



Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales

Presentación del Informe de Trabajo Final de Carrera

“Caracterización de la capacidad promotora del crecimiento vegetal y saprofítica de los simbioses de soja (*Glycine max* (L) Merr) aislados de suelos del NOA”

Carrera: Ingeniería Agronómica

Nombre de la alumna: Winklerek, Nadia

Legajo N°25847/8 DNI: 32.999.561

Dirección de correo electrónico: nadiawinklerek@gmail.com Teléfono:
0221154186425

Directora del trabajo: Balagué, Laura

Co-director del trabajo: Balatti, Pedro Alberto

Curso de Microbiología Agrícola, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales,
UNLP, 60 y 119, 1900-La Plata, Argentina.

Fecha de entrega: 05/12/2023

INDICE

1. Resumen.....	Página 3
2. Introducción.....	Página 4
2.1. Caracterización saprofitica.....	Página 9
2.2. Hipótesis.....	Página 10
2.3. Objetivo general	Página 10
2.4. Objetivos específicos.....	Página 10
3. Materiales y métodos.....	Página 11
3.1. Supervivencia de rizobios sobre semillas.....	Página 11
3.2. Solubilización de fósforo (P).....	Página 12
3.3. Producción de ácido indol acético (AIA).....	Página 13
4. Resultados.....	Página 14
4.1. Supervivencia de rizobios sobre semillas.....	Página 14
4.2. Solubilización de fósforo (P).....	Página 16
4.3. Producción de ácido indol acético (AIA).....	Página 18
5. Consideraciones finales.....	Página 22
6. Bibliografía.....	Página 23

RESUMEN

El cultivo de soja establece una relación simbiótica con microorganismos del suelo denominados "rizobios". El objetivo del presente trabajo fue identificar, dentro de un conjunto de aislados de suelos del noroeste de la Argentina, cepas de rizobios simbioses de soja que promocionen el crecimiento vegetal y que tengan capacidad de sobrevivencia en condiciones saprofitas, características que contribuye a la competitividad de los rizobios en el suelo. Los aislados se caracterizaron en cuanto a su sobrevivencia en la semilla una vez inoculada, su capacidad para solubilizar fósforo y sintetizar auxinas (AIA). Los resultados indicaron que la capacidad de supervivencia sobre semilla de la mayoría de las estirpes aisladas del NOA no presenta diferencias respecto a la cepa de referencia *B. japonicum* E109 y que estas mismas cepas no solubilizaron P en las condiciones ensayadas. En cuanto a la capacidad de sintetizar AIA cinco aislados mostraron tener esa capacidad, dos aislados sintetizaron bajas cantidades. La capacidad diferencial de sobrevivencia y de síntesis de AIA sugieren que un cambio en las condiciones del ambiente podría alterar estas capacidades y por lo tanto el comportamiento de los organismos como promotores del crecimiento vegetal. En síntesis, las diferentes capacidades de los aislados de rizobios sugieren que los mismos constituyen recursos para formular inoculantes o para promover por medio de la biotecnología el crecimiento de las plantas en un marco de agricultura sostenible.

INTRODUCCIÓN

La soja, (*Glycine max* (L) Merr), pertenece a la familia de las Leguminosas (*Fabaceae*), sub-familia Papilionoideas, es una planta originaria del continente asiático, específicamente del Norte y Centro de China, donde fue domesticada, probablemente en el Siglo XI A.C. (Hymowitz, 1970). Su cultivo se extendió en el mundo a partir del siglo pasado, aunque la gran difusión del mismo ocurrió en los últimos 35 años, siendo el cultivo cuya área tuvo el mayor incremento porcentual comparado al resto de los cultivos de mayor importancia económica y consumo (Ferraris, 2001). Esta amplia distribución se debe, en parte, a la amplitud de ambientes a los que se adapta la soja, a la calidad nutritiva y al valor económico de la semilla. La misma tiene un alto contenido y calidad de proteínas y de aceite. En Argentina, la superficie cultivada con soja en el Noroeste (NOA) ha experimentado un crecimiento explosivo, produciéndose, en muchos casos, el reemplazo de los cultivos regionales tradicionales como algodón y poroto. En las provincias de Santiago del Estero, Salta y Tucumán, la superficie ocupada por el cultivo ha pasado de 390 mil ha en 1994/95 a 1.416.651 ha en la campaña 2022/2023, siendo la superficie sembrada en esta campaña de 251.246 ha en Salta y Jujuy (SISA, 2023). Actualmente, Argentina junto con Brasil y Estados Unidos son los países que concentran cerca del 82% de la producción, siendo los principales productores. En la campaña 2020/2021, en nuestro país en una superficie sembrada de 17,2 millones de hectáreas se cosecharon 43,5 millones de toneladas (BCR, 2021).

En los modelos productivos actuales, en los que se obtienen altos rendimientos, los agroquímicos forman parte del paquete tecnológico de producción y los nuevos modelos de manejo buscan desarrollar estrategias alternativas independientes o consociadas al uso de moléculas de síntesis conocidas como agroquímicos. Esto conduce a la búsqueda de mecanismos alternativos que reduzcan el uso de moléculas sintéticas que, en algunos casos, pueden comprometer variables ambientales. Uno de esos caminos alternativos consiste en utilizar

microorganismos que suelen interactuar con las plantas y como resultado de esto promover el crecimiento. A este grupo de bacterias se las denomina bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, del inglés Plant Growth-Promoting Rhizobacteria).

El cultivo de soja establece una relación simbiótica con microorganismos del suelo que tienen forma de bastones cortos denominados “rizobios”. Estas bacterias pertenecen a la subdivisión α -Proteobacteria y se pueden describir como bacilos móviles Gram (-). La soja puede asociarse con varias especies de rizobios (Nakei et al., 2022) entre las cuales podemos citar a: *Bradyrhizobium japonicum* (Jordan, 1982), *Bradyrhizobium elkanii* (Kuykendall et al., 1992), *Bradyrhizobium liaoningense* (Xu et al., 1995), *Bradyrhizobium arachidis* (Wang et al., 2013), *Bradyrhizobium betae* (Rivas et al., 2004); *Bradyrhizobium canariense* (Vinuesa et al., 2005), *Bradyrhizobium diazoefficiens* (Liu et al., 2018), *Bradyrhizobium cytisi* (Chahboune et al., 2011), *Bradyrhizobium daqingense* (Wang et al., 2013) *Bradyrhizobium denitrificans* (Van Berkum et al., 2006), *Bradyrhizobium huaghuaihaiense* (Zhang et al., 2012), *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* (Chen et al., 2002).

El establecimiento de la simbiosis leguminosa-rizobio es el resultado de una compleja serie de eventos coordinados de comunicación, reconocimiento y diferenciación que ocurre entre los rizobios y la planta (Figura 1). Las raíces de las plantas exudan flavonoides, que son moléculas que interactúan con una batería de genes de los rizobios. La especificidad de esta interacción, que está definida por la especie de hospedante y los rizobios, puede conducir a la expresión diferencial de genes nod (nodulación) en las interacciones compatibles (Perret et al., 2000). Esta expresión diferencial es resultado de que cada planta sintetiza y libera un perfil distinto de flavonoides los que interactúan con genes *nodD*. Esta interacción primaria es la clave para que se expresen el resto de los genes de nodulación y ocurra no solo la formación de nódulos sino la fijación de nitrógeno (N). Los genes comunes de nodulación codifican enzimas para la síntesis de factores de

nodulación (lipo-quitina-oligosacáridos) que disparan los procesos metabólicos que conducen a la formación de nódulos. En una fase inicial, el pelo radical se enrula y atrapa a los rizobios, los cuales liberan enzimas que degradan la pared y así comienza a producirse una invaginación de la membrana desarrollándose un hilo infectivo (Ferguson et al., 2010). La interacción entre los rizobios y la planta resulta en la formación de nódulos, estructuras que albergan a las bacterias simbióticas, las cuales reducen el N_2 (atmosférico) a NH_3 por medio de la enzima nitrogenasa, dejándolo disponible para la planta (Mulder et al., 2005). Con este proceso se puede aportar entre el 25 al 90% del nitrógeno necesario para el desarrollo del cultivo (Perticari, 2005).

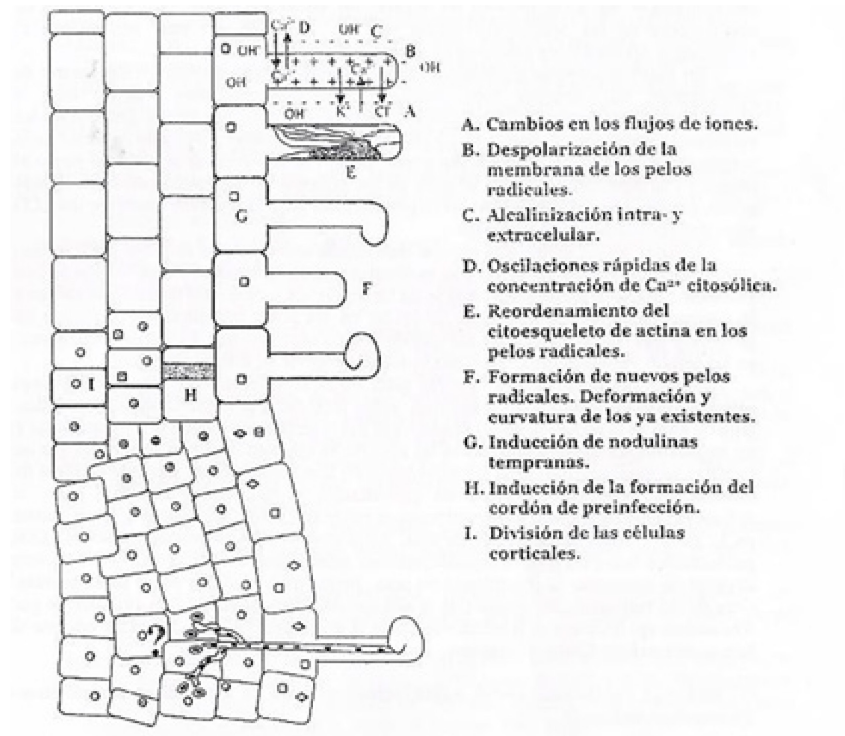


Figura 1: Formación del hilo infectivo en el pelo radical de la planta. (Extraído de Morón, 2006).

Las PGPRs son microorganismos del suelo que además pueden proliferar sobre la superficie de las raíces de las plantas. Estas bacterias interactúan con las raíces

de las plantas y como resultado de esto se desencadenan procesos que favorecen el crecimiento y desarrollo de las mismas y/o su sanidad. Estos mecanismos pueden ser de acción directa o indirecta. Los mecanismos indirectos, por regla general, son aquellos que suceden fuera de la planta, mientras que los mecanismos directos son aquellos que ocurren dentro de la planta y afectan al metabolismo de la planta (Glick, 1995; Vessey, 2003; Antoun & Prevost, 2006; Siddikee et al., 2010).

El mecanismo indirecto requiere la participación de los procesos metabólicos defensivos de las plantas, que responden a la señal enviada por las bacterias que influyen en la planta. Estos mecanismos de acción indirecta resultan principalmente en el control biológico de organismos patógenos, lo que contribuye a la sanidad del cultivo (Birch & Kamoun, 2000). Estos métodos de control de organismos patogénicos generados a través de la competencia con bacterias PGPR incluyen los efectos inhibitorios que resultan de la producción de sustancias antibióticas, entre otros (Goswami et al., 2016).

Entre los mecanismos de acción directa se encuentran los que modifican el balance hormonal de la planta en lo que hace al contenido de auxinas, giberelinas o citoquininas; o los que alteran la disponibilidad de nutrientes, como el nitrógeno y fósforo entre otros (Glick et al., 1999). En los últimos años este tipo de estudio se ha incrementado debido a que ha aumentado la demanda de herramientas tendientes a desarrollar una agricultura sustentable (Santillana et al., 2005; de Souza et al.; 2015; Korir et al., 2017).

Otro de los métodos directos es la producción de auxinas, hormonas que regulan el crecimiento alterando la división celular y la elongación de las células generadas en los meristemas de la planta. El ácido-indol-3-acético (AIA) es sintetizado por diversas vías metabólicas y el triptófano es uno de los precursores de mayor importancia. Esta fitohormona está implicada en el desarrollo de la raíz, incrementa la división celular, estimula la elongación celular, e interviene en el desarrollo de meristemas de raíces secundarias por lo que aumenta el volumen de

la raíz y la longitud, con lo cual aumenta la superficie de suelo explorada por la raíz, proporcionando a la planta un mayor acceso a los nutrientes del suelo (Gopalakrishnan et al., 2014).

Numerosas bacterias del grupo de las PGPR, que se han aislado de la rizósfera de diversas especies vegetales sintetizan diversos metabolitos secundarios entre los cuales se encuentra el AIA, que es liberado fuera de las células, pero desde allí suelen incorporarse a las células de las plantas y alterar los procesos fisiológicos (Ahemad & Kibret, 2013).

El fósforo (P) es el nutriente, que junto con el nitrógeno (N), es el que más frecuentemente limita el crecimiento y desarrollo de los cultivos. El fósforo es un componente esencial de moléculas como el ácido ribonucleico (RNA), el ácido desoxirribonucleico (DNA) y el adenosin trifosfato (ATP), así como de los fosfolípidos. Por eso la fertilización con P rápidamente se pone en evidencia con un aumento del crecimiento de las plantas (Coyne & Mikkelsen, 2015).

La producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular por las rizobacterias es uno de los mecanismos que con frecuencia es responsable de la solubilización del fosfato del suelo, dado que pone al elemento P en disponibilidad para plantas (Paredes Mendoza, 2010; Bashan et al., 2013). Esto, además, es complementado con el P que ponen en disponibilidad la actividad de algunas enzimas sintetizadas por las bacterias como fosfatasas y fitasas (Fernández & Rodríguez, 2006).

Entre los aislados de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, bacterias Gram (-) que como ya se dijo fijan N, se han identificado aislados que tienen la capacidad de solubilizar fósforo inorgánico (Halder et al., 1990; Halder & Chakrabartty, 1993; Surange & Kumar, 1993; Hungria, 2009).

Caracterización saprofítica

Uno de los aspectos clave de la supervivencia bacteriana tanto en lo que hace a los ecosistemas como cuando se formulan bioinsumos, es la supervivencia de los microorganismos sobre la superficie de la semilla. En principio es fundamental que la semilla esté en contacto con las bacterias del inoculante, pero frecuentemente la supervivencia se ve afectada por el estrés hídrico, el estado de la semilla, los metabolitos que libera la cobertura seminal, que muchas veces son antagonistas bacterianos, y también por la presencia de contaminantes; estas situaciones producen una reducción considerable del número de células microbianas inoculadas. Uno de los principales problemas cuando se inoculan bacterias sobre la semilla es la muerte de las bacterias aplicadas que se produce por el estrés de falta de agua que reduce el número de bacterias viables sobre la semilla (Salema et al., 1982; Streeter, 2003). La temperatura de almacenamiento de la semilla, es otro de los factores que puede reducir considerablemente la viabilidad de los microorganismos inoculados en la semilla preinoculada (Kremer & Peterson, 1983; Vriezen, 2005; Vriezen et al., 2006), ya que modifica el contenido de agua en el ambiente generando un incremento del estrés hídrico (Streeter, 2003, 2007). Otros factores que impactan sobre la sobrevivencia son el estrés salino y el estrés tóxico de la cubierta de la semilla (Deaker et al., 2004). Es importante destacar que la temperatura y tiempo de secado de la semilla luego de la preinoculación son aspectos biotecnológicos claves para la sobrevivencia de las bacterias (Penna et al., 2011).

En trabajos realizados con anterioridad en el Laboratorio de Microbiología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (UNLP), se ha demostrado que los suelos sin historia de cultivo que alberga leguminosas nativas de distintos ambientes del Noroeste Argentino contienen rizobios nativos que inducen la formación y desarrollo de nódulos fijadores de N en la soja. Así se procedió a realizar el aislamiento de los mismos utilizando como plantas trampa: *Vigna angularis*, *Glycine max* cv mamloxi (línea de origen asiático) y *Glycine max* cv

A4404 (línea americana), inoculadas con diluciones de suelos del NOA. Estos rizobios que nodulan la soja difieren en sus características simbióticas, fisiológicas y además son genéticamente diversas (Balatti et al., 2006; Diosma et al, 2007; Balatti et al., 2010) según los fingerprints del genoma obtenidos mediante secuencias BOX, ERIC (Versalovic et al., 1994).

Considerando que los suelos contienen comunidades microbianas con capacidades biotecnológicas, se trabajará en la selección de aislados de suelos del NOA. Estos serán caracterizados en lo que hace a su supervivencia sobre la semilla y en su capacidad para promover el crecimiento vegetal mediante la producción de AIA y la solubilización de fósforo.

Hipótesis

Aislados de rizobios procedentes de suelos del NOA difieren en su capacidad de sobrevivencia sobre la semilla de soja.

Los suelos del NOA contienen bacterias que promueven el crecimiento de las plantas.

Objetivo general

Disponer de comunidades de organismos promotores del crecimiento para incrementar la sanidad y producción de los cultivos.

Objetivos específicos

Evaluar la capacidad de sobrevivencia saprofitica de los rizobios aislados en suelos del NOA sobre la superficie de la semilla de soja.

Evaluar la capacidad de promoción del crecimiento de las plantas de distintos aislados de rizobios provenientes de suelos del NOA a través de su capacidad de solubilizar el fósforo (P) y de la producción de Acido Indol acético (AIA).

MATERIALES Y MÉTODOS

Las determinaciones y características de las cepas de rizobios se evaluaron utilizando la infraestructura del laboratorio de Microbiología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Las **cepas control** empleadas fueron: *Bradyrhizobium japonicum* E109, SEMIA 5079; *B. diazoefficiens* SEMIA 5080, y *B. elkanii* SEMIA 5019, SEMIA 587, habitualmente utilizadas en los inoculantes para soja.

Los **aislados** que nodulan soja que se incluyeron en los estudios forman parte de una colección de rizobios aislados de los suelos del NOA sin historia de cultivo de soja. Los mismos se identificaron con los siguientes códigos CMA 15; CMA 18; CMA 31; CMA 36; CMA 44; CMA 45A; CMA 47; CMA 48; CMA 58; CMA 77; CMA 78; CMA 79; CMA 81; CMA 83; CMA 84; CMA 96; CMA 101; CMA 130.

Medio de cultivo YEM modificado (*Yeast Extract Mannitol*)

El medio descripto (componentes en g.l⁻¹) está compuesto por: manitol 10 g/l, MgSO₄ 0,2g/l, K₂PO₄H 0,5g/l, NaCl 0,1g/l, extracto de levadura 0,4 g/l y pH 6,9. Al formular el medio sólido se le adicionaron 18 g/l de agar agar. El medio además contuvo 10 ml de Rojo Congo (1:400) y agua bidestilada.

Los cultivos líquidos se realizaron en el mismo medio YEM sin adicionar agar agar, incorporándose oxígeno por agitación en un agitador orbital rotatorio seteado a 150 rev. min⁻¹ y 28 °C, durante 148-240 h (Vincent, 1970).

Solución nutritiva para plantas Jensen (*Concentración 50x*) Las plantas se regaron con solución nutritiva de Jensen que está compuesta por: FeCl₃ 1 g/l, MgSO₄ · 7H₂O 2 g/l, NaCl 2 g/l, CaPO₄H 10 g/l, K₂PO₄H 2 g/l, agua 1000 ml.

Sobrevivencia de rizobios sobre semillas

Para evaluar la sobrevivencia se inocularon 50 g de semillas de soja del cultivar A 4404 con 0,250 ml de una suspensión bacteriana formulada a partir de un cultivo

exponencial al que se le adicionó 0,5 ml del adhesivo comercial PRONOC. Los cálculos para cada aislado se realizaron considerando aplicar 1×10^7 bacterias /semilla. Las semillas inoculadas se almacenaron a una temperatura de 20 °C, durante 15 días. Con el fin de evaluar la supervivencia bacteriana comenzando en tiempo cero y en un intervalo de tiempo de 14 días se tomó una muestra de 10 semillas las que se colocaron en 10 ml de solución salina estándar estéril, que se agitó a 100 rev/min durante 1 h. Una alícuota del mismo se realizó una serie de diluciones de las que sembraron alícuotas de las mismas en medio de cultivo YEM-Rojo Congo.

Las muestras se dispusieron enteramente al azar y los resultados se analizaron en base a un análisis estadístico mediante ANOVA y las diferencias se analizaron con el test de Tukey al 5% utilizando el programa INFOSTAT (Di Rienzo et al., 2011).

Solubilización de fósforo (P)

La capacidad de solubilización de P se determinó utilizando un medio de cultivo sólido (MMSFCP-Mg) suplementado con una fuente de fósforo insoluble (Paredes Mendoza, 2010), en donde se sembraron los aislados. La composición del medio fue de glucosa 10 g/l; $(\text{PO}_4) \text{Ca}_3$ 5 g/l; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g/l, extracto de levadura 0,5 g/l; MgCl_2 3 g/l; agar 18 g/l; agua bidestilada 1000 ml.

La capacidad solubilizadora se determinó cualitativamente en base a la formación de un halo transparente alrededor de las colonias. La presencia indica actividad solubilizadora de fosfato (+). El período de incubación fue de 7 días a 30°C. Las cepas control fueron *B. japonicum* (E109, SEMIA5079), *B. diazoefficiens* (SEMIA5080) y *B. elkanii* (SEMIA587, SEMIA5019).

Producción de ácido indol acético (AIA)

La producción de AIA se evaluó cualitativamente por el método colorimétrico descrito por Bric et al. (1991). El ensayo se realizó sobre una placa de Petri con medio YEM al que se le adicionó, luego de la esterilización por autoclave, 5 mM de L-triptófano ($C_{11}H_{12}N_2O_2$, solución stock: 5% p/v, esterilizada a 0,7 atm durante 7 minutos), el medio se sembró con una alícuota de los aislados en caldo YEM. Cada placa inoculada se cubrió con una membrana de nitrocelulosa esterilizada. Se incubaron durante 7 días a 28 °C. Luego se retiró cada membrana de las placas y se las trató sumergiéndolas en una solución del reactivo de Salkowski (0,01 M de $FeCl_3$ en 35% de $HClO_4$) y se las dejó a temperatura ambiente durante dos horas.

Las cepas productoras de AIA adquieren una coloración rosa a púrpura que difiere en la intensidad, dentro de las 2 hs de realizada la reacción, a temperatura ambiente. Las escalas encontradas son (-) sin color, sin producción de AIA; (+) color tenue, halo tenue o borde coloreado, escasa producción; (++) coloreado uniforme producción media; (+++) marcada tinción, producción alta; (++++) tinción intensa, alta producción. Cada cepa se dispuso por duplicado. Se empleó como control positivo a *Pseudomonas fluorescens*.

Para la cuantificación de AIA se realizó una curva patrón tomando concentraciones de 10, 20, 25, 30 y 50 $\mu g/ml$ de AIA (Sigma), a partir de una solución stock de 100 $\mu g/ml$. Luego se tomó 1 ml de cada una de las soluciones y se le adicionó 2 ml del reactivo de Salkowski (0,01 M de $FeCl_3$ en 35% de $HClO_4$). Se dejó reposar por 30 minutos a temperatura ambiente y se leyeron las absorbancias de los patrones a 530nm en un espectrofotómetro. Con los valores obtenidos se halló la ecuación de la curva: ($y: 63,462 x + 0,0034$) ($R^2: 0,9942$) que relaciona la concentración de AIA en función de la absorbancia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sobrevivencia de rizobios sobre semillas

Los microorganismos que se recuperan de la cubierta seminal de la semilla inoculada están en relación con el número de bacterias viables que se encuentran en la semilla, que resultan del estado fisiológico y las características de los microorganismos para resistir condiciones adversas y condiciones ambientales al momento del tratamiento (Streeter, 2007; Penna et al., 2011).

La supervivencia sobre semilla determinada a los 2 y 14 días posteriores a la inoculación, mostró que el porcentaje de recuperación (% PR) de bacterias de la mayoría de las estirpes aisladas del NOA (CMA 13, CMA 15, CMA 45, CMA 48, CMA78, CMA 79, CMA 81, CMA 82, CMA 83, CMA84, CMA 101, CMA 123 y CMA 130) no presentaron diferencias significativas con respecto a la cepa de referencia *B. japonicum* E109 (Figura 2). En el tratamiento realizado con la cepa de referencia (E109) se recuperaron a los 14 días después de la inoculación valores promedios de 5×10^4 UFC.semilla⁻¹.

Solo los aislados CMA 43, CMA 44, y CMA 77 presentaron una capacidad de supervivencia significativamente menor que la cepa control. En estas cepas, el número de rizobios.semilla⁻¹ se redujo considerablemente, se recuperaron a los 14 días después de la inoculación valores cercanos a 2×10^2 UFC.semilla⁻¹.

Uno de los factores que más afecta a la supervivencia de los rizobios adicionados a la superficie de la semilla es el estrés por falta de agua, es decir, la desecación, y adicionalmente a esto, la temperatura de almacenamiento (Kremer & Peterson, 1983; Vriezen, 2005, Vriezen et al., 2006), generando estos dos factores tasas de disminución considerables luego de la inoculación de los rizobios sobre la semilla o el suelo (Salema et al., 1982; Streeter, 2003).

Diversos estudios demuestran que el efecto del estrés provocado por la falta de agua es la principal causa de muerte de las bacterias inoculadas en las semillas

(Temprano et al., 2002; Streeter, 2003; Vriezen et al. 2006). Algunas bacterias tienen la capacidad de sintetizar y acumular, en condiciones de estrés osmótico, compuestos como por ejemplo la trehalosa (disacárido de glucosa), que actúan reteniendo el agua en base a su capacidad higroscópica protegiendo de esta manera a las células microbianas de la deshidratación (Streeter 2003), la supervivencia de *B. japonicum* sobre las semillas estaría relacionado al aumento de la síntesis de trehalosa (Streeter, 2007).

La supervivencia sobre la semilla y en el suelo genera un incremento de la cantidad de rizobios y de esta manera se puede mejorar el proceso de nodulación con bacterias adaptadas al suelo y con esto el rendimiento del cultivo (Papakosta, 1992).

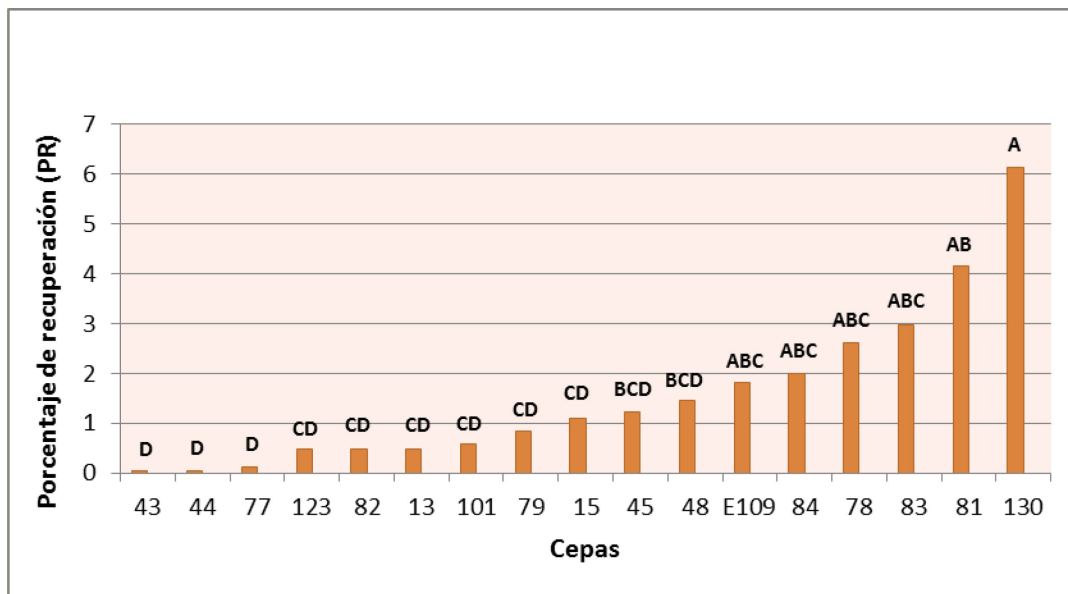


Figura 2: Supervivencia sobre semilla. Porcentaje de recuperación (PR) de los rizobios. Período evaluado entre los 2 y 14 días posteriores a la inoculación. Referencias: Resultado de tres determinaciones. Letras iguales indican diferencias no significativas entre las cepas (Test de LSD, $p < 0,05$).

Solubilización de fósforo (P)

La capacidad de solubilización de los aislados, como ya se explicó anteriormente, se evaluó en el medio MMSFCP-Mg (Figura 3). Ninguna de las cepas de referencia de rizobios solubilizó P. La cepa control de *Pseudomonas fluorescens* formó un halo transparente sobre el fondo blanco del medio de cultivo con fosfato insoluble (Tabla 2).

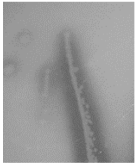

Resultado Positivo	Resultado Negativo
Cepa de Referencia <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Cepas de Referencia (E109, SEMIA5079, SEMIA5080, SEMIA587) y Aislados NOA: 101, 77
	

Figura 3: Evaluación de la Solubilización de fósforo. Placa de petri con medio de cultivo MMSFCP-Mg (Mendoza Paredes, 2010). Se observan el halo de solubilización alrededor de la estría de la cepa control (+) *Pseudomonas fluorescens* (lado izquierdo) y placa de petri con resultados negativos (lado derecho).

Tabla 2: Evaluación de la Solubilización de fósforo. Aislados simbiotes de soja provenientes de suelos del NOA.

	Solubilización de P (*)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> E109	-
<i>Bradyrhizobium elkanii</i> SEMIA 587	-
Cepas control	
<i>B. japonicum</i> SEMIA 5079	-
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> SEMIA 5080	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	(+)
Aislados NOA	(Negativo)
CMA 15; CMA 18; CMA 31; CMA 36; CMA 44; CMA 45A CMA 47; CMA 48; CMA 58 CMA 77; CMA 78; CMA 79 CMA 81; CMA 83; CMA 84 CMA 96; CMA 101; CMA 130	

Referencia: (*) Medio de cultivo sólido MMSFCP-Mg (Paredes Mendoza, 2010).

Distintas especies de los géneros *Rhizobium*, *Ensifer* y *Bradyrhizobium*, poseen la capacidad de solubilización de fósforo inorgánico (Halder et al., 1990; Halder y Chakrabartty 1993; Surange y Kumar 1993; Sridevi y Mallaiah, 2009; Bianco & Defez, 2010; Hamane, 2020). Los resultados sugieren que la capacidad de solubilizar P por parte de las bacterias del género *Bradyrhizobium* es baja (Alikhani et al., 2006), esto podría estar asociado a que la baja tasa de crecimiento de estos rizobios hace que se liberen pocos ácidos orgánicos.

López (2015) y Pastorino (2016) encontraron que un muy bajo número de bradyrhizobios, aislados de suelos con historia del cultivo de soja, presentaban la capacidad de solubilizar P.

Producción de ácido indol acético (AIA)

La producción de ácido indol acético (AIA) (Figura 4), mostró que solo cinco aislados sintetizaron AIA en distinta cantidad, mientras CMA45a y CMA84 produjeron bajos niveles de AIA los aislados CMA15, CMA18, y CMA78 sintetizaron concentraciones más altas de AIA (Tabla 3).

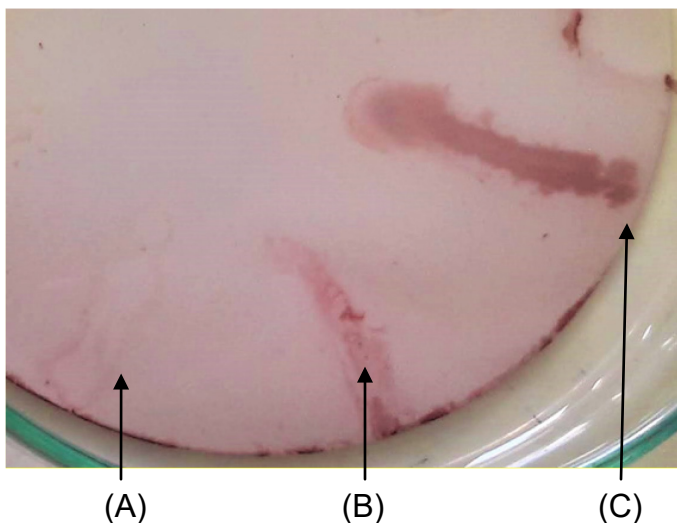


Figura 4: Producción de ácido indol acético (AIA). Ensayo en medio de cultivo YEM sólido suplementado con 5 mM de L-triptófano para producción de AIA (Lectura con el reactivo de Salkowski 0,01 M de FeCl_3 en 35% de HClO_4). Referencias: Resultado positivo: estría de color rojizo. A) Resultado negativo: E109; B) Resultado positivo (+++): Cepa *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA587; C) Resultado positivo (++++): *Pseudomonas fluorescens*.

Tabla 3: Producción de ácido indol acético (AIA).

		Producción de AIA (*)
Cepas control	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> E109	-
	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> SEMIA 587	+++
	<i>B. japonicum</i> SEMIA 5079	-
	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> SEMIA 5080	-
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	++++
Aislados NOA	CMA 15; CMA 18; CMA 78	++
	CMA 84; CMA 45a	+
	CMA 47, CMA 58, CMA 77 CMA 31, CMA 83, CMA 36, CMA 96; CMA 101; CMA 130	-

Referencia: (*) Resultados del ensayo en medio de cultivo YEM sólido suplementado con 5 mM de L-triptófano para producción de AIA, lectura con el reactivo de Salkowski (0,01 M de FeCl₃ en 35% de HClO₄).

Las cepas que demostraron capacidad de síntesis de AIA fueron también evaluadas en esta capacidad cuando se desarrollaron en medios líquidos. Esta evaluación cuantitativa se realizó con los aislados y las estirpes control y la cantidad de AIA producida se expresó en (µg AIA/DO del cultivo) (Figura 5). Se observó que los tres aislados seleccionados CMA15, CMA18, y CMA78, que sintetizaron en medio sólido más AIA, en medio líquido sintetizaron entre 5 y 8 µg de AIA/10⁹ MO/ml microorganismos por ml de medio de cultivo. El aislado CMA78 sintetizó niveles de AIA considerables, aunque estadísticamente diferentes a la cepa de referencia SEMIA 587.

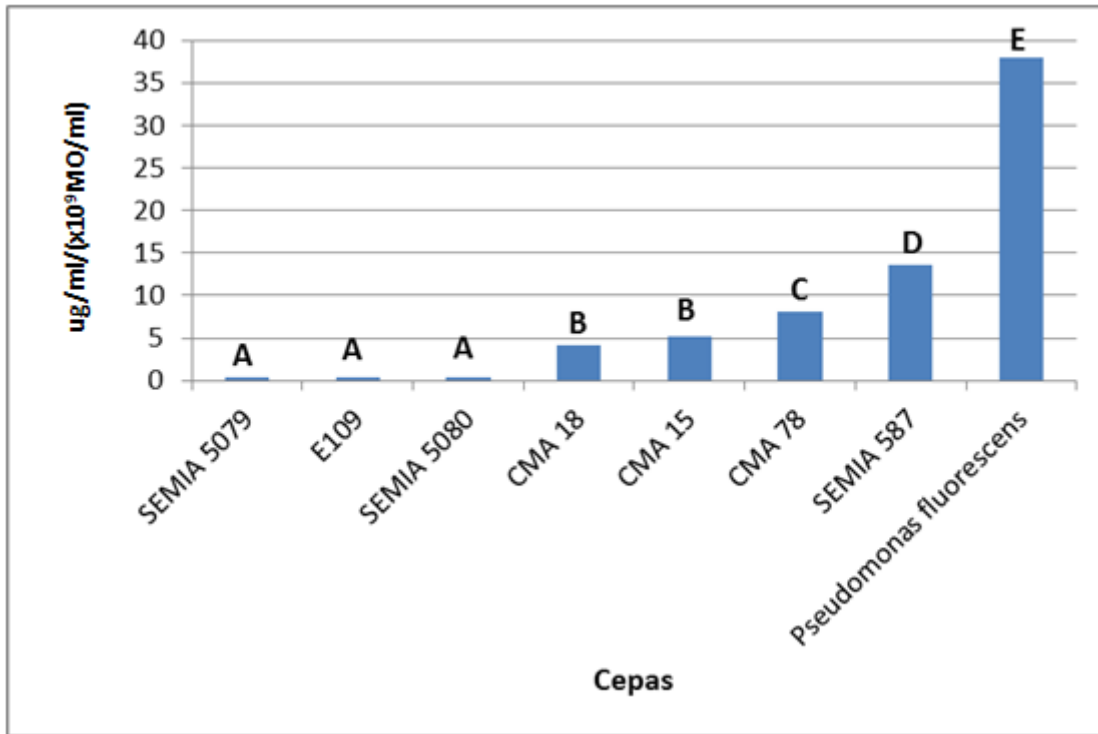


Figura 5: Evaluación cuantitativa de la producción de los aislados de AIA. La producción de la auxina está expresada en µg de AIA por unidad de DO del cultivo y los valores representan el promedio de dos determinaciones. Letras iguales indican diferencias no significativas entre las cepas (Test de LSD, $p < 0.05$).

Diversos microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPM), aislados de la rizósfera son productores de AIA, poseen la capacidad de sintetizar y liberar auxinas como metabolitos secundarios (Choudhary et al., 2011). Esta capacidad de sintetizar AIA está ampliamente distribuida en las bacterias asociadas a las plantas, más del 70 % de los microorganismos aislados de la rizósfera pueden sintetizar AIA (Sahasrabudhe, 2011).

Los rizobios han sido considerados como promotores del crecimiento vegetal debido al proceso de fijación biológica del nitrógeno en asociación con las leguminosas. Además, se han caracterizado en otros mecanismos de promoción con otras especies vegetales que no pertenecen al grupo de las leguminosas (Antuon et al., 1998; Padukkage et al., 2021).

Se han reportado varias rutas de síntesis de AIA, denominadas dependientes o independientes de triptófano, González et al. (2021) las describió en *B. japonicum*. La presencia de AIA sintetizado por la bacteria rizobium está involucrada en distintas etapas de la relación simbiótica (Ghosh et al, 2011), puede influir en distintos procesos como la organogénesis del nódulo o en el número de nódulos formados, mutantes deficientes en síntesis de AIA redujeron el número de nódulos comparado con la cepa original de *B. elkanii* (Fukuhara et al., 1994). Otra implicancia que genera la presencia de concentraciones elevadas de AIA es un incremento en la respuesta al estrés en *B. japonicum* (Donatti, 2013).

CONSIDERACIONES FINALES

Los rizobios del NOA mostraron una capacidad diferencial de síntesis de AIA. Por eso sería relevante estudiar el impacto que la producción de moléculas promotoras del crecimiento como las auxinas podrían tener en la nutrición y crecimiento de las plantas. Ninguno de los aislados mostró capacidad para solubilizar fósforo por lo que en este caso no sería una vía de promoción del crecimiento de las plantas.

Los rizobios mostraron una capacidad distinta para sobrevivir sobre la superficie de la semilla. En este sentido sería importante evaluar la capacidad de sobrevivencia con mayor precisión en condiciones controladas del crecimiento microbiano y del almacenamiento de las semillas.

La capacidad diferencial de sobrevivencia y de síntesis de AIA sugieren que un cambio en las condiciones del ambiente podría alterar estas capacidades y por lo tanto el comportamiento de los organismos como promotores del crecimiento vegetal.

En síntesis, las diferentes capacidades de los aislados de rizobios sugieren que los mismos constituyen recursos para formular inoculantes o para promover por medio de la biotecnología el crecimiento de las plantas en un marco de agricultura sostenible.

BIBLIOGRAFÍA

- **Ahemad, M., Kibret, M.**, 2013. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University Science*, 26:1-20.
- **Alikhani, H.A., Antoun, N. & Saleh-Rastin, H.**, 2006. Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. In E. V. zquez and C. Rodri'guez-Barrueco, ed. *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*. Springer, pp. 35–41.
- **Antoun, H., Prevost, D.**, 2006. Ecology of Plant Growth Promoting Rhizobacteria. In: Siddiqui, Z.A., Ed., *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*, Springer, Dordrecht, 1-38.
- **Balatti P., Martínez Alcántara, V.; Diosma G., Pastorino, G.; Videira, L. B., Peticari A., Hernández Lois, G, Scarano P.y Hungría M.** 2006. Los suelos del NOA argentino constituyen una fuente de nuevos rizobios que nodulan la soja (*Glycinemax L. Merr*). Congreso De Soja Del Mercosur. Buenos Aires, Argentina.
- **Balatti, P.; V. Martínez Alcántara, L. Balagué, G. Pastorino, Videira L., G, Diosma; D. Salvucci.** 2010. Selection Of Nitrogen Fixing Rhizobia From uncultivated soils of Northern Argentina. The 21st North American Symbiotic Nitrogen Fixation Conference Christopher S. Bond Life Sciences Center. Missouri, Estados Unidos.
- **Bashan, Y., Kamnev, A. A., & de-Bashan, L. E.** 2013. A proposal for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth. *Biology and Fertility of Soils*, 49(1), 1-2.
- **BCR, 2021. Bolsa de Cereales.** <https://www.bolsadecereales.com/post-14>
Último acceso 15/12/2023

- **Bianco C, Defez R.**, 2010 Improvement of phosphate solubilization and Medicago plant yield by an Indole-3-Acetic Acid-overproducing strain of *Sinorhizobium meliloti*. *Applied and Environmental Microbiology*. 76:4626–4632.
- **Birch, P.R.J, Kamoun, S.**, 2000. Studying interaction transcriptomes: coordinated analyses of gene expression during plant-microorganism interactions. En Wood R. (ed.) *New technologies for life sciences: a trends guide*. Elsevier Science, New York, N.Y. p. 77-82.
- **Bric, J.M., Bostock, R.M. & Silverstone, S.E.** 1991. Rapid in situ assay for indoleacetic Acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(2), pp.535–8.
- **Chahboune, R., Carro, L., Peix, A., Barrijal, S., Velázquez, E., & Bedmar, E. J.** 2011. *Bradyrhizobium cytisi* sp. nov., isolated from effective nodules of *Cytisus villosus*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61(12), 2922-2927.
- **Chen, L., Figueredo, A., Villani, H., Michajluk, J., & Hungria, M.** 2002. Diversity and symbiotic effectiveness of rhizobia isolated from field-grown soybean nodules in Paraguay. *Biology and Fertility of Soils*, 35(6), 448-457.
- **Choudhary, D.K.; Sharma, K.P.; Gaur, R.K.**, 2011. Biotechnological perspectives of microbes in agro-ecosystems. *Biotechnology letters*. 33, 1905–1910.
- **Coyne, M. S., Mikkelsen, R.** 2015. Soil microorganisms contribute to plant nutrition and root health. *Better Crops*, 99(1), 18-20.
- **Deaker, R. R., Rodney, R., Roughley, J., Kennedy, I.** 2004. Legume seed inoculation technology-a review. *Soil Biology and Biochemistry*. 36:1275-1288.
- **de Souza R., Ambrosini, A., Passaglia L.M.P.**, 2015. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*, 38 (4):401-419.
- **Di Rienzo J.A., F. Casanoves, M.G. Balzarini, L. Gonzalez, M. Tablada, C.W. Robledo.** 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar/index.php?mod=page&id=46>. Último acceso: 14/6/2018.

- **Diosma, G; Salvucci, R.D.; Martínez Alcántara, V; Videira; Pastorino, G.N.; Hernandez Lois, G.; Balague, L.J.; Balatti, P.** 2007. Comportamiento simbiótico de rizobios aislados de suelos del Noroeste Argentino. Congreso. XI Congreso Argentino de Microbiología. Buenos Aires, Argentina.
- **Donati, A. J., Lee, H. I., Leveau, J. H., & Chang, W. S.** 2013. Effects of indole-3-acetic acid on the transcriptional activities and stress tolerance of *Bradyrhizobium japonicum*. *PloS one*, 8(10), e76559.
- **Ferguson, B. J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M. H., Lin, Y. H., Reid, D. E., & Gresshoff, P. M.** 2010. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of integrative plant biology*, 52(1), 61-76
- **Fernández, M. T., & Rodríguez, H.** 2006. Aplicaciones biológicas de las fitasas: papel en los fertilizantes microbianos. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 40(2), 27-34.
- **Ferraris G. N.** 2001. Soja, resultados de unidades demostrativas año 2001. Publicaciones regionales INTA.
- **Fukuhara, H., Minakawa, Y., Akao, S., & Minamisawa, K.,** 1994. The involvement of indole-3-acetic acid produced by *Bradyrhizobium elkanii* in nodule formation. *Plant and Cell Physiology*, 35(8), 1261-1265.
- **Ghosh, S., Ghosh, P., & Maiti, T. K.,** 2011. Production and metabolism of indole acetic acid (IAA) by root nodule bacteria (*Rhizobium*): a review. *Journal of Pure & Applied Microbiology*. 5, 523-540
- **Glick, B.R.,** 1995. The enhancement of plant growth by free living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 41, 109-117.
- **Glick, B.R., Patten, C.L., Holguin, G., Penrose D.M.,** 1999. Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth-promoting. Londres. Imperial College Press.
- **González, S. M. C., Castillejos, G. C. R., Ortega, C. L., Yáñez, J. M. S., Cano, E. G., Hernández, A. A. O., & Mendoza, J. L. H.,** 2021. Estudio de las vías de biosíntesis del ácido indol acético en *bradyrhizobium japonicum* bjbv-05. *Interciencia: Revista de ciencia y tecnología de América*, 46(5), 198-203.

- **Gopalakrishnan, S., Sathya, A., Vijayabharathi R., Varshne R.K., Laxmipathi Gowda C. L., Krishnamurthy, L.,** 2014. Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. *Biotech*, 5:355-377.
- **Goswami. D., Thakker, J.N., Dhandhukia, P.,** 2016. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food & Agriculture*. 2(1): 1127500.
- **Halder, A. and Chakrabartty, P.** 1993 Solubilization of Inorganic Phosphate by *Rhizobium*. *Folia Microbiologica*, 38, 325-330.
- **Halder, A., Mishra, A.K., Bhattacharyya, P. and Chakrabartty, P.K.** 1990 Solubilization of Rock Phosphate by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 36, 81-92.
- **Hamane, S., Zerrouk, M. H., Lyemlahi, A. E., Aarab, S., Laglaoui, A., Bakkali, M., & Arakrak, A.,** 2020. Screening and characterization of phosphate-solubilizing rhizobia isolated from *Hedysarum pallidum* in the northeast of Morocco. In *Phyto-Microbiome in Stress Regulation* (pp. 113-124). Springer, Singapore.
- **Korir, H., Mungai, N. W., Thuita, M., Hamba, Y., and Masso, C.,** 2017. Co-inoculation Effect of Rhizobia and Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Common Bean Growth in a Low Phosphorus Soil. *Frontiers in plant science*, 8: articulo 141 (10 pp).
- **Hungria, M., Franchini, J. C., Brandao-Junior, O., Kaschuk, G., & Souza, R. A.** 2009. Soil microbial activity and crop sustainability in a long-term experiment with three soil-tillage and two crop-rotation systems. *Applied Soil Ecology*, 42(3), 288-296.
- **Hymowitz T.** 1970. On the domestication of the soybean. *Economic Botany*, 24: 408-421.
- **Jordan, D.C.** 1982. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium*gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 32, 136-139.

- **Kremer, R., Peterson, H.**, 1983. Effects of carrier and temperature on survival of Rhizobium spp. in legume inocula: development of an improved type of inoculant. Applied and environmental microbiology, 45:1790-1794.
- **Kuykendall, L. D., Saxena, B., Devine, T. E., & Udell, S. E.** 1992. Genetic diversity in Bradyrhizobium japonicum Jordan 1982 and a proposal for Bradyrhizobium elkanii sp. nov. Canadian Journal of Microbiology, 38(6), 501-505.
- **Liu, Y. H., Wang, E. T., Jiao, Y. S., Tian, C. F., Wang, L., Wang, Z. J. & Chen, W. F.** 2018. Symbiotic characteristics of Bradyrhizobium diazoefficiens USDA 110 mutants associated with shrubby sophora (Sophora flavescens) and soybean (Glycine max). Microbiological research, 214, 19-27.
- **López S.M.**, 2015. Análisis de las alteraciones estructurales y/o regulatorias en los genes de nodulación y fijación de nitrógeno, en aislados de Bradyrhizobium japonicum que difieren en su capacidad para fijar nitrógeno. (Tesis Doctoral, Universidad Nacional de La Plata)..
- **Morón B. M., Dardanelli, M. S., Martín, C. S., & Guijo, M. M.** 2006. Diálogo molecular en la simbiosis rizobio-leguminosa. In Fijación de nitrógeno: fundamentos y aplicaciones (pp. 160-171). Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno.
- **Mulder, L., Hogg B., Bersoult A. and Cullimore J.** 2005. Integration of signalling pathways in the establishment of the legume-rhizobia symbiosis. Issue Physiologia Plantarum. Physiologia Plantarum, 123 (2):207–218.
- **Nakei, M. D., Venkataramana, P. B., & Ndakidemi, P. A.** (2022). Soybean-nodulating rhizobia: Ecology, characterization, diversity, and growth promoting functions. Frontiers in Sustainable Food Systems, 6, 824444.
- **Padukkage, D., Geekiyanage, S., Reparaz, J. M., Bezus, R., Balatti, P. A., & Degrassi, G.** 2021. Bradyrhizobium japonicum, B. elkanii and B. diazoefficiens interact with rice (Oryza sativa), promote growth and increase yield. Current Microbiology, 78, 417-428.
- **Papakosta, D. K.** 1992. Effect of inoculant rate on nodulation and various agronomic traits of soybean. Journal of Agronomy and Crop Science, 168(4), 238-242.

- **Paredes-Mendoza M.** 2010. Aislamiento y caracterización bioquímica de metabolitos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato. Tesis de doctorado en Ciencias Agronómicas. ANLIS Dr. Josue M Malibrán y Colegio de Postgraduados de Chapingo, Veracruz.
- **Pastorino, G. N.** 2016. Diversidad de los rizobios que nodulan la soja en los suelos de la Pampa húmeda e identificación de cepas para la fabricación de inoculantes comerciales (Tesis Doctoral, Universidad Nacional de La Plata).
- **Penna, C., Massa, R., Olivieri, F., Gutkind, G., & Cassán, F.** 2011. A simple method to evaluate the number of bradyrhizobia on soybean seeds and its implication on inoculant quality control. *AMB express*, 1(1), 1-10.
- **Perret, X., Staehelin, C., & Broughton, W. J.** 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(1), 180-201.
- **Perticari A.** 2005. Inoculación de calidad para un máximo aprovechamiento de la FBN. Congreso Mundo Soja. Buenos Aires, Argentina. Pp. 121-126.
- **Rivas, R., Willems, A., Palomo, J. L., García-Benavides, P., Mateos, P. F., MartínezMolina, E. & Velazquez, E.** 2004. *Bradyrhizobium betae* sp. nov., isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumour-like deformations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(4), 1271-1275.
- **Sahasrabudhe, M. M.,** 2011. Screening of rhizobia for indole acetic acid production. *Annals of Biological Research*, 2(4), 460-468.
- **Salema M., Parker C., Kidby D., Chatel, D.,** 1982. Death of rhizobia on inoculated seed. *Soil Biology and Biochemistry*, 14:13-14.
- **Santillana, N; Arellano, C; y Zúñiga, D.** 2005. Capacidad del *Rhizobium* de promover el crecimiento en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller). *Ecología Aplicada*, 4:47-51.
- **Siddikee, M. A., Chauhan, P.S., Anandham, R., Han, G.,** 2010. Isolation, Characterization, and Use for Plant Growth Promotion under Salt Stress, of ACC Deaminase-Producing Halotolerant Bacteria Derived from Coastal Soil. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 20(11):1577-84 DOI:10.4014/jmb.2017.2709.1724. Source Pub Med.

- **SISA.**, 2023. Sistema de Información Simplificado Agrícola, en conjunto del Ministerio de Agroindustria de la Nación (MINAGRO), del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), del Instituto Nacional de Semillas (INASE) y de la Administración Federal de Ingresos Públicos (AFIP). https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/inase_if_sisa_soja_22_23_v01.pdf
Último acceso 15/12/2023
- **Streeter, J.**, 2003. Effect of trehalose on survival of *Bradyrhizobium japonicum* during desiccation. *Journal of Applied Microbiology*, 95:484-491.
- **Streeter, J.**, 2007. Factors affecting the survival of *Bradyrhizobium* applied in liquid cultures to soya bean [*Glycine max* (L.) Merr.] seeds. *Journal of Applied Microbiology*, 103:1282-1290.
- **Sridevi M, Mallaiah K.V.**, 2009. Phosphate solubilization by *Rhizobium* strains. *Indian Journal of Microbiology*, 49:98–102
- **Surange S; Kumar N.**, 1993. Phosphate solubilization under varying pH by *Rhizobium* from tree legumes. *Indian Journal of Experimental Biology*. 31:855-857.
- **Temprano, F., Albareda, M., Camacho, M., Daza, A., Santamaria, C., & Rodríguez-Navarro, N. D.** 2002. Survival of several *Rhizobium/Bradyrhizobium* strains on different inoculant formulations and inoculated seeds. *International Microbiology*, 5(2), 81-86.
- **Van Berkum, P., Leibold, J. M., & Eardly, B. D.** 2006. Proposal for combining *Bradyrhizobium* spp. (*Aeschynomene indica*) with *Blastobacter denitrificans* and to transfer *Blastobacter denitrificans* (Hirsch and Muller, 1985) to the genus *Bradyrhizobium* as *Bradyrhizobium denitrificans* (comb. nov.). *Systematic and applied microbiology*, 29(3), 207-215.
- **Versalovic, J., Schneider, M., Lupski, J.R., De Bruijn, F.J.**, 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 5:25-40.
- **Vessey, J.K.**, 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255, 571-586.
- **Vincent J.M.** 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. Blackwell Scientific, Oxford.

- **Vinuesa, P., Leon-Barrios, M., Silva, C., Willems, A., Jarabo-Lorenzo, A., PerezGaldona, R., Werner, D., Martinez-Romero, E.** 2005. *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteeae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. *Int. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55, 569-575.
- **Vriezen, J.**, 2005. Responses of *Sinorhizobium meliloti* 1021 to water stress. In: PhD Thesis. University of Massachusetts. Amherst ProQuest Dissertations Publishing, 2005. 3193952.
- **Vriezen, J., de Bruijn, F., Nüsslein, K.**, 2006. Desiccation responses and survival of *Sinorhizobium meliloti* USDA 1021 in relation to growth-phase, temperature, chloride and sulfate availability. *Letters in applied microbiology*, 42:172-178.
- **Wang, R., Chang, YL., Zheng, WT., Zhang, D., Zhang XX., Sui, XH., Wang, ET., Hu, JQ., Zhang, LY., Chen, WX.** 2013. *Bradyrhizobium arachidis* sp. nov., isolated from effective nodules of *Arachis hypogaea* grown in China. *Systematic and Applied Microbiology*. 36:101-105.
- **Xu LM, Ge C, Cui Z et al.** 1995. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov, isolated from the root nodules of soybeans. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 45:706–711.
- **Zhang, Y. M., Li Jr, Y., Chen, W. F., Wang, E. T., Sui, X. H., Li, Q. Q., & Chen, W. X.** 2012. *Bradyrhizobium huanghuaihaiense* sp. nov., an effective symbiotic bacterium isolated from soybean (*Glycine max* L.) nodules. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 62(Pt_8), 1951-1957.