



Universidad Nacional de La Plata,
Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales

TRABAJO FINAL DE CARRERA

Título

**“CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS QUE INTERACTÚAN CON LEGUMINOSAS
ARBÓREAS NATIVAS”**

Alumno: Juan Marcelo Gauna,

Nº de Legajo: 27887/6

E-mail: marcelo.gauna@agro.unlp.edu.ar.

Director: Lic. Virginia Martínez Alcántara

Co-director: Dra. Rocío Medina

Fecha de presentación: Marzo 2020

Lugar de trabajo: Cátedra de Microbiología Agrícola, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (FCAyF) Universidad Nacional de La Plata (UNLP)

Modalidad: Una investigación en cualquiera de los campos de las Ciencias Agrarias y Forestales

Índice

RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
HIPOTESIS	8
OBJETIVOS	8
Objetivo general	8
Objetivos específicos	9
MATERIALES Y MÉTODOS	9
Revisión bibliográfica	9
Material biológico	12
Rizobios recuperados de la colección de la Cátedra de Microbiología Agrícola.	14
Caracterización microbiológica de los aislados de <i>P. parviflora</i> , <i>E. contortisiliquum</i> , <i>V. caven</i> y <i>P. alba</i>	15
Inhibición del crecimiento fúngico: análisis estadístico	17
Caracterización genética de los aislados de <i>P. parviflora</i> , <i>E. contortisiliquum</i> , <i>V. caven</i> y <i>P. alba</i>	17
Amplificación de 16S rADN y secuenciamiento	19
RESULTADOS Y DISCUSION	21
Revisión bibliográfica	21
Caracterización microbiológica y atributos biológicos de los aislados	23
Inhibición del crecimiento fúngico: Análisis estadístico	25
Inhibición de crecimiento fúngico	27
CONCLUSIONES	39
BIBLIOGRAFIA	40
ANEXO1	50
ANEXO2	56

RESUMEN

La familia Leguminosae (Fabaceae) es una de las más importantes y de interés económico. Junto con bacterias Gram negativas, conocidas como rizobios, forman una asociación simbiótica muy útil para manejar el nitrógeno (N) en los sistemas productivos agroforestales; se aprovecha la capacidad de los rizobios de fijar N dentro de los nódulos radicales y tornarlo disponible para las plantas. Los rizobios además, pueden encontrarse en los nódulos u otros tejidos de las leguminosas junto a otras bacterias y promover el crecimiento de las plantas por el aporte de N, la solubilización de fosfatos y la capacidad biocontroladora de patógenos. Actualmente, las leguminosas forestales son un foco de atención debido a los múltiples propósitos con los cuales pueden ser incorporadas a los sistemas agroforestales consecuencia de los múltiples beneficios que aportan. El objetivo de este trabajo fue estudiar las bacterias provenientes de nódulos de las especies arbóreas nativas *Poecilanthe parviflora* Benth (“lapachillo”), *Vachellia caven* (Molina) Seigler & Ebinger (“espinillo”), *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong. (“timbó”) y *Prosopis alba* Griseb. (“algarrobo blanco”) a fin de contribuir al conocimiento de los microorganismos que interactúan con ellas. Para esto se realizó el aislamiento y la caracterización microbiológica de las bacterias en cuanto a su respuesta a la tinción de Gram, morfología, acidificación o alcalinización de medio de cultivo, capacidad de solubilizar fosfato y acción antagonista contra los hongos fitopatógenos: *Fusarium graminearum* Schwabey *Stemphylium lycopersici* (Enjoji) W. Yamam. Asimismo, se realizó una caracterización genética de los aislados a partir de la comparación de perfiles genéticos generados mediante PCR-BOX y la amplificación y secuenciación del gen 16S rADN. Los aislados presentaron distinta capacidad de acidificar y alcalinizar el medio de cultivo, inhibir el crecimiento de los hongos fitopatógenos en condiciones controladas y se encontró un aislado con la capacidad de solubilizar fósforo. Además, resultaron pertenecer a diversos grupos taxonómicos.

INTRODUCCIÓN

La familia Leguminosae (Fabaceae) es la tercera familia de plantas más grande entre las angiospermas; está conformada por tres subfamilias, *Caesalpinioideae*, *Papilionoidae* y *Mimosoideae* (Raven & Polhill, 1981; Doyle & Luckow, 2003; Lewis et al., 2005), unos 750 géneros y 20.000 especies (Peix et al., 2015) encontrándose en la Argentina unos 113 géneros y 630 especies (Ulibarri, 2002).

Las leguminosas son un grupo muy importante de interés forestal ya que existen algunas de uso maderable, alimenticio, para leña y carbón, melíferas, forrajeras y proveedoras de otros productos forestales no madereros (Ulibarri, 2002). Asimismo, al formar parte de asociaciones boscosas nativas, cumplen roles fundamentales en el equilibrio de distintas funciones biológicas de los ecosistemas, que se transforman en servicios ecosistémicos cuando son útiles para la sociedad, como son la sucesión, la regulación biótica, el ciclado de nutrientes, el flujo de energía y la regulación del ciclo del agua (Sarandón & Flores, 2014). Esto permite el diseño de agroecosistemas de mayor sustentabilidad como por ejemplo en sistemas de uso diversificado, agroforestería o de policultivos o cultivos mixtos entre leguminosas y otras especies de interés económico, basados en el principio que las funciones biológicas y los servicios ecosistémicos se verán más favorecidos cuanto más diversa y compleja sea la biodiversidad de un sistema en sus distintas dimensiones (Sarandón & Flores, 2014).

Poecilanthe parviflora Benth (“lapachillo”) es una especie arbórea o arbustiva, hidrófila, endémica de América del Sur, distribuida en Argentina (Buenos Aires, Corrientes, Entre Ríos, Misiones), Brasil, Paraguay y Uruguay (Flora Argentina y del Cono sur, 2019) en las selvas en galería. Existen reportes de rizobios aislados de esta especie en Brasil (De Faria et al., 1984). Se caracteriza por tener una madera resistente al ataque de hongos e insectos debido a que posee sacuranetina (Ulibarri, 2002), por lo que se destaca por su

durabilidad (Carrere, 2016) y por su uso para la obtención de compuestos antimicóticos e insecticidas.

El género *Vachellia* está compuesto por alrededor de 165 especies, de las cuales 60-62 crecen en América, 21 en Asia, 73 en África y 9 en Australia (Seigler & Ebinger, 2005; Flora Argentina y del Cono sur, 2019). Sus especies crecen en el bosque tropical caducifolio estacionalmente seco y suelen asociarse a la vegetación secundaria, en los márgenes de ríos y en planicies arenosas; a menudo son invasoras o colonizadoras de áreas degradadas. Las distintas especies muestran una gran plasticidad fenotípica, según la edad de la planta o las condiciones ambientales en donde crecen (Arce & de Lourdes, 2007). La flora argentina registra seis especies nativas que crecen en las regiones fitogeográficas Chaqueña, del Espinal y del Monte (Cabrera, 1971), desde el nivel del mar hasta los 3000 m. s. m. Ellas son: *Vachellia caven* (Molina) Seigler & Ebinger (“espinillo”), *V. albicorticata* (Burkart) Seigler & Ebinger; *V. aroma* (Gillies ex Hook. et Arn.) Seigler & Ebinger; *V. astringens* (Gillies ex Hook. et Arn.) Speg. y *V. curvifructa* (Burkart) Seigler & Ebinger.

Enterolobium contortisiliquum (Vell.) Morong. (“timbó”) es una especie que, así como *V. caven* y *P. alba*, pertenece a la subfamilia *Mimosoideae*. Es un árbol deciduo proveniente de Brasil, Bolivia, Paraguay, Uruguay y Argentina. Se encuentra especialmente localizado en las Yungas y en la Selva Paranaense, así como en las selvas marginales de los ríos Paraguay, Uruguay y Paraná. Este género contiene alrededor de 11 especies nativas en Argentina y son usadas normalmente con fines ornamentales en parques, calles y plazas (Ulibarri, 2002).

El género *Prosopis* cuenta con alrededor de 44 especies distribuidas en el suroeste de Asia y África y sobre todo en América desde el oeste de América del Norte hasta la Patagonia, especialmente en las regiones templadas y secas del oeste. En la República

Argentina hay alrededor de 30 especies de las cuales 8 se encuentran en la Patagonia. *Prosopis alba* Griseb. (“algarrobo blanco”) es una especie nativa, arbórea, perenne, que se distribuye en la Argentina, Chile y Paraguay, siendo cultivada en Uruguay (Flora Argentina y del Cono sur, 2019). Es una especie emblemática de nuestro país y se le atribuyen múltiples usos como forrajera, alimenticia, forestal, ornamental, melífera y tintórea (Ulibarri, 2002).

Las leguminosas se caracterizan y distinguen de muchas otras plantas porque tienen la capacidad de asociarse simbióticamente con bacterias del suelo, principalmente Gram negativas, denominadas colectivamente como rizobios (Franche et al., 2009; Peixet al., 2015). Estas bacterias inducen la formación de órganos especializados en raíces y tallos llamados nódulos. Dentro de ellos, los rizobios se convierten en bacteroides que fijan el nitrógeno atmosférico (N_2), el cual se reduce a amonio (NH_4) disponible para la planta. La nodulación es común en *Papilionoideae* (80 - 90% del total de especies), menos frecuente en *Mimosoideae* (25% del total de especies) y ocurre ocasionalmente en *Caesalpinioideae* (algunas pocas especies) (Paredes, 2013).

El nitrógeno (N) es un elemento esencial para las plantas, puesto que cumple un rol fundamental en la formación de compuestos no proteicos como los pigmentos, en las proteínas y en la diversidad de funciones que cumplen las plantas, por lo que la nodulación y la fijación de N_2 en las leguminosas es una ventaja en la obtención de este nutriente. Tanto las leguminosas arbóreas como las demás plantas actinorricas, contribuyen con el aumento del N del suelo por lo que se ha planteado su uso en asociación con cultivos anuales para mejorar la producción de los agroecosistemas (Frioni et al., 1998).

Los rizobios se ubican taxonómicamente dentro de las α y β proteobacterias, entremezclándose con géneros no simbióticos, fotosintéticos y patógenos de plantas. Las

especies que inducen la formación de nódulos en las leguminosas se distribuyen al menos en 14 géneros bacterianos (Sprent et al., 2013). Una misma especie de rizobio puede tener la capacidad de nodular distintas especies de leguminosas, así como una misma leguminosa puede ser hospedante de distintas especies de bacterias; sin embargo en determinados casos la interacción es altamente específica (Sprent et al., 2013). Las especies de rizobios pueden vivir independientemente de las especies leguminosas y está documentada su naturalización en los suelos productivos del país a causa de manejos de cultivos a partir de semillas de leguminosas inoculadas, como puede ser el caso de *Bradyrhizobium japonicum* (Kirchner) Jordan y *B. elkanii* Kuykendall cuya expansión en los suelos pampeanos donde no existían se dio por la década del 70' acompañando a la expansión del cultivo de soja [*Glycine max* (L.) Merr.] (Paredes, 2013).

Los nódulos de las leguminosas también están cohabitados por un conjunto de diversas bacterias endófitas Gram positivas y Gram negativas que coexisten con los rizobios (Sprent, 2007; Gyaneshwar et al., 2011; Peix et al., 2015). Las bacterias conocidas como PGPB (Plant Growth Promoting Bacteria), promueven el crecimiento de las plantas ya sea por el aporte de N, la solubilización del fósforo, la modificación de los niveles hormonales de las plantas y la capacidad biocontroladora de patógenos, entre otros mecanismos (Delaporte Quintana, 2018). Ellas establecen relaciones con las plantas que difieren en el nivel de interacción y pueden ser asociativas y/o simbióticas, denominándose "endófitos" a los organismos que cumplen una parte o todo su ciclo de vida en el interior de los tejidos, donde viven y se nutren de sus hospedantes, sin producir síntomas de enfermedad (Yanniet al., 2011). En los últimos años se han estudiado las bacterias endófitas de los nódulos de diferentes leguminosas y estos estudios revelaron una alta diversidad genética, con miembros de los Phyla Proteobacteria, Firmicutes y Actinobacteria (Peix et al., 2012; Peix et al., 2015), es decir que los nódulos constituyen

una importante fuente de diversidad a ser estudiada complementariamente a la diversidad de los rizobios.

Algunos de estos endófitos nodulares además mostraron *in vitro* mecanismos para promover el crecimiento de las plantas (Peix et al., 2012) como la solubilización del fosfato y la actividad de biocontrol y debido a que comparten los nódulos con los rizobios, presentan ventajas para su uso en el diseño de inoculantes aplicables a leguminosas.

Se han realizado estudios en América del Sur, especialmente en Brasil, Chile, Uruguay y Argentina en los que se aislaron los rizobios y se estudiaron la sistemática y las relaciones filogenéticas de los simbioses bacterianos de las leguminosas arbóreas, así como su capacidad de nodulación y fijación de N (Frioni et al., 1998). Considerando el potencial de las leguminosas arbóreas, en este trabajo final se propone estudiar las bacterias que se encuentran en los nódulos de cuatro especies de plantas nativas: *Poecilanthe parviflora* Benth, *Vachellia caven* (Molina) Seigler & Ebinger, *Prosopis alba* Griseb. y *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong.

HIPOTESIS

Las bacterias aisladas de nódulos de leguminosas nativas difieren tanto en sus características genéticas, como en su capacidad de solubilizar fósforo y de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar las bacterias provenientes de nódulos de las especies arbóreas nativas *Poecilanthe parviflora* Benth (“lapachillo”), *Vachellia caven* (Molina) Seigler & Ebinger (“espinillo”), *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong. (“timbó”) y *Prosopis alba* Griseb.

("algarrobo blanco") a fin de contribuir al conocimiento de los microorganismos que interactúan con estas especies y de completar la caracterización de los microorganismos de la colección de la cátedra de Microbiología Agrícola.

Objetivos específicos

- Relevar los artículos científicos disponibles en las bases bibliográficas referidos a la interacción de los rizobios y otros endófitos, aislados de las leguminosas de los géneros *Poecilanthe*, *Enterolobium*, *Vachellia* y *Prosopis*.
- Aislar bacterias de los nódulos de *Poecilanthe parviflora*.
- Caracterizar y evaluar mediante la tinción de Gram, modificación del pH del medio de cultivo, la capacidad de solubilización del fósforo y el biocontrol del crecimiento de hongos fitopatógenos, los aislados obtenidos de *P. parviflora*, aquellos disponibles en la colección de la cátedra Microbiología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (FCAyF, UNLP) de *V. caven*, *E. contortisiliquum* y *P. alba*.
- Caracterizar los aislados genéticamente mediante el uso de marcadores moleculares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Revisión bibliográfica

Para cumplir con esta etapa se relevaron los artículos científicos disponibles en las bases bibliográficas y publicados en la última década, referidos a los rizobios y bacterias endófitas asociadas a los géneros botánicos estudiados en este trabajo: *Poecilanthe*, *Enterolobium*, *Vachellia* y *Prosopis*.

En este trabajo de revisión se utilizaron dos bases bibliográficas:

1. SciELO (Scientific Electronic Library Online), biblioteca científica electrónica en línea, que es un modelo para la publicación electrónica cooperativa de revistas científicas en Internet, especialmente desarrollado para responder a las necesidades de la comunicación científica en los países en desarrollo y particularmente de América Latina y el Caribe, es el producto de la cooperación entre FAPESP- la Fundación de Apoyo a la Investigación del Estado de São Paulo-, BIREME -Centro Latinoamericano y del Caribe de Información en Ciencias de la Salud-, así como instituciones nacionales e internacionales relacionadas con la comunicación científica y editores científicos

(<http://www.scielo.org/php/level.php?lang=es&component=44&item=1>).

2. Google Académico (Google Scholar) es un buscador que permite localizar documentos de carácter académico como artículos, tesis, libros, patentes, documentos relativos a congresos y resúmenes. Contiene información procedente de distintas fuentes como editoriales universitarias, asociaciones profesionales, repositorios de “preprints”, universidades y otras organizaciones académicas

(https://biblioguias.uam.es/tutoriales/google_academico).

Con el fin de definir el dominio de la revisión bibliográfica, se deben utilizar ecuaciones de búsqueda (expresiones que consisten en palabras claves y operadores lógicos) que incluyan términos específicos del tema a investigar. Se deben aplicar criterios de selectividad de manera que el investigador se enfoque en los documentos relevantes para la investigación (Gómez Luna et al., 2014). De acuerdo con ello, en este trabajo, los criterios de búsqueda fueron:

- a. Literatura en idioma castellano e inglés publicada desde 2009 hasta 2019;
- b. Las ecuaciones de búsqueda siguientes:

Búsqueda 1 → *Rizhobium x Acacia*

Búsqueda 2 → *Rizhobium x Vachellia*

Búsqueda 3 → *Rizhobium x Prosopis*

Búsqueda 4 → *Rizhobium x Poecilanthe*

Búsqueda 5 → *Rizhobium x Enterolobium*

Búsqueda 6 → *Endophyte x Vachellia*

Búsqueda 7 → *Endophyte x Prosopis*

Búsqueda 8 → *Endophyte x Poecilanthe*

Búsqueda 9 → *Endophyte x Enterolobium*

Búsqueda 10 → *Endophyte x Acacia*

Aplicando los criterios de selectividad propuestos, los documentos encontrados fueron organizados y analizados mediante la lectura de sus resúmenes y conclusiones, para identificar y seleccionar los que permitan conocer los trabajos existentes sobre los endosimbiontes de los géneros *Poecilanthe*, *Vachellia* y *Prosopis* en general y en América del Sur en particular. Luego, para su sistematización, se empleó una tabla de datos, como argumenta Gómez Luna et al. (2014).

Material biológico

Se recolectaron renovales de *Poecilanthe parviflora* Benth, “lapachillo”, en la Isla Martín García, Buenos Aires, Argentina (34°11'19"S, 58°15'00"O), en 3 unidades de vegetación: Selva Marginal, Bosque de Coronillo, y Bosque Ribereño (Lahitte, 1994) (Figura 1)



Figura 1. Mapa de Unidades de Vegetación de la zona intangible de la Reserva Natural Isla Martín García. Bosque Ribereño (BR); Selva Marginal (SM); Bosque de Coronillo (C); Pastizal (P); Bosque xerófito (X); Bosque Xerófito inundado (XI). Tomado de Kastelanovic (2015).

Una vez obtenidos los renovales, se procedió a la extracción de las raíces y nódulos funcionales (Figura 2), los cuales se mantuvieron en recipientes herméticos por 48 hs hasta que fueron procesados. Aquellos que no presentaron nódulos se trasplantaron a envases de 3L con un sustrato formado por el suelo correspondiente a la unidad vegetativa de la que fueron extraídos y vermiculita, en proporción 1:1. Las plantas se mantuvieron en invernáculo y se regaron diariamente con agua destilada.



Figura 2 A. Plantín nodulado de *P. parviflora*. B. Detalle de los nódulos radiculares. C. Detalle del tamaño y morfología de los nódulos.

Aislamiento de bacterias endófitas de *P. parviflora*

Todos los aislados de *P. parviflora* se obtuvieron de nódulos radiculares pertenecientes a plantas de la unidad vegetativa Selva Marginal. Este fue el único ecosistema en el que se encontraron plantas noduladas con nódulos indeterminados funcionales (con coloración rojiza interna debido a la presencia de leghemoglobina). Plantas no noduladas y plantas con nódulos no funcionales se encontraron en el Bosque Ribereño y en el Bosque de Coronillo, respectivamente. Esto puede deberse a las características diferenciales de los suelos de las distintas U.V o a las distintas leguminosas acompañantes presentes en ellas, lo que puede tener influencia y/o determinar el banco de bacterias presentes en el suelo.

En laboratorio, los nódulos fueron esterilizados superficialmente con alcohol 50% por 2 minutos y posteriormente con hipoclorito de sodio 4 g/L durante 2 minutos. Luego se

lavaron diez veces con agua destilada estéril y, para comprobar la eficiencia de la esterilización, se rodaron en placas de Petri conteniendo los medios de cultivo: Manitol Extracto de Levadura (YMA) con rojo Congo (de composición: K_2HPO_4 0500 g/L, $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0,2 g/L, NaCl 0,1 g /L, CO_3Ca 1 g/L, Extracto de Levadura 1 g/L, Manitol 10 g/L, Rojo Congo (1/400) 10 ml , Agar 15 g/L), Agar Cetrimide (compuesto por: peptona de gelatina 20 g/L, Cloruro magnésico 1,4 g/L, Sulfato potásico 10 g/L, Bromuro de Cetiltrimetilamonio 0,3 g/L, Agar 15 g/L) y Agar nutritivo (de composición: peptona 5g/L, extracto de carne 3g/L, cloruro de sodio 8g/L, agar 15 g/L). Para obtener las bacterias endófitas, los nódulos se rompieron en agua destilada estéril y las suspensiones se sembraron mediante estrías en placas de Petri conteniendo dos de los medios de cultivo (agar nutritivo y YMA), siguiendo la metodología de Vincent (1970), placas que posteriormente se incubaron a 28°C, durante siete días. Transcurrido este tiempo, las colonias aisladas fueron la fuente para realizar subcultivos y obtener cultivos puros. Luego, las bacterias aisladas se hicieron crecer en medio YEM líquido hasta saturación y posteriormente se mezclaron alícuotas del medio con glicerol hasta alcanzar una concentración final de glicerol 10% y finalmente conservar los aislados a -80°C.

Rizobios recuperados de la colección de la Cátedra de Microbiología Agrícola

Los aislados de *V. caven*, *E. contortisiliquum* y las cepas de referencia de *Glycine max* L.: *Bradyrhizobium diazoefficiens* Delamuta SEMIA 5080; *B. japonicum* (Kirchner) Jordan, SEMIA 5079; *B. elkanii* Kuykendall SEMIA 5019; SEMIA 587 y la cepa tipo *Mesorhizobium chacoense* Velázquez Pr5 (=LMG19008=CECT5336) aislada de *Prosopis alba* en la región del Chaco seco (Burkart et al., 1999) Reserva, Provincia de Córdoba, Argentina (Velázquez et al., 2001) fueron recuperados de la colección de la Cátedra de Microbiología Agrícola (FCAYF), en condiciones de criopreservación. Los aislados de *V.*

caven (espinillo) y de *E. contortisiliquum* (timbo) fueron obtenidos de nódulos de plantas desarrolladas a partir de semillas esterilizadas y pregerminadas que se inocularon con suelos localizados en la ecorregión del Chaco seco (Salta, Argentina) a los 24°48'52.3"S 65°29'59.6"O, 1.300 m.s.n.m. (para "espinillo") y a los 24°35'18.7"S 65°02'50"O, 750 m.s.n.m. (para "timbó"). Dichos cultivos fueron obtenidos en medio YMA con rojo Congo según el procedimiento de Vincent (1970). La inclusión de las cepas tipo se realiza como control gracias a la información que se tiene sobre las características microbiológicas consideradas en esta investigación.

Caracterización microbiológica de los aislados de *P. parviflora*, *E. contortisiliquum*, *V. caven* y *P. alba*.

La caracterización microbiológica fue realizada sobre un total de 28 aislados: 5 noduladores de *G. max*, 1 de *P. alba*, 1 de *E. contortisiliquum*, 6 de *V. caven* y 15 de *P. parviflora*.

En primera instancia, el total de aislados fue observado con microscopio óptico de campo claro (1000x) una vez realizada la tinción de Gram, según la metodología descrita por Rodríguez & Arenas (2018).

La capacidad de modificar el pH del medio de cultivo fue evaluada a partir de cultivos de 5 ml desarrollados en medio de cultivo líquido YEM, de pH 6,8 sin buffer, suplementado con bromotimol azul como indicador de pH, luego de 10-13 días de incubación a 28°C en un agitador rotatorio a 250 rev. min⁻¹. La acidificación del medio se evidenció a partir de la observación de un gradiente de color amarillo para el medio fuertemente ácido, moderadamente ácido y levemente ácido. Las reacciones neutras y básicas se evidencian mediante coloraciones verdosas y azuladas, respectivamente. El tratamiento control consistió en tubos con medio de cultivo sin bacterias.

La capacidad de solubilización del fósforo fue evaluada verificando la formación de un halo translúcido alrededor de las colonias bacterianas desarrolladas en el medio NBRI-P (Glucosa 10g/L, Ca₃ PO₄ 5g/L, MgCl₂6H₂O 5g/L, KCl 0,2g, (NH₄)₂ SO₄ 0.1g/L, Agar 20g/L) luego de ser cultivados los aislados por 10 días a 28°C.

La capacidad inhibitoria de los aislados bacterianos sobre el crecimiento fúngico se evaluó mediante el cultivo conjunto de los aislados y los hongos *Stemphylium lycopersici* (Enjoji) W. Yamam., agente causal de la mancha gris de la hoja (Franco et al., 2017) y *Fusarium graminearum* Schwabe agente causal de la fusariosis (Malbrán et al., 2019).

En un ensayo preliminar se trabajó con el total de aislados (cuyos resultados no se presentan en este trabajo) a partir del cual se seleccionaron a aquellos que presentaron una inhibición mayor al 10% para trabajar de forma más exhaustiva (23 aislados: LA2; LA32A1; LA33A1; LA32B1; LA13; *M. chacoense*; ACS41; *B. elkanii* 587; AC4S41; LA32A2; *B. diazoefficiens* 5080; *B. japonicum* E109; 9ACS43; LA10; *B. elkanii* 5019; LA26; ACS43; LA32B2; LA4; LA35B; 11AC3; LA11; LA21).

Ambos hongos se hicieron crecer en placas con medio APG (de composición: agar 20 g/L - papa 250 g/L – glucosa 20 g/L) a 28°C en oscuridad, durante 3 y 10 días para *F. graminearum* y *S. lycopersici*, respectivamente para poder obtener con sacabocados discos de micelio que fueran sembrados junto con las bacterias. La actividad antifúngica se evaluó mediante la siembra de los aislados bacterianos en dos estrías paralelas equidistantes del centro de la placa con APG. Al cabo de un periodo de incubación de 7 días a 28°C, un disco de micelio de cada hongo se colocó en el centro de cada caja de Petri. En cuanto a los controles, éstos consistieron en placas inoculadas con cada uno de los hongos patógenos en ausencia de las estrías bacterianas. Todas las placas se sellaron con Parafilm® y se incubaron a 28°C durante 3 días (para *F. graminearum*) y 10

días (*S. lycopersici*). En esta instancia fueron consideradas 3 repeticiones para cada interacción bacteria/aislado, hongo patógeno.

Transcurridos los tiempos previstos, Se realizó la medición de la superficie del micelio fúngico mediante el uso del software Image Tool 3.0 (Image Tool Software Copyright) (UTHSCSA, 1995).

La capacidad inhibitoria se estimó a partir del calculo del porcentaje de inhibición (InC%) se calculó según Plazas-Jiménez & Coy-Barrera (2016) mediante la fórmula:

$$\% InC = \frac{\text{superficie del micelio control} - \text{superficie del micelio tratamiento}}{\text{superficie del micelio control}} * 100$$

Inhibición del crecimiento fúngico: análisis estadístico

Los resultados se interpretaron mediante el análisis de la varianza (ANOVA) y el test de Tukey utilizando el programa estadístico InfoStat versión 2015 (Di Rienzo et al., 2015) tomando como variables de clasificación al control y a cada uno de los aislamientos seleccionados, mientras que como variable dependiente se evaluó el porcentaje de inhibición de crecimiento del micelio (%InC) para cada uno de los hongos previamente transformado mediante la función arcoseno.

Caracterización genética de los aislados de *P. parviflora*, *E. contortisiliquum*, *V. caven* y *P. alba*.

Para la caracterización genética de los aislados, en primer lugar, las bacterias fueron cultivadas en medio líquido hasta alcanzar una concentración de 1×10^9 células mL⁻¹. Alícuotas de 5 mL de cultivo se usaron como fuente para la extracción de ADN la cual fue

realizada utilizando un kit de extracción y purificación (Promega Wizard Genomic DNA Purification KiT) (López et al., 2018). La integridad así como la cantidad y calidad del ADN extraído se evaluó en geles de agarosa (1% p/v) teñido con bromuro de etidio (10% p/v) que se corrieron a 90 voltios durante 30 minutos (Sambrook et al., 1989). Utilizando el ADN molde de los aislados se compararon los perfiles genéticos mediante PCR-BOX utilizando el cebador BOX1AR (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') empleándolas condiciones descritas por De Bruijn (1992). La mezcla de PCR consistió en 1x de buffer de amplificación (Inbio Highway), 2.5 mM de MgCl₂ (Inbio Highway), 50 pmol de BOXA1R primer, 2 mM de cada dNTP (Inbio Highway), 50-100 ng de ADN genómico y 0.6 U de Taq DNA polymerasa (Inbio Highway) en un volumen de 15 µl. Las reacciones de desarrollaron en un Mini Ciclador PTC-1152 (MJ Research) programado de la siguiente forma: una desnaturalización inicial a 94°C durante 7 min, seguida por 35 ciclos a 94°C por 1 min, 53°C de annealing durante 1 min, un paso final de extensión a 65°C por 8 min y un ciclo final a 65°C por 16min (López & Balatti, 2011). Los perfiles genéticos se relevaron en geles de agarosa (1.5% p/v) teñidos con bromuro de etidio (10% p/v) que se corrieron a 90 voltios durante 4 horas.

Los tamaños de los fragmentos se normalizaron por comparación utilizando como marcador de peso molecular el genoma del fago λ digerido con la enzima de restricción HindIII (*λHindIII* marker, Invitrogen). Los patrones de bandas se analizaron con el software NTSYS-pc. Cada banda se trató por separado como un putativo *locus*, y se anotó como presente (1) o ausente (0) en una matriz de datos binarios. Se realizó un análisis multivariado usando el software Past3 (<https://folk.uio.no/ohammer/past/>). Las estimaciones de similitud se basaron en coeficiente de DICE (Dice, 1945). El análisis de conglomerados se realizó empleando el método de agrupamiento no ponderado utilizando medias aritméticas (UPGMA) de software NTSYS-pc (Rohlf, 1992) para generar un

dendrograma. Todos aquellos aislados que tengan una secuencia de bandas única fueron seleccionados para el análisis del 16S rADN.

Amplificación de 16S rADN y secuenciamiento

La biología molecular proporciona métodos de tipificación e identificación, así como análisis filogenéticos basados en la secuencia de genes universalmente conservados como el 16S rADN. Los métodos basados en ADN han sido utilizados crecientemente para caracterizar rizobios. En particular, los análisis filogenéticos basados en el análisis de las secuencias del gen 16S ADN ribosomal y de genes específicos cuyos productos génicos están involucrados en la simbiosis, se desarrollaron y se utilizan como métodos estándar para tipificar e identificar rizobios. Los genes *nif* y *nod* involucrados en la fijación de N₂ y en la especificidad de la leguminosa hospedante son usualmente llevados por plásmidos o islas simbióticas y podrían ser transferidos horizontalmente entre diferentes especies dentro de un género y no tan usualmente entre géneros (Vinuesa et al., 2005; Remigi et al., 2016).

Los aislados bacterianos se caracterizaron por medio del análisis de las secuencias del gen 16S rADN. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador PCR (Minicycler™, MJ Research Inc., Waltham, MA, USA), usando los cebadores 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-ACGGTTACCTTGTTACGACTT-3') siguiendo la metodología de Reysenbach et al. (1994). Los productos de amplificación se purificaron como lo describe Sambrook et al. (1989), se precipitaron y se secuenciaron por MACROGEN Inc. (Seoul, South Korea) empleando la metodología descrita por Sanger et al. (1977). Las secuencias se analizaron y procesaron usando el software Geneious R9 (Geneious version R9.0.5, Biomatters) (ver Anexo 2). Las secuencias finalmente se compararon con las depositadas en la base de datos ncbi (www.ncbi.nlm.nih.gov)

mediante la herramienta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) contrastando con las secuencias de 16S rADN de cepas tipo.

El análisis filogenético se realizó usando el software Geneious R9. Las secuencias se alinearon usando los parámetros del algoritmo ClustalW (gap opening penalty 15, gap extension penalty 6.66) (Thompson et al., 1994). El análisis filogenético se desarrolló usando el modelo de distancia genética descrito por Tamura- Nei usando el método neighbour-joining (Tamura et al., 2004).

Las secuencias de referencia que se incluyeron en el análisis filogenético fueron de *Bacillus aerophilus* (MN845151.1), *Bacillus aerius* (MK850542.1), *Bacillus altitudinis* (MN840036.1), *Bacillus amyloliquefaciens* (NR_117946.1), *Bacillus siamensis*(MN176482.1), *Bradyrhizobium cajani* (NR_157657.1), *Bradyrhizobium liaoningense* (NR_041785.1), *Caulobacter rhizosphaerae* (NR_156992.1), *Curtobacterium herbarum* (NR_025461.1), *Dyella marensis* (NR_042691.1), *Ensifer glycinis* (NR_151923.1), *Ensifer shofinae* (NR_149806.1), *Enterobacter asburiae* (CP011863.1), *Enterobacter roggenkampii* (CP017184.1), *Mesorhizobium amorphae* (NR_114122.1), *Mesorhizobium silamurunense* (NR_116302.1), *Microbacterium jejuense* (NR_134085.1), *Microbacterium trichothecenolyticum* (NR_112002.1), *Pseudomonas marginalis* (LC409077.1), *Rhodopseudomonas thermotolerans* (LC221830.1), *Sinorhizobium fredii* (NR_113669.1), *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587 (AF234890.2), *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 5019 (AF237422.2), *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5080 (AF234889.2), *Bradyrhizobium japonicum* E109 (HG518577.1), *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079 (AF234888.2) y *Mesorhizobium chacoense* (NR_025411.1) y *Escherichia coli* (KY048445.1) como un grupo externo.

RESULTADOS Y DISCUSION

Revisión bibliográfica

A partir de los trabajos científicos obtenidos (13 artículos), con la metodología de búsqueda utilizada, se logró conocer el contexto actual del tema de estudio central en este trabajo de investigación. La información resumida se presenta en el Anexo 1 (Tabla 6).

En ellos, se relevaron al menos unos 50 microorganismos distintos que han sido investigados en los últimos 10 años, cuyas asociaciones con especies de leguminosas arbóreas tienen distintas finalidades, como la metabolización de metales pesados y fitotóxicos (arsénico, cromo), fijación biológica del N, solubilización del fósforo y resistencia a la salinidad del suelo. Entre los géneros estudiados en esos trabajos se pueden mencionar: *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Brevibacterium*, *Devosia*, *Ensifer*, *Kocuria*, *Mesorhizobium*, *Paenibacillus*, *Phyllobacterium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*.

Si bien el número de especies de microorganismos estudiados o identificados en los reportes científicos es cuantioso (más de 50 identificados a nivel de especie y unos 8 a nivel de género), no lo es número el de las especies forestales en las que se describieron las interacciones, encontrándose principalmente estudios en *Acacia salicina* Lindl., *A. Senegal* Lindl., *Prosopis chilensis* (Molina) Stuntz, *P. cineraria* (L.) Druce, *P. farcta* (Banks et Sol.) Eig., *P. laevigata* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) Johnston y *Vachellia macracantha* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) Seigler & Ebinger, entre otras, particularmente para los géneros *Poecilanthus* y *Enterolobium* no se encontraron trabajos.

Los países en los que se han llevado adelante estos estudios son: Perú (1 artículo), India (1 artículo), Pakistán (1 artículo), Egipto (1 artículo), Sudán (1 artículo), Australia (1 artículo), España (1 artículo), Túnez (1 artículo), Sudáfrica (1), Argelia (1) y es México (3

artículos) el país con mayor número de publicaciones. No se encontraron trabajos desarrollados en Argentina.

Aislamiento de bacterias endófitas de leguminosas arbóreas nativas de la Argentina

Fue posible purificar y aislar un total de 22 bacterias: 15 obtenidas de *P. parviflora*, aisladas en dos medios de cultivo distinto lo que sugiere que es posible que los nódulos alberguen bacterias endófitas, y 7 pertenecientes a la colección de la Cátedra de Microbiología: 6 de *V. caven* y 1 de *E. contortisiliquum* (Tabla 1).

Tabla 1. Aislados obtenidos y recuperados. Se indica la especie hospedante, el medio de cultivo y el sitio de origen del material. YMA, Manitol Extracto de Levadura; AN, Agar nutritivo.

Aislado	Hospedante	Medio de aislamiento	Sitio de origen del material
4ES6-1	<i>E. contortisiliquum</i>	YMA	Salta, suelo colectado
ACS43	<i>V. caven</i>	YMA	Salta, suelo colectado
9ACS43	<i>V. caven</i>	YMA	Salta, suelo colectado
11AC3	<i>V. caven</i>	YMA	Salta, suelo colectado
ACS41	<i>V. caven</i>	YMA	Salta, suelo colectado
AC4S41	<i>V. caven</i>	YMA	Salta, suelo colectado
5ACS4-2	<i>V. caven</i>	YMA	Salta, suelo colectado
LA33A2	<i>P. parviflora</i>	YMA	Buenos Aires, plantín colectado
LA11	<i>P. parviflora</i>	YMA	Buenos Aires, nódulo colectado <i>in situ</i>
LA13	<i>P. parviflora</i>	YMA	Buenos Aires, nódulo colectado <i>in situ</i>
LA2	<i>P. parviflora</i>	YMA	Buenos Aires, nódulo colectado <i>in situ</i>
LA32B1	<i>P. parviflora</i>	YMA	Buenos Aires, plantín colectado
LA32A2	<i>P. parviflora</i>	YMA	Buenos Aires, plantín colectado
LA32A1	<i>P. parviflora</i>	YMA	Buenos Aires, plantín colectado
LA35B	<i>P. parviflora</i>	YMA	Buenos Aires, plantín colectado
LA33A1	<i>P. parviflora</i>	YMA	Buenos Aires, plantín colectado
LA32B2	<i>P. parviflora</i>	YMA	Buenos Aires, plantín colectado
LA26	<i>P. parviflora</i>	YMA	Buenos Aires, nódulo colectado <i>in situ</i>
LA21	<i>P. parviflora</i>	AN	Buenos Aires, nódulo colectado <i>in situ</i>
LA4	<i>P. parviflora</i>	AN	Buenos Aires, nódulo colectado <i>in situ</i>
LA10	<i>P. parviflora</i>	AN	Buenos Aires, nódulo colectado <i>in situ</i>
LA8	<i>P. parviflora</i>	YMA	Buenos Aires, nódulo colectado <i>in situ</i>

Caracterización microbiológica y atributos biológicos de los aislados

Las principales características microbiológicas de los aislados se presentan en la Tabla 2. De la totalidad de los aislados, 18 se observaron en el microscopio como gram negativos, 3 de ellos como gram positivos y 7 no fueron posibles de determinar. Debido a que los aislados provenían de nódulos de rizobios, era de esperar que se encontraran muchas bacterias gram negativas y por otro lado la presencia de bacterias gram positivas puede asociarse a la presencia de otras bacterias endófitas. De los aislados obtenidos y de aquellos recuperados de la colección, 4 bacterias provenientes de *P. parviflora* alcalinizaron el medio, 8 del mismo hospedante (lapachillo) lo acidificaron de leve a fuertemente y otras 3 del mismo hospedante no produjeron modificaciones. En cuanto a las 8 restantes (recuperadas de la colección), 7 lo acidificaron de leve a fuertemente (1 de *M. chacoense* y 6 de *V. caven*) y aquella proveniente de *E. contortisiliquum* lo alcalinizó. Es conocido que *Bradyrhizobium* sp. alcaliniza el caldo de cultivo YEM y *Ensifer* (*Sinhorhizobium*) lo acidifica, mientras que en las especies de *Mesorhizobium* la reacción es dependiente de la fuente de carbono en el medio (Velázquez et al., 2001).

Tabla2. Caracterización microbiológica de los 22 aislados y de las 6 cepas de referencia utilizadas en este estudio. GN, Gram negativa; GP, Gram positiva; R, bacilo; A++, acidificación fuerte; A+, acidificación moderada; A, levemente acidificada; N, neutro; B, básico; ND, no determinado.

Aislados	Hospedante	Tinción de Gram	Cambio de pH del medio
<i>B. elkanii</i> SEMIA 5019	G. max	GN,R.	B
<i>B. diazoefficiens</i> SEMIA 5080	G. max	GN,R.	B
<i>B. japonicum</i> SEMIA 5079	G. max	GN,R.	B
<i>B. japonicum</i> E109	G. max	GN,R.	N
<i>M. chacoense</i> Pr5	P. alba	GN,R.	A++
<i>B.elkanii</i> SEMIA 587	G. max	GN,R.	B
4ES6-1	<i>E. contorsiliquum</i>	GN,R	B

ACS43	<i>V. caven</i>	GN,R	A+
9ACS43	<i>V. caven</i>	ND	A+
11AC3	<i>V. caven</i>	GN,R	A++
ACS41	<i>V. caven</i>	GN,R	A+
AC4S41	<i>V. caven</i>	ND	A+
5ACS4-2	<i>V. caven</i>	GN,R	A++
LA33 A2	<i>P. parviflora</i>	ND	A++
LA11	<i>P. parviflora</i>	GP,R	N
LA13	<i>P. parviflora</i>	GN, R	A
LA2	<i>P. parviflora</i>	GN,R	A
LA32B1	<i>P. parviflora</i>	GN,R	N
LA32A2	<i>P. parviflora</i>	GN,R	A++
LA32A1	<i>P. parviflora</i>	ND	B
LA35B	<i>P. parviflora</i>	ND	A
LA33A1	<i>P. parviflora</i>	ND	B
LA32B2	<i>P. parviflora</i>	GN,R	A++
LA26	<i>P. parviflora</i>	GN,R	B
LA21	<i>P. parviflora</i>	GP,R	A+
LA4	<i>P. parviflora</i>	GP,R	N
LA10	<i>P. parviflora</i>	ND	N
LA8	<i>P. parviflora</i>	GN,R	B
Control			N

Entre todos los aislados, sólo 11AC3 proveniente de *V. caven* solubilizó fosfato de modo similar al control (Figura 3). La capacidad solubilizadora del fosfato puede deberse a la disminución del pH extracelular por la liberación de ácidos orgánicos, la formación de complejos metálicos, la reducción de metales o la disolución directa por acción de enzimas hidrolíticas (Restrepo et al., 2019). Por lo que considerando que la mayoría de los suelos son deficientes en este nutriente resulta sumamente interesante el papel que podría jugar en la adquisición del fósforo por las raíces de las plantas

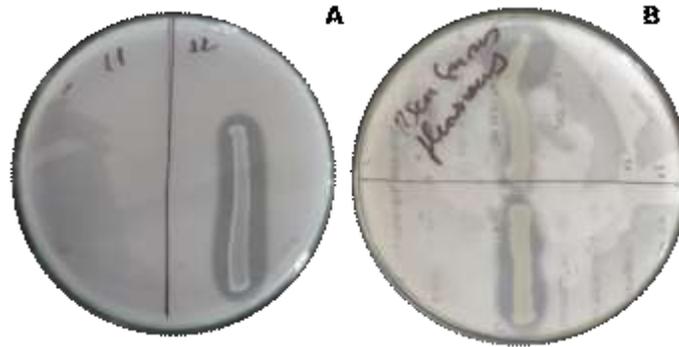


Figura 3 Solubilización del fosfato. A. A la izquierda 9ACS43, negativo, y a la derecha 11AC3, positivo. B. Control positivo *Pseudomonas fluorescens*.

Inhibición del crecimiento fúngico: Análisis estadístico

En cuanto a la capacidad de los aislados de inhibir el crecimiento de *Stemphylium lycopersici* (Enjoji) W. Yamam y *Fusarium graminearum* Schwabe, el análisis de la varianza arrojó diferencias significativas (p -valor $<0,05$) entre los aislados para cada patógeno considerado y posterior comparación de Tukey permitió diferenciar los aislados (Tablas 3 y 4). Para el caso de *F. graminearum* el %InC mínimo para diferenciarse del control fue del 19% mientras que para *S. lycopersici* el %InC mínimo para diferenciarse del control fue del 42%.

Tabla 3. Inhibición de *Fusarium graminearum*

Aislamiento	Medias*							
CONTROL	0,00	A						
LA2	0,13	A	B					
LA32A1	0,16	A	B					
LA33A1	0,18	A	B					
LA32B1	0,20	A	B	C				
LA13	0,22	A	B	C	D			
<i>M. chacoense</i>	0,23	A	B	C	D			
ACS41	0,27	A	B	C	D			
<i>B. elkanii</i> 587	0,29	A	B	C	D			
AC4S41	0,32	A	B	C	D			
LA32A2	0,41	A	B	C	D	E		
<i>B. diazoefficiens</i> 5080	0,41	A	B	C	D	E		
<i>B. japonicum</i> E109	0,42	A	B	C	D	E		
9ACS43	0,44		B	C	D	E		
LA10	0,49		B	C	D	E		
<i>B. elkanii</i> 5019	0,50		B	C	D	E		
LA26	0,52		B	C	D	E		
ACS43	0,54		B	C	D	E		
LA32B2	0,56		B	C	D	E	F	
LA4	0,62			C	D	E	F	G
LA35B	0,64				D	E	F	G
11AC3	0,81					E	F	G
LA11	0,99						F	G
LA21	1,01							G

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Tabla 4. Inhibición de *Stemphylium lycopersici*

Aislamiento	Medias*								
CONTROL	0,00	A							
LA33A1	0,00	A							
LA2	0,07	A	B						
<i>B. japonicum</i> E109	0,15	A	B	C					
AC4S41	0,26	A	B	C	D				
<i>B. elkanii</i> 587	0,36	A	B	C	D				
LA32A1	0,37	A	B	C	D				
LA32B1	0,39	A	B	C	D				
ACS41	0,43	A	B	C	D	E			
ACS43	0,45	A	B	C	D	E	F		
9ACS43	0,47	A	B	C	D	E	F		
LA32A2	0,51	A	B	C	D	E	F		
<i>B. diazoefficiens</i> 5080	0,52	A	B	C	D	E	F		
LA32B2	0,53	A	B	C	D	E	F		
LA35B	0,60	A	B	C	D	E	F	G	
11AC3	0,63	A	B	C	D	E	F	G	
LA26	0,71		B	C	D	E	F	G	H
LA13	0,72		B	C	D	E	F	G	H
<i>B. elkanii</i> 5019	0,78			C	D	E	F	G	H
<i>M. chacoense</i>	0,93				D	E	F	G	H
LA10	1,11					E	F	G	H
LA4	1,13						F	G	H
LA11	1,29							G	H
LA21	1,35								H

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Inhibición de crecimiento fúngico

En el ensayo se obtuvo que de los 23 aislados estudiados, 6 obtenidos de *P. parviflora* (LA32A2, LA13, LA32B1, LA32A1, LA33A1, LA2) y 2 de *V. caven* (AC4S41, ACS41), así como las cepas tipo *B. diazoefficiens* SEMIA 5080, *B. japonicum* E109, *B. elkanii* SEMIA 587 y *M. chacoense* fueron incapaces de inhibir el crecimiento de *F. graminearum*.

Respecto de *S. lycopersici*, 7 aislados de *P. parviflora* (LA2, LA32B1, LA32A1, LA32B1, LA32A2, LA32B2, LA35B), 5 de *V. caven* (AC4S41, ACS41, ACS43, 11AC3, 9ACS43) y las cepas tipo *B. diazoefficiens* SEMIA 5080, *B. elkanii* SEMIA 587 y *B. japonicum* E109 fueron incapaces de inhibir el crecimiento.

Además, fue encontrado que 13 de los 23 aislados provocaron una inhibición significativa de al menos uno de los dos hongos patógenos. Los aislados LA26, LA10, LA4, LA 11, y LA21, mostraron las mejores capacidades de inhibición de ambos hongos con valores de 26%, 23%, 34%, 68%, 72% para *F. graminearum* y 43%, 80%, 82%, 91% y 95% para *S. lycopersici*, respectivamente. Similar comportamiento tuvo la cepa de referencia *B. elkanii* 5019 que inhibió en un 23% a *F. graminearum* y en un 49% a *S. lycopersici* (Figura 4).

Para el caso de inhibición únicamente de uno de los dos hongos se encontraron valores de inhibición de *S. lycopersici* del 44% para el aislado LA13 y del 63% para *M. chacoense*. Mientras que para *F. graminearum* se hallaron valores significativos mayores al 19% para los aislados 9ACS43 (19%), ACS43 (27%) LA32B2 (29%), LA35B (36%) y 11AC3 (52%).

La capacidad de inhibición podría deberse a distintos mecanismos que influyen directa o indirectamente sobre el crecimiento de los hongos, como la producción de exudados o compuestos volátiles del tipo fitohormonal o de enzimas con actividad lítica sobre la pared de los hongos (Tejera et al., 2012; Fernández-Larrea Vega, 2001).

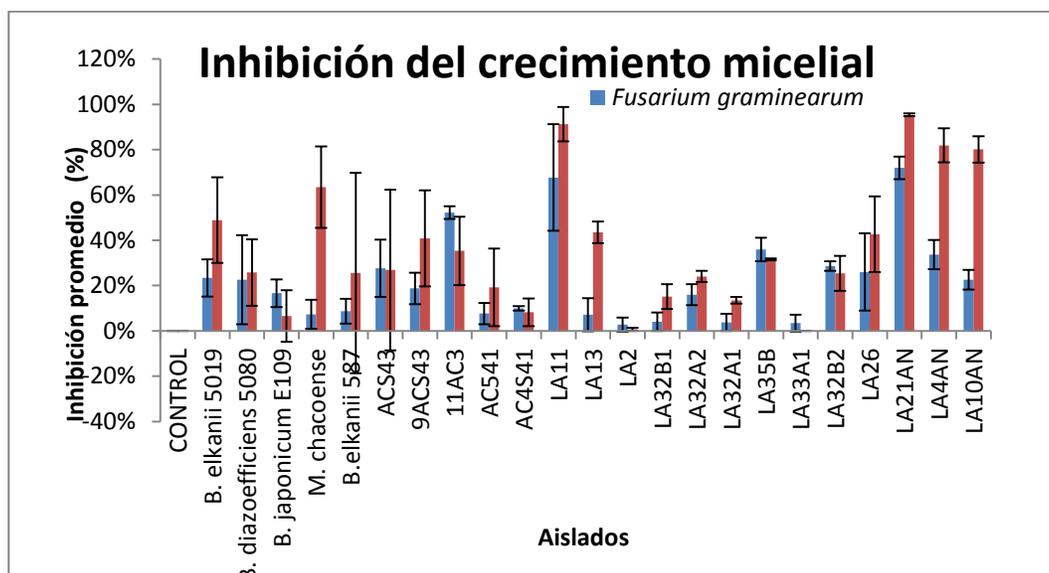


Figura 4 Inhibición del crecimiento de *F. graminearum* y *S. lycopersici* (cultivado in vitro) para los 23 aislados

Para sintetizar se puede decir que del total de aislados analizados (23), 13 inhibieron significativamente el crecimiento de *F. graminearum* y/o *S. lycopersici* en rangos del 19% al 72% y del 43% al 95% respectivamente, con respecto a los controles y en las Figuras 5 y 6 se muestran los 6 mejores aislados biocontroladores de cada hongo.

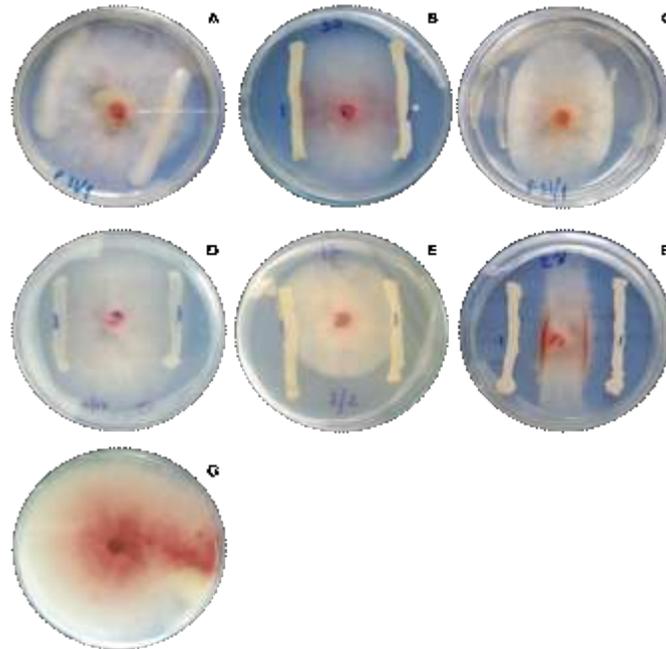


Figura 5. Ensayo de actividad antagónica vs. *Fusarium graminearum*. Son presentados los seis aislados más efectivos **A.** LA32B2 29% de inhibición. **B.** LA4 34% de inhibición. **C.** LA35B 36% de inhibición. **D.** 11AC3 52% de inhibición. **E.** LA11 68% de inhibición. **F.** LA21 72% de inhibición. **G.** *F. graminearum*, placa control.

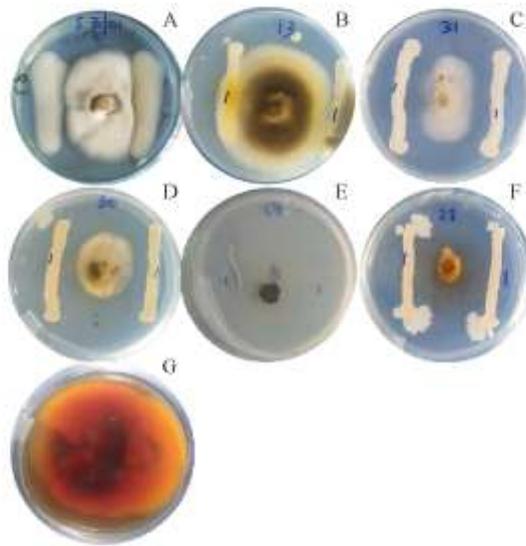


Figura 6. Ensayo de actividad antagonica vs. *Stemphylium lycopersici*. Son presentados los seis aislados más efectivos **A.** *M. chacoense* 46% de inhibición. **B.** LA13 43% de inhibición. **C.** LA10 80% de inhibición. **D.** LA4 82% de inhibición. **E.** LA11 91% de inhibición. **F.** LA21 95% de inhibición. **G.** *S. lycopersici*, placa control.

Estudios genéticos e identificación de bacterias endófitas

Los genomas de los aislados se asociaron a un perfil genético y se compararon con aquellos provenientes de las cepas de referencia *B. diazoefficiens* SEMIA 5080, *B. japonicum* E109, *B. japonicum* SEMIA 5079, *B. elkanii* SEMIA 5019, *B. elkanii* SEMIA 587 y *M. chacoense* generados por amplificación mediante PCR utilizando el primer BOXAR1 (Figura 7).

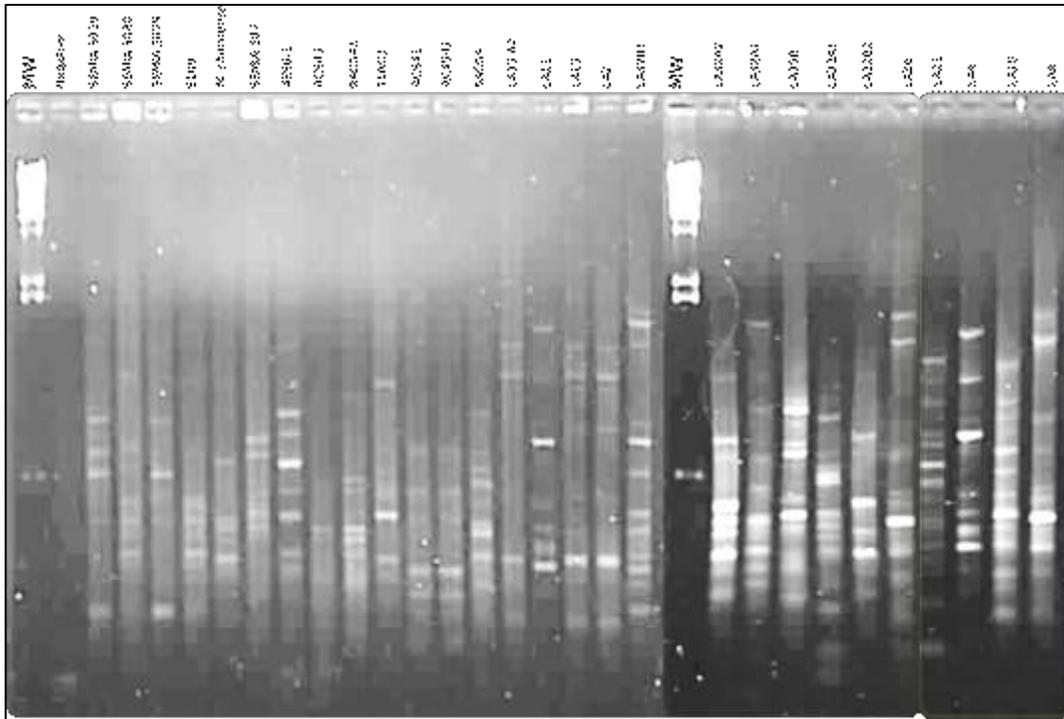


Figura 7. Perfiles genéticos de BOX-PCR de los aislados de *P. parviflora*, *V. caven* y las cepas control.

Los aislados y las cepas tipo se agruparon en cuatro grupos mayores (Figura 8) con una similitud de ~35%, dos de ellos sólo contuvieron aislados de *P. parviflora*: el grupo I (LA11, LA4 y LA21) y el IV (LA33A2, LA13 y LA2). Los otros 16 aislados se agruparon en los grupos II y III. Particularmente, el grupo II incluyó los aislados de *P. parviflora* LA33A1, LA10 y LA32B1 que se distribuyeron entre 3 diferentes subgrupos, los denominados LA26 y LA8 que se presentaron juntos y en una raíz diferente el aislado 5ACS4-2 de *V. caven*, el cual es diferente también de *V. caven* 9ACS43 y ACSA3 que se agruparon juntos con una similitud del ~70%. El grupo III incluyó aislados de *V. caven*, *P. parviflora*, *E. contorsiliquum* y *M. chacoense*, como también a las cepas tipo *B. elkanii*, *B. japonicum* y *B. diazoeficiens*, por lo que es probable que estas bacterias sean representantes de bacterias fijadoras de N₂. Con una similitud del 60%, el aislamiento de *P. parviflora* LA32A1 se agrupó con bacterias aisladas de *E. contorsiliquum* en un subgrupo diferente,

separado de los aislados LA35B, LA32A2 y LA32B. El aislado 11AC3 de *V. caven* difirió de ACS41 o de AC4S41. El grupo IV incluyó tres aislados, 2 de ellos con un perfil genético idéntico y por lo tanto podrían corresponder a una misma cepa, mientras que el otro aislado probó ser diferente. En cualquier caso, los organismos dentro de este grupo son los más diversos en comparación con las otras bacterias. Es evidente que a pesar de que los aislados hayan sido obtenidos de los mismos hospedantes ellos fueron genéticamente diversos y es probable que pertenezcan a diferentes especies.

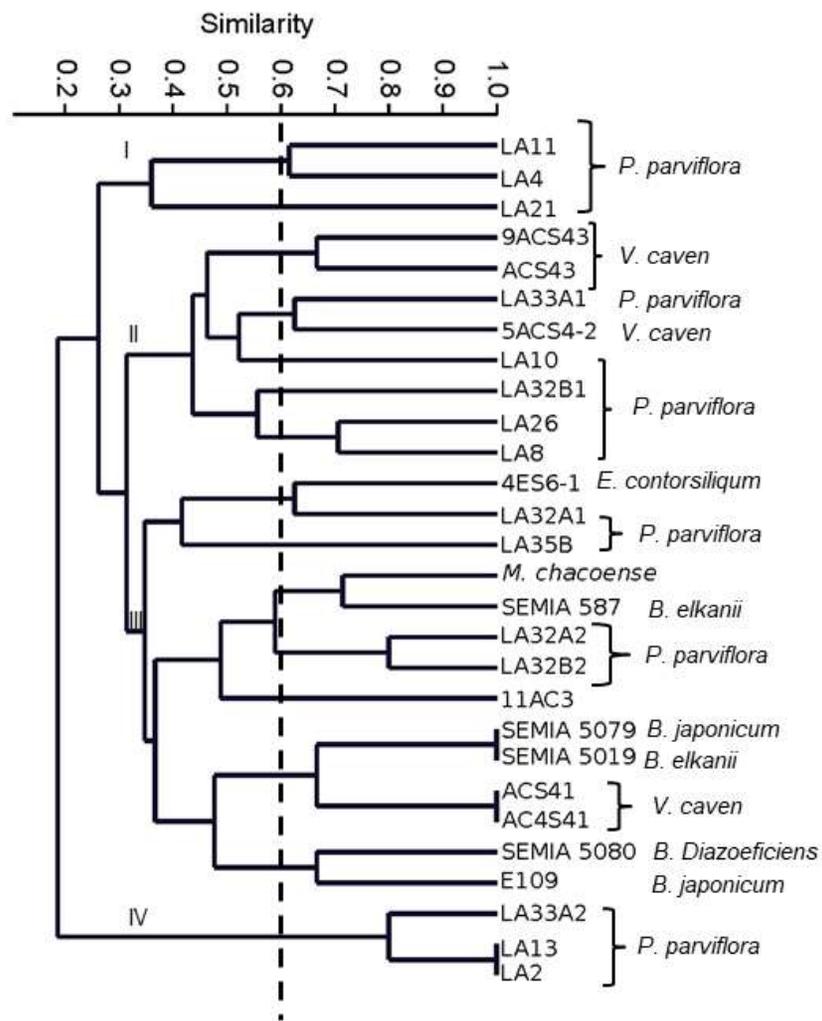


Figura 8. Dendrograma generado por análisis de grupos UPGMA usando el coeficiente de similitud de Dice basado en el perfil genético BOXAR1 de los aislados estudiados.

Con base en los resultados del dendrograma, se seleccionaron los organismos más diversos para amplificar y secuenciar su 16S rADN para una identificación preliminar.

El análisis BLAST basado en el alineamiento de la secuencia del 16S rADN sugiere que las bacterias endófitas de los nódulos pertenecen a 10 géneros clasificados dentro de las Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Firmicutes y Actinobacteria (Tabla 5 y Figura 9).

Tabla 5. Homología de las secuencias 16S rADN fijada por el análisis BLAST.

Taxa y especies más cercanas	Similaridad	Aislados	Hospedante de aislamiento
Alphaproteobacteria, Rhizobiales, Bradyrhizobiaceae			
<i>Bradyrhizobium</i>	99.66%	4ES6-1	<i>E. contorsiliquum</i>
Bradyrhizobium	99.85%	LA2	<i>P. parviflora</i>
<i>Bradyrhizobium</i>	88.03%	LA32A1	<i>P. parviflora</i>
Alphaproteobacteria, Rhizobiales, Rhizobiaceae, Sinorhizobium/Ensifer grupo			
Ensifer	99.85%	ACS41	<i>V. caven</i>
Alphaproteobacteria, Rhizobiales, Phyllobacteriaceae			
Mesorhizobium	100%	ACS43	<i>V. caven</i>
Mesorhizobium	99.79%	5ACS4-2	<i>V. caven</i>
Gammaproteobacteria, Caulobacterales, Caulobacteraceae			
<i>Caulobacter rhizosphaerae</i>	99.59%	LA33A1	<i>P. parviflora</i>
Gammaproteobacteria, Enterobacterales, Enterobacteraceae			
<i>Enterobacter</i>	91.4%	11AC3	<i>V. caven</i>
Gammaproteobacteria, Pseudomonadales, Pseudomonadaceae			
<i>Pseudomonas marginalis</i>	100%	LA10	<i>P. parviflora</i>
Gammaproteobacteria, Xanthomonadales, Rhodanobacteraceae;			
<i>Dyella marenensis</i>	99.86%	LA8	<i>P. parviflora</i>
Terrabacteria grupo, Firmicutes, Bacilli, Bacillales, Bacillaceae			
Bacillus	100%	LA11	<i>P. parviflora</i>
<i>Bacillus</i>	83.11%	LA21	<i>P. parviflora</i>
Bacillus	100%	LA4	<i>P. parviflora</i>
Terrabacteria grupo, Actinobacteria, Micrococcales, Microbacteriaceae			
<i>Microbacterium</i>	91.42%	LA32B1	<i>P. parviflora</i>
<i>Curtobacterium</i>	98.11%	LA35B	<i>P. parviflora</i>

Poder identificar, al menos, a nivel de género además nos permite confirmar lo observado en el microscopio óptico con respecto a la naturaleza de las paredes de algunos de los

aislamientos, por ejemplo para el caso de 4ES6-1, ACS43,11AC3, ACS41, 5ACS4-2, LA11, LA2, LA21, LA4 y LA8. Para algunos de los aislados que no fueron posible de determinar mediante la tinción de Gram, se pudieron definir como LA32A1 (Gram negativo), LA35B (Gram positivo), LA33A1 (Gram negativo) y LA10 (Gram negativo).

Los 3 aislados del *Phyllum* Firmicutes pertenecen al género *Bacillus* sp. Los 2 aislamientos del *Phyllum* Actinobacterias (*Microbacterium* sp. o *Curtobacterim* sp.) se obtuvieron de *P. parviflora* como también aquellos pertenecientes a las familias Calubacteraceae (*Caulobacter*), Rhodanobacteraceae (*Dyella*) y Pesudomonadaceae (*Pseudomonas*) (todas ellas Gammaproteobacterias). Para , *V. caven* solo 1 aislamiento (11AC3) se identificó como *Enterobacter* sp.(Gammaproteobacteria, Enterobacteraceae).

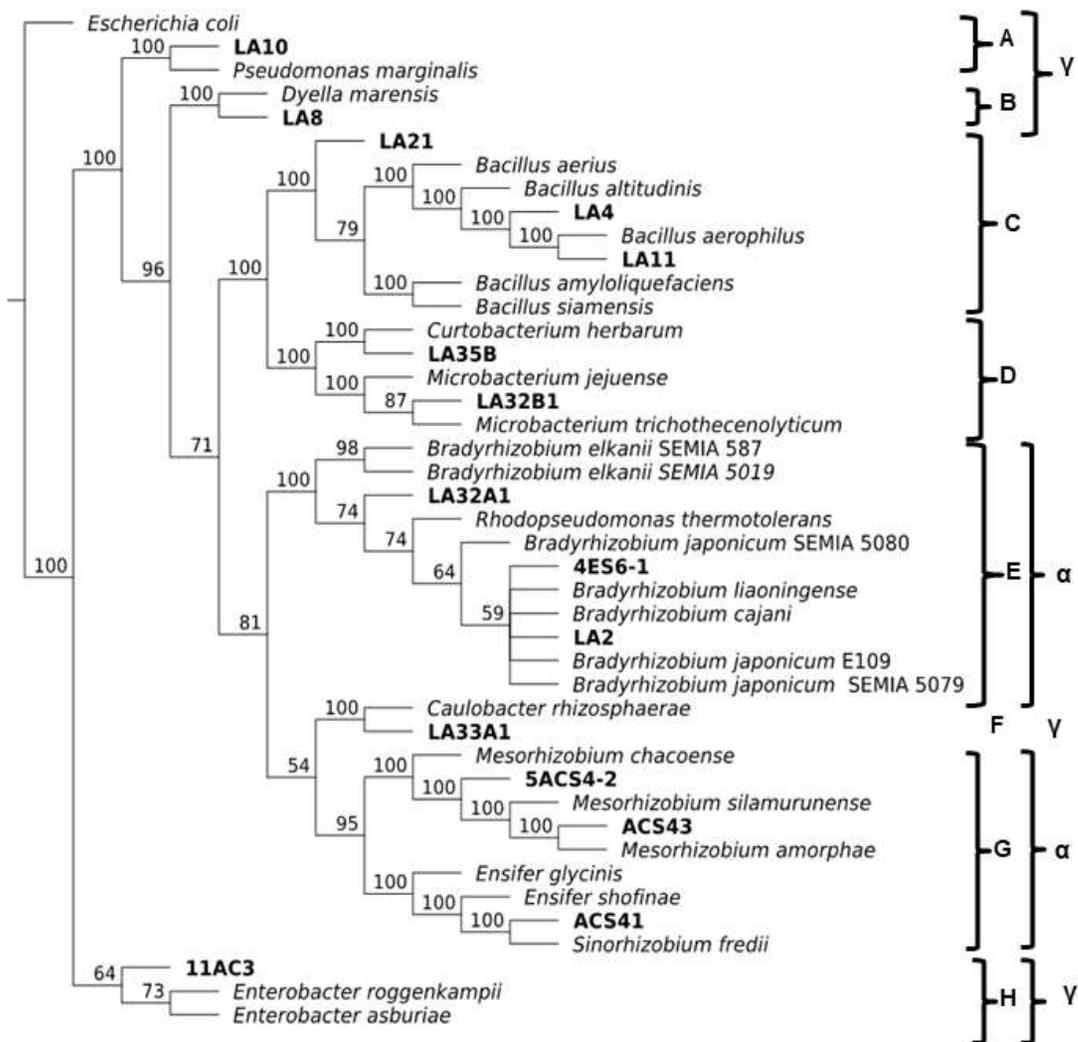


Figura 9. Relación filogenética para los aislados representativos basada en la similitud de las secuencias alineadas del gen 16S rADN. Se indica el nivel de soporte obtenido.

Por su parte, el análisis del gen 16S rADN (Figura 9) muestra 8 grupos principales (A-H). Las Gammaproteobacteria (A, B, F y H) se separaron en diferentes clados e incluyen los aislados de *P. parviflora* LA10, LA 8, LA 33A1 y *V. Caven* 11AC3; estas son bacterias endofíticas que viven dentro de los nódulos probablemente proveyendo a los nódulos o las plantas con alguna ventaja metabólica. Los alfa rizobios fijadores de N de *P. parviflora*, *E. contorsiliqum* y *V. caven* se agruparon separadamente (grupos E y G) con un valor de

soporte del 71%. Estas bacterias, como se dijo anteriormente, son representantes de los géneros *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* y *Ensifer*. Ha sido reportado que los rizobios comparten el ambiente nodular con un diverso grupo de Gammaproteobacteria endófitas así como otros taxa de bacterias, lo que podría estar relacionado con el nivel de nutrientes y el ambiente particular de los nódulos albergando una amplia variedad de bacterias no simbiotes las cuales podrían ser compañeras necesarias o competidoras por el nicho ecológico del nódulo, siendo necesario realizar estudios para establecer el rol y la dependencia de la simbiosis en estos otros organismos (Gyaneshwar et al., 2011).

Benhizia et al. (2004), aislaron de nódulos de *Hedysarum* sp, Gammaproteobacterias como *Pantoea agglomerans* Gavini, *Enterobacter kobei* Kosako, *Enterobacter cloacae* (Jordan) Hormaeche & Edwards, *Leclercia adecarboxylata* (Leclerc) Tamura, *Escherichia vulneris* (Brenner) Alnajjar & Gupta y *Pseudomonas* sp por primera vez. Además, Muresu et al. (2008), mostraron que Gammaproteobacterias como *Entrebacteriaceae*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Curtobacterium herbarum* y *Microbacterium* entre otras, son también habitantes comunes de los nódulos radiculares de 3 especies silvestres de *Hedysarum*. Todo esto sugiere que la nodulación en leguminosas podría no ser exclusivamente desencadenada por las Alphaproteobacterias (Gyaneshwar, 2011) y que otros organismos viven dentro de los nódulos aportando ventajas nutricionales o en la sanidad de las plantas.

Entre los géneros recuperados de leguminosas arbóreas nativas se encontraron bacterias que muy probablemente sean endófitos viviendo dentro de los nódulos provocados por los rizobios cumpliendo el rol de microorganismos cooperativos o también bacterias fijadoras de N. *Pseudomonas* (Gammaproteobacteria) desarrolló nódulos fijadores de N en *Robinia pseudoacacia* L. (Shiraishi et al., 2010) y *Acacia confusa* Merr. (Huang et al., 2012). *Geobacillus* (Firmicutes), *Paenibacillus* (Firmicutes) y *Rhodococcus* (Actinobacteria)

también fueron descritos como simbioses de *Lotus corniculatus* L. que desarrollaron nódulos en esta especie (Ampomah & Huss-Danell, 2011). Estas bacterias tienen secuencias de genes *nodA* similares a las correspondientes a *Mesorhizobium* aislados de las mismas plantas. Es altamente probable que estas especies de bacterias recibieran estos genes de *Mesorhizobium* mediante transferencia horizontal, aunque dicho proceso con genes asociados a la simbiosis no es tan frecuente y debería ser verificado. Saïdi et al. (2013) encontraron dentro de nódulos radiculares de *Vicia faba* L., bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Serratia*, *Stenotrophomonas* y *Xanthomonas*, aunque estas bacterias fallaron en inducir la nodulación en *Vicia* y aparentemente no poseerían genes *nifH* o *nodC*.

Los alfarizobios se agruparon en tres diferentes grupos, *Mesorhizobium* es más próximo al grupo de *Sinorhizobium* que al grupo de *Bradyrhizobium* como se pudo observar previamente en la Figura 9. Los aislados LA2, LA32A1 y 4ES61 que se obtuvieron de *P. parviflora* y *E. contorsiliquum* respectivamente, pertenecen a un grupo que incluye a cepas tipo de *B. japonicum* sugiriendo que también podrían ser *Bradyrhizobium* sp. Es interesante que *B. elkanii* SEMIA 6403 (=BR 8205) es la cepa recomendada para el uso de inoculantes brasileños para *P. parviflora* (Binde et al., 2009). Los miembros de las Alphaproteobacteria albergan representantes de 3 familias (Bradyrhizobiaceae, Rhizobiaceae y Phyllobacteriaceae).

Los nódulos de *E. contorsiliquum* contenían *Bradyrhizobium* sp., que se caracteriza por su velocidad de crecimiento extremadamente lenta y el tamaño muy pequeño de las células (estas fueron difícilmente observables en el microscopio). Esto y la homología de secuencia de 16S rADN con la cepa tipo *Bradyrhizobium lianonginense* Xu sugiere que es un representante de *B. lianonginense*. Además, como era esperado para esta especie, el aislado alcalinizó el medio de cultivo. Los aislados de *P. parviflora* pertenecerían al género

Bradyrhizobium y a pesar de las diferencias observadas entre los aislamientos, deberían analizarse otros marcadores moleculares para poder establecer su identidad con mayor precisión. La diferencia de estos dos géneros entre los demás se debe a la velocidad de crecimiento.

Los aislamientos de *V. caven* 5ACS4-2 y ACS43 se agruparon con *Mesorhizobium* sp. y el aislamiento ACS41 correspondería a un representante de *Ensifer* al haber sido agrupado con *Sinorhizobium* sp. (*Ensifer* sp.) con un alto valor (100%).

Los rizobios aislados para los árboles nativos incluidos en este trabajo coinciden con estudios previos que determinaron que 59 especies de *Mesorhizobium* desarrollaron nódulos en un amplio rango de diferentes leguminosas: *M. amorphae* en *Amorpha fruticosa* L. (Wang et al., 1999), *M. silamurunense* en *Astragalus membranaceus* Linn. (Zhao et al., 2012) y *Mesorhizobium acaciae* en *Acacia melanoxydon* R. Br (Zhu et al., 2015) entre otras. Beukes et al. (2019) estudiaron los nódulos radiculares de *Vachellia karoo* (Hayne) Banfi & Galasso, los cuales contenían Alphaproteobacteria: *Bradyrhizobium*, *Ensifer* (32 aislamientos), *Mesorhizobium* (27 aislamientos) y *Rhizobium*, así como Betaproteobacteria. Ambos géneros, *Ensifer* y *Mesorhizobium*, incluyen un número de especies del género *Acacia* de acuerdo con información previa reportada para otras Acacias africanas (especies de los géneros *Vachellia* y *Senegalia*) las cuales también fueron noduladas predominantemente por *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Ensifer* (Beukes et al., 2019). También Cordero et al. (2016) encontraron que *Vachellia macracantha* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) Seigler & Ebinger, esnodulada por *Ensifer numidicus* Merabet, *Ensifer kummerowiae* Wei, *Ensifer fredii* (Scholla & Elkan) Chen, *Ensifer americanus* Toledo y *Ensifer sahelii* De Lajudie.

En el trabajo de Andrews & Andrews (2017) puede consultarse una lista completa de los rizobios y leguminosas que interactúan entre sí.

CONCLUSIONES

Con este trabajo sobre leguminosas arbóreas nativas fue posible concluir que *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong. (“timbó”) establece simbiosis para la fijación de nitrógeno con *Bradyrhizobium lianonginense* Xu, *Poecilanthe parviflora* Benth. (“lapachillo”) desarrolla nódulos con *Bradyrhizobium* sp., cepas que hace falta continuar estudiando para determinar las especies. *Vachellia caven* (Molina) Seigler & Ebinger, (“espinillo”) es nodulada tanto por cepas de *Ensifer* sp. como por *Mesorhizobium* sp., sugiriendo que es una especie promiscua.

Así mismo, *V. caven* y *P. parviflora* albergan una gran diversidad de bacterias endófitas junto a los alfa-rizobios en los nódulos de sus raíces.

Cabe destacar que los nódulos de las especies nativas estudiadas contenían bacterias pertenecientes a las Gammaproteobacteria (*Pseudomonas*, *Dyella*, *Caulobacter*), las Actinobacteria (*Curtobacterium*, *Micobacterium*) y Firmicutes (*Bacillus*), bacterias endófitas que podrían jugar un rol tanto en la nutrición de las plantas como en su sanidad.

Fue posible también describir la capacidad de la cepa de *Mesorhizobium chacoense* de biocontrolar el crecimiento del micelio del hongo fitopatógeno *Stemphyllium lycopersici*, la cual no se hallaba documentada.

El presente estudio permitió conocer la diversidad de grupos de bacterias asociadas a especies forestales nativas de la Argentina y sus características promotoras del crecimiento vegetal. Sin embargo, resulta necesario seguir estudiando las bacterias endófitas de los nódulos para entender sus efectos benéficos en el crecimiento de las plantas, su rol en la interacción planta-microorganismos y su potencial aprovechamiento en las especies leguminosas forestales nativas, a fin de promover prácticas agrícolas y forestales sustentables en ecosistemas extremos o degradados o en agroecosistemas productivos.

BIBLIOGRAFIA

Ampomah, O.Y., K. Huss-Danell. 2011. Genetic diversity of root nodule bacteria nodulating *Lotus corniculatus* and *Anthyllis vulneraria* in Sweden. *Systematic and Applied Microbiology* 34: 267–275.

Andrews, M. & M.E. Andrews. 2017. Specificity in Legume-Rhizobia Symbioses. *International Journal of Molecular Sciences* 18(4): 705.

Arce, R. & M. de Lourdes. 2007. A Checklist and Synopsis of American Species of *Acacia* (Leguminosae: Mimosoideae). No. C/583.321 R5.

Benhizia, Y., H. Benhizia, A. Benguedouar, R. Muresu, A. Giacomini & A. Squartini. 2004. Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. *Systematic and Applied Microbiology* 27(4): 462-8.

Beukes Chrizelle, W., F.S. Boshoff, L. Phalane Francina, A.I. Hassen, M.M. Le Roux, T. Stępkowski, S.N. Venter & E.T. Steenkamp. 2019. Both Alpha- and Beta-Rhizobia occupy the root nodules of *Vachellia karroo* in South Africa. *Frontiers in Microbiology* 10: 1195.

Binde, D.R., P. Menna, E.V. Bangel, F.G. Barcellos & M. Hungria. 2009. Rep-PCR fingerprinting and taxonomy based on the sequencing of the 16S rRNA gene of 54 elite commercial rhizobial strains. *Applied Microbiology and Biotechnology* 83: 897–908.

Biomatters. Geneious version R9.0.5 software, <http://www.geneious.com>.

Boukhatem, Z.F., O. Domergue, A. Bekki, C. Merabet, S. Sekkour, F. Bouazza, R. Duponnois, J. de Lajudie & A. Galiana. 2012. Symbiotic characterization and diversity of rhizobia associated with native and introduced acacias in arid and semi-arid regions in Algeria. *FEMS Microbiology Ecology* 80: 534–547.

Burkart, R., N.O. Bárbaro, R.O. Sánchez & D.A. Gómez. 1999. Eco-regiones de la Argentina. Administración de Parques Nacionales. Secretaria de Recursos Naturales y Desarrollo Sustentable. Presidencia de la Nación.

Cabrera, Á.L. 1971. Fitogeografía de la República Argentina. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica 14: 1-42.

Carrere, R. 2016. El bosque natural uruguayo: utilización tradicional y usos alternativos. Disponible en <http://www.guayubira.org.uy/monte/Ciedur7.html>. Último acceso: Enero 2020.

Cordero I., B. Ruiz-Díeza, T. Coba de la Peña, L. Balaguerb, M.M. Lucasa, A. Rincóna & J.J. Pueyo. 2016. Rhizobial diversity, symbiotic effectiveness and structure of nodules of *Vachellia macracantha*. Soil Biology & Biochemistry 96: 39-54.

De Bruijn, F. 1992. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. Applied and Environmental Microbiology 58(7): 2180-2187.

De Faria, S.M., A.A. Franco, R.M. de Jesús, D.S. Menandro, J.B. Baitello & E.S.F. Mucci. 1984. New nodulating legume trees from south-east Brazil. New Phytologist 98: 317-328.

Delaporte Quintana, P.A.G. 2018. Contribución de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en la nutrición de hierro y fósforo de plantas de frutilla (*Fragaria ananassa* Duch.). Disponible en: <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/84816>. Último acceso: Marzo de 2020.

Di Rienzo, J.A., F. Casanoves, M.G. Balzarini, L. Gonzalez, M. Tablada & C.W. Robledo. 2015. InfoStat versión 2015l. Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba.

Dice, L. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26(3): 297-302.

Doyle, J.J. & M.A. Luckow. 2003. The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiology* 131: 900–910.

Fernández-Larrea Vega, O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 62: 96-100.

Flora Argentina y del Cono sur. 2020. Disponible en <http://www.floraargentina.edu.ar/>. Último acceso: Enero 2020.

Franché, C., K. Lindström & C. Elmeric. 2009. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant Soil* 32: 35–59.

Franco, M.E.E., M.I. Troncozo, S.M.Y. López, G. Lucentini, R. Medina, M.C.N. Saparrat & P.A. Balatti. 2017. A survey on tomato leaf grey spot in the two main production areas of Argentina led to the isolation of *Stemphylium lycopersici* representatives which were genetically diverse and differed in their virulence. *European Journal of Plant Pathology* 149(4): 983-1000.

Frioni, L., R. Dodera, D. Malate's & I. Irigoyen. 1998. An assessment of nitrogen fixation capability of leguminous trees in Uruguay. *Applied Soil Ecology* 7: 271–279.

Fterich A., M. Mahdhi, M.A. Caviedes, E. Pajuelo, R. Rivas, I.D. Rodríguez-Llorente & M. Mars. 2011. Characterization of root-nodulating bacteria associated to *Prosopis farcta* growing in the arid regions of Tunisia. *Archives of Microbiology* 193: 385–397.

Gómez-Luna, E., D. Fernando-Navas, G. Aponte-Mayor & L.A. Betancourt-Buitrago. 2014. Metodología para la revisión bibliográfica y la gestión de información de temas científicos, a través de su estructuración y sistematización. *Dyna* 81(184): 158-163.

- Gyaneshwar, P.A., M. Hirsch, L. Moulin, W.M. Chen, G.N. Elliott & C. Bontemps.** 2011. Legume-Nodulating Betaproteobacteria: Diversity, Host Range, and Future Prospects. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24(11): 1276–1288.
- Hoque, M.S., L.M. Broadhurst & P.H. Thrall.** 2011. Genetic characterization of root-nodule bacteria associated with *Acacia salicina* and *A. stenophylla* (Mimosaceae) across south-eastern Australia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61: 299–309.
- Huang, B., C. Lv, Y. Zhao & Y. Huang.** 2012. A Novel Strain D5 Isolated from *Acacia confusa*. *PLOS ONE* 7(11): e49236.
- Khan, M. H., A. Sessitsch, M. Harris, K. Fatima, A. Imran, M. Arslan, G. Shabir, Q.M. Khan & M. Afzal.** 2015. Cr-resistant rhizo- and endophytic bacteria associated with *Prosopis juliflora* and their potential as phytoremediation enhancing agents in metal-degraded soils. *Frontiers in Plant Science. Plant Biotechnology* 5: 755.
- Lahitte, H.B. & J.A. Hurrel.** 1994. Los arboles de la Isla Martín García. Árboles y arbustos (nativos y naturalizados) de la Reserva Natural y Cultural Isla Martín García (Buenos Aires, Argentina). *Programas Estructura y Dinámica y Ecología del No Equilibrio*, Comisión de Investigaciones Científicas, Buenos Aires. 18-24 pp.
- Lewis, G., B. Schrire, B. Mackinder & M. Lock.** 2005. *Legumes of the world*. UK: Royal Botanic Gardens.
- López, S. & P.A. Balatti.** 2011. Closely related strains of *Bradyrhizobium* contained in commercial inoculates of soybean are identified by a set of PCR reactions. *Genetic Engineering and Biotechnology Journal* 2011: GEBJ-34.

López, S., G. Pastorino, M. Franco, R. Medina, C. Lucentini, M. Saparrat & P. Balatti. 2018. Microbial endophytes that live within the seeds of two tomato hybrids cultivated in Argentina. *Agronomy* 8(8): 136.

Malbrán, I., C.A. Mourellos, P.A. Balatti & G.A. Lori. 2019. Aggressiveness and genetic variability of *Fusarium graminearum* populations from the main wheat production area of Argentina. *Journal of King Saud University-Science* 31(4): 1215-1219.

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

Ndlovu, J., D.M. Richardson, J.R.U. Wilson & J.J. Le Roux. 2013. Co-invasion of South African ecosystems by an Australian legume and its rhizobial symbionts. *Journal of Biogeography* 40: 1240–1251.

Paredes, M.C. 2013. Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas y gramíneas. Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Católica Argentina. Disponible en:

<http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/tesis/fijacion-biologica-nitrogeno-leguminosas.pdf>. Ultimo acceso: Marzo de 2020

Peix, A., L. Carro, E. Cerda-Castillo, C. Tejedor, M.H. Ramírez-Bahena & E. Velázquez. 2012. New research on the genetic diversity of non-rhizobial endophytes inhabiting legume nodules. Chapter 9, In: *Genetic Diversity: New Research* Editors

Peix, A., M.H. Ramírez-Bahena, E. Velázquez & E.J. Bedmard. 2015. Bacterial associations with Legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences* 34: 17-42.

Plazas-Jiménez, O.D. & E. Coy-Barrera. 2016. Antifungal activity of ultrasound-assisted acetone extract and alkylresorcinol-enriched fractions from *Hordeum vulgare* L. against *Fusarium oxysporum*. *Cultivos Tropicales* 37(4): 173-181

Ramírez, V., A. Baez, P. López, R. Bustillos, M.A. Villalobos, R. Carreño, J.L. Contreras, J. Muñoz-Rojas, L.E. Fuentes, J. Martínez & J.A. Munive. 2019. Chromium Hyper-Tolerant *Bacillus* sp. MH778713 Assists Phytoremediation of Heavy Metals by Mesquite Trees (*Prosopis laevigata*). *Frontiers in Microbiology* 10: 1833.

Raven, P.H & R.M. Polhill. 1981. *Advances in Legume Systematics*. UK: Royal Botanic Gardens.

Reeve, W., T. Tian, L. Bräu, L. Goodwin, C. Munk, C. Detter, R. Tapia, C. Han, K. Liolios, M. Huntemann, A. Pati, T. Woyke, K. Mavrommatis, V. Markowitz, N. Ivanova, N. Kyrpides & A. Willems. 2014. Genome sequence of *Ensifer arboris* strain LMG 14919T; a microsymbiont of the legume *Prosopis chilensis* growing in Kosti, Sudan. *Standards in Genomic Sciences* 9: 473-483

Remigi, P., J. Zhu, J.P. Young & C. Masson-Boivin. 2016. Symbiosis within Symbiosis: Evolving Nitrogen-Fixing Legume Symbionts. *Trends in Microbiology* 24(1): 63-75.

Restrepo, G., S. Marulanda, Y. Pérez, A. Díaz, V. Baldani & A. Hernández – Rodríguez. 2019. Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *CENIC Ciencias Biológicas* 46(1): 63-76.

Reysenbach, A.L., G.S. Wickham & N.R. Pace. 1994. Phylogenetic analysis of the hyperthermophilic pink filament community in Octopus Spring, Yellowstone National Park. *Applied Environmental Microbiology* 60(6): 2113-2119.

Rodríguez, P.A. & R. Arenas. 2018. Hans Christian Gram y su tinción. *Derma Cosmética y Quirúrgica* 16(2): 166-167.

Rohlf, F. 1992. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system. Applied Biostatistics.

Román-Ponce, B., Y. Hua Li, M.S. Vásquez-Murrieta, X. Hua Sui, W. Feng Chen, P. Estrada-de los Santos & E. Tao Wang. 2015. *Brevibacterium metallicus* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from roots of *Prosopis laegivata* grown at the edge of a mine tailing in Mexico. *Archives of Microbiology* 197(10) 1007/s00203-015-1156-6.

Roman-Ponce, B., D. Wang, M.S. Vasquez-Murrieta, W. Feng Chen, P. Estrada-de los Santos, X. Hua Sui & E. Tao Wang. 2016. *Kocuria arsenatis* sp. nov., an arsenic-resistant endophytic actinobacterium associated with *Prosopis laegivata* grown on high-arsenic-polluted mine tailing. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66: 1027–1033.

Saïdi, S., S. Chebil, & M. Gtari. 2013. Characterization of root-nodule bacteria isolated from *Vicia faba* and selection of plant growth promoting isolates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 29: 1099–1106.

Sambrook, J., E.F. Fritsch & T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.

Sanger, F., S. Nicklen & A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74(12): 5463-5467.

Sarandón, S.J. & C.C. Flores. 2014. Agroecología bases teóricas para el diseño y manejo de agroecosistemas sustentables. Disponible en: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/37280>. Ultimo acceso: Marzo de 2020.

Seigler, D.S. & J.E. Ebinger.2005. New combinations in the genus *Vachellia* (Fabaceae: Mimosoideae) from the New World. *Phytologia* 87: 139-178.

Shiraishi A., M. Norihisa & H. Taizo. 2010. Nodulation in black locust by the Gammaproteobacteria *Pseudomonas* sp. and the Betaproteobacteria *Burkholderia* sp. *Systematic and Applied Microbiology* 33: 269–274.

Singh, S.K., A. Pancholy, S.K. Jindal & R. Pathak. 2011. Effect of plant growth promoting rhizobia on seed germination and seedling traits in *Acacia senegal*. *Annals of Forest Research* 54(2): 161-169.

Soliman, A.S., N.T. Shanan, O.N. Massoud & D.M.Swelim. 2012. Improving salinity tolerance of *Acacia saligna* (Labill.) plant by arbuscular mycorrhizal fungi and *Rhizobium* inoculation. *African Journal of Biotechnology* 11(5): 1259-1266.

Sprent, J.I. 2007. Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. *New Phytologist* 174: 11–25.

Sprent, J.I., J.K Ardley & E. K. James. 2013. From North to South: A latitudinal look at legume nodulation processes. *South African Journal of Botany* 89: 31-41.

Tamura, K., M. Nei & S. Kumar. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(30): 11030-11035.

Tejera, B., M. Heydrich & M.M. Rojas. 2012. Antagonismo de *Bacillus* spp. frente a hongos fitopatógenos del cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Revista de Protección Vegetal* 27(2): 117-122.

Thompson, J.D., D.G. Higgins & T.J. Gibson.1994. CLUSTAL: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22(22): 4673-4680.

Ulibarri, E. A. 2002. Leguminosas. Nativas y exóticas. Colección Biota Rioplatense: inventario temático de la biota de la región del Delta del Paraná, Isla Martín García y Ribera Platense. Ed. Colin Sharp. Buenos Aires. 16 pp

UTHSCSA University of Texas Health Science Center, San Antonio, USA. Image tool 3.0 (Image Tool Software Copyright 1995).

Valverde, A., A. Fterich, M. Mahdhi, M.H. Ramirez-Bahena, M.A. Caviedes, M. Mars, E. Velazquez & I. Rodriguez-Llorente. 2010. *Paenibacillus prosopidis* sp. nov., isolated from the nodules of *Prosopis farcta*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 60: 2182–2186.

Velazquez, E., J.M. Igual, A. Willems, M.P. Fernández, E. Munoz & P.F. Mateos. 2001. *Mesorhizobium chacoense* sp. nov., a novel species that nodulates *Prosopis alba* in the Chaco Arido region (Argentina). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51: 1011–1021.

Vincent, J.M. 1970. A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. Oxford: Blackwell Scientific 12(5): 440.

Vinuesa, P., C. Silva, M.J. Lorite, M.L. Izaguirre-Mayoral, E.J. Bedmar & E. Martínez-Romero. 2005. Molecular systematics of rhizobia based on maximum likelihood and Bayesian phylogenies inferred from *rrs*, *atpD*, *recA* and *nifH* sequences, and their use in the classification of *Sesbania* microsymbionts from Venezuelan wetlands. Systematic and Applied Microbiology 28: 702–716.

Wang, E.T., P. van Berkum, X.H. Sui, D. Beyene, W.X. Chen, & E. Martínez-Romero. 1999. Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from Chinese soils and description of *Mesorhizobium amorphae* sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology 49: 51-65.

Yanni, Y.G., F.B. Dazzo & M.I. Zidan. 2011. Beneficial endophytic rhizobia as biofertilizer inoculants for rice and the spatial ecology of this bacteria–plant association. In *Bacteria in agrobiology: Crop ecosystems*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp: 265-294.

Zhao, C.T., E.T. Wang, Y.M. Zhang, W.F. Chen, X.H. Sui, W.X. Chen, H.C. Liu, & X.X. Zhang. 2012. *Mesorhizobium silamurunense* sp. nov., isolated from root nodules of *Astragalus* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62: 2180-2186.

Zhu, Y.J., J. Kun, Y.L. Chen, S.K. Wang, X.H. Sui & L.H. Kang. 2015. *Mesorhizobium acaciae* sp. nov., isolated from root nodules of *Acacia melanoxylon* R. Br. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65: 3558-3563.

ANEXO1

Tabla 6. Resumen de la búsqueda bibliográfica.

	Título	Endófito	Autor	Año	Hospedante	Tipo de simbiote	Función biológica	Análisis 16s	país
1	Rhizobial diversity, symbiotic effectiveness and structure of nodules of <i>Vachellia macracantha</i> .	<i>Rhizobium jaguaris</i> <i>R. indigoferae</i> <i>R. laguerreae</i> <i>Ensifer numidicus</i> <i>E. kummerowiae</i> <i>E. fredii</i> <i>E. americanus</i>	Cordero et al .	2016	<i>Vachellia macracantha</i>	rizobio	N	si	Perú
2	<i>Brevibacterium metallicus</i> sp. nov., an endophytic bacterium isolated from roots of <i>Prosopis laegivata</i> grown at the edge of a mine tailing in Mexico	<i>Brevibacterium metallicus</i>	Román-Ponce et al .	2015	<i>Prosopis laegivata</i>	endofito	Metales pesados	si	México
3	Genome sequence of <i>Ensifer arboris</i> strain LMG 14919T; a microsymbiont of the legume <i>Prosopis chilensis</i> growing in Kosti, Sudan	<i>Ensifer arboris</i>	Reeve et al .	2014	<i>Prosopis chilensis</i> <i>Acacia senegal</i>	rizobio	N	si	Sudán

4	Kocuria arsenatis sp. nov., an arsenic-resistant endophytic actinobacterium associated with Prosopis laegivata grown on high-arsenic-polluted mine tailing	<i>Kocuria arsenatis</i>	Román-Ponce et al .	2016	<i>Prosopis laegivata</i>	endófito	Arsénico	si	México
5	Paenibacillus prosopidis sp. nov., isolated from the nodules of Prosopis farcta	<i>Paenibacillus prosopidis</i>	Valverde et al .	2010	<i>Prosopis farcta</i>	endófito		si	España
6	Chromium Hyper-Tolerant Bacillus sp. MH778713 Assists Phytoremediation of Heavy Metals by Mesquite Trees (Prosopis laevigata).	<i>Bacillus sp. MH778713</i>	Ramírez et al .	2019	<i>Prosopis laegivata</i>	endófito	Cromo		México
7	Effect of plant growth promoting rhizobia on seed germination and seedling traits in Acacia Senegal	<i>Sinorhizobium saheli</i>	Singh et al .	2011	<i>Acacia senegal</i>	rizobio	N		India
		<i>Bacillus licheniformis</i>				endófito	solubilizador de fosfato		
		<i>Sinorhizobium kostiense</i>			<i>Prosopis cineraria</i>	Rizobio	N	India	
		<i>S. saheli</i>				Rizobio	N		

8	Genetic characterization of root-nodule bacteria associated with <i>Acacia salicina</i> and <i>A. stenophylla</i> (Mimosaceae) across south-eastern Australia	<i>Ensifer spp</i> <i>Phyllobacterium spp</i> <i>Mesorhizobium spp</i> <i>Rhizobium spp</i> <i>Devosia spp</i> <i>Bradyrhizobium spp</i>	Hoque et al 2011	<i>Acacia salicina</i>	rizobio	N	si	Australia
		<i>Pseudomonas spp.</i>			<i>Acacia spp</i>			
9	Improving salinity tolerance of <i>Acacia saligna</i> (Labill.) plant by arbuscular mycorrhizal fungi and <i>Rhizobium</i> inoculation	<i>Ensifer spp</i> <i>Mesorhizobium spp</i> <i>Rhizobium spp</i> <i>Bradyrhizobium spp</i> <i>Achromobacter spp</i> <i>Burkholderia herbalspirillum</i>	Soliman et al 2013	<i>acacia saligna</i>	rizobio	N/salinidad	no	Egipto
		<i>Sinorhizobium terangaie</i>						
10	Characterization of root-nodulating bacteria associated to <i>Prosopis farcta</i> growing in the arid	<i>Ensifer terrangaie</i> <i>E. saheli</i> <i>E. meliloti</i> <i>E. fredii</i>	Fterich et al 2011	<i>prosopis fracta</i>	rizobio	N	si	Túnez

regions of Tunisia

E. medicae
E. numidicus
E. kostiense
E. arboris
E. xinjiangense
E. garamantidis
E. morelense
E. adhaerens
Agrobacterium tumefaciens
Rhizobium leguminosarum
R. giardinii
R. galegae
R. gallicum
Mesorhizobium huakuii
M. ciceri
M. loti
M. tianshanense
M. amorphae
M. mediterraneum
Azorhizobium caulinodans
Burkholderia tuberum

11	Cr-resistant rhizo- and endophytic bacteria associated with <i>Prosopis juliflora</i> and their potential as	<i>Staphylococcus. sp</i> <i>S. saprophyticus</i> <i>S. epidermidis</i> <i>Massilia</i>	Khan et al .	2015	<i>Prosopis juliflora</i>	endófito	Cromo	si	Pakistan
----	--	--	--------------	------	---------------------------	----------	-------	----	----------

phyto remediation
 enhancing agents
 in metal-degraded
 soils

sp Ochrobactru
m intermedium
Arthrobacter sp
Pseudomonas
sp
P. stutzeri
P. aeruginosa
Bacillus sp
B. licheniformis
B. pumilus
B. aquimaris
B. aerophilus
Aerococcus sp
Pantoea
stewartii
Microbacterium
arborescens
Aerococcus
viridans
Brevundimonas
vesicularis
Enterobacter sp

12	Symbiotic characterization and diversity of rhizobia associated with native and introduced acacias in arid and semi-arid regions in Algeria	<i>Ensifer spp</i> <i>Mesorhizobium spp</i> <i>Rhizobium spp</i> <i>Bradyrhizobium spp</i> <i>Ochrobactrum spp</i>	Boukhatem et al .	2012	<i>Acacia saligna</i>	Rizobio, endófito	N, salinidad	si	Argelia
----	---	--	-------------------	------	-----------------------	-------------------	--------------	----	---------

13	Co-invasion of South African ecosystems by an Australian legume and its rhizobial symbionts	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> <i>Rhizobium gallicum</i> <i>R. lusitanum</i> <i>R. miluonense</i> <i>R. multihospitium</i> <i>R. tropici</i> <i>Burkholderia caledonica</i> <i>B. graminis</i> <i>B. phytofirmans</i>	Ndlovu et al 2013	<i>Acacia pycnantha</i>	rizobio	N	si	Sudafrica
----	---	--	-------------------	-------------------------	---------	---	----	-----------

ANEXO2

Secuencias para el armado del dendrograma

4ES6-1 (419 pb)

TTGGTTCGGAACAACACAGGGAACTTGTGCTAATACCGGATAAGCCCTTACGGGGAAAGATTTATCGCCGAAAGATCGGCCCG
CGTCTGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGG
ACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCGC
GTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAGCTCTTTTGTGCGGGAAGATAATGACGGTACCGCAAGAATAAGCCCCGGCTAACT
TCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATCACTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGGTCTTTA
A

ACS43 (419 pb)

TCTCTACGGAACAACCTCCGGGAACTGGAGCTAATACCGTATACGTCCTTCGGGAGAAAGATTTATCGGAGATGGATGAGCCCG
CGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGG
ACTGAGACACGGCCCACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGC
GTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAGCTCTTTCAACGGTGAAGATAATGACGGTAACCGTAGAAGAAGCCCCGGCTAACT
TCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCTAGGCGGATACTTA
A

11AC3 (458 pb)

ATGGAGGGGGATAACTACTGTGAACGGTAGCTAATACCGCACAAACGTCTCACGACCAAAAAGGGGGACCTTCTGGCCTCTTGCC
ATCTGATGTGCCCGATGGGATTATCTATTATGTGGGGTAAAGGCTCACCTAGGCGACAATCCCTATCTGGTCTGAGAGGATGAC
CCGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCCCACTCCTACGGGAGGCGGCAGTGGGGAATATTGTGCAATGTGCGCAAGCCTGAT
GCGGCCATGCGGCGTGTGTGAAGAAAGCGTTCTGGTTGTAAGTACTTTTTCCGGGGAGGAAGGTGTTGAGGTTAATAACCTCT
CCAATTGAGGTTACCCGCAGAAAAACACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGGGCGAGCGTTTATCG
GAATTATTGGGCGTATAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAC

ACS41 (419 pb)

TTTCTACGGAATAACGCAGGGAACTTGTGCTAATACCGTATGAGCCCTTCGGGGGAAAGATTTATCGGGAAAGGATGAGCCCG
CGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGG
ACTGAGACACGGCCCAAACCTCATAACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGC
GTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAGCTCTTTACCCGGTGAAGATAATGACGGTAACCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACT
TCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCTAGGCGGACATTTA
A

5ACS4-2 (419 pb)

TCTCTACGGAACAACCTCCGGGAAACTGGAGCTAATACCGTATACGTCCTTCGGGAGAAAGATTTATCGGAGATGGATGAGCCCG
CGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGG
ACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGC
GTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCAACGGTGAAGATAATGACGGTAACCGTAGAAGAAGCCCCGGCTAACT
TCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATACTTA
A

LA11 (467 pb)

TAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTTCG
GCTGTCACCTTACAGATGGACCCGCGGCCGATTAGCTAGTTGGTGGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCT
GAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGA
CGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCAAG
AGTAACTGCTTGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCA
AGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAA

LA2 (419 pb)

TTGGTTTCGGAACAACACAGGGAAACTTGTGCTAATACCGGATAAGCCCTTACGGGGAAAGATTTATCGCCGAAAGATCGGCCCCG
CGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGG
ACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCGC
GTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTGTGCGGGAAGATAATGACGGTACCGCAAGAATAAGCCCCGGCTAACT
TCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATCACTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGGTCTTTA
A

LA32B1 (440 pb)

GGACTCTGGGATAAGCGCTGGAAACGGTGTCTAATACTGGATATGAGCTTTCCTGTCATGGTGGGGGTTGGAAAGATTTTTTCGG
TCTGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGAGGTAATGGCTTACCAAGGCGTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGT
GACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCATACTGGAGGCAGCTGTGCGGAATATTGCACAATGGGCGGAAGCCT
GATGCAGCAACGCCGCGTGGAGGATGACGGCCTTCGGGGTTGTAAACCTCTTTTAGCAAGGAAGAAGCTTTTGTGACGGTACTT
GCAGAAAAGCGCCGCTAACTACGTGCCACGAGCCGCGGTAATACGTAGGTGCGCAAGTGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAA
GAGCTCGTGGACGGTTTGTTCGC

LA32A1 (413 pb)

TTGCTTCGGAACATCTTTCCCAACTTGTGCTAATACCGGATAAGCCCTTACGGCGAAAGATTTATCGCCGAAAGATCGGCCCGC
GTCTGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAGTTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGA
CTGAGCCACGATCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCGCG
TGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTGTGCGGGAAGATAATGACGGTACCGCAAGAATAAGCCCCGGCTAACTT
CGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATCACTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGGT

LA35B (446 pb)

TGACTCTGGGATAAGCGTTGGAAACGACGTCTAATACTGGATATGATCACTGGCCGCATGGTCTGGTGGTGGAAAGATTTTTTGG
TTGGGGATGGACTCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGT
GACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGAATCATACTGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCT
GATGCAGCAACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTAGTAGGGAAGAAGGGAGCTTGCTCTTGACG
GTACCTGCAGAAAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGG
CGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTCCG

LA33A1 (419 pb)

TTGTTTCGGAACAACCTCAGGGAACTTGAGCTAATACCGGATGTGCCCTTCGGGGGAAAGATTTATCGCCATTGGAGCGGCCCG
CGTAGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGCTCACCAAGGCTACGATCCTTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGG
ACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATCTTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCCATGCCG
CGTGAATGATGAAGGTCTTAGGATTGTAAAATTCTTTACCGGGGACGATAATGACGGTACCCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAAC
TTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGAGCGTAGGCGGATAGTT
TA

LA21 (464 pb)

CTGTATGAACCGCATGTTTCCACGAGCAGTATAATAGCGTAGGTCCTTGCAGCGCGTGACACAGCTTTTACCACGAAATGTGATC
TCACGGCGAGTCGCGATCTAGCCTAGTTGCGTGAGGTAACGGCTCACCATGGCGACGATGCGATAGTGCAACCAGAGAGCACG
ATCGCGCGACACTGGGACTGAGCCCTGATCCAACCTAATACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCT
GAAGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAGGAACAAGTGCTGTTCAAATAGG
GAGTCACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGGCCACCAGCCCAGCGGTAATACGCTAGGTGGGCAAG
GCGTTGGTACCGAGAATTAATTGGGGCGATCAAGGGGCTTCGCAG

LA4 (467 pb)

TAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTTCG
GCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCT
GAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGA

CGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCAAG
AGTAACTGCTTGACACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCA
AGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAA

LA10 (458 pb)

GTAGTGGGGGATAACGTTTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGC
TATCAGATGAGCCTAGGTTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATG
ATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTG
ATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCCATTACCTAATACGTG
ATGGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATC
GGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTTGTAA

LA8 (458 pb)

GACGTGGGGGATAACGTTAGGGAACTTACGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGGATCGAAAGACCTCGCGC
GGTTGGATGGACCGATGTTTCGATTAGCTAGTTGGTGGAGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCGATAGCTGGTCTGAGAGGATG
ATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTG
ATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTATCAGGAGCGAAATACTGCCGGCTAATACCCG
GCGGGGCTGACGGTACCTGAGGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAAT
CGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGCGGTTATTTAA