GALLICUM GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
MONGOLENSE GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
RETLI GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
HAINANENSE GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
USDA76 GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
USDA110 GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA