



UNSAM
UNIVERSIDAD
NACIONAL DE
SAN MARTÍN



“Adaptación de rizobios y bacterias solubilizadoras de fosfato a condiciones salino-alcálinas para el desarrollo de biofertilizantes eficientes para Lotus tenuis e identificación de genes bacterianos implicados en la tolerancia a dicha condición”

2021

TESIS DOCTORAL

“Programa de Doctorado en Biología Molecular y Biotecnología”
“Programa de Doctorado en Biología Fundamental y de Sistemas”

Liz Marjory S. Cumpa-Velásquez

Director: Dra. María Julia Estrella (UNSAM)
Co-Director: Dra. Analía Inés Sannazzaro (UNSAM)
Director: Dr. Juan Sanjuán Pinilla (UGR)

Lugares de trabajo:

Instituto Tecnológico Chascomús, CONICET – UNSAM.
Estación Experimental del Zaidín, CSIC.



I N T E C H



Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Liz Marjory S. Cumpa Velásquez
ISBN: 978-84-1306-979-1
URI: <http://hdl.handle.net/10481/70168>

Esta Tesis doctoral ha sido realizada bajo la modalidad de co-tutela entre la Universidad Nacional de San Martín (UNSAM) y la Universidad de Granada (UGR), en el laboratorio de Microbiología del Suelo del Instituto tecnológico de Chascomús (INTECH), Buenos Aires - Argentina y el laboratorio de Interacciones Planta-Bacteria del Departamento de Microbiología y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental (EEZ), Granada – España, gracias a las becas de postgrado otorgadas por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) del Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Innovación de la República Argentina y del Programa de Cooperación científica para el Desarrollo ICOOP-2017 del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) del Ministerio de Ciencia e innovación de España. Las estancias de investigación se distribuyeron proporcionalmente según los objetivos trazados.

Los resultados de este trabajo de tesis han sido presentados en los siguientes congresos:

Liz Cumpa-Velásquez, Emanuel Mazza, Nazareno Castagno, Analía Sannazzaro, María Julia Estrella. Aislamiento y caracterización de bacterias solubilizadoras de fosfato de *Lotus tenuis* bajo condiciones salino –alcalinas XIII Congreso latinoamericano de microbiología - XIV Congreso argentina de Microbiología Rosario – Argentina. Septiembre 2016

Liz Cumpa-Velásquez, Analía Sannazzaro, José Otondo, María Julia Estrella. Claves para el desarrollo de biofertilizantes basados en consorcios microbianos para suelos con condiciones restrictivas. III Congreso Ibero-Americano de Interacción Benéfica Planta-Microorganismo-ambiente (III IBEMPA - XXVIII RELAR - XVI SEFIN). Lima – Perú. Noviembre 2017

Publicaciones derivadas de los resultados del proyecto de Tesis

Cumpa-Velásquez, L.M., Moriconi, J.I., Dip, D.P., Castagno L.N., Puig M.L., Maiale J.M., Santa-María, G.E., Sannazzaro, A.I., Estrella, M.J. (2021) Prospecting phosphate solubilizing bacteria in alkaline-sodic environments reveals intra-specific variability in *Pantoea eucalypti* affecting nutrient acquisition and rhizobial nodulation in *Lotus tenuis*. *Applied Soil Ecology*. Aceptado.

Enlace de Seguimiento:

<https://authors.elsevier.com/tracking/article/details.do?aid=104125&jid=APSOIL&surname=Estrella>

Publicaciones relacionadas con el tema de la Tesis

Sannazzaro, A. I., Tejerizo, G. T., Fontana, M. F., **Cumpa-Velásquez, L.M.**, Hansen, L. H., Pistorio, M., & Estrella, M. J. (2018). *Mesorhizobium sanjuanii* sp. nov., isolated from nodules of *Lotus tenuis* in the saline-alkaline lowlands of Flooding Pampa, Argentina. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(9), 2936-2942.

Estrella, M. J., Fontana, M. F., **Cumpa-Velásquez, L. M.**, Tejerizo, G. A. T., Diambra, L., Hansen, L.H., Pistorio, M., & Sannazzaro, A. I. (2020). *Mesorhizobium intechi* sp. nov. isolated from nodules of *Lotus tenuis* in soils of the Flooding Pampa, Argentina. *Systematic and Applied Microbiology*, 43(1), 126044.

*“Study hard what interests you the most in the most undisciplined, irreverent
and original manner possible”.*

Richard Feynman

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) del Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Innovación de la República Argentina por la beca doctoral tipo I con países latinoamericanos

Al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) por la beca del Programa de Cooperación científica para el Desarrollo ICOOP-2017.

A la Dra. Julia Estrella por la oportunidad de integrar el grupo de Microbiología del Suelo y por la confianza depositada en mí estos años. Más que una directora fuiste muchas veces como una madre.

A la Dra. Analía Sannazzaro, por confiar en mí sin conocerme y por convertir esa confianza en cariño. Agradezco mucho que nuestra relación haya trascendido las puertas del laboratorio a una de verdadero cariño y aprecio.

Al Dr. Juan Sanjuán Pinilla por aceptar co-dirigir esta tesis, por la paciencia y por las magníficas charlas.

He tenido muchísima suerte de tenerlos como directores no solo por lo mucho que he aprendido de ustedes sino por lo nobles y pacientes que han sido conmigo todos estos años.

A mis padres, Alejandro y Soledad, por alentarme a perseguir mis sueños, a pesar de que eso signifique largas temporadas fuera de casa. Entre mis momentos favoritos de auténtica y profunda felicidad, están las veces que nos hemos abrazado por minutos cada que llegaba a Lima. Cuento los días para volver a verlos

A mis hermanos Carlos, Dennis, Sandra y Jonathan por encargarse de cuidar a mamá y papá durante todos los años que no estuve en casa y por seguirlos cuidando con tanta dedicación en especial en momentos como este. Agradezco a la vida de tenerlo sanos y salvos, espero que sean muchos los años en que sigamos compartiendo charlas en la terraza de la casa de mamá.

A todos los chicos que integran o integraron la Unidad de Biotecnología 3. A Fernando, Eli, Naza, Pato, Maru, Paulina, Flor, Diana y Paola, por el recibimiento y el constante apoyo durante todo este tiempo tanto en lo académico y en lo personal, y por hacer de cada cena de grupo una experiencia deliciosa e inolvidable. No creo que exista grupo con mejores cocineros como el nuestro.

A Eli, Naza, Maru, Pauli, Diana y Pao por ponerle risas, buena onda y mate a los días de trabajo en el lab.

A Pato por quererme mucho y preocuparse por mí desde que llegué a Chascomús. Charlar contigo me hacía sentir en casa.

A Flor por confiar en mí y permitirme confiar en ella cada que lo necesité. Fuiste mi apoyo desde el primer día en que iniciamos el doctorado juntas. Extraño mucho nuestras charlas.

A todo el personal del Intech.

A todos los chicos que integran el grupo de Interacciones Planta-Bacteria. A Mari trini, Maria José, Soco, Dani, Ariana y Mary por el recibimiento, la predisposición y la paciencia.

A Mary por ser mi “*Soul-mate*” nacida en otro continente.

A los “wachines” de Juan, JuanMa, Su, Diani, Maxi, Lucre, Luisa, Jhony, Edwin, Diana compi y Juancho por hacer de la vida en el Intech y en Chascomús una parodia constante. Las birras y los asados espontáneos hicieron que el tiempo no se sienta.

A Juan Bertucci por su habilidad para hacerme reír y restarle importancia a la vida misma. He visto muchos universos y en ninguno somos capaces de hablar seriamente sin soltar una tontería.

A Diani y Su, por los montones de horas juntas en nuestra casita de la calle Mendoza acurrucadas en el sofá mirando *Friends*.

A mis amargos favoritos Lucre, JuanMa y Maxi, su sarcasmo alimenta mi alma. Ojalá algún día la vida conspire y coincidamos al menos en el mismo continente junto a Diani y Susy para resolver los problemas del planeta con una IPA en la mano.

A Luisa, Jhony, Edwin y Diana Compi por el merecido descontrol, las arepas y el aguardiente

A Angel (sin tilde) por ser mi hermano de corazón y mi soporte emocional más importante. Ser mejores amigos por más de una década y seguir hablándonos todos los días como el día en que nos hicimos amigos en la facultad de naturales no es sencillo. Agradezco a la vida por ponerte en mi camino Renato to to to, eres el mejor de mejores te quiero con el alma y muchas gracias por pintar la portada de esta tesis.

RESUMEN

La región de la Pampa Deprimida del Salado (PDS) concentra la mitad del stock de bovino de la provincia de Buenos Aires y se considera la región de cría más importante de la Argentina. No obstante, aproximadamente el 60% de superficie de esta región está dominada por “suelos bajos” cuyas características edáficas limitan severamente la producción de pasturas de calidad. En ese contexto, hay un profundo interés por la búsqueda de alternativas que posibiliten un mejor aprovechamiento de estos suelos bajos, con el objetivo de incrementar el recurso forrajero y subsecuentemente, la productividad ganadera. Entre las estrategias propuestas, el uso de leguminosas nativas o naturalizadas como *Lotus tenuis* es una de las más destacadas. Esta leguminosa es muy atractiva por su altísimo valor forrajero y por su adaptación a los diferentes ambientes de la PDS, incluso a aquellos que representan las zonas más restrictivas como los bajos alcalino-sódicos. No obstante, la incorporación exitosa a estos últimos está todavía lejos de ser óptima. En respuesta a esta problemática, en este trabajo de tesis se propuso la búsqueda de bacterias promotoras de crecimiento vegetal asociadas a *L. tenuis*, tolerantes a condiciones salino-alcalinas, para el diseño de bio-formulados como estrategia de mejora para la producción de pasturas en la Pampa Deprimida del Salado. Para ello, como tema central, se analizaron dos comunidades de bacterias: bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) y bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN).

Se analizó una población de 310 bacterias solubilizadoras de fosfato aisladas de la rizosfera de plantas de *L. tenuis* naturalizadas en los suelos bajos alcalino-sódicos de la Pampa Deprimida del Salado, de la cual más del 95% mostró la capacidad de solubilizar fosfato bajo condiciones salino-alcalinas. De acuerdo a ello, los aislamientos se cualificaron en 3 grupos fenotípicos, siendo el grupo de bacterias con capacidad solubilizadora de fosfato de rango amplio (BSFRA) el más promisorio, por su plasticidad para solubilizar fosfato en diferentes condiciones alcalino-sódicas. Este grupo resultó ser muy diverso genéticamente, además de estar compuesto exclusivamente por miembros de la familia *Pseudomonadaceae* y del orden *Enterobacteriales* (este último el más dominante), pertenecientes a al menos 7 géneros bacterianos. El género *Pantoea* fue uno de los más abundante con 9 cepas genéticamente diferentes. En base a sus antecedentes en la promoción del crecimiento vegetal y al criterio de “uso de microorganismos seguros” se seleccionaron las cepas de *P. eucalypti* MA66, P76, P63, P163 y P173 para estudios comparativos tanto *in vitro* como en planta. Todas las cepas de *P. eucalypti* mostraron atributos PGPR *in vitro* evidenciando su potencial efecto promotor en plantas. No obstante, cuando fueron evaluadas en el sistema tripartito Rizobio-PGPR-leguminosa en suelos alcalino-sódicos, mostraron efectos diferenciales notables en las variables de crecimiento peso seco total, peso seco de vástago y peso seco de nódulos, así como en la concentración y acumulación de P, N y Zn. Estos resultados revelaron la fuerte variabilidad intra-especie y la complejidad de las

interacciones planta-microorganismo, además de la importancia de la evaluación *in planta* para la selección de cepas promisorias para la elaboración de bioformulados.

Simultáneamente se realizó otro análisis de prospección de la comunidad de rizobios simbioses asociados a *L. tenuis*. Con ese fin se analizó una comunidad de 126 rizobios infectivos que reveló ser genéticamente muy diversa, además de estar dominada –aunque no exclusivamente– por miembros del género *Mesorhizobium*; otros miembros de la familia *Phyllobacteriaceae* (*Aminobacter* y *Phyllobacterium*) también fueron identificados. Mediante la caracterización de la tolerancia a condiciones salinas y/o alcalinas, se determinó que la comunidad de simbioses infectivos es mayoritariamente sensible a estas condiciones *in vitro*. El mismo patrón de comportamiento se observó en un sistema *in vivo* con suelo proveniente de los bajos alcalino-sódicos, aunque este último no fue tan restrictivo como el primero. La comparación de los resultados obtenidos en ambos sistemas evidenció la complejidad de los mecanismos de adaptación de los rizobios frente al estrés abiótico del medio. De toda la comunidad de rizobios infectivos se identificó a las cepas del género *Aminobacter* como las más destacadas en cuanto a sus capacidades de adaptación a las condiciones salino-alcalinas *in vitro* y en suelo. En base a estos resultados, se utilizó un rizobio del género *Aminobacter* tolerante a condiciones alcalino-sódicas para profundizar el conocimiento acerca de sus mecanismos de tolerancia. Se seleccionó a la cepa *Aminobacter* sp. BA135 como organismo de estudio para la identificación de los mecanismos de tolerancia a las condiciones salino-alcalinas. Mediante mutagénesis aleatoria se identificaron dos grupos de genes involucrados en la respuesta a salinidad o a salinidad y alcalinidad en simultáneo. Mientras que entre las estrategias de respuesta a salinidad se hallaron la modificación de la estructura de la pared bacteriana, el uso de osmolitos compatibles y el control del estrés oxidativo, frente al estrés salino-alcalino, se identificó como principal estrategia de respuesta la regulación de la homeostasis, seguido de la modulación del metabolismo de pared bacteriana también y la activación de genes de respuesta al estrés. Además, se identificó la cobalamina (vitamina B12) como molécula importante para la tolerancia a estrés alcalino-salino. De manera complementaria, un estudio transcriptómico abundó en el hecho de que BA135 emplea una variedad de estrategias complejas y coordinadas con el fin de mantener las funciones centrales y asegurar la viabilidad celular, que incluyen la regulación de la homeostasis, almacenamiento de fuentes de carbono, control de los niveles de especies reactivas al oxígeno (ROS), cambios de expresión en los sistemas de transporte de sustratos, optimización de los recursos energéticos, expresión de genes de respuesta al estrés y la acumulación de osmoprotectores. Este estudio reveló también una interesante conexión entre la síntesis de metionina dependiente de cobalamina y el metabolismo del soluto compatible glicina-betaína en condiciones de estrés.

Los resultados de esta tesis ponen de manifiesto la composición de las comunidades de BSF y BFN asociadas a *L. tenuis* y su potencial para promover el crecimiento y la nutrición mineral en *L. tenuis* cuando se utilizan consorcios compatibles, así como los múltiples mecanismos de tolerancia frente al estrés salino-alkalino por parte del rizobio *Aminobacter* sp. BA135, que pueden aportar a mejorar la sobrevivencia de los microorganismos formulados en los bioinsumos en ambientes restrictivos como los bajos alcalinos-sódicos.

Palabras Clave: Suelos alcalino-sódicos, *Lotus tenuis*, rizobios, bacterias solubilizadoras de fosfato, diversidad taxonómica, biofertilizantes, forraje, calidad nutricional, mutagénesis al azar, RNA-seq, mecanismos de tolerancia.

ABSTRACT

The Flooding Pampa region contains half of the total cattle stock in the province of Buenos Aires and is considered the most important breeding region in Argentina. However, approximately 60% of its surface is dominated by “lowlands” whose edaphic characteristics severely limit the production of quality pastures. In this context, there is a deep interest in the search for alternatives that allow the use of these lowlands in order to improve the forage resource as well as the livestock productivity. Among the strategies that have been proposed, the use of native or naturalized legumes, such as *Lotus tenuis*, is one of the most outstanding. This legume is very attractive because of its high forage value and adaptation to the different Flooding Pampa environments, even those that represent the most restrictive zones such as the alkaline-sodic lowlands. However, the successful incorporation into the latter is still far from optimal. In response to this problem, this thesis proposes the search for growth-promoting bacteria associated with *L. tenuis*, tolerant to saline-alkaline conditions, for the design of bio-formulates as a strategy to improve pasture production in the alkaline-sodic lowlands of Flooding Pampa.

For this purpose, two bacterial communities were analyzed: Phosphate solubilizing bacteria (PSB) and nitrogen fixing bacteria (NFB). A total of 310 phosphate solubilizing bacteria isolated from the rhizosphere of *L. tenuis* plants naturalized from the soils of the alkaline-sodic lowlands was analyzed, of which more than 95% showed the ability to solubilize phosphate under saline-alkaline conditions. According to this, the isolates were qualified in 3 phenotypic groups, with the group of bacteria with broad range phosphate solubilizing ability (BSFRA) being the most promising one due to its plasticity to solubilize phosphate under different alkaline-sodium conditions. The BSFRA group showed a high genetic biodiversity composed exclusively of members of the family *Pseudomonadaceae* and the order *Enterobacteriales* (the latter being the most dominant), distributed to, at least, 7 bacterial genera. The genus *Pantoea* was the most abundant with 9 genetically different strains. Based on their plant growth promotion capabilities, in addition to the "use of safe microorganisms" criterion, *P. eucalypti* strains MA66, P76, P63, P163 and P173 were selected for both *in vitro* and *in planta* comparative studies. All *P. eucalypti* strains displayed *in vitro* PGPR attributes providing evidence of their potential promoter effect in plants. However, when they were evaluated in the Rhizobia-PGPR-legume tripartite system in alkaline-sodic soils, they showed remarkable differential effects on the growth variables such as total, shoot and nodule dry weight, as well as on the concentration and accumulation of P, N and Zn. These results revealed the strong intra-species variability and the complexity of plant-microorganism interactions, as well as the importance of *in planta* evaluation for the selection of promising strains for the elaboration of bioformulates.

Simultaneously, another prospective analysis of the rhizobial symbiont community associated to *L. tenuis* was carried out. To this end, a community of 126 infective rhizobia was analyzed and revealed to be genetically very diverse; in addition to being dominated -although not exclusively- by members of the genus *Mesorhizobium*, other members of the *Phyllobacteriaceae* family (*Aminobacter* and *Phyllobacterium*) were also identified. Through the characterization of tolerance to saline and/or alkaline conditions, it was found that the community of infective symbionts is mostly sensitive to such conditions *in vitro*. The same pattern of behavior was observed in an *in vivo* system with soil from alkaline-sodic lowlands, although the latter was not as restrictive as the former. The comparison of the results obtained in both systems evidenced the complexity of the adaptation mechanisms of rhizobia to abiotic stress of the environment. Among the whole community of infective rhizobia, the *Aminobacter* group was identified as the most outstanding one because its adaptive capabilities to saline-alkaline conditions both *in vitro* and soil. From these results, a rhizobial strain of the genus *Aminobacter* tolerant to alkaline-sodic conditions was used to deepen the knowledge about its tolerance mechanisms. *Aminobacter* sp. BA135 was selected as a model organism for the identification of tolerance mechanisms to saline-alkaline conditions. Two groups of genes involved in the response to salinity or salinity and alkalinity simultaneously were identified by random mutagenesis. While among the strategies of response to salinity were the modification of the bacterial wall structure, the use of compatible osmolytes and the control of oxidative stress, against saline-alkaline stress, the regulation of homeostasis was identified as the main response strategy, followed by the modulation of bacterial wall metabolism and the activation of stress response genes. In addition, cobalamin (vitamin B12) was identified as an important molecule for alkaline-salt stress tolerance. Complementarily, a transcriptomic study showed that BA135 employs a variety of complex and coordinated strategies in order to maintain core functions and ensure cell viability, including regulation of homeostasis, storage of carbon sources, control of reactive oxygen species (ROS) levels, expression changes in substrate transport systems, optimization of energy resources, expression of stress response genes, and accumulation of osmoprotectants. This study also revealed an interesting connection between cobalamin-dependent methionine synthesis and glycine-betaine compatible solute metabolism under stress conditions.

Keywords: Alkaline-sodic soils, *Lotus tenuis*, rhizobia, phosphate solubilizing bacteria, taxonomic diversity, biofertilizers, forage, nutritional quality, random mutagenesis, RNA-seq, tolerance mechanisms.

Índice

CAPITULO I: Introducción General.....	1
I.1. Suelos afectados por sal.....	3
I.1.1. Clasificación de los suelos afectos por sal.....	3
I.2. Efectos de los suelos afectados por sal en las plantas.....	6
I.3. Nutrientes en los suelos afectados por sal.....	7
I.3.1. El suelo como fuente de nutrientes.....	7
I.3.2. Disponibilidad de nutrientes minerales.....	8
I.3.3. Nitrógeno y Fósforo como principales limitantes.....	10
I.4. Estrategias de promoción agrícola en suelos afectados por sal.....	13
I.4.1. La problemática de los fertilizantes químicos.....	13
I.4.2. Soluciones agrícolas sostenibles.....	13
I.5. Rizobacterias Promotoras del Crecimiento de Plantas (PGPR).....	15
I.5.1. Bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN).....	17
I.5.2. Fosfobacterias.....	24
I.6. Efectos del uso de PGPR en suelos afectados por sal.....	26
I.7. Bajos alcalino-sódicos de la Pampa Deprimida del Salado (PDS).....	28
I.8. <i>Lotus tenuis</i> como estrategia para incrementar la producción forrajera.....	34
Objetivos.....	36
 CAPITULO II: Materiales y Métodos.....	 37
II.1. Colecta de campo.....	39
II.2. Propiedades fisicoquímicas del suelo.....	40
II.3. Procedimientos Microbiológicos.....	41
II.3.1. Medios de cultivos para Microorganismos.....	41
II.3.2. Medios para cultivo <i>in vitro</i> de plantas y solución de riego.....	44
II.3.3. Antibióticos.....	45
II.3.4. Cepas y plásmidos.....	45

II.3.5. Aislamiento de bacterias solubilizadoras de fosfato a partir de rizosfera de <i>L. tenuis</i>	46
II.3.6. Desinfección superficial de nódulos.....	46
II.3.7. Aislamiento de rizobios a partir de nódulos	46
II.3.8. Conservación y preparación de cultivos bacterianos.....	46
II.3.9. Estimación de biomasa y recuento de bacterias “drop plate” (goteo en placas)..	46
II.3.10. Recuento de unidades formadoras de colonias (UFC).....	47
II.3.11. Cinética de crecimiento en medio líquido	47
II.3.12. Conjugación biparental	48
II.4. Técnicas Moleculares	50
II.4.1. Extracción de ADN mediante lisis alcalina	50
II.4.2. Extracción y purificación de ADN	50
II.4.3. Extracción de ARN total.....	50
II.4.4. Cuantificación y Análisis de calidad de Ácidos nucleicos.....	51
II.4.5. Extracción del plásmido pSAM_R1	51
II.4.6. Perfiles o huellas genómicas (<i>Fingerprinting</i>)	52
II.4.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	52
II.4.8. Diseño de oligos para PCR.....	53
II.4.9. Purificación y secuenciación de productos de PCR.....	55
II.4.10. Determinación de identidad por <i>matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) time-of-flight (TOF)</i>	55
II.4.11. Identificación de sitios de inserción con los oligonucleótidos IRR3, IRL2.....	55
II.5. Ensayos Biológicos	56
II.5.1. Esterilización y escarificación de semillas	56
II.5.2. Germinación de semillas	56
II.5.3. Ensayo de infectividad de rizobios	56
II.5.4. Ensayo de tolerancia a estrés salino, alcalino y salino-alcalino de rizobios	56
II.5.5. Solubilización de fosfato en condiciones salino-alcalinas.....	57
II.5.6. Ensayo de supervivencia en suelo restrictivo	58

II.5.7. Producción de sideróforos en condiciones salino-alcálinas - Método Overcast modificado (Schwyn y Neilands, 1987).	58
II.5.8. Estimación colorimétrica de ácido Indol-acético (AIA)	59
II.5.9. Test de bio-compatibilidad	59
II.5.10. Ensayo de promoción de crecimiento de las BSF en suelo restrictivo	59
II.5.11. Determinación de nitrógeno por micro-Kjeldhal	60
II.5.12. Determinación de fósforo y micronutrientes	60
II.5.13. Antibiograma.....	60
II.5.14. Búsqueda de mutantes en condiciones salino-alcálinas	61
II.5.15. Validación de mutantes en condiciones salino-alcálinas	61
II.5.16. Caracterización fenotípica de las mutantes sensibles	61
II.5.17. Capacidad simbiótica de los mutantes BA135.....	61
II.5.18. Eficiencia simbiótica de los mutantes BA135.	62
II.6. Análisis transcriptómico por RNA-seq	63
II.6.1. Diseño Experimental.....	63
II.6.2. Preparación de ARNm y tecnología de secuenciamiento.	64
II.6.3. Análisis transcriptómico.....	64
II.7. Herramientas bioinformáticas y análisis estadísticos	67
II.7.1. Bases de datos.....	67
II.7.2. Alineamiento y construcción de árboles	67
II.7.3. Análisis estadísticos.....	67
CAPÍTULO III: Bacterias solubilizadoras de fosfato de los bajos alcalinos - sódicos.....	69
III.1. Introducción	71
III.2. Aislamiento y caracterización de bacterias solubilizadoras de fosfato.....	74
III.3. Diversidad genética y taxonómica del grupo BSFRA.....	76
III.4. Propiedades <i>in vitro</i> de las cepas <i>P. eucalypti</i> seleccionadas	87

III.5. Efecto de diferentes cepas de <i>P. eucalypti</i> en el crecimiento, nutrición e interacción simbiótica con <i>L. tenuis</i> en suelos alcalino sódicos.....	91
III.5.1. Efectos en los parámetros de crecimiento de <i>L. tenuis</i>	91
III.5.2. Efectos en el estado nutricional de <i>L. tenuis</i>	94
III.6. Anexos.....	103

CAPITULO IV: Rizobios simbioses de *Lotus tenuis*, nativos de los ambientes alcalino-sódicos de la Pampa Deprimida del Salado..... 113

IV.1. Introducción.....	115
IV.2. Aislamiento de rizobios simbioses de <i>L. tenuis</i> en ambientes alcalino-sódicos de la Pampa Deprimida del Salado.....	117
IV.3. Diversidad genética y taxonómica de los rizobios simbioses de <i>L. tenuis</i>	119
IV.4. Tolerancia <i>in-vitro</i> a condiciones alcalino-salinas.....	129
IV.5. Tolerancia <i>in vivo</i> a condiciones alcalino - sódicas.....	133
IV.6. Estudio Taxonómico de la cepa A65.....	136
IV.7. Anexos.....	141

CAPÍTULO V: Mecanismos involucrados en la respuesta al estrés salino-alcalino de la cepa *Aminobacter* sp. BA135..... 147

V.1. Introducción.....	149
V.2. Tolerancia al estrés salino-alcalino de la cepa <i>Aminobacter</i> sp. BA135.....	151
V.2.1. Tests de tolerancia en medio sólido.....	151
V.2.2. Crecimiento de <i>Aminobacter</i> sp. BA135 en medio líquido.....	152
V.3. Identificación de genes involucrados en la tolerancia al estrés salino – alcalino de BA135 por mutagénesis aleatoria.....	155
V.3.1. Antibiograma de BA135.....	155
V.3.2. Mutagénesis aleatoria.....	156
V.3.3. Mutantes sensibles a salinidad.....	164

V.3.4. Mutantes sensibles a salinidad y alcalinidad.....	169
V.3.5. Evaluación funcional de mutantes de la cepa BA135	173
V.3.6. Efecto de las mutaciones en la capacidad simbiótica con <i>L. tenuis</i>	175
V.3.7. Efecto de las mutaciones en la eficiencia simbiótica en <i>L. tenuis</i>	176
V.4. Análisis Transcriptómico de la cepa BA135 en condiciones salino–alcalinas.....	180
V.4.1. Genes relevantes en la respuesta al estrés salino-alcalino	184
V.4.2. Cambios en el transcriptoma de BA135 en condiciones de estrés salino-alcalino	191
V.5. Anexos	203
Discusión general.....	209
Conclusiones.....	221
Referencias.....	225

LISTA DE FIGURAS

Figura I.1. Categorías de suelos afectados por sal.....	5
Figura I.2. Disponibilidad de nutrientes esenciales en suelo de acuerdo a los niveles de pH	9
Figura I.3. Principales procesos de transformación en los ciclos de Fósforo y Nitrógeno.....	11
Figura I.4. Diagrama sobre los mecanismos de promoción directa e indirecta de crecimiento de plantas.....	16
Figura I.5. Proceso de infección en la simbiosis Rizobio-Leguminosa.....	19
Figura I.6. Esquema de nódulos determinados e indeterminados.....	21
Figura I.7. Mapa de la Argentina y la distribución de las sub-regiones de la Pampa Argentina.....	29
Figura I.8. Pastizales de la región de la Pampa Deprimida del Salado.....	30
Figura I.9. Toposecuencia típica de la Pampa Deprimida del Salado.....	32
Figura I.10. Paisaje de los bajos alcalinos-sódicos.....	32
Figura I.11. <i>L. tenuis</i> naturalizado en los suelos de los bajos alcalino-sódicos de la Pampa Deprimida del Salado y estructuras tipo costra, producto del exceso de sales de sodio.....	35
Figura II.1. Lugares de colecta en la región de la Pampa Deprimida del Salado.....	39
Figura II.2. Mapa de los vectores de mutagénesis pSAM_Rl y pSUP2021.....	49
Figura II.3. Esquema de la ubicación de los oligos IRL3 e IRR2 en el transposón.....	53
Figura II.4. Diagrama del diseño experimental del estudio de RNA-seq de la cepa BA135 en condiciones salino-alcalino.....	63
Figura II.5. Flujograma de análisis de datos del RNA-seq de la cepa BA135.....	65
Figura III.1. Ensayo de actividad solubilizadora de fosfato inorgánico de las bacterias aisladas de la rizosfera de <i>Lotus tenuis</i>	74
Figura III.2. Ensayo de solubilización de fosfato en condiciones de estrés mixto en medio selectivo NBRIP.....	75
Figura III.3. Árbol de similitud UPGMA de los patrones BOX-PCR del grupo BSFRA.....	78
Figura III.4. Árbol filogenético de máxima verosimilitud que muestra la posición filogenética de las cepas del orden <i>Enterobacteriales</i> del grupo BSFRA.....	80 - 81

Figura III.5. Árbol filogenético de máxima verosimilitud que muestra la posición filogenética de las cepas de la familia <i>Pseudomonadaceae</i> del grupo BSFRA.....	82
Figura III.6. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en la concatenación de las secuencias de los genes ARNr 16S, <i>gyrB</i> , <i>rpoB</i> mostrando la posición de las cepas P76, MA66, P63, P163, P173 y M91.....	85
Figura III.7. Capacidad solubilizadora de fosfato de las cepas de <i>P. eucalypti</i> en medio líquido.....	89
Figura III.8. Imágenes representativas del ensayo de promoción de crecimiento de <i>L. tenuis</i> en suelos alcalino-sódicos.....	93
Figura III.9. Concentración de nutrientes en vástago y raíz de plantas de <i>L. tenuis</i> inoculadas con <i>M. sanjuanii</i> BSA136 o con diferentes consorcios <i>P. eucalypti</i> – <i>M. sanjuanii</i>	95
Figura III.10. Acumulación total de nutrientes en plantas de <i>L. tenuis</i> inoculadas con <i>M. sanjuanii</i> BSA136 o con diferentes consorcios de <i>P. eucalypti</i> – <i>M. sanjuanii</i>	96
Figura III.11. Acumulación de nutrientes en vástago y raíz de plantas de <i>L. tenuis</i> inoculadas con <i>M. sanjuanii</i> BSA136 o con diferentes consorcios de <i>P. eucalypti</i> – <i>M. sanjuanii</i>	98
Figura IV.1. Ensayo de infectividad de aislamientos obtenidos a partir de nódulos, en plántulas de <i>Lotus tenuis</i> cultivadas en medio EVANS agarizado sin nitrógeno.....	118
Figura IV.2. Árbol de similitud UPGMA de los rizobios de <i>Lotus tenuis</i> aislados en ambientes alcalino-sódicos de la Pampa Deprimida del Salado.....	120
Figura IV.3. Imágenes referenciales de la prueba de tolerancia a condiciones salinas, alcalinas y salino-alcalinas.....	129
Figura IV.4. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en secuencias del gen ARNr 16S que muestra la posición de la cepa A65.....	137
Figura IV.5. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en secuencias de genes concatenados de ARNr 16S, <i>dnaK</i> y <i>glnII</i> que muestran la posición de las cepas A65 y BA135.....	138
Figura V.1. Tests de tolerancia a condiciones de estrés salino y/o alcalino de BA135.....	151
Figura V.2. Validación de mutantes sensibles a salinidad y alcalinidad de BA135.....	157
Figura V.3. Caracterización fenotípica de los mutantes en condiciones de salinidad y alcalinidad	158
Figura V.4. Contexto genómico de los mutantes sensibles a salinidad de la cepa BA135.....	168

Figura V.5. Contexto genómico de las mutaciones que provocan sensibilidad a salinidad y alcalinidad en BA135.....	172
Figura V.6. Ensayo de crecimiento de la cepa BA135 y del mutante LC2717.....	173
Figura V.7. Crecimiento de la cepa BA135 y del mutante LC3924.....	174
Figura V.8. Evaluación funcional del mutante LC4829.....	175
Figura V.9. Ensayo de eficiencia simbiótica de algunos mutantes derivados de BA135.....	177
Figura V.10. Ensayo de nodulación de los mutantes de BA135 en condiciones control.....	178
Figura V.11. Electroforesis de las muestras de ARN.....	180
Figura V.12. MA-plot que representa la media normalizada de todas las lecturas cuantificadas para los 6505 genes del genoma de BA135.....	182
Figura V.13. Expresión diferencial de BA135 en condiciones salino-alcalinas.....	183

LISTA DE TABLAS

Tabla II.1. Propiedades físico-químicas de los suelos.....	40
Tabla II.2. Tabla de antibióticos usados en este trabajo.....	45
Tabla II.3. Relación de cepas y plásmidos empleados en este trabajo.....	45
Tabla II.4. Características del diseño de los IRL3 e IRL2.....	53
Tabla II.5. Relación de oligonucleótidos empleados en este trabajo.....	54
Tabla III.1. Clasificación de las BSF según su habilidad de solubilización de fosfato bajo condiciones alcalino-sódicas.....	75
Tabla III.2. Comparación de secuencias entre las cepas selectas aisladas de la rizosfera de <i>L. tenuis</i> y la cepa tipo de <i>Pantoea eucalypti</i>	84
Tabla III.3. Características genotípicas y taxonómicas de las bacterias BSFAR.....	86
Tabla III.4. Evaluación <i>in vitro</i> de actividades PGPR en cepas seleccionadas de <i>P. eucalypti</i>	88
Tabla III.5. Efecto de la inoculación de rizobios y bacterias solubilizadoras de fosfato de <i>P. eucalypti</i> sobre la acumulación de materia seca de <i>L. tenuis</i> en un suelo alcalino-sódico.....	93
Tabla IV.1. Origen e infectividad de rizobios aislados en <i>L. tenuis</i>	118
Tabla IV.2. Asignación taxonómica de los rizobios simbioses de <i>L. tenuis</i> de los suelos alcalino-sódicos de la Pampa Deprimida del Salado.....	122
Tabla IV.3. Descripción del fenotipo de tolerancia en condiciones salinas, alcalinas y salino-alcalinas de los rizobios aislados de <i>L. tenuis</i>	130
Tabla IV.4. Ensayo de supervivencia en suelo alcalino-sódico.....	133
Tabla V.1. Variables de crecimiento de la cepa BA135 en distintas condiciones de estrés.....	154
Tabla V.2. Frecuencia de resistencia a antibióticos.....	155
Tabla V.3. Lista de transposantes validados, sensibles a condiciones de salinidad y/o alcalinidad...	157
Tabla V.4. Caracterización fenotípica de los mutantes de BA135 seleccionados.....	159
Tabla V.5. Transposantes seleccionados para la identificación de las mutaciones.....	162
Tabla V.6. Identidad de los genes interrumpidos por la inserción del transposón pSAM_RI en cada mutante de BA135.....	163
Tabla V.7. Ensayo de nodulación en <i>L. tenuis</i>	176

Tabla V.8. Cuantificación de la concentración e índices de pureza por diferentes metodologías ...	181
Tabla V.9. Calidad de las lecturas crudas de BA135 en condiciones restrictivas.....	182
Tabla V.10. Relación de genes con mayores valores de aumento de expresión en condiciones salino- alcalinas.....	185
Tabla V.11. Relación de genes con mayores valores de decremento de expresión en condicione salino- alcalinas.....	188

ABREVIATURAS

°C	Grados celsius	dS	Decisiemens
μ	Micro	EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
μg	Microgramo	ENODs	Genes de nodulación temprana
μL	Microlitro	EPS	Exopolisacáridos
μm	Micrómetro	FBN	Fijación biológica del nitrógeno
a.a	Aminoácido	g	Gramo
ADN	Ácido Desoxirribonucleico	g	Tiempo de duplicación o generación
AIA	Ácido indol acético	Gm	Gentamicina
Amp	Ampicilina	h	Horas
ANOVA	Análisis de la varianza	Ha	Hectáreas
AO	Ácidos orgánicos	ISF	Índice de solubilización de fosfato
ARN	Ácido Ribonucleico	k	Capacidad de carga
ARNm	ARN mensajero	Kb	Kilobase
ARNr	ARN ribosomal	Kcal	Kilocaloría
ARNt	ARN de transferencia	Kg	Kilogramos
atm	Atmósfera	Km	Kanamicina
ATP	Adenosin-5 trifosfato	km	Kilómetro
BFN	Bacterias Fijadoras de Nitrógeno	L	Litro
BMF	Bacterias mineralizadoras de fosfato	L2FC	Log 2 Fold Change
BrEt	Bromuro de Etidio	<i>lag</i>	fase lag
BSF	Bacterias solubilizadoras de fosfato	LB	Luria - Bertani
BSFRA	BSF de rango amplio	LCOs	Lipo-chito-oligosacáridos
BSFRE	BSF de rango estrecho	m	Metro
BSFRI	BSF de rango intermedio	M	Molar
CAS	Chrome Azurol S	meq	Miliequivalentes
Cd.	Ciudad	mg	Miligramos
cDNA	ADN complementario	min	Minutos
CCaMK	Calcio-calmodulina kinasa	MM	Medio mínimo
CE	Conductividad Eléctrica	mm	Milímetros
CIC	Capacidad de Intercambio catiónico	mM	Milimolar
cm	Centímetros	MO	Materia orgánica
DAPA	Ácido Diaminopimélico	mQ	miliQ
DEPC	Dietilpirocarbonato	N	Normal
dNTP	Desoxirribonucleótido(s) trifosfato	NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido
DO	Densidad óptica		fosfato

NBRIP	National Botanical Research Institute's phosphate	SDS	Dodecilsulfato sódico
nm	Nanómetros	SE	Error estándar
nM	Nanomolar	Sm	Estreptomicina
ORF	<i>Open reading frame</i>	Spc	Espectinomicina
p	valor p	TA	Temperatura ambiente
p _{adj}	valor p ajustado	TBE	Tris-Borato-EDTA
pb	Pares de bases	TCA	Ácido tricarboxílico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa	TE	tris-EDTA
PDS	Pampa Deprimida del Salado	THG	Transferencia horizontal génica
p.ej.	Por ejemplo	T _m	Temperatura de melting
PEP	Fosfoenolpiruvato	TY	Triptona Yeast Agar
PGPR	Rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas	UFC	Unidades Formadoras de Colonias
P _i	Fosfato inorgánico	UV	Ultravioleta
P _o	Fosfato orgánico	V	voltios
ppm	Partes por millón	vol	volumen
PSI	Porcentaje de sodio intercambiable	v/v	Volumen en volumen, ml/100ml
qPCR	PCR en tiempo real o cuantitativa	WT	Wild Type o silvestre
RAS	Relación de absorción de Sodio	YEM	Yeast-extract-Manitol Agar
RIN	RNA <i>integrity number</i>	λ	longitud de onda
ROS	Especies reactivas del oxígeno		
rpm	revoluciones por minuto		

CAPITULO I

Introducción General

I.1. Suelos afectados por sal

El suelo contiene sales solubles de diversa composición iónica que, si se acumulan y alcanzan una cierta concentración, pueden resultar tóxicas para las plantas como ocurre en los denominados “suelos afectados por sal”. En estos suelos, el exceso de sales solubles puede ocasionar un retardo en el crecimiento y generar daños tisulares que pueden afectar negativamente la producción de los cultivos. (Eynard *et al.*, 2005). Los suelos afectados por sal pueden originarse de forma natural (Salinización Primaria) por efecto de la meteorización física y química de las rocas, deposición de areniscas, evapotranspiración e irrupción de agua del océano en zonas costeras; o de forma inducida (Salinización Secundaria) como consecuencia de actividades antropogénicas como la deforestación o el uso excesivo de fertilizantes y otros agroquímicos (Fitzpatrick R.W., 2002, Arora y Dagar., 2019, Srivastava *et al.*, 2019).

Según la FAO (2008) los suelos afectados por sal, cubren más de 800 millones de hectáreas de la superficie terrestre mundial. A pesar del supuesto general de que dichos suelos se encuentran principalmente en climas áridos y semiáridos, lo cierto es que es posible hallarlos en cada zona climática de cada continente, excepto en la Antártida (Rengasamy, 2006). Estos suelos presentan propiedades morfológicas, físicas, químicas y biológicas marcadamente diversas y variadas, por lo que el entendimiento de su naturaleza ayudaría en el diseño de las estrategias de recuperación y manejo (Rengasamy, 2010).

I.1.1. Clasificación de los suelos afectos por sal

La composición de los suelos afectados por sal comúnmente incluye una mezcla de los cationes sodio (Na^{2+}), calcio (Ca^{2+}), magnesio (Mg^{2+}) y potasio (K^{+}) con los aniones cloruro (Cl^{-}), sulfato (SO_4^{2-}), carbonato (CO_3^{2-}) y bicarbonato (HCO_3^{-}) (en ocasiones también borato y nitrato). Estos suelos se definen y clasifican principalmente en base a la determinación de las variables: CE (Conductividad Eléctrica), PSI (Porcentaje de Sodio Intercambiable) y de los iones dominantes en un extracto de pasta saturada de cada tipo de suelo. El PSI se determina intercambiando el Na^{+} del suelo con otro ion, como Ca^{2+} , mediante técnicas de fotometría o espectrometría, mientras que la CE indica la concentración de sales en la solución de suelo, medida por evaporación y técnicas electroconductométricas o espectrométricas (Sparks, 2003). De acuerdo a estas variables, la clasificación de los suelos afectados por sal se resume en 3 categorías: salinos, sódicos y salinos-sódicos (Figura I.1).

Las características que definen a los suelos salinos comprenden niveles de PSI alrededor de 15, $\text{CE} > 4.0 \text{ dS m}^{-1}$ y $\text{pH} < 8.5$, así como la dominancia de los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} y los aniones Cl^{-}

y SO_4^{2-} . Otras sales de baja solubilidad como CaSO_4 y CaCO_3 , también pueden estar presentes. En este tipo de suelos los niveles de sodio intercambiable no representan un problema, por lo que la permeabilidad es buena. Sin embargo, es frecuente la aparición de estructuras blanquecinas tipo costras en su superficie debido a la acumulación de sales, y entre las estrategias para su recuperación se destaca la aplicación de cantidades suficientes de agua que lixivien las sales más allá de la zona de la raíz (Sparks, 2003, Ogle y Loren, 2010).

Cuando los suelos tienen un elevado contenido de ión sodio tanto en la solución como en el complejo de cambio (formado principalmente por las partículas coloidales de arcilla y de materia orgánica), estamos ante la presencia de suelos denominados “sódicos”, que se caracterizan por la dominancia de los iones de Na^+ , carbonatos y bicarbonatos, además de los aniones Cl^- y SO_4 . Las características que definen estos suelos son valores de $\text{CE} < 4.0 \text{ dS m}^{-1}$, $\text{PSI} > 15.0$ y niveles de pH generalmente entre 8.5 y 10.5, esto último en consecuencia de la hidrólisis del Na_2CO_3 . Asimismo, se calcula la relación de absorción de sodio (RAS) que es la relación entre el Na^+ y los cationes bivalentes Ca^{2+} y Mg^{2+} el cual resulta en valores de $\text{RAS} > 13$. (Sparks, 2003). En estos suelos, los altos niveles de sodio intercambiable hacen que las partículas del suelo se dispersen, lo que disminuye el espacio poroso dentro del suelo y aumenta la formación de costras. La pérdida de permeabilidad por la reducción del espacio poroso puede restringir severamente el movimiento del agua hacia la zona de la raíz, lo que resulta en una situación de estrés para las plantas por falta de agua (Ogle y Loren, 2010).

Cuando, además del sodio, existe acumulación de sales solubles en las capas superiores, los suelos sódicos se convierten en suelos salino-sódicos, diferenciables por contener niveles de $\text{CE} > 4 \text{ dS m}^{-1}$, $\text{PSI} > 15$ y $\text{pH} < 8.5$. Debido a la alta concentración de electrolitos, el pH del suelo se mantiene por debajo de 8.5; no obstante, si las sales solubles son lixiviadas el sodio se convierte en el principal problema, lo que conlleva al incremento del pH por encima de 8.5 y a la dispersión de las partículas del suelo (Richards, 1954; Sparks, 2003).

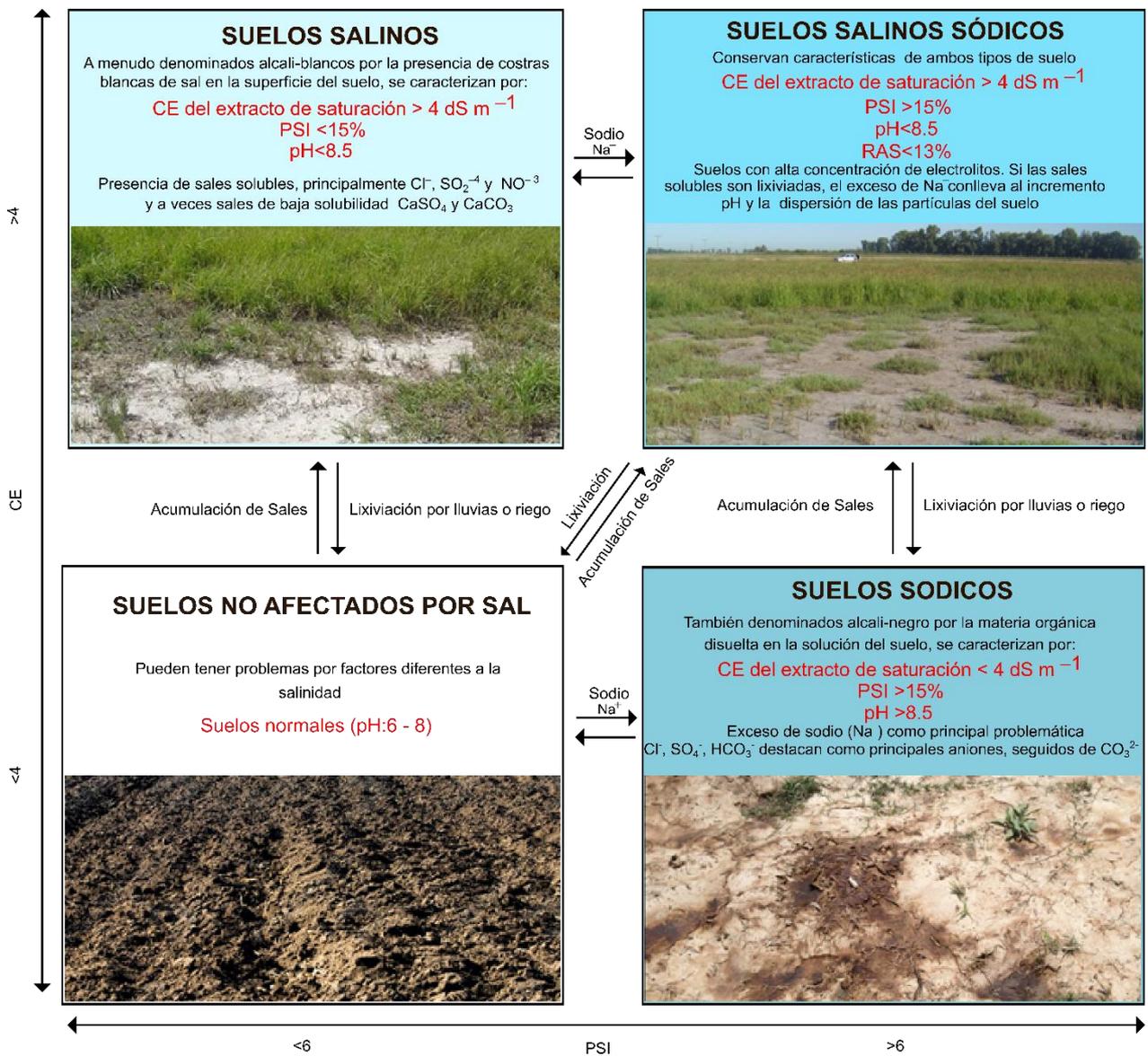


Figura I.1. Categorías de los suelos afectados por sal, en base a los criterios de pH, conductividad eléctrica (CE) a 25°C y el porcentaje de sodio intercambiable (PSI) en un extracto de pasta saturada. Adaptado de Ogle y Loren (2010) y Rengasamy (2010).

I.2. Efectos de los suelos afectados por sal en las plantas

Los efectos de los suelos afectados por sal en las plantas, y en consecuencia en la producción agrícola, son el resultado combinado de la interacción compleja que ocurre entre diferentes procesos a niveles morfológicos, fisiológicos y bioquímicos. Desde una perspectiva general, a medida que incrementa la concentración de sales en el suelo, se reduce el crecimiento de la planta y su capacidad de absorber el agua necesaria por el efecto osmótico de la salinidad en la solución del suelo (Rengasamy, 2010). La reducción de crecimiento resulta de la inhibición directa o indirecta de la división celular, debido a que la salinidad disminuye el crecimiento del vástago afectando el tamaño de las hojas y los tallos, que a su vez influyen metabólicamente en la planta, por la reducción de la fotosíntesis y la respiración por unidad de área de la hoja. Por otra parte, en respuesta a las limitaciones hídricas, la planta incrementa el radio de la raíz por la necesidad de una mayor área de absorción agua y nutrientes (Singh y Chatrath, 2001). Otro efecto adicional en los suelos salinos es la limitación de la absorción de nutrientes por las raíces debido al desbalance en la disponibilidad de diferentes iones, así como efectos tóxicos resultado del exceso de estos (Manchada y Garg, 2007). La sodicidad, por su parte, incrementa el deterioro de las propiedades físicas del suelo que ocasiona la disminución de la porosidad del mismo, lo que restringe aún más la tasa de absorción de agua y nutrientes, así como el intercambio de gases. Además, la alta resistencia del suelo complica el alargamiento y la expansión de las raíces (Rengasamy P., 2002). En las variantes salino-sódicas y alcalino-sódicas, el predominio de bicarbonato y carbonato inducen efectos de toxicidad en las plantas. En particular en los suelos alcalino-sódicos, el problema estructural del suelo puede inducir al anegamiento y al subsecuente incremento de las toxicidades de los elementos manganeso, hierro, sodio, aluminio y boro por efecto del pH en las solubilidades de los mismos (Rengasamy, 2010). Para la mejora o recuperación de los suelos afectados por sal, se han descrito varias estrategias: lixiviación de sales de la zona de las raíces, técnicas de optimización del uso de agua y mejora en las prácticas de manejo de cultivos. No obstante, su implementación suele estar limitada por el costo y la disponibilidad del recurso hídrico (Manchada y Garg, 2008; Shrivastava y Kumar 2015).

Por otro lado, el uso de cultivos tolerantes a sal, en particular de los naturalmente resistentes, destaca entre las estrategias para aliviar el problema de la salinidad, ya que estas permitirían un uso eficiente del riego (Manchada y Garg, 2008) así como el incremento del rendimiento agrícola. No obstante, a pesar del éxito de las estrategias de adaptación de los cultivos tolerantes para abordar las condiciones desafiantes de los suelos, las limitaciones nutricionales -por las características físico-químicas de estos- persisten. Es así que, en campos agrícolas y en particular las regiones destinadas

a la producción ganadera, donde la productividad está fuertemente ligada al recurso forrajero, la optimización de la producción y calidad nutricional de estos es un tema central.

La esencialidad de los minerales en la dieta del ganado es indiscutible, por ello su provisión inadecuada puede resultar en una variedad de síntomas como el poco aumento o pérdida de peso, problemas reproductivos y otras deficiencias. A pesar de que la suplementación de estos minerales se puede lograr mediante otros medios complementarios como inyecciones o bolos intrarruminales, su desventaja radica en el costo adicional que representan para el productor ganadero (Darch *et al.*, 2020). En ese sentido, el bajo costo unitario del forraje y sus beneficios inherentes en la salud ruminal representan una de las opciones más promisorias. Por lo tanto, el comprender y controlar los niveles de minerales en el forraje, podría mejorar la rentabilidad y productividad ganadera.

I.3. Nutrientes en los suelos afectados por sal

I.3.1. El suelo como fuente de nutrientes

Junto al agua, los nutrientes son el factor ambiental que afecta más fuertemente la productividad de los cultivos, la cual, incluso en los ecosistemas más áridos, responde a la adición de uno o más nutrientes, lo que señala a la limitación de los mismos como una problemática generalizada (Lambers y Oliveira, 2019).

El suelo actúa como matriz de diversos nutrientes orgánicos e inorgánicos, que se encuentran interactuando en sus tres fases: sólida, líquida y gaseosa. La fase sólida proporciona un reservorio de nutrientes inorgánicos (Potasio, Calcio, Magnesio y Hierro), así como de componentes orgánicos que proveen nitrógeno, fósforo y azufre, entre otros elementos. La fase líquida contiene iones disueltos que pueden transportarse con mayor facilidad hacia la raíz de las plantas, mientras que los espacios de aire comprendidos entre las partículas del suelo -fase gaseosa- pueden estar ocupados con gases como oxígeno, dióxido de carbono y nitrógeno (Pandey, 2015). Estos nutrientes son mayoritariamente absorbidos por las raíces y distribuidos a los diversos órganos y tejidos vegetales para el cumplimiento de sus funciones específicas, contribuyendo al desarrollo y crecimiento normal de la planta. No obstante, la adquisición también es posible directamente a través de las hojas. Por ejemplo, los componentes volátiles nitrogenados y sulfurosos pueden ser tomados por los estomas, así como los nutrientes disueltos en el agua en el caso de las plantas acuáticas. Entre otras fuentes de absorción se podría mencionar a las presas en plantas carnívoras y asociaciones simbióticas con microorganismos (Lambers y Oliveira, 2019).

Son 17 los nutrientes esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta: carbono (C), hidrógeno (H), oxígeno (O), nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio, (Ca), magnesio (Mg), azufre (S), zinc (Zn), cobre (Cu), manganeso (Mn), hierro (Fe), boro (B), molibdeno (Mo), cloro (Cl) y níquel (Ni). De acuerdo a los niveles de requerimiento, pueden ser clasificados como macronutrientes (C, H, O, N, P, K, Ca, Mg y S), o micronutrientes (Zn, Cu, Mn, Fe, B, Mo, Cl y Ni) (Fageria *et al.*, 2002). Cabe resaltar que todos los nutrientes son igualmente importantes para las plantas y si alguno de ellos se encuentra en cantidades limitantes, el crecimiento de la planta se verá reducido (Fageria *et al.*, 2011). Asimismo, la adquisición y el uso de nutrientes varía según la especie y la variedad del cultivo.

I.3.2. Disponibilidad de nutrientes minerales

La presencia de cantidades suficientes o en exceso de elementos esenciales en el suelo no garantiza su disponibilidad para las plantas en crecimiento, debido a que la cantidad de nutrientes utilizables está influenciada por las propiedades físicas (estructura y textura) y químicas (pH) del suelo. Por sus características fisicoquímicas, en los suelos afectados por sal hay una predominancia de elementos no esenciales en comparación con los esenciales, lo que implica un efecto de dilución y una menor disponibilidad de los segundos, que además representa un gasto extra de energía por parte de la planta para suplir sus necesidades nutricionales (Fageria *et al.*, 2008).

En los suelos salinos el exceso frecuente de iones Na^+ y/o Cl^- por uno o dos órdenes de magnitud por encima de la cantidad de macronutrientes, incluso más en el caso de micronutrientes, disminuye la actividad de los nutrientes y produce proporciones extremas de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, Na^+/K^+ , $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ y $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$ (Grattam y Grieve, 1994). Como resultado, las plantas se vuelven susceptibles a daños osmóticos y iones-específicos, así como a desórdenes nutricionales que pueden afectarlas de diferentes formas. Efectos de inactivación fisiológica por el exceso de un nutriente dado o el desequilibrio por la disponibilidad de nutrientes, deficiencias en la absorción, transporte y partición en la planta, son algunas de ellas (Grattam y Grieve, 1998).

En los suelos alcalino-sódicos, que contienen baja concentración de sales solubles y el porcentaje de sodio intercambiable (PSI) es superior a 15, el pH del suelo aumenta (> 8.0) por el dominio del catión sodio y la prevalencia de aniones carbonato y bicarbonato (Rengasamy, 2010). En ese contexto, el pH del suelo se suma como un factor importante en la disponibilidad de nutrientes en el suelo, ya que estos no se encuentran igualmente disponibles a diferentes niveles de pH, y su disponibilidad varía dramáticamente a medida que incrementa el pH desde los valores ácidos a los básicos. En la figura

I.2 se representa la disponibilidad de algunos macro y micronutrientes en función de los niveles de pH (Figura I.).

Entre los elementos descritos como esenciales, y la problemática de su biodisponibilidad para las plantas, hacemos énfasis en los macronutrientes nitrógeno y fósforo ya que estos se destacan como los más limitantes para la producción de cultivos en la mayoría de las condiciones agroecológicas, por lo que su uso eficiente resulta crucial para la sostenibilidad económica de los sistemas de cultivo.

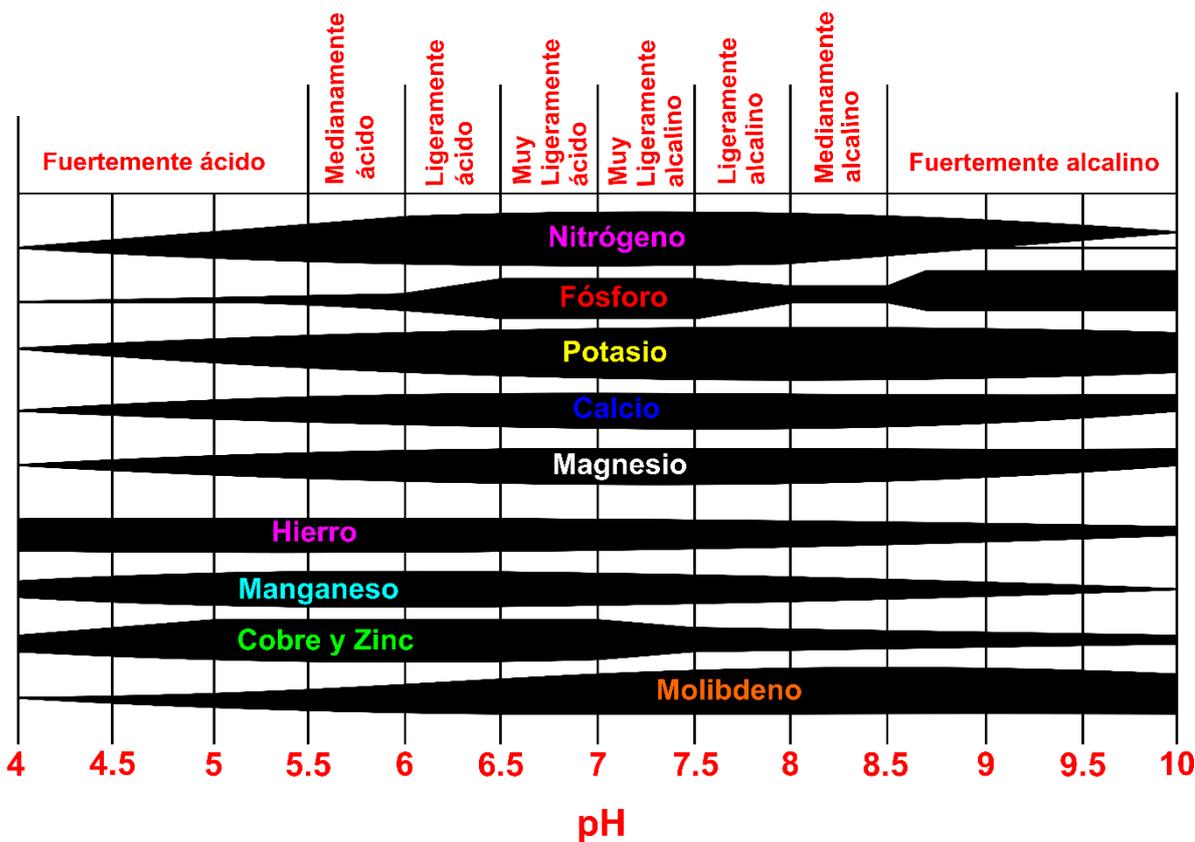


Figura I.2. Disponibilidad de nutrientes esenciales en el suelo de acuerdo a los niveles de pH. La disponibilidad óptima de la mayoría de ellos se encuentra entre el grado neutro y ligeramente ácido, en particular de los micronutrientes Fe, Mn, Cu y Zn. Caso contrario ocurre en el espectro alcalino en donde la solubilidad y disponibilidad estos micronutrientes, decrece significativamente. Los nutrientes K, Ca, Mg y Mo, tienen espectros amplios de disponibilidad, contrastando con el P cuyo espectro es notablemente más reducido entre pH 8 y 8.5. En el caso del N, la disponibilidad se afecta a $\text{pH} > 8.0$ y < 6.0 . Extraído y modificado de H. Lambers y R. S. Oliveira (2019).

I.3.3. Nitrógeno y Fósforo como principales limitantes

El nitrógeno es el principal constituyente de proteínas y ácidos nucleicos, los dos polímeros más importantes de la vida. No obstante, a pesar de su importancia y su abundancia en la atmósfera, como gas dinitrógeno, N_2 , no es accesible para la mayoría de organismos vivos -incluyendo eucariotas- por lo que el nitrógeno disponible frecuentemente limita la productividad primaria en ecosistemas tanto marinos como terrestres (Canfield *et al.*, 2010). Esta inaccesibilidad se sostiene en la estabilidad del N_2 debido a la fuerza del triple enlace entre los átomos de nitrógeno, por lo que se requiere una gran cantidad de energía para su ruptura. Sólo cuando el N_2 es reducido hasta amonio (NH_4^+) es que se convierte en una forma disponible para los productores primarios, por lo que los procesos de fijación del nitrógeno (FN) son fundamentales para la disponibilidad de nitrógeno como nutriente, entre los que destaca la fijación biológica de nitrógeno (FBN) como la principal entrada no antropogénica del nitrógeno a la biosfera (Vitousek *et al.*, 2002).

La FBN es una capacidad exclusiva de bacterias y arqueas especializadas que poseen los complejos enzimáticos nitrogenasa formados por las proteínas dinitrogenasa molibdeno-hierro y la proteína dinitrogenasa-reductasa de vanadio o hierro (Stein y Klotz, 2016). Son estos complejos enzimáticos los que catalizan la reducción del gas N_2 a NH_4^+ , que subsecuentemente participa en una serie de transformaciones que componen el ciclo biogeoquímico del nitrógeno en la Tierra (Figura I.3). Tanto el nitrato (NO_3^-) como el NH_4^+ son las fuentes de N mineral más importantes para la nutrición de las plantas bajo condiciones de cultivo. Estas son captadas por las raíces, transportadas a través de la membrana plasmática de las células epidérmicas y corticales de la raíz en donde pueden ser directamente metabolizadas y almacenadas, o pueden ser transferidas a la parte aérea de la planta. (Krap, 2015). No obstante, la accesibilidad y la utilización de estas fuentes de nitrógeno están fuertemente condicionadas por el ambiente y las condiciones del suelo. En suelos que se encuentran en situaciones de altos niveles de salinidad, la acumulación de N en las plantas se reduce drásticamente (Fageria *et al.*, 2008). Según Grattam y Grieve (1999), bajo estas situaciones el incremento de la absorción y acumulación de Cl^- a menudo se acompaña de la disminución del NO_3^- en el vástago de muchos cultivos, por lo que esto podría asociarse con la competencia entre los iones NO_3^- y Cl^- . Otra importante propiedad química del suelo es el pH, que determina la concentración relativa de NH_4^+ y NH_3 , y en situaciones en donde el nivel de pH tiende a la alcalinidad, se favorece la producción de amoníaco, mejor conocida como “volatilización del amonio”, uno de los procesos descritos de pérdida de nitrógeno (Cameron *et al.*, 2013).

Es en este contexto que surge la necesidad de estrategias para incrementar la eficiencia del uso de los recursos de nitrógeno.

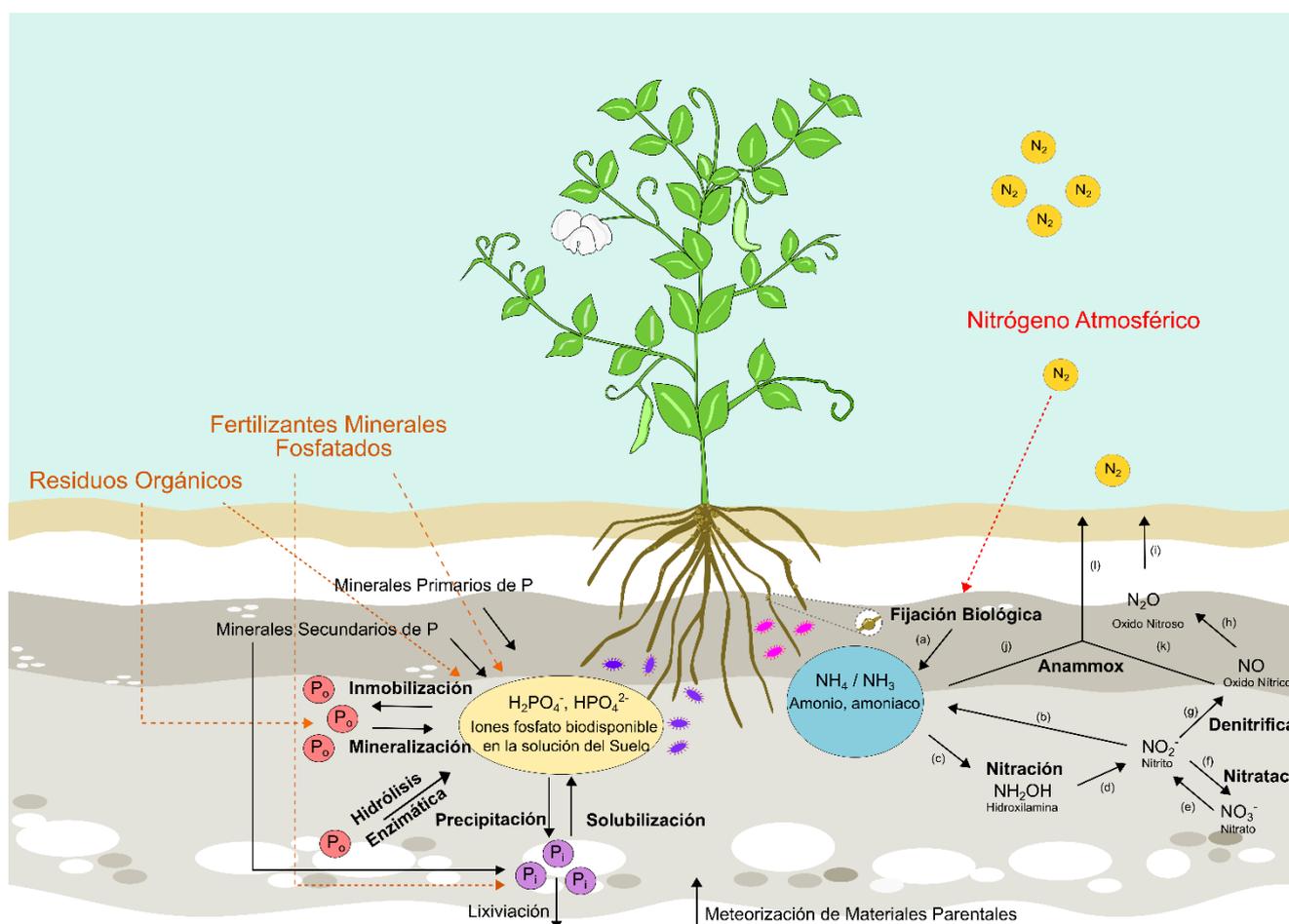


Figura I.3. Principales procesos de transformación en los ciclos de Fósforo (izquierda) y Nitrógeno (derecha). El ciclo del fósforo incluye procesos bióticos y abióticos que usan como sustrato tanto a los compuestos fosfatos producidos de la meteorización de las rocas fosfatadas parentales como a los fertilizantes fosfatados. Entre los principales procesos biológicos de transformación de compuestos fosfatados se encuentran la mineralización que transforma el fósforo orgánico en soluble mediante la liberación de fosfatasas u otras enzimas hidrolíticas y la solubilización que transforma el fósforo inorgánico (P_i) en formas biodisponibles ($H_2PO_4^-$ y HPO_4^{2-}) mediante la producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular, ambas reacciones son reversibles a través de procesos de fijación del Pi y P_o por precipitación, respectivamente. Otras fuentes de P son los fertilizantes fosfatados, no obstante, solo una parte de ellos es absorbida por la planta en consecuencia de las condiciones fisicoquímicas del suelo. Las formas solubles ($H_2PO_4^-$ y HPO_4^{2-}) representan a aquellas utilizables por la planta. El ciclo del N, aunque históricamente ha sido dividido en 3 procesos fundamentales en realidad consta de un conjunto de procesos complejos. La fijación biológica del nitrógeno (a) y la reducción asimilativa (ANRA) y desasimilativa (DNRA) del nitrito (NO_2^-) (b). La nitrificación consiste en la oxidación de amonio (NH_4^+) a nitrito (NO_2^-) (c, Nitración), la oxidación de NO_2^- a nitrato NO_3^- (f, Nitratación) y la recientemente descrita oxidación directa de NH_4^+ a nitrato (NO_3^-) (e). La desnitrificación comprende los procesos de reducción de NO_2^- a óxido nítrico (NO) y de óxido nitroso a N_2 , además de la clásica desnitrificación de NO_3^- a N_2 . Finalmente, el Anammox u oxidación anaeróbica del amonio utiliza los “pools” de NO_2^- y NH_4^+ para generar N_2 . Modificado y adaptado de (Meyer y Johnson, 2016).

Junto al nitrógeno, el fósforo (P) es el otro macronutriente esencial para toda forma de vida, ya que es un componente principal de moléculas tan cruciales como los ácidos nucleicos o los fosfolípidos que componen la membrana y además juega un rol fundamental en una variedad de procesos metabólicos claves y de transferencia de energía (Herrera-Estrella y López-Arredondo, 2016). De forma general el P en el suelo se encuentra en forma inorgánica (P_i) y orgánica (P_o), y contempla tanto compuestos minerales de roca parental, siendo la apatita el mineral primario más frecuente y los fosfatos de calcio, hierro y aluminio los minerales secundarios (Frossard *et al.*, 1995), así como diversas formas orgánicas derivadas de los restos de las células de los organismos y fosfatos biodisponibles (Khan *et al.*, 2014). Asimismo, el ciclo del P en el suelo (Figura I.3) involucra una serie de procesos articulados de transformación del mismo, como la precipitación/disolución y la adsorción/desorción que controlan la transferencia de P entre la fase sólida y la solución del suelo, y los procesos biológicos de inmovilización-mineralización que controlan las transformaciones de P entre formas inorgánicas y orgánicas (Frossard *et al.*, 2000) que se dan tanto de forma biótica como abiótica.

Pese a que los suelos contienen cantidades considerables de P almacenado, las plantas y los microorganismos lo asimilan predominantemente como iones ortofosfato (P_i) desde la solución del suelo. No obstante, solo una fracción pequeña (<1% de fosfato inorgánico y orgánico) se encuentra disuelta en un momento dado (Bünemann, 2015), es por ello que el P_i biodisponible se convierte en un factor recurrentemente limitante para las plantas y en consecuencia para la productividad agrícola. A esto se le suma que la solubilidad de las distintas fuentes de fosfato orgánico e inorgánico y orgánico está influenciada por el pH del suelo (Figura I.2), siendo la situación óptima de disponibilidad y absorción para la planta, valores entre 6 y 7 de pH (Adhya *et al.*, 2015). Es así que, en suelos con características fisicoquímicas no-óptimas como los afectados por sal, en particular los de tipo alcalino-sódicos, los recursos de P disponibles se ven severamente limitados, predominantemente por el acomplejamiento que sufren con los iones Ca^{2+} y en consecuencia la baja solubilidad de los minerales Ca-P (Fageria *et al.*, 2011).

I.4. Estrategias de promoción agrícola en suelos afectados por sal

I.4.1. La problemática de los fertilizantes químicos

En respuesta a las limitaciones naturales descritas anteriormente y ante la necesidad de incrementar la productividad de los cultivos, se utiliza como estrategia -más habitual- el suministro directo de los nutrientes faltantes -principalmente P y N- mediante la aplicación de fertilizantes químicos, con el objetivo de mejorar el rendimiento de la productividad.

Sin embargo, a pesar del beneficio aparente de los agroquímicos, estos no escapan de las limitaciones y efectos de las condiciones fisicoquímicas del suelo. Por ejemplo, los fertilizantes de nitrógeno sintético se encuentran sujetos a constantes pérdidas por procesos de lixiviación y volatilización, que se acentúan bajo ciertas condiciones del suelo, generando un conjunto de impactos ambientales perjudiciales indirectos (Savci, 2012). Además, se estima que de 100 unidades de N reactivo usado en la agro-producción, solo entre el 4 y 14% termina como proteína consumible, lo que indica una alta ineficiencia de la agricultura convencional (Galloway *et al.*, 2004; Pikaar *et al.*, 2017). Por otro lado, en el caso de los fertilizantes fosforados, un gran porcentaje del P_i aplicado en campo se vuelve inaccesible para las plantas, debido a que se fija rápidamente en el suelo por su alta reactividad con los cationes divalentes presentes en el suelo (Na^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+}), provocando daños ecológicos irreversibles.

Además del deterioro de la calidad de los ecosistemas causado por los agroquímicos, estos no resultan asequibles para los agricultores en entornos de bajos recursos, por su alto costo, por lo que resulta fundamental adoptar estrategias agro-biotecnológicas adecuadas y económicamente más accesibles que contemplen el uso responsable de los recursos del suelo para maximizar la productividad agrícola (Herrera-Estrella y López-Arredondo, 2016).

I.4.2. Soluciones agrícolas sostenibles

La necesidad de prácticas agrícolas alternativas a las convencionales es uno de los desafíos constantes para la agricultura sostenible, que tiene como principio fundamental la búsqueda de soluciones inmediatas que no comprometan los recursos del futuro, de modo que exista un equilibrio entre el respeto al medio ambiente, la igualdad social y la rentabilidad económica. Ante ello, el conocimiento y la innovación se convierten en factores claves para el desarrollo de los agro-ecosistemas (Brodt *et al.*, 2011).

Las prácticas agrícolas alternativas pueden ir desde opciones basadas en alta innovación tecnológica, como la modificación genética de cultivos o la agricultura de precisión, hasta aquellas basadas en conceptos más ecológicos como el uso de recursos biológicos disponibles en la naturaleza. Entre las estrategias recopiladas en la revisión de Wezel y col. (2014) se menciona la elección correcta del cultivo y cultivar, así como la elección de la distribución espacial y las sucesiones de los mismos; la optimización de los sistemas de uso de agua mediante la implementación de técnicas como el “riego por goteo”; la diversificación de los sistemas agrícolas mediante rotación de cultivo, innovación en los manejos de la labranza, reintegración de paisajes naturales, control de plagas a través de pesticidas botánicos naturales derivados de semillas, árboles, y/o biopesticidas basados en microorganismos (bacterias y hongos) y, por supuesto, la fertilización mediante el uso de biofertilizantes basados en microorganismos. Este bioinsumo se aplica en forma directa en la semilla previo a la siembra, o también o directamente en el suelo, con el objetivo de lograr que los microorganismos que lo componen colonicen la rizosfera o el interior de la planta y a través una serie de mecanismos incrementen la biodisponibilidad de nutrientes primarios necesarios para la planta (Vessey 2003). Por consiguiente, cada vez son más los estudios de nutrición dirigidos a identificar los microbios presentes en la rizosfera o aquellos presentes como endófitos, que pueden contribuir a la producción sostenible de biomasa vegetal con menos efectos nocivos que los fertilizantes químicos (Pieterse *et al.*, 2016; Enebe y Babalola, 2018). En tal sentido, el uso de microorganismos como estrategia para la mejora nutricional de cultivos se posiciona como tema central en este trabajo de tesis.

I.5. Rizobacterias Promotoras del Crecimiento de Plantas (PGPR)

A lo largo de la evolución las plantas han interactuado con las comunidades microbianas que habitan naturalmente los suelos, estableciendo con algunas de ellas relaciones estrechas, complejas y coordinadas, dejando obsoleto el concepto de individualidad de los organismos superiores (Andreote y Silva, 2017). En la actualidad, el conjunto de estas comunidades responde al concepto de microbioma asociado a planta, el cual ha sido objeto de una gran cantidad de investigaciones en las últimas décadas, evidenciando la enorme importancia y constante interés sobre los microorganismos. (Bulgarelli *et al.*, 2013).

Entre las comunidades microbianas que colonizan la rizósfera, existe un particular y creciente interés en el grupo de bacterias que ejercen un efecto positivo en el crecimiento de las plantas. A menudo denominadas como rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (o PGPR por “*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*”), este grupo de organismos incluye a un extenso grupo de bacterias y hongos que mejoran la nutrición y desarrollo de las plantas y las protegen del ataque de patógenos mediante una amplia variedad de mecanismos (Shailendra Singh, 2015). Estos mecanismos se clasifican en dos grandes grupos (Figura I.4): Mecanismos directos, que involucran una serie de capacidades para el suministro de nutrientes importantes como el nitrógeno, fósforo, potasio y otros elementos esenciales, o la producción de hormonas similares a las producidas en vegetales que impactan directamente sobre el huésped; y Mecanismos indirectos, que implican funciones protectoras de control biológico mediante la inhibición de organismos patógenos o la modulación de los sistemas de defensas vegetales, permitiendo indirectamente el crecimiento y desarrollo de las plantas (Shailendra Singh, 2015). Todos estos mecanismos han sido bien documentados para una amplia variedad de géneros bacterianos, los cuales han logrado captar una considerable atención por su potencial como reemplazo o disminución del uso de agroquímicos, dado que su implementación conlleva beneficios no solo económicos -debido a la disminución de los costes de producción- sino también ecológicos, evitando perjuicios ambientales y manteniendo la sanidad del suelo.

De la variedad de los mecanismos mencionados líneas arriba y en base a los objetivos descritos más adelante, nuestro interés se ha centrado en dos mecanismos directos de promoción del crecimiento de plantas: la fijación biológica del nitrógeno y la solubilización de fosfato, y en especial en los microorganismos relacionados a ellos, por su potencial en la mejora y el incremento de biodisponibilidad de los macronutrientes N y P. Ambos mecanismos se describen a continuación:

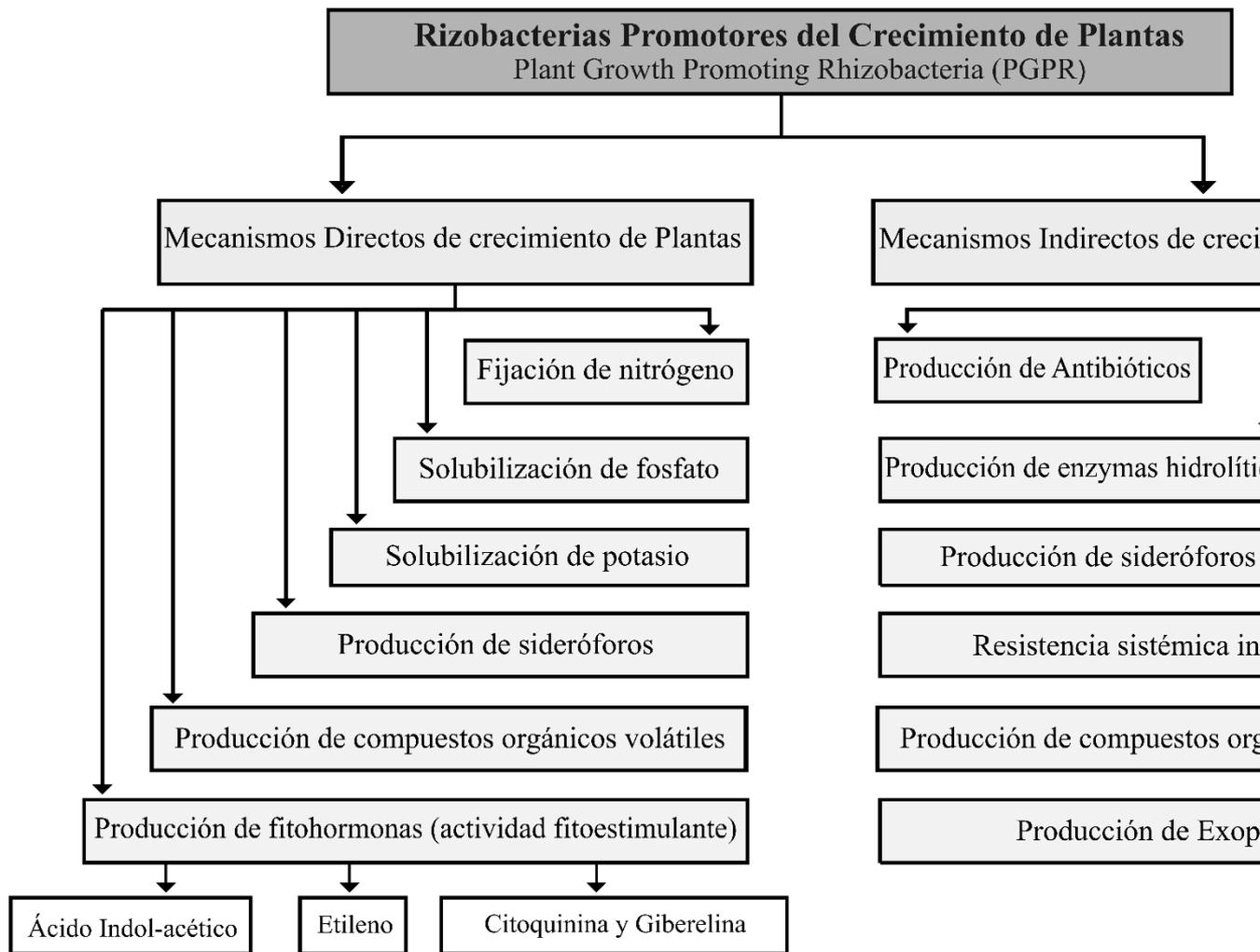
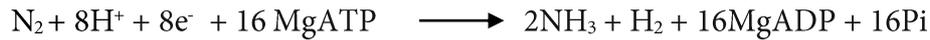


Figura I.4. Diagrama sobre los mecanismos de promoción directa e indirecta de crecimiento de plantas empleado por rizobacterias de Shailendra Singh (2015).

I.5.1. Bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN)

La fijación biológica del nitrógeno es un proceso exclusivo de organismos procariotas, que se lleva a cabo ya sea bajo un contexto simbiótico o en condiciones de vida libre. Estos microorganismos ejercen su función generalmente en las raíces de leguminosas, donde expresan el complejo enzimático nitrogenasa para catalizar la reducción de nitrógeno molecular (N₂) a amonio, según la siguiente reacción (Postgate, 1998):



Debido a la estabilidad del N₂, este proceso biológico requiere una gran cantidad de energía para romper el triple enlace entre sus átomos, lo que involucra el uso de ocho electrones y al menos 16 moléculas de ATP. Es así que en organismos diazotrófos de vida libre, el amonio generado es asimilado a través de la ruta metabólica glutamina sintetasa/glutamato sintasa, mientras que el de los diazótrosos simbióticos es aprovechado directamente por la planta (Postgate, 1998). A pesar de la amplia diversidad fisiológica y taxonómica de los organismos fijadores de nitrógeno, cabe resaltar el alto grado de conservación del complejo enzimático de la nitrogenasa cuya forma convencional (Molibdeno nitrogenasa, Mo-nitrogenasa) está compuesta por dos proteínas altamente conservadas: Dinitrogenasa reductasa hierro (proteína Fe) y dinitrogenasa hierro-molibdeno (proteína MoFe), codificadas por los genes *nifH* y *nifDK* respectivamente (Shridhar, 2012). Algunas bacterias como *Azotobacter* y otros fijadores de nitrógeno (incluyendo algunas cianobacterias) portan formas adicionales de nitrogenasa, cuyo cofactor contiene vanadio (V-nitrogenasa) o solo hierro (Fe-nitrogenasa) (Newton, 2007). La nitrogenasa es irreversiblemente inhibida por el oxígeno molecular y las especies reactivas del oxígeno (ROS), lo que conlleva a que los organismos diazotróficos desplieguen diversos mecanismos protectores de la nitrogenasa frente a los efectos inhibitorios del oxígeno, los cuáles varían según la naturaleza fisiológica y adaptativa de los mismos (de Bruijn, 2015).

Dentro de los organismos fijadores de nitrógeno, nuestro interés se centra en el grupo de bacterias colectivamente denominadas “rizobios”, que se destacan por su capacidad de inducir la formación de órganos especializados -nódulos- en plantas leguminosas, donde dichos micro-simbiontes llevan a cabo la reducción del nitrógeno atmosférico a la forma biológica absorbible por la planta (NH₄⁺). Esta asociación mutualista rizobio-leguminosa representa una de las mayores fuentes de nitrógeno para los ecosistemas naturales y agrícolas.

Simbiosis Rizobio – Leguminosa

La eficacia de esta interacción está determinada en gran parte en la infección intracelular masiva de las células vegetales por parte de los rizobios y en la estructura protectora del nódulo, que proporciona el entorno adecuado para el funcionamiento óptimo de la nitrogenasa y, en consecuencia, de la FBN. El inicio de la interacción requiere previamente el reconocimiento mutuo que, bajo un contexto de comunicación química bidireccional, involucra por parte de la leguminosa la síntesis y secreción de un cóctel de moléculas fenólicas, predominantemente flavonoides (Wang *et al.*, 2012). La percepción éstos por los rizobios activa la proteína NodD que subsecuentemente induce la transcripción de un conjunto de genes involucrados con el proceso de nodulación (*nod*), como consecuencia de la unión de NodD a los motivos de ADN conservados (Cajas *nod*), ubicados en las regiones promotoras de estos genes (Oldroyd *et al.*, 2011, Wang *et al.*, 2012). Estos genes *nod* codifican enzimas involucradas en la producción de lipo-chito-oligosacáridos (LCOs) o factores Nod, que son fundamentales para la señalización del desarrollo de los nódulos. Cabe resaltar que tanto los genes *nod*, como los involucrados en la fijación de nitrógeno (*nif*, *fix*) se localizan frecuentemente en elementos genéticos móviles como plásmidos e islas simbióticas, que son proclives a fenómenos de transferencia genética horizontal (MacLean, 2007).

A pesar de que la estructura básica de los factores Nod, un esqueleto de 3-5 residuos de N-acetilglucosamina, está conservada entre los rizobios, pueden ser objeto de una variedad de sustituciones químicas que incluyen acetilación, glicosilación, metilación o sulfatación. Tales “decoraciones” químicas, particularmente las situadas en el extremo reductor del LCO, suelen jugar un papel crucial en su percepción por la planta hospedadora y por tanto en la especificidad de la interacción bacteria-planta (Wang *et al.*, 2012; Haag *et al.*, 2012).

La percepción del factor de nodulación Nod involucra la participación de receptores tipo kinasas con motivos LysM (*Lysin Motif*) de unión a peptidoglicano y quitina (Radutoiu *et al.*, 2003, Madsen *et al.*, 2004). La interacción entre los receptores y el factor Nod específico conlleva una cascada de transducción de señales y una serie de respuestas celulares, como la modificación del gradiente de calcio en la punta de los pelos radiculares decodificadas por una calcio-calmodulina kinasa (CCaMK), la despolarización transitoria de la membrana plasmática y la reorganización de los filamentos de actina y microtúbulos en las células del pelo de la raíz (Murray, 2011; Garg y Geetanjali., 2009).

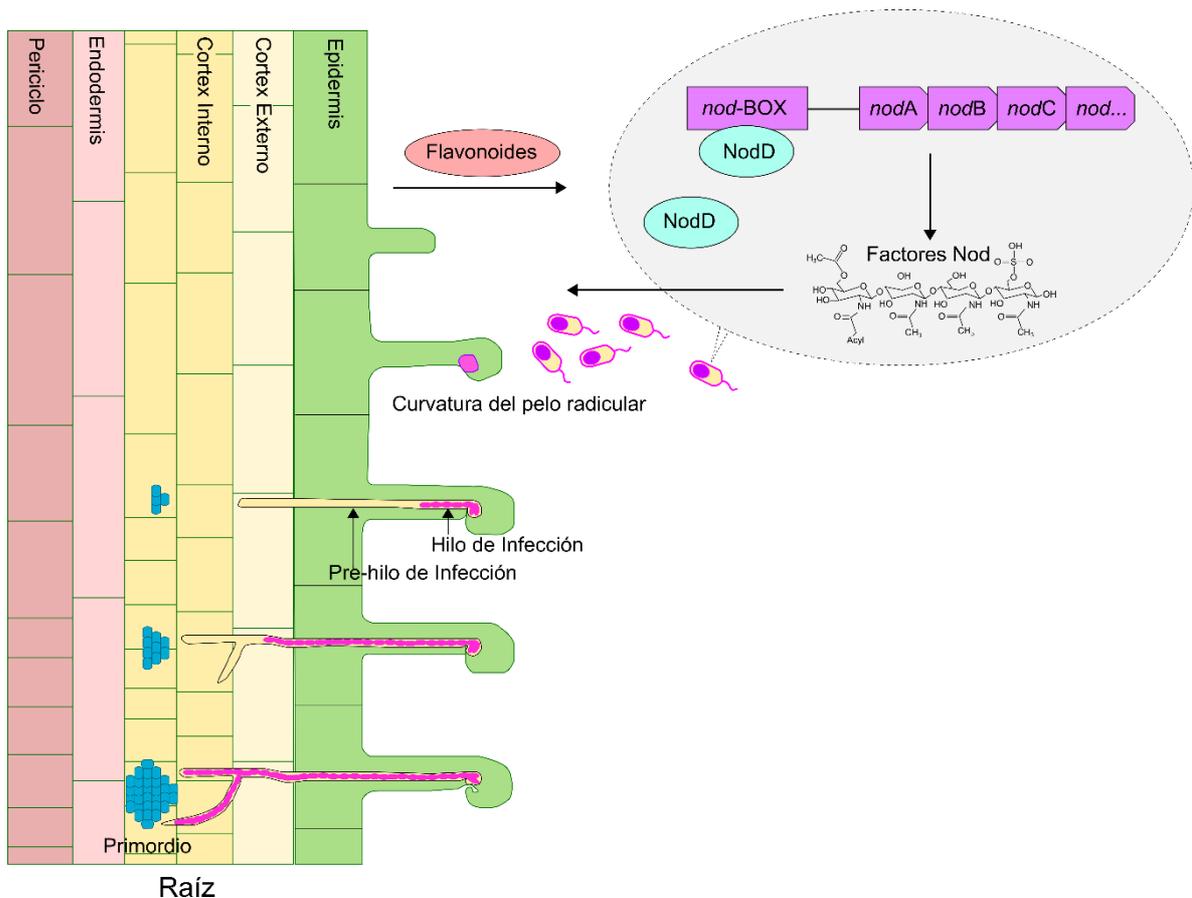


Figura I.5. Proceso de infección en la simbiosis Rizobio-Leguminosa: El inicio de la interacción rizobio-leguminosa se da mediante la secreción de flavonoides por parte de las raíces que actúan como molécula señal para los rizobios de vida libre, activando la expresión de los genes de nodulación, mediada por las proteínas NodD. Estas se unen a los motivos de ADN conservados, cajas *nod* (*nod-BOX*) que subsecuentemente activan la transcripción de los genes de nodulación *nod*. Los genes *nod* codifican las enzimas para la síntesis de los factores Nod, los cuales son secretados por las bacterias y reconocidos en la superficie de las células de la raíz mediante receptores transmembrana, de manera específica cepa-leguminosa. La activación de los receptores del factor Nod, desencadena una serie de cambios en el pelo radicular (curvaturas) que permite la captación de una cantidad de bacterias, permitiendo su colonización. En esta curvatura se da la infección por parte del rizobio, se forma el hilo de infección en dirección a las capas corticales de la raíz. Simultáneamente en la zona cortical se induce la división y proliferación celular dando lugar a la formación del primordio nodular. Una vez que los canales de infección alcanzan estas células, los rizobios son finalmente internalizados mediante un proceso similar a la endocitosis, quedando rodeados por una membrana de origen vegetal previo a diferenciarse en bacteroides. En esta estructura denominada simbiosoma es donde se lleva a cabo la fijación biológica de nitrógeno. Extraído y modificado de Wang *et al.*, 2012.

Esto último probablemente involucrado en los cambios del desarrollo en las raíces, que resulta en la formación de la curvatura en los pelos radiculares (Oldroy y Downie, 2008; Murray, 2011). Otros efectos asociados a la percepción de los factores Nod incluyen la expresión de genes de nodulación temprana (ENODs) inducida por las oscilaciones en las concentraciones de calcio (picos de calcio) en el nucleoplasma y el citoplasma asociado al núcleo de las células epidérmicas de los pelos radiculares (Charron *et al.*, 2004).

Es en estas curvaturas en donde los rizobios inicialmente quedan atrapados y proliferan, lo que ocasiona un incremento de factores Nod, que se piensa son requeridos a un cierto umbral para causar un remodelamiento del crecimiento de la pared de celular de los pelos radiculares. Este remodelamiento resulta en la formación de una estructura tubular conocida como “hilo de infección”, el cual es colonizado masivamente por rizobios permitiéndoles alcanzar las capas de células corticales de la raíz de la planta (Haag *et al.*, 2012). Cabe resaltar que antes de que el hilo de infección alcance la base de las células de los pelos radiculares, se induce a la diferenciación de algunas células corticales de la raíz, reactivando su ciclo celular y provocando que se dividan para formar el primordio nodular. Además de las células corticales, las células del periciclo también se activan y experimentan algunas divisiones celulares (Machanda y Garg, 2007). Cuando los hilos de infección alcanzan las células corticales se ramifican y la red de hilos de infección resultante crece a través de las células corticales hacia el primordio del nódulo en desarrollo. Es en ese instante cuando las bacterias son capaces de ingresar a las células del hospedero a través de estructuras denominadas gotas de infección. Luego, por un proceso similar a la endocitosis las bacterias son rodeadas por la membrana plasmática del hospedero, dando lugar a los simbiosomas. Es en esta estructura en donde las bacterias se diferencian a bacteroides fijadores de nitrógeno, dependientes del suministro de energía constante de la planta huésped (Garg y Geetanjali., 2009).

Cabe mencionar que dependiendo de la capa celular en dónde se inicie el desarrollo del primordio nodular, se pueden distinguir dos tipos de nódulos (Figura I.6). Si el desarrollo se da en el córtex medio o externo, dan lugar a los denominados nódulos determinados, mientras que, si lo hacen en el córtex interno, se forman los denominados nódulos indeterminados (Patriarca *et al.*, 2004). Ambos tipos de nódulos también difieren en su forma de crecimiento y organización histológica. En los nódulos determinados la actividad meristemática se localiza en la periferia y cesa tempranamente, por lo que el crecimiento del nódulo ocurre principalmente por expansión celular, resultando en nódulos de aspecto esférico en los que la FBN ocurre en el tejido central del nódulo (Figura I.6). En los nódulos indeterminados, de aspecto alargado con un meristema distal y persistente, se da una distribución en forma de gradiente desde una zona meristemática distal hasta una zona de senescencia proximal, diferenciables en zonas específicas. En la zona I se encuentra el meristema, cuya actividad da lugar a nuevas células que pueden ser infectadas por las bacterias, formando la llamada zona de infección (zona II). Más internamente en la zona III

se induce la diferenciación de bacteroides y la FBN. Finalmente, en la zona IV se encuentra la zona de senescencia, en donde los bacteroides dejan de ser activos y son degradados (Mylona *et al.*, 1995) (Figura I.6).

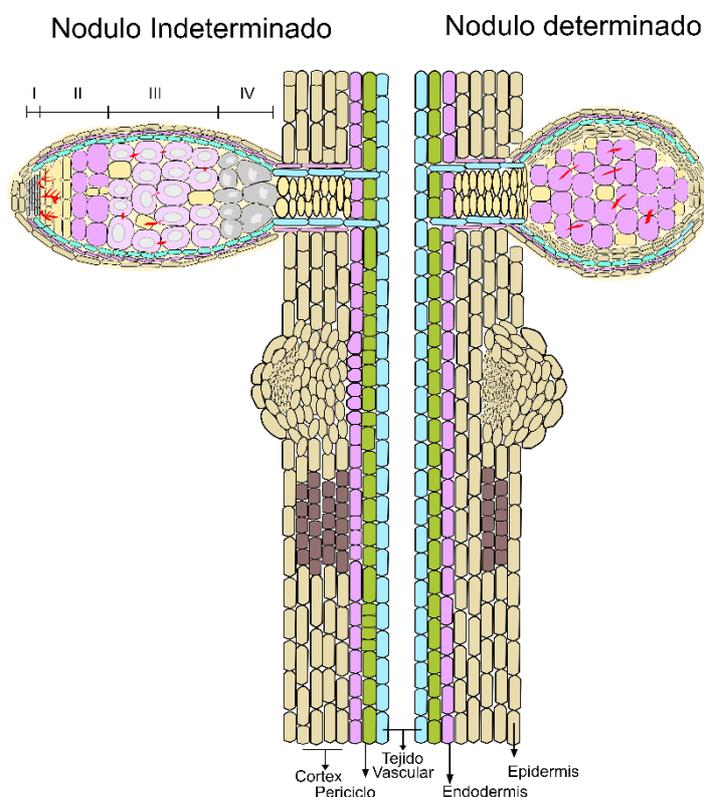


Figura I.6. Esquema de nódulos determinados e indeterminados. La formación de nódulos indeterminados comprende la inducción de la división de las células del periciclo seguido de la proliferación de las células corticales en respuesta a la percepción del factor Nod. El desarrollo del nódulo indeterminado se acompaña de la presencia de un meristema persistente que permite la zonificación longitudinal del nódulo, en la zona del meristema (Zona I), zona de infección (zona II), la zona de fijación (zona III) y la zona de senescencia (zona IV). En contraste, los nódulos determinados poseen un meristema transitorio derivado de la reactivación de la división celular en la zona del cortex externo. El crecimiento del nódulo se debe a la expansión celular una vez que cesa la actividad meristemática, lo que origina un tejido central donde se encuentran las células vegetales llenas de simbiosomas que llevan a cabo la FBN. Adaptado de Popp y Ott, 2011.

Los nódulos proveen el entorno adecuado que permite la fijación biológica del nitrógeno por parte del microsimbionte. Dentro de él, se lleva a cabo la reacción de reducción del dinitrógeno -discutida anteriormente- dependiente de energía, que es provista por el huésped mediante fuentes de carbono, como sacarosa (Hawker, 1985), la cual es transportada desde las hojas hasta los nódulos, para luego ser incorporada en el metabolismo del nódulo mediante su degradación por la enzima sacarosa sintasa. La energía requerida para la reacción es finalmente generada por un proceso oxidativo, por lo que existe una gran demanda de oxígeno en el nódulo. No obstante, la enzima nitrogenasa responsable de la reacción, es altamente sensible al oxígeno. En tal sentido, existen diferentes estrategias para hacerle frente a esta paradoja (Mylona *et al.*, 1995). Por ejemplo, morfológicamente el nódulo está provisto de una barrera de difusión de oxígeno, localizada en el parénquima nodular formada por unas pocas capas de células con pocos y muy pequeños espacios intercelulares, que dificultan la difusión del oxígeno (Witty *et al.*, 1986). Por otra parte, en la zona central del nódulo, la proteína transportadora de oxígeno leghemoglobina facilita la difusión del mismo, de modo que el microsimbionte sea provisto de la cantidad suficiente de oxígeno para su respiración sin que afecte a la actividad nitrogenasa (Mylona *et al.*, 1995). La expresión de una oxidasa terminal *cbb3*, con muy alta afinidad por el oxígeno, facilita la respiración del bacterioide en presencia de concentraciones micromolares de

oxígeno. El amonio producido por el microsimbionte como primer producto de la fijación de nitrógeno es asimilado en el citoplasma del nódulo vía la ruta glutamina sintetasa (GS)/ glutamato sintasa. Seguidamente, el glutamato es metabolizado en formas transportables de nitrógeno.

Efectos de los factores ambientales en la simbiosis

El éxito del establecimiento de la simbiosis y los procesos de infección y nodulación dependen fuertemente de los factores ambientales, que afectan tanto al micro como al macrosimbionte. Por ejemplo, en suelos con altos niveles de salinidad los efectos perjudiciales en las poblaciones microbianas se evidencian como resultado de la toxicidad directa y del estrés osmótico, así como las limitaciones en el crecimiento tanto en los rizobios como en las leguminosas por el desbalance nutricional del medio (Lebrazi y Benbrahim, 2014; Zahran, 1999). Además, entre los efectos descritos para la simbiosis se encuentran la deformación de los pelos radiculares, disminución de los hilos de infección, reducción en la respiración del nódulo, reducción de proteínas citosólicas específicamente la leghemoglobina y deformaciones en la estructura del nódulo (Zahran, 1999), así como el efecto en la interacción simbiótica por la deficiencia de minerales esenciales como tales como el hierro y el magnesio (Lebrazi y Benbrahim, 2014). En ese sentido, la capacidad de tolerar diferentes estreses ambientales es una propiedad deseada en rizobios para suelos restrictivos y empobrecidos en nitrógeno.

Rizobios adaptados a condiciones abióticas extremas

Algunos rizobios despliegan una serie de estrategias para adaptarse a las duras condiciones del suelo como la acidez, temperaturas extremas, desecación y, por supuesto, la salinidad y alcalinidad. Su estudio y caracterización resulta por lo menos interesante, ya que inoculación de rizobios tolerantes al estrés podría ser una opción para la mejora de la simbiosis y de la fijación de N₂ en dichas condiciones.

Frente a la salinidad, hay un consenso acerca de que la osmoregulación se destaca como la principal estrategia de respuesta empleada por los rizobios. Mediante el uso de una variedad de osmoprotectores, incluidos betaínas, aminoácidos y azúcares, el rizobio busca contrarrestar las altas concentraciones de sales presentes en el medio. La acumulación de estos compuestos contrarresta la deshidratación celular y, por tanto, contribuye a mantener una presión citoplasmática orientada hacia afuera (Gouffi *et al.*, 1999). En la revisión publicada por Atieno y Lesueur (2019), destacan a la trehalosa, N- acetilglutaminilglutamina amida (NAGGN), glutamato, betaínas, glucanos, sacarosa, ectoína, 3-dimetilsulfoniopropionato, 2-dimetilsulfonioacetato, ácido perclórico y algunos iones como calcio y potasio, entre las clases de solutos compatibles producidos por los rizobios como mecanismo de tolerancia. Por otro lado,

revisiones de varios estudios sostienen que después de un choque osmótico ascendente, el metabolismo general se ralentiza (Vriezen *et al.*, 2007). Esto es observable en *Sinorhizobium meliloti*, que reprime la expresión de genes del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, captación de fuentes de carbono, cadena respiratoria y genes ribosomales (Dominguez-Ferreras *et al.*, 2006). En otra reciente revisión, la modulación del metabolismo del glucógeno y la represión de genes del flagelo y quimiotaxis se incluyen entre otras respuestas frente al estrés salino (Zhang *et al.*, 2020).

Sobre los mecanismos de respuestas al estrés por pH, la documentación más extendida está referida principalmente al estrés ácido, no tanto al alcalino (Atieno y Lesueur, 2019; Kajic *et al.*, 2016; Zahran, 1999). Esto quizás se debe a que la mayoría de leguminosas de interés requieren condiciones de crecimiento neutras o ligeramente ácidas, especialmente cuando dependen de la fijación biológica del nitrógeno (Zahran, 1999). No obstante, algunos trabajos han explorado los potenciales mecanismos de respuesta a alcalinidad por parte de los rizobios. Por ejemplo, frente a la alcalinidad se ha reportado la presencia de altas concentraciones de homospermidina en el nódulo (Fujihara y Yoneyama, 1993) y más recientemente el rol protector de expolisacáridos (EPS) en la cepa IC3123 (Tewari y Sharma, 2020). Un aspecto a considerar es la poca frecuencia de estudios realizados tomando en cuenta dos o más estreses combinados, a pesar de que en el suelo es común la concurrencia de estos en simultáneo.

Si bien estas son algunas de las estrategias de adaptación y supervivencia empleadas por los rizobios ante las condiciones restrictivas del medio, ciertamente no son las únicas. Las cepas de rizobios pueden diferir en sus capacidades para sobrellevar el estrés, por lo que el conocimiento y la comprensión de estos factores fisiológicos y moleculares de respuesta al estrés de los rizobios, en ciertos ambientes particulares, puede ser crucial en la selección o desarrollo de cepas con alto potencial y eficacia simbiótica. En este sentido, se debe tener en cuenta que, desde una perspectiva aplicada, si el inoculante formulado no puede soportar las tensiones del ambiente, su desempeño óptimo en el campo se verá comprometido.

A partir del conocimiento generado en relación a las diferentes respuestas empleadas por los rizobios, algunos estudios funcionales han demostrado la importancia de tales contribuciones. Mediante ensayos de mutagénesis se ha demostrado la importancia de los genes *groEL*, *dnaK*, *clpB*, *otsAB*, *treS* y *treZY*, entre otros, en la respuesta a condiciones de temperatura, acidez y salinidad (da-Silva *et al.*, 2017). Ello permitió abordar estrategias biotecnológicas para la mejora del comportamiento de algunas cepas de rizobios. Por ejemplo, en la cepa *S. meliloti* UNA349, la sobreexpresión del gen *betS*, resultó en la rápida adquisición de betaínas bajo condiciones de choque osmótico, así como una mejor actividad fijadora de nitrógeno en alfalfa (Boscari *et al.*, 2006). Así mismo, plantas de garbanzo inoculadas con cepas de *M. ciceri* con copias extra de *otsA* mostraron una mejora significativa en la formación de nódulos y una mayor biomasa en vástago en presencia de NaCl (Moussaid *et al.*, 2015). También, cepas de *M. ciceri* (sensibles y tolerantes

a la sal) transformados con un gen *acdS* ayudaron a un crecimiento significativo de garbanzo en situación de salinidad (Brígido *et al.*, 2013).

Estas evidencias promisorias alientan a profundizar las investigaciones sobre los mecanismos de adaptación y respuesta de los rizobios al estrés abiótico, lo que permitiría la obtención de cepas mejoradas como bioinoculantes en esas condiciones.

I.5.2. Fosfobacterias

El otro grupo de bacterias de interés para esta tesis es aquel con las capacidades de transformar el fósforo no disponible a formas disponibles, de modo que pueda ser aprovechado por las plantas. Este grupo de bacterias colectivamente denominadas fosfobacterias, que incluye tanto a las bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) como a las bacterias mineralizadoras de fosfato (BMF), representan una de las opciones más económicas y ecológicamente sustentables para suplir las necesidades de P requeridas por los cultivos. Como discutimos en el apartado en I.3.3, el fósforo existe en el suelo tanto en formas orgánicas (P_o) como inorgánicas (P_i) y, a pesar de su abundancia, la proporción de formas solubles y disponibles para las plantas son usualmente muy bajas en relación con la cantidad total de P del suelo, lo que lo convierte en uno de los factores más limitantes para el desarrollo y productividad de los cultivos. El fósforo soluble disponible es rápidamente consumido en la rizosfera, por lo que, para satisfacer las demandas de la planta este es repuesto mediante una serie de procesos de transferencia de P desde el suelo a la rizosfera que, según la fuente de fósforo, pueden ser diferenciados como solubilización (P inorgánico) y mineralización (P orgánico) (Khan *et al.*, 2014; Adhya *et al.*, 2015). Finalmente, el fósforo absorbido forma parte de las principales moléculas orgánicas como los fosfolípidos, proteínas, ácidos nucleicos (ADN y ARN), así como ATP (Adenosin-5 trifosfato), PEP (fosfoenolpiruvato), NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) y otras moléculas, siendo participe directo de una variedad de funciones centrales del metabolismo y generación de energía bioquímica esenciales para la viabilidad de la célula (Fageria y Moreira, 2011).

La accesibilidad a las formas solubles de P_i puede ser mejorada mediante el uso de BSF, las cuales pueden incrementar la cantidad de fosforo disponible para las plantas. Del conjunto de estrategias adoptadas por las BSF, la secreción de ácidos orgánicos (AO) de bajo peso molecular ha sido reconocido como el principal mecanismo de solubilización de P_i (Khan *et al.*, 2014), los cuales actúan como agentes quelantes del catión unido al fosfato inorgánico, convirtiéndolo en su forma soluble (Pradhan y Sukla 2006). De acuerdo a Goldstein (1995), en bacterias gram negativas la producción de estos ácidos orgánicos, principalmente ácido glucónico y cetoglucónico, se daría mediante la ruta de oxidación directa de la glucosa y serían liberados en el periplasma para luego ser difundidos al medio extracelular. Entre otros AO involucrados en la solubilización de fósforo están el ácido fórmico, acético, láctico, glicólico, oxálico, succínico,

málico y cítrico. Además, este proceso es acompañado con la acidificación del medio contiguo a la célula, como consecuencia de la liberación de AO o de protones ácidos disociados de estos, permitiendo la transformación de PO_4^{3-} en HPO_4^{2-} y H_2PO_4^- , las formas químicas biodisponibles para las plantas (Prabhu *et al.*, 2019). La solubilización de formas insolubles de P_i también es posible mediante la acción de ácidos inorgánicos, como el ácido clorhídrico, sulfúrico, nítrico o carbónico, pero resultan menos efectivos en comparación con los ácidos orgánicos al mismo pH (Kim *et al.*, 1997, Rodríguez y Fraga, 1999).

Por otro lado, la mineralización de compuestos de P_o ocurre principalmente a expensas de los residuos derivados de plantas y animales, a partir de los cuáles, la acción de fosatasas ácidas o alcalinas de origen microbiano o vegetal, convierten el fosfato orgánico en su forma inorgánica (Khan *et al.*, 2009). Estas reacciones desfosforilantes involucran la hidrólisis de enlaces de éster fosfato o anhídrido y dependen fuertemente de las propiedades bioquímicas y fisicoquímicas de las moléculas (Hamid y Ahmad, 2012).

Una de las clases más importantes de fosfatasas son las fitasas, que hidrolizan el ácido fítico (principal forma de almacenamiento de P_o en las semillas) a mio-inositol, liberando los grupos fosfato que quedan accesibles para las plantas y eliminando la capacidad del este para quelar iones metálicos vitales, de modo que inactiven enzimas y formen complejos con proteínas (Singh y Prabha, 2019). Por otro lado, las fosfonatasas y liasas C-P hidrolizan enlaces éster de fosfonatos (p.ej. Fosfoenol piruvato, fosfonoacetato), convirtiendo los fosfonatos en hidrocarburos e iones fosfato asimilables (Wanner, 1996).

En vista de su potencial, en los últimos años el aislamiento e identificación de fosfobacterias ha sido objeto de un considerable número de investigaciones (Prabhu *et al.*, 2019). No obstante, solo un número limitado de ellas se ha dedicado a evaluar su efecto en plantas, particularmente en suelos deficientes de fósforo. Una reciente revisión de nuestro grupo (Castagno *et al.*, 2021) exploró el potencial de diversos aislamientos de BSF y BMF en el mejoramiento del crecimiento de cultivos bajo tal condición. Son varios los reportes que muestran el efecto de diferentes géneros con capacidades solubilizadoras de fosfato en la promoción de crecimiento, el contenido de fósforo y otras variables de crecimiento en diferentes cultivos, ya sea como inoculantes individuales o como parte de un consorcio microbiano. Un aspecto a destacar en la revisión de Castagno y col. (2021) es la consideración adicional de BSF con potencial de promoción de crecimiento bajo condiciones restrictivas. Aislamientos de los géneros *Bacillus*, *Enterobacter*, *Providencia*, *Ensifer*, *Acinetobacter*, entre otros, mostraron capacidades promotoras bajo condiciones salinas, desecación y de acidez. Lo relatado anteriormente, refuerzan los argumentos para el uso de BSF como estrategia en la mejora nutricional de cultivos.

I.6. Efectos del uso de PGPR en suelos afectados por sal

A lo largo de este capítulo hemos comentado acerca de los suelos afectados por sal y la necesidad de estrategias para la recuperación de los mismos de forma sustentable. Comentamos el potencial del uso de bacterias promotoras de crecimiento como una alternativa sostenible para la mejora de la producción de cultivos, dado que su aplicación permitiría reducir la eficiencia del uso de los fertilizantes químicos, logrando al mismo tiempo incrementar la productividad de los sistemas agrícolas. En ese aspecto, son cada vez más numerosos los intentos para mitigar el estrés abiótico mediante la inoculación de microorganismos tolerantes al estrés que formen asociaciones beneficiosas con las plantas (Enebe y Babalola, 2018).

Son varios los estudios que han demostrado que la inoculación con cepas tolerantes en leguminosas cultivadas en ambientes estresantes puede mejorar no solo las variables de crecimiento, como la nodulación o biomasa, sino también la productividad en campo. Algunos ensayos de inoculación singular son ejemplo de ello. Tal es el caso de *Cicer arietinum* L. (garbanzo), cuya inoculación con cepas selectas de *Rhizobium* tolerantes a salinidad evidenció mejoras en la nodulación, así como en el contenido de materia seca del vástago, raíz y longitud de raíz (Khaitov *et al.*, 2016). De igual manera, ensayos de promoción de *Vicia faba* L. en múltiples suelos alcalinos-calcáreos y afectados por sal, inoculados con cepas locales selectas de *Rhizobium/Agrobacterium*, mostraron incrementos significativos del rendimiento de grano (50%) y rendimiento de N de grano (56%), en comparación con tratamientos fertilizados con N (96 kg N ha⁻¹) (Youseif *et al.*, 2020). Más recientemente, cultivos de *Cajanus cajan* en suelos restrictivos (pH 8.9, 45 °C, 33 ppm NO₃⁻ N), inoculados con una interesante formulación basada en la combinación de la cepa IC3123 suplementada con un EPS (exopolisacárido), también demostraron la mejora significativa en la germinación, el número de vainas, el rendimiento de semillas y el contenido de proteína, en comparación con el conjunto no tratado (Tewari y Sharma, 2020).

Resultados similares o incluso más promisorios se observan en ensayos de co-inoculación Rizobio-PGPR. Por ejemplo, la inoculación de *Galega officinalis* con combinaciones *Rhizobium galegae-Pseudomonas* permitió mitigar el efecto del estrés salino, mejorando el crecimiento de vástago y raíz, así como la nodulación y colonización de las puntas de la raíz -respecto a la inoculación singular de *R. galegae*- en las plantas cultivadas tanto en un sistema de arena gnotobiótica modificada con NaCl como en suelo bajo condiciones de invernadero (Egamberdieva *et al.*, 2013). Lo mismo en experimentos realizados en campo evaluando el efecto de la co-inoculación de cepas de *Rhizobium* y *Azotobacter* en dos variedades de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) bajo condiciones salinas (5.8 dS m⁻¹), en donde se evidenció la superioridad de los tratamientos de co-inoculación *Rhizobium-Azotobacter* en la mejora en el peso seco del vástago, raíz, número de nódulos, contenido de nitrógeno y proteínas, así como la mejora de la

productividad en 429 (27.9%) y 538 (23.9%) kg ha⁻¹ sobre el control, para ambas variedades (Abdiev *et al.*, 2019). La misma tendencia se observa en no-leguminosas como *Zea mays*, en donde la co-inoculación de dos cultivares (cv. Av 4001 y cv. Agaiti 2002), con un consorcio *Rhizobium-Pseudomonas* incrementó significativamente el contenido relativo de agua de la hoja y el peso seco de raíz bajo condiciones salinas (Bano y Fatima, 2009). La combinación con otros microorganismos, como micorrizas, también ha evidenciado efectos promisorios en *Medicago sativa* o *Sesbania cannabina* bajo condiciones salinas (Laouane *et al.*, 2018; Ren *et al.*, 2016). Estos son algunos de los muchos ejemplos disponibles en la literatura, que demuestran que el uso de bacterias promotoras de crecimiento es una estrategia prometedora para la mejora de cultivos en suelos restrictivos. Por ello, en este trabajo de tesis consideramos que el uso de PGPR, de forma singular o combinada, podría ser una alternativa a la problemática asociada a los requerimientos de la sub-región de la Pampa Deprimida del salado, expuesta a continuación.

I.7. Bajos alcalino-sódicos de la Pampa Deprimida del Salado (PDS)

La Pampa Argentina

Antes de discutir sobre los bajos alcalino-sódicos de la Depresión del Salado, resulta menester conocer acerca de la región de la Pampa Argentina. La icónica región pampeana abarca más de 500 000 km² de la zona centro-este de la Argentina, y comprende toda la provincia de Buenos Aires y gran parte de las provincias de Santa Fe, Córdoba, La Pampa y San Luis y dependiendo de algunos autores también parte del sur de Entre Ríos (Rubio *et al.*, 2019). Su topografía predominantemente llana, además de la alta fertilidad y productividad de gran parte de sus suelos ha provisto el escenario adecuado para el desarrollo de una vasta industria agrícola y ganadera, convirtiéndola en la región económicamente más importante del territorio argentino. Desde una visión simplificada puede ser descrita como una región de clima húmedo en el este y sub-húmedo/semiárido en el oeste, con precipitaciones variables desde los 1200 a 500 mm año⁻¹ respectivamente y con temperaturas medias entre los 14°C en el sur y los 20°C en el norte (Rimsi-Korsakov *et al.*, 2015). La mayoría de los suelos pampeanos son predominantemente del orden de los Molisoles, específicamente distribuidos como suelos Argiudoles, Hapludoles y Haplustoles de este a oeste y Natracuoles en algunas áreas localizadas. Otros suelos menos representativos son Alfisoles, Vertisoles y Entisoles (Lavado y Taboada, 2009; Rubio *et al.*, 2019). De acuerdo a sus características geomorfológicas, de suelos, drenaje, fisiográficas y su composición florística es posible distinguir varias unidades o distritos fitogeográficos, distribuidos como se muestra en la Figura I.6.

En esta región se producen las principales cosechas de grano: soja, maíz, trigo, cebada, centeno, girasol, maní y sorgo (FAO 2019) y, según la Secretaria de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación en la campaña 2020, tan solo el complejo maíz, soja, trigo, girasol alcanzó un volumen de producción de 130.166.531 toneladas (www.magyp.gob.ar), lo que refleja la magnitud de la actividad agrícola productiva y por supuesto su innegable relevancia económica para el país.

Si bien, en el presente, la región pampeana es una región agrícola muy competitiva y económicamente importante para la Argentina, lo cierto es que inicialmente se trató de una región principalmente ganadera. Los pastizales naturales de esta zona se utilizaron esencialmente para el pastoreo y no fue hasta el último cuarto del siglo XIX que, de mano de la llegada de los inmigrantes europeos, se inicia la actividad agrícola en la zona. Esta actividad se fue desarrollando a lo largo del siglo XX, y se intensificó principalmente durante los inicios de la década de 1990 como consecuencia de las innovaciones tecnológicas para las prácticas agrícolas. Este denominado “proceso de agriculturización”, discutido detalladamente por Manuel-Navarrete (y col., 2009), se refiere al fuerte y continuo aumento del área de tierra dedicada al cultivo agrícola

en esta región, lo que trajo como consecuencia no solo la reducción de los pastizales naturales sino también el desplazamiento de otras actividades económicas (p.ej., la ganadera) a zonas menos fértiles como las tierras bajas.

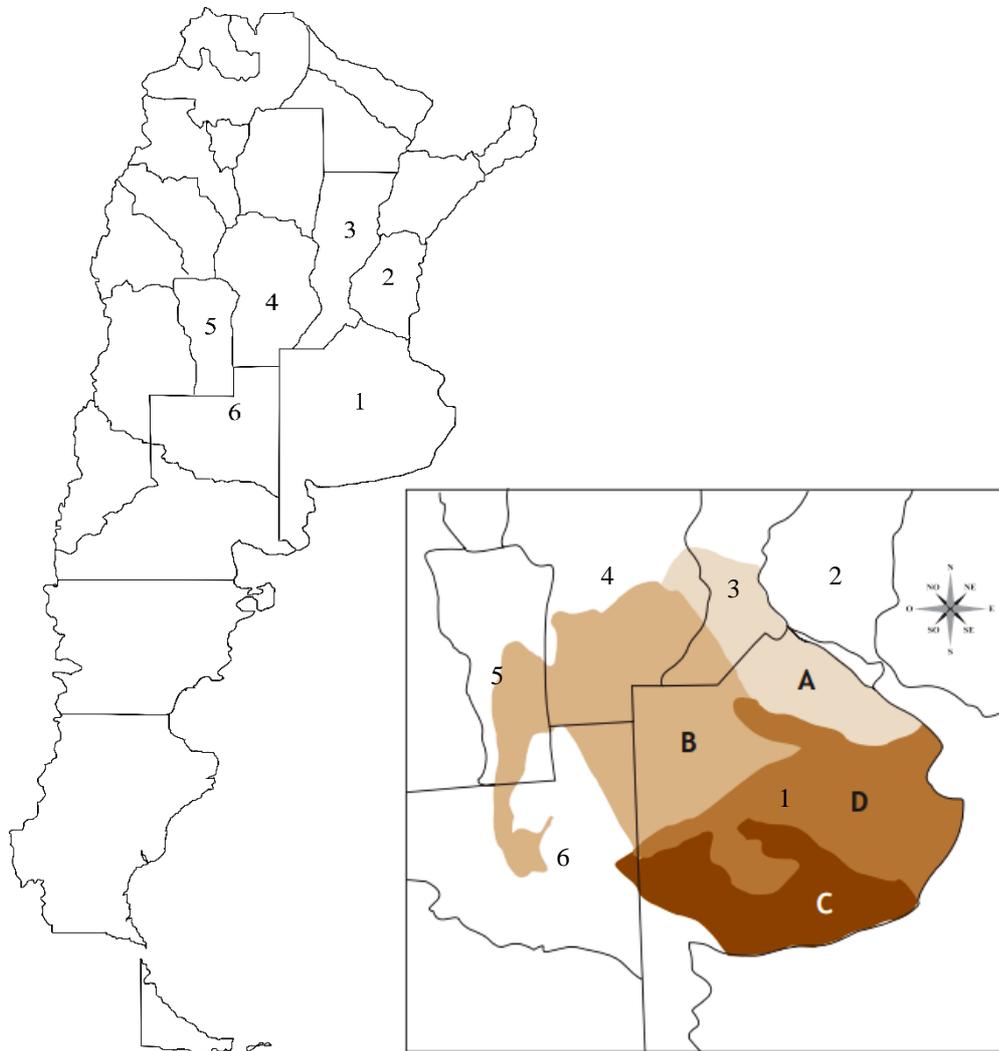


Figura I.7. Mapa de la Argentina y la distribución de las sub-regiones de la Pampa Argentina. La región pampeana, con una extensión de 500 000km², se extiende a lo largo de las provincias de Buenos aires (1), Santa Fe (3), Córdoba (4), San Luis (5), La Pampa (6) y dependiendo de algunos autores el sur de Entre Rios (2) (Rubio *et al.*, 2018). Según la asociación de sus características geomorfológicas, edáficas y composición florística es distinguible en las sub-regiones de **La Pampa Ondulada (A)**, **Pampa Interior (B)**, **Pampa Austral (C)** y **Pampa Deprimida (D)**. Tomado de Rodríguez y Jacobo, 2012, adaptado de Soriano *et al.*, 1991

La Pampa Deprimida del Salado

Las tierras bajas o suelos poco profundos se encuentran predominantemente presentes en la subregión de la Pampa Deprimida del Salado -una de las 4 subregiones la Pampa Argentina-, ubicada en el centro-este de la provincia de Buenos Aires y limitada por la Pampa Ondulada al norte, la Pampa Austral al sur, la Pampa interior al oeste y la Planicie Costera del Océano Atlántico al este (Figura I.6). En esta sub región los ambientes denominados “bajos”, a diferencia de las otras subregiones, se los puede encontrar ocupando áreas de decenas de km² (Rubio *et al.*, 2019). Con una extensión total de aproximadamente 9 millones de Ha, se estima que aproximadamente el 60% de su superficie está dominada por este tipo de suelos.

En esta región el clima es templado-húmedo, las temperaturas medias anuales oscilan entre 13.8 °C en el sur y 15.9 °C en el norte y la precipitación media anual varía de 850 a 900 mm (Perelman *et al.*, 2001). Los niveles de precipitación más altos se alcanzan durante las épocas de primavera e invierno, lo cual, en una región de pendiente escasa y con la estructura de suelo discutida más adelante, produce inminentes periodos de anegamiento y permanencia de aguas subterráneas cerca de la superficie del suelo, lo cual, acompañado con los periodos de sequía por altas temperaturas alcanzadas en las épocas de verano, favorecen a la salinización de los mismos (Perelman *et al.*, 2001). Estas condiciones sumadas al drenaje insuficiente de la zona, limitan severamente su uso para fines agrícolas, por lo que casi el 80% de la superficie no se cultiva, y mantiene su vegetación natural o semi-natural (pastizales) que son aprovechados para cría de ganado vacuno y, en menor medida, ovino (León *et al.*, 1984, Rodríguez y Jacobo, 2012).



Figura I.8. Pastizales de la región de la Pampa Deprimida del Salado

A pesar de la aparente uniformidad de relieve –por su escasa pendiente- sumado al tipo de suelo y heterogeneidad vegetativa, es distinguible una diversidad de paisajes que dan origen a las “comunidades vegetales” esquematizados en la Figura I.8 (Perelman *et al.* 2001).

Suelos de la Pampa Deprimida del Salado

Por un lado, se encuentran las zonas altas o “lomas” que comprenden a los sitios más altos con suelos profundos con buen drenaje, de tipo Hapludoles o Argiudoles, que no tienen problemas de inundación, salinidad o alcalinidad. En la posición intermedia se encuentran las “medias lomas”, con suelos principalmente de tipo Natracuoles. En estos últimos, el horizonte superior tiene buen contenido de materia orgánica, sin salinidad ni alcalinidad, seguido de un horizonte sub-superficial prácticamente impermeable por su alto contenido de arcillas y contenido mayor de sales que ascienden solo cuando la superficie del suelo queda desprovista de cobertura vegetal debido al sobrepastoreo o labores mecánicas (Rodríguez y Jacobo, 2012).

Por otro lado, las zonas bajas son diferenciables en dos ambientes. Los “bajos dulces”, caracterizados por ser zonas de suelos anegables (Argiacuoles o Argialboles), pero no salinos ni alcalinos, con una buena productividad forrajera y los “bajos salinos y/o alcalinos” -los más notoriamente restrictivos- cuyo horizonte superficial somero (menor de 10cm) tiene poca materia orgánica (Natracualfes), altas concentraciones de sales y/o alcalinidad, baja productividad y escaso valor forrajero (Rodríguez y Jacobo, 2012).

Tanto las lomas como las medias lomas son propicias para la producción de pasturas de calidad. No obstante, desde las últimas décadas, están mayoritariamente dedicadas al cultivo agrícola (principalmente soja) (Viglizzo *et al.*, 2010), por lo que la disponibilidad de zonas para la actividad ganadera, principalmente la etapa de cría de ganado, se ha reducido a las zonas de los bajos.

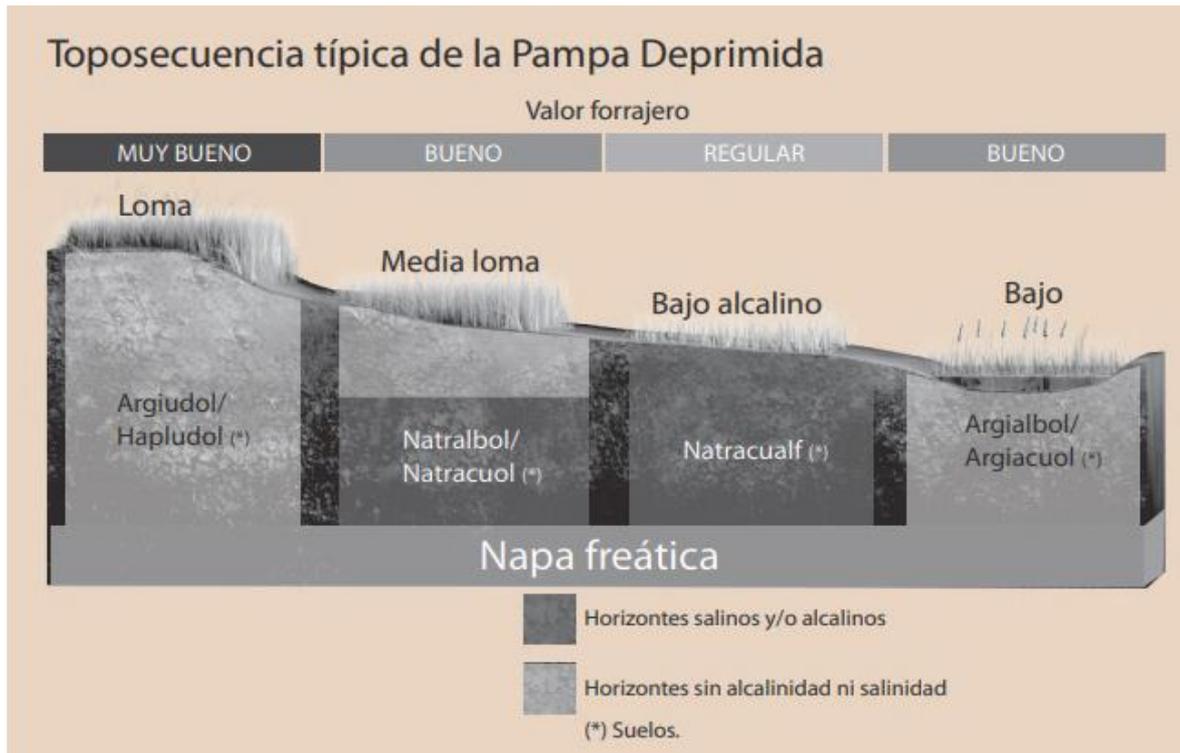


Figura I.9. Toposecuencia típica de la Pampa Deprimida del Salado: Si bien el paisaje de la Pampa Deprimida es principalmente una planicie, la asociación de sus características edáficas y composición vegetal permite distinguirla en comunidades vegetales: Lomas, medias lomas, bajos dulces y bajos salinos-alcalinos Tomado de Rodríguez y Jacobo, 2012 y adaptado de Batista y Taboada, 2005



Figura I.10. Paisaje de los bajos alcalinos-sódicos

La Pampa Deprimida como principal zona ganadera

La importancia de la industria cárnica se sostiene en la dinámica de producción y consumo de la Argentina, la cual inversamente a lo habitual, no solo está compuesto principalmente por carne bovina, seguido por aviar y luego de cerdo (en ese orden), sino que además está destinada principalmente al mercado interno local. Este consume un aproximado del 85% de la producción total, en concordancia con las estimaciones de consumo de carne vacuna per cápita de aproximadamente 57 Kg equivalente al 50% del consumo de carnes totales per cápita, una de las más altas del mundo (FADA 2015).

Según el primer reporte del Sistema de monitoreo del sector de la carne bovina (INTA-SENASA), en el año 2015 se reportó que la región de la Depresión del Salado y Depresión de Laprida contaba con la mitad del stock de bovino de la provincia de Buenos Aires (48%) y se considera la región de cría más importante del país, ya que concentra el 50% de las cabezas correspondientes a las categorías vacas, terneros, terneras, toros y reteniendo el 47% de las vaquillonas de la provincia.

La cadena de producción de carne bovina se puede calificar como un proceso complejo y dinámico que abarca desde la producción primaria hasta el consumo directo. La producción primaria puede distinguirse en distintos eslabones, empezando por la cría, seguido por las etapas de recría y finalmente engorde. De todas ellas, la etapa de la cría es económicamente la de rentabilidad inferior, debido a su complejidad biológica, lo cual, a pesar de su importancia, habitualmente se destina a los ambientes menos propicios. A diferencia de los productos agrícolas, que se destinan directamente para la alimentación humana sin requerir transformaciones intermedias (pérdidas energéticas), la producción cárnica sí requiere de estas, siendo la etapa de la cría la actividad que mayores cambios energéticos implica (Veneciano y Frasinelli, 2014). En ese contexto la necesidad de adoptar estrategias rentables que tengan un efecto positivo en el incremento y mejora de la calidad forrajera destinada a la producción cárnica, es un tema recurrente. A esto último, se suma el criterio de sostenibilidad. En adición a lo comentado anteriormente sobre las consecuencias del “proceso de agriculturización”, cabe mencionar que este se acompañó de la introducción de la práctica del “alambrado”, que confinó al ganado en áreas restringidas durante largos períodos de tiempo (método de pastoreo continuo), causando también el deterioro de los pastizales naturales, disminuyendo la calidad de la oferta forrajera de los mismos, además de otras consecuencias ecológicas (Arelovich *et al.*, 2011).

En ese sentido, han surgido propuestas alternativas para el desarrollo de prácticas ganaderas sostenibles. Por ejemplo, en el “Manual de manejo de pastizales naturales para una ganadería sustentable en la Pampa Deprimida” de Rodríguez y Jacobo (2012), se describe la metodología de pastoreo controlado, que consiste en la subdivisión de los campos en potreros por comunidades vegetales (Fig I.8), de manera tal que en cada potrero haya claro predominio de una

sola comunidad. Así quedarían separados los potreros que ofrezcan forraje principalmente en el invierno (loma y media loma) de los que ofrezcan forraje en verano (bajos). De ese modo el pastoreo se daría de forma intensiva y alternada entre ellos, en periodos cortos de tiempo, permitiendo la recuperación del vigor de las plantas durante las etapas de descanso.

Otra propuesta es la promoción del establecimiento de especies nativas valiosas y leguminosas naturalizadas de elevado valor forrajero. Estas últimas aumentarían los niveles de nitrógeno en el suelo además de que mejorarían notablemente la dieta. Cabe resaltar que entre las recomendaciones para la implementación del “pastoreo controlado” también se encuentra el uso de especies nativas y naturalizadas. Esto evidencia que de alguna manera u otra es importante el uso de especies vegetales de alto valor forrajero como estrategia para la mejora del recurso forrajero y subsecuente productividad ganadera en la Pampa Deprimida del Salado. En ese sentido, en vista de la clara dominancia de los suelos bajos en la región resulta importante la promoción de especies forrajeras en estos suelos especialmente en los bajos alcalino-sódicos para el aprovechamiento de los mismos.

I.8. *Lotus tenuis* como estrategia para incrementar la producción forrajera

Entre las especies naturalizadas usadas, la leguminosa *Lotus tenuis* es una de las más exitosas (Stofella, 1998; Taboada *et al.* 1999). El género *Lotus* incluye entre 125 y 130 especies de hierbas y arbustos pequeños, distribuidos principalmente en el hemisferio norte. Varias especies de *Lotus* como *L. uliginosus*, *L. tenuis* y particularmente *L. corniculatus*, se utilizan como forraje de la pastura en todo el mundo y se incluyen en los estudios filogenéticos en el mismo clado, como *L. japonicus*, la leguminosa modelo (Degtjareva *et al.*, 2006). Las especies de *Lotus* presentan una distribución mundial, excepto en regiones muy frías y ciertas áreas tropicales del sudeste de Asia y América Central, (Degtjareva *et al.*, 2008). Esta amplia distribución geográfica, en parte, se debe a la introducción de estas especies por parte de las actividades humanas y a su adaptabilidad a diferentes estreses ambientales (lo que conduce a una naturalización eficiente). En el caso particular de las especies del género *Lotus*, su adaptabilidad y tolerancia a diversos estreses ambientales le otorgan una elevada potencialidad de utilización en la restauración de ambientes degradados y/o contaminados (Escaray, 2012). En los ambientes de la Pampa Deprimida del Salado, *L. tenuis* se ha naturalizado y adaptado exitosamente incluso en aquellas zonas como los bajos alcalino-sódicos, consideradas como las más restrictivas, demostrando su plasticidad en términos de adaptación por encima de los requerimientos edáficos (León *et al.*, 1984). Tal plasticidad sugiere su potencial para ser usada en estos ambientes como estrategia para incrementar el recurso forrajero en suelos limitantes como los bajos alcalinos-sódicos de la Pampa Deprimida (Dear *et al.*, 2003). No obstante, su incorporación a estos ambientes está todavía lejos de ser óptima, debido a las características edáficas de los bajos alcalinos-sódicos descritas, que

restringen severamente el crecimiento y desarrollo de las plantas forrajeras de calidad en estos suelos como *L. tenuis*.



Figura I.11. Superior: *L. tenuis* naturalizado en los suelos de los bajos alcalino-sódicos de la Pampa Deprimida del Salado, rodeado de la flora natural de los bajos salinos (*Distichlis spicata*). Inferior: Estructuras tipo costra, producto del exceso de sales de sodio.

En ese sentido, en este trabajo de tesis planteamos la hipótesis de que la producción de pasturas en la Pampa Deprimida del Salado puede ser mejorada mediante el uso de biofertilizantes para *Lotus tenuis*, formulados a base de rizobios fijadores de nitrógeno (BFN) y bacterias solubilizadoras de fósforo (BSF) tolerantes a condiciones salino-alcálinas, por lo que planteamos el siguiente objetivo general y sus objetivos específicos

Objetivos

Objetivo General 1

Obtener bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN) y bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) adaptadas a las condiciones salino-alcálicas de los suelos de la Pampa Deprimida del Salado para su aplicación como biofertilizantes para *L. tenuis*.

Objetivos específicos:

- 1.1. Aislar cepas de rizobios y bacterias solubilizadoras de fosfato tolerantes a condiciones alcalino-salinas
- 1.2. Evaluar su capacidad para promover el crecimiento de *L. tenuis*, en condiciones restrictivas.

Objetivo General 2

Identificar mecanismos involucrados en la respuesta y adaptación de rizobios simbiotes de *L. tenuis* a condiciones alcalino-sódicas.

Objetivos específicos:

- 2.1. Obtención de mutantes de rizobios sensibles e identificación de genes involucrados en tolerancia a condiciones salino-alcálicas.
- 2.2. Análisis del transcriptoma de rizobios en condiciones salino-alcálicas
- 2.3. Identificación de los mecanismos de adaptación de estas bacterias a condiciones salino-alcálicas.

CAPÍTULO II

Materiales y Métodos

II.1. Colecta de campo

Con el objeto de aislar cepas de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) y rizobios nativos de los bajos alcalino-sódicos de la Pampa Deprimida del Salado, dos fechas de colectas fueron establecidas en los meses de junio y setiembre del 2015, respectivamente, para la colecta de muestras para cada colección. Fue así que en la primera fecha de colecta se estableció la toma de entre ocho y nueve plantas de *L. tenuis* naturalizadas por cada lugar en dos zonas de los bajos alcalino-sódicos: Manantiales (35° 44' 36.319"S - 58° 3' 25.307"W) y Punta Indio (35° 16' 15.449" S - 57° 14' 52.101" W), mientras que en la segunda fecha de colecta se tomaron 10 plantas por sitio en las mismas zonas mencionadas además de una tercera zona: Ayacucho (37° 8' 59.482"S, 58° 28' 40.231"O). Las plantas colectadas fueron trasladadas al laboratorio y almacenadas a 4°C hasta su procesamiento.

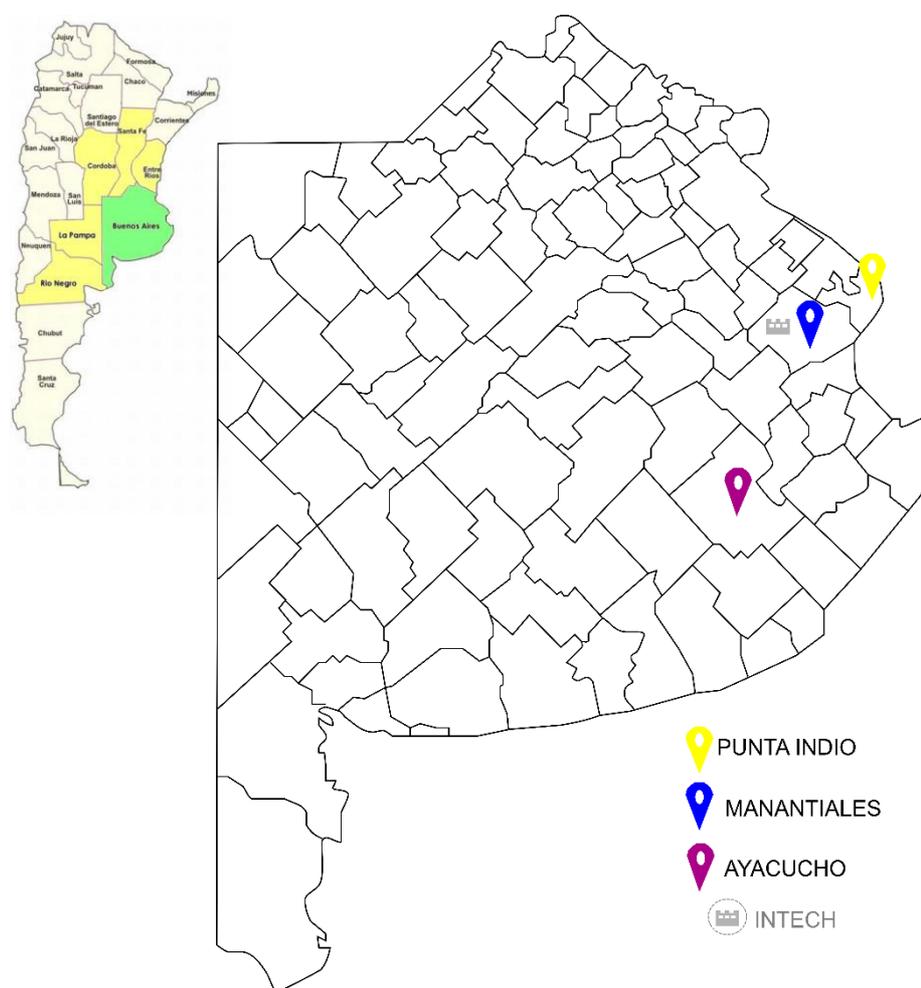


Figura II.1 Lugares de colecta en la región de la Pampa Deprimida del Salado, dentro de la provincia de Buenos Aires. Las zonas de toma de muestra se indican en el mapa coloreados diferenciadamente.

II.2. Propiedades fisicoquímicas del suelo

Junto a las muestras biológicas, algunas muestras de suelo fueron colectadas para corroborar las condiciones salino-alcálinas requeridas para el presente estudio. Estas fueron analizadas según los protocolos estandarizados de la Red de Laboratorios Agropecuarios Argentinos (REDLAA) por el servicio de análisis de suelos del laboratorio MRB (Chascomús, Argentina). Los niveles de pH y conductividad eléctrica (CE) fueron cuantificados en una solución de suelo/agua (1:2.5), mientras que la capacidad de intercambio catiónico (CIC) mediante el método del Acetato de amonio (Schollenberger y Dreibelbis, 1930). La cantidad de carbono orgánico oxidable (C) y el contenido de materia orgánica (MO) fueron cuantificados mediante el método de Walkley-Black (Walkley y Black, 1934). El contenido de Calcio (Ca^{2+}) y Magnesio (Mg^{2+}) fueron determinados por titulación complexométrica, mientras que las concentraciones de Sodio (Na^+) y Potasio (K^+) mediante fotometría de llama. El contenido de nitrógeno total (Nt) mediante el método Kjeldahl (Bradstreet, 1954) y contenido de fósforo mediante el método propuesto por Bray y Kurtz, 1945. Los datos obtenidos se detallan en la Tabla II.1.

Tabla II.1. Propiedades físico-químicas de los suelos

	LUGAR		
	Manantiales	Ayacucho	Punta Indio
pH	8.6	9.7	8.7
CE (dSm)	0.6	4.4	0.88
C (%)	ND	1.16	1.19
MO (%)	3.59	2	2.39
Nt (ppm)	0.05	0.123	0.13
Ca (meq/100g)	8.29	4.8	1.08
Mg (meq/100g)	1.45	3	0.47
K (meq/100g)	0.96	2.6	0.12
Na (meq/100g)	2.26	13.9	0.97
P (ppm)	0.13	4.8	1.67
CIC (meq/100g)	12.58	16.3	2.85
PSI (%)	17.96	85.3	34.03

CE: Conductividad Eléctrica. Ct: Carbono total. MO: Materia Orgánica. Nt: Nitrógeno total. Ca: Calcio. Mg: Magnesio. K: Potasio. Na: Sodio. P: Fósforo. CIC: Capacidad de Intercambio Catiónico. PSI: Porcentaje de Sodio Intercambiable

II.3. Procedimientos Microbiológicos

II.3.1. Medios de cultivos para Microorganismos

Tanto las cepas de rizobios como las de bacterias solubilizadoras de fosfato fueron cultivadas de forma rutinaria en el medio de cultivo **Tryptona Yeast Agar (TY)**, ya sea en sólido o líquido (180rpm) a 28°C (Vincent, 1970). Asimismo, para los ensayos de tolerancia a condiciones alcalino-sódica se utilizó la versión modificada, para lo cual fue suplementada con una solución de Na₂CO₃ (1M) y NaCl.

Tryptona	5g/L
Extracto de levadura	3g/L
Cl ₂ Ca ₂ H ₂ O	0.5g/L
Agar	15g/L

Las cepas de rizobios se cultivaron principalmente en medio de cultivo **Yeast-extract-mannitol (YEM)**, tanto en sólido como en líquido a 28°C (Vincent, 1970) y ocasionalmente en **medio mínimo (MM)** (Robertsen *et al.*, 1981) o **AB Sacarosa** según los requerimientos del ensayo.

YEM

Extracto de levadura	0.4 g/L
Manitol	10 g/L
NaCl	0.1 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2 g/L
K ₂ HPO ₄	0.5 g/L
Agar	15 g/L

MM

KH ₂ PO ₄	0.3 g/L
K ₂ HPO ₄	0.3 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.15 g/L
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.05 g/L
FeCl ₃	0.006 g/L
NaCl	0.05 g/L
Glutamato	1.1 g/L
Manitol	10 g/L
Vitaminas	1mL /L
Biotina	0.2 g/L
Tiamina	0.1 g/L
Pantotenato sódico	0.1 g/L
Agar purificado	13 g/L

AB - Sacarosa

K ₂ HPO ₄	3 g/L
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	1.14 g/L
NH ₄ Cl	1 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.30 g/L
KCl	0.15 g/L
CaCl ₂	0.01 g/L
Cl ₃ Fe 10%	100 µl/L
Sacarosa 20%	25 mL/L
Agar	15 g/L

La corroboración de la eficacia del protocolo de desinfección de nódulos de *L. tenuis* se realizó usando el medio **Plate Count Agar (PCA)** para cultivar el agua del último lavado a 28°C (Buchbinder L., 1951)

Triptona	5.0 g/L
Extracto de Levadura	2.5 g/L
Glucosa	1 g/L
Agar	15 g/L

La capacidad solubilizadora de fosfato se evaluó usando el medio **National Botanical Research Institute's phosphate (NBRIP)** tanto sólido como líquido a 28°C. De la misma manera, para los ensayos de solubilización en condiciones alcalino-sódicos se utilizó la versión modificada con Na₂CO₃ (1M) y NaCl 200mM (Shekhar Nautiyal, 1999)

MgCl ₂ 6H ₂ O	5 g/L
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.25 g/L
KCl	0.2 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1 g/L
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5 g/L
Glucosa	10 g/L
Agar	15 g/L

Las cepas de *E. coli* se cultivaron rutinariamente en medio de cultivo **Luria-Bertani (LB)** tanto en sólido como en líquido a 37°C, en agitación constante (180rpm) si se requiere (Bertani G., 1951)

Triptona	10 g/L
Extracto de Levadura	5 g/L
NaCl	10 g/L
Agar	15 g/L

Para realizar la evaluación funcional de uno de los mutantes de BA135 se utilizó el **Medio M9** según las recomendaciones de diCenzo (y col., 2017)

MOPS	(pH 6.8, 40mM morpholinopropane sulfonic acid, 20mM KOH)
NaCl	8.6 mM
NH ₄ Cl	18.7 mM
Biotina	41 µM
CoCl ₂	42 nM
MgSO ₄	1 mM
CaCl ₂	0.25 mM
FeCl ₃	38 µM
Glucosa	75 mM
Agar	15 g/L

El ensayo de detección de sideróforos se realizó utilizando el medio Cromo Azurol Agarizado (Pérez-Miranda *et al.*, 2007; Schwyn y Neilands, 1987). La preparación del mismo consistió en la mezcla de las soluciones descritas abajo, en la siguiente proporción. Para cada 100 mL de **Medio CAS-sólido**: Solución 1 (80 mL), solución 2 (10 mL), solución 3 (10 mL), solución 4 (1 mL), solución 5 (0.05 mL), solución 6 (0.1 mL) y solución 7 (0.1 mL)

Buffer PIPES	11.44 g	} Solución 1: PIPES agarizado 300 mL
NaOH	1.53 g	
**llevar a pH 6.8		
Tripteina	0.06 g	
Triptófano 1%	1.12 mL	
Agar	5.6 g	
KH ₂ PO ₄	0.15 g	} Solución 2: MM9 10X 50 mL
NaCl	0.25 g	
NH ₄ Cl	0.50 g	
Cromo Azurol S	60.5 mg/50 mL	} Solución 3: CAS HDTMA 100 mL
FeCl ₃ .6H ₂ O	0.0016 g/10 mL HCl 10mM)	
Cetrimida	72.9 mg/40 mL.	
Glucosa 1M	20 mL	Solución 4
MgSO ₄ .7H ₂ O 1M	1 mL	Solución 5
CaCl ₂ 50Mm	5 mL	Solución 6
Vitaminas 1000x	20 mg/100 mL	Solución 7

Todos los medios descritos se utilizaron a pH 7.0, salvo los medios modificados, y se esterizaron en autoclave a 120°C y 1 atm. por 20 min. Las vitaminas por su parte, debido a su

termosensibilidad, se agregaron al medio de cultivo (cuando fue necesario) posterior a la esterilización de los mismos.

II.3.2. Medios para cultivo *in vitro* de plantas y solución de riego

Los protocolos de germinación de semillas se llevaron a cabo utilizando el medio Agar-Agua, compuesto de agua y agar al 0.8%. Por otro lado, para los ensayos de infectividad se utilizó como medio de cultivo la solución hidropónica Evans agarizada (0.8%), cuya composición se describe a continuación. Cuando fueron requeridos, ambos medios se prepararon a pH 7.0 y esterilizaron en autoclave a 120°C. Para los ensayos en el sistema de jarras de Leonard se utilizó como solución hidropónica el medio Evans. La preparación del mismo consistió en la mezcla de 1 mL de las soluciones 1, 2, 3, 4 y 6, además de 0.1 mL de la solución 5 por cada litro de agua.

K ₂ SO ₄	27.88 g/L	}	Solución 1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	49.28 g/L		
KH ₂ PO ₄	2.3g/L	}	Solución 2
K ₂ HPO ₄	14.5 g/L		
CaSO ₄ ·2H ₂ O	10.33g/L	}	Solución 3
CaCl ₂ ·2H ₂ O	14.5 g/L		
FeNa EDTA	0.66 g/L	}	Solución 4
H ₃ BO ₃	0.143 g/L	}	Solución 5 Micronutrientes
MnSO ₄	0.069 g/L		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.022 g/L		
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0079 g/L		
Na ₂ MoO ₄	0.042 g/L		
ClCo·6H ₂ O	0.12 g/L		
NH ₄ NO ₃	2.86g/L	}	Solución 6

II.3.3. Antibióticos

Los antibióticos utilizados fueron preparados en una concentración de 100X en agua bidestilada estéril (Tabla II.2). La esterilización se realizó por filtración (filtros Millipore de 0.22 µm de poro). Las concentraciones experimentales requeridas variaron según el ensayo biológico, por lo que los detalles de las mismas se especifican en cada ensayo.

Tabla II.2. Relación de antibióticos usados en este trabajo

Antibióticos		Stock Inicial
Nistatina		50 mg/mL
Kanamicina	(Km)	200 µg/mL (100X)
Estreptomicina	(Sm)	200 µg/mL (100X)
Espectinomicina	(Spc)	200 µg/mL (100X)
Gentamicina	(Gm)	50 µg/mL (100X)
Ampicilina	(Amp)	200 µg/mL (100X)
Ácido Diaminopimélico (DAPA)		30 mM

II.3.4. Cepas y plásmidos

Tabla II.3. Relación de cepas y plásmidos empleados en este trabajo.

Cepas y plásmidos	Descripción	Referencia
<i>E. coli</i> β2163 (pSUP2021)	Cepa donadora de Tn5	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
<i>E. coli</i> SM10λpir (pSAM_R1)	Cepa donadora <i>Mariner</i>	(Perry y Yost, 2014)
BA135	<i>Aminobacter sp.</i>	(Estrella <i>et al.</i> , 2009)
BSA136	<i>Mesorhizobium sanjuanii</i>	(Sannazzaro <i>et al.</i> , 2018)
MA66	<i>Pantoea eucalipty</i>	Esta tesis
P63	<i>Pantoea eucalipty</i>	Esta tesis
P76	<i>Pantoea eucalipty</i>	Esta tesis
P163	<i>Pantoea eucalipty</i>	Esta tesis
P173	<i>Pantoea eucalipty</i>	Esta tesis

II.3.5. Aislamiento de bacterias solubilizadoras de fosfato a partir de rizosfera de *L. tenuis*.

Para recoger la rizosfera adherida a las raíces de *L. tenuis*, estas fueron lavadas con una solución de $MgCl_2$ 10 mM. A partir de dicha solución se realizaron diluciones seriadas (1:10), de las cuales 100 μ L fueron plaqueadas sobre medio NBRIP suplementado con nistatina (5 μ g/mL) hasta obtener colonias aisladas. Se seleccionaron aquellas colonias aisladas que mostraron capacidad solubilizadora de fosfato inorgánico mediante la formación de un halo translúcido alrededor de la colonia, resultado de la solubilización de fosfato inorgánico contenido en el medio.

II.3.6. Desinfección superficial de nódulos.

Los nódulos colectados fueron lavados inicialmente 4 veces con H_2O destilada estéril. Posteriormente fueron tratados en un lavador ultrasónico (*Teslab*) durante 2 min y nuevamente fueron lavados con H_2O estéril 4 veces. A continuación, fueron desinfectados superficialmente con una solución de $NaClO$ 5% durante 4 min, lavados con H_2O estéril 4 veces y posteriormente nuevamente desinfectados con Etanol 70% durante 1 min. Por último, se lavaron repetidas veces con agua destilada estéril para eliminar completamente los restos de etanol.

II.3.7. Aislamiento de rizobios a partir de nódulos.

Los nódulos desinfectados previamente fueron aplastados usando una varilla de vidrio estéril. Gotas de la suspensión resultante fueron sembradas en placas con medio YEM e incubados a 28°C entre 3 y 10 días hasta observar crecimiento. Asimismo, para comprobar la eficiencia del método de desinfección se incubó el agua de lavado en placas con medio PCA.

II.3.8. Conservación y preparación de cultivos bacterianos.

Los aislamientos obtenidos fueron crecidos en medio TY y almacenados a -80°C con glicerol 30 v/v. Siempre que fue necesario se plaquearon alícuotas del stock en el medio de cultivo requerido y se incubaron a 28°C.

II.3.9. Estimación de biomasa y recuento de bacterias “drop plate” (goteo en placas).

La biomasa bacteriana fue estimada indirectamente mediante la lectura de densidad óptica (DO) por espectrofotometría a 600 nm de longitud de onda (λ), la cual se calcula en función de la transmitancia (T) de la siguiente manera: $DO = -\log T/100$. Esta técnica indirecta no solo permitió estimar la biomasa del cultivo sino también, previa validación de células viables en placa, el estado fisiológico del cultivo de manera rápida.

La técnica de “drop plate” (Miles y Misra, 1938) o recuento bacteriano en gota se utilizó durante los ensayos de tolerancia a condiciones salino-alcálinas, tanto para las BSF como para rizobios.

Por ello, a partir de cultivos bacterianos crecidos hasta fase exponencial ($DO_{600} = 1.0$) se realizaron diluciones seriadas (1:10), de cada una de las cuales se sembraron gotas de 10 μL en el medio de cultivo sólido elegido. Las gotas se dejaron secar por unos minutos antes de incubar a 28°C. El crecimiento bacteriano fue observado visualmente de manera periódica y en todo caso durante el tiempo necesario para observar el crecimiento de colonias aisladas en las diluciones más altas.

II.3.10. Recuento de unidades formadoras de colonias (UFC).

Los recuentos de UFC se realizaron en medio TY a partir de cultivos crecidos en fase exponencial. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas (1:10) las cuales fueron plaqueadas usando esferas de borosilicato. Los recuentos se realizaron en las diluciones más altas en donde se observó el crecimiento de colonias individuales.

Para calcular las UFC/mL se aplicó la siguiente fórmula.

$$UFC = \frac{\#colonias \times [dilución]}{inóculo(mL)}$$

II.3.11. Cinética de crecimiento en medio líquido.

Para evaluar el crecimiento de una cepa en función del tiempo se realizaron mediciones de la densidad óptica (D.O) a intervalos establecidos. Para ello, las cepas fueron previamente cultivadas en medio líquido TY a 28°C, durante toda la noche (*overnight*), hasta alcanzar la mitad de la fase exponencial. Estos fueron diluidos hasta una DO_{600} de 0.01 y puestos a crecer en el medio de cultivo elegido a 28°C en agitación constante durante 48 o 72 horas hasta alcanzar la fase estacionaria. Las mediciones se realizaron de modo manual utilizando espectrofotómetros, o de forma automatizada en un equipo BIOSCREEN C. Los datos obtenidos permitieron el modelamiento de la curva de crecimiento logístico, que no es más que el modelamiento matemático de la ecuación de crecimiento exponencial que toma en cuenta la limitación del medio de cultivo para cuando la población bacteriana aumenta lo suficiente para ralentizar la tasa de crecimiento (Sprouffske y Wagner, 2016), y el cálculo de las variables crecimiento asociadas a ella (II.7.3)

II.3.12. Conjugación biparental

En búsqueda de la mejor frecuencia de transposición para BA135 se utilizaron dos cepas donadoras de transposones: *Escherichia coli* β 2163 (pSUP2021) y *E. coli* SM10 λ pir (pSAM_R1) (Figura II.2), portadoras de los plásmidos pSUP2021 (Tn5, Simon *et al.*, 1983), y pSAM_R1 (*mariner*, Perry y Yost, 2014). Las cepas donadoras fueron crecidas hasta fase exponencial en medio LB Amp¹⁰⁰ Km⁵⁰ DAPA (concentración final 0.3 mM) y LB Amp¹⁰⁰ Km⁵⁰ para β 2163 y SM10 λ pir respectivamente, mientras que la cepa receptora BA135 fue cultivada en medio TY hasta la fase exponencial tardía. Una vez crecidas, las células donadoras fueron centrifugadas y lavadas con medio TY para eliminar los restos de antibióticos. Se realizaron sendas mezclas de conjugación (β 2163 x BA135 y SM10 λ pir x BA135) en proporción 1:1 donadora-receptora, los cuales fueron lavados posteriormente con medio líquido TY y finalmente centrifugados a 12000 rpm por 1 min. Cada mezcla de conjugación se resuspendió en 40 μ L de medio de cultivo TY, y colocada sobre un filtro *Millipore* estéril de 0.45 μ m de poro y 2.5 cm de diámetro, previamente colocado sobre medio TY sólido (o TY+Dapa, dependiendo de la donadora). El mismo procedimiento se realizó para cada cepa donadora y la cepa receptora separadamente. Los cultivos fueron incubados a 28°C por 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, las bacterias fueron separadas de los filtros y resuspendidas en medio líquido TY. Se realizaron diluciones seriadas a partir de las suspensiones, se sembraron en medio selectivo y se incubaron nuevamente por un espacio de 24 a 72 horas. A partir de la cuantificación de las UFC/mL se calculó la frecuencia de transposición en función de las UFC/mL de las tranposantes y la receptora. Las mezclas de conjugación fueron almacenadas en glicerol (20% v/v) a -80°C, para posteriormente ser usados en la búsqueda de transposantes sensibles a condiciones de sal y pH.

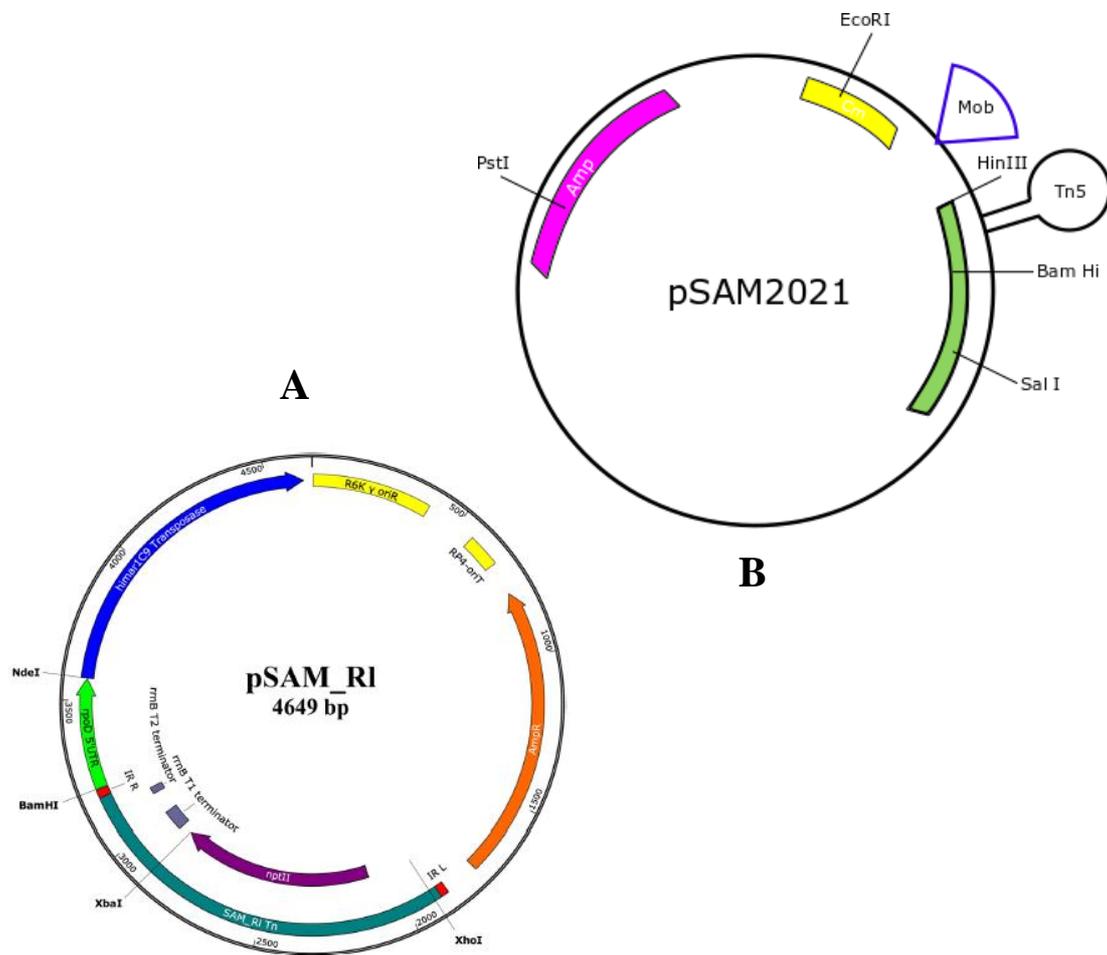


Figura II.2. Mapas de los vectores de mutagénesis pSAM_R1 (A) y pSUP2021 (B), portadores de los transposones tipo Mariner y Tn5, respectivamente, y portadores del gen de resistencia a Km. El transposón Tn5 destaca como uno de los más utilizados y no tiene secuencias preferentes de inserción, mientras que pSAM_R1 se inserta preferentemente en secuencias Tiamina-Adenina (“TA”). Por otro lado, pSAM_R1 permite además la implementación de la tecnología INSeq para la evaluación de transposantes por secuenciamiento masivo (Perry y Yost, 2014).

II.4. Técnicas Moleculares

II.4.1. Extracción de ADN mediante lisis alcalina

A partir de cultivos frescos de los aislamientos, se realizó una suspensión de la masa bacteriana en 20 μL de una solución de lisis compuesta por NaOH 0.01M y SDS 0.25%. La suspensión fue incubada a 100°C por 30 min. Posteriormente se agregaron 100 μL de H₂O mQ estéril para homogenizar. La mezcla se centrifugó a 14000 rpm por 2 min y el sobrenadante conteniendo el ADN fue almacenado a 4°C hasta su posterior uso. Esta metodología se utilizó principalmente para obtener el ADN molde en la técnica de “Fingerprinting” descrita más adelante (II.4.6)

II.4.2. Extracción y purificación de ADN

La extracción de ADN se realizó a partir de cultivos bacterianos crecidos previamente en medio TY a 28°C. Dichos cultivos fueron centrifugados por 2 min a 12000 rpm y lavados en 0.5 mL de 0.1% (wt/vol) N-lauroylsarcosine en tampón TE 1X [Tris base 10mM, Ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) 1mM] para nuevamente ser centrifugados durante 2 min a 12000 rpm. Luego, los pellets fueron homogenizados con 0.2 mL de ECTS (Tris base 10 mM, EDTA 1mM, NaCl 150 mM, SDS 1 %) para posteriormente adicionarles 2 μL de proteinasa K (10 mg/mL) y calentarlos a 56 °C por 30 min. Se adicionaron 0.5 mL de etanol absoluto y se mantuvieron a -20°C por 20 min. Seguidamente, se centrifugaron por 10 min a 13000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 0.3 mL de TE 1X y 3 mL de RNAsa (10mg/mL), para luego ser incubados a 37°C por 30 min. Posteriormente, se adicionaron 300 μL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), para nuevamente ser centrifugados a 13000 rpm durante 1 min. A los sobrenadantes se le adicionaron 200 μL de CHCl₃, se homogenizaron y se centrifugaron nuevamente por 1 min a 13000 rpm. Los sobrenadantes fueron mezclados con 0.3 vol de NH₄Ac 10M y 2.5 vol de etanol absoluto frío y mantenidos en frío a 4°C durante la noche (*overnight*). Transcurrido el periodo, las muestras fueron centrifugadas a 13000 rpm durante 10 min. Los pellets fueron homogenizados con 0.2 mL de etanol 70% frío y luego centrifugados nuevamente a 13000 rpm durante 4 min. Finalmente, los pellets fueron resuspendidos en 50 μL de TE 1X y calentados a 65°C por 20 min para luego ser almacenados a -20°C hasta su uso.

II.4.3. Extracción de ARN total

Se realizó la extracción de ARN de la cepa *Aminobacter* sp. BA135 cultivada en medio TY en condiciones control y estrés mixto salino-alkalino (pH 8.0 + 200 mM de NaCl) a 180 rpm hasta llegar a la mitad de la fase exponencial (aproximadamente DO₆₀₀ = 1.0). Los cultivos fueron centrifugados a 10000 rpm por 5 min a 4°C, los pellets obtenidos se lavaron en sarcosil 0.5% y se sumergieron rápidamente en nitrógeno líquido para luego ser almacenados a -80°C (*overnight*).

Los pellets se descongelaron y se resuspendieron en 1.5 mL de TRIS-reagent (Merck) precalentado a 70°C y se incubaron a 65°C por 10 min. Las muestras se centrifugaron a 12000 rpm por 10 min a temperatura ambiente (TA) El sobrenadante se mezcló con 0.1 vol de BCP (1-Bromo-3-cloropropano) y se incubó a TA por 5 min. Las muestras fueron nuevamente centrifugadas a 16000 rpm a 4 °C. La fase acuosa se trasladó a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 mL y se le añadió 1 vol de isopropanol seguido de una incubación a TA por 10 min. Las muestras se centrifugaron a 12000 rpm por 10 min, se eliminó el sobrenadante, el ARN precipitado (pellet blanco) fue lavado con 1 mL de etanol 70%, se centrifugaron las muestras a 12000 rpm por 5 min y el pellet se secó a 65°C por 5 min. Los productos se resuspendieron en 100 µL de H₂O tratada con DEPC (dietilpirocarbonato) (Merck). Por cada 100 µL de ARN se agregaron 10 µL de buffer 10X (Roche), 5 µL de DNAsa (Roche) y 1.5 µL de inhibidor de RNAsa. Las muestras se incubaron a 37°C por 1 hora. Posteriormente las muestras se mezclaron con 1 vol. de fenol ácido:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) a 4°C y se centrifugaron a 4 °C durante 10 min a 14000 rpm. El sobrenadante obtenido se mezcló con 1 vol. de cloroformo:alcohol isomamílico (24:1) y se centrifugó a 14000 rpm por 5 min. La fase acuosa se mezcló con 1/10 vol de NaAc 3M pH=5.2 y 3 vol de etanol 100%. Las muestras se dejaron a -20°C por una noche. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 14000 rpm a 4 °C durante 12 min. El pellet se lavó con 1 mL de etanol 70% frío y se centrifugó nuevamente a 14000 rpm a 4 °C durante 10 min. Las muestras finalmente fueron secadas a 60°C durante 10 min y se re-suspendieron en 50 µL de H₂O-DEPC precalentado a 65°C. Las muestras se almacenaron a -20°C para su posterior cuantificación y uso.

II.4.4. Cuantificación y Análisis de calidad de Ácidos nucleicos.

Las cantidades de ADN y ARN extraídas fueron determinadas usando el lector Synergy H1 Hybrid-reader (Biotek) y el Nanodrop 1000 (Thermofisher). Asimismo, las muestras fueron sometidas a electroforesis en geles de agarosa (0.8% para ADN y 1.2% para ARN) durante 30 min a 90 V, teñidos con bromuro de etidio (BrEt) y visualizadas bajo luz UV. Adicionalmente, las muestras de ARN destinadas para los análisis transcriptómicos fueron cuantificados fluorométricamente por Qubit, así como mediante electroforesis automatizada en equipo Agilent 2100 Bioanalyzer. Estos últimos fueron realizados por el servicio de Genómica del Instituto de Parasitología y Biomedicina “Lopez-Neyra” (CSIC, Granada).

II.4.5. Extracción del plásmido pSAM_RI

El plásmido pSAM_RI, fue extraído y purificado a partir de un cultivo LB Amp¹⁰⁰Km⁵⁰ en fase exponencial de la cepa *E. coli* SM10λpir crecido *overnight*- a 37°C. La extracción se realizó usando el kit Plasmid DNA purification (Macherey-Nagel) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El producto obtenido fue linealizado con la enzima de restricción XhoI (Thermo

Scientific). Para ello se realizó una digestión mezclando 2 μL de enzima XhoI, 3 μL de tampón de enzima y 15 μL de H_2O mQ por cada 10 μL de plásmido. La mezcla de digestión fue incubada a 37°C durante 1 hora seguido de una etapa de inactivación a 65°C por 15 min. El producto linealizado fue visualizado en un gel de agarosa 0.8% corrido durante 30 min a 90 V, teñido con BrEt y revelado en un transiluminador bajo luz UV.

II.4.6. Perfiles o huellas genómicas (*Fingerprinting*)

El análisis de *fingerprinting* o huella genómica fue realizado mediante la técnica BOX-PCR (Versalovic *et al.*, 1994), usando el oligonucleótido BOXA1R 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3' (Versalovic *et al.*, 1991; 1994). El uso de estas huellas genómicas corresponde a una técnica ampliamente usada para el análisis de diversidad genética de poblaciones bacterianas (Covelli, 2013), basado en la amplificación de las regiones repetitivas dispersas a lo largo del genoma en diferentes posiciones intergénicas, lo que produce amplicones de distintos tamaños que tras su separación electroforética resultan en un perfil único que permite discriminar hasta nivel de cepa; además son particularmente útiles en el análisis de control de calidad de inoculantes comerciales (Menna *et al.*, 2009). La mezcla de PCR y las condiciones de amplificación fueron las mismas usadas por Sannazzaro (y col., 2011). Los productos amplificados y el marcador 1kb plus DNA ladder (Invitrogen) fueron separados en un gel de agarosa a 1.5% en tampón TBE 1X [Tris base 80 mM, ácido bórico 80 mM, EDTA-Na (2 mM a pH 8.0)], teñido con una solución de BrEt (Sigma Aldrich) 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y fotografiado bajo luz UV. El dendrograma fue construido con el software GelCompar II software (Applied Maths), usando el algoritmo de UPGMA y el coeficiente de correlación de Pearson con 2.0% de tolerancia. Se utilizó como criterio de selección de genotipos diferentes una línea de corte de 75% de similitud en el caso de solubilizadoras de fosfato y 65 % de similitud para las bacterias fijadoras de nitrógeno.

II.4.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para las amplificaciones de ADN, las mezclas de reacción contenían 2 μL de los ADN purificados (25 ng/ μL) y 23 μL de *Mix* PCR, compuesta por 16.6 μL de H_2O mQ, 2.5 μL de buffer 10X sin MgCl_2 , 1.5 μL de MgCl_2 25 mM, 0.2 μL de dNTP 25mM, 1 μL (10 mM) de primer forward, 1 μL (10 mM) de primer reverse y 0.2 μL de Taq polimerasa. Los programas de amplificación usados según la pareja de oligos se detallan en la tabla II.5. Los productos amplificados fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa 0.8% en buffer TBE 1X, teñido con BrEt (Sigma Aldrich) 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ usando el marcador de tamaños 1kb plus DNA ladder (Invitrogen) y fotografiado bajo luz UV.

II.4.8. Diseño de oligos para PCR

A partir de la secuencia del plásmido pSAM_R1 se diseñaron cebadores, de modo que se obtenga la secuencia adyacente al transposón. Los cebadores fueron diseñados usando el software Oligo Explorer v1.5. Como características generales los oligos fueron diseñados entre 40 y 60 pb antes de las regiones de inserción del transposón pSAM_R1. No forman homodímeros ni heterodímeros y cuentan con una Temperatura de melting (T_m) mayor a 56°C. Las pruebas de amplificación in-silico se realizaron usando el software SnapGene 4.3.7.

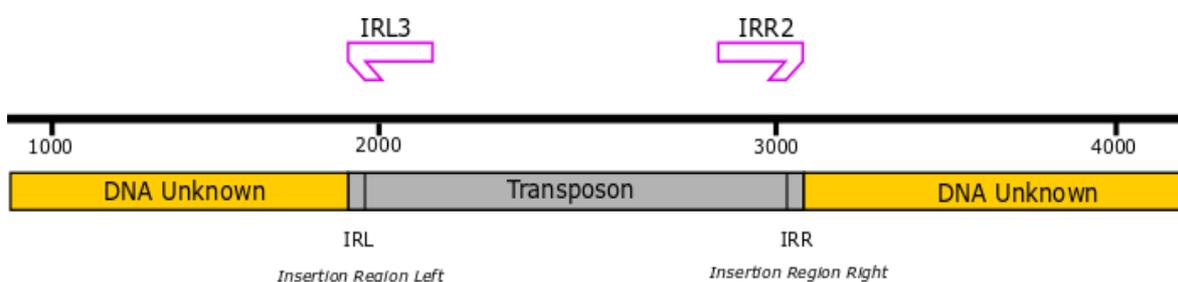


Figura II.3. Esquema de la ubicación de los oligos IRL3 e IRR2 en el transposón inserto en una región desconocida del ADN (DNA Unknown). La orientación y la posición con las que fueron diseñados permiten amplificar no solo las porciones adyacentes a las regiones de inserción del transposón (Insertion region - IR) sino también una parte de las IR lo que cual permite corroborar la inserción exitosa del transposón.

Tabla II.4. Características del diseño de los IRL3 e IRL2

Cebador	pSAM_RI IRL3	pSAM_RI IRR2
Secuencia	5'-TTCGCTTGCTGTCCATAAAACCGCCC-3'	5'-GGACGCCCGCCATAAACTGCC-3'
Tamaño	26	21
T _m (básico)	80.0°C	70.0° C
T _m (sal)	69.4 °C	67.2 ° C
T _m (NN)	69.1°C	69.6 ° C
GC%	53.8%	66.70%
3'-tail GC %	85.70%	57.10%
ΔG	-54.8 kcal/mol	-48.0 kcal/mol
3-tail ΔG	-15.3 kcal/mol	-11.5 kcal/mol
Self annealing	No	No
Loops	No	No

T_m= Temperatura de melting, %GC= % de Guanina y Citosina, 3'-tail GC % = % de Guanina y Citosina en el extremo 3', ΔG= Cambio en la energía libre, 3-tail ΔG = Cambio en la energía libre en el extremo 3', Self annealing = auto alineamiento, L= formación de horquillas

Tabla II.5. Relación de oligonucleótidos empleados en este trabajo.

Molde	Producto	Oligo/Secuencia	Referencia
Genoma	regiones intergénicas BOX	BOX-A1R: 5' CTACGGCAAGGCGACGCTGACG 3'	(Versalovic 199)
ARNr 16S	ARN ribosomal 16S	41f: 5'- GCTCAAGATTGAACGCTGGCG-3' 1488r: 5'- CGGTTACCTTGTTACGACTTCACC-3'	(Herrera <i>et al.</i> ,
GyrB	<i>gyrB</i> ADN girasa subunidad B	320F 5' TAARTTYGAYGACTCYTAYAAAAGT 3' 1260R 5' CMCCYTCCACCARGTAMAGTTC 3'	(Rezzonico <i>et al.</i>
RpoB	<i>rpoB</i> ARN polimerasa subunidad beta	rpoBCM7-F 5' AACCAGTTCGCGTTGGCCTGG 3' rpoBCM31b - R 5' CCTGAACAACACGCTCGGA 3'	(Brady <i>et al.</i> ,
GlnII	<i>glnII</i> glutamina sintasa	GSII-1 : 5' AACGCAGATCAAGGAATTCG 3' GSII-2 : 5' ATGCCCGAGCCGTTCCAGTC 3'	(Turner y Young
DnaK	<i>dnaK</i> proteína chaperona	D352F 5' GGCCGCATCATSAACGTCATC 3' D871R 5' AGAGCCGACACTTCMGARCC 3'	(Martens <i>et al.</i> ,
pSAMRI	Regiones adyacentes a las regiones de inserción del plásmido pSAMRI	IRL3 5'-TTCGCTTGCTGTCCATAAAACCGCCC-3' IRR2 5'-GGACGCCCGCCATAAACTGCC-3'	esta tesis

II.4.9. Purificación y secuenciación de productos de PCR

La purificación se realizó mezclando las muestras con 11.25 μL de EDTA 125 mM y 135 μL de etanol absoluto, seguido de una centrifugación a 13000 rpm durante 25 min, posteriormente se lavó el pellet con 120 μL de etanol 70% y nuevamente se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min. Los pellets obtenidos fueron resuspendidos en 25 μL de H_2O mQ estéril. En algunos casos la purificación se realizó usando los kits comerciales AccuPrep® PCR Purification Kit (BIONEER), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La secuenciación fue realizada por el servicio de genómica de Macrogen (Korea) o el Instituto de parasitología y Biomedicina “Lopez-Neyra” (CSIC, Granada).

II.4.10. Determinación de identidad por *matrix-assisted laser desorption/ionization* (MALDI) *time-of-flight* (TOF)

La identificación por espectrometría de masas fue realizada en el servicio de análisis de espectrofotometría de masas MALDI-TOF de la Universidad Nacional de la Plata. Como parte de los requerimientos del servicio de espectrofotometría de masas, previo al análisis, las muestras fueron sometidas al proceso de lisis celular. A partir de un cultivo bacteriano fresco en fase exponencial se obtuvo el pellet luego de centrifugar por 4 min a 12000 rpm. Ese pellet fue resuspendido en 100 μL de agua bidestilada estéril y mezclado con 300 μL de etanol absoluto. La muestra homogeneizada fue centrifugada nuevamente a 10000 rpm por 2 min para obtener nuevamente el pellet, que finalmente luego de ser secado cuidadosamente, fue mezclado con 12 μL de CH_3CN y 12 μL de H-COOH . Los espectros de cada muestra fueron adquiridos usando el software Biotyper (v. 2.0)

II.4.11. Identificación de sitios de inserción con los oligonucleótidos IRR3, IRL2

La localización de las inserciones del transposón fue determinada a partir de la secuenciación directa de las regiones de inserción transposón tipo mariner del plásmido pSAM_R1. Usando el ADN genómico purificado de los mutantes elegidos BA135, para lo cual se utilizaron los oligos IRL3 e IRR2 (esta tesis). La secuenciación fue realizada por el servicio de genómica del Instituto de parasitología y Biomedicina “Lopez-Neyra” (CSIC, Granada).

II.5. Ensayos Biológicos

II.5.1. Esterilización y escarificación de semillas

Se utilizaron semillas de *Lotus tenuis* cultivar Bartriunfo, cedidas amablemente por la semillera Barenbrug Palaversich (Cd. Pergamino, Buenos Aires), fueron escarificadas usando H_2SO_4 concentrado por 2 min. Seguidamente fueron lavadas con agua destilada 4 veces hasta eliminar los rastros del H_2SO_4 . Posteriormente se trataron con una solución de NaClO_3 3% durante 6 min. Finalmente, las semillas fueron lavadas 5 veces con H_2O destilada estéril y dejadas en H_2O estéril en imbibición por 3 - 6 horas.

II.5.2. Germinación de semillas

Las semillas esterilizadas fueron dispuestas en placas estériles con 0.8% agar-agua y se incubaron en cámara de crecimiento (cuarto de plantas) bajo condiciones controladas (Oscuridad, Temperatura = día 25°C / noche 21°C , humedad relativa = 55 - 75 +/- 5%) por 5 días hasta la obtención de plántulas.

II.5.3. Ensayo de infectividad de rizobios

Para confirmar la capacidad simbiótica de las bacterias aisladas de nódulos, se realizó un ensayo de infectividad en placa cuadrada (120x120mm) usando medio Evans -libre de nitrógeno-agarizado. Las plántulas fueron alineadas sobre la superficie (aproximadamente 10 plantas por placa) y se inocularon con 10 μL de una suspensión de rizobios en agua bidestilada estéril en fase exponencial de crecimiento ($\text{DO}_{600} = 1.0$). Cabe resaltar que la zona de la placa correspondiente al crecimiento de la raíz fue cubierta con papel oscuro para evitar el efecto inhibitorio de la luz en la nodulación. Las plántulas inoculadas se incubaron en un cuarto de cultivo de plantas bajo condiciones controladas (Luz/Oscuridad = 16/8 horas, Temperatura = día 25°C / noche 21°C , humedad relativa = 55-75 +/- 5%) por un período de 30 días. Se consideraron como positivas aquellas plantas que formaron al menos 1 nódulo.

II.5.4. Ensayo de tolerancia a estrés salino, alcalino y salino-alcalino de rizobios

Se evaluó la capacidad de tolerar condiciones de estrés de los aislamientos de rizobios infectivos. Se utilizó el medio TY modificado (ver II.3.1) a diferentes condiciones de salinidad: 100, 200 y 300 mM de NaCl; alcalinidad: pH 8.0 y pH 8.5, y salinidad-alcalinidad: pH 8.0 + 100 mM NaCl y pH 8.0 + 150 mM NaCl. El crecimiento se evaluó empleando el método de goteo en placas "drop plate" las cuales se inocularon en los medios anteriormente descritos y se incubaron a 28°C por 5 días.

La tolerancia al estrés fue clasificada de acuerdo a las siguientes categorías:

Tolerante (Crecimiento igual al control)	++
Tolerancia reducida (Una dilución menos que el control)	+
Afectado (Dos diluciones menos que el control)	--
Sensible (3 o más diluciones menos que el control)	---

Este mismo sistema se utilizó para evaluar la tolerancia al estrés salino, alcalino y salino-alcalino de la cepa BA135. Las condiciones de salinidad se ajustaron a 100, 150, 200 y 300 mM NaCl; alcalinidad: pH 8.0, 9.0, 10.0 y mixto: pH 8.0 + 100 mM NaCl, pH 8.0 + 150 mM NaCl, pH 9.0 + 100 mM NaCl, pH 9.0 + 150 mM NaCl. Las placas fueron incubadas a 28°C por un espacio de 5 días.

II.5.5. Solubilización de fosfato en condiciones salino-alcalinas

La capacidad para solubilizar fosfato inorgánico en condiciones estresantes fue evaluada a partir de cultivos bacterianos frescos de los aislamientos obtenidos de la rizosfera, crecidos en medio de cultivo TY. Dichos cultivos fueron centrifugados a 12000 rpm por 4 min y posteriormente sometidos a varios lavados con agua destilada estéril. Finalmente, los pellets lavados fueron resuspendidos en 100 µL de agua destilada estéril de los cuales, 10 µL de los cultivos se inocularon en placas con medio N-BRIP modificado a 3 condiciones de estrés; salino-alcalino: pH 8 + 200 mM NaCl, pH9 + 200 mM NaCl, pH10 + 200 mM NaCl y posteriormente incubado a 28°C entre 3 y 5 días. La capacidad solubilizadora de fosfato en condiciones de estrés se determinó por la formación del halo translúcido de solubilización, de modo que los aislamientos fueron clasificados según su capacidad de solubilizar en el medio más restrictivo.

Determinación cuantitativa de la actividad solubilizadora de fosfato en medio sólido

La habilidad solubilizadora de fosfato confirmada inicialmente por la observación de los halos de solubilización fue cuantificada mediante el cálculo del índice de solubilización de fosfato (ISF) descrito por Sarkar (y col., 2012) de la siguiente manera: $ISF = A/B$, donde A es el diámetro de la colonia sumado a la zona translúcida alrededor de ella y B es el diámetro de la colonia. Esto se realizó para las BSF seleccionadas a partir de alícuotas de 10 µL (por duplicado) de una suspensión bacteriana, obtenida como se describe en II.5.5, inoculada en medio sólido NBRIP e incubada a 28° por 168 horas.

Determinación cuantitativa de solubilización de fosfato en medio líquido.

Para la determinación cuantitativa de fósforo soluble en condiciones restrictivas, 10 mL de medio de cultivo NBRIP modificado a distintas condiciones (pH 8 + 200 mM NaCl, pH 9 +

200 mM NaCl) fue inoculado con un cultivo bacteriano de aproximadamente 1×10^5 UFC/mL⁻¹ y subsecuentemente incubado en un agitador a 28°C. Tras 24, 72 y 168 horas se colectaron muestras de cada cultivo para ser centrifugadas a 14000 rpm por 5 min, de modo que a partir del sobrenadante se determinó el pH y el contenido de fósforo (P) solubilizado mediante el método de Azul de molibdeno (Murphy y Riley 1962), el cual consistió en la mezcla de 50 µL de un único reactivo mixto (125 mL de H₂SO₄ 5N, 37.5 mL de Molibdato de amonio 0.4%, 75 mL de ácido ascórbico 0.09M y 12.5 mL de tartrato de potasio y amonio 4.1 mM), con 250 µL de muestra. A partir de esta mezcla se determinó el fósforo soluble mediante la lectura de la absorbancia en un lector de microplacas Synergy H1, BioTek, USA a una DO₆₀₀. La cuantificación se realizó mediante una curva de calibración con 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8 y 2.0 ppm de KH₂PO₄.

II.5.6. Ensayo de supervivencia en suelo restrictivo

Muestras de suelo provenientes de los bajos salinos alcalinos (previamente cribado) de la Pampa Deprimida del Salado fueron inoculados con cultivos bacterianos de las cepas de rizobios seleccionadas para evaluar su supervivencia en vida libre. Las cepas seleccionadas fueron cultivadas en medio TY a 28°C por 24 horas. Cuatro mL de cultivo bacteriano en fase exponencial (DO₆₀₀ = 0.01) fueron inoculados en placas de petri conteniendo 4 g de suelo estéril e incubados a 25°C. El test se realizó por triplicado. El rescate y cuantificación (UFC/g) de las cepas se llevó a cabo a los 0, 7, 14 y 28 días post inoculación. El rescate se realizó a partir de la suspensión del suelo inoculado en 40 mL de MgCl 10 mM, a partir del cual se cuantificó la cantidad en UFC/mL en cada tiempo mediante la técnica de *drop-plate* (ver II.3.9). Adicionalmente se cuantificó las UFC/mL presentes en el cultivo inicial previo a la inoculación.

II.5.7. Producción de sideróforos en condiciones salino-alcálicas - Método Overcast modificado (Schwyn y Neilands, 1987).

Para evaluar la capacidad de producción de sideróforos, las BSF seleccionadas se cultivaron en medio TY líquido a 28°C por 24 horas. A partir de dichos cultivos se inoculó una gota de 10 µL en placas de medio TY a pH 9.0 + 200 mM de NaCl y medio TY sin estrés. Las placas fueron incubadas a 28°C por 24 horas hasta observar crecimiento. Luego de la incubación, una capa del medio Cromo Azurol Agarizado (Pérez-Miranda *et al.*, 2007; Schwyn y Neilands, 1987) fue agregado a las placas de TY crecidas anteriormente para detectar la producción de sideróforos. La producción de sideróforos se reveló mediante la formación de un halo de color naranja-amarillo alrededor de las colonias. Se tomó la medida del área difundida a las 48 horas.

II.5.8. Estimación colorimétrica de ácido Indol-acético (AIA)

Para determinar la capacidad de las cepas selectas de producir ácido indol-acético (AIA), se usaron cultivos bacterianos crecidos en medio TY suplementados con 10 μM de L-triptófano (Sigma-Aldrich, USA) a 28°C en agitación constante por 72 horas. Alícuotas de 100 μL (por triplicado) fueron colectadas para obtener el sobrenadante mediante centrifugación a 6000 rpm por 5 min. La estimación se realizó según el protocolo de Gordon y Weber (1951), de modo que los sobrenadantes obtenidos se mezclaron con 100 μL del reactivo de Salkovski, y se expusieron a oscuridad plena por 30 min. La producción de índoles se determinó por la cuantificación de la absorbancia a una longitud de onda de 530 nm en un lector de microplacas Synergy H1, BioTek, USA. La concentración de AIA se calculó usando una curva de calibración con 10, 20, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$ de AIA (Sigma-Aldrich, USA).

II.5.9. Test de bio-compatibilidad

Previo al ensayo de promoción de crecimiento de las BSF sobre *L. tenuis* en condiciones restrictivas (II.5.12), éstas fueron evaluadas para determinar su bio-compatibilidad con la cepa de rizobio *Mesorhizobium sanjuanii* BSA136 mediante el método de estrías cruzadas. Cada BSF seleccionada fue estriada en líneas rectas a través de la superficie de una placa con medio de cultivo TY o TY modificado (pH 8.0 + 150 mM NaCl), en donde posteriormente se realizaron estrías rectas de la cepa de rizobios en posición perpendicular a las estrías de las BSF. Las placas se incubaron durante 2 a 5 días a 28°C y posteriormente se observaron para determinar si existían efectos inhibitorios en la intersección de los aislamientos probados.

II.5.10. Ensayo de promoción de crecimiento de las BSF en suelo restrictivo

Se evaluó la capacidad de promover el crecimiento de las cepas seleccionadas en plantas de *Lotus tenuis* (var. Bartrunfo). Para ello se empleó un diseño experimental completamente aleatorizado en donde plántulas de *Lotus tenuis*, germinadas en condiciones de esterilidad, fueron sembradas en macetas con suelo estéril proveniente de los bajos salinos alcalinos-sódicos (35° 38'00.1''S, 58° 00'07.7''W). Estas plantas fueron inoculadas con 1 mL de cada cultivo bacteriano de las BSF en fase exponencial ($\text{DO}_{600} = 0.25$), en conjunto con 1 mL de cultivo bacteriano del rizobio *Mesorhizobium sanjuanii* BSA136 (Sannazzaro *et al.*, 2018). Las plantas se mantuvieron bajo condiciones controladas (Luz/Oscuridad = 16/8 horas, Temperatura = día 25°C/ noche 21°C, humedad relativa = 55 - 75 +/- 5%) por 40 días. Transcurrido el tiempo de cultivo las plantas de *L. tenuis* fueron cosechadas, cuidadosamente se colectaron los nódulos formados y se separó el vástago de la raíz. Luego los órganos (nódulos, vástago y raíz) fueron colocados en sobres de papel o *ependorfs* para secarse en una estufa a 60°C. A partir de ello se

tomaron las siguientes variables: Peso seco total (DWt), peso seco del vástago (DWsh), peso seco de raíz (DWr) y peso seco de nódulos (DWn).

II.5.11. Determinación de nitrógeno por micro-Kjeldhal

Se estimó el contenido de nitrógeno en vástago y en raíz mediante el método de micro-Kjeldhal (Bradstreet, 1954). Para ello 100 mg de materia seca fue mezclada con 1 g de mezcla catalítica ($K_2SO_4:CuSO_4:Se$, 100:10:1) y 8 mL de H_2SO_4 concentrado. La mezcla fue digerida inicialmente a $150^\circ C$ por 15 min y luego a $350^\circ C$ por 60 min, seguido de un proceso de alcalinización con NaOH 10 N. El amonio resultante fue separado por destilación y colectado en una solución de H_3BO_3 4% con algunas gotas de indicador mixto (Rojo de metilo y verde de bromocresol) y finalmente titulado con HCl 0.01 N.

El porcentaje de nitrógeno se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{[\text{ácido valorante (mL)} - \text{blanco (mL)}] \times N \text{ ácido} \times 1.4007}{\text{peso de la muestra (g)}}$$

En donde N es la normalidad y HCl el ácido valorante.

II.5.12. Determinación de fósforo y micronutrientes

Para la determinación del resto de micronutrientes se utilizaron 100 mg de materia seca, la cual fue reducida hasta ceniza a $550^\circ C$. Estos residuos fueron suspendidos en 3.5 mL de una solución de $HNO_3:H_2O$ al 65% (1:6 v/v). La concentración de K, Ca, Mg, P, Fe, Zn, Cu, Mn y Na en el digesto fue estimado mediante el uso de espectroscopia de emisión atómica de plasma de microondas MP-AES 4200, Agilent

II.5.13. Antibiograma

Se determinó la frecuencia de aparición de resistencia a antibióticos de la cepa BA135 en distintas concentraciones. A partir de un cultivo bacteriano en medio líquido TY crecido a $28^\circ C$ *overnight*, se realizaron diluciones seriadas y se inocularon en medio TY suplementado con los siguientes antibióticos: Gentamicina (10, 20, y 50 $\mu g/mL$); Espectinomicina (25, 50 y 100 $\mu g/mL$); Estreptomycin (25, 50, 100, 150, 200 y 250 $\mu g/mL$) y Kanamicina (25, 50, 100, 200 y 300 $\mu g/mL$). Las placas inoculadas fueron incubadas a $28^\circ C$ por 72 horas. La frecuencia de resistencia se evaluó en función de las UFC/mL en cada condición respecto a las UFC/mL en medio sin antibiótico.

II.5.14. Búsqueda de mutantes en condiciones salino-alcálinas

Los transposantes fueron evaluados en los medios Control: TY Km³⁰⁰ Sm¹⁰⁰ y Problema: TY + 300 mM NaCl₂ Km³⁰⁰ Sm¹⁰⁰ y TY pH 8.5 Km³⁰⁰ Sm¹⁰⁰. De la mutoteca obtenida, producto de la conjugación biparental, se realizaron diluciones seriadas hasta obtener colonias aisladas, a partir de las cuales con la ayuda de escarbadiantes estériles se realizó estrías oblicuas en el medio control y los medios problema. Las placas fueron incubadas a 28°C por 5 días. Aquellos clones que mostraban crecimiento en el medio control mas no en los medios problemas fueron considerados como mutantes sensibles y fueron seleccionados para comprobaciones posteriores en el mismo sistema. Se realizaron 3 comprobaciones consecutivas de dichos mutantes sensibles.

II.5.15. Validación de mutantes en condiciones salino-alcálinas

Los mutantes sensibles fueron validados mediante la técnica de goteo en placa. Para ello los mutantes sensibles seleccionados previamente fueron precultivados en medio líquido TY *overnight*. Posteriormente, a partir de dicho cultivo se realizaron 6 diluciones seriadas de los cuales se inoculó 10 µL de cada dilución en medio control y medios problemas. Las placas fueron incubadas a 28°C y la observación se realizó 5 días post inoculación. Aquellos que mostraron disminución del crecimiento en los medios problema en comparación a la cepa parental fueron confirmados como verdaderos mutantes sensibles.

II.5.16. Caracterización fenotípica de las mutantes sensibles

Se realizó la caracterización fenotípica de los mutantes sensibles validados para determinar el grado de sensibilidad provocada por la mutación. Para ello, dichos mutantes fueron crecidos en medio TY líquido *overnight* a 28°C en agitación constante (180 rpm) en medio TY con estrés salino a 100, 150, 200, 250 y 300mM NaCl y en medio TY con estrés alcalino a pH 7.5, 8.0 y 8.5.

II.5.17. Capacidad simbiótica de los mutantes BA135

Para evaluar la habilidad de los mutantes BA135 de nodular plantas de *L. tenuis* se realizaron ensayos de infectividad usando la metodología descrita en II.5.3. Las plantas se inocularon con cultivos bacterianos de las cepas mutantes crecidas hasta la fase exponencial y se incubaron bajo condiciones controladas a 25°C. Se utilizó la cepa silvestre BA135 como control positivo y agua destilada estéril como control negativo. Durante la etapa de incubación se registró y cuantificó periódicamente la aparición de nódulos a los 7, 14, 28, 21, 24 y 30 días post inoculación

II.5.18. Eficiencia simbiótica de los mutantes BA135.

De forma complementaria se evaluó el efecto de las mutaciones en la eficiencia de la interacción simbiótica con *L. tenuis*. Para lo cual se utilizó el sistema de jarras de Leonard (Sannazzaro *et al.*, 2011; Escaray *et al.*, 2012) con solución de riego Rigaud y Puppo modificada (1975) y una mezcla de vermiculita:perlita (3:1) estéril como sustrato inerte. Las plántulas de *L. tenuis* germinadas en condiciones de esterilidad, fueron inoculadas con 1 mL de cultivo bacteriano en fase exponencial ($DO_{600} = 0.25$) e incubados a 25°C y condiciones controladas. Luego de 35 días post inoculación, las plantas fueron cosechadas y se cuantificaron las variables peso seco y el peso fresco.

II.6. Análisis transcriptómico por RNA-seq

Dilucidar los cambios en la expresión génica es fundamental para comprender la respuesta celular de los organismos a los estímulos y las condiciones ambientales externas. Estos cambios ocurridos frente a una condición específica son reflejados en las moléculas de ARN mensajero (ARNm), o transcritos, generados durante ese momento dado. El conjunto de estos transcritos y su cuantificación conforma el Transcriptoma y su entendimiento es fundamental para interpretar la funcionalidad de los elementos de un genoma (Wang *et al.*, 2009) El RNA-seq se ha convertido en la principal opción para medir los cambios en los niveles de expresión y destaca por su alto nivel de reproducibilidad, además de la posibilidad de identificar y cuantificar isoformas y transcritos desconocidos (Costa-Silva *et al.*, 2017)

II.6.1. Diseño Experimental

Tal como se muestra en la Figura II.4, nuestro diseño experimental consistió en dos condiciones a comparar: La condición control que se refiere a medio de cultivo TY (Control) y la condición problema (Estrés) referida a medio de cultivo TY modificado a pH 8 + 200 mM NaCl. Cada condición estuvo compuesta por 2 réplicas biológicas (RB), cada una de ellas conformadas a su vez por 3 réplicas técnicas (RT). Estas réplicas técnicas fueron cultivadas a 28°C y agitación constante (180 rpm) hasta alcanzar la mitad de la fase exponencial ($DO_{600} = 1.0$). Esto último fue validado a partir del ensayo de cinética de crecimiento realizado para la cepa BA135.

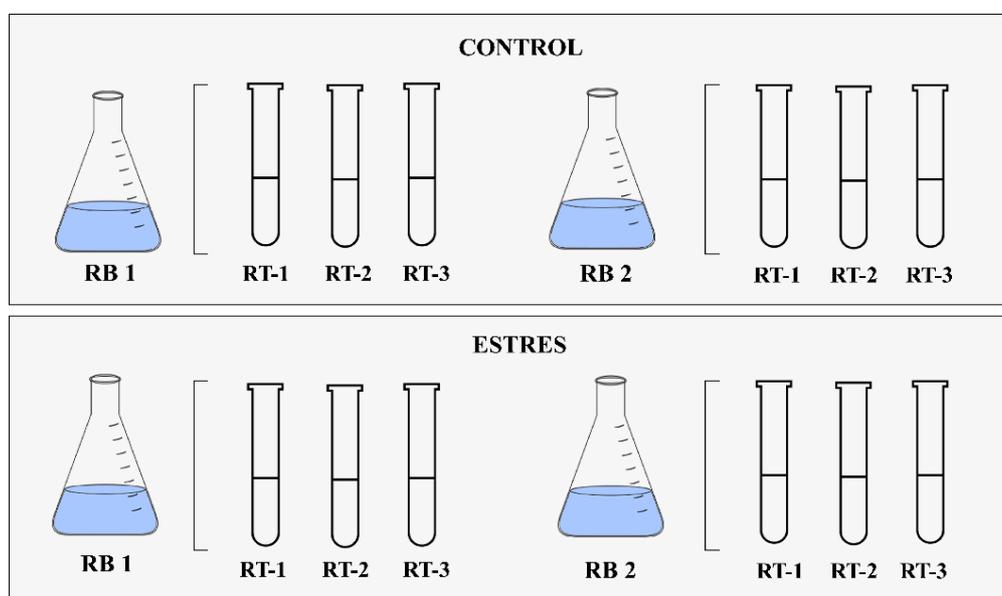


Figura II.4. Diagrama del diseño experimental del estudio de RNA-seq de la cepa BA135 en condiciones salino-alcálinas. Se emplearon dos réplicas biológicas (RB) por cada condición, las cuales estuvieron conformadas a su vez por 3 réplicas técnicas (RT).

Siguiendo el diseño experimental, se procedió a la extracción y purificación del ARN total de cada réplica biológica según el protocolo descrito en II.4.3. Las cuales luego de ser cuantificadas y evaluadas cualitativamente (II.4.4) fueron enviadas al servicio de secuenciación de ARN procariota brindado por *Novogene* – Hong Kong.

II.6.2. Preparación de ARNm y tecnología de secuenciamiento.

Cabe precisar que, previo a la secuenciación de alto rendimiento, las muestras requieren de un proceso de purificación de ARNm, cuyas metodologías están establecidas según la tecnología de secuenciamiento usada. En líneas generales, estos protocolos, parten de muestras de ARN total de alta calidad, cualificadas según electroforesis automatizada y los valores de RIN (*RNA integrity number*), a partir de las cuales se sintetiza cDNA basado en la poliadenilación de ARNm procariótico (Alberti *et al.*, 2014). Es usual que previo a la síntesis de cDNA se realice un tratamiento de remoción de ARNr (presente en más del 95% del ARN celular total) debido a sus efectos en la reducción de la cobertura útil de la transcripción, por lo que la eliminación eficaz de ARNr es fundamental para el perfil exitoso del transcriptoma (Peano *et al.*, 2013). Tanto las etapas de remoción de ARNr, purificación de ARNm, síntesis de cDNA y secuenciación masiva fueron realizados por servicio de secuenciación de *Novogene* – Hong Kong. El sistema de secuenciamiento empleado en este ensayo fue el de Illumina HiSeq3000/4000 (PE150).

II.6.3. Análisis transcriptómico

Como se describe en la Figura II.5, las lecturas crudas fueron analizadas siguiendo un flujograma de trabajo (*pipeline*) comprendido en dos etapas: Pre-procesamiento y análisis de datos, ambas llevadas a cabo en la terminal de interpretación de órdenes del software libre UBUNTU. El flujograma empleado fue diseñado siguiendo las recomendaciones de Johnson (y col., 2016) en donde además se destaca la falta de “*pipelines*” diseñados para los sets de datos provenientes de organismos procariotas.

Durante la etapa del pre-procesamiento se llevaron a cabo los procesos de análisis de calidad de datos (1), mapeo de lecturas al genoma de referencia (2), ensamblado y cuantificación de transcriptos (3); mientras que en la etapa de análisis de datos se realizaron cálculos de expresión diferencial (4) e interpretación biológica del contexto (5), todos estos descritos a continuación.

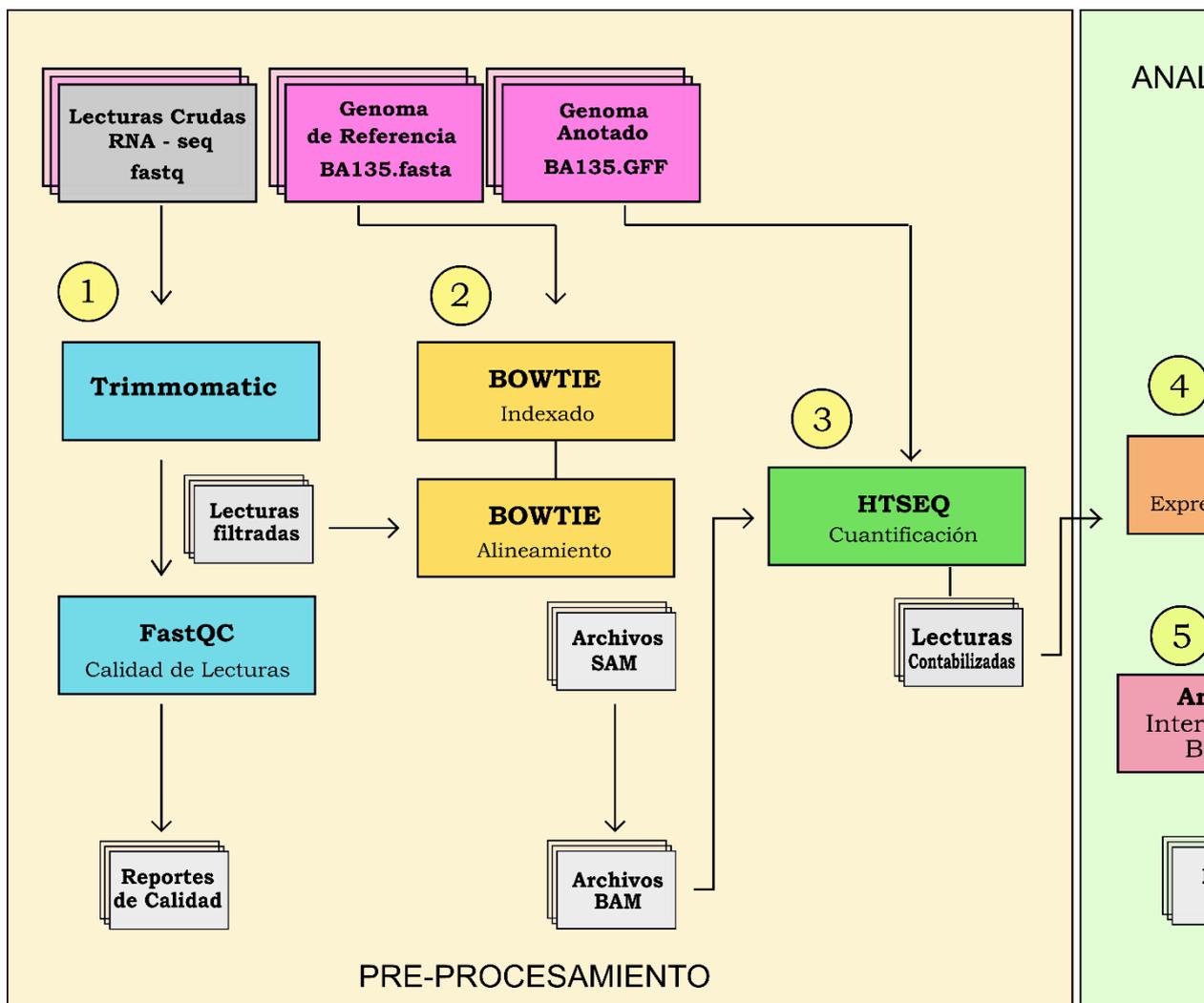


Figura II.5. Flujograma de análisis de datos del RNAseq de la cepa BA135. Las etapas 1, 2 y 3 corresponden al pre-procesamiento de los datos, las etapas 4 y 5 corresponden al análisis de expresión diferencial y análisis estadísticos.

II.6.3.1. Pre-procesamiento

Análisis de calidad de datos. Las lecturas crudas, obtenidas del servicio de secuenciación, fueron sometidas a un proceso de filtrado, a fin de asegurar la eliminación de lecturas de baja calidad, artefactos tales como las secuencias de los adaptadores u otros contaminantes, ya que la presencia de los mismos afecta los análisis subsiguientes e interpretación de los datos. En ese sentido se empleó la herramienta TRIMMOMATIC (versión 0.30) (Bolger *et al.*, 2014). Luego, a partir de estas lecturas crudas filtradas se realizaron análisis cualitativos con la herramienta FastQC (versión 0.11.8), en donde a partir de archivos tipo FastQ (.fastq) se generaron archivos de tipo HTML con los reportes de calidad de cada muestra. Estos archivos interactivos permitieron corroborar la calidad de las lecturas mediante la interpretación de la puntuación de calidad (Quality Scores)

Alineamiento. Los archivos filtrados fueron alineados con el genoma de referencia usando la herramienta BOWTIE2 (Langmead y Salzberg, 2012) a fin de ubicar la posición real de los transcritos. Se generaron archivos de salida en formato SAM (.sam) los cuales fueron transformados a uno de tipo binario BAM (.bam) para optimizar el tiempo de cómputo del análisis.

Ensamblado y cuantificación de transcriptos. Finalmente en esta etapa se procedió a la cuantificación de los transcritos usando la herramienta *htseq-count* de la librería HTseq (Anders *et al.*, 2015). Los archivos generados fueron fusionados usando la función *merge function* para realizar los análisis estadísticos correspondientes. Todas estas órdenes fueron ejecutadas en la terminal de interpretación de órdenes de UBUNTU en modo local, por lo que no se requirió el uso de servidores adicionales.

II.6.3.2. Análisis de datos

Expresión diferencial. - Luego de la cuantificación de las lecturas respecto al genoma de referencia, se realizó la normalización de la data y el análisis diferencial. La normalización resulta esencial para garantizar una inferencia precisa de la expresión génica y análisis posteriores de la misma. El ajuste y la normalización del set de datos se realizó mediante el uso de la función *lfcShrink*, y el análisis de expresión diferencial se realizó usando la función *DESeqDataSetFromMatrix* de la librería DESeq2.

Anotación e Interpretación biológica. – El proceso de anotación de los genes diferencialmente expresados se realizó de forma manual utilizando como herramientas los genomas anotados de las cepas: *Aminobacter* sp. BA135 (datos no publicados), *Aminobacter* sp. KCTC 2477 (KEGG), la plataforma KEGG (Kyoto Encyclopedia of Gene and Genomes), así como las herramientas BLAST, INTERPRO y Pfam de The European Bioinformatic Institute (EMBL-EBI).

II.7. Herramientas bioinformáticas y análisis estadísticos

II.7.1. Bases de datos

La búsqueda de secuencias por homología tanto para las del ARN 16S y los genes *housekeeping* se realizó utilizando los servidores de las bases de datos: The ribosomal database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/>) y National Center for Biotechnology Information – NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), mientras que la búsqueda de secuencias de nucleótidos tanto las mutantes de BA135 como las del transcriptoma se realizó utilizando las bases de datos Kyoto Encyclopedia of Gene and Genomes – KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>) y NCBI, así como las herramientas BLAST, INTERPRO y Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) de The European Bioinformatic Institute EMBL-EBI.

II.7.2. Alineamiento y construcción de árboles

Los alineamientos de las secuencias de nucleótidos se realizaron con la herramienta ClustalW del programa bioinformático MEGA v 7.0.26. Los árboles filogenéticos se construyeron utilizando el método de Maximum Likelihood con diferentes modelos, elegidos según los datos del alineamiento. En todos los casos el soporte de las ramas (nodos) se calculó mediante el método de *bootstrap* con 1000 réplicas.

II.7.3. Análisis estadísticos

Los datos de los ensayos referidos a la cinética de crecimiento (II.3.11) fueron utilizados para la construcción de la curva de crecimiento mediante la ecuación logística de crecimiento bacteriano, a partir de cual fue posible estimar las variables de crecimiento: tiempo de generación (g), capacidad de carga (k) y duración de la fase lag (λ). Estos cálculos se realizaron con los paquetes *Growthcurver* (Sprouffske y Wagner, 2016) y *Growthrates* (Petzoldt T., 2020). El cálculo del índice de Shannon-Weaver (H') se realizó con el paquete estadístico *veganpackages* (Oksanen J. *et al.*, 2020). Ambos cálculos se realizaron en el software estadístico R-project versión 3.4.3 (<https://www.r-project.org/>). Cuando fue requerido los datos se sometieron a análisis de varianza de una o dos vías (ANOVA) usando el software estadístico Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2008), dependiendo del diseño experimental. Los análisis Post-hoc fueron realizados, cuando fue apropiado, usando el test de comparaciones múltiples Tukey o el test de Dunnet.

CAPÍTULO III

Bacterias solubilizadoras de fosfato de los bajos
alcalinos - sódicos

III.1. Introducción

El fósforo (P) es un elemento esencial para el crecimiento de las plantas dado que forma parte de las principales moléculas orgánicas y desempeña un rol fundamental en procesos fisiológicos y metabólicos claves como la fotosíntesis y respiración celular entre otros (Wu *et al.*, 2005). Este elemento, a pesar de encontrarse en cantidades elevadas en el suelo (entre 400 y 1.200 mg kg⁻¹ de suelo), resulta limitante para la producción agrícola dado que solo una pequeña fracción de la cantidad total requerida se encuentra disponible para las plantas (Castagno *et al.*, 2021). La biodisponibilidad del P está sujeta a una combinación de procesos fisicoquímicos (adsorción/desorción y precipitación/disolución), biológicos y bioquímicos (mineralización / inmovilización) (Frossard *et al.*, 2000; Bünenman, 2015) que pueden verse alterados por las características fisicoquímicas del tipo de suelo. Por ejemplo, en los suelos alcalinos-sódicos, los niveles de pH elevados ocasionan que los iones de fosfato reaccionen con el Ca²⁺ del medio, formando diferentes compuestos de fosfato insolubles (Billah *et al.*, 2019), mientras que las altas concentraciones de salinidad disminuyen la incorporación de fósforo por la planta, debido a la reducción de los niveles de ATP necesario para la absorción de P (Fageria *et al.*, 2011). La limitación de fósforo puede afectar en mayor o menor medida a los cultivos, dependiendo de la especie y el genotipo. En el caso particular de las leguminosas, su déficit puede afectar además la disponibilidad de otro nutriente esencial como el nitrógeno (N₂) que generalmente es obtenido a través de la interacción simbiótica mutualista con rizobios, dado que dicho proceso es altamente dependiente de fósforo (Sanz-Saez *et al.*, 2017).

Frente a esta problemática, se han desarrollado algunas estrategias para el aprovechamiento de suelos limitantes, entre las cuales la implementación de herramientas biotecnológicas basadas en el uso de microorganismos rizosféricos destaca como una opción sostenible y de gran potencial, por la diversidad genética y metabólica de especies haloalcalitolerantes que pueden contribuir a incrementar al desarrollo y sanidad de las plantas (Pavankumar *et al.*, 2019). Se sabe que una gran proporción de estos microorganismos pueden ser considerados socios estratégicos de las plantas dado que mejoran la disponibilidad y absorción de nutrientes a través de mecanismos directos o indirectos, y promover así el crecimiento de las plantas.

En ese sentido, en suelos con limitaciones de fósforo, las bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF), destacan dentro de la comunidad rizosférica por su capacidad para lograr que este nutriente pueda estar disponible en el entorno de las raíces de las plantas. Entre los mecanismos referidos a la solubilización de fosfato, podemos mencionar principalmente a la producción y liberación de compuestos de disolución mineral como ácidos orgánicos, protones, iones hidroxilo y CO₂ (Gupta *et al.*, 2015).

Si bien se han identificado bacterias de distintos géneros con habilidades solubilizadoras de fosfato, solo algunas de ellas han logrado formar parte de formulaciones de biofertilizantes comerciales (Glick, 2012). No obstante, cabe resaltar que el uso de biofertilizantes basados en microorganismos no siempre produce los resultados esperados, lo que atenta muchas veces contra la credibilidad de este tipo de bioinsumo. Uno de los factores que afectan la eficiencia de los biofertilizantes comerciales es su baja competitividad frente a cepas nativas que suelen estar mejor adaptadas a las condiciones locales (Herrera-Estrella y López-Arredondo, 2016). Otro factor que incide en su baja “*performance*” es la baja supervivencia de los microorganismos una vez aplicados en el suelo, por la baja tolerancia a los factores ambientales a los que se ven expuestos. (Compant *et al.*, 2019).

Bajo ese contexto, planteamos la hipótesis de que el estudio de las poblaciones nativas de bacterias que colonizan la rizosfera de especies vegetales de interés, y puedan aportar fósforo en suelos con restricciones nutricionales como los bajos alcalino-sódicos, permitirá aportar conocimiento sobre la diversidad funcional y genética de este grupo de microorganismos en este tipo de ambientes. Asimismo, dicho estudio podría contribuir a diseñar bio-formulados que resulten más eficientes y aporten beneficios nutricionales para la promoción del crecimiento vegetal en sistemas productivos.

Como se describió en el capítulo I, la sub-región de la Pampa Deprimida del Salado es la principal zona de cría y re-cría de ganado bovino de la Argentina. Cuenta con una extensión de 9 millones de Ha. y en su mayoría está conformada por zonas propensas a inundación debido a las condiciones climáticas de la región (Taboada *et al.*, 2009). Estos campos “bajos” corresponden al 60% de su superficie y se encuentran fuertemente afectados por períodos alternantes de inundación (durante invierno y primavera) y sequía, con una evidente salinización de la superficie, durante el verano (Rubio *et al.*, 2019). Además de la alcalinidad, el exceso de sodio intercambiable limita severamente el desarrollo de pasturas (Berasategui y Barberis, 1982; Paruelo y Sala, 1990; Burkart *et al.*, 2005). Aunque tradicionalmente estuvo dedicada a la actividad ganadera, siendo su productividad altamente dependiente de la oferta forrajera, en los últimos años la expansión del sector agrícola en la región ha reducido la superficie de los suelos destinados a la ganadería, desplazándola a los ambientes más restrictivos como los bajos alcalinos-sódicos (Rearte, 2010).

Tal situación ha llevado a la búsqueda constante de estrategias para la mejora del recurso forrajero de la zona. Entre ellas, la incorporación de especies exóticas como *L. tenuis* es una de las más atractivas. Esta leguminosa de altísimo valor forrajero se ha naturalizado y adaptado exitosamente a los diferentes ambientes de la Pampa Deprimida del Salado, incluso en los suelos más restrictivos como los bajos alcalino-sódicos, demostrando gran plasticidad en términos de adaptación por encima de los

requerimientos edáficos (León *et al.*, 1984). Esa plasticidad es lo que la destaca entre otras leguminosas como especie clave para ser usada en estos ambientes, como estrategia para incrementar el contenido proteico del recurso forrajero en los bajos alcalinos-sódicos de esta región (Dear *et al.*, 2003). Sin embargo, su incorporación a estos ambientes a través de la siembra de cultivares comerciales está todavía lejos de ser óptima, debido a las limitaciones nutricionales a los que se ve expuesta y que afectan su crecimiento a nivel productivo.

En ese sentido, y como primer objetivo de este trabajo de tesis se realizó un estudio de prospección de bacterias solubilizadoras de fosfato de la rizosfera de *L. tenuis* naturalizada en los bajos alcalino-sódicos, con el fin de contribuir en la mejora del recurso forrajero y subsecuentemente la productividad ganadera.

En este capítulo, se describen los resultados obtenidos en relación al objetivo general 1 (y sus objetivos particulares), enfocado en el aislamiento y caracterización genética de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) nativas de la rizosfera de poblaciones naturalizadas de *L. tenuis*, mejor adaptadas a los ambientes alcalino-sódicos de la Pampa Deprimida del Salado. Asimismo, se detalla el efecto de cepas seleccionadas sobre la promoción y adquisición de nutrientes en *L. tenuis* en suelos alcalino-sódicos provenientes de la Pampa Deprimida del Salado. Cabe mencionar que para evaluar el efecto promotor de cada una de las bacterias seleccionadas, se decidió elaborar un consorcio que contuviera, además, una cepa de rizobio capaz de establecer una simbiosis mutualista fijadora de nitrógeno con *L. tenuis*. La evaluación de este consorcio se basó en el conocimiento previo de las prácticas de manejo habitual de esta leguminosa cuando se siembra en el campo, que incluyen la aplicación de un rizobio fijador de nitrógeno sobre la semilla, en el momento previo a la siembra o en semillas tratadas previamente con estos rizobios (semilla pre-inoculada). Basándonos en la existencia de este tipo de manejo y considerando las características del suelo de evaluación, se utilizó una cepa nativa de rizobio (*Mesorhizobium sanjuanii* BSA136, caracterizada previamente por el grupo de trabajo del laboratorio), para formular el consorcio.

III.2. Aislamiento y caracterización de bacterias solubilizadoras de fosfato

Los resultados descritos en este capítulo se obtuvieron con aislamientos de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) asociadas a la rizosfera de plantas de *L. tenuis*, colectadas de 2 lugares de la Pampa Deprimida del Salado: Manantiales (35°44'36.319"S - 58°3' 25.307"W) y Punta Indio (35°16' 15.449" S - 57°14' 52.101" W) durante el mes de junio del 2015. La tabla II.2 describe las propiedades fisicoquímicas de muestras de suelos representativas de las zonas de colecta de los aislamientos. Según las variables calculadas, estos suelos se caracterizan principalmente por su alcalinidad ($\text{pH} > 8.5$) y alto porcentaje de sodio intercambiable ($\text{PSI} > 15$), lo que permite clasificarlos dentro de la definición de suelos afectados por sal, de tipo alcalino-sódicos (Rengasamy, 2010). Otra variable a destacar es el bajo contenido de nutrientes, particularmente el contenido de fósforo total (< 10 ppm). Todas estas características reflejan las condiciones restrictivas de los suelos en los lugares de colecta.

La capacidad de solubilizar fosfato de cada aislamiento fue determinada por la formación de un halo translúcido alrededor de la colonia o el eje de siembra, producto de la solubilización del fosfato inorgánico insoluble (Ca_3PO_2) que compone el medio NBRIP (Figura III.1). Según este fenotipo, se aislaron 310 bacterias de la rizosfera de *Lotus tenuis*, las cuales se conservaron posteriormente a -80°C en glicerol 30% v/v. Estos aislamientos en la actualidad forman parte de la colección de BSF asociadas a *L. tenuis* en bajos alcalinos-sódicos, que se encuentra en el Laboratorio de Microbiología del Suelo del Instituto Tecnológico de Chascomús (INTECH)



Figura III.1.- Ensayo de actividad solubilizadora de fosfato inorgánico de las bacterias aisladas de la rizosfera de *Lotus tenuis*. La solubilización de fosfato se manifiesta mediante la formación de halos translúcidos alrededor de las colonias bacterianas, como consecuencia de la solubilización del fósforo insoluble (Ca_3PO_2) del medio NBRIP (Indicada con el círculo blanco).

Acorde con el objetivo de aislar bacterias que fueran capaces de solubilizar fosfato bajo condiciones de alcalinidad y salinidad, se repitió el test de solubilización con la totalidad de las BSF aisladas (310), pero esta vez en condiciones de estrés mixto alcalino-salino. Del total de los aislamientos, 299 (96.45%) formaron un halo translúcido, es decir mostraron actividad solubilizadora, mientras que una proporción minoritaria de 11 (3.55%) no desarrolló halo, revelando una incapacidad para solubilizar fosfato en las condiciones alcalino-salinas testeadas (Figura III.2). En base a esta primera evaluación, los 299 aislamientos que solubilizaron fosfato en las condiciones evaluadas, se clasificaron cualitativamente en 3 grupos: Bacterias solubilizadoras de fosfato de rango estrecho (pH 7.0 – 8.0 + NaCl), rango intermedio (pH 7.0 – 9.0 + NaCl) y rango amplio (pH 7.0 – 10.0 + NaCl), llamadas de aquí en adelante como BSFRE, BSFRI y BSFRA respectivamente. De este modo, 35 aislamientos (11.70%) fueron clasificados como BSFRE, 190 (63.55%) como BSFRI y 74 (24.75%) como BSFRA (Tabla III.1). Teniendo en cuenta que las variaciones de pH son una característica importante de los suelos de la Pampa Deprimida (Perelman *et al.*, 2007), se seleccionó el grupo de aislamientos con la mayor plasticidad para solubilizar fosfato (BSFRA) para los estudios subsiguientes (Tabla III.1)

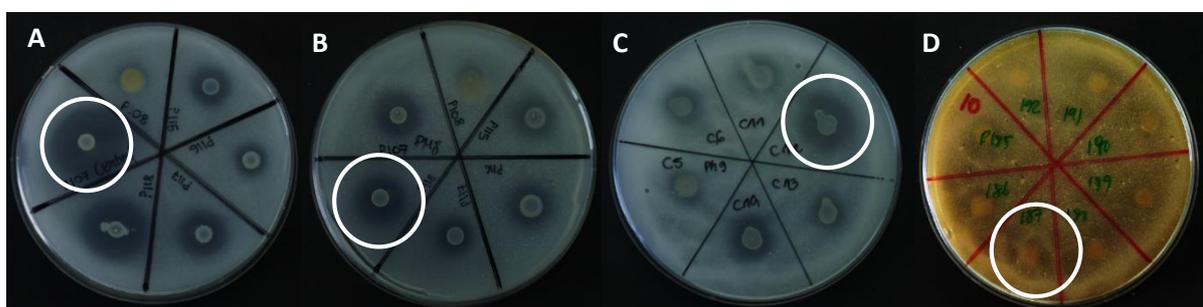


Figura III.2.- Ensayo de solubilización de fosfato en condiciones de estrés mixto en medio selectivo NBRIP ajustado a 200mM NaCl y pH 8, 9 o 10 usando una solución de Na_2CO_3 a 1M. A: Control (pH 7.0), B: pH 8.0 + 200mM NaCl, C: pH 9.0 + 200mM NaCl, D: pH 10.0 + 200mM NaCl. Los círculos blancos señalan los halos de solubilización obtenidos con algunos aislamientos

Tabla III.1.- Clasificación de las BSF según su habilidad de solubilización de fosfato bajo condiciones alcalino-salinas

Lugar	BSFRE (pH 7 - 8 + NaCl)	BSFRI (pH 7 - 9 + NaCl)	BSFRA (pH 7 - 10 + NaCl)	Total
Manantiales	13	94	30	137
Punta Indio	22	96	44	162
	35	190	74	299

BSFRE, Bacterias que solubilizan fosfato en un rango estrecho; **BSFRI**, bacterias que solubilizan fosfato en un rango intermedio; **BSFRA**, bacterias que solubilizan fosfato en un rango amplio.

III.3. Diversidad genética y taxonómica del grupo BSFRA

Una vez seleccionado el grupo de análisis (BSFRA), se evaluó la diversidad genética de los 74 aislamientos mediante al análisis de huellas digitales del ADN genómico. En este caso, en base a la experiencia previa de nuestro grupo en tipificación bacteriana, se empleó el cebador BOX A1R (Castagno *et al.*, 2011). El análisis de los perfiles genéticos se realizó empleando el algoritmo UPGMA y el coeficiente de Pearson al 2% de tolerancia. Tomando como valor de corte un 75% de similitud, los aislamientos se clasificaron en 36 grupos BOX diferentes (numerados del I al XXXVI), 21 de ellos formados por un único aislamiento y los 15 restantes formados por 2 a 8 aislamientos, con valores de similitud mayores al 76% y en su mayoría con el mismo origen de procedencia, a excepción de los grupos I y IV que estaban formados por aislamientos procedentes de las dos localidades donde se realizaron los muestreos (Figura III.3).

Para estimar la diversidad taxonómica del grupo de BSFRA, se amplificó y analizó la secuencia del ARNr 16S de una cepa representativa elegida al azar de cada grupo BOX (Tabla III.3). Las secuencias de las 36 cepas fueron comparadas con secuencias de referencia provenientes de las bases de datos de RDP (Ribosomal Database Project) y NCBI (Anexo III.7.1 y III.7.2). Este análisis reveló que la mayoría de las cepas BSFRA (33) estaban relacionadas con diferentes taxones del orden *Enterobacteriales* (Figura III.4), mientras que las 3 restantes se relacionaron con miembros de la familia *Pseudomonadaceae*, específicamente con el género *Pseudomonas* (Figura III.5). Para cada una de estas familias se construyó un árbol filogenético comparando las secuencias del ARNr 16S de las cepas seleccionadas con las de cepas de referencia de los taxones más relacionados.

En el análisis del gen ARNr 16S de las cepas relacionadas con el orden *Enterobacteriales*, la mayoría de las ramas generadas mostraron valores bajos de *bootstrap*, evidenciando el limitado poder resolutivo de este marcador para ciertos géneros. Cinco cepas se agruparon con *Pantoea eucalypti*, mientras que otras 4 -con un soporte débil de bootstrap- se agruparon con otras especies del género *Pantoea* (excepto *P. cypredii*). Ocho cepas se agruparon con *Enterobacter ludwigii*, mientras que otras 3 se agruparon con miembros del género *Enterobacter* (excepto *E. coli*) y *Leclersia adecarboxylata*. De forma similar, un soporte débil de bootstrap fue observado con 4 cepas que se agruparon con *Hafnia alvaei*, que a su vez se encuentra incluida en un cluster que tentativamente puede contener a otros 5 aislamientos, así como a miembros de otros varios géneros. La cepa MB48, no mostró una relación clara con los otros géneros evaluados, mientras que MB18 parece estar relacionada con *Yokenella regenseburgei*. La cepa P49 agrupó con algunos miembros del género *Kosakonia*, mientras P50 agrupó con miembros del género *Erwinia*. Por otro lado, las cepas restantes P195, P198 y P215 se agruparon con *Pseudomonas chlororaphis*, que pertenece al complejo

Pseudomonas fluorescens, de acuerdo a la clasificación propuesta por Garrido-Sanz y col. (2017) y Peix y col. (2018) (Tabla III.3). Los diferentes de géneros hallados y la agrupación de varios de ellos en más de un *cluster* reflejan la complejidad filogenética que caracteriza a esta familia de bacterias Gram-negativas (Figura III.4, III.5). La información detallada para cada cepa se describe en la Tabla III.3.

Llamativamente, los resultados obtenidos mostraron un grado limitado de variación taxonómica entre las 74 cepas pertenecientes al grupo BSFRA. A pesar de que muchos estudios sugieren que la habilidad para solubilizar fosfato no es exclusiva de un grupo acotado de taxones bacterianos, sino que, por el contrario, está extendida a varios *Phyla* (Zheng *et al.*, 2017), nuestro análisis filogenético del gen ARNr 16S mostró que la población de bacterias del grupo BSFRA está compuesta exclusivamente por miembros del *Phylum Proteobacteria*. En primer instancia se debe considerar el sesgo inevitable que genera el protocolo de aislamiento principalmente por el medio de cultivo empleado, por otra parte ciertamente ya que el *Phylum Proteobacteria* es uno de los más abundantes en ambientes rizosféricos (García Salamanca *et al.*, 2013; Zgadzaj *et al.*, 2016), no debe descartarse la posibilidad de que el estrecho rango de categorías taxonómicas aquí encontrados para el grupo de BSFRA pueda deberse, al menos parcialmente, a la abundancia -generalmente alta- de proteobacterias en la rizosfera.

Por otro lado, se debe considerar también la posibilidad de la existencia de algún patrón de selección asociado a las características fisicoquímicas particulares de los suelos alcalino-sódicos. Recientemente se ha encontrado que factores ambientales como el pH y la salinidad, tienen injerencia en la composición de la comunidad bacteriana en los suelos, cumpliendo un rol selectivo de las poblaciones más adaptadas a dichos factores (Rath *et al.*, 2018). En el área de la rizosfera, estos factores se suman a los propios del genotipo de la planta, haciendo de la rizósfera un ambiente naturalmente selectivo (Marshner *et al.*, 2001).

El análisis de las secuencias del ARNr 16S, reveló que las cepas BSFRA pertenecen al orden *Enterobacteriales* y a la familia *Pseudomonadaceae*, siendo las enterobacterias las más abundantes. Las cepas de este grupo están relacionadas con los géneros *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Enterobacter*, *Yersinia*, *Yokenella*, *Kosakonia*, *Erwinia* y *Hafnia*. Todos ellos reportados previamente en asociación con diferentes especies vegetales y algunos particularmente destacados por su capacidad para solubilizar fosfato y promover el crecimiento vegetal, como es el caso de los géneros *Pseudomonas*, *Pantoea* y *Enterobacter* (Kämpfer, 2002). No obstante, es esperable que, con el tiempo, incremente el número de géneros con estas características ya que se debe tener en cuenta la creciente incorporación de géneros nuevos, así como la constante re-clasificación que sufren los miembros del orden *Enterobacteriales* (Adeolu *et al.*, 2016).

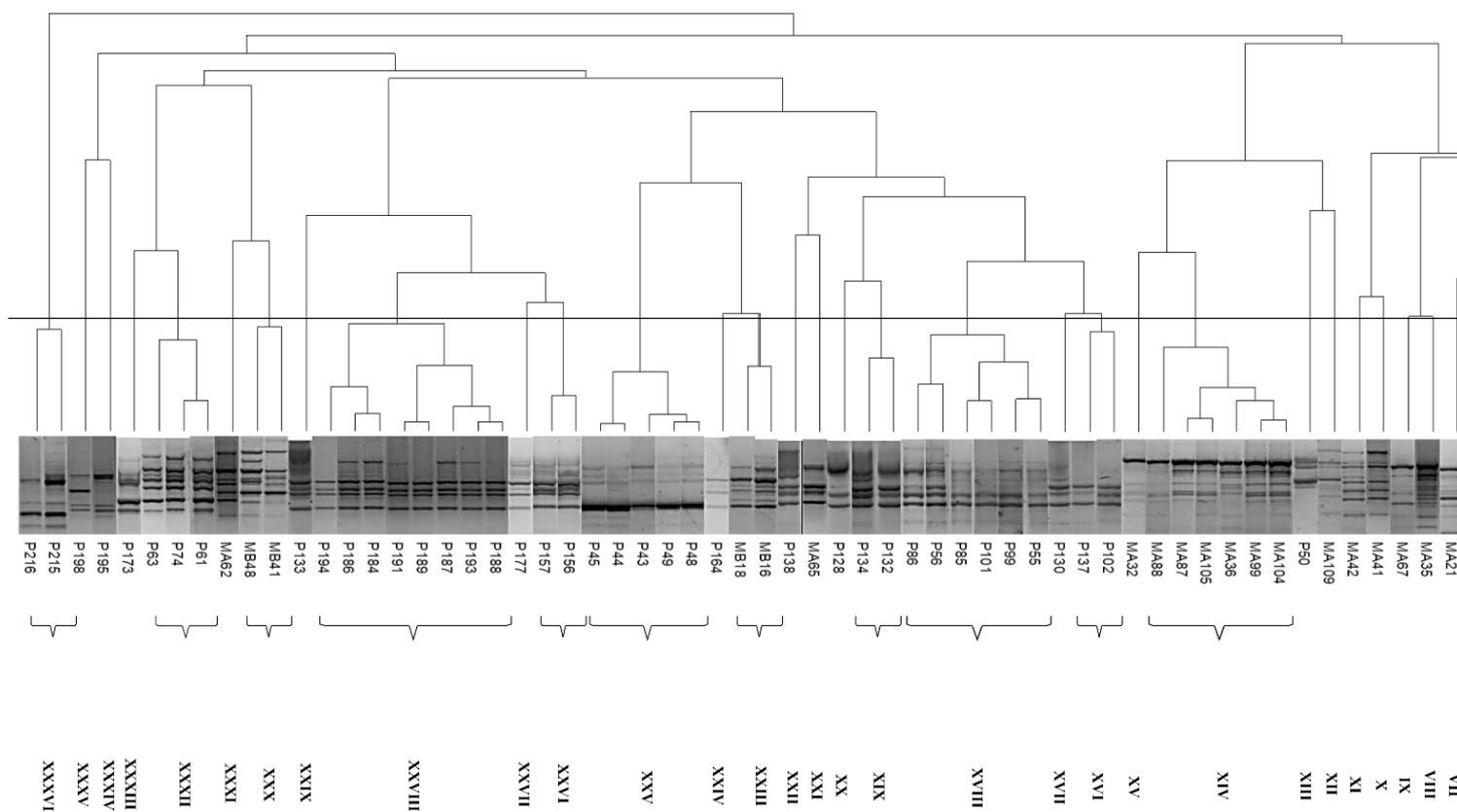


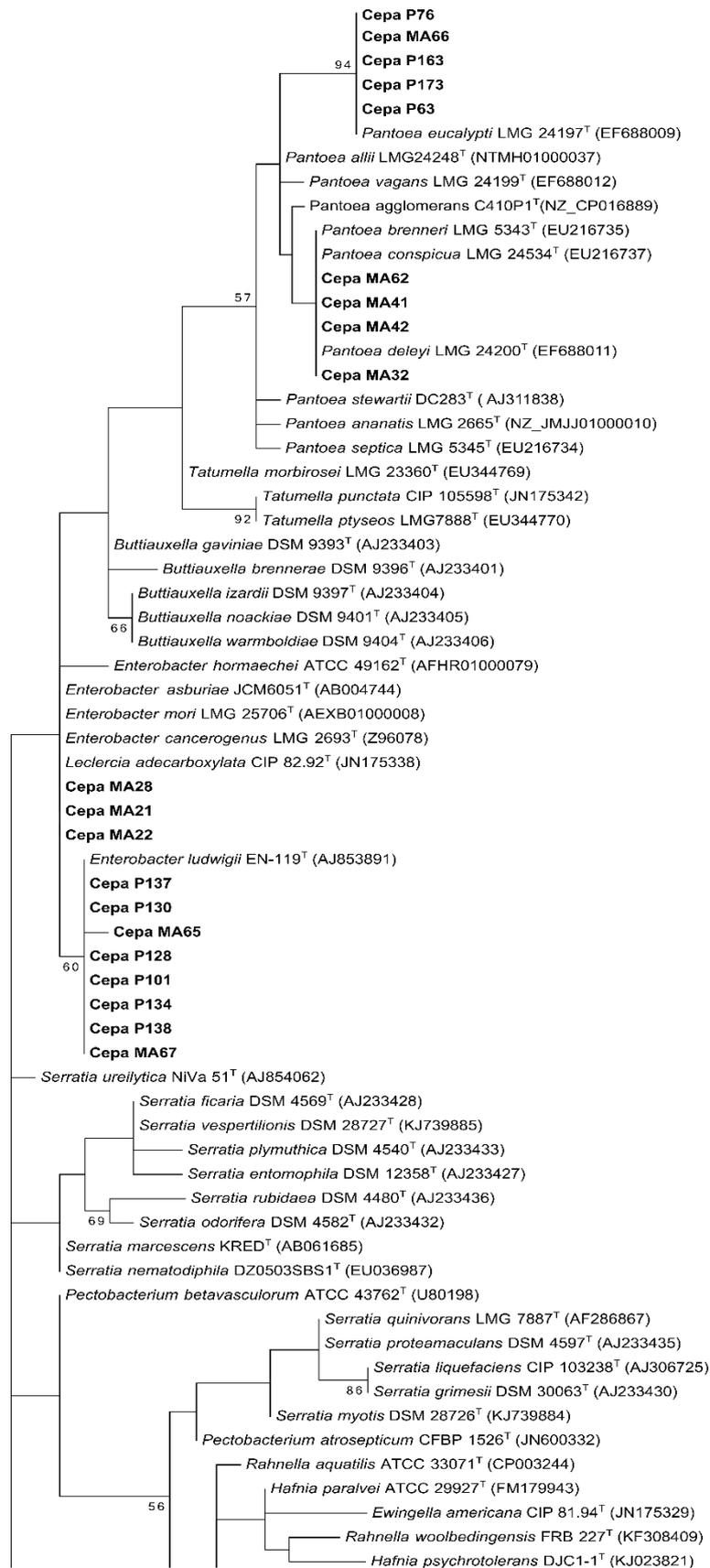
Figura III.3.- Árbol de similitud UPGMA de los patrones BOX-PCR de las bacterias que solubilizan fosfato en un rango amplio de salinidades (BSFRA), aisladas de la rizosfera de plantas de *Lotus tenuis* en suelos alcalinos-sódicos. Las huellas genómicas de ADN de las bacterias se amplificaron mediante PCR con el cebador BOX-A1R. La similitud entre los aislamientos se calculó mediante el algoritmo UPGMA y el coeficiente de similitud. Los aislamientos se agruparon en 36 clados (I a XXXVI), que se definieron con una línea de corte del 75% de similitud.

Un ejemplo es el género *Kosakonia*, que aún no ha sido profundamente caracterizado y que recientemente ha sido re-clasificado a partir del género *Enterobacter* (Brady *et al.*, 2013). Sin embargo, aún así en un estudio reciente se ha demostrado su habilidad solubilizadora de fosfato bajo condiciones de estrés osmótico (Cruz-barrera *et al.*, 2020).

Descripciones similares de actividad solubilizadora de los géneros *Enterobacter*, *Pseudomonas* y *Serratia* en condiciones salinas y su efecto en plantas como maíz o *Medicago trunculata* han sido reportadas (Mukhtar *et al.*, 2019; Kushwaha *et al.*, 2020, Ben Zineb *et al.*, 2019). Asimismo, otros estudios describen la actividad solubilizadora de fosfato de algunas cepas del género *Yokenella* en asociación con *Butia purpurascens* y té comercial (da Silva *et al.*, 2018, Dutta y Thakur, 2017). Especies de los géneros *Hafnia* y *Erwinia*, han sido utilizados para estudiar los mecanismos de solubilización de fosfato. La especie *Hafnia alvei*, productora de la enzima fitasa, ha servido de organismo modelo para su caracterización y modelado estructural, mientras que a partir de *Erwinia herbicola* se clonó el primer gen involucrado en la solubilización de fosfato mineral (Ariza *et al.*, 2013, Goldstein y Liu, 1987). Por el lado de la familia *Pseudomonadaceae*, son igual de abundantes los reportes de cepas del género *Pseudomonas* con habilidad para solubilizar fosfatos. (Kämpfer, 2002, Rathinasabapathi *et al.*, 2018, Naik *et al.*, 2008). Si bien, entre las especies descritas, *P. chlororaphis* no se encuentra entre las más destacadas por su habilidad solubilizadora, sí lo está por presentar otras actividades PGPR como la producción de metabolitos secundarios (Anderson y Kim, 2020; Jain y Pandey, 2016; Shahid *et al.*, 2017).

Algunos rizobios del grupo de las alphaproteobacterias, también han mostrado capacidad para solubilizar fosfato (Abdalla *et al.*, 1994; Rosas *et al.*, 2006; Peix *et al.*, 2001). No obstante, a pesar de la abundancia de rizobios en la rizosfera de leguminosas (Hartmann *et al.*, 2017), no logramos detectar bacterias pertenecientes a géneros comunmente asociados a rizobios dentro del grupo de BSFAR. Cabe resaltar que la caracterización de rizobios asociados a *L. tenuis* aislados en un estudio anterior realizado por nuestro grupo (Estrella *et al.*, 2009), reveló que dichos simbioses poseen una baja o nula actividad para solubilizar fosfato (datos no publicados). En ese sentido, los resultados hallados acrecientan la importancia de buscar bacterias solubilizadoras de fosfato que puedan utilizarse conjuntamente con los rizobios simbioses de *L. tenuis* y, de este modo, aprovechar el beneficio potencial de ambos tipos de microorganismos para el crecimiento y nutrición de esta leguminosa.

Como se sabe, la rizosfera es fuente de microorganismos que juegan un papel importante en la salud y productividad de las especies vegetales naturales (Berg *et al.*, 2014). La mayoría de ellos actúan sinérgicamente promoviendo el crecimiento y desarrollo de plantas a través de diferentes mecanismos detalladamente descritos (Kumar, 2016; Glick, 2015).



continúa

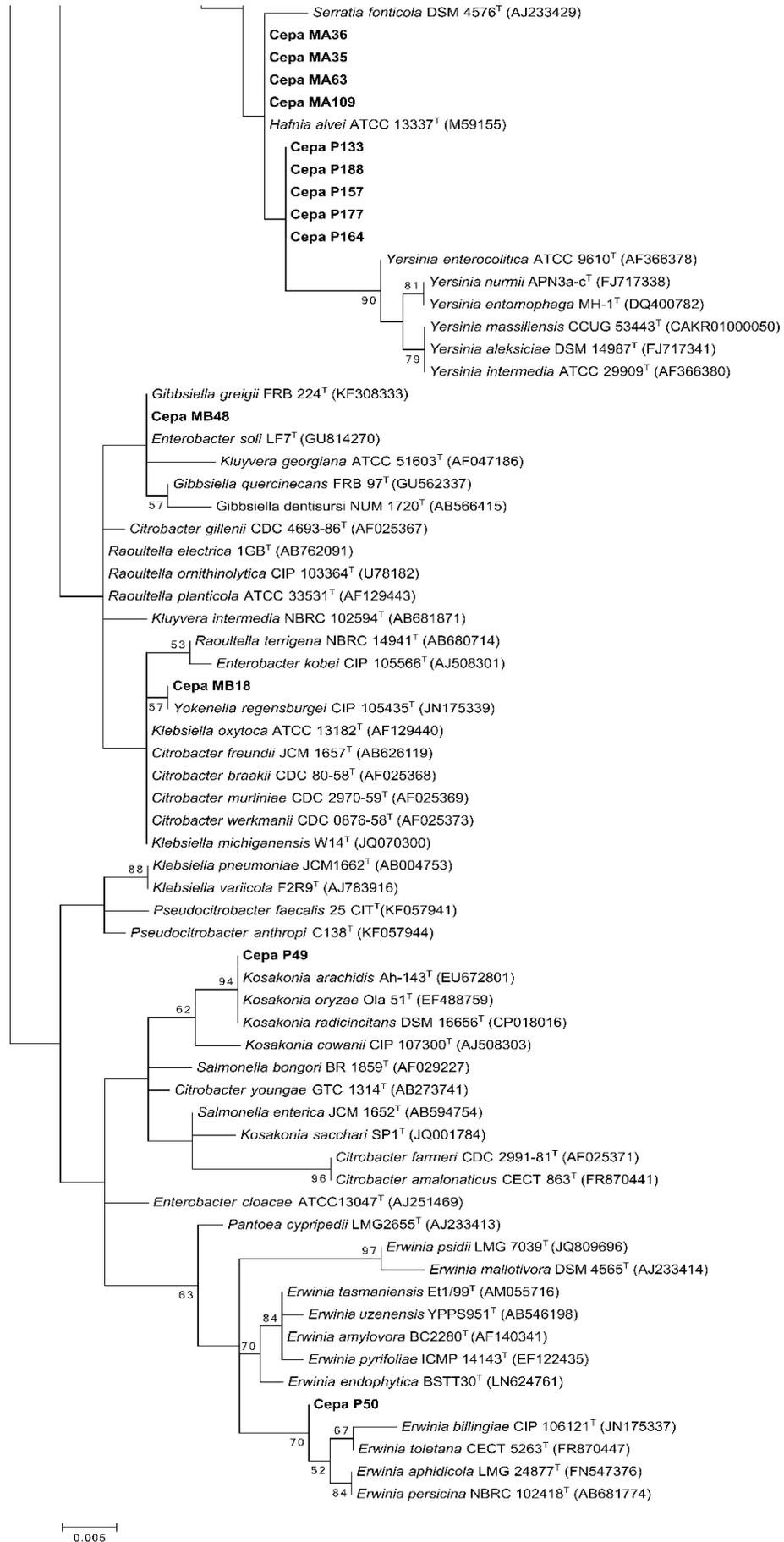


Figura III.4.- Árbol filogenético de máxima verosimilitud (*Maximum-likelihood*) que muestra la posición filogenética de las cepas del orden *Enterobacteriales* del grupo de solubilizadoras de fosfato de rango amplio de pH (BSFRA). El árbol fue construido en base a las secuencias parciales del gen ARNr 16S (890 nucleótidos) usando los modelos de Kimura 2 y de distribución gamma (G+I). Los números indican los resultados del análisis de bootstrap realizado para 1000 réplicas y se indican en los nodos (valores de bootstrap menores a 50% no se muestran en la figura). Los números de acceso de las secuencias utilizadas se muestran entre paréntesis (ver Anexo III.7.1, III.7.2 y III.7.3)

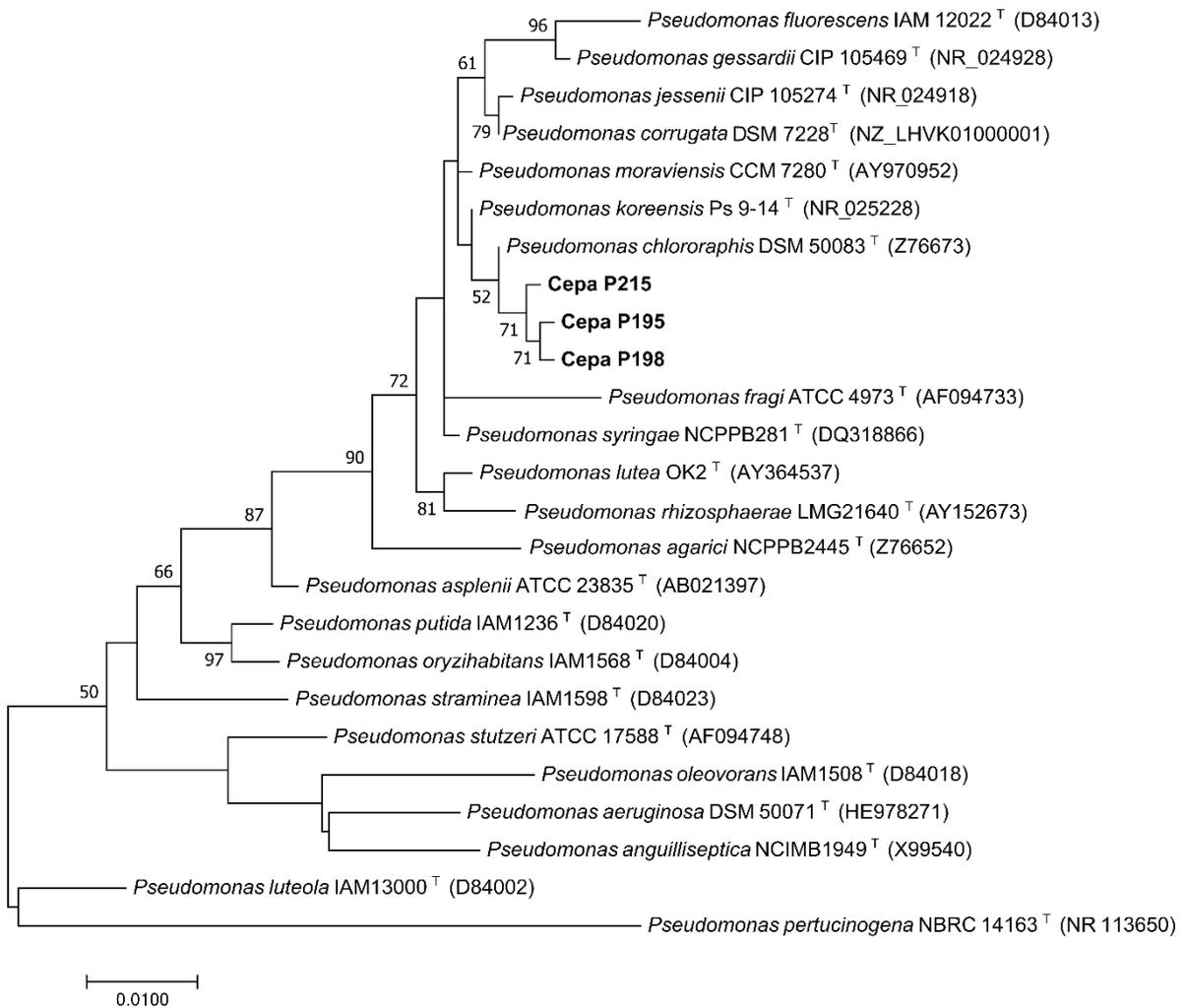


Figura III.5.- Árbol filogenético de máxima verosimilitud (*Maximum-likelihood*), que muestra la posición filogenética de las cepas de la familia *Pseudomonadaceae* del grupo de solubilizadoras de fosfato de rango amplio (BSFRA). El árbol fue construido en base a las secuencias parciales del gen ARNr 16S (951 nucleótidos) usando los modelos de Kimura 2 y de distribución gamma (G+I). Los números indican los resultados del análisis de bootstrap realizado para 1000 réplicas y se indican en los nodos (valores de bootstrap menores a 50% no se muestran en la figura). Los números de acceso de las secuencias utilizadas se muestran entre paréntesis (ver anexo III.7.1 y III.7.2)

No obstante, cabe resaltar que el uso de microorganismos rizosféricos no siempre es una solución “libre de riesgos”, dado que, a pesar de sus actividades promisorias para el crecimiento vegetal, algunos están relacionados taxonómicamente con cepas patógenas, lo que potencialmente podría significar un riesgo para la salud humana y ambiental. Es por ello que la identificación taxonómica de precisión y posterior selección de “microorganismos seguros”, debe ser un criterio a seguir y a tener en cuenta cuando se estudian bacterias que puedan ser de interés para formular bioinoculantes (Ferreira *et al.*, 2019).

Entre los géneros bacterianos identificados en el grupo de BSFRA, se observó una clara dominancia de los géneros *Enterobacter* y *Pantoea* (Tablas III.3, Figura III.4). No obstante, teniendo en cuenta el criterio de “microorganismos seguros”, cabe mencionar que, entre los géneros hallados, el género *Pantoea* se destaca por estar compuesto en su mayoría por especies consideradas biológicamente seguras, con 23 de 27 especies clasificadas dentro del grupo de riesgo I (agentes biológicos que no causan enfermedades en humanos, de la guía TRBA-466 del *Committee on biological agents* del 2015), en contraste con géneros como *Enterobacter* que tiene a 8 de 18 especies clasificadas en el Grupo de riesgo II (agentes biológicos que pueden causar una enfermedad en un individuo).

El género *Pantoea* comprende a un conjunto de especies muy versátiles, aisladas de múltiples ambientes con una diversidad de características interesantes como la producción de compuestos antimicrobianos o habilidades bio-remediadoras (Walterson y Stavrinides, 2015). Estudios recientes ejemplifican las habilidades multi-PGPR de las cepas de este género, tales como las cepas *Pantoea* A17 y A81 aisladas de la rizósfera de *Triticum aestivum* L., capaces de solubilizar fosfato, producir sideróforos y antibióticos, además de adecuarse naturalmente a estreses ambientales ocasionados por temperatura, sal y pH (Rfaki *et al.*, 2020); o la cepa *Pantoea ananatis* D1, que además de solubilizar fosfato, producir sideróforos, AIA y ACC-deaminasa en condiciones *in vitro*, también incrementa significativamente el crecimiento de raíz y vástago de arroz tanto en condiciones normales como salinas (Lu *et al.*, 2021). Específicamente dentro de este grupo, la especie *P. eucalypti* se destaca por su capacidad de solubilizar fosfato y habilidad para adaptarse/colonizar ambientes adversos, en asociación con leguminosas (Campestre *et al.*, 2016; Castagno *et al.*, 2011, Son *et al.*, 2006). Estudios previos realizados por nuestro grupo revelaron que un aislamiento de esta especie, además de solubilizar fosfato *in vitro*, mostró un buen desempeño como promotor del crecimiento de *L. tenuis* en suelos Natracuol (pH 6.7) (Castagno *et al.*, 2014). Estos antecedentes promisorios, sumados al hallazgo de varios aislamientos del grupo de BSFRA relacionados con *P. eucalypti* (Figura III.4; Tabla III.3), sugieren una potencial buena adaptación de los miembros de esta especie a la rizosfera

de *L. tenuis*. Estas evidencias alentaron a profundizar los estudios con los aislamientos relacionados (según la secuencia del ARNr 16S) con la especie *P. eucalypti*: MA66, P76, P63, P163 y P173.

La identificación de bacterias en base al análisis del ARNr 16S es indiscutiblemente la herramienta más extendida para análisis evolutivos en bacterias cultivables y no cultivables. Su uso como marcador filogenético universal se debe principalmente a que se encuentra de forma ubicua en bacterias y arqueas, siendo funcionalmente indispensable para la síntesis de proteínas. No obstante, este gen también contiene un amplio espectro de variación de secuencia, por lo que su poder resolutivo en la asignación taxonómica puede verse limitado principalmente a nivel de especie (Glaeser y Kämpfer, 2015). En estos casos el procedimiento habitual consiste en el empleo de estrategias complementarias, tales como el análisis de secuencias parciales de genes codificantes de proteínas con valor taxonómico (genes *housekeeping*) los cuales, a diferencia del ARNr 16S, evolucionan a un ritmo lento pero constante y tienen mejor poder resolutivo, especialmente a nivel de género o incluso por debajo (Glaeser y Kämpfer, 2015).

De este modo, se complementó la identificación taxonómica de las cepas del género *Pantoea* mediante el análisis de los genes *rpoB* y *gyrB*, en base a que previamente se ha descrito que ambos marcadores tienen una buena capacidad resolutiva para las especies de este género (Jiang *et al.*, 2019; Gutiérrez-Barranquero *et al.*, 2019). Tanto los árboles filogenéticos construidos individualmente con las secuencias de cada marcador filogenético (Anexos III.7.5 y III.7.6), como con las secuencias concatenadas de los distintos genes (Figura III.6) resultaron consistentes con los resultados inferidos del análisis del ARNr 16S (Figura III.4). Asimismo, la alta similitud de secuencias encontrada entre las cepas seleccionadas y la cepa de referencia *P. eucalypti* LMG 24197^T, tanto para el ARNr 16S como para los genes *gyrB* y *rpoB*, (Tabla III.2), apoyaron la asignación taxonómica de estos aislamientos a la especie *Pantoea eucalypti*.

Tabla III.2.- Comparación de secuencias entre las cepas selectas aisladas de la rizosfera de *L. tenuis* y la cepa tipo de *Pantoea eucalypti*.

Cepa	Similitud de secuencias con <i>P. eucalypti</i> LMG24197 ^T (%)			
	ARNr 16S	<i>rpoB</i>	<i>gyrB</i>	MLSA
MA66	98.96	99.50	99.43	99.46
P76	98.40	100.00	99.43	99.85
P63	98.86	100.00	99.71	99.69
P163	99.33	99.67	99.14	99.59
P173	99.54	99.67	99.14	99.39
M91	99.55	99.67	99.14	99.44



Figura III.6.- Árbol filogenético de máxima verosimilitud (Maximum-likelihood) basado en la concatenación de las secuencias de los genes ARNr 16S, *gyrB*, *rpoB* (1271 nucleótidos), mostrando la posición de las cepas P76, MA66, P63, P163, P173 y M91 (en negrita) dentro del género *Pantoea*. El árbol fue construido usando el modelo Tamura 3 y de distribución gamma (G+I). Los valores de Bootstrap calculados para 1000 réplicas se indican en los nodos (valores de bootstrap menores a 50% no se muestran en la figura). Los números de acceso de las secuencias de referencia se detallan en Anexo III.7.2.

Tabla III.3 Características genotípicas y taxonómicas de las bacterias que solubilizan fosfato en un amplio rango de condiciones alcalinas

Cepas	Sitio de colecta	Grupo Box	n	Orden / Familia	
P163 P84 MA113	P - P - M	I	3	<i>Enterobacteriales</i>	
MA22	M	II	1	<i>Enterobacteriales</i>	
MA111 MA28	M	III	2	<i>Enterobacteriales</i>	
MB21 P75 P76	M - P - P	IV	3	<i>Enterobacteriales</i>	
MA58 MA59 MA53 MA56 MA63	M	V	5	<i>Enterobacteriales</i>	
MA66	M	VI	1	<i>Enterobacteriales</i>	
MA21	M	VII	1	<i>Enterobacteriales</i>	
MA35	M	VIII	1	<i>Enterobacteriales</i>	
MA67	M	IX	1	<i>Enterobacteriales</i>	
MA41	M	X	1	<i>Enterobacteriales</i>	Gen
MA42	M	XI	1	<i>Enterobacteriales</i>	Gen
MA109	M	XII	1	<i>Enterobacteriales</i>	
P50	P	XIII	1	<i>Enterobacteriales</i>	
MA104 MA99 MA36 MA105 MA87 MA88	M	XIV	6	<i>Enterobacteriales</i>	
MA32	M	XV	1	<i>Enterobacteriales</i>	Gen
P102 P137	P	XVI	2	<i>Enterobacteriales</i>	
P130	P	XVII	1	<i>Enterobacteriales</i>	
P55 P99 P101 P85 P56 P86	P	XVIII	6	<i>Enterobacteriales</i>	
P132 P134	P	XIX	2	<i>Enterobacteriales</i>	
P128	P	XX	1	<i>Enterobacteriales</i>	
MA65	M	XXI	1	<i>Enterobacteriales</i>	
P138	P	XXII	1	<i>Enterobacteriales</i>	
MB16 MB18	M	XXIII	2	<i>Enterobacteriales</i>	
P164	P	XXIV	1	<i>Enterobacteriales</i>	
P48 P49 P43 P44 P45	P	XXV	5	<i>Enterobacteriales</i>	Kosakov
P156 P157	P	XXVI	2	<i>Enterobacteriales</i>	
P177	P	XXVII	1	<i>Enterobacteriales</i>	
P188 P193 P187 P189 P191 P184 P186 P194	P	XXVIII	8	<i>Enterobacteriales</i>	
P133	P	XXIX	1	<i>Enterobacteriales</i>	
MB41 MB48	M	XXX	2	<i>Enterobacteriales</i>	
MA62	M	XXXI	1	<i>Enterobacteriales</i>	Gen
P61 P74 P63	P	XXXII	3	<i>Enterobacteriales</i>	
P173	P	XXXIII	1	<i>Enterobacteriales</i>	
P195	P	XXXIV	1	<i>Pseudomonadaceae</i>	
P198	P	XXXV	1	<i>Pseudomonadaceae</i>	
P215 P216	P	XXXVI	2	<i>Pseudomonadaceae</i>	

Los aislamientos marcados en negrita se seleccionaron para ser identificados por análisis del ARNr 16S. Los números de acceso se detallan en el Anexo Punta Indio y M, Manantiales. El número de aislamientos para cada clado se indica con la letra n.

III.4. Propiedades *in vitro* de las cepas *P. eucalypti* seleccionadas

Con el objetivo de explorar las potenciales habilidades promotoras de las cepas identificadas como *P. eucalypti*, se realizaron 3 ensayos descriptivos *in vitro*: cuantificación de fósforo soluble, producción de ácido indol acético (AIA) y producción de sideróforos. Cabe resaltar que, debido a lo mencionado anteriormente y con fines comparativos, se incluyó a la cepa de *P. eucalypti* M91 (Castagno *et al.*, 2011).

Se estimó nuevamente la capacidad solubilizadora de fosfato de las cepas seleccionadas según el índice de solubilización de fosfato (ISF). Todos los aislamientos mostraron la capacidad de solubilizar fosfato, tanto en el medio de cultivo control como en el medio modificado con condiciones alcalino-salinas (Tabla III.4). A pesar de que no se evidenciaron diferencias significativas entre los valores de ISF entre cepas, sí se observaron valores mayores en la condición problema pH 8.0 + 200mM NaCl. Adicionalmente, se realizó un ensayo de cuantificación de fosfato soluble en medio líquido NBRIP en condiciones normales y restrictivas a distintos tiempos de incubación (Figura III.7). Se detectó relación entre las cepas, la condición de crecimiento y el tiempo de incubación, indicando un efecto combinado de estos tres factores en la determinación de la capacidad solubilizadora de fosfato. Si bien encontramos que a tiempos de incubación tempranos, la cantidad de fósforo solubilizado tiende a ser pequeña bajo condiciones alcalino-salinas, con el avance del tiempo encontramos un incremento de la cantidad de P solubilizado en el medio para todas las condiciones ensayadas, sugiriendo un comportamiento de solubilización de P dependiente del tiempo. Debe notarse que, como consecuencia del crecimiento bacteriano, las condiciones del medio pueden cambiar durante la incubación. En ese aspecto, cabe mencionar que las diferencias iniciales de pH tienden a desaparecer conforme el tiempo de incubación avanza, siguiendo el mismo patrón descrito para la solubilización de fosfato. Estos resultados, reafirman la capacidad de solubilizar fosfato de las cepas ensayadas en condiciones neutras y alcalino-salinas sugiriendo que esta puede mantenerse durante largos períodos de incubación (Figura III.7).

La producción de sideróforos también fue estimada en base al cálculo del área del halo de difusión alrededor de la colonia, luego de 24 horas de incubación. Según este análisis todas las cepas fueron capaces de producir sideróforos tanto en condiciones control como en condiciones alcalino-salinas, con áreas entre 0.92 a 3.09cm² y de 1.39 a 3.47cm² bajo condiciones control y restrictivas respectivamente (Tabla III.4).

Tabla III.4.- Evaluación *in vitro* de actividades PGPR en cepas seleccionadas de *P. eucalypti*

Tratamiento	P163	P76	MA66	P63	P173
	Índice de Solubilización de Fosfato (ISF)				
Control	4.42 ± 0.32	6.14 ± 0.52	4.26 ± 0.14	4.47 ± 0.82	4.31 ± 0.38
pH8.0 + 200mM NaCl	4.63 ± 1.04	6.46 ± 0.98	4.09 ± 0.67	5.29 ± 1.91	5.09 ± 0.16
pH9.0 + 200mM NaCl	3.59 ± 0.59	4.11 ± 0.56	3.07 ± 0.66	2.85 ± 0.74	3.53 ± 0.30
pH10.0 + 200mM NaCl	1.42 ± 0.05	1.55 ± 0.08	1.73 ± 0.01	1.38 ± 0.16	1.38 ± 0.38
	Producción de Sideróforos (cm ²)				
Control	1.735 ± 0.20	0.995 ± 0.16	0.922 ± 0.16	3.092 ± 0.46	1.151 ± 0.07
pH9.0 + 200mM NaCl	2.925 ± 1.35	3.275 ± 0.36	1.396 ± 0.14	2.801 ± 0.60	3.471 ± 0.07
	Producción de ácido indol-acético (µg/ml)				
Control	34.53 ± 2.41 ^A	35.54 ± 0.68 ^A	35.45 ± 2.15 ^A	37.21 ± 0.90 ^A	34.05 ± 2.32 ^A

Los valores de la producción de ISF y sideróforos representan las medias de dos réplicas biológicas +/- SE. Los valores de la producción de ácido indol-acético son las medias de tres réplicas +/- SE, analizadas mediante ANOVA de una vía. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre columnas, dentro de la misma fila.

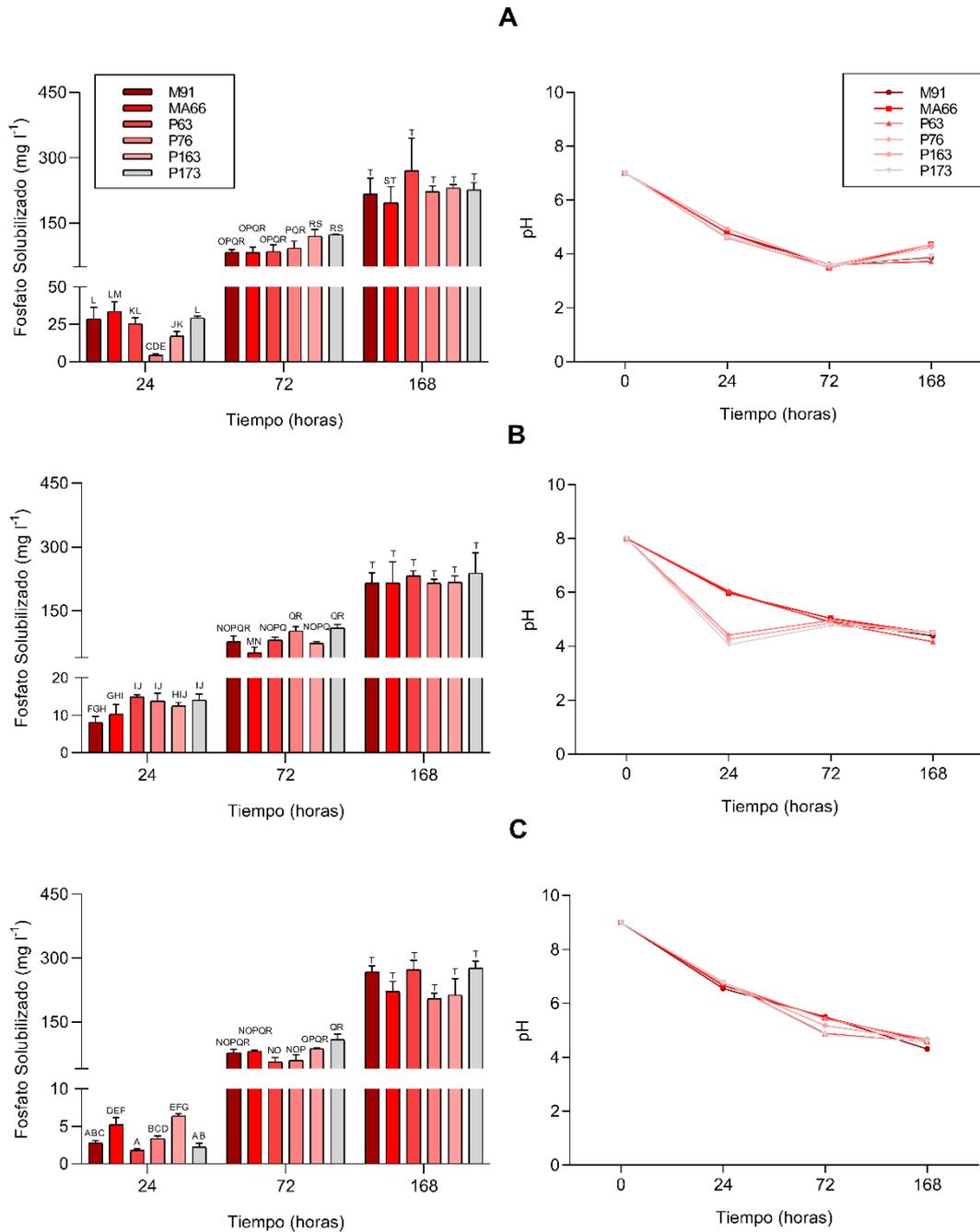


Figura III.7.- Capacidad solubilizadora de fosfato de las cepas de *P. eucalypti* en medio líquido. La capacidad solubilizadora de fosfato (panel izquierdo) y el pH del medio (panel derecho) fueron evaluados en el medio líquido NBRIP con fosfato tricálcico como fuente de fósforo insoluble a diferentes tiempos de incubación en 3 condiciones. A: pH 7.0, B: pH 8.0 + 200 mM NaCl, C: pH 9.0 + 200 mM NaCl. Las barras representan la media de 3 réplicas biológicas +/- SE (error estándar). Los datos fueron analizados mediante ANOVA factorial seguido del test de comparaciones múltiples Tukey. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en la cantidad de fosfato solubilizado.

Por otro lado, todas las cepas produjeron niveles detectables de AIA, siendo las cepas P163, MA66, P76, P63 y P173 las que produjeron niveles significativamente más altos -entre 34.05 y 37.21 $\mu\text{g/ml}$ - que la cepa M91 (5.65 $\mu\text{g/mL}$) (Tabla III.4).

Si bien es usual seleccionar organismos por una característica en particular, estos suelen poseer más de una habilidad relacionada con la promoción de crecimiento vegetal. De ahí que muchos estudios están cada vez más enfocados en caracterizar y seleccionar microorganismos que tengan varias capacidades PGPR. En conjunto, nuestros resultados indican que el grupo de cepas de *P. eucalypti* evaluadas en este trabajo comparten algunas características *in vitro*, concretamente la capacidad de solubilizar P, de producir AIA y sideróforos, que podrían impactar positivamente tanto en el crecimiento como en la dinámica nutricional de *L. tenuis*.

Cabe mencionar que en la mayoría de los estudios donde se han investigado los efectos de bacterias solubilizadoras de fosfato con distintas actividades PGPR, se han comparado cepas pertenecientes a diferentes géneros/especies, sin centrarse en las comparaciones intra-específicas. En este sentido, contar con un subgrupo de BSFRA estrechamente relacionadas que comparten rasgos genéticos y funcionales *in vitro*, proporcionó una oportunidad para explorar y analizar los efectos diferenciales intra-especie en el crecimiento y la adquisición de nutrientes de *L. tenuis* en suelos alcalino-sódicos.

III.5. Efecto de diferentes cepas de *P. eucalypti* en el crecimiento, nutrición e interacción simbiótica con *L. tenuis* en suelos alcalino sódicos.

Cuando se cultivan leguminosas en el campo, el procedimiento habitual previo a la siembra consiste en la inoculación de las semillas con rizobios simbioses fijadores de nitrógeno, para lograr que la planta incorpore nitrógeno a través la interacción mutualista que se da entre estos dos organismos. Por esta razón, en este ensayo en planta se consideró la co-inoculación de cada cepa de *P. eucalypti* con el rizobio *Mesorhizobium sanjuanii* BSA136 -simbionte de *L. tenuis*- nativo de suelos alcalino-sódicos de la Pampa Deprimida del Salado, aislado y caracterizado por nuestro grupo (Estrella *et al.*, 2009, Sannazzaro *et al.*, 2018). Cabe mencionar que, como paso previo, se evaluó la compatibilidad *in vitro* entre las cepas *Mesorhizobium sanjuanii* BSA136 y *P. eucalypti* para descartar la existencia de efectos antagonicos entre ellas. Luego de 5 días de incubación, no se observó inhibición del crecimiento en ninguna de las combinaciones rizobio-BSF, al menos en condiciones de cultivo *in vitro*.

III.5.1. Efectos en los parámetros de crecimiento de *L. tenuis*

Para determinar si las propiedades *in vitro* descritas anteriormente para las cepas seleccionadas tenían un efecto sobre el crecimiento de *L. tenuis*, se evaluaron los efectos de su aplicación (en co-inoculación con *M. sanjuanii*) sobre el crecimiento de *L. tenuis* en suelos de los bajos alcalino-sódicos de la Pampa Deprimida del Salado. Con ese objeto, las plantas fueron cultivadas en un suelo alcalino sódico (pH 8.2) según lo descrito en el diseño experimental. Las plantas inoculadas únicamente con el rizobio (R), fueron usadas como control. Las variables cuantificadas fueron: Peso seco total (DWt), peso seco del vástago (DWsh), peso seco de raíz (DWr) y peso seco de nódulos (DWn) (Tabla III.5).

Luego de 40 días de incubación el análisis Post-hoc reveló que el peso seco acumulado (DWt) por las plantas co-inoculadas (R+MA66, R+P63, R+P76, R+P163, R+P173, R+M91) no mostró diferencias significativas respecto al tratamiento control (R). Comportamientos similares se observaron para las variables DWsh y DWr (Tabla III.5). No obstante, la comparación entre los tratamientos de co-inoculación reveló efectos significativos entre las cepas. En el tratamiento R+P76, las variables de peso seco total (DWt) y del peso seco de vástago (DWsh) fueron significativamente menores respecto a la de los tratamientos R+M91 y R+P163, sugiriendo que las diferentes cepas de *P. eucalypti* ejercen efectos diferenciales sobre el crecimiento de *L. tenuis*.

Adicionalmente, la biomasa de nódulos producidos por *M. sanjuanii* también fue evaluada. En comparación al tratamiento control (R), los valores de peso seco de nódulos (DW_n) de los tratamientos R+MA66, R+P173, R+P63 y R+P163 fueron similares, mientras que el tratamiento R+M91 incrementó significativamente dicha variable en un 62.9%. Un efecto contrario se observó en el tratamiento R+P76, reduciéndolo en un 77.8% (Tabla III.5). Estos resultados indican que las diferentes cepas de *P. eucalypti* afectan diferencialmente el desarrollo de los nódulos de *M. sanjuanii* en *L. tenuis*, además de sugerir la posibilidad de que algunas de ellas puedan interferir en la capacidad de las plantas de incorporar el nitrógeno adquirido mediante la interacción simbiótica mutualista con el rizobio.

En base a estos resultados y para corroborar tal hipótesis, se realizó un análisis posterior para determinar la concentración y acumulación de nitrógeno (N) en plantas inoculadas con rizobios (R) y en tres de los cinco tratamientos de co-inoculación anteriormente mencionados, que fueron seleccionados en base a los fenotipos contrastantes observados en las plantas y nódulos. Por lo tanto, analizamos las plantas expuestas a los tratamientos R, R+M91, R+P76 y R+P163.

Tabla III.5.- Efecto de la inoculación de rizobios y bacterias solubilizadoras de fosfato de *P. eucalypti*. sobre la acumulación de nitrógeno en *L. tenuis* en un suelo alcalino-sódico.

Variable	Tratamiento					
	R+P163	R+P76	R+MA66	R+P63	R+P173	R+M91
DW_{sh}	0.73 ± 0.05^{bc}	0.48 ± 0.05^a	0.52 ± 0.05^{ab}	0.53 ± 0.05^{ab}	0.68 ± 0.05^{abc}	0.76 ± 0.05^{bc}
DW_r	0.32 ± 0.04	0.26 ± 0.03	0.28 ± 0.02	0.28 ± 0.04	0.35 ± 0.03	0.34 ± 0.03
DW_n	0.035 ± 0.003^{bc}	0.006 ± 0.003^a	0.026 ± 0.003^b	0.028 ± 0.003^b	0.032 ± 0.003^{bc}	0.044 ± 0.003^{bc}
DW_t	1.08 ± 0.07^{bc}	0.74 ± 0.07^a	0.81 ± 0.07^{ab}	0.83 ± 0.07^{abc}	1.06 ± 0.07^{abc}	1.14 ± 0.07^{bc}

DW_{sh} : Peso seco de vástago (g), DW_r : Peso seco de raíz (g), DW_n : Peso seco de nódulo (g), DW_t : Peso seco total (g). Los resultados son la media aritmética de 6 a 8 réplicas biológicas \pm SE (error estándar). Los valores fueron analizados mediante ANOVA, seguido del test de Tukey. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$) entre filas.



Figura III.8.- Imágenes representativas del ensayo de promoción de crecimiento de *L. tenuis* en suelos alcalino-sódicos. Las plantas corresponden a las combinaciones de *P. eucalypti* (MA66, P76, P63, P163, P173 y M91) con el rizobio nativo *Mesorhizobium sanjuanii* BSA136 (R). Se muestran 40 días de la cosecha (40 días post-inoculación)

III.5.2. Efectos en el estado nutricional de *L. tenuis*

La concentración de N tanto en vástago como raíz de las plantas co-inoculadas fueron similares a las de las plantas inoculadas con el tratamiento control (R) (Figura III.8). No obstante, cuando se compararon dichos valores entre plantas inoculadas con los distintos tratamientos de co-inoculación, sorpresivamente se detectaron valores significativamente menores en el tratamiento R+P76 comparado contra R+M91 (36.4 y 20.8% para vástago y raíz respectivamente) (Figura III.9). También se observó el efecto significativo entre los tratamientos en la cantidad de nitrógeno total acumulado en planta (Figura III.10). Respecto al control (R), se observaron valores similares para el tratamiento R+P163, mientras que para R+M91 se evidenció un incremento significativo del 61.64%. Un efecto opuesto se obtuvo con el tratamiento R+P76, en el cual se observó una reducción del 34% respecto a R, así como la reducción del 59.15 y 45.7% respecto a R+M91 y R+P163 respectivamente (Figura III.10). Análisis más detallados revelaron que la acumulación de nitrógeno en parte aérea no fue diferente entre los tratamientos analizados respecto al control (R), a excepción del tratamiento R+M91 que mostró un incremento del 69.39% (Figura III.11).

Complementariamente, se analizó el efecto de los tratamientos de co-inoculación sobre la concentración y la cantidad de fósforo (P) en la planta (Figura III.9, Figura III.10, Figura III.11). A nivel de vástago, no se detectó ningún efecto en la concentración de fósforo, como sí se observó en raíz. En este último órgano, la concentración de P no fue afectada por los tratamientos de co-inoculación R+M91 y R+P163 en comparación a los valores obtenidos en plantas control (R). No obstante, una diferencia significativa se observó con el tratamiento R+P76, que incrementó la concentración de fósforo en raíz respecto a la condición control (R) y el consorcio R+P163 (Figura III.9). Respecto a la acumulación de P total en planta (Figura III.10), aquellas tratadas con la combinación R+M91 incrementaron el nivel de este nutriente en un 47.89% respecto al control (R). En las comparaciones entre tratamientos, la combinación R+P76 mostró menor acumulación de P que el obtenido con el consorcio R+M91 (Figura III.10). Una tendencia similar se observó para la acumulación de P en vástago (Figura III.11).

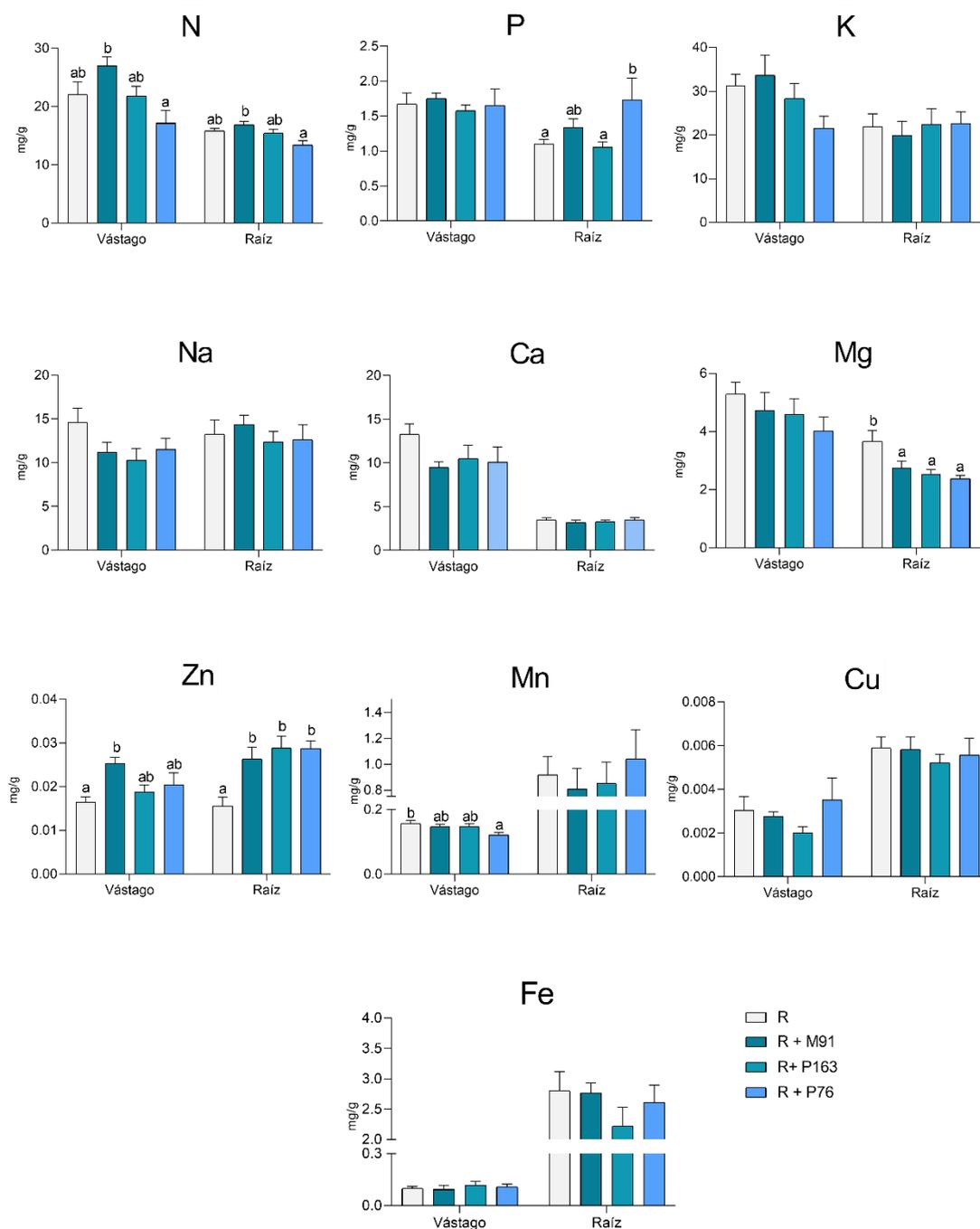


Figura III.9.- Concentración de nutrientes en vástago y raíz de plantas de *L. tenuis* inoculadas con *M. sanjuanii* BSA136 (R) o con diferentes consorcios *P. eucalypti* – *M. sanjuanii* BSA136 (R+M91, R+P163, R+P76). Los resultados representan la media aritmética de 6 a 8 réplicas biológicas + SE. Los valores fueron analizados mediante ANOVA seguido del test de comparaciones múltiples Tukey. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$) entre tratamientos.

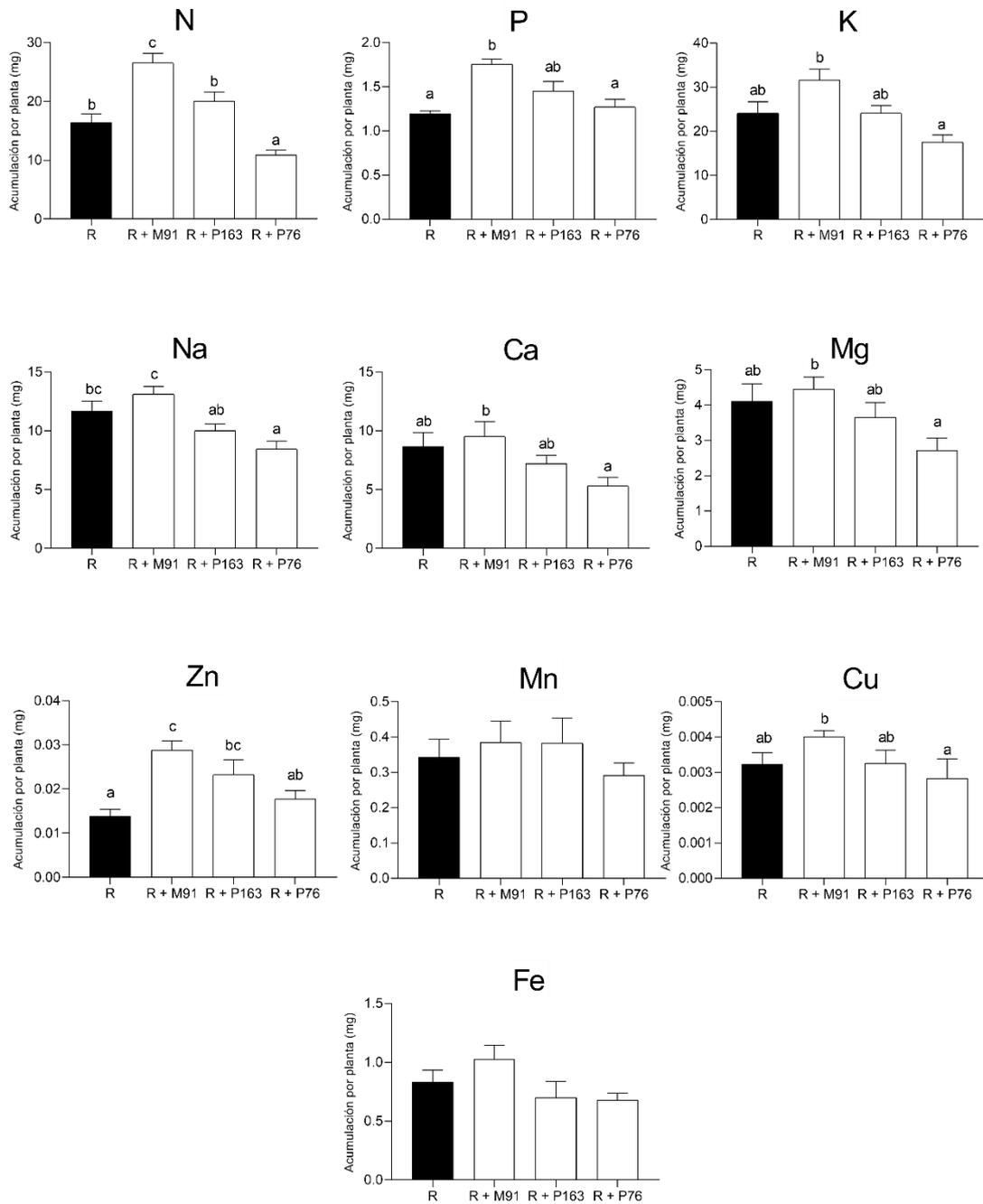


Figura III.10.- Acumulación total de nutrientes en plantas de *L. tenuis* inoculadas con *M. sanjuanii* BSA136 (R) o con diferentes consorcios de *P. eucalypti* – *M. sanjuanii* BSA136 (R+M91, R+P163, R+P76). Las barras representan la media aritmética de 6 a 8 réplicas biológicas + SE. Los valores fueron analizando mediante ANOVA seguido del test de comparaciones múltiples Tukey. Letras diferentes señalan diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$) entre tratamientos.

Por otra parte, para obtener un panorama más amplio acerca del efecto de los diferentes tratamientos de co-inoculación sobre la composición elemental en las plantas *L. tenuis*, se analizó la concentración y acumulación de los siguientes elementos: Potasio (K), Calcio (Ca), Magnesio (Mg), Sodio (Na), Hierro (Fe), Zinc (Zn), Cobre (Cu) y Manganeseo (Mn). Se encontró que la acumulación total en planta (Figura III.10) de muchos de los elementos estudiados (8 de 10, incluyendo a N y P), fueron significativamente mayores para las plantas co-inoculadas con el tratamiento R+M91 en comparación con el tratamiento R+P76. Estos resultados podrían ser atribuidos -al menos parcialmente- a las diferencias mencionadas anteriormente en el peso seco acumulado. Por otro lado, respecto al control (R), las plantas tratadas con el tratamiento R+M91 acumularon más N, P y Zn. Además, se observó que el tratamiento R+P163 ejerció un efecto positivo en la acumulación de Zn. En el análisis de la concentración de nutrientes en *L. tenuis*, se observaron efectos significativos de los tratamientos co-inoculados en las variables de Zn y Mn en vástago, así como en la concentración de Zn y Mg en raíz (aparte de la concentración P y N descrito anteriormente). A nivel de vástago, la concentración de Zn incrementó en plantas tratadas con el consorcio R+M91 en comparación con el tratamiento control (R), mientras que la concentración de Mn disminuyó en este órgano en plantas tratadas con R+P76 respecto al control (R). En raíz, la concentración de Mg fue menor en todos los tratamientos co-inoculados R+P76, R+P163 y R+M91 en comparación al control (R), mientras que en la concentración de Zn se observó el efecto contrario.

Dentro de las variables de crecimiento, resultó llamativa la diferencia en la alocación de la materia seca en los nódulos observada en las plantas de *L. tenuis* co-inoculadas con las diferentes cepas de *P. eucalypti*, más aún teniendo en cuenta la compatibilidad *in vitro* con el rizobio *M. sanjuanii* BSA136. Estos resultados sugieren que la compatibilidad *in vitro* entre rizobios y bacterias solubilizadoras de fosfato no garantiza efectos similares en la interacción con la planta y que la simbiosis mutualista puede ser afectada diferencialmente incluso por cepas pertenecientes a una misma especie, como en este caso de estudio. Debido a la complejidad que tiene el proceso de formación de nódulos en la interacción simbiótica mutualista entre rizobios y leguminosas, para poder comprender con mayor profundidad los resultados diferenciales obtenidos con este grupo de cepas, a futuro sería interesante indagar sobre el efecto que puedan tener las mismas en los mecanismos hormonales involucrados durante dicho proceso.

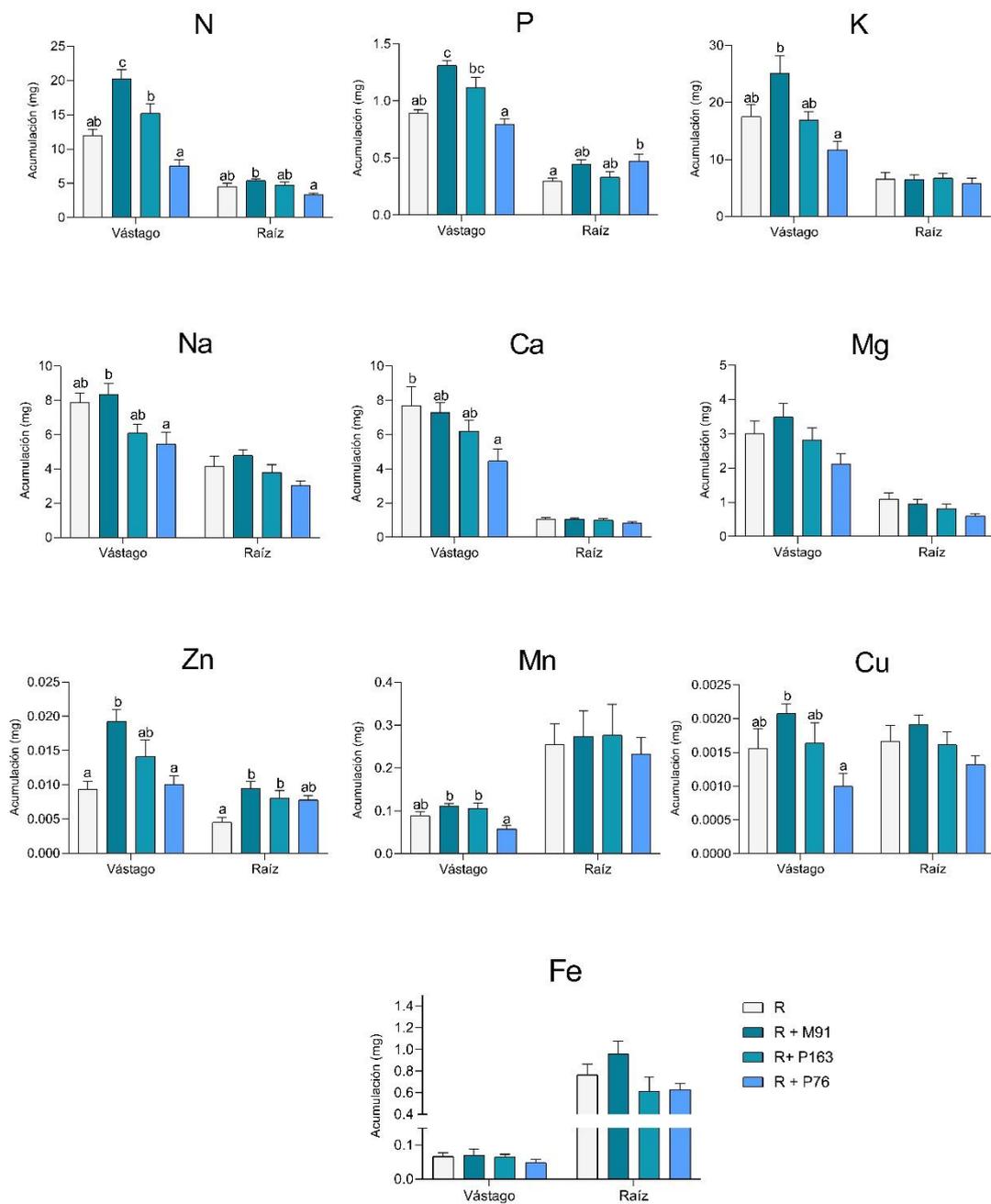


Figura III.11.- Acumulación de nutrientes en vástago y raíz de plantas de *L. tenuis* inoculadas con *M. sanjuanii* BSA136 (R) o con diferentes consorcios de *P. eucalypti* – *M. sanjuanii* BSA136 (R+M91, R+P163, R+P76). Los resultados representan la media aritmética de 6 a 8 réplicas biológicas + SE. Los valores fueron analizados mediante ANOVA seguido del test de comparaciones múltiples Tukey. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$) entre tratamientos.

Se sabe que el equilibrio hormonal de la planta es fundamental para el desarrollo de los nódulos (Liu *et al.*, 2018) y este puede verse afectado por múltiples señales, incluyendo la producción de hormonas y otras moléculas de señalización (Simontacchi *et al.*, 2013). Por ello, debe considerarse la posibilidad de que más de una vía pueda verse afectada por diferentes cepas de *P. eucalypti* en las interacciones tripartitas. En este sentido, la producción de hormonas puede no ser la misma para todas las cepas, como sugiere indirectamente -aunque no se ha probado aún en planta- la diferente producción *in vitro* de AIA encontrada para M91 en relación con el resto de las cepas. (ver Tabla III.3). Otras posibilidades que generen efectos positivos o negativos deben ser tomados en cuenta. En el contexto de que la relación mutualista de tipo simbiótica deriva evolutivamente de una patogénica (Cao *et al.*, 2017), se sugiere que el establecimiento de esta depende del éxito del simbionte en la supresión y modulación de la respuesta inmune del huésped. Por ejemplo, un estudio de interacción tripartita conformado por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, *Sinorhizobium meliloti* Sm2011 y *Medicago truncatula* A17, reveló un rol antagonista de la simbiosis a causa de la activación de la inmunidad innata de la planta desencadenada por la presencia del patógeno, a pesar de la modulación ejercida por el simbionte, disminuyendo la formación de nódulos (Chen *et al.*, 2017). Un efecto contrario se observó en un estudio de interacción entre *Bacillus* sp. CHEP5, *Arachis hypogaea* L. y el simbionte *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144, donde se observó un incremento significativo del número de nódulos en presencia del *Bacillus* (Figueredo *et al.*, 2014).

Respecto a la adquisición de nutrientes, nuestros resultados muestran efectos novedosos y contrastantes de las cepas de *P. eucalypti* ensayadas. Si bien de forma similar a lo aquí descrito, un trabajo realizado en paralelo de Campestre y col. (2020) sobre la influencia de la cepa *P. eucalypti* M91 en el crecimiento de *L. tenuis* bajo un sistema hidropónico con medio nutritivo alcalinizado, no reveló efectos en las variables de crecimiento o en la acumulación de la mayoría de nutrientes, en nuestro ensayo de interacción tripartita rizobio-BSF-*L. tenuis*, la inoculación con *P. eucalypti* M91 crecido en suelo alcalino-sódico sí incrementó la acumulación de N, P y Zn. En base a estos resultados, el uso de la cepa M91 en la co-inoculación con *M. sanjuanii* podría ayudar en la adquisición de estos nutrientes en suelos alcalino-sódicos, mientras que P163 puede ser una adecuada alternativa, en conjunto con *M. sanjuanii* BSA136, para incrementar la adquisición de Zn en *L. tenuis*.

Es importante destacar las diferencias en la acumulación de nutrientes entre los tratamientos, especialmente R+P76 y R+M91, ya que sugieren que incluso cepas de una misma especie, con propiedades PGPR *in vitro* similares pueden ejercer efectos nutricionales diferentes en una misma especie vegetal. La dinámica de la acumulación nutricional en las plantas es un proceso complejo que, entre otros factores, depende de la disponibilidad de los nutrientes en la zona de absorción de la raíz, la capacidad específica de captación por unidad de peso de raíz, estructura y arquitectura del

sistema radicular, efectos de dilución y concentración derivados de las diferencias de crecimiento, así como en el patrón de asignación dentro de la planta (Epstein y Bloom, 2005). Sin embargo, las cepas evaluadas probablemente afectaron algunos de los procesos mencionados, por lo que para precisar tales los efectos es necesario realizar análisis adicionales.

Particularmente, se observó la reducción y el incremento en la concentración de Mg y Zn, respectivamente, en las raíces de *L. tenuis* co-inoculadas con *P. eucalypti*. Los datos relacionados al Mg, indican que *P. eucalypti* tiene la capacidad de modular el estatus interno de este nutriente en las raíces, sin afectar su adquisición. El Mg es un macronutriente esencial para el crecimiento de las plantas, su presencia es muy importante para las moléculas de clorofila, además de ser necesario para muchas reacciones fisiológicas esenciales, especialmente las de fosforilación. El balance nutricional de este elemento es crucial, ya que su deficiencia o exceso puede influir en una amplia gama de funciones fisiológicas que derivan de estos procesos interrelacionados (Frageria y Moreira, 2011; Huber y Jones, 2012). En ese contexto parece relevante mencionar que ninguna de las cepas evaluadas reducen negativamente la concentración de Mg en el vástago, que es crítico en las zonas dedicadas a la cría del ganado donde la hipomagnesemia es una problemática mayor (Docen *et al.*, 2019; Zelal, 2017). En el caso del Zn, el incremento de la concentración en las raíces de todos los tratamientos co-inoculados podría ser atribuido al incremento de la bio-disponibilidad de este micronutriente para *L. tenuis*, ya que al igual que el fósforo, ésta se ve limitada por factores abióticos como el pH alcalino y la presencia de sales (Alloway, 2009). Debido a la similitud entre los mecanismos de solubilización de P y Zn, basados en la producción de ácidos orgánicos, es probable que un mismo microorganismo posea ambas características (Zaheer *et al.*, 2019). Por ejemplo, se ha observado que en plantas de trigo la inoculación de algunas especies del género *Pantoea*, con habilidades de solubilización de Zn y P, incrementaron significativamente la acumulación de Zn en raíz y vástago (Kamran *et al.*, 2017). Los análisis de composición nutricional permiten evidenciar los efectos tangibles de las bacterias inoculadas.

En leguminosas, la inoculación combinada de rizobios y bacterias solubilizadoras de fosfato ha mostrado un impacto positivo en el número y el peso de los nódulos, raíz y biomasa total, así como el nitrógeno total acumulado en la planta (Rosas *et al.*, 2006, Guiñazu *et al.*, 2010; Morel *et al.*, 2012; Walpola y Yoon, 2013). Incluso en condiciones de suelos alcalino-sódicos, algunos estudios han demostrado el efecto positivo de las BSF en cultivos agrícolas importantes como el maíz y el algodón (Ahmad *et al.*, 2018; Dixit *et al.*, 2020). No obstante, los efectos combinados de rizobio-BSF en el crecimiento y en la acumulación de nutrientes elementales bajo condiciones de estrés no han sido estudiados aún.

Resulta interesante destacar que las cepas de *P. eucalypti* analizadas en esta tesis, a pesar de compartir similares propiedades *in vitro* y de pertenecer a la misma especie, tuvieron efectos diferentes sobre el crecimiento de la planta, la nodulación y la acumulación de nutrientes. Este hallazgo sugiere que los efectos beneficiosos de estas bacterias no pueden predecirse exclusivamente sobre la base de sus atributos de PGPR evaluados *in vitro* ni de su identidad taxonómica, y que es necesario realizar pruebas complementarias en planta para seleccionar las cepas adecuadas para la inoculación a campo de *L. tenuis* en combinación con rizobios fijadores de nitrógeno.

III.6. Anexos

Anexo III.6.1

Secuencias de Referencia del gen ARNr 16S de las cepas tipo del orden Enterobacteriales y la familia Pseudomonadaceae

Cepa	Número de Acceso	Cepa
<i>Buttiauxella brennerae</i> DSM 9396 ^T	AJ233401	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM50071 ^T
<i>Buttiauxella gaviniae</i> DSM 9393 ^T	AJ233403	<i>Pseudomonas agarici</i> NCPPB2445 ^T
<i>Buttiauxella izardii</i> DSM 9397 ^T	AJ233404	<i>Pseudomonas anguilliseptica</i> NCIMB1949 ^T
<i>Buttiauxella noackiae</i> DSM 9401 ^T	AJ233405	<i>Pseudomonas asplenii</i> ATCC23835 ^T
<i>Buttiauxella warmboldiae</i> DSM 9404 ^T	AJ233406	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> DSM50083 ^T
<i>Citrobacter amalonaticus</i> CECT 863 ^T	FR870441	<i>Pseudomonas corrugata</i> DSM 7228 ^T
<i>Citrobacter braakii</i> CDC 80-58 ^T	AF025368	<i>Pseudomonas fluorescens</i> IAM12022 ^T
<i>Citrobacter farmeri</i> CDC 2991-81 ^T	AF025371	<i>Pseudomonas fragi</i> ATCC4973 ^T
<i>Citrobacter freundii</i> JCM 1657 ^T	AB626119	<i>Pseudomonas gessardii</i> CIP105469 ^T
<i>Citrobacter gillenbergii</i> CDC 4693-86 ^T	AF025367	<i>Pseudomonas jessenii</i> CIP105274 ^T
<i>Citrobacter murliniae</i> CDC 2970-59 ^T	AF025369	<i>Pseudomonas koreensis</i> Ps 9-14 ^T
<i>Citrobacter werkmanii</i> CDC 0876-58 ^T	AF025373	<i>Pseudomonas lutea</i> OK2 ^T
<i>Citrobacter youngae</i> GTC 1314 ^T	AB273741	<i>Pseudomonas luteola</i> IAM13000 ^T
<i>Enterobacter asburiae</i> JCM6051 ^T	AB004744	<i>Pseudomonas moraviensis</i> CCM7280 ^T
<i>Enterobacter cancerogenus</i> LMG 2693 ^T	Z96078	<i>Pseudomonas oleovorans</i> IAM1508 ^T
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC13047 ^T	AJ251469	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i> IAM1568 ^T
<i>Enterobacter hormaechei</i> ATCC 49162 ^T	AFHR01000079	<i>Pseudomonas pertucinogena</i> NBRC14163 ^T
<i>Enterobacter kobei</i> CIP 105566 ^T	AJ508301	<i>Pseudomonas putida</i> IAM1236 ^T
<i>Enterobacter ludwigii</i> EN-119 ^T	AJ853891	<i>Pseudomonas rhizosphaerae</i> LMG21640 ^T
<i>Enterobacter mori</i> LMG 25706 ^T	AEXB01000008	<i>Pseudomonas straminea</i> IAM1598 ^T
<i>Enterobacter soli</i> LF7 ^T	GU814270	<i>Pseudomonas stutzeri</i> ATCC17588 ^T
<i>Erwinia amylovora</i> BC2280 ^T	AF140341	<i>Pseudomonas syringae</i> NCPPB281 ^T
<i>Erwinia aphidicola</i> LMG 24877 ^T	FN547376	<i>Rahnella aquatilis</i> ATCC 33071 ^T
<i>Erwinia billingiae</i> CIP 106121 ^T	JN175337	<i>Rahnella woolbedingensis</i> FRB 227 ^T
<i>Erwinia endophytica</i> BSTT30 ^T	LN624761	<i>Raoultella electrica</i> 1GB ^T
<i>Erwinia mallotivora</i> DSM 4565 ^T	AJ233414	<i>Raoultella ornithinolytica</i> CIP 103364 ^T
<i>Erwinia persicina</i> NBRC 102418 ^T	AB681774	<i>Raoultella planticola</i> ATCC 33531 ^T

Cepa	Número de Acceso	Cepa
<i>Erwinia psidii</i> LMG 7039 ^T	JQ809696	<i>Raoultella terrigena</i> NBRC 14941 ^T
<i>Erwinia pyriformis</i> ICMP 14143 ^T	EF122435	<i>Salmonella bongori</i> BR 1859 ^T
<i>Erwinia tasmaniensis</i> Et1/99 ^T	AM055716	<i>Salmonella enterica</i> JCM 1652 ^T
<i>Erwinia toletana</i> CECT 5263 ^T	FR870447	<i>Serratia entomophila</i> DSM 12358 ^T
<i>Erwinia uzenensis</i> YPPS951 ^T	AB546198	<i>Serratia ficaria</i> DSM 4569 ^T
<i>Ewingella americana</i> CIP 81.94 ^T	JN175329	<i>Serratia fonticola</i> DSM 4576 ^T
<i>Gibbsiella dentisursi</i> NUM 1720 ^T	AB566415	<i>Serratia grimesii</i> DSM 30063 ^T
<i>Gibbsiella greigii</i> FRB 224 ^T	KF308333	<i>Serratia liquefaciens</i> CIP 103238 ^T
<i>Gibbsiella quercinecans</i> FRB 97 ^T	GU562337	<i>Serratia marcescens</i> KRED ^T
<i>Hafnia alvei</i> ATCC 13337 ^T	M59155	<i>Serratia myotis</i> DSM 28726 ^T
<i>Hafnia paralvei</i> ATCC 29927 ^T	FM179943	<i>Serratia nematodiphila</i> DZ0503SBS1 ^T
<i>Hafnia psychrotolerans</i> DJC1-1 ^T	KJ023821	<i>Serratia odorifera</i> DSM 4582 ^T
<i>Klebsiella michiganensis</i> W14 ^T	JQ070300	<i>Serratia plymuthica</i> DSM 4540 ^T
<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 13182 ^T	AF129440	<i>Serratia proteamaculans</i> DSM 4597 ^T
<i>Klebsiella pneumoniae</i> JCM1662 ^T	AB004753	<i>Serratia quinivorans</i> LMG 7887 ^T
<i>Klebsiella variicola</i> F2R9 ^T	AJ783916	<i>Serratia rubidaea</i> DSM 4480 ^T
<i>Kluyvera georgiana</i> ATCC 51603 ^T	AF047186	<i>Serratia ureilytica</i> NiVa 51 ^T
<i>Kluyvera intermedia</i> NBRC 102594 ^T	AB681871	<i>Serratia vespertilionis</i> DSM 28727 ^T
<i>Kosakonia arachidis</i> Ah-143 ^T	EU672801	<i>Tatumella morbirosei</i> LMG 23360 ^T
<i>Kosakonia cowanii</i> CIP 107300 ^T	AJ508303	<i>Tatumella ptyseos</i> LMG7888 ^T
<i>Kosakonia oryzae</i> Ola 51 ^T	EF488759	<i>Tatumella punctata</i> CIP 105598 ^T
<i>Kosakonia radicincitans</i> DSM 16656 ^T	CP018016	<i>Yersinia aleksiciae</i> DSM 14987 ^T
<i>Kosakonia sacchari</i> SP1 ^T	JQ001784	<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 9610 ^T
<i>Leclercia adecarboxylata</i> CIP 82.92 ^T	JN175338	<i>Yersinia entomophaga</i> MH-1 ^T
<i>Pantoea cypripedii</i> LMG2655 ^T	AJ233413	<i>Yersinia intermedia</i> ATCC 29909 ^T
<i>Pectobacterium atrosepticum</i> CFBP 1526 ^T	JN600332	<i>Yersinia massiliensis</i> CCUG 53443 ^T
<i>Pectobacterium betavasculorum</i> ATCC 43762 ^T	U80198	<i>Yersinia nurmii</i> APN3a-c ^T
<i>Pseudocitrobacter anthropi</i> C138 ^T	KF057944	<i>Yokenella regensburgei</i> CIP 105435 ^T
<i>Pseudocitrobacter faecalis</i> 25 CIT ^T	KF057941	<i>Pantoea eucalypti</i> M91

Anexo III.6.2

Secuencias de referencia de las cepas tipo de *Pantoea*

Cepa	Número de Acceso	
	ARNr 16S	<i>gyrB</i>
<i>Pantoea agglomerans</i> C410P1 ^T	NZ_CP016889.1 (597576:598487)	NZ_CP016889.1 (1546883:1547622)
<i>Pantoea allii</i> LMG24248 ^T	NTMH01000037.1 (109168:110079)	KF482586.1
<i>Pantoea ananatis</i> LMG 2665 ^T	NZ_JMJJ01000010.1 (32361:33272)	FJ617371.1
<i>Pantoea anthopila</i> LMG 2558 ^T	EF688010.1	EF988812.1
<i>Pantoea brenneri</i> LMG 5343 ^T	EU216735.1	FJ617409.1
<i>Pantoea calida</i> 25383 ^T	AB907785.1	KF482591.1
<i>Pantoea citrea</i> LMG22049 ^T	EF688008.1	EF988802.1
<i>Pantoea coffeiphila</i> Ca04 ^T	KJ427829.1	KM205365.1
<i>Pantoea conspicua</i> LMG24534 ^T	EU216737.1	EU145269.1
<i>Pantoea cypripedii</i> LMG2655 ^T	AJ233413.1	FJ187832.1
<i>Pantoea deleyi</i> LMG24200 ^T	EF688011.1	NZ_VHJA01000081.1 (73898:74800)
<i>Pantoea dispersa</i> EGD-AAK13 ^T	AVSS01000032.1(268:1240)	NZ_AVSS01000005.1
<i>Pantoea eucalypti</i> LMG24197 ^T	EF688009.1	EF988762.1
<i>Pantoea eucrinea</i> LMG5346 ^T	NZ_MIPP01000001.1	EU145273.1
<i>Pantoea gaviniae</i> 25382 ^T	GQ367483.1	KF482592.1
<i>Pantoea punctata</i> LMG 22050 ^T	EF688006.1	EF988803.1
<i>Pantoea rodasii</i> LMG26273 ^T	JF295053.1	JF295023.1
<i>Pantoea rwandensis</i> LMG 26275 ^T	JF295055.1	JF295030.1
<i>Pantoea septica</i> LMG 5345 ^T	EU216734.1	FJ617422.1
<i>Pantoea stewartii</i> DC283 ^T	AJ311838.1	KF482574.1
<i>Pantoea terreus</i> LMG 22051 ^T	EF688007.1	EF988804.1
<i>Pantoea theicola</i> QC88-366 ^T	AB907776.1	NWUO01000009.1 (131288:132168)
<i>Pantoea vagans</i> LMG24199 ^T	EF688012.1	EF988768.1
<i>Pantoea wallisii</i> LMG 26277 ^T	JF295057.1	JF295031.1

Anexo III.6.3

Números de acceso de las secuencias del ARNr 16S generados en este estudio

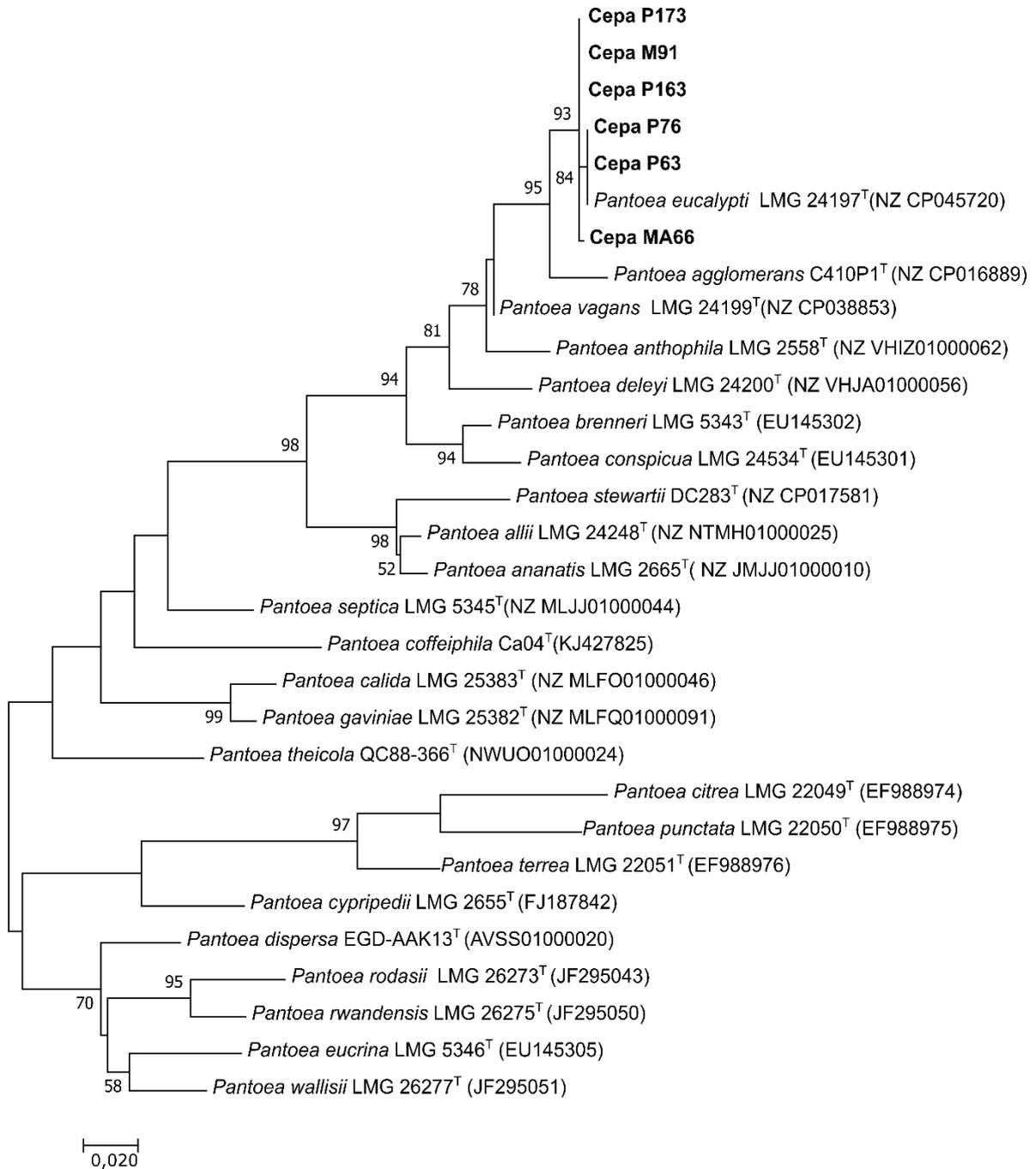
Cepa	Números de Acceso
MA62	MT786018
MA41	MT786019
MA42	MT786020
MA32	MT786021
P163	MT786022
P173	MT786023
P63	MT786024
P76	MT786025
MA66	MT786026
MB18	MT786027
P137	MT786028
P130	MT786029
P128	MT786030
P101	MT786031
P134	MT786032
P138	MT786033
MA22	MT786034
MA21	MT786035
MA28	MT786036
MA65	MT786037
MB48	MT786038
MA67	MT786039
P50	MT786040
P49	MT786041
MA109	MT786042
P164	MT786043
P177	MT786044
P157	MT786045
P133	MT786046
MA63	MT786047
MA36	MT786048
MA35	MT786049
P188	MT786050
P195	MT786051
P198	MT786052
P215	MT786053

Anexo III.6.4

Número de acceso de los genes housekeeping generados en este estudio

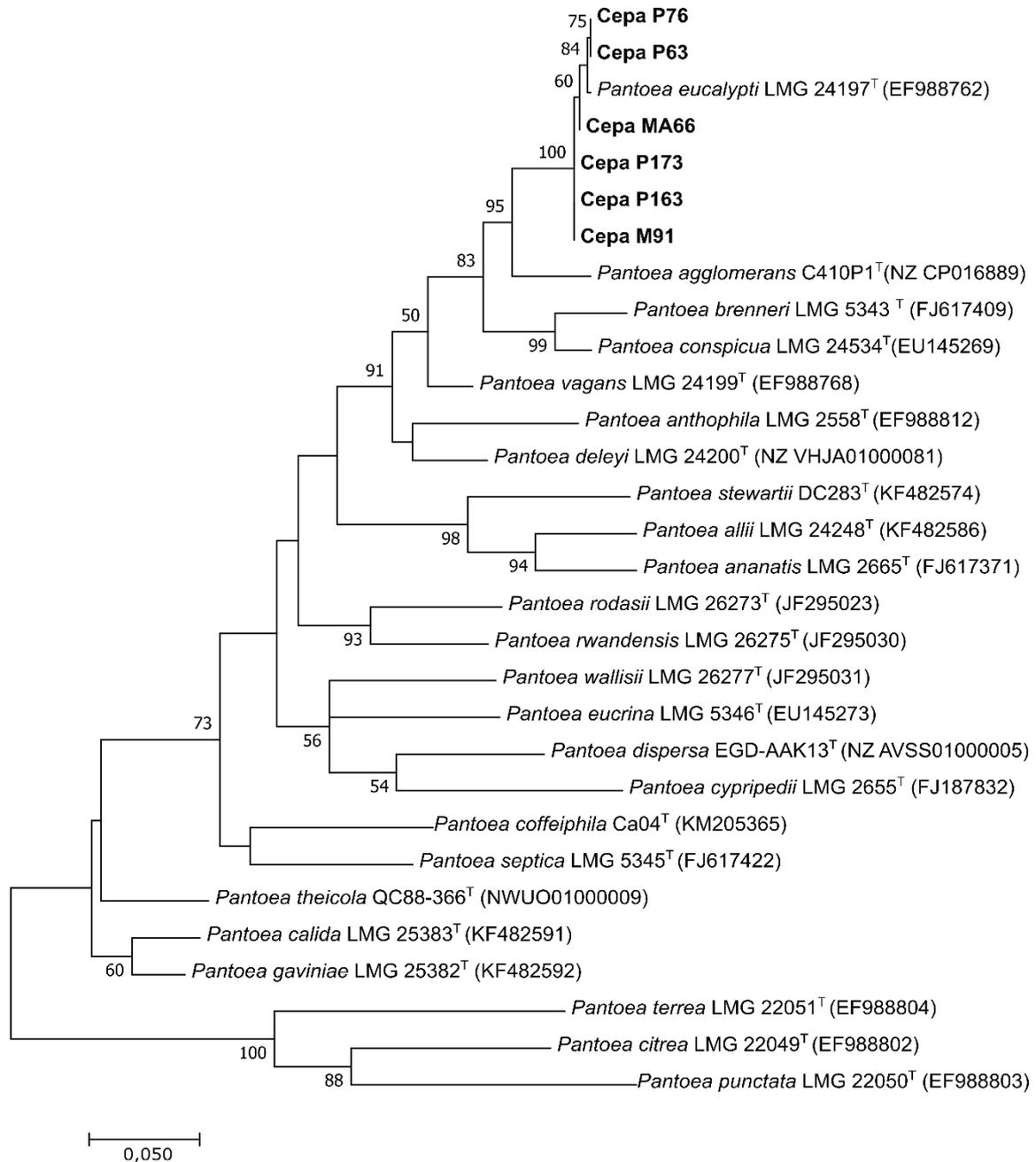
Cepa	Número de Acceso	
	<i>rpoB</i>	<i>gyrB</i>
P163	MT822750	MT822756
P76	MT822751	MT822757
MA66	MT822752	MT822758
P63	MT822753	MT822759
P173	MT822754	MT822760
M91	MT822755	MT822761

Anexo III.6.5



Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en secuencias del gen *rpoB* (650 nucleotidos) mostrando la posición de las cepas P76, MA66, P63, P163, P173 y M91 dentro del género *Pantoea* (Números de acceso en el anexo III.7.4). El árbol fue construido usando el modelo Tamura 3-parameter y el modelo de distribución gamma (G+I). Los valores de *Bootstrap* calculados para 1000 réplicas se indican en los nodos (valores de bootstrap menores a 50% no son mostrados). Las cepas P76, MA66, P63, P163, P173 y M91 se indican en negrita. Los números de acceso del GenBank para las secuencias de referencia del gen *rpoB* del género *Pantoea* se indican en paréntesis (ver anexo III.7.2).

Anexo III.6.6



Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en secuencias del gen *gyrB* (700 nucleotidos) mostrando la posición de las cepas P76, MA66, P63, P163, P173 y M91 dentro del género *Pantoea* (Números de acceso en el anexo III.7.4). El árbol fue construido usando el modelo Tamura 3-parameter y el modelo de distribución gamma (G+I). Los valores de *Bootstrap* calculados para 1000 réplicas se indican en los nodos (valores de bootstrap menores a 50% no son mostrados). Las cepas P76, MA66, P63, P163, P173 y M91 se indican en negrita. Los números de acceso del GenBank para las secuencias de referencia del gen *gyrB* del género *Pantoea* se indican en paréntesis (ver anexo III.7.2).

CAPÍTULO IV

Rizobios simbiotes de *Lotus tenuis*, nativos de los ambientes alcalino-sódicos de la Pampa Deprimida del Salado

IV.1. Introducción

El Nitrógeno es otro macronutriente fundamental para el desarrollo vegetal y representa aproximadamente el 2% del peso seco total de la planta (Santi *et al.*, 2013). Este elemento representa aproximadamente el 78% del aire atmosférico, aunque se encuentra principalmente en forma inerte como gas dinitrógeno (N_2). A pesar de su abundancia, la forma química en la que se encuentra no permite su adquisición directa por parte de las plantas, por esta razón su disponibilidad se considera uno de las principales limitantes del crecimiento vegetal (Moreau *et al.*, 2019).

Entre los grupos bacterianos que componen la microbiota del suelo, los rizobios que establecen relaciones simbióticas mutualistas con leguminosas destacan por su habilidad de reducir el nitrógeno atmosférico (N_2) a amonio (NH_3), mediante el uso del complejo enzimático de la nitrogenasa. Como resultado de esta interacción, los rizobios suplen los requerimientos de nitrógeno del hospedero, a cambio de recursos energéticos a base de compuestos carbonados. Esta asociación rizobio-leguminosa se establece a partir de una comunicación química bidireccional, a nivel de la rizosfera, desencadenando una serie de etapas que conllevan al desarrollo de un órgano especializado –el nódulo- en donde se lleva a cabo la fijación biológica del nitrógeno (Oldroyd *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012; Gage, 2004). Este proceso es probablemente uno de los más sofisticados entre los descritos para bacterias y en la actualidad constituye uno de los pilares de toda una iniciativa biotecnológica centrada en el desarrollo agrícola sostenible (Arora *et al.*, 2017). Se estima que la simbiosis rizobio-leguminosa proporciona aproximadamente 40 millones de toneladas de nitrógeno a los sistemas agrícolas cada año (Herridge *et al.*, 2008), y desempeña un papel crucial en el aumento de la productividad y la calidad de los cultivos, especialmente el contenido de proteínas (Krapp *et al.*, 2015). Todo esto hace innegable la importancia económica y ecológica de estos organismos fijadores de nitrógeno en la agricultura.

Un aspecto importante a considerar y poco explorado es la etapa de vida saprófita de los rizobios. Indistintamente de su eficiencia simbiótica, en esta etapa la supervivencia de las poblaciones de rizobios depende fuertemente de su capacidad de adaptación a las condiciones del suelo en el que se encuentran. En ese aspecto, suelos con características fisicoquímicas como las de los ambientes alcalino-sódicos de la Pampa Deprimida del Salado, constantemente afectados por sales en diferentes grados, constituirían hábitats desfavorables para el crecimiento y la multiplicación de microorganismos como los rizobios (Lebrazi y Benbrahim, 2014; Zahran, 1999).

A pesar de ello, algunos rizobios han sido capaces de desarrollar mecanismos regulatorios para responder rápida y adecuadamente a los cambios ambientales logrando colonizarlos exitosamente (Laranjo y Oliveira, 2011). Por lo tanto, el estudio de las poblaciones de rizobios que

son capaces de formar nódulos en ambientes alcalino-sódicos y la selección de cepas que tengan no solo cualidades destacadas para la fijación de nitrógeno, sino también de adaptación a dichos ambientes, podría significar una mejora en el diseño y formulación de inoculantes microbianos.

Como se sustenta en el capítulo I, en los sistemas agroganaderos actuales hay un profundo interés en la búsqueda de alternativas agroecológicas para hacer un uso más eficiente y sustentable del recurso suelo, en particular de los que tienen características más restrictivas como los bajos alcalino-sódicos. En ese sentido, la búsqueda de rizobios nativos de estos suelos que puedan ser utilizados para desarrollar bioinsumos eficientes para estos ambientes, contribuiría a mejorar la producción de *Lotus tenuis* en los mismos, y a incrementar el contenido proteico de las pasturas que se destinan al forraje vacuno en la Pampa Deprimida del Salado.

Con ese objetivo y teniendo en cuenta la escasez de estudios de prospección sobre las poblaciones nativas de bacterias fijadoras de nitrógeno que habitan estos suelos, en este capítulo se describen los resultados que surgen de explorar la diversidad genética, taxonómica y la tolerancia *in vitro* a condiciones salino-alcálicas de una colección de rizobios aislados de nódulos de *L. tenuis* en los ambientes alcalino-sódicos de la región de la Pampa Deprimida del Salado.

IV.2. Aislamiento de rizobios simbios de *L. tenuis* en ambientes alcalino-sódicos de la Pampa Deprimida del Salado

Si bien en nuestro grupo se han realizado previamente estudios de prospección de rizobios simbios de *L. tenuis* en diferentes tipos de suelos de la región de la Pampa Deprimida del Salado, incluyendo a los bajos alcalino sódicos (Estrella *et al.*, 2009), es importante remarcar que los mismos se obtuvieron con el método de “planta trampa”. Esta metodología es de gran utilidad porque permite conocer la población nativa de un suelo que es infectiva para una determinada leguminosa. No obstante, a pesar de ser ampliamente utilizada, no hay que perder de vista que con esta aproximación experimental, la interacción rizobio-leguminosa ocurre bajo condiciones de cultivo controladas que generalmente son mucho más favorables que las condiciones reales que imponen los ambientes naturales. Por esta razón, en este trabajo de Tesis se propuso como objetivo identificar a la población de rizobios nativa que establece simbios mutualista bajo las condiciones reales que imponen los ambientes alcalino-sódicos.

Con ese fin, se realizaron colectas de plantas de *L. tenuis* naturalizadas en los suelos alcalino-sódicos durante el mes de septiembre del 2015, en tres localidades de la región de la Pampa Deprimida del Salado: Ayacucho (37°8'59.482''S, 58°28'40.231''O), Manantiales (35° 44' 36.319"S - 58° 3' 25.307"W) y Punta Indio (35°16' 15.449" S - 57°14' 52.101" W). Según nuestro diseño experimental, 10 plantas fueron colectadas de forma aleatoria en cada localidad, de las cuales se realizó el aislamiento de rizobios a partir de nódulos individuales (5 nódulos por planta). De un total de 150 nódulos, se obtuvieron 138 aislamientos, que se conservaron a -80°C en glicerol 30% v/v, luego de confirmar su pureza bajo condiciones de cultivo (Tabla IV.1). Cabe mencionar que para aislar los rizobios que colonizan el interior de los nódulos, estos se sometieron a un proceso de desinfección superficial utilizando una técnica optimizada previamente por nuestro grupo (ver II.3.6), mediante la cual se logró obtener aislamientos del 92% de los nódulos colectados.

Posteriormente, y para confirmar la capacidad simbiótica de estos aislamientos, se realizó un ensayo de infectividad en plántulas de *L. tenuis* crecidas en medio Evans agarizado sin nitrógeno, utilizando cultivos individuales de cada aislamiento. (Figura IV.1). Las plantas inoculadas se cultivaron bajo condiciones controladas por aproximadamente 30 días. Al cabo de este período se observó que, de los 138 aislamientos evaluados, 126 resultaron infectivos y desarrollaron nódulos en *L. tenuis* (Tabla IV.1) bajo estas condiciones de ensayo, confirmando su funcionalidad como rizobios simbios de esta leguminosa. Los 12 aislamientos restantes (8.7%) no desarrollaron nódulos, por lo cual fueron clasificados no infectivos para *L. tenuis*.

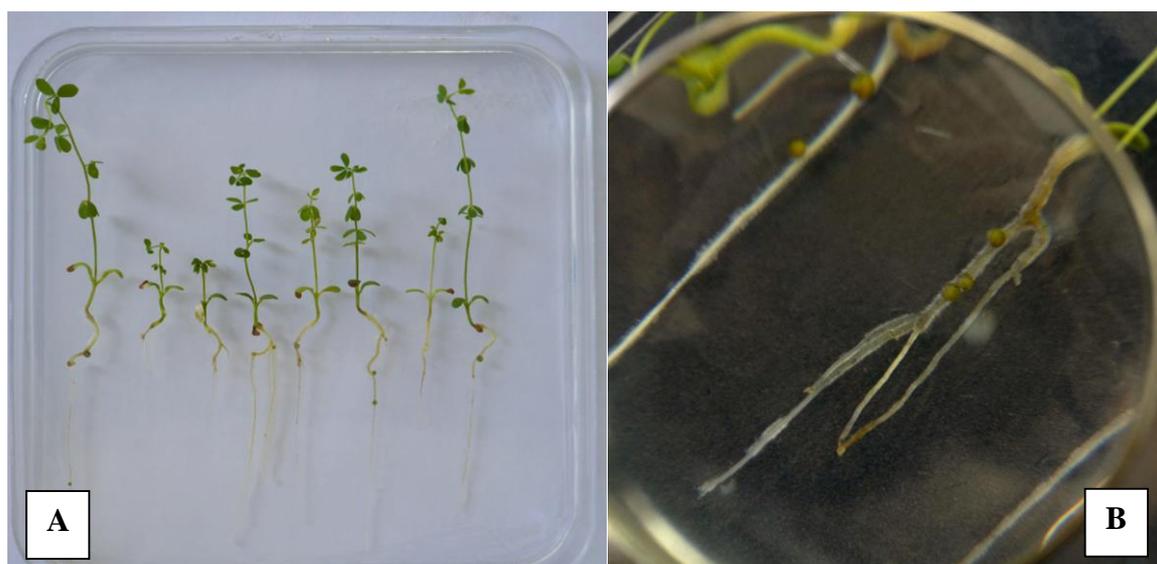


Figura IV.1 Ensayo de infectividad de aislamientos obtenidos a partir de nódulos, en plántulas de *Lotus tenuis* cultivadas en medio EVANS agarizado sin nitrógeno. A: Placa cuadrada con plantas de *L. tenuis* inoculadas con uno de los aislamientos, luego de 30 días de incubación en un cuarto de cultivo bajo condiciones controladas. B: Nódulos de *L. tenuis*

Tabla IV.1 Origen e infectividad de rizobios aislados en *L. tenuis*

	Lugar de procedencia de los aislamientos			Total
	Ayacucho	Punta Indio	Manantiales	
Aislamientos	46	48	44	138
Infectividad	42	41	43	126

Si bien el consenso dicta que la ocupación de un nódulo está usualmente limitada a un acotado número de especies bacterianas denominadas “rizobios” por su habilidad para inducir la formación de este órgano, los avances en la investigación han demostrado que existen “excepciones a la regla”, las cuales se han atribuido a la presencia de especies endófitas que a pesar de colonizar el interior de los nódulos, carecen de las funciones para inducir su desarrollo en ese huésped (Velazquez *et al.*, 2013, Peix *et al.*, 2015, Muresu *et al.*, 2008). Teniendo en cuenta estos antecedentes, consideramos que los 12 aislamientos que resultaron no infectivos en los ensayos de inoculación en *L. tenuis* serían potencialmente endófitos de nódulo.

IV.3. Diversidad genética y taxonómica de los rizobios simbioses de *L. tenuis*

Se analizó la variabilidad genética de la colección de los 126 aislamientos infectivos en *L. tenuis* mediante la técnica de huellas genómicas. A partir de los perfiles genómicos, se construyó un dendrograma usando condiciones experimentales similares a las empleadas en el capítulo III. (Figura IV.2). No obstante, teniendo en cuenta que a diferencia de las bacterias solubilizadoras de fosfato, los grupos taxonómicos de rizobios suelen ser más acotados debido a la especificidad que requiere un proceso como la simbiosis mutualista, se estableció la línea de corte al 65% de similitud. De este modo los aislamientos quedaron distribuidos en 55 grupos genómicos diferentes (numerados del I al LV), la mayoría de ellos formados por un número no mayor a 3 aislamientos y solo 2 grupos (IX y XXX) formados por 13 aislamientos. La agrupación de los aislamientos no se asoció con el lugar de colecta, dado que los grupos formados por más de un aislamiento contenían bacterias procedentes de distintas localidades. El amplio número de grupos formados por aislamientos que compartieron menos del 65% de similitud sugiere una alta diversidad genética de los rizobios que desarrollan nódulos en *L. tenuis* bajo las condiciones restrictivas del suelo. En base a los perfiles genómicos diferentes se calculó la diversidad genética específica de los rizobios simbioses para cada lugar de colecta mediante el índice de Shannon-Weaver (H'). Este índice toma valores entre 1 y 4.5, en donde ambientes con valores superiores a 3 se consideran altamente diversos. Los valores de H' para cada lugar fueron: Manantiales = 3.49, Punta Indio=3.47 y Ayacucho=3.23, lo que los califica como ambientes con alta diversidad genética de rizobios.

En concordancia con estos resultados, estudios previos en la región de la Pampa Deprimida del Salado han evidenciado una considerable variabilidad genética entre los rizobios simbioses de *L. tenuis* (Fulchieri *et al.*, 2001, Estrella *et al.*, 2009). Si bien hay que tener en cuenta que en estos estudios se analizó un número más acotado de aislamientos (Fulchieri *et al.*, 2001) y en uno de ellos los aislamientos se obtuvieron a partir de aproximaciones metodológicas seminaturales como el “método de planta trampa” que minimiza los efectos ambientales que puedan afectar la interacción simbiótica mutualista (Estrella *et al.*, 2009), la alta diversidad genética observada en todos los estudios parece ser una característica consistente que define a los simbioses de esta especie de leguminosa.

Para tener una primera aproximación de los géneros bacterianos que componen a la población de los simbioses que desarrollan nódulos en los ambientes alcalino-sódicos, se utilizó la técnica de MALDI-TOF MS (*Matrix Assisted Laser Desorption /Ionization- Time of Flight- Mass Spectrometry*). Esta técnica basada en la espectrofotometría de masas permite identificar aislamientos bacterianos a través de la obtención y análisis de huellas peptídicas que luego son comparadas con las de cepas de referencia, usando el software Biotyper 2.0 (II.4.10). Dicha metodología se emplea cada vez con mayor frecuencia para estudios taxonómicos en los que se requiere analizar un gran número de aislamientos, dado que entre sus ventajas destacan la rapidez y el bajo costo de implementación en comparación con metodologías más convencionales como el análisis del gen ARNr 16S.

Para realizar la asignación taxonómica de los aislamientos se seleccionó y analizó a un representante de cada grupo Box. La identificación de cada aislamiento se realizó según el valor de puntuación (“*score*”) obtenida, utilizando para la clasificación los valores de puntuación descritos por Ferreira et al. (2011): identificación de género (1.70 - 1.99), identificación de especie (>2), identificación no confiable (< 1.7).

De los 55 aislamientos seleccionados para los distintos grupos Box, 38 tuvieron valores de puntuación mayores a 1.7 y pudieron ser clasificados a nivel de género: 37 se asignaron al género *Mesorhizobium* (37) y uno al género *Aminobacter* (1). Por otra parte, con los 17 aislamientos restantes se observó que un grupo mayoritario tuvo un patrón concordante con cepas del género *Mesorhizobium*, pero con valores de puntuación menores a 1.7 y con un grupo minoritario no se logró obtener un espectro de masas para comparar con la base de datos. En estos casos se decidió optar por el análisis de la secuencia del gen ARNr 16S como método alternativo para poder identificarlos. Para los aislamientos MA146(VI), MA161 (XXII), A40 (XXIII), A1(XXV), A13 (XXVII) y A42 (XLVIII). se confirmó su asignación al género *Mesorhizobium*, los aislamientos A4 y A7 se clasificaron como *Phyllobacterium* y los aislamientos MA128 (XXXVIII), P224 (VIII), P244 (XI), P237 (XV), MA135 (XXVIII), MA163 (XXIX) no pudieron ser identificados (Tabla IV.2). Basándonos en estos resultados y en los estudios previos realizados, parece clara la dominancia del género *Mesorhizobium* entre los rizobios simbioses de *L. tenuis* en los suelos alcalino-sódicos de la Pampa Deprimida del Salado y la presencia minoritaria de simbioses de otros géneros no habituales como *Phyllobacterium* y *Aminobacter*.

Tabla IV.2 Asignación taxonómica de los rizobios simbios de *L. tenuis* en los suelos alcalino-sódicos de la Pampa Deprimida del

Aislamientos	Grupo Box	n	MALDI-TOF MS	Score	ARNr 16S
P260 P264 P223 MA133 MA134	I	5	<i>Mesorhizobium</i>	1.71	
P250 P265	II	2	<i>Mesorhizobium</i>	1.87	
P253	III	1	<i>Mesorhizobium</i>	1.72	
A35 P228 P245	IV	3	<i>Mesorhizobium</i>	1.74	
P249 P261 P251	V	3	<i>Mesorhizobium</i>	1.92	
MA146 P263 MA165	VI	2	<i>Mesorhizobium</i>	1.5	<i>Mesorhizobium</i>
P226 P225	VII	2	<i>Mesorhizobium</i>	2.1	
P224 P227	VIII	2	<i>Mesorhizobium</i>	1.63	
P257 P258 P233 MA131 P262 P232 MA129 MA138 MA140 MA139 MA141 A26 A27	IX	13	<i>Mesorhizobium</i>	2.22	
P252 P255 P253	X	3	<i>Mesorhizobium</i>	2.29	
P234 P244	XI	2	<i>Mesorhizobium</i>	1.66	
A28 A29 A30	XII	3	<i>Mesorhizobium</i>	2.02	
P270	XIII	1	<i>Mesorhizobium</i> .	1.72	
P229 P230	XIV	2	<i>Mesorhizobium</i> .	1.91	
P237	XV	1	<i>Mesorhizobium</i>	1.46	
A21	XVI	1	Nd	nd	
A20 P222	XVII	2	<i>Mesorhizobium</i> .	2.21	
A4 MA168	XVIII	2	<i>Mesorhizobium</i>	1.696	<i>Phyllobacterium</i>
P240	XIX	1	Nd		
MA171 P248	XX	2	<i>Mesorhizobium</i>	1.87	

A44 MA143 A2 A3 A18	XXI	5	<i>Mesorhizobium</i>	1.82	
MA161	XXII	1	<i>Mesorhizobium</i>	1.69	<i>Mesorhizobium M. n</i>
A40	XXIII	1	<i>Mesorhizobium</i>	1.6	<i>Mesorhizobium</i>
MA166	XXIV	1	<i>Mesorhizobium</i>	1.76	
A1 A5	XXV	2	<i>Mesorhizobium</i>	1.63	<i>Mesorhizobium M. v</i>
A12	XXVI	1	<i>Mesorhizobium</i>	1.93	
A13	XXVII	1		nd	<i>Mesorhizobium M</i>
MA135	XXVIII	1	<i>Mesorhizobium.</i>	1.54	
MA163	XXIX	1	<i>Mesorhizobium</i>	1.64	
MA148 MA152 MA149 MA151 MA155 MA150 MA156 MA153 A37 A38 MA130 MA154 A39	XXX	13	<i>Mesorhizobium</i>	1.69	<i>Mesorhizobium</i>
MA160	XXXI	1	<i>Mesorhizobium .</i>	1.84	
A7	XXXII	1	Nd	nd	<i>Phyllobacterium.</i>
P239 P241 MA158 P238	XXXIII	4	<i>Mesorhizobium</i>	1.71	
A32 A33	XXXIV	2	<i>Mesorhizobium</i>	2.04	
MA170	XXXV	1	<i>Mesorhizobium</i>	1.55	
A34	XXXVI	1	<i>Mesorhizobium</i>	1.72	
A17	XXXVII	1	<i>Mesorhizobium</i>	2.07	
MA128	XXXVIII	1	Nd	nd	
MA169	XXXIX	1	<i>Mesorhizobium</i>	1.78	
A31 P243	XL	2	<i>Mesorhizobium</i>	1.81	
MA144	XLI	1	<i>Mesorhizobium</i>	2	
P242 MA172	XLII	2	<i>Mesorhizobium</i>	2.02	

A10 A8 A9 A24 A6 MA157	XLIII	6	<i>Mesorhizobium</i>	1.85	
A14 A45 P235	XLIV	3	<i>Mesorhizobium.</i>	1.78	
A43 MA159	XLV	2	<i>Mesorhizobium .</i>	1.92	
MA164	XLVI	1	<i>Mesorhizobium .</i>	1.92	
MA142	XLVII	1	<i>Mesorhizobium</i>	2.25	
A42	XLVIII	1	<i>Mesorhizobium.</i>	1.66	<i>Mesorhizobium</i>
MA167	XLIX	1	<i>Mesorhizobium</i>	1.75	
P247	L	1	<i>Mesorhizobium.</i>	2.08	
MA123 MA124 MA125	LI	3	<i>Mesorhizobium.</i>	1.92	
A16	LII	1	<i>Mesorhizobium</i>	1.99	
MA126 MA127	LIII	2	<i>Mesorhizobium</i>	2.07	
P267	LIV	1	<i>Mesorhizobium</i>	nd	nd
A65 A66 A67 A68 A69	LV	5	<i>Aminobacter</i>	2.7	<i>Aminobacter</i>

Los grupos BOX se agruparon al 65% de similitud, la letra “n” indica el número de aislamientos dentro de cada grupo BOX. Los aislamientos seleccionados para su identificación taxonómica a nivel de género por la técnica de espectrometría de masas-MALDI-TOF y análisis de secuenciación del ARNr 16s. Los valores de *Score* de la identificación por MALDI-TOD MS indican identificación poco probable (<1.70 -1.99) e identificación de especie (>2.00). La identificación de género por análisis de la secuencia del ARNr 16S se realizó a partir de secuencias parciales de los aislamientos representativos de cada grupo Box con secuencias de referencias de la base de datos RDP (*Thermotoga*). Entre paréntesis se indica el % de identidad con la especie tipo del género más relacionado. nd= no determinado

Hasta hace poco más de una década, estaba aceptado que las relaciones simbióticas entre las especies de *Lotus* y sus microsimbiontes eran altamente específicas y que estos se limitaban principalmente a especies de los géneros *Mesorhizobium* y *Bradyrhizobium*, diferenciables por características tales como el tiempo de crecimiento bajo condiciones de cultivo y por su asociación con un determinado grupo de especies de *Lotus*. Los simbiotes con tiempos de crecimiento rápido, denominados genéricamente como *M. loti* (en referencia a la cepa tipo *M. loti* NZP2213^T), son los simbiotes habituales del grupo *L. corniculatus* (*L. corniculatus*, *L. tenuis* y *L. japonicum*), mientras que los de crecimiento lento *Bradyrhizobium* sp. interactúan habitualmente con el grupo *L. uliginosus* (*L. uliginosus*, *L. subbiflorus* y *L. angustissimus*) (Jarvis *et al.*, 1982; Jordan *et al.*, 1982; Saeki y Kouchi *et al.*, 2000).

En la actualidad, la extensión de los análisis de comunidades de rizobios en especies de *Lotus* naturalizadas, sumado al uso de herramientas bioinformáticas para el análisis de genes con valor taxonómico y de genomas, ha evidenciado la complejidad taxonómica de los simbiotes de *Lotus*, que incluiría al menos 20 especies de cinco géneros: *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Ensifer* y *Aminobacter* (Lorite *et al.*, 2018). En concordancia con lo reportado, un estudio previo realizado por nuestro grupo en el que se analizó la diversidad taxonómica de rizobios de *L. tenuis* cultivados en 3 suelos diferentes de la Pampa Deprimida del Salado (media loma, bajo dulce y bajo alcalino salino), señaló que aproximadamente el 60% de los aislamientos estaban filogenéticamente relacionados con distintas especies del género *Mesorhizobium* (*M. loti*, *M. amorphae*, *M. mediterraneum* y *M. tianshanense*) mientras que el 40% restante se relacionó con especies de los géneros *Rhizobium*, *Agrobacterium*, así como un único aislamiento del género *Aminobacter* (Cepa BA135). Cabe resaltar que en dicho estudio se identificó por primera vez a un rizobio simbiote de *L. tenuis* del género *Aminobacter*, a pesar de que habitualmente este género se comporta como saprófito del suelo (Estrella *et al.*, 2009). Por otra parte, si bien en dicho estudio no se encontró una relación particular entre la identidad del aislamiento y el tipo de suelo de procedencia, cabe resaltar que la cepa *Aminobacter* sp. BA135 fue aislada de los suelos alcalino-salinos de la Pampa Deprimida del Salado al igual que las cepas identificadas como *Aminobacter* sp. A65, A66, A67, A68 y A69 de este trabajo de Tesis (Tabla IV.2). En este sentido, el hallazgo de nuevas cepas del género *Aminobacter* en los suelos de la localidad de Ayacucho sugieren que el aislamiento BA135, reportado por Estrella y col. (2009) no sería un caso aislado, sino que, por el contrario, probablemente se trate de un taxón habitual en la comunidad de rizobios que coloniza los nódulos de *L. tenuis* en los suelos alcalino-sódicos.

En relación a las cepas del género *Phyllobacterium* reportadas en este estudio (A4, A7), cabe destacar que hasta el presente no se había reportado la presencia de rizobios del género *Phyllobacterium* en los nódulos de *L. tenuis*. Se sabe que algunas especies de este género pueden

encontrarse frecuentemente asociadas a plantas ya sea como endófitos (Mergaert *et al.*, 2002; Flores-Feliz *et al.*, 2013, Valverde *et al.*, 2005) o habitando el rizoplano (Mantelin *et al.*, 2006). Recientemente la especie *Phyllobacterium loti* (cepa tipo S658^T) descrita por Sanchez y col. (2014), fue aislada de nódulos de *L. corniculatus* en Uruguay, sin embargo, resultó incapaz de inducir la formación de nódulos por lo que es probable que necesite asociarse a un rizobio simbiote de esta leguminosa para colonizar dicho órgano.

Los resultados que surgen de este trabajo de tesis y de estudios previos realizados por nuestro grupo demuestran la dominancia del género *Mesorhizobium* entre los simbiotes de *L. tenuis* en la región de la Pampa Deprimida del Salado y la presencia, aunque en menor proporción, de rizobios de otros géneros, entre ellos, taxones considerados “no convencionales” como *Aminobacter* y *Phyllobacterium*, reportados en este estudio. El hallazgo de estas últimas resulta interesante, ya que podrían significar una oportunidad de explorar nuevas cepas con capacidades adaptativas diferentes.

Entre los causales más importantes que explican la diversidad taxonómica en los rizobios, se destaca la Transferencia Horizontal de Genes (THG), que mediante el traslado de clusters de genes simbióticos desde un organismo a otro, permite al organismo receptor la ganancia de funciones adaptativas que resultan ventajosas para la supervivencia bajo ciertas condiciones mediambientales (Languille *et al.*, 2008, Andrews *et al.*, 2018). Los primeros indicios de THG de elementos simbióticos codificados en islas genómicas en rizobios fueron descritos por Sullivan y col. (1995, 1998), quienes demostraron que bacterias aisladas de un campo inicialmente desprovisto de rizobios nativos, eran capaces de nodular *L. corniculatus*. Tales aislamientos contenían una región simbiótica idéntica a la cepa *M. japonicum* R7A inoculada originalmente 7 años antes, demostrando que bacterias adaptadas a las condiciones locales del suelo pueden evolucionar y convertirse en rizobios simbiotes de leguminosas, en un solo paso, por la adquisición de genes simbióticos por mecanismos de THG. Mediante el análisis filogenético de los genes simbióticos (*simbiovars*), es posible inferir potenciales eventos de THG y distinguir subgrupos simbióticamente distintos dentro de una misma especie de rizobios, o distinguir diferentes especies que comparten un mismo clúster de genes simbióticos por efecto de eventos de transferencia lateral de la información simbiótica (Roger *et al.*, 2011).

Las primeras evidencias de eventos de THG de genes simbióticos en bacterias que colonizan nódulos en los bajos salinos alcalinos de la Pampa Deprimida del Salado fueron reportados por Estrella y col. (2009), quienes observaron un alto nivel de conservación de las secuencias nucleotídicas de genes simbióticos (*nodC* y *nifH*) entre rizobios de *L. tenuis* de distintos taxones. En ese sentido, resultaría interesante a futuro extender los análisis para determinar el ancestro común de los genes simbióticos en los aislamientos novedosos aquí reportados.

Como se mencionó anteriormente, además de los 126 rizobios, obtuvimos 12 cepas que al evaluar su infectividad *in vitro* resultaron incapaces de inducir la formación de nódulos, por lo que podría tratarse de presuntos endófitos. No obstante, debido a que no se incluyeron en la identificación taxonómica no fue posible determinar su identidad por lo que ignoramos si se trata de bacterias endófitas “no-rizobios” o “rizobios endófitos no nodulantes”, estos últimos referidos a bacterias de géneros usualmente simbióticas (p.ej. *Rhizobium*), pero que no son infectivos en la planta huésped ya sea porque requieren condiciones diferentes para nodularlas a las que representa un sistema *in vitro* o porque han perdido uno o varios genes simbióticos esenciales.

Desde el primer hallazgo de una bacteria distinta a *Rhizobium* –ahora denominadas endófito-identificada como *Agrobacterium radiobacter*, en nódulos de trébol rojo (Beijerinck y Van Delden, 1902), la frecuencia y diversidad taxonómica de este tipo de bacterias se ha incrementado enormemente. La revisión publicada por Velázquez y col. (2013), evidencia la amplia diversidad de las especies de endófitos de nódulos de leguminosas, dispersos entre bacterias Gram-negativas del filo Proteobacteria, principalmente de la clase *alpha-proteobacteria* y entre dos filo Gram-positivos: Actinobacteria y Firmicutes. Entre los endófitos “no-rizobios” documentados en nódulos de leguminosas se encuentran bacterias de los géneros *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* (Velázquez *et al.*, 2013, Peix *et al.*, 2015). Y aunque no se espera encontrar la presencia de genes *nod* en estos géneros, sí se ha reportado la presencia del gen *nifH* en cepas de los géneros *Microbacterium*, *Agromyces*, *Starkeya* y *Phyllobacterium* (Zakhia *et al.*, 2006).

Por su parte, la presencia de rizobios endófitos no formadores de nódulos también se ha documentado. Por ejemplo, en la caracterización de 154 microsimbiontes asociados a diferentes especies de *Vicia*, si bien se observó la presencia de un gran número de simbiontes noduladores efectivos de *Rhizobium leguminosarum*, también se evidenció la presencia de cepas endófitas no nodulantes, de las cuales 22 cepas estaban filogenéticamente relacionadas con *R. leguminosarum* biovar *viciae*. Interesantemente estos endófitos no nodulantes carecían de genes simbióticos (Lei *et al.*, 2008). Adicionalmente la presencia de rizobios en otros órganos diferentes al nódulo también ha sido reportado. Un análisis de diversidad de endófitos asociados a trébol rojo evidenció la presencia sistémica de especies de *Rhizobium*, tanto en hojas como en raíz (Sturtz *et al.*, 1997). Lo que indicaría que el hallazgo de rizobios no estaría limitado a la rizofera y raíz de las plantas.

En vista del frecuente hallazgo de endófitos de nódulos, un análisis combinado de técnicas microbiológicas y moleculares de la población bacteriana de los nódulos de leguminosas nativas, demostró la existencia de bacterias endófitas no nodulantes co-habitando con rizobios no cultivables, lo que hipotéticamente explicaría su presencia en el nódulo a cuenta de la carencia de genes simbióticos en bacterias endófitas (Muresu *et al.*, 2008)

Hasta hace un tiempo el rol de los endófitos dentro de los nódulos no era tomado en cuenta, sin embargo, estudios recientes evidencian las características PGPR de estos, sugiriendo su potencial efecto sinérgico en la mejora de la “*performance*” de los huéspedes. En condiciones de salinidad, el efecto de dos aislamientos endófitos no noduladores de *Vigna unguiculata* (1E) y *Glycine max* (26E) con características PGPR *in vitro* se evidenció mediante la mejora de crecimiento y aumento significativo del peso seco de la raíz, el índice de clorofila, la concentración de fósforo de la raíz y el peso de 1000 granos en plantas de trigo en comparación con las plantas no inoculadas (Bakhtiyarifar *et al.*, 2021). Otro estudio reciente en *Lotus parviflorus* reveló, entre los aislamientos de nódulos, la presencia de bacterias no nodulantes de las clases *alpha-* (*Rhizobium/Agrobacterium*), *beta-* (*Massilia*) y *gamma-proteobacteria* (*Pseudomonas*, *Lysobacter*, *Luteibacter*, *Stenotrophomonas* y *Rahnella*). Algunos de ellos mostraron características PGPR como la producción de enzimas líticas, actividad antagonista, solubilización de fosfato o producción de sideróforos (Soares *et al.*, 2020). Cabe mencionar que hasta el momento no se han explorado las poblaciones bacterianas diferentes a rizobios cultivables presentes en los nódulos de *L. tenuis*. No obstante, en vista de la obtención de 12 aislamientos no nodulantes, resultaría interesante a futuro extender y profundizar el estudio de los microorganismos endófitos de nódulos en *L. tenuis*.

IV.4. Tolerancia *in-vitro* a condiciones alcalino-salinas

Siguiendo con el objetivo de aislar rizobios tolerantes a condiciones alcalino-salinas, se evaluó su comportamiento *in vitro* en condiciones restrictivas. Para ello se seleccionó un representante de cada grupo BOX (Tabla IV.3) para analizar su tolerancia a condiciones de salinidad (S1 = 100mM NaCl, S2 = 200mM NaCl, S3 = 300mM NaCl), alcalinidad (A1 = pH 8.0, A2= pH 8.5) y salinidad-alcalinidad (M1 = 8.0 + 100mM NaCl, M2 = 8.0 + 150 mM NaCl). Las pruebas se realizaron mediante la técnica de diluciones en gota “*Drop plate*”, de cultivos individuales de cada aislamiento en medio TY modificado (Figura IV.3). El crecimiento bacteriano se clasificó de la siguiente manera: Tolerante = (++), Tolerancia reducida = (+), Afectado = (- -), Sensible = (---), según el criterio descrito en II.5.4.

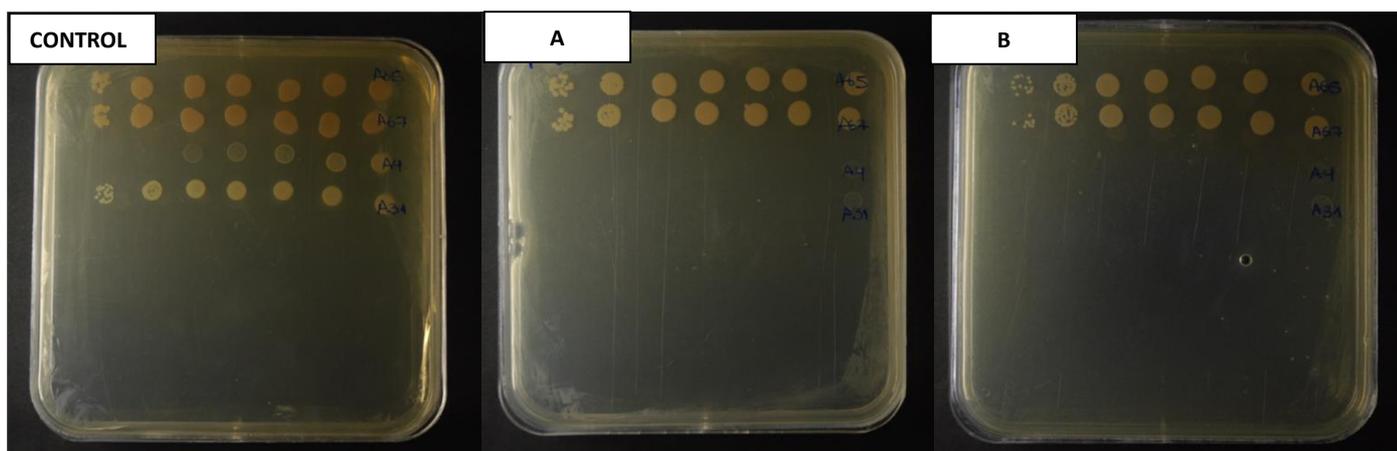


Figura IV.3 Imágenes referenciales de la prueba de tolerancia a condiciones salinas, alcalinas y salino-alcalinas. El ensayo se realizó mediante la técnica de diluciones seriadas en gota de los cultivos de aislamientos individuales en medio de cultivo TY (Control) o TY modificado (A= pH 8 + 100mM NaCl, B = pH 8 + 150mM NaCl). El orden de las diluciones se muestra de derecha a izquierda desde la dilución más baja hasta la más alta

Como se describe en la Tabla IV.3, en condiciones salinas el 30.9% de los aislamientos evaluados mostró un fenotipo de tolerancia o de tolerancia reducida a 100 mM de NaCl (S1) y solo el 3.6% resultó tolerante a 200 mM NaCl (S2 y S3). En cuanto a los tratamientos de alcalinidad, aproximadamente el 50% evidenció tolerancia o tolerancia reducida a pH 8.0 (A1), mientras que a pH 8.5 la población tolerante se redujo al 16.3%. Si bien se contabilizaron 14 aislamientos (25.4%) capaces de tolerar salinidad (100 mM NaCl) y alcalinidad (pH 8.0 y/o 8.5) de forma independiente, ninguno de ellos fue capaz de crecer cuando ambos factores de estrés se combinaron (M1 y M2) a excepción de la cepa A65, la cepa representante del grupo genotípico LV, que fue capaz de crecer en todas las condiciones ensayadas (Figura IV.3).

Tabla IV.3. Descripción del fenotipo de tolerancia en condiciones salinas, alcalinas y salino-alcalinas de los rizobios aislados de *L. tenuis*

Aislamientos	Grupo BOX	Salinidad			Alcalinidad		Salinidad y Alcalinidad	
		S1	S2	S3	A1	A2	M1	M2
P264	I	+	---	---	++	++	---	---
P265	II	---	---	---	---	---	---	---
P246	III	--	---	---	---	---	---	---
P228	IV	+	---	---	++	---	---	---
P249	V	+	---	---	++	+	---	---
MA146	VI	+	---	---	++	++	---	---
P225	VII	+	---	---	++	++	---	---
P224	VIII	+	---	---	++	++	---	---
P258	VIX	+	---	---	++	++	---	---
P252	X	---	---	---	---	---	---	---
P244	XI	---	---	---	++	---	---	---
A30	XII	+	---	---	++	++	---	---
P270	XIII	---	---	---	---	---	---	---
P230	XIV	---	---	---	+	---	---	---
P237	XV	+	---	---	---	---	---	---
A21	XVI	--	---	---	++	+	---	---
A20	XVII	---	---	---	---	---	---	---
A4	XVIII	---	---	---	---	---	---	---
P240	XIX	--	---	---	--	---	---	---
P248	XX	--	---	---	---	---	---	---
A18	XXI	--	---	---	++	---	---	---
MA161	XXII	---	---	---	---	---	---	---
A40	XXIII	--	---	---	---	---	---	---
MA166	XXIV	---	---	---	---	---	---	---
A1 A5	XXV	---	---	---	---	---	---	---
A12	XXVI	---	---	---	++	---	---	---
A13	XXVII	---	---	---	++	---	---	---
MA135	XXVIII	++	---	---	++	---	---	---
MA163	XXIX	---	---	---	---	---	---	---
A39	XXX	---	---	---	---	---	---	---
MA160	XXXI	--	---	---	---	---	---	---
A7	XXXII	++	---	---	---	---	---	---
P238	XXXIII	++	+	---	---	---	---	---
A32 A33	XXXIV	+	---	---	++	---	---	---
MA170	XXXV	--	---	---	++	--	---	---
A34	XXXVI	+	---	---	++	---	---	---
A17	XXXVII	--	---	---	++	---	---	---
MA128	XXXVIII	++	---	---	++	---	---	---
MA169	XXXIX	--	---	---	++	--	---	---
A31 P243	XL	++	---	---	++	---	---	---
MA144	XLI	--	---	---	++	--	---	---
MA172	XLII	--	---	---	---	---	---	---
A8	XLIII	--	---	---	++	---	---	---
P235	XLIV	---	---	---	---	---	---	---
A43	XLV	--	---	---	---	---	---	---
MA164	XLVI	--	---	---	---	---	---	---
MA142	XLVII	--	---	---	++	--	---	---
A42	XLVIII	--	---	---	---	---	---	---
MA167	XLIX	--	---	---	++	---	---	---
P247	L	---	---	---	---	---	---	---
MA125	LI	---	---	---	---	---	---	---
A16	LII	--	---	---	++	--	---	---
MA126	LIII	--	---	---	--	--	---	---
P267	LIV	---	---	---	---	---	---	---
A65	LV	++	++	+	++	++	++	++

n = Número de Aislamientos; S1: 100mM NaCl, S2: 200mM NaCl, S3: 300mM NaCl, A1: 8.0, A2: 8.5, M1: pH 8.0 + 100mM NaCl, M2: pH 8.0 + 150mM NaCl. La asignación del fenotipo fue la siguiente: Tolerante (++), Tolerancia reducida (+), Afectado (--), Sensible (---)

Según el comportamiento de los aislamientos frente a cada condición de estrés individual (salinidad o alcalinidad), la salinidad pareciera afectar más el crecimiento que la alcalinidad, teniendo en cuenta la proporción de tolerantes registrada en cada condición ensayada (30.9 y 3.6% de tolerantes o tolerancia reducida a 100 y 200 mM NaCl, respectivamente frente al 50% y 16.3% de tolerantes o con tolerancia reducida a pH 8.0 y pH 8.5, respectivamente). En los ensayos de salinidad se observó incluso una reducción drástica del número de tolerantes conforme se incrementan las concentraciones de 100 a 200 mM NaCl. Por otro lado, si bien a pH 8.0 aproximadamente el 50% de la población de rizobios creció sin dificultad, es importante tener en cuenta que dicho valor se encuentra por debajo del valor característico de los suelos alcalinos-sódicos de la región de la Pampa Deprimida del Salado (pH > 8.5). Los rizobios tolerantes a pH 8.5 a su vez crecieron a 100mM de salinidad (P264, MA146, P225, P224, P258, A30, A65). No obstante, las condiciones mixtas salino-alcálicas (M1 y M2) afectaron el crecimiento de casi la totalidad de aislamientos a excepción de A65 (grupo box, LV).

En contraste con lo observado con las bacterias solubilizadoras de fosfato (capítulo III), se observó que la probabilidad de encontrar rizobios tolerantes a estrés salino-alcálico (al menos en condiciones *in vitro*) es significativamente menor, lo que sugiere *a priori* la necesidad de un mayor esfuerzo de muestreo para poder obtener un mayor número de rizobios simbiotes de *L. tenuis* tolerantes a condiciones salino-alcálicas. Por otro lado, la reducción drástica del crecimiento refleja la dificultad que tienen los rizobios para la formación de colonias bajo las condiciones ensayadas. Estos resultados concuerdan con lo reportado en varios estudios, en los que se muestra un efecto inhibitorio mayoritario en las poblaciones rizobianas a partir de los 100 mM de NaCl (Lippi *et al.*, 2000; Maatallah *et al.*, 2002; Zurayk *et al.*, 1998). Un estudio sostiene la existencia de una correlación entre la velocidad de crecimiento del rizobio y la tolerancia a salinidad (Odee *et al.*, 1997). En ese sentido los rizobios de crecimiento intermedio (como *Mesorhizobium*), podrían ser menos tolerantes que aquellos de rápido crecimiento (como *Rhizobium*). En un análisis de 18 cepas tipo del género *Mesorhizobium*, se observó que la mayoría de ellas son poco tolerantes a salinidad a 1.5 y 3.0% de NaCl y totalmente sensibles a pH 9.0 (Laranjo y Oliverira, 2011). En concordancia, observaciones similares se describen para la población de *Mesorhizobium* asociada a *Lotus lancerottensis* aislados de suelos alcalinos en Lanzarote (Islas Canarias), que evidenciaron mayor sensibilidad a condiciones alcalinas (pH 9) (Leon-Barrios *et al.*, 2017). No obstante, mediante los estudios de prospección, es posible hallar cepas de *Mesorhizobium* adaptadas a las características edáficas del ambiente que colonizan (Sannazzaro *et al.*, 2018, Singh *et al.*, 2016, Wei *et al.*, 2008). Incluso algunas de ellas con potencial efecto promotor en suelos estresantes. En este aspecto es importante traer a colación lo observado en el apartado III.5 del capítulo anterior, en donde el uso de la cepa *Mesorhizobium sanjuanii* BSA136 (Estrella *et al.*, 2009, Sannazzaro *et al.*, 2018) promovió positivamente el

crecimiento de *L. tenuis* en suelo restrictivos y mejoró significativamente en combinación con otra bacteria con características PGPR.

Si bien, *a priori*, es esperable que el comportamiento de las bacterias bajo condiciones *in vitro* sea extrapolable a los sistemas *in vivo*, la complejidad de los suelos y la plasticidad de los mecanismos de respuesta de los microorganismos, requiere de la validación de los fenotipos *in vitro* en sistemas *in vivo*. En ese aspecto, con el fin de evaluar lo observado en condiciones *in vitro*, se evaluó la persistencia de cepas seleccionadas en suelos provenientes de los bajos alcalino-sódicos.

IV. 5. Tolerancia *in vivo* a condiciones alcalino - sódicas

De acuerdo a los resultados de la Tabla IV.3, se reconocieron 5 grupos con comportamientos fenotípicos diferentes: Rizobios sensibles a todas las condiciones (A), rizobios tolerantes a salinidad y alcalinidad por separado (B), tolerantes a salinidad, alcalinidad y salinidad + alcalinidad (C), tolerantes a alcalinidad (D) y tolerantes a salinidad (E). De cada grupo se seleccionaron aleatoriamente 2 aislamientos para evaluar su comportamiento en el suelo restrictivo. El suelo alcalino-sódico estéril fue inoculado con cultivos en fase exponencial de cada aislamiento e incubado bajo condiciones controladas durante 28 días, haciendo recuentos en 3 momentos, T₁= Día 7, T₂ = Día 14 y T₃ = Día 28. Adicionalmente se cuantificaron las UFC/ml presentes en el inóculo inicial (I_i).

Tabla IV.4. Ensayo de supervivencia en suelo alcalino-sódico.

CEPA	Grupo	UFC/gramo de suelo			
		I _i	T ₁	T ₂	T ₃
MA153	A	1,4 x 10 ⁷ (a)	1,6x10 ⁶ (b)	2,4x10 ⁴ (c)	1,3x10 ⁴ (c)
A37		nd	nd	nd	nd
P264	B	4x10 ⁶	1,17x10 ⁶	2,25x10 ⁶	1,3x10 ⁶
A26		2x10 ⁶ (a)	4,5x10 ⁵ (b)	1,5x10 ⁶ (ab)	1,5x10 ⁶ (ab)
A65	C	3x10 ⁶ (a)	1,50x10 ⁶ (a)	2,4x10 ⁶ (a)	1,43 x10 ⁶ (a)
A67		3x10 ⁶ (a)	1,01x10 ⁶ (a)	1,5x10 ⁶ (a)	2,0x10 ⁶ (a)
A44	D	2,3x10 ⁷ (c)	2,05x10 ⁵ (ab)	1x10 ⁶ (b)	1,5x10 ⁵ (a)
A24		2x10 ⁶ (a)	1x10 ⁴ (b)	1x10 ⁶ (ab)	2x10 ⁵ (ab)
P241	E	3x10 ⁶ (b)	1x10 ⁶ (ab)	8x10 ⁴ (a)	9x10 ⁴ (a)
MA148		1,3x10 ⁶ (b)	1x10 ⁶ (b)	7,5x10 ⁴ (ab)	8x10 ⁴ (a)
	Control	0	0	0	0

I_i: Inóculo inicial, T₁= día 7, T₂ = día 15, T₃ = día 28; nd = no determinado. Los resultados representan la media aritmética de 2 réplicas biológicas. Los valores fueron analizados mediante ANOVA seguido del test de Tukey como post-hoc. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (p≤0.05) de los tratamientos a los distintos tiempos.

En la tabla IV.4 se detallan los resultados de la cuantificación de la UFC/gramo de suelo respecto al tiempo de incubación. Tal como se menciona anteriormente, 2 representantes por cada grupo fenotípico fueron seleccionados para esta evaluación. No obstante, no fue posible cuantificar

las UFC/gramo de suelo de la cepa A37, por un evento de contaminación externa. Como punto de partida se observa la disminución significativa de entre uno y dos órdenes en la cuantificación de células viables a los 7 días post inoculación (T1) en los grupos A (sensibles) y D (tolerantes alcalinidad). Entre ellos, el grupo A disminuye su población hasta en 3 órdenes a lo largo de T₂ y T₃, mientras que el grupo D parece mantener su población ya que no muestra cambios significativos en T₂ y T₃. Por otro lado, los grupos B (tolerantes a salinidad y alcalinidad), C (tolerante a salinidad, alcalinidad y salinidad + alcalinidad) y E (tolerantes a salinidad) no muestran reducción a T₁ (excepto A26), no obstante, solo los grupos B y C mantienen una población constante, mientras que el grupo E reduce su población hasta en dos órdenes en T₂ y T₃. Es destacable el comportamiento de los aislamientos del grupo C, cualificados como tolerantes a todas las condiciones ensayadas, ya que no evidenciaron cambios en las células viables a lo largo de los tiempos evaluados. En ese sentido, estos resultados a priori parecen guardar relación con lo observado en condiciones de evaluación *in vitro*, en donde las cepas con fenotipo sensible (total o parcial a una sola condición) disminuyen su población inicial significativamente mientras que aquellos de fenotipo más tolerante, la mantienen. Asimismo, como dato adicional (no mostrado) es importante resaltar que el recuento de UFC en el medio de cultivo post rescate se realizó a los 5 días en todos los casos. No obstante, solo en las cepas del grupo C se observó el crecimiento total de colonias en todas las diluciones a partir de las 72 horas. Ello sugiere las notables diferencias fisiológicas de las cepas del grupo C en cuanto al crecimiento en comparación con el resto de cepas evaluadas.

Algunos estudios han evidenciado el efecto de las condiciones del suelo en las poblaciones de cepas de *Rhizobium*, destacando la reducción que sufren estas poblaciones bajo diferentes situaciones. Por ejemplo, el número de células viables de cepas de *R. leguminosarum* biovar *viciae* (RC1001, 1044 y Okadín) se reduce significativamente en condiciones de suelo salinizado a 1 y 2% de NaCl a partir del primer mes de evaluación. Efectos similares se observan en *R. leguminosarum* biovar cepa ANU 843 en suelos contaminados con Zn luego de 28 días de inoculación (Abd-alla y Wahab, 1995, Broos *et al.*, 2005). En concordancia con lo observado, un estudio en cepas de *Rhizobium* aisladas de diferentes leguminosas en suelos afectados por sal, evidenció que cepas con fenotipos sensibles -cualificadas según su crecimiento en medio cultivo con altos valores de conductividad eléctrica- mostraron una disminución en el número de células viables a partir de los 27 días post-inoculación cuando fueron inoculados en suelo salino, mientras que aquellas cualificadas como tolerantes mantuvieron el número de células viables durante el periodo de evaluación (Singleton *et al.*, 1982).

A diferencia de los trabajos realizados en rizobios durante su etapa simbiótica con leguminosas, que han sido extensamente estudiados incluso bajo condiciones de estrés (Gulati, 2018, Karmakar *et al.*, 2015, Lebrazi y Benbrahim, 2014), los estudios sobre su comportamiento en

condiciones de vida libre (como saprófitos) son muy escasos. Sin embargo, esta etapa es extremadamente relevante, ya que el éxito que pueda tener cualquier bioinsumo en cultivos de interés agrícola depende fuertemente de la capacidad de supervivencia de los microorganismos que lo componen, en las condiciones del suelo donde se aplican.

Algunos géneros bacterianos como *Bacillus*, *Streptomyces* y *Clostridium* han desarrollado células especializadas, como esporas, que contienen al citoplasma deshidratado encapsulado bajo múltiples capas protectoras, permitiéndole resistir las condiciones ambientales extremas, mientras que otras como *Staphylococcus aureus* entran en un estado de reducción de funciones vitales a lo mínimo necesario para la viabilidad celular (Gray *et al.*, 2019, Watson *et al.*, 1998). No obstante, a diferencia de estos taxones, la mayoría de los géneros de rizobios, está compuesta por organismos no formadores de esporas y las hipótesis más sólidas indican que estos microorganismos pueden sobrevivir al entorno del suelo gracias a su capacidad para formar biopelículas en superficies abióticas o bióticas (Rinaudi *et al.*, 2006, Fujishige *et al.*, 2006, 2008).

Las biopelículas son agregados celulares bacterianos altamente complejos, encapsulados en una matriz de polímeros extracelulares, adheridos generalmente a superficies sólidas (Solanki *et al.*, 2019). Y las bacterias que la componen se conectan entre sí por las fibras de los polisacáridos y otros biopolímeros, que proporcionan fuerzas cohesivas, nutrientes y protección frente a condiciones ambientales adversas (Emanuel *et al.*, 2010). Se sugiere a la producción de exopolisacáridos (EPS), componentes esenciales de las biopelículas, como una de las respuestas bacterianas más extendidas frente a diferentes condiciones de estrés abiótico (Qurashi y Sabri, 2012; Zhang *et al.*, 2020) En el caso particular de los rizobios, cumplen además un rol importante en la interacción con la planta huésped. En *Sinorhizobium meliloti* se ha demostrado que la deficiencia en la producción de EPS afecta no solo el desarrollo normal de la estructura de la biopelícula sino también interfiere en la capacidad infectiva (Fujishige *et al.*, 2006). Todo ello sugiere la complejidad del comportamiento de los rizobios cuando se enfrentan a las condiciones ambientales del suelo. Si bien hay una correspondencia entre el comportamiento *in vitro* y en el suelo restrictivo, es necesario ser cautelosos con la extrapolación de resultados entre un sistema y otro.

A partir de los análisis realizados y basándonos en el comportamiento observado tanto *in vitro* como en suelo, se seleccionó a la cepa A65 (representante del grupo genotípico LV) para profundizar en los estudios de identificación taxonómica, por sus características destacadas en cuanto a tolerancia y supervivencia en condiciones alcalino-sódicas.

IV. 6. Estudio Taxonómico de la cepa A65

Como se precisó anteriormente, A65 es una cepa promisoría para el desarrollo de biofertilizantes a ser aplicados en suelos con condiciones restrictivas. Por lo tanto, nos propusimos precisar su identidad taxonómica mediante un análisis filogenético del marcador taxonómico ARNr 16S usando secuencias de referencia de los grupos taxonómicos más relacionados del orden *Rhizobiales*, en base a lo reportado por diversos autores (Velazquez *et al.*, 2017; Rivas *et al.*, 2009; y Estrella *et al.*, 2009).

La cepa A65 se agrupó dentro del clúster formado por especies del género *Aminobacter*, junto con la cepa BA135, aislada previamente de nódulos de *L. tenuis* cultivados en condiciones controladas en suelos alcalino-sódicos (Estrella *et al.*, 2009), y la cepa *Aminobacter ciceronei* DSM15910^T. Cabe resaltar que estas cepas forman parte de un mismo clado conjuntamente con cepas de los géneros *Mesorhizobium* y *Phyllobacterium*, todos ellos dentro de la familia *Phyllobacteriaceae* (Figura 4.4). El porcentaje de similitud entre la cepa A65 y la cepa *Aminobacter ciceronei* DSM15910^T reveló valores 99.41% a nivel del ARNr 16S. No obstante, como se explica en el apartado III.3, debido a la resolución limitada de este gen para lograr la identificación a nivel de especie, resultó necesario el uso de marcadores taxonómicos adicionales (Peix *et al.*, 2015).

Dentro del grupo *Phyllobacteriaceae*, los genes “housekeeping” más utilizados incluyen *atpD*, *dnaK*, *glnII*, *gltB*, *gyrB*, *recA*, *rpoA*, *rpoB*, *trpB* (Delamuta *et al.*, 2012; Ribeiro *et al.*, 2009, 2012; Dall’Agnol *et al.*, 2017; Helene *et al.*, 2015, 2017, 2019). De todos estos, para precisar la posición taxonómica de A65 dentro del género *Aminobacter* sp, se seleccionaron como marcadores filogenéticos a los genes *glnII* y *dnaK*, (Figura 4.5). Además, la cepa *Aminobacter* BA135, simbionte de *L. tenuis* y previamente aislada de los bajos alcalino sódicos (Estrella *et al.*, 2009), se incluyó en esta comparación.

El árbol MLSA (Figura IV.5) agrupó a la cepa A65 en el mismo clado con la cepa de *A. ciceronei* DSM15910^T y la cepa simbionte BA135. Estos resultados nos permiten inferir que tanto la cepa A65 como la cepa BA135 corresponden a miembros de la especie *Aminobacter ciceronei*.

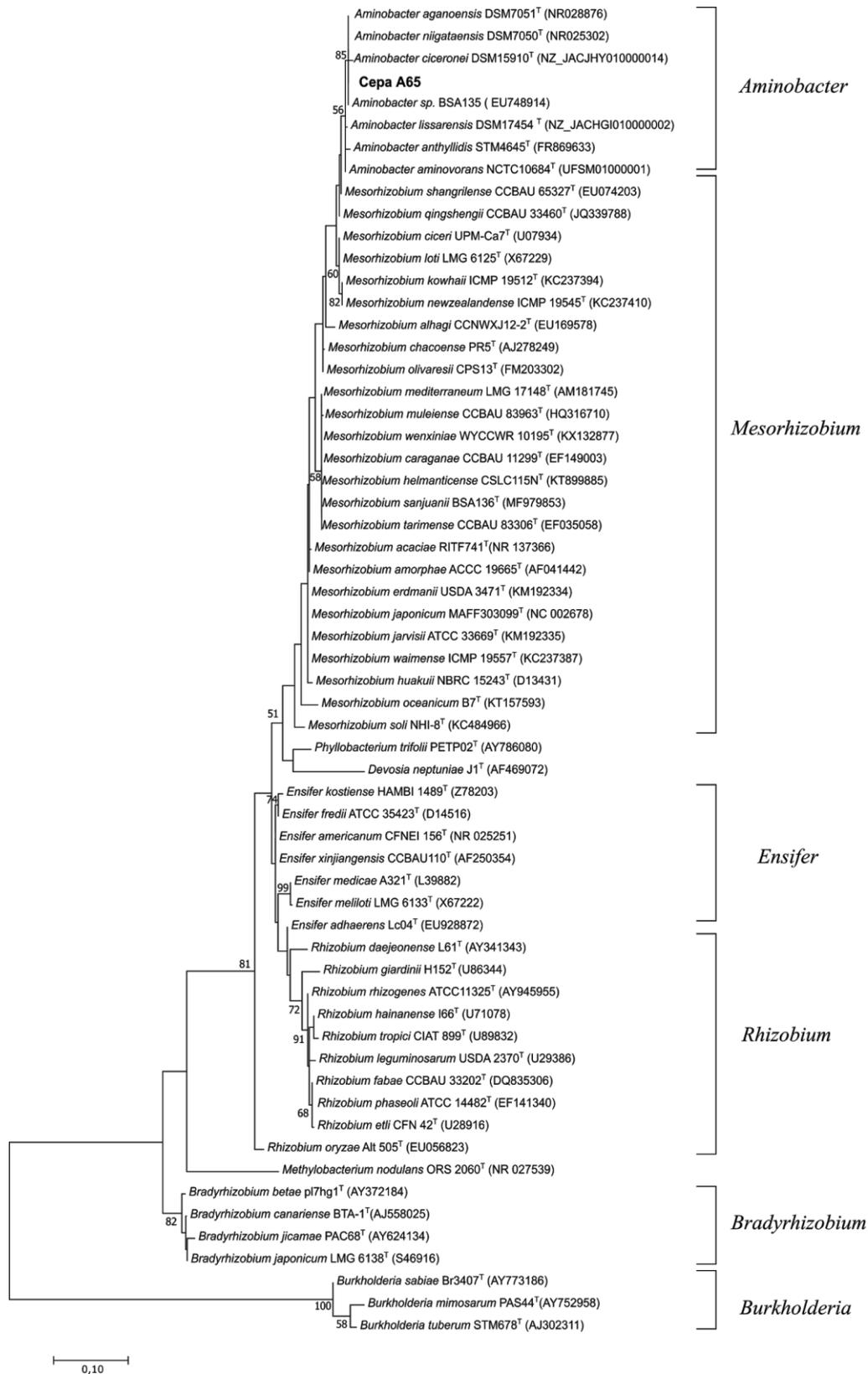


Figura IV.4 Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en secuencias del gen ARNr 16S (670 nucleótidos) que muestra la posición de la cepa A65 (indicada en negrita) dentro del género *Aminobacter* (números de acceso detallados en anexo VI.8.2). El árbol fue reconstruido usando el modelo Kimura-2-parámetro (G + I). Los valores de *bootstrap* calculados para 1000 réplicas se indican en los nodos. Los valores superiores al 50% en el que los taxones asociados se agrupan se muestran junto a las ramas. Los números de acceso de las secuencias utilizadas se muestran entre paréntesis.

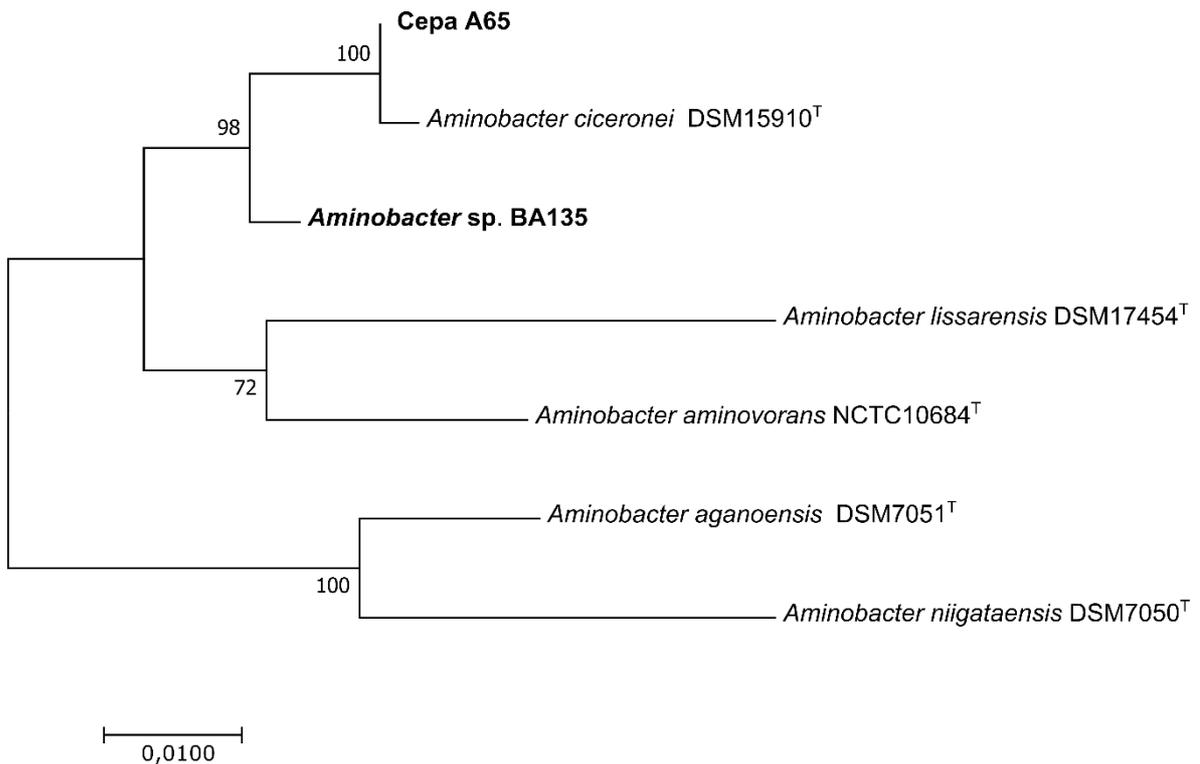


Figura IV.5. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en secuencias de genes concatenados de ARNr 16S, *dnaK* y *glnII* (1492 nucleótidos) que muestran la posición de las cepas A65 y BA135 (indicadas en negrita) dentro del género *Aminobacter* (números de acceso detallados en el anexo IV.8.1). El árbol fue reconstruido usando el modelo Tamura-nei y el modelo de distribución gamma (G + I). Los valores de *bootstrap* calculados para 1000 réplicas se indican en los nodos. Los valores superiores al 50% en el que los taxones asociados se agrupan se muestran junto a las ramas. Los números de acceso de las secuencias utilizadas se muestran entre paréntesis (IV.8.1)

El género *Aminobacter* está conformado por bacterias Gram negativas, no formadoras de esporas y con flagelos subpolares. Utilizan amonio, nitrato, urea, peptona y metilamina como fuentes de nitrógeno y carbono, además son capaces de crecer normalmente entre pH 6.0 y 9.0. (Urakami *et al.*, 1992). Los estudios realizados en bacterias este género, han puesto en valor sus potenciales aplicaciones biotecnológicas. La cepa *A. aminovorans* DSM7048 (=NCTC10684), aislada de suelos con trimetilamina (TMA) (Urakami *et al.*, 1992), ha sido reportada por su capacidad de biodegradar TMA, sustancia responsable del olor desagradable asociado a la descomposición del pescado y otros olores molestos generados por actividades industriales (Aguirre *et al.*, 2018). En tanto, cepas de *Aminobacter anthyllidis* (STM4645^T = LMG26462^T = CFBP7437^T) tolerantes a suelos contaminados con relaves mineros se encontraron asociados a *Anthyllis vulneraria*, una leguminosa adecuada para la fitoestabilización de zonas mineras (Maynaud *et al.*, 2012). Si bien estas últimas fueron capaces de nodular *A. vulneraria*, cabe resaltar que el primer reporte que puso en evidencia la capacidad simbiótica de miembros de este género en consecuencia de la adquisición de funciones simbióticas fue realizado por nuestro grupo (Estrella *et al.*, 2009). En ese estudio se estableció que la cepa *Aminobacter* sp. BA135, aislada de un suelo alcalino-sódico de la pampa Deprimida del Salado, tiene la capacidad de formar nódulos fijadores de N₂ en plantas de *L. tenuis* (Estrella *et al.* 2009). En ese sentido, los resultados descritos en este capítulo, no solo confirman la presencia de cepas de este género como parte de los simbiontes de *L. tenuis* en estos ambientes, sino que además se demuestra su capacidad de tolerar condiciones alcalino-sódicas.

IV.7. Anexos

Anexo IV.7.1

Secuencias de referencia de las cepas tipo de *Aminobacter*

CEPA	REFERENCIA	<i>dnaK</i>	
<i>Aminobacter aganoensis</i> DSM7051 ^T	Urakami <i>et al.</i> , 1992	NZ_JACHOU010000007.1:119336 - 119075	NZ_JA
<i>Aminobacter aminovorans</i> NCTC10684 ^T	Urakami <i>et al.</i> , 1992	UFSM01000001.1:687944-688205	UFS
<i>Aminobacter anthydilis</i> STM4645 ^T	Maynaud <i>et al.</i> , 2013		
<i>Aminobacter ciceronei</i> DSM15910 ^T	McDonald <i>et al.</i> , 2005	NZ_JACJHY010000014.1:42698-42959	NZ_
<i>Aminobacter lissarensis</i> DSM17454 ^T	McDonald <i>et al.</i> , 2005	NZ_JACHGI010000002.1:644586-644847	NZ_JA
<i>Aminobacter niigataensis</i> DSM7050 ^T	Urakami <i>et al.</i> , 1992	NZ_JACHOT010000004.1:137218-137479	NZ_JA
<i>Aminobacter</i> sp. BA135	Estrella <i>et al.</i> , 2009	data no publicada	

Anexo IV.7.2

Secuencias de referencia de las cepas tipo de rizobios

Cepa	Acceso	Cepa
<i>Aminobacter aganoensis</i> DSM7051 ^T	NR028876	<i>Mesorhizobium oceanicum</i> B7 ^T
<i>Aminobacter niigataensis</i> DSM7050 ^T	NR025302	<i>Mesorhizobium soli</i> NHI-8 ^T
<i>Aminobacter ciceronei</i> DSM15910 ^T	NR041700	<i>Phyllobacterium trifolii</i> PETP02 ^T
<i>Aminobacter</i> sp. BA135	EU748914	<i>Devosia neptuniae</i> J1 ^T
<i>Aminobacter lissarensis</i> DSM 17454 ^T	AF107722	<i>Ensifer kostiense</i> HAMBI 1489 ^T
<i>Aminobacter anthyllidis</i> STM4645 ^T	FR869633	<i>Ensifer fredii</i> ATCC35423 ^T
<i>Aminobacter aminovorans</i> NCTC10684 ^T	NZ_UFSM01000001	<i>Ensifer americanum</i> CFNEI156 ^T
<i>Mesorhizobium shangrilense</i> CCBAU 65327 ^T	EU074203	<i>Ensifer xinjiangensis</i> CCBAU110 ^T
<i>Mesorhizobium qingshengii</i> CCBAU33460 ^T	JQ339788	<i>Ensifer medicae</i> A321 ^T
<i>Mesorhizobium ciceri</i> UPM-Ca7 ^T	U07934	<i>Ensifer meliloti</i> LMG6133 ^T
<i>Mesorhizobium loti</i> LMG6125 ^T	X67229	<i>Ensifer adhaerens</i> Lc04 ^T
<i>Mesorhizobium kowhii</i> ICMP19512 ^T	KC237394	<i>Rhizobium daejeonense</i> L61 ^T
<i>Mesorhizobium newzealandense</i> ICMP 19545 ^T	KC237410	<i>Rhizobium giardinii</i> H152 ^T
<i>Mesorhizobium alhagi</i> CCNWXJ12-2 ^T	EU169578	<i>Rhizobium rhizogenes</i> ATCC11325 ^T
<i>Mesorhizobium chacoense</i> PR5 ^T	AJ278249	<i>Rhizobium hainanense</i> I66 ^T
<i>Mesorhizobium olivaresii</i> CPS13 ^T	FM203302	<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 ^T
<i>Mesorhizobium mediterraneum</i> LMG17148 ^T	AM181745	<i>Rhizobium leguminosarum</i> USDA2370 ^T
<i>Mesorhizobium muleiense</i> CCBAU83963 ^T	HQ316710	<i>Rhizobium fabae</i> CCBAU33202 ^T
<i>Mesorhizobium wenxiniae</i> WYCCWR 10195 ^T	KX132877	<i>Rhizobium phaseoli</i> ATCC14482 ^T
<i>Mesorhizobium caraganae</i> CCBAU11299 ^T	EF149003	<i>Rhizobium etli</i> CFN42 ^T
<i>Mesorhizobium helmanticense</i> CSLC115N ^T	KT899885	<i>Rhizobium oryzae</i> Alt505 ^T
<i>Mesorhizobium sanjuanii</i> BSA136 ^T	MF979853	<i>Methylobacterium nodulans</i> ORS2060 ^T

<i>Mesorhizobium tarimense</i> CCBAU83306 ^T	EF035058	<i>Bradyrhizobium betae</i> pl7hg1 ^T
<i>Mesorhizobium acaciae</i> RITF741 ^T	NR137366	<i>Bradyrhizobium canariense</i> BTA-1 ^T
<i>Mesorhizobium amorphae</i> ACCC19665 ^T	AF041442	<i>Bradyrhizobium jicamae</i> PAC68 ^T
<i>Mesorhizobium erdmannii</i> USDA 3471 ^T	KM192334	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> LMG6138 ^T
<i>Mesorhizobium japonicum</i> MAFF303099 ^T	NC002678	<i>Burkholderia sabiae</i> Br3407 ^T
<i>Mesorhizobium jarvisii</i> ATCC33669 ^T	KM192335	<i>Burkholderia mimosarum</i> PAS44 ^T
<i>Mesorhizobium waimense</i> ICMP 19557 ^T	KC23787	<i>Burkholderia tuberum</i> STM678 ^T
<i>Mesorhizobium huakuii</i> NBRC15243 ^T	D13431	

CAPÍTULO V

Mecanismos involucrados en la respuesta al estrés salino-alkalino de la cepa *Aminobacter* sp. BA135

V.1. Introducción

Las condiciones ambientales del suelo son factores críticos para el crecimiento, multiplicación y supervivencia de los rizobios en el suelo, así como para el establecimiento exitoso de la interacción simbiótica con su huésped (Abd-alla, 2014). Tal es la influencia de los factores abióticos sobre la composición de la comunidad de rizobios, que puede verse ejemplificada en las diferencias que se observan entre los simbioses de una misma leguminosa que provienen de diferentes ubicaciones geográficas (Karmakar *et al.*, 2015). Afortunadamente algunos rizobios poseen la capacidad de adecuarse a dichos ambientes mediante el uso de mecanismos adaptativos y cambios a niveles fisiológicos, bioquímicos y moleculares (Atieno y Lesueur, 2019; Zhang *et al.*, 2020; Kajíc *et al.*, 2016) que, junto con las estrategias desplegadas por el huésped, permiten el establecimiento exitoso de la relación simbiótica.

Aunque los estudios sobre estos simbioses tolerantes se han incrementado en los últimos años, muchos de ellos están mayormente centrados en la descripción de la diversidad (McInnes *et al.*, 2004, Martínez-Romero y Caballero-Mellado, 1996) y en menor medida en la comprensión y dilucidación de los mecanismos involucrados. Esto último resulta por lo menos interesante, ya que el conocimiento y la comprensión de estos factores fisiológicos y moleculares de respuesta al estrés de los rizobios, puede ser crucial en la selección de cepas con alto potencial para la fijación de nitrógeno en ambientes particulares.

Entre las estrategias de identificación de genes involucrados en una determinada respuesta, una de las más empleadas es la mutagénesis aleatoria, una técnica de evolución dirigida que introduce mutaciones puntuales aleatorias en genomas completos y que proporciona información sobre la función puntual de genes bacterianos. No obstante, gracias a los avances en las tecnologías de secuenciación masiva y a las herramientas bioinformáticas con las que se cuenta en la actualidad, también es posible lograr una comprensión integrada y a escala global del comportamiento de los organismos en ambientes complejos (Meena *et al.*, 2017). En particular, los análisis transcriptómicos mediante la aplicación de la técnica del RNA-seq, permiten estimar cambios en la expresión génica durante la respuesta a condiciones específicas, como lo es el estrés mixto salino-alcalino, lo que permite inferir los posibles mecanismos involucrados.

Teniendo en cuenta la utilidad de estas aproximaciones experimentales, su aplicación al estudio de rizobios simbioses de *L. tenuis* podría arrojar luz sobre los mecanismos de adaptación de estas bacterias en los ambientes alcalino-sódicos. Asimismo, este conocimiento podría contribuir en la selección de fertilizantes biológicos más exitosos y en el diseño de nuevas estrategias que faciliten el establecimiento y desarrollo de *L. tenuis* en estos ambientes. Con ese objetivo se llevaron a cabo

dos estrategias de estudio complementarias: La obtención de mutantes sensibles a condiciones salinas y/o alcalinas por mutagénesis aleatoria, y un estudio transcriptómico en condiciones de estrés salino-alcalino mediante la técnica de RNA-seq.

Cabe recordar que los resultados del capítulo IV sobre el análisis de la diversidad de bacterias fijadoras de nitrógeno asociadas a *L. tenuis* en los bajos alcalino-sódicos de la Pampa Deprimida, confirmaron la presencia de cepas del género *Aminobacter* entre la comunidad de simbioses asociados a *L. tenuis*. Asimismo, el ensayo de caracterización fenotípica de la tolerancia al estrés mixto salino-alcalino de los simbioses aislados, revelaron que los simbioses de este género presentan mayores niveles de tolerancia en comparación con el resto de las cepas pertenecientes a los otros géneros encontrados.

De acuerdo a esos resultados, se decidió ahondar en el estudio de los mecanismos relacionados con la tolerancia al estrés salino-alcalino con el grupo de rizobios más tolerante. Para ello se decidió utilizar la cepa *Aminobacter* sp. BA135 (Estrella *et al.*, 2009) como organismo de estudio, por tratarse de un rizobio aislado de nódulos de *L. tenuis*, taxonómicamente relacionado con las cepas identificadas como más tolerantes en este trabajo de Tesis, que a su vez resultó ser tolerante a condiciones alcalino-salinas, y por la disponibilidad de su secuencia genómica para realizar estudios bioinformáticos. Previo a dichos estudios, fue necesario conocer en detalle la respuesta a las condiciones salino-alcalinas de la cepa BA135, para definir las condiciones experimentales más adecuadas.

V.2. Tolerancia al estrés salino-alkalino de la cepa *Aminobacter* sp. BA135

La tolerancia implica el crecimiento de células viables en la condición problema de igual o similar manera que en la condición neutra o control. Entre las estrategias para determinar la tolerancia se encuentran el seguimiento del crecimiento mediante el recuento de células viables (UFC/mL) en medio sólido, o mediante la cuantificación de la turbidez (Densidad Óptica, DO_{600}) de cultivos en medio líquido. Aquí utilizamos ambas técnicas para evaluar el comportamiento de la cepa BA135.

V.2.1. Tests de tolerancia en medio sólido

Se determinó la tolerancia de BA135 a diferentes condiciones de salinidad (100, 150, 200 y 300 mM NaCl), alcalinidad (pH 8.0, 9.0 y 10.0) y salinidad-alkalinidad (pH 8.0 + 100 mM NaCl, 8.0 + 150 mM NaCl, 9.0 + 100 mM NaCl y 9.0 + 150 mM NaCl) en medio sólido, mediante una adaptación del método de recuento de bacterias “drop plate” (goteo en placas) (Miles y Misra, 1938; Herigstad *et al.*, 2001; Nogales *et al.*, 2002). Como se observa en la Figura V.1, en condiciones control (medio TY) se observó crecimiento en todas las diluciones, observándose la aparición de colonias individuales a partir de la dilución 10^{-6} , lisas y con pigmentación melada o amarillo-ocre tras 5 días de incubación a 28 °C.

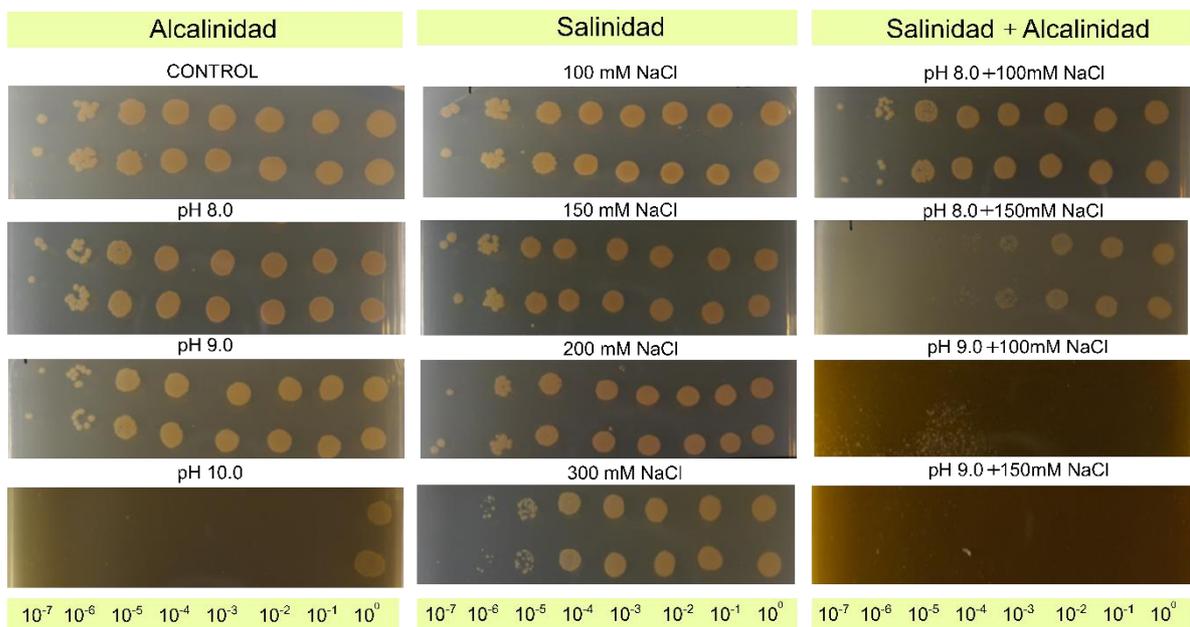


Figura V.1. Tests de tolerancia a condiciones de estrés salino y/o alcalino mediante el método de goteo en placa “drop plate”. A partir de un cultivo de BA135 en fase exponencial en TY, se prepararon diluciones seriadas al décimo. De cada dilución se aplicaron gotas de 10 μ L en placas con cada tipo de estrés. Las diluciones se sembraron por duplicado y ordenadas de derecha a izquierda, desde la dilución más baja a la más alta. Las placas fueron incubadas a 28°C por 5 días.

El crecimiento de BA135 fue similar al control en medio tamponado a pH 8.0 y pH 9.0, mientras que prácticamente resultó nulo a pH 10.0 (Figura V.1). Bajo condiciones de salinidad no se observó reducción significativa del crecimiento hasta 300 mM NaCl, condición en la que se observó una disminución en el tamaño de las colonias y ausencia de crecimiento en las diluciones más altas (Figura V.1). Por otro lado, bajo condiciones de estrés combinado (alcalinidad y salinidad) se observó una importante reducción del crecimiento a pH 8.0 + 150 mM NaCl, y se observó una inhibición total a partir de pH 9.0 + 100 mM NaCl.

V.2.2. Crecimiento de *Aminobacter* sp. BA135 en medio líquido

Complementariamente se determinó la cinética de crecimiento de la cepa BA135 en medio líquido, bajo diferentes condiciones de salinidad, alcalinidad y salinidad-alcalinidad durante 72 horas. Los datos de DO_{600} permitieron la construcción de las curvas de crecimiento para cada condición hasta la fase estacionaria (Anexo V.1), y el cálculo de las variables: tiempo de generación (g), capacidad de carga (k) y duración de la fase *lag* (λ) mediante la ecuación del modelo logístico de crecimiento bacteriano (Tabla V.1). Dicho modelo considera la limitación del medio de cultivo para cuando la población bacteriana aumenta lo suficiente para ralentizar la tasa de crecimiento. Es así que, a partir del modelamiento matemático de la ecuación de crecimiento exponencial, es posible inferir el tamaño máximo de la población en un entorno particular (k), el tiempo requerido por las bacterias para duplicar su número (g), y el tiempo de ajuste necesario para que las células bacterianas se adapten al medio (λ). Adicionalmente en la Tabla V.1 se muestra la densidad óptica máxima (DO_{max}) alcanzada en cada situación. Según el ajuste de las curvas, en las condiciones de salinidad se halló un incremento significativo de la fase *lag* (λ) a partir de 150 mM NaCl. No obstante, los valores de DO_{max} , k y g no se vieron afectados en la mayoría de tratamientos, lo que sugiere que el efecto de la salinidad en BA135 (salvo en 300 mM NaCl) determina una extensión de λ de adaptación a la situación estresante, período que una vez superado permite tasas de crecimiento similares a la condición control. En condiciones alcalinas, no se observó la ampliación de λ a pH 8.0 aunque sí se vieron niveles menores de DO_{max} y k , lo cual contrastó con lo observado a pH 8.5, en donde se registró una extensión significativa de λ así como valores mayores de DO_{max} y k , lo cual resalta el rol adaptativo que cumple la fase *lag*.

Por otro lado, en condiciones de estrés mixto (salinidad + alcalinidad) se evidenciaron cambios en la duración de la fase *lag*, la velocidad de duplicación (μ) y en los niveles de DO_{max} y k , siendo los tratamientos pH 8.0 + 250 mM NaCl y pH 8.0 + 300 mM NaCl los que produjeron efectos más notorios (Anexo V.1. y Tabla V.1).

Según lo observado, la salinidad no parece limitar el crecimiento de la cepa BA135 en ninguna de las condiciones ensayadas, ya que luego de la prolongación de la etapa de adaptación el crecimiento en el cultivo líquido fue regular, así como el crecimiento de colonias aisladas en las placas hasta 300 mM de NaCl. Las condiciones alcalinas sí parecen tener un efecto negativo en el crecimiento bacteriano, particularmente evidenciado en los ensayos en medio líquido. No obstante, cabe resaltar que, al igual que en la condición salina, el pH 8.5 provocó una prolongación de la fase *lag*, pero no afectó a los valores de DO_{max} y k . En ese sentido se observa una posible relación entre la prolongación de la fase *lag* y la posterior capacidad de crecimiento, respecto al control. Han sido halladas relaciones similares entre la resistencia bacteriana a antibióticos y la extensión de la fase *lag* (Li *et al.*, 2016). Se ha reportado que la variación en la fase *lag* es el primer cambio realizado por las bacterias para desarrollar tolerancia en respuesta al estrés de los antibióticos (Fridman *et al.*, 2014). Por otro lado, en condiciones mixtas se obtuvieron comportamientos variables según la condición ensayada.

En base a lo aquí mostrado y según el objetivo planteado, se establecieron las condiciones experimentales a utilizar para los apartados siguientes. En la sección V.3 se llevó a cabo la búsqueda de mutantes sensibles a condiciones salinas y alcalinas, y para ello se eligieron las condiciones problema a 300mM NaCl y pH 8.5 (ver V.2.1)

Tabla V.1. Variables de crecimiento de la cepa BA135 en distintas condiciones de estrés.

Condición	DO _{max}	g (h)	λ	k
Control	1,16	1,91	3,63	1,05
100 mM NaCl	1,22	2,00	3,98	1,12
150 mM NaCl	1,22	1,98	4,61**	1,12
200 mM NaCl	1,19	2,08	5,28**	1,09
250 mM NaCl	1,28*	2,52	6,59**	1,15*
300 mM NaCl	1,17	3,44**	7,82**	1,07
pH 8.0	1,04**	2,67**	4,16	0,86*
pH 8.5	1,18	3,14**	4,50**	1,08
pH 8.0 + 100 mM NaCl	1,10	2,79*	3,94	0,98
pH 8.0 + 150 mM NaCl	1,08	2,60*	4,58**	0,96*
pH 8.0 + 200 mM NaCl	1,08	2,81*	4,85**	0,93*
pH 8.0 + 250 mM NaCl	1,05*	4,48**	7,20**	0,96*
pH 8.0 + 300 mM NaCl	0,90**	6,57**	7,82**	0,82**

Las variables de crecimiento se calcularon usando la ecuación logística de crecimiento bacteriano a partir de los valores de densidad óptica (DO) y tiempo (horas). DO_{max} = Máximo valor de densidad óptica alcanzado, g = Tiempo de generación, λ = Duración de la fase lag (horas), k= Capacidad de carga. Los datos fueron tratados mediante un análisis de ANOVA y la prueba de Dunnet como test *post-hoc*. Los asteriscos indican las diferencias significativas halladas respecto al control: (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$

V.3. Identificación de genes involucrados en la tolerancia al estrés salino – alcalino de BA135 por mutagénesis aleatoria

V.3.1. Antibiograma de BA135

Para llevar a cabo adecuadamente la técnica de mutagénesis aleatoria, fue necesario elegir el antibiótico y la concentración en la que seleccionarían correctamente los transconjugantes. Es por ello que se determinó la sensibilidad de la cepa BA135 a distintos antibióticos, así como la frecuencia de aparición de resistencia a los mismos. Los resultados revelaron que BA135 es parcialmente sensible y totalmente sensible a 20 µg/mL y 50 µg/mL de Gentamicina (Gm), respectivamente; parcialmente sensible a 50 y 100 µg/mL de Espectinomomicina (Spc) en las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} , parcialmente sensible a 100 µg/mL de Kanamicina (Km) a partir de la dilución 10^{-1} y totalmente sensible a partir de 200 µg/mL. Asimismo, también se determinó que es resistente a Estreptomomicina (Sm). En base a estos resultados, se seleccionó Kanamicina 300 µg/mL como antibiótico de marca del transposón a utilizar para la mutagénesis (Tabla V.2).

Tabla V.2. Frecuencia de resistencia a antibióticos

Ant	(µg/ml)	Dilución		
		10^0	10^{-1}	10^{-2}
Gm	10	R	R	R
	20	4.65×10^{-7}	4.5×10^{-8}	1.8×10^{-8}
	50	S	S	S
Spc	25	R	R	R
	50	R	2.8×10^{-9}	2.8×10^{-9}
	100	R	5.27×10^{-9}	1.11×10^{-9}
Sm	25	R	R	R
	50	R	R	R
	100	R	R	R
	150	R	R	R
	200	R	R	R
	250	R	R	R
Km	25	R	R	R
	50	R	R	R
	100	R	2.64×10^{-7}	1.05×10^{-8}
	200	3.8×10^{-9}	S	S
	300	S	S	S

La frecuencia de resistencia a antibióticos (Ant) se calculó para Gentamicina (Gm), Espectinomomicina (Spc), Estreptomomicina (Sm) y Kanamicina (Km) a diferentes concentraciones (µg/mL). Se utilizaron 3 diluciones como se indica en la tabla y los resultados se expresaron como Resistente (R) y Sensible (S)

V.3.2. Mutagénesis aleatoria

Se hizo un estudio preliminar de la capacidad de transposición de dos transposones: Tn5, con capacidad de inserción aleatoria en genomas de bacterias Gram-negativas, portado por el plásmido pSUP2021 (Simon *et al.*, 1983) y el transposón *mariner* pSAM_R1, con preferencia de inserción en motivos “TA” del ADN (Perry y Yost, 2014).

A partir de la conjugación de la cepa BA135 con las cepas donadoras *Escherichia coli* β 2163 (pSUP2021) y *E. coli* SM10 λ pir (pSAM_R1), se obtuvieron 2×10^5 y 1.04×10^7 transconjugantes, respectivamente. Así mismo, las frecuencias de transposición se calcularon en 5×10^{-5} y 2×10^{-3} para ambas mutatecas. Dado el mayor número de transposantes obtenidos con pSAM_R1, se seleccionó dicha mutateca para la búsqueda de mutantes sensibles a condiciones de salinidad y alcalinidad. Otra ventaja de esta mutateca, aunque no ha podido ser aprovechada en este estudio, es que la misma podría ser utilizada en un futuro para estudios de genómica funcional mediante INSeq (“Insertion Sequencing”) (Perry y Yost, 2014).

Selección de mutantes sensibles a salinidad y/o alcalinidad:

La selección de mutantes sensibles se realizó en condiciones de 300mM NaCl y pH 8.5 (ver V.2.1) de forma independiente de modo que las mutaciones obtenidas se atribuyan con precisión a una condición en particular. A partir del *pool* de transposantes, se sembraron diluciones adecuadas en medio TY Km³⁰⁰, a fin de obtener colonias de transposantes individuales. Estas fueron posteriormente replicadas, utilizando palillos de madera estériles, en el mismo medio TY Km³⁰⁰, así como en condiciones de salinidad y a pH alcalino. Un total de 10.105 transposantes fueron evaluados en condiciones de salinidad a 300 mM NaCl y 10.195 fueron evaluados a pH 8.5. De entre todos ellos, 90 transposantes que inicialmente mostraron ausencia o reducción de crecimiento en una o ambas condiciones evaluadas, fueron seleccionados para su validación.

Validación de transposantes:

Se evaluó el crecimiento de los 90 transposantes elegidos mediante la técnica de “goteo en placas” en los medios problema (Figura V.2) observándose reducción parcial o total del crecimiento en una o ambas condiciones evaluadas para 37 de los 90 transposantes previamente evaluados. (Tabla V.3).

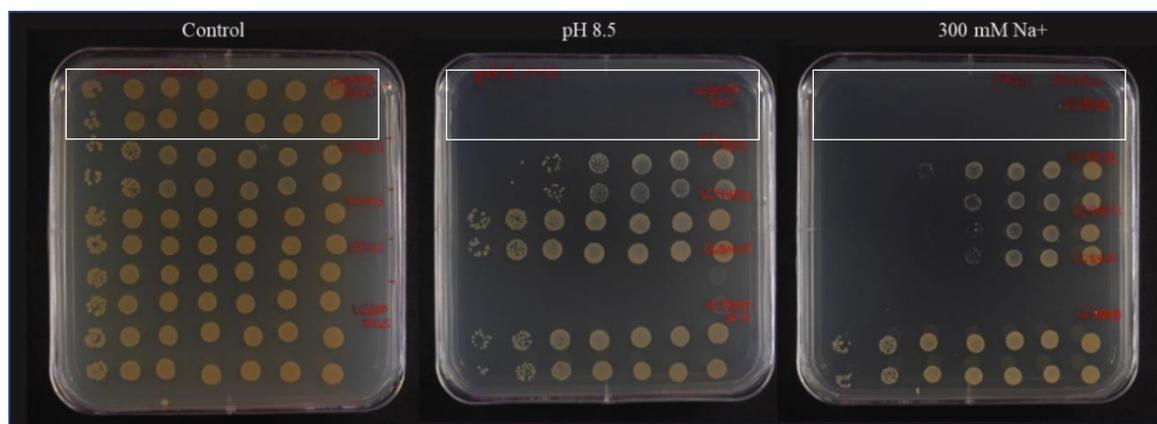


Figura V.2. Validación de mutantes sensibles a salinidad y alcalinidad mediante la técnica de “goteo de placa”, los cuáles se observan por duplicado y ordenados de derecha a izquierda desde la dilución más baja a la más alta.

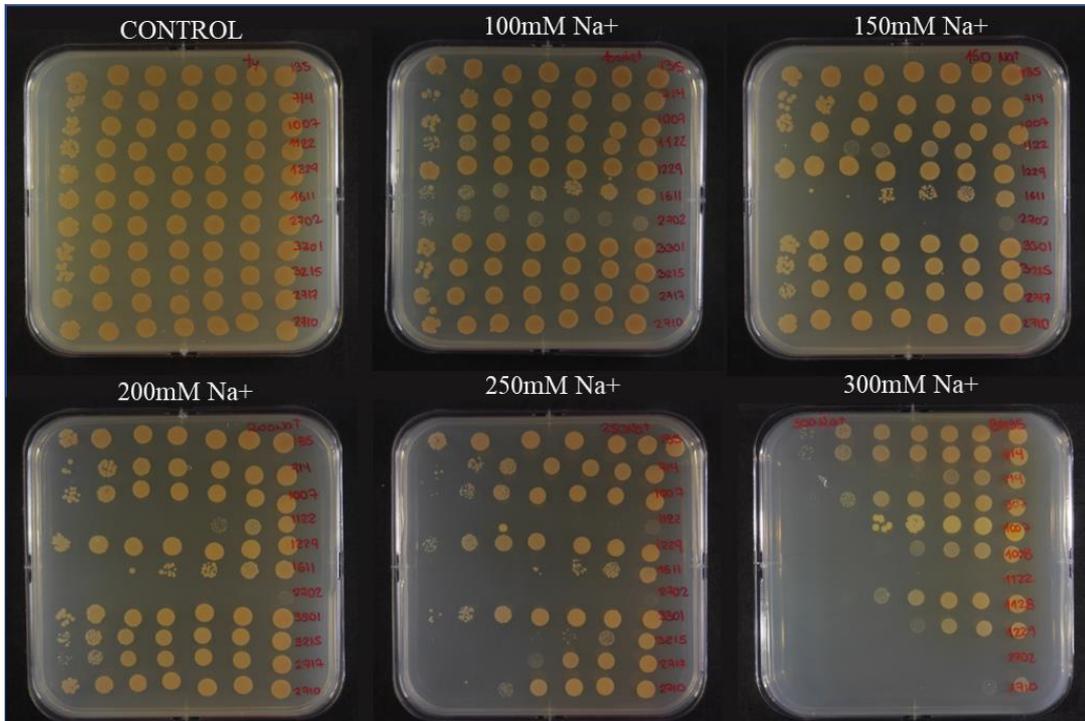
Tabla V.3. Lista de transposantes validados, sensibles a condiciones de salinidad y/o alcalinidad.

LC209	LC523	LC1128	LC3001	LC5310	LC7206
LC303	LC619	LC1229	LC3301	LS5410	LC7432
LC308	LC714	LC1611	LC3310	LC5706	
LC506	LC907	LC2702	LC3924	LC5801	
LC509	LC1007	LC2710	LC4004	LC6244	
LC510	LC1008	LC2717	LC4430	LC6436	
LC517	LC1122	LC3215	LC4829	LC7030	

Caracterización fenotípica de los mutantes sensibles:

Los 37 mutantes validados fueron caracterizados fenotípicamente para determinar el nivel de sensibilidad ocasionado por la inserción del transposón en condiciones salinas y alcalinas (Figura V.3; Tabla V.4). El fenotipo fue clasificado según el crecimiento en cada condición. Se consideraron como tolerantes (T) a la condición ensayada a aquellos que, al igual que la cepa silvestre, mostraron crecimiento hasta la dilución 10^{-6} ; con tolerancia reducida (t) aquellos que solo mostraron crecimiento hasta la dilución 10^{-5} ; moderadamente sensibles (s) fueron considerados los que solo mostraron crecimiento hasta las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} ; sensibles (S) hasta 10^{-1} y 10^{-2} ; y súper sensibles (SS) los que no mostraron crecimiento en ninguna de las diluciones o solo lo hicieron en la dilución 10^0 .

SALINIDAD



ALCALINIDAD

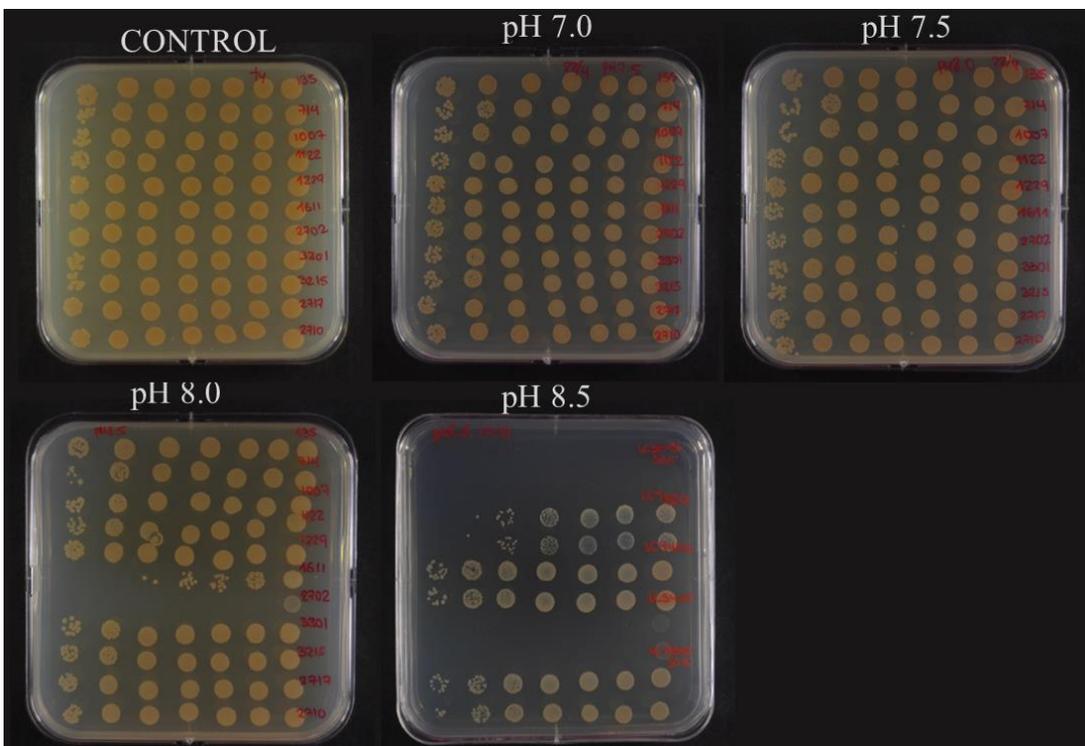


Figura V.3. Caracterización fenotípica de los mutantes en condiciones de salinidad y alcalinidad. Las condiciones ensayadas están indicadas en las figuras. Las diluciones seriadas se observan ordenadas de derecha a izquierda, desde la dilución más baja a la más alta.

Tabla V.4. Caracterización fenotípica de los mutantes de BA135 seleccionados.

M	NaCl (mM)					pH		
	100	150	200	250	300	7.5	8.0	8.5
BA135 WT	T	T	T	T	T	T	T	T
LC5410	t	SS	SS	SS	SS	T	T	SS
LC7432	t	SS	SS	SS	SS	T	T	SS
LC5310	T	SS	SS	SS	SS	T	T	SS
LC6244	t	S	SS	SS	SS	T	T	SS
LC1122	T	s	S	SS	SS	T	T	T
LC7030	T	t	S	SS	SS	T	t	SS
LC2702	t	S	S	S	SS	T	T	S
LC619	T	t	S	S	SS	T	T	T
LC1611	t	s	s	s	S	T	T	SS
LC209	T	T	t	S	SS	T	T	T
LC3215	T	T	T	S	SS	T	T	T
LC3924	T	T	t	S	S	T	T	T
LC2717	T	T	T	s	SS	T	T	T
LC523	T	T	T	t	SS	T	T	T
LC5801	T	T	T	t	SS	T	T	T
LC2710	T	T	T	t	SS	T	T	T
LC4829	T	T	T	t	s	T	t	SS
LC1008	T	T	t	t	s	T	T	T
LC1229	T	T	T	t	s	T	T	T

WT: Cepa *Aminobacter* sp. BA135 Wild-type, **NaCl (mM):** Concentración de NaCl

----- continúa -----

M	NaCl (mM)					pH		
	100	150	200	250	300	7.5	8.0	8.5
BA135 WT	T	T	T	T	T	T	T	T
LC4004	T	T	T	t	s	T	T	T
LC4430	T	T	T	T	s	T	T	T
LC7206	T	T	T	T	s	T	T	T
LC907	T	T	T	t	t	T	T	T
LC1007	T	T	T	t	t	T	T	T
LC3301	T	T	T	t	t	T	T	T
LC1128	T	T	T	T	t	T	T	T
LC303	T	T	T	T	t	T	T	T
LC308	T	T	T	T	t	T	T	T
LC506	T	T	T	T	t	T	T	T
LC509	T	T	T	T	t	T	T	T
LC510	T	T	T	T	t	T	T	T
LC517	T	T	T	T	t	T	T	T
LC3001	T	T	T	T	t	T	T	T
LC3310	T	T	T	T	t	T	T	T
LC714	T	T	T	T	t	T	T	T
LC5706	T	T	T	T	t	T	T	T
LC6436	T	T	T	T	t	T	T	T

WT: Cepa *Aminobacter* sp. BA135 Wild-type, **NaCl (mM):** Concentración de NaCl

T	Tolerante
t	Tolerancia reducida
s	Moderadamente sensible
S	Sensible
SS	Súper sensible

En la Tabla V.4 se resumen los fenotipos de cada uno de los mutantes en cada una de las condiciones evaluadas. Los mutantes se listan en orden decreciente en función del nivel de sensibilidad a salinidad y/o alcalinidad. La totalidad de los 37 mutantes incluidos en esta Tabla V.4 mostraron algún nivel de sensibilidad incrementada a una o más de las condiciones salinas ensayadas. Veintiuno de ellos solo mostraron tolerancia reducida (t) o sensibilidad moderada (s) a las concentraciones de sal más elevadas (250 o 300 mM NaCl), mientras mantenían intacta su capacidad de tolerancia a condiciones salinas menos exigentes. El ligero fenotipo mostrado por este grupo de mutantes sugiere un efecto muy leve de las respectivas mutaciones sobre la capacidad de adaptación de la bacteria a condiciones salinas. En contraste, los otros 16 mutantes mostraron fenotipos más agudos, mostrando una clara sensibilidad a 150 mM NaCl o concentraciones superiores. Por otro lado, solo 8 de los mutantes mostraron fenotipo sensible (S) o muy sensible (SS) a pH 8.5. Todos ellos también presentaban una clara sensibilidad a condiciones salinas, con excepción de la cepa LC4829 que solo mostró una ligera reducción de la tolerancia a altas concentraciones de NaCl. No se encontraron mutantes sensibles a alcalinidad que mantuvieran intacta la tolerancia a salinidad, lo que sugiere algún tipo de interrelación entre los mecanismos de tolerancia a ambos estreses.

Identificación y caracterización genética de los mutantes sensibles a condiciones salinas y/o alcalinas.

Se eligieron 17 mutantes con los fenotipos más pronunciados, en una o las dos condiciones, para determinar la posición de la inserción del transposón y la identidad de los genes interrumpidos. De acuerdo a los fenotipos, los mutantes se clasificaron en dos grupos: mutantes sensibles a salinidad: LC619, LC209, LC3215, LC3924, LC2717, LC523, LC5801, LC2710, LC1122 y sensibles a salinidad y alcalinidad: LC5410, LC7432, LC5310, LC6244, LC1611, LC7030, LC2702, LC4829 (Tabla V.5). Usando los cebadores IRL3 o IRR2 (Tabla II.6), que aparean específicamente con secuencias en los extremos del transposón pSAM_RI, se realizó la secuenciación directa del ADN genómico purificado de cada mutante. Dichos cebadores fueron probados previamente con el plásmido pSAM_RI. De cada una, se obtuvo la secuencia de al menos 100pb -que incluían las regiones de inserción del transposón- lo que permitió la identificación del sitio preciso de inserción del transposón en la mayoría de ellos. Asimismo, la búsqueda por homología de las secuencias adyacentes a los puntos de inserción del transposón en el genoma de la cepa *Aminobacter* sp. BA135 (no publicado), apoyada con la anotación del genoma de *Aminobacter* KCTC2477 (KEGG, T04343), permitió la identificación de los genes interrumpidos en 16 de los 17 mutantes seleccionados (Tabla V.6). Los análisis de las secuencias revelaron que cada cepa mutante presentaba una única inserción del transposón en su genoma, y que cada uno era diferente del resto de mutantes, lo que implicaba

que cada mutante seleccionado era único y no redundante. No obstante, algunos de los mutantes identificados estaban relacionados entre sí, pues presentaban inserciones en distintas posiciones sobre un mismo gen u operón (por ejemplo, los mutantes LC7432, LC5310, LC6244 y LC2702) (Tabla V.6). Este tipo de resultados dan, por un lado, fiabilidad al proceso de selección fenotípica realizado y, por otro lado, apoyan la existencia de una relación directa genotipo-fenotipo; esto es, que los fenotipos observados para cada mutante son directamente provocados por la inserción del transposón y no debidos a otro tipo de eventos genéticos de mayor complejidad, como múltiples eventos de inserción del transposón en el genoma de la bacteria o reorganizaciones genéticas ocurridas con posterioridad o a consecuencia de dicha inserción.

Tabla V.5 Transposantes seleccionados para la identificación de las mutaciones

Mutante	NaCl (mM)					pH			
	100	150	200	250	300	7.5	8.0	8.5	
LC5410	t	SS	SS	SS	SS	T	T	SS	Sensibles a Salinidad-Alcalinidad
LC7432	t	SS	SS	SS	SS	T	T	SS	
LC5310	T	SS	SS	SS	SS	T	T	SS	
LC6244	t	S	SS	SS	SS	T	T	SS	
LC1611	t	s	s	s	S	T	T	SS	
LC7030	T	t	S	SS	SS	T	t	SS	
LC2702	t	S	S	S	SS	T	T	S	
LC4829	T	T	T	t	s	T	t	SS	
LC619	T	t	S	S	SS	T	T	T	
LC209	T	T	t	S	SS	T	T	T	
LC3215	T	T	T	S	SS	T	T	T	
LC3924	T	T	t	S	S	T	T	T	
LC2717	T	T	T	s	SS	T	T	T	
LC523	T	T	T	t	SS	T	T	T	
LC5801	T	T	T	t	SS	T	T	T	
LC2710	T	T	T	t	SS	T	T	T	
LC1122	T	s	S	SS	SS	T	T	T	

T	Tolerante
t	Tolerancia reducida
s	Sensibilidad moderada
S	Sensible
SS	Súper sensible

Como se menciona líneas arriba, la identificación de los mutantes seleccionados se realizó por homología de secuencias utilizando las bases de datos disponibles, detalladas más adelante, así como las anotaciones de los genomas tanto de la cepa *Aminobacter* sp. BA135 como *A. aminovorans* KCTC2477 (KEGG: T04343). Es necesario aclarar que, mediante análisis de comparación de genomas del género *Aminobacter* realizados por nuestro grupo, se ha determinado

Tabla V.6 Identidad de los genes interrumpidos por la inserción del transposón pSAM_RI en cada mutante de BA135.

Mutantes	Fenotipo	Locus_tag BA135	Ortólogo KCTC2477	Gen	Descripción	
LC7432, LC5310, LC6244, LC2702	Sal ⁻ Alk ⁻	BA135_1058	AA2016_4709	<i>mrpA</i>	<i>Na(+)/H(+)</i> Antiportador Subunidad A	Bom
LC5410	Sal ⁻ Alk ⁻	BA135_6670	AA2016_3199	<i>usp</i>	Proteína Universal del estrés	
LC1611	Sal ⁻ Alk ⁻	BA135_4155	AA2016_1629		Transportador permeasa ABC	
LC4829	Sal ^{+/-} Alk ⁻	BA135_5601	AA2016_2921	<i>cobH</i>	Precorrin-8x-metilmutasa	
LC7030	Sal ⁻ Alk ⁻	BA135_3783	AA2016_1309	<i>envC</i>	Peptidasa	
LC1122, LC619	Sal ⁻	BA135_6349	AA2016_3465	<i>mrcA</i>	Penicillin-binding protein	M
LC209	Sal ⁻	BA135_6350	AA2016_3464	<i>amiC</i>	<i>N</i> acetilmuramoil-L-alanina amidasa	M
LC3924	Sal ⁻	BA135_4114	AA2016_1596	<i>phoB</i>	Proteína reguladora transcripcional del regulón fosfato	
LC3215	Sal ⁻	BA135_4306/ BA135_4307	AA2016_1742 / 1743	<i>ftsE</i>	Zona promotora	
LC2717	Sal ⁻	BA135_2263	AA2016_5383	<i>pgi</i>	Glucose-6-fosfato isomerasa	Enz
LC2710	Sal ⁻	BA135_3813	AA2016_1334	<i>livK</i>	Proteína de unión a aminoácidos (Leu, Ile, Val)	
LC523	Sal ⁻	BA135_1194	AA2016_4827	<i>ahpCD</i>	Alkyl hidropoxido reductasa	

Se determinó la identidad de los genes interrumpidos, mediante la búsqueda por homología de secuencias. La búsqueda por homología se realizó con referencia al genoma de *Aminobacter* sp. BA135 (datos no publicados) y el genoma de la cepa actualmente anotada como *Aminobacter* sp. BA135 en la base de datos KEGG (T04343). El fenotipo se detalla de la siguiente manera: Fenotipo sensible a salinidad (Sal⁻), Fenotipo sensible a alcalinidad (Alk⁻), Fenotipo sensible a salinidad y alcalinidad (Alk⁻Sal⁻). El mutante LC4829, indicado en gris, mostró un fenotipo ligeramente sensible a salinidad (Sal^{+/-}) y muy sensible a alcalinidad (Alk⁻).

que la cepa KCTC2477, al igual que la cepa BA135, corresponden a la especie *A. ciceronei* (datos no publicados) (ver Figura IV.5), por lo que resultó adecuado incluirla como cepa de referencia para los análisis bioinformáticos, dado que no existen datos publicados de la anotación del genoma de la cepa tipo de *A. ciceronei*.

V.3.3. Mutantes sensibles a salinidad.

La búsqueda por homología de secuencias se realizó utilizando las bases de datos National Center for Biotechnology Information (NCBI) y Kyoto Encyclopedia of Gene and Genomes (KEGG), así como las herramientas BLAST, INTERPRO y Pfam de The European Bioinformatic Institute (EMBL-EBI). De acuerdo a ello, los mutantes LC1122 y LC619 corresponderían a sendas inserciones en el gen *mrcA* (KEGG, K05366), que codifica para una *penicillin-binding protein 1A* (PBP-1A), perteneciente a una familia de enzimas involucradas en la biosíntesis de peptidoglicano, ampliamente conservadas en bacterias. Las proteínas MrcA poseen un dominio transglicosidasa en su extremo N-terminal y un dominio transpeptidasa en el C-terminal. En ambas mutantes, la inserción del transposón provocaría la producción de una proteína con el dominio transpeptidasa truncado (Fig. V.4, A). *Las enzimas de la familia PBP asociadas a la membrana catalizan la polimerización (transglicosilación) y la reticulación (transpeptidación) de las cadenas de glucano requeridas en la síntesis de peptidoglicanos*, el principal polímero constituyente de la pared celular bacteriana (Macheboeuf *et al.*, 2006, Sauvage *et al.*, 2008). Se ha visto que, bajo condiciones desfavorables, las PBPs responderían a la regulación de D-aminoácidos, lo que conlleva a las modificaciones estructurales necesarias para la adaptación (Horcajo *et al.*, 2012). En concordancia con lo observado, resultados similares se obtuvieron en el análisis de un mutante del simbionte halotolerante *Ochrobactrum* sp. 11a, en el que mutaciones en una enzima PBP también afectaron la supervivencia en condiciones de salinidad (Príncipe *et al.*, 2009). Asimismo, en un estudio transcriptómico y proteómico de cepas de *Frankia* cultivadas bajo condiciones de hipersalinidad, se observó la sobreexpresión de enzimas PBPs glicosiltransferasas (Oshone *et al.*, 2017), al igual que en la cepa halotolerante *Bacillus* sp. N16-5 (Yin *et al.*, 2015). Esto sugiere el rol importante que cumplirían las enzimas PBPs en la respuesta a las condiciones salinas.

Relacionado con los mutantes LC1122 y LC619, en el mutante LC209 la inserción del transposón se ha producido sobre un gen *amiA* (KEG, K01448), ubicado en posición adyacente aguas arriba de *mrcA* (Figura V.4, A), que codifica para una enzima de tipo N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase (NALAA), implicada en la degradación del peptidoglicano. Las NALAAAs o amidasas hidrolizan el

enlace amida entre el N-acetilmurámico (MurNAc) y L-alanina, separando la cadena de glucano del péptido (Vollmer *et al.*, 2008). El rol que cumplen las NALAAs en la edición de los peptidoglicanos de la pared celular ha sido descrito ampliamente, asimismo se sabe que este tipo de enzimas se encuentran de forma generalizada en bacterias (Vermassen *et al.*, 2019). De acuerdo a lo observado en la enzima NALAAs, en un estudio de expresión diferencial bajo condiciones de hipersalinidad de *Bacillus subtilis*, también se sugirió que esta enzima cumpliría un rol importante en la respuesta a salinidad ya que la expresión de NALAAs se vio altamente inducida (Steil *et al.*, 2003). Si bien no se ha reportado su vinculación para condiciones salinas en rizobios, sí lo ha sido en la respuesta frente a otros estreses abióticos. Tal es el caso del análisis transcriptómico de *Rhizobium favelukesii* LPU83 en el que se mostró la sobreexpresión de NALAAs bajo condiciones ácidas (Nilsson *et al.*, 2019). El efecto de las mutaciones en estos genes relacionados con los procesos sintéticos de la pared celular confirma que las modificaciones estructurales son procesos claves en la respuesta a salinidad. Esto es debido a que, al ser el primer elemento en contacto con el medio adverso, la conservación de su integridad y el correcto funcionamiento, resultan fundamentales para garantizar la viabilidad celular (Scheffers y Pinho, 2005, Yadav *et al.*, 2018). Esto ha sido comprobado mediante la observación de modificaciones morfológicas en la pared celular de *Vibrio anguillarum*, donde se observó que la comparación entre la cepa *wild-type* y una cepa mutada en el gen *amiB* que codifica para NALAA evidenció diferencias morfológicas significativas, así como el incremento de sensibilidad a estrés oxidativo (Hong *et al.*, 2007). Situación similar se observó en células de *Lactobacillus casei* crecidas en condiciones de salinidad comparadas con células crecidas en condiciones normales. La observación microscópica reveló el incremento significativo de la pared celular en condiciones salinas (Piuri *et al.*, 2005).

El mutante LC2710 contiene la inserción en el gen *livK* (Figura V.4, B), que contiene un dominio Peripla_BP_6 (Pfam PF13458, InterPro IPR 028081), que corresponde a una proteína periplásmica de unión a sustrato, principalmente relacionada con la importación de aminoácidos de cadena ramificada como leucina (Leu), isoleucina (Ile), valina (Val) (Hosie y Poole, 2001). Los aminoácidos, al igual que la trehalosa son considerados solutos u osmolitos compatibles que se sintetizan internamente o se adquieren del medio externo y cuya acumulación es empleada como estrategia de defensa frente a las lesiones que genera el estrés osmótico. Estos solutos ayudan a estabilizar el estado natural de las proteínas y lípidos (Robert *et al.*, 1999; Brhada *et al.*, 2001). En *Sinorhizobium meliloti*, se demostró que el aa Ile estimula la acumulación de glutamato (solute compatible) en condiciones salinas y el mecanismo propuesto es que el glutamato deriva de la degradación de aminoácidos como la isoleucina y la transaminación de 2-ketoglutarato (Botsford y Lewis, 1990; Gonzales *et al.*, 1990). No obstante, no se descarta la posibilidad de que la inserción del

transposón en esta cepa tenga un efecto polar sobre el gen situado aguas abajo, *pyc*, que codifica para la enzima piruvato carboxilasa (PC) (Figura V.4, B). Además de su rol principal en el metabolismo energético celular, la PC y el propio piruvato han sido implicados como elementos clave en el mantenimiento del balance redox de la célula en condiciones de estrés oxidativo (Lemire *et al.*, 2017). La posición de *pyc* aguas abajo de *livK* está conservada en otras cepas de *Aminobacter* y varios mesorizobios.

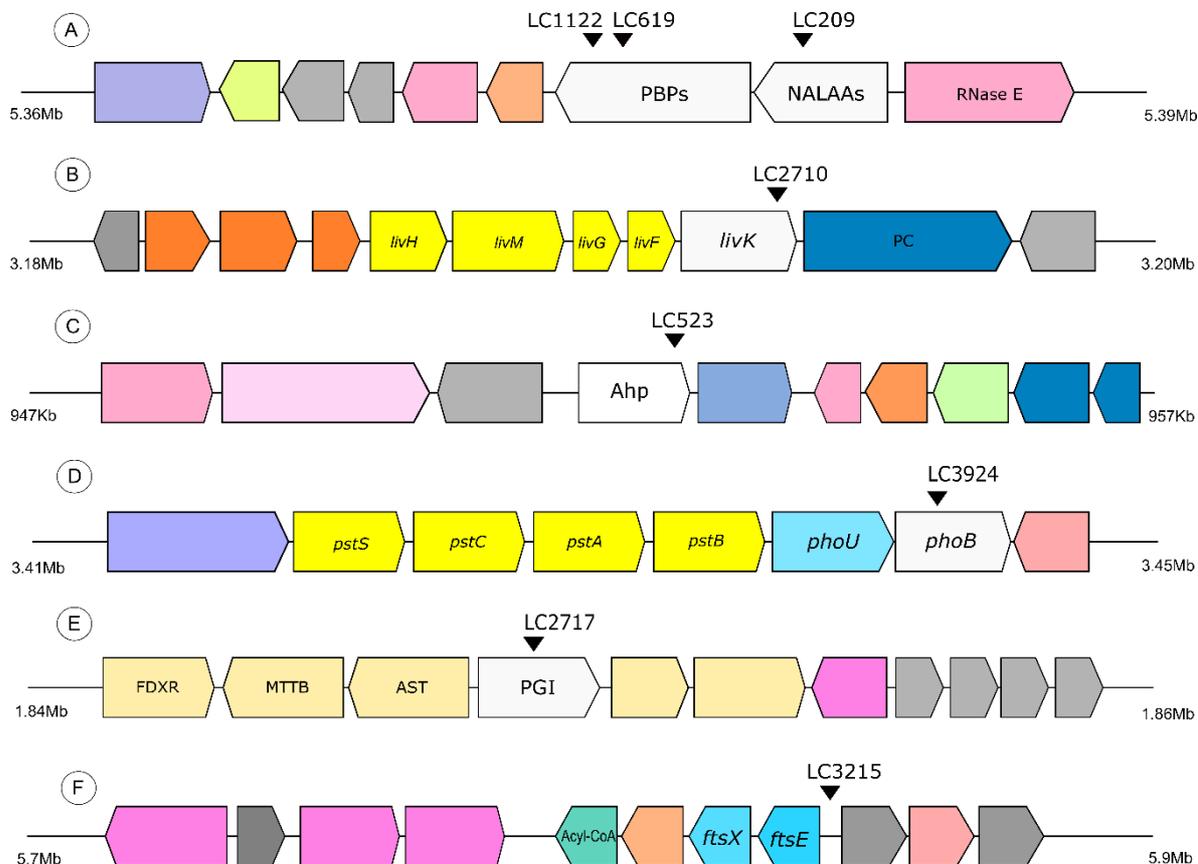
La inserción en el mutante LC523 (Figura V.4, C) afecta a la expresión de una proteína con dominio redoxina (Pfam PF08534, InterPro IPR013740), que sería una de las subunidades de una hipotética AHP (Alkyl Hydroperóxido reductasa). El dominio redoxina está presente en peroxirredoxinas, glutarredoxinas y tiorredoxinas, todas ellas pertenecientes a una familia de tiol peroxidasa que reducen peróxido de hidrógeno, peroxinitrito y otros hydroperóxidos. En situaciones adversas ocasionadas por factores abióticos es común que se desarrolle adicionalmente y en simultáneo estrés oxidativo. El cual ocurre cuando incrementa desmedidamente la cantidad de especies reactivas del oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS), tales como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), ocasionando daños en biomoléculas como el ADN, proteínas y lípidos (Imlay, 2003). Ante ello, enzimas como las catalasas, superóxido dismutasas y AHPs cumplen funciones de detoxificación, de las cuáles las AHPs suelen ser más eficientes eliminando niveles bajos de H₂O₂ (Poole, 2005).

El mutante LC3924 contiene la mutación en el gen *phoB* (K07657) que codifica para el regulador transcripcional del regulón Pho, PhoB (Pfam PF00486; InterPro IPR001867). El regulón Pho (de *phosphate*) se refiere al conjunto de genes involucrados en la adaptación a condiciones limitantes de fosfato inorgánico (Pi), cuya expresión está regulada por un sistema regulador de dos componentes, una histidina quinasa (HK) de membrana interna sensora, y un regulador transcripcional de respuesta (RR) (Lipa y Janczarek, 2020). Estas proteínas han recibido diferentes nombres según el modelo bacteriano estudiado (Santos-Beneit, 2015). En la cepa *Aminobacter* sp. BA135 se encuentra el sistema regulatorio *phoB-phoU*, ubicado en la región inmediata aguas abajo del sistema de transporte de fosfato *pstABC* (Figura V.4, D). En rizobios, el mecanismo de regulación de PhoB ha sido largamente estudiado en *Sinorhizobium meliloti* (Yuan *et al.*, 2006; Geiger *et al.*, 1999; diCenzo *et al.*, 2017) y se ha demostrado que, en respuesta a los cambios de concentración de fósforo, se activa su rol regulador sobre múltiples genes asociados a la deficiencia de Pi (Krol y Becker, 2004). Investigaciones más recientes sugieren que su función regulatoria se extendería más allá de los genes responsables de la respuesta a la falta de fósforo. Se ha reportado su vinculación en la respuesta a estrés oxidativo de *Vibrio cholerae* O1, cepa N16961, en donde se observó mayor actividad de las catalasas KatG and KatB en situación de deficiencia de fósforo en comparación con

la cepa deficiente en PhoB (Goulart *et al.*, 2016). También se ha indicado que genes relacionados con estrés abiótico como *katA*, forman parte del regulón Pho en *S. meliloti* y otras proteobacterias (Yuan *et al.*, 2005). Asimismo, en *Agrobacterium tumefaciens* GW4 el gen *phoB2* regula positivamente la expresión del gen *anoA*, lo que incrementa la oxidación de antimonio (Sb), asociando a *phoB2* en la resistencia a ambientes con exceso de Sb (Li *et al.*, 2019). La mutación en *phoB* de la cepa BA135 podría estar afectando la expresión de genes involucrados en la respuesta a estreses abióticos, en particular a salinidad. Posteriormente, en un ensayo de crecimiento en bajas concentraciones de P, pudimos observar que este mutante presenta menor crecimiento en medios con limitación de fosfato (Figura V.7), lo que apoya la relación directa genotipo-fenotipo en este caso.

En el mutante LC2717 (Figura V.4, E), la inserción se localiza en el único dominio del gen que codifica para la enzima Glucosa-6-fosfato isomerasa (PGI; InterPro IPR001672) involucrada en la isomerización reversible de glucosa-6-fosfato y fructosa-6-fosfato, en las rutas de la glucólisis y de gluconeogénesis. El rol sugerido para PGI es el de ser una de las proteínas intermediarias importantes en la biosíntesis de trehalosa, un osmolito compatible sintetizado en situaciones de estrés abiótico (Jawahar *et al.*, 2019). En *Escherichia coli* y muchas otras bacterias, una de las rutas principales de síntesis de trehalosa involucra la condensación de glucosa-6-P y UDP-glucosa a trehalosa-6-P por la trehalosa sintasa (OtsA), compuesto que es finalmente convertido a trehalosa por la trehalosa fosfatasa (OtsB) (Giaever *et al.*, 1988, Kaasen *et al.*, 1992). La mayoría de rizobios poseen la capacidad de síntesis de trehalosa en respuesta a estrés salino y/o osmótico (Domínguez-Ferreras *et al.*, 2006; Fernandez-Aunián *et al.*, 2010). Recientemente se ha sugerido que PGI pertenecería al grupo de proteínas centrales que protegen frente al estrés en bacterias (Nagar *et al.*, 2016).

Finalmente, el mutante LC3215 (Figura V.4, F) corresponde a una inserción del transposón en la probable región promotora de los genes *ftsE* y *ftsX*, lo que sugiere que el efecto se debe a la interrupción de la zona promotora, lo que impediría el inicio regular de la transcripción de dichos genes. Tanto *ftsE* como *ftsX* están involucrados en la formación o estabilidad del anillo septal necesario para la división celular (Newton y Ohta, 1990; Schmidt *et al.*, 2004), por lo que la deficiencia podría deberse a la limitación del crecimiento, sugiriendo un efecto indirecto o bien pleiotrópico. No obstante, en *E. coli* el papel de *ftsEX* parece ser diferente dependiendo de la cantidad de sal presente en el medio (Schmidt *et al.*, 2004). En *S. meliloti*, mutantes *ftsE* fueron incapaces de crecer en concentraciones altas de salinidad, además de ser defectuosos en la ocupación de nódulos de alfalfa (Miller-Williams *et al.*, 2006). La inserción del transposón en la cepa LC3215 también podría afectar a la expresión de un operón adyacente que se transcribe en dirección opuesta a *ftsEX*. Este operón lo integran varios genes de función desconocida (Figura V.4, F).



(A)	<p>PBPs: <i>Penicilin binding protein</i> NALAAs: <i>N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa</i> RNaseE: <i>Ribonucleasa E</i></p>	(E)	<p>FDXR: <i>Ferredoxina reductasa</i> MTTB: <i>Trimetilamina metiltransferasa</i> AST: <i>Aspartato aminotransferasa</i> GPI: <i>Glucosa-6-fosfato isomarasasa</i></p>
(B)	<p><i>livH</i>: <i>Proteína permeasa del transporte de aminoácidos</i> <i>livM</i>: <i>Proteína permeasa del transporte de aminoácidos</i> <i>livG</i>: <i>Proteína de unión a ATP del transporte de aminoácidos</i> <i>livF</i>: <i>Proteína de unión a ATP del transporte de aminoácidos</i> <i>livK</i>: <i>Proteína de unión periplasmática</i> PC: <i>Piruvato carboxylasa</i></p>	(F)	<p>Acyl-CoA: <i>l-acil-sn-glicerol-3-fosfato aciltransferasa</i> <i>ftsX</i>: <i>Proteína de señalización similar a transportador ABC Asociada a la división celular</i> <i>ftsE</i>: <i>Proteína de señalización similar a transportador ABC Asociada a la división celular</i></p>
(C)	<p>Ahp: <i>alkyl hydroperoxide reductase</i></p>		
(D)	<p><i>pstS</i>: <i>Transportador ABC de fosfato, proteína periplasmica de unión a fosfato</i> <i>pstC</i>: <i>Proteína permeasa del sistema de transporte de fosfato</i></p>		

Figura V.4. Contexto genómico de los mutantes sensibles a salinidad de la cepa BA135. Los genes están representados mediante bloques y etiquetas en su interior, cuya descripción se indica en la leyenda ubicada en el recuadro inferior. Asimismo, la dirección de los bloques, señala el sentido de transcripción. Los triángulos invertidos (▼) representan la inserción del transposón y los genes interrumpidos se muestran de color blanco y los que no fueron identificados en color gris.

V.3.4. Mutantes sensibles a salinidad y alcalinidad

La mitad de los mutantes con fenotipo sensible para ambas condiciones, LC7432, LC5310, LC6244 y LC2702, correspondieron a inserciones en un gen *mrpA/phaA*, el primero de un operón heptacistrónico que codifica para un sistema multicomponente antiportador catión:protón (Figura V.5, A). La proteína MrpA (Mrp: **M**ultiple **r**esistance and **pH**), contiene un dominio NADH:quinona oxidoreductasa/Antiporter Mrp, subunidad de membrana (InterPro: IPR001750) o Transportador de membrana conductor de protones (Pfam PF00361, *Proton_antipo_M*) y está designado como un antiportador catión:protón-3 (CPA3) en la clasificación de los transportadores (Ito *et al.*, 2017). Los antiportadores tipo Mrp son un tipo de transportadores secundarios que cumplen un rol muy importante en el mantenimiento de la homeostasis catiónica y del pH citoplasmático (Saier *et al.*, 2009), especialmente en bacterias que crecen en medios alcalinos, ya que están involucrados en la importación activa de H⁺ del medio externo relativamente pobre en protones (Krulwich *et al.*, 2011). A diferencia de otros antiportadores Catión/Protón, que constan de solo una proteína de membrana, los de tipo Mrp requieren de 6 o 7 proteínas hidrofóbicas que forman complejos hetero-oligoméricos, que usan la fuerza protón motriz para expulsar cationes potencialmente citotóxicos como el sodio (Na⁺) a cambio de protones externos, evitando así su acumulación a niveles tóxicos (Morino *et al.*, 2008, 2014). La caracterización detallada de este tipo de antiportador en la cepa alcalifílica *Bacillus pseudofirmus* OF4, señala que las subunidades MrpA y MrpD serían esenciales para la actividad antiportador. Recientemente se ha demostrado que mutaciones específicas en la región C-terminal de la subunidad MrpA ocasionarían profundos efectos deletéreos (Morino *et al.*, 2017). En concordancia con lo observado en este estudio, se ha reportado que en *Halomonas* sp. Y2, la mutante *Ha-mrp* mostró una seria reducción del crecimiento en presencia de altas concentraciones de NaCl, LiCl y KCl, solo en condiciones alcalinas (pH > 8.0) y normal crecimiento en condiciones ácidas (Cheng *et al.*, 2016), sugiriendo la especificidad de este operón en la supervivencia a alcalinidad. El genoma de *S. meliloti* codifica para 2 operones tipo *mrp* que han sido anotados como *pha* (**pH adaptation**). El sistema Pha1 ha sido estudiado en cierto detalle, y tiene un papel importante en el eflujo de iones K⁺ durante la adaptación a pH alcalino (Putnoky *et al.* 1998; Yamaguchi *et al.*, 2009) tanto en vida libre como en simbiosis.

En el mutante LC5410 (Figura V.5, B) la inserción del transposón pSAM_R1 interrumpe la secuencia de un gen que codifica para una proteína con dominio Usp (Proteína Universal del estrés; InterPro IPR006016; Pfam PF00582), que codifica para una proteína de respuesta a estrés. Los genomas bacterianos suelen codificar para varias proteínas tipo Usp, aunque en general sus funciones no son bien conocidas. La proteína universal del estrés A (*uspA*) se expresa a niveles moderados en

respuesta a un amplio espectro de agentes de estrés, tales como deficiencia de nutrientes, xenotoxicidad, choque térmico, estrés osmótico, daño macromolecular, etc. (Chou *et al.*, 2007). Aunque su función específica no está completamente dilucidada, su rol en el metabolismo del carbono (Nyström y Neidhardt, 1994) y el análisis de mutantes *uspA*, que muestran deficiencias en la supervivencia a periodos largos de cultivo en diferentes estreses, refuerzan la hipótesis de que se trataría de un gen regulador o con función protectora, particularmente en la fase estacionaria de cultivo (Vollmer y Bark, 2018). No obstante, no se descarta un efecto polar de la mutación sobre el gen inmediatamente aguas abajo (BA135_6669/AA2016_3200), que podría formar parte de la misma unidad transcripcional. Este gen codifica para una probable proteína de la superfamilia *Bacterial effector binding domain* (SSF55136), con un posible dominio similar a GyrI (Proteína inhibidora de girasa; IPR029442). Este grupo de proteínas podrían estar implicadas en la protección celular (Yuan *et al.*, 2017)

La inserción en el mutante LC1611 (Figura V.5, C) corresponde al primer gen de un probable operón que codifica para un sistema de transporte de tipo ABC (*ATP Binding Cassette*). Estos transportadores hidrolizan ATP para energizar diversos sistemas de importación y exportación de moléculas de diverso tamaño y propiedades químicas (Saurin *et al.*, 1999). Un operón homólogo se encuentra conservado en varios rizobios y otras bacterias (p.ej, Smb20155-Smb20158 en *S. meliloti*). Tanto en la cepa BA135 como en esas otras bacterias, los genes aguas abajo de este sistema ABC codifican para una o varias fosfatasas de función desconocida.

Tal como se mencionó anteriormente, el metabolismo de la pared bacteriana es un proceso dinámico que implica un equilibrio constante entre los procesos de degradación y biosíntesis, cuidadosamente regulados por la acción de enzimas con actividad hidrolasa (CWHs), las cuales pueden ser discriminadas en tres tipos: amidasas, glicosidasas y peptidasas (Vermassen *et al.*, 2019). En ese sentido, el análisis de la secuencia interrumpida en el mutante LC7030 sugiere que correspondería al gen *envC* (Figura V.5, D), que codifica para el factor EnvC que contiene el dominio LytM (lisostafina) (Uehara *et al.*, 2009). En *E. coli*, EnvC está implicada en la activación de las amidasas de peptidoglucano (PG) periplásmicas, AmiA y AmiB, requeridas para la hidrólisis de PG septal que es esencial para la separación de las células hijas durante la división (Peters *et al.*, 2011).

El mutante LC4829 (Figura V.5, E) contiene la inserción en el gen *cobH* (KEEG, K06042) que codifica para la enzima intermediaria precorrin-8X metilmutasa (InterPro, IPR003722), involucrada en la síntesis *de novo* de cobalamina. La síntesis de cobalamina o vitamina B₁₂, está restringida a procariontes en los cuales puede producirse a través de dos rutas de biosíntesis: aeróbica y anaeróbica, en las que se estima que están involucradas alrededor de 30 enzimas (Moore y Warren, 2012). La enzima precorrin-8X metilmutasa es común a ambas rutas (CobH y CbiC, respectivamente)

y cataliza la conversión de precorrin-8X a hidrogenobirinato (Warren *et al.*, 2002; Cohen, 2014). El rol más destacado de la cobalamina en diversos organismos es el de actuar como cofactor de múltiples reacciones enzimáticas y en rizobios es fundamental para la actividad de enzimas como la metionina sintasa (MetH), metilmalonil-CoA mutasa (BhbA) y ribonucleotido reductasa (NrdJ), de las cuales MetH y NrdJ participan en la respuesta a estrés oxidativo y/o salino en rizobios (Taga y Walker, 2010; Jiang *et al.*, 2004). Lo que sugiere un rol indirecto de la cobalamina en la respuesta a estrés abiótico. En *S. meliloti*, mutantes deficientes en la síntesis de B₁₂ sobreproducen el exopolisacárido I (EPS-I), aunque se desconoce la relación entre síntesis de cobalamina y producción de EPS-I (Barnett y Long, 2018). Como se muestra más adelante, el mutante LC4829 es auxótrofo para cobalamina.

Particularmente en este grupo de transposantes, las mutaciones descritas generaron fenotipos sensibles para ambas condiciones, lo que sugiere que este conjunto de genes ejerce una respuesta protectora compartida para ambas situaciones. Los estudios realizados en condiciones únicas de estrés permiten describir los mecanismos especializados de respuesta. No obstante, en condiciones naturales las bacterias están enfrentadas a más de un factor estresante en simultáneo, por lo que evolutivamente han adquirido propiedades ventajosas que confieren mecanismos de protección a múltiples estreses. Ejemplo de ello es el fenómeno de protección cruzada del estrés (*cross-stress protection*), el cual sostiene que la exposición de una bacteria a un factor estresante provee ventajas o desventajas adaptativas frente a un segundo estrés (Dragosits *et al.*, 2013, Zorraquino *et al.*, 2017, Dragosits y Matanovich, 2013). Este fenómeno ha sido ampliamente estudiado en *E. coli* y se han llegado a conclusiones como que la protección de estrés cruzado es un fenómeno ubicuo que puede provenir tanto de efectos pleiotrópicos como de rutas o genes subyacentes y que ciertas mutaciones puntuales se fijan en una población cuando confieren ventajas adaptativas significativas.

Por otra parte, resultó llamativo que no se obtuvieran mutantes con sensibilidad única a condiciones alcalinas, como sí se observó en el grupo de mutantes a salinidad anteriormente descritas, salvo quizá para el mutante en *cobH* (LC4829), que mostró una significativa sensibilidad a pH alcalino mientras que apenas vio alterada su tolerancia a salinidad. Esto sugiere una cierta dependencia de los mecanismos de respuesta al estrés alcalino respecto del salino, pero no al revés. Un escenario similar se observó en *Saccharomyces cerevisiae* en donde un ensayo de evolución *in vitro* reveló que luego de 300 generaciones las poblaciones desarrollaron protección cruzada asimétrica, donde la tolerancia al estrés oxidativo protegía frente al estrés osmótico, pero no al revés (Dhar *et al.*, 2013).

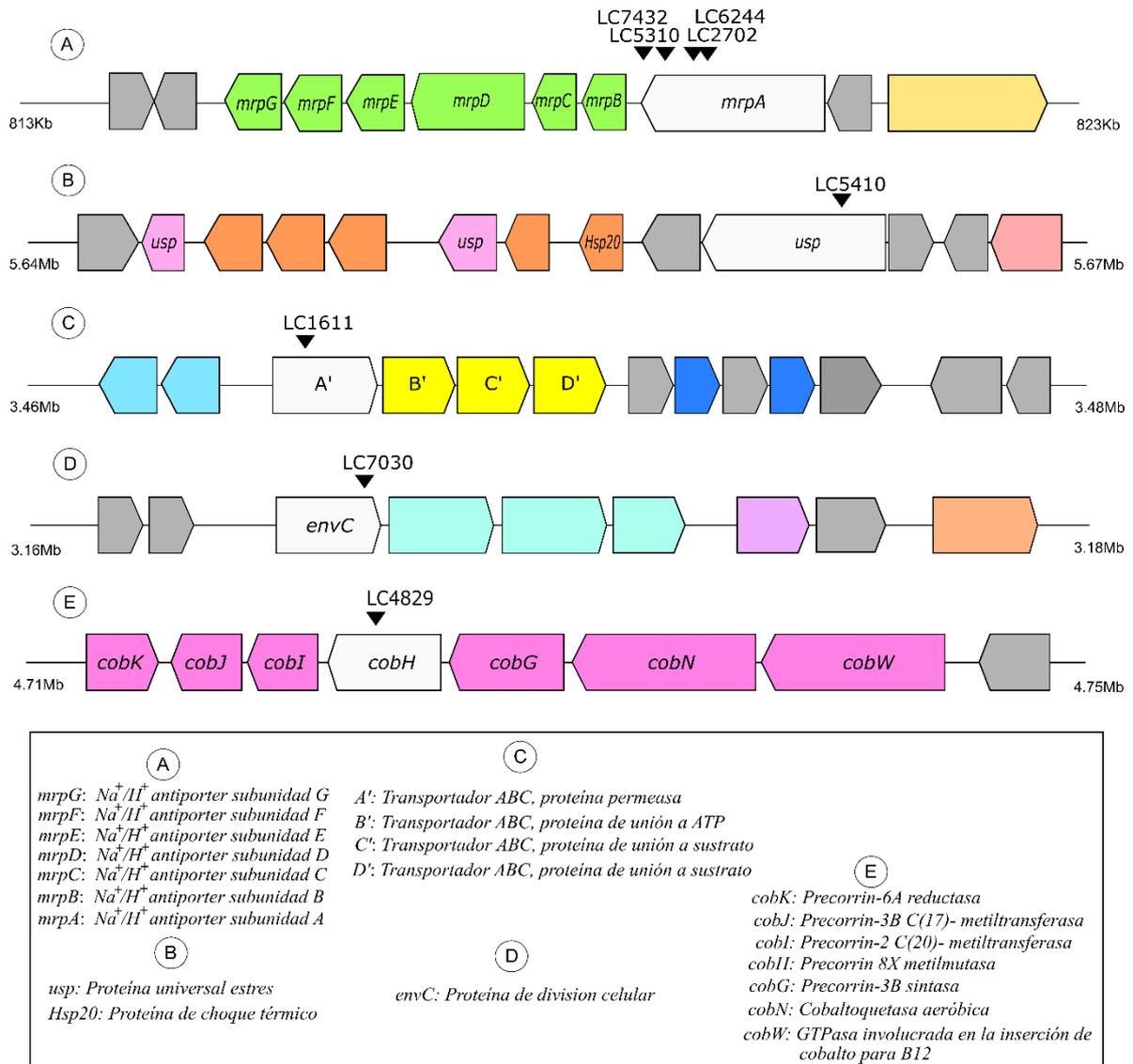


Figura V.5. Contexto genómico de las mutaciones que provocan sensibilidad a salinidad y alcalinidad en BA135. Los genes están representados mediante bloques y etiquetas en su interior, cuya descripción se indica en la leyenda ubicada en el recuadro inferior. Asimismo, la dirección de los bloques señala el sentido de transcripción de los genes. Los triángulos invertidos (▼) representan el punto de inserción del transposón, los genes interrumpidos se muestran de color blanco. En gris, los genes de función desconocida.

V.3.5. Evaluación funcional de mutantes de la cepa BA135

Algunos de los mutantes descritos anteriormente fueron evaluados funcionalmente con el objetivo de verificar la relación entre la inserción del transposón y el o los fenotipos asociados. En primera instancia, se eligieron aquellos mutantes cuya complementación o evaluación era posible mediante estrategias accesibles y sencillas de implementar. Para el mutante LC2717, interrumpido en el gen que codifica para la enzima Glucosa-6-P isomerasa, involucrada en el metabolismo de azúcares, se utilizó el medio mínimo (MM) modificado con manitol como única fuente de carbono. Se utilizó la técnica de diluciones por gota para evaluar el crecimiento del mutante LC2717 en presencia de manitol. Usando la cepa WT BA135 como control, se evidenció la ausencia total de crecimiento del mutante LC2717 a expensas de dicho azúcar (Figura V.6). Este resultado es coherente con la localización de la inserción en este mutante, ya que mutantes de *S. meliloti* carentes de actividad PGI son incapaces de crecer en medios con manitol como única fuente de carbono (Arias *et al.*, 1979).

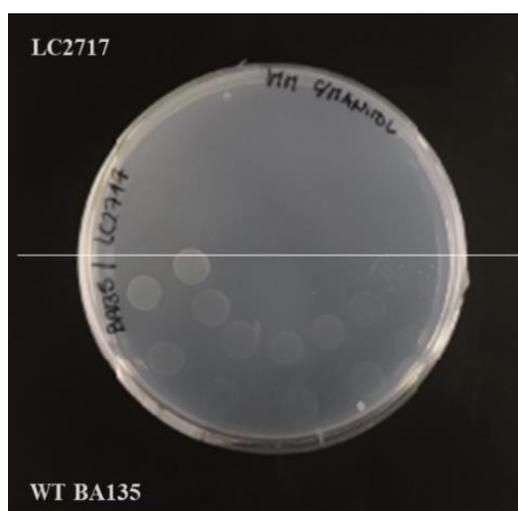


Figura V.6. Ensayo de crecimiento de la cepa BA135 y del mutante LC2717 en medio mínimo (MM) y manitol como única fuente de carbono.

Para el mutante LC3924, relacionado con la respuesta a las condiciones limitantes de fósforo inorgánico, se utilizó el medio base M9 (diCenzo *et al.*, 2017) con MOPS (MM9) suplementado con fosfato de potasio (KH_2PO_4) a 3 concentraciones distintas, para recrear diferentes concentraciones de fosfato (KH_2PO_4 2 mM, 40 μM y 4 μM). Se observó disminución de crecimiento del mutante LC3924 a bajas concentraciones de fosfato en las diluciones más altas en comparación con la cepa WT, sugiriendo que la función que tendría el gen *phoB* en condiciones limitantes de fósforo estaría probablemente afectada en este mutante.

ALTAS CONCENTRACIONES DE FOSFATO

2mM

BAJAS CONCENTRACIONES DE FOSFATO

40µM

4µM

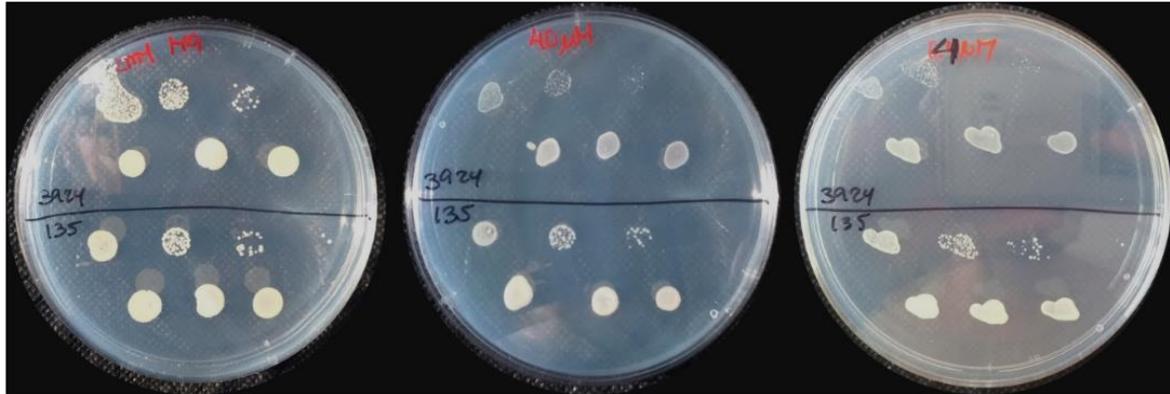


Figura V.7. Crecimiento de la cepa BA135 y del mutante LC3924 en medio M9 con diferentes concentraciones de fosfato de potasio (KH_2PO_4).

La mutación en la cepa LC4829 (*cobH*) sugería una auxotrofia para cobalamina. Por ello, se evaluó el crecimiento de LC4829 en medio AB sacarosa con y sin estrés (Figura V.8 A, B, C), así como en condiciones de medio mínimo agarizado (Figura V.8 D). Tal como se observa en las curvas de crecimiento, tanto en las condiciones control y de estrés por salinidad y alcalinidad (Figura V.8 B y C), el mutante LC4829 muestra problemas en el crecimiento en comparación con la cepa silvestre BA135 (Figura V.8 A y D). No obstante, la adición de cobalamina al medio de cultivo restaura el crecimiento de LC4829 en todas las condiciones. Esto sugiere que la cepa LC4829 es auxótrofa para cobalamina y que su pérdida de tolerancia a estrés efectivamente se debe a una deficiencia de vitamina B12. Estrategias similares para la restauración de fenotipo han sido utilizadas anteriormente en *S. fredii* RT19, cuyos mutantes complementados con colina, betaína, sarcosina y metionina restauraron sus fenotipos tolerantes a condiciones salinas (Jiang *et al.*, 2004).

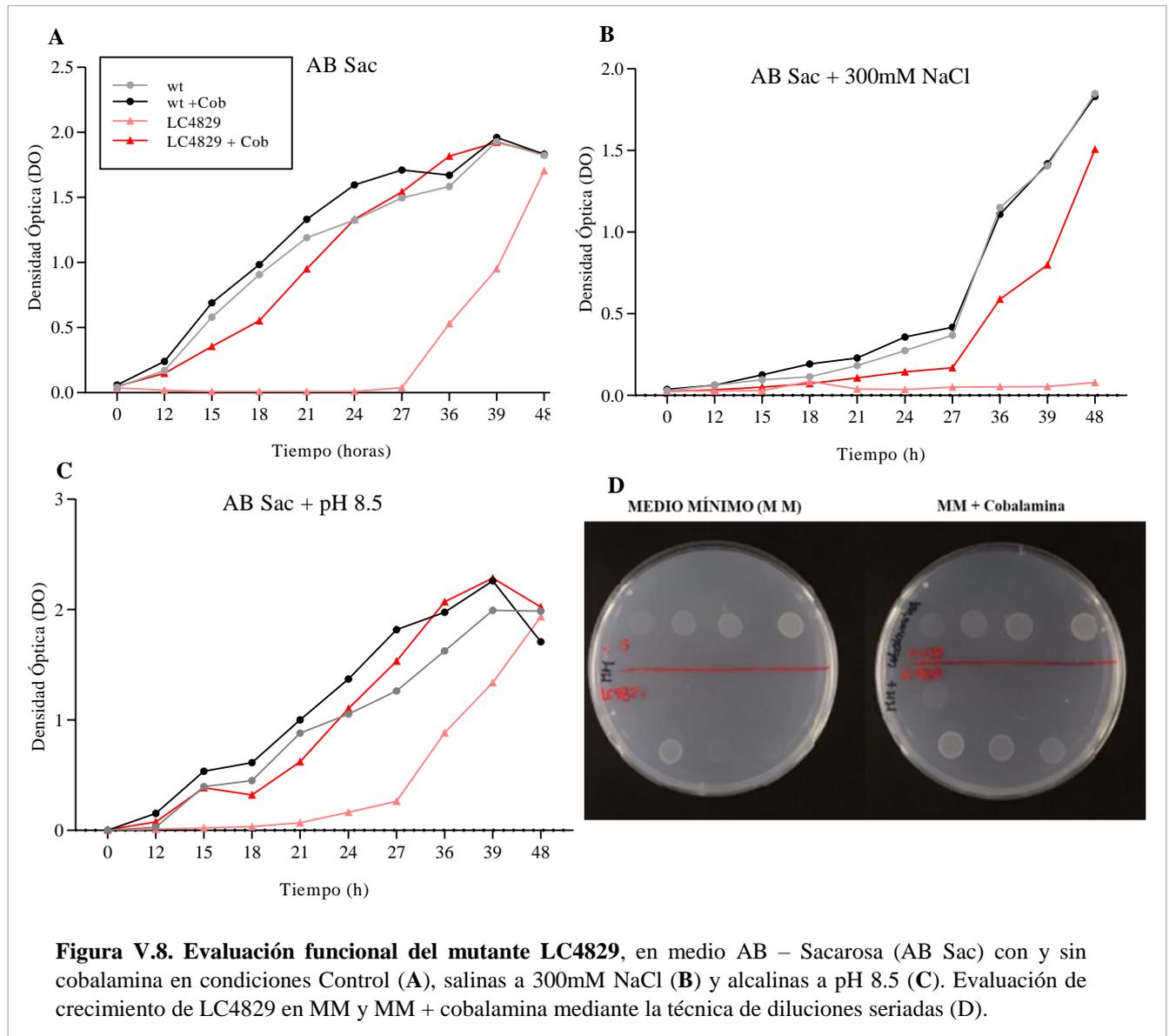


Figura V.8. Evaluación funcional del mutante LC4829, en medio AB – Sacarosa (AB Sac) con y sin cobalamina en condiciones Control (A), salinas a 300mM NaCl (B) y alcalinas a pH 8.5 (C). Evaluación de crecimiento de LC4829 en MM y MM + cobalamina mediante la técnica de diluciones seriadas (D).

V.3.6. Efecto de las mutaciones en la capacidad simbiótica con *L. tenuis*

Se evaluó la capacidad de los mutantes para nodular las raíces de *L. tenuis* en placas con medio Evans agarizado, bajo condiciones controladas sin estrés. Se evidenció la aparición de nódulos en las plantas de *L. tenuis*, aunque se observaron diferencias en los tiempos de aparición de los nódulos entre los mutantes (Fig. V.9; Tabla V.7). En estas condiciones, los mutantes LC619, LC3924, LC3215 y LC2717 no formaron nódulos, sugiriendo un posible efecto negativo en la capacidad infectiva de dichos mutantes. No obstante, esto último fue descartado mediante un ensayo posterior de nodulación en macetas con arena estéril como sustrato inerte. A los 25 días post inoculación, se

constató la presencia de nódulos en las plantas inoculadas (Tabla V.7, columna M), evidenciando que ninguno de los genes identificados en este estudio resulta esencial para la formación de nódulos, o al menos que las mutaciones descritas no bloquean la capacidad de la bacteria para la inducción de nódulos en su planta huésped. No obstante, la formación de nódulos no garantiza que la eficiencia simbiótica, particularmente el proceso de fijación del nitrógeno, no esté afectada en alguno de estos mutantes.

Tabla V.7. Ensayo de nodulación en *L. tenuis*

Cepa	Tiempo (día)						
	7	14	18	21	24	30	M
BA135 WT				+	+	+	+
LC2710			+	+	+	+	
LC523			+	+	+	+	
LC5410			+	+	+	+	
LC5310				+	+	+	
LC1122				+	+	+	
LC4829					+	+	
LC7432					+	+	
LC209					+	+	
LC6244					+	+	
LC7030					+	+	
LC2702						+	
LC1611					+	+	
LC3924							+
LC3215							+
LC619							+
LC2717							+

Los símbolos (+) indican el momento en el que se registró la aparición de al menos un nódulo en plantas cultivadas en placa cuadrada. M se refiere al ensayo en maceta

V.3.7. Efecto de las mutaciones en la eficiencia simbiótica en *L. tenuis*

Por lo anterior y como estrategia complementaria, se realizó un ensayo de inoculación en plantas de *L. tenuis* cultivadas en jarras Leonard, sin estrés y bajo condiciones controladas de temperatura, humedad e iluminación. A partir de los resultados obtenidos en el apartado anterior (V.3.6) y en base a la función sugerida para los mutantes descritos, se seleccionaron 5 mutantes a fin de evaluar el efecto de las inserciones en la eficiencia simbiótica. Los mutantes LC4829, LC7030, LC5410, LC2702 y LC503 (Tabla V.6) se utilizaron como inóculo en plántulas de *L. tenuis*. Adicionalmente se agregaron como controles positivo y negativo a la cepa silvestre BA135 (WT) y agua destilada estéril (Si), respectivamente (Figura V.10). Tras 5 semanas post-inoculación, se

determinaron las variables de peso fresco y peso seco de la biomasa aérea (Figura V.9). De acuerdo al análisis de varianza, se observó una reducción significativa ($p \leq 0.01$) del peso seco y fresco de las plantas inoculadas con LC4829 (*cobH*) y LC7030 (*envC*) respecto al de las inoculadas con la cepa silvestre.

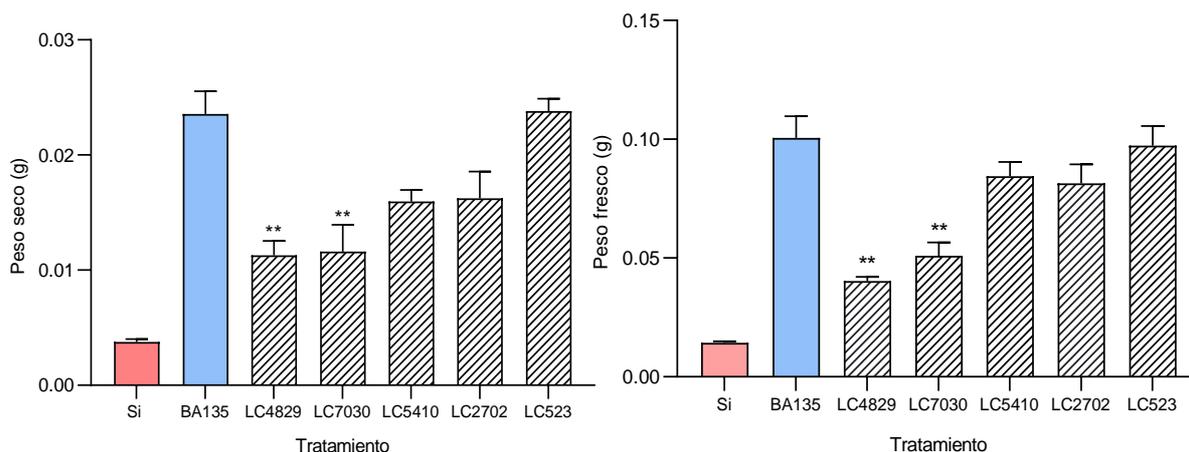


Figura V.9. Ensayo de eficiencia simbiótica de algunos mutantes derivados de BA135. Se empleó un diseño experimental completamente aleatorizado. Los resultados representan la media aritmética de 3 a 5 réplicas biológicas + SE (error estándar). Los valores fueron analizados mediante ANOVA seguido del test de Dunnet como post-hoc. Los asteriscos (**) indican diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.01$) de los tratamientos respecto al control.

Los resultados sugieren que un número significativo de los genes implicados en la tolerancia a salinidad y/o alcalinidad de BA135 en vida libre, son también importantes para el establecimiento de una simbiosis eficiente. Este resultado concuerda con lo observado en estudios previos con otros rizobios (Nogales *et al.*, 2002; Domínguez-Ferreras *et al.*, 2006 y 2009; Moussaid *et al.*, 2015; da Silva *et al.*, 2017) y que responde al consenso de que los rizobios enfrentan varios tipos de estreses (pH, oxidativo, osmótico, etc.) en la rizosfera y en el interior de los nódulos. Entre las proteínas y funciones que son importantes para la tolerancia a salinidad y otros estreses abióticos, que son además necesarias para el óptimo establecimiento y funcionamiento de la simbiosis, están aquellas relacionadas con el mantenimiento de la integridad y función de membranas, pared y otros componentes de la superficie celular, la síntesis y/o acumulación de solutos compatibles, la expresión de chaperonas y proteínas de respuesta a estrés, la expresión de sistemas de detoxificación, etc. (revisado por da Silva *et al.*, 2017).



Figura V.10. (A) Ensayo de nodulación de los mutantes de BA135 en condiciones control. Se empleó como inóculo cultivos puros de los mutantes en fase exponencial de crecimiento. Las plantas se incubaron por 5 semanas bajo condiciones controladas de luz. Los círculos blancos marcan la presencia de nódulos. (B) Ensayo de eficiencia simbiótica en condiciones estériles, sin estrés. Los tratamientos se indican como WT: BA135, 1: LC4829, 2: LC7030, 3: LC5410, 4: LC2702, 5: LC523.

En el caso particular de las inserciones en los genes *cobH* y *envC*, de los mutantes LC4829 y LC7030 respectivamente, la eficiencia simbiótica se afectó de manera significativa (Figura V.10). La capacidad para sintetizar cobalamina parece ser importante para la nodulación y eficiencia simbiótica de *Sinorhizobium fredii* (Medina et al., 2008) y *S. meliloti* (Campbell et al., 2006). En esta última bacteria, la cobalamina es necesaria para la actividad de al menos dos enzimas, MetH (metionina sintasa) y NrdJ (ribonucleótido reductasa), ambas dependientes de cobalamina como cofactor catalítico. Al menos la enzima NrdJ, que es resistente a inactivación por ROS y RNS, sería necesaria

para la supervivencia de la bacteria dentro del nódulo (Taga y Walker, 2010). El genoma de la cepa BA135 codifica tanto para una ribonucleótido reductasa de tipo NrdJ (BA135_6594), así como para una metionina sintasa MetH (BA135_2604), ambas dependientes de cobalamina. Por otra parte, el gen *envC* tendría una importante función como activador de las amidasas de peptidoglucano (PG) periplásmicas, requeridas para la división del PG septal (Peters *et al.*, 2011; Cook *et al.*, 2020). La importancia de esta actividad para el establecimiento de la simbiosis no había sido descrita hasta ahora.

V.4. Análisis Transcriptómico de la cepa BA135 en condiciones salino- alcalinas

Complementariamente a la mutagénesis aleatoria se realizó un análisis transcriptómico de la cepa BA135 bajo condiciones de estrés combinado salino-alcálico, mediante la metodología de RNAseq, para obtener una visión más global de la respuesta de BA135 frente a la congruencia de ambos estreses. Basados en las curvas de crecimiento obtenidas previamente (ver V.2.2), se eligió la condición pH 8.0 + 200 mM de NaCl como condición problema ya que esta fue la más restrictiva en la que BA135 presentó problemas de crecimiento. Previo a la secuenciación de alto rendimiento, el ARN purificado de las muestras fue cuantificado y cualitativamente evaluado, para asegurar su integridad y la calidad requerida. El diseño experimental se detalla en materiales y métodos. Los parámetros de pureza del ARN fueron estimados mediante un equipo Nanodrop y las concentraciones fueron cuantificadas fluorométricamente (Tabla V.8). Las relaciones de pureza (Absorbancia 260/280 y 260/230) se encontraron dentro de los valores esperados para muestras de ARN consideradas puras ($260/280 \approx 2.00$), y libres de contaminantes ($260/230 > 2.0$). La integridad de las muestras se verificó inicialmente por electroforesis en gel de agarosa, y posteriormente por electroforesis en chip mediante el uso de *Bioanalyzer 2100* (Agilent), este último realizado por los servicios de proteómica del Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra (IPBLN-CSIC, Granada), no observándose degradación significativa del ARN (Figura V.11).

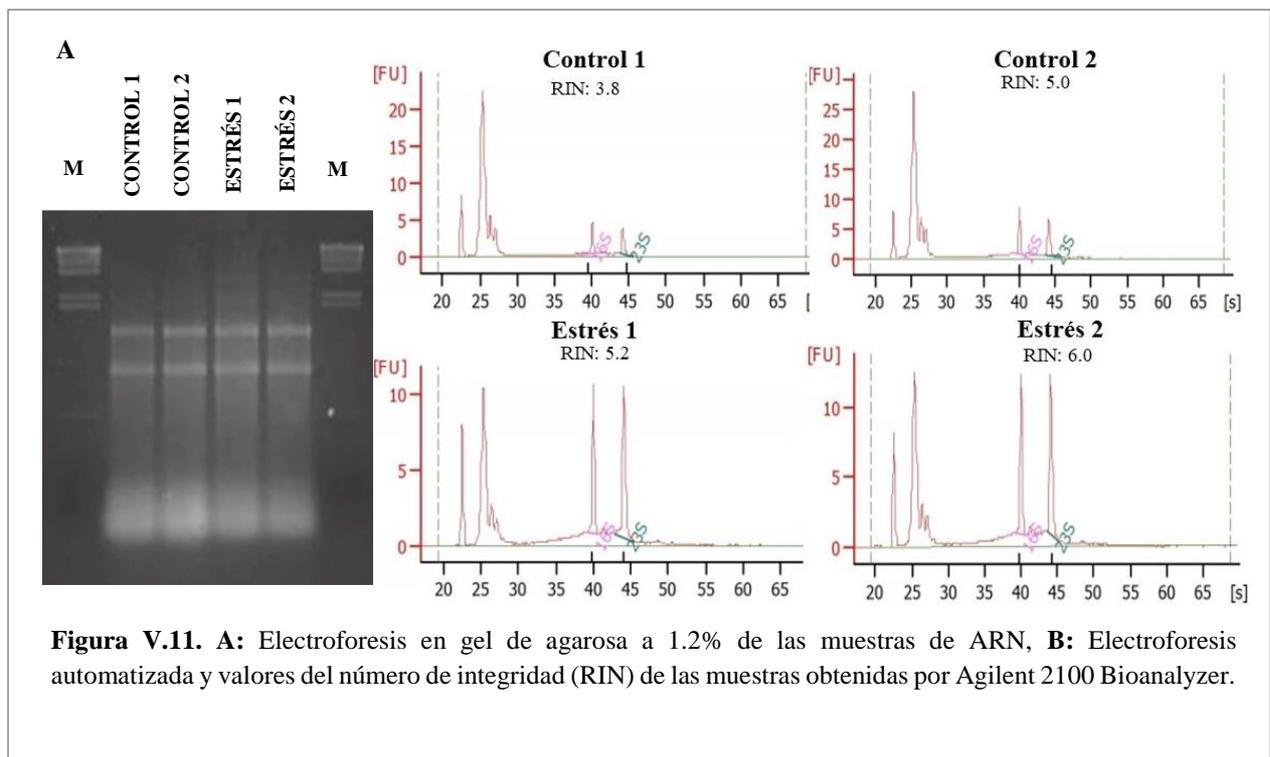


Figura V.11. A: Electroforesis en gel de agarosa a 1.2% de las muestras de ARN, **B:** Electroforesis automatizada y valores del número de integridad (RIN) de las muestras obtenidas por Agilent 2100 Bioanalyzer.

Mediante este último análisis se obtuvo el número de integridad de ARN, RIN (*RNA integrity number*). Se obtuvieron valores de RIN entre 3.8 y 6.0, lo cuáles podrían interpretarse como no adecuados. Sin embargo, se debe considerar que el algoritmo del *Bioanalyzer* no ha sido diseñado para uso de muestras bacterianas por lo que los valores de RIN pueden ser bajos y no representativos de la calidad de la muestra. En ese sentido, en base a los perfiles obtenidos por electroforesis automatizada y en gel, consideramos que la integridad de las muestras resultó óptima para RNAseq. Por limitaciones presupuestarias, solo pudieron utilizarse 2 réplicas biológicas, compuestas por 3 réplicas técnicas cada una, para cada condición (ver II.6.1).

Tabla V.8. Cuantificación de la concentración e índices de pureza por diferentes metodologías

Muestra	Qubit	Agilent 2100 Bioanalyzer	Nanodrop	
	Concentración ng/μL	Concentración ng/μL	260/280	260/230
Control 1	768	939	2.000	2.27
Control 2	1344	1173	2.000	2.28
Estrés 1	800	1032	2.000	2.34
Estrés 2	712	936	2.010	2.31

Comprobada la calidad de las muestras de ARN, las mismas fueron enviadas al servicio de secuenciación de Novogene en *Hong Kong*, en donde se sometieron a un proceso complementario de análisis de calidad y purificación de ARNm.

Secuenciación:

Aproximadamente 10 millones de lecturas crudas por muestra, fueron obtenidas por tecnología de secuenciación de alto rendimiento en la plataforma Illumina HiSeq3000/4000 (PE150). Dichas lecturas fueron analizadas siguiendo un flujograma de trabajo comprendido en dos etapas: Pre-procesamiento y análisis de datos. Ambas fueron realizadas en la terminal de interpretación de órdenes del software libre UBUNTU. En la primera etapa, se realizó el análisis de calidad de datos, mapeo de lecturas al genoma de referencia, ensamblado y cuantificación de transcritos por líneas de comando, mientras que el análisis de datos consistió en la estimación de los niveles de transcripción, cálculo de la expresión diferencial y enriquecimiento funcional realizados con el software estadístico R-project.

Pre-procesamiento:

Previo al análisis de calidad, se realizó el filtrado exitoso de las lecturas de baja calidad y de artefactos, tales como las secuencias de los adaptadores, usando la herramienta TRIMMOMATIC. Seguidamente, se realizó el análisis de la calidad de lecturas filtradas con la herramienta FastQC (versión 0.11.8). El análisis de control de calidad comprobó la buena calidad del set de datos crudos,

ubicando el promedio de la puntuación de calidad (QS) de todas las réplicas en el cuartil superior (Tabla V.9).

Tabla V.9. Calidad de las lecturas crudas de BA135 en condiciones restrictivas.

Muestras	Lecturas crudas	Lecturas limpias	QS	Tamaño de secuencias	% GC
Control 1	8676644	8368836	36	148-150	62
Control 2	9422347	9172337	36	149-150	62
Estrés 1	9100689	8856781	36	149 -150	62
Estrés 2	9522233	9247138	36	149 -150	62

QS: Puntuación de calidad de las lecturas.

El alineamiento de las lecturas se realizó usando la herramienta BOWTIE2 (Langmead y Salzberg, 2012) con 6505 de los 6827 genes del genoma de la cepa de referencia *Aminobacter* sp. BA135. Se generaron archivos en formato SAM, los cuales fueron transformados a uno de tipo binario (BAM) para optimizar el tiempo de cómputo del análisis con la herramienta SAMTOOLS. Dichos archivos fueron cuantificados usando la herramienta HTseq y fusionados (*merge function*) para realizar los análisis estadísticos correspondientes.

Análisis de datos

Análisis de Expresión Diferencial (DESeq2):

El análisis diferencial se realizó usando la función *DESeqDataSetFromMatrix* del paquete DESeq2 para los transcriptos alineados con 6505 genes del genoma de la cepa BA135. El ajuste y la normalización del set de datos se realizó mediante el uso de la función *lfcShrink* (Figura V.12).

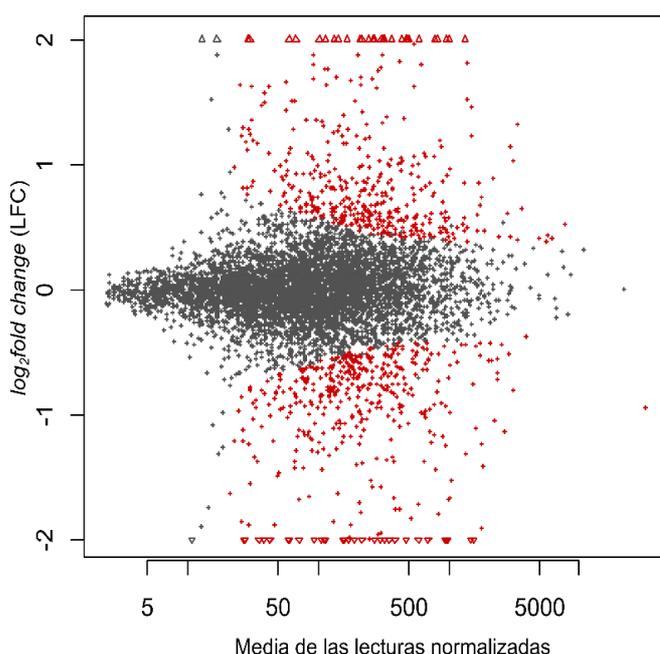


Figura V.12. MA-plot que representa la media normalizada de todas las lecturas cuantificadas para los 6505 genes del genoma de BA135 producto de la comparación de las dos condiciones. Aquellas lecturas que están expresados diferencialmente de forma significativa se muestran como puntos coloreados de rojo.

Entre las variables calculadas se destacan la relación logarítmica de un transcripto en dos condiciones ($\log_2\text{FoldChange}$) y el p-valor ajustado (p_{adj}). Se obtuvo que 664 genes mostraron expresión diferencial significativa ($p_{\text{adj}} < 0.05$), de los cuales 329 (5.1%) evidenciaron estar sobreexpresados y 335 (5.1 %) subexpresados en la condición problema (Figura V.13).

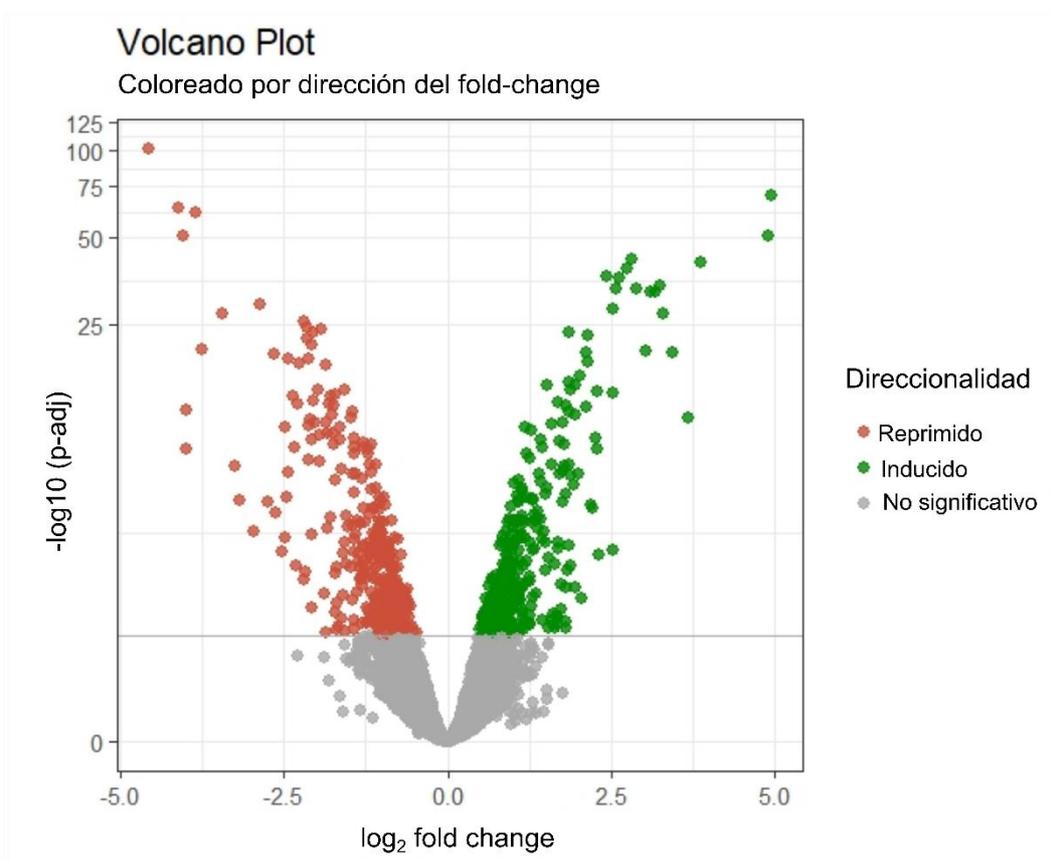


Figura V.13.- Expresión diferencial de la cepa *Aminobacter* sp. BA135 en condiciones salino-alcálinas. Los 664 genes expresados diferencialmente ($p_{\text{adj}} < 0.05$) se muestran coloreados en verde si se encontraron inducidos o en rojo si se encontraron reprimidos.

En el anexo V.2. se muestra el mapa de calor (Heatmap) de los valores de expresión génica ($\log_2\text{FoldChange}$) de los 664 genes expresados diferencialmente entre las réplicas biológicas de ambos tratamientos. En él se observa la agrupación por tratamiento de las réplicas biológicas (columnas), mostrando la correlación positiva de los valores de expresión entre ellas y la diferencia de expresión en función del tratamiento.

Anotación:

Debido a que la cepa *Aminobacter* sp. BA135 no es considerada un organismo modelo, no se procedió a utilizar la metodología de anotación convencional dispuesta para el análisis de RNAseq. En ese sentido, se procedió a realizar el proceso de anotación de los genes diferencialmente expresados de forma manual utilizando como herramientas los genomas anotados de las cepas *Aminobacter* sp. BA135 (datos no publicados) y *Aminobacter aminovorans* KCTC2477. Se utilizaron las plataformas KEGG (Kyoto Encyclopedia of Gene and Genomes), así como las herramientas BLAST, INTERPRO y Pfam de The European Bioinformatic Institute (EMBL-EBI). Es necesario recordar que según los análisis bioinformáticos realizados por nuestro grupo, la cepa KTCC2477 (KEGG T04343) en realidad pertenece a la especie *A. ciceronei* (datos no publicados), del mismo modo que la cepa BA135, por lo que de aquí en adelante nos referiremos a la cepa *A. aminovorans* KCTC2477 como *Aminobacter* KCTC2477.

V.4.1. Genes relevantes en la respuesta al estrés salino-alkalino

De los 6505 genes del genoma de referencia de la cepa *Aminobacter* sp. BA135, 664 (10.20%) estuvieron diferencialmente expresados, entre inducidos y reprimidos. Para detallar con precisión la identidad y función de los genes involucrados en la respuesta al estrés salino-alkalino según el análisis transcriptómico, se eligieron genes teniendo como criterio el valor de la variable $\log_2 \text{FoldChange}$ (Log2FC). Genes con valores de $L2FC \geq 1.5$ y $L2FC \leq -1.5$, fueron considerados como los inducidos y reprimidos, respectivamente, de relevancia más significativa en la respuesta celular a estrés salino-alkalino. Con este criterio de selección, el número de genes diferencialmente expresados se redujo a 144, de los que 69 eran inducidos y 75 reprimidos. Los resultados se detallan en las tablas V.10 y V.11, respectivamente. Cabe destacar que algunos de los genes diferencialmente expresados en condiciones de estrés coincidieron con algunos de los identificados anteriormente durante el estudio genético de la adaptación a estrés. Concretamente estos fueron BA135_1058 y BA135_1055 (Tabla V.10), ambos codifican proteínas componentes de un sistema antiportador de protones, y BA135_6670 que codifica para una proteína tipo Usp (Tabla V.11)

Tabla V.10. Relación de genes con mayores valores de aumento de expresión en condiciones salino-alcálinas.

Locus_tag	Log2FC	p_{adj}	Ortólogo KCTC2477	Descripción
BA135_174	3.019	7.18E-07	No existe (≈AA2016_1634)	Familia Inositol monofosforiltransferasa
BA135_175	2.288	4.71E-02	No existe (≈AA2016_0297)	Transportador ABC, proteína de membrana
BA135_178	2.121	2.61E-13	No existe (≈AA2016_1631)	Transportador ABC, proteína de membrana
BA135_571	2.258	2.07E-10	AA2016_4352	T5SS, proteína autotransportadora
BA135_602	1.544	0.0374	AA2016_4369	N-acetilneuraminato epimerasa
BA135_672	1.815	0.0000	No existe	Secuencia no codificante; excluida
BA135_673	1.619	0.0196	AA2016_4763	Proteína de respuesta al estrés similar a DUF1234 desconocida (DUF1234)
BA135_678	2.180	0.0000	AA2016_4425	Proteína hipotética
BA135_679	1.872	0.0011	AA2016_6331	Proteína de membrana; función desconocida
BA135_685	1.689	0.0003	AA2016_4415	Proteína hipotética
BA135_926	1.812	1.69E-13	AA2016_4609	Familia de proteínas amidas
BA135_1052	1.856	2.08E-08	AA2016_4703	Na ⁺ /H ⁺ antiportador submembrana
BA135_1054	1.729	0.0148	AA2016_4705	Na ⁺ /H ⁺ antiportador submembrana
BA135_1055	1.711	3.40E-10	AA2016_4706	Na ⁺ /H ⁺ antiportador submembrana
BA135_1056	2.038	0.009	AA2016_4707	Na ⁺ /H ⁺ antiportador submembrana
BA135_1057	1.691	0.0319	AA2016_4708	Na ⁺ /H ⁺ antiportador submembrana
BA135_1058	2.139	2.09E-10	AA2016_4709	Putativa cation monovalente/H ⁺ antiportador
BA135_1059	1.949	0.0047	AA2016_4710	Proteína hipotética
BA135_1098	2.531	6.73E-01	AA2016_4739	Proteína desramificadora del glucógeno
BA135_1101	1.774	6.53E-10	AA2016_4741	Glucógeno sintasa, familia 1
BA135_1105	1.870	9.77E-08	AA2016_4743	Proteína ramificada 1,4-alfa-D-glucosiltransferasa
BA135_1107	1.853	5.46E-10	AA2016_4744	Glucógeno fosforilasa

BA135_1108	1.886	2.53E-01	AA2016_4745	Transportador ABC, proteína c
BA135_1399	1.647	0.0365	AA2016_5152	Proteína hipotética
BA135_1503	1.991	8.14E-06	AA2016_5226	Transportador ABC, proteína de
BA135_1886	1.742	0.0037	AA2016_6632	<i>Enoyl-(Acyl carrier protein) red</i>
BA135_2046	1.829	0.0016	AA2016_3989	NadC, Nicotinato nucleotido pirofo fosforibosil transferasa (C
BA135_2236	2.432	2.86E-23	IG197_09695, cepa SR38	Proteína hipotética
BA135_2237	2.813	6.80E-29	AA2016_5363	Probable metionil amino
BA135_2238	1.859	2.47E-04	AA2016_5364	Dominio parecido a
BA135_2566	1.586	0.0248	EDC40_RS17325 (cepa DSM7048)	Proteína hipotética
BA135_2604	3.662	2.67E-12	AA2016_0187	Metionina sintas
BA135_3131	3.091	5.02E-19	AA2016_0686	Proteína similar a CsbD, proteína de re
BA135_3224	1.805	0.0282	AA2016_0763	S-adenosil-L-homocisteín
BA135_3328	1.791	2.74E-08	AA2016_0849	Proteína hipotética
BA135_3527	3.430	1.92E-06	AA2016_1020	Función desconocida (D
BA135_3534	3.175	2.77E-19	AA2016_1026	Putativa L,D-peptidoglucano tran
BA135_3535	3.241	7.82E-21	AA2016_1027	Proteína hipotética
BA135_3553	1.611	0.03183	AA2016_1042	Proteína hipotética
BA135_3562	2.025	4,46E-03	AA2016_1048	Región interna
BA135_3788	1.953	1.36E-12	AA2016_1313	Familia de proteínas GreA/GreB; in polimerasa
BA135_3794	2.307	5.14E-04	AA2016_1317	Proteína hipotética
BA135_4003	1.585	1.12E-13	AA2016_1475	Función desconocida (L
BA135_4118	1.685	8.91E-14	AA2016_1599	Transportador ABC, proteín
BA135_4119	2.526	4.59E-15	AA2016_1600	Transportador ABC, proteína c
BA135_4124	1.691	0.0214	AA2016_1604	HWE_HK histidina kinas
BA135_4127	1.797	0.0045	AA2016_1607 / AA2016_1606	Región intergénica (165775

BA135_4129	2.151	3.36E-05	AA2016_1608	<i>CheY-like receiver doma</i>
BA135_4323	1.712	7.98E-08	AA2016_1754	Transporter ABC, proteína de unión
BA135_4458	2.121	1.13E-06	AA2016_1873	Dominio de proteína simil
BA135_4459	2.870	7.02E-20	AA2016_1874	Región adyacente a AA2016_1874
BA135_4460	2.569	6.73E-20	AA2016_1874	Similar a Xilosa isomerasa, Domi
BA135_4594	2.290	1.49E-09	AA2016_1984	Familia de regulador transcr
BA135_4598	1.662	0.02	AA2016_1987	Posible Enoyl-CoA hidrat
BA135_4663	1.639	0.00103	AA2016_2035	PTS transportador PTS sub
BA135_4664	1.507	7.30E-16	AA2016_2036	Homoespermidina sintasa/ Sacchar
BA135_4828	1.917	3.74E-07	AA2016_2175	Dominia Tim44, proteína de memb transportador
BA135_4830	2.523	3.51E-04		Proteína relacionada a Transposa
BA135_5313	1.520	5.42E-07	AA2016_2685	Aldehído dehidroge
BA135_5436	1.858	3.07E-02	AA2016_2782	Dominio de proteína híbrido HTI
BA135_5438	1.542	6.53E-04	AA2016_2784	Dominio EamA; posible c
BA135_5503	1.843	6.32E-13	AA2016_2837	Familia de proteína Dienelac
BA135_5694	1.768	4.62E-08	AA2016_2999	Proteína hipotética
BA135_5727	1.595	2.21E-07	AA2016_3023	Familia de regulador transcri
BA135_5735	1.757	7.39E-12	AA2016_3029	Función desconocida (DUF3520); si amiloide
BA135_6031	3.874	5.82E-28	AA2016_3761	Familia Lactoilglutination lias
BA135_6032	4.895	1.42E-37	AA2016_3760	Función desconoc
BA135_6033	4.936	1.36E-56	AA2016_3759	Familia oxidoreductasa Glucosa-Me
BA135_6409	2.728	1.34E-25	AA2016_3416	Dominio HTH, Familia de regulador

Locus_tag: Código del gen, **Log2FC:** log2foldChange, **p-adj:** p-valor ajustado. Los genes se encuentran ordenados e identificador (Locus_tag) asignado en la anotación; aquellos adyacentes con fondo coloreado (amarillo) corresponden a transcripcionalmente relacionados, p.e., integrar un mismo operón. (≈) indica similaridad no significativa.

Tabla V.11. Relación de genes con mayores valores de decremento de expresión en condiciones salino-alcálinas

Locus_tag	Log2FC	p-adj	Ortólogo KCTC2477	Descripción
BA135_309	-2.5279	3.89E-04	AA2016_4134	Transportador ABC, prote
BA135_319	-1.5555	0.001	AA2016_4140	<i>Amino acid-Polyamine-org</i> Superfamily (I
BA135_894	-1.6771	0.001	IG197_06325 (Cepa SR38)	Exportador
BA135_918	-2.9648	7.07E-05	AA2016_4603	Proteína de M
BA135_1431	-2.0276	9.08E-12	AA2016_5176	Putativa proteína fas
BA135_1618	-2.0649	2,46E-10	AA2016_0624	Familia citocr
BA135_1988	-2.7309	3.10E-06	AA2016_0760	<i>NDP-sugar phosphor</i>
BA135_2041	-1.5191	4.37E-05	AA2016_3986	<i>Nudix Hyd</i>
BA135_2201	-1.6987	0.011	AA2016_5334	Proteína hipotética, fu
BA135_2325	-3.8538	7.77E-62	AA2016_5438	Fenilalanina 4-
BA135_2326	-4.0953	4.70E-64	AA2016_5439	Dominio EamA; po
BA135_2327	-2.6335	1.00E-05	AA2016_5440	Proteína de membrana MF
BA135_2355	-1.5418	1.42E-05	AA2016_5466	Monooxigenasa/O
BA135_2477	-2.3546	1.74E-14	AA2016_0065	Dominio HTH, Familia de reg XRE
BA135_2514	-2.1859	3.13E-12	AA2016_0099	<i>Dominio EamA; po</i>
BA135_2599	-1.6573	0.0331	AA2016_0183	Transportador ABC, p
BA135_2600	-2.6468	2.03E-06	AA2016_0184	Transportador ABC, comp
BA135_2601	-2.2806	1.19E-13	AA2016_0185	Oxidoreductasa FAD/NAD(P)
BA135_2602	-2.8506	6.38E-17	AA2016_0186	Putativa fenilpropion
BA135_2727	-3.4296	4.70E-14	AA2016_0300	Transportador ABC, prote
BA135_2838	-1.7161	1.88E-07	AA2016_0452	Transportador ABC, prote
BA135_2839	-1.6317	2.69E-11	AA2016_0453	Ureohidrolasa (arginasa/ag
BA135_3018	-4.5680	3.14E-101	AA2016_0597	Proteína de quimiotaxis
BA135_3019	-3.9947	1.44E-09	EDC40_112130 (DSM7048)	Dominio de pro (<i>Sulphate Transporter and An</i>

BA135_3020	-3.9926	5.03E-13	EDC40_112131 (DSM7048)	Dominio del receptor s
BA135_3021	-4.0271	1.81E-51	EDC40_112132 (DSM7048)	Proteína de quimiotaxis, F
BA135_3022	-3.2550	2.69E-08	EDC40_112132 (DSM7048)	C-terminal, Proteína de quimio CheA
BA135_3024	-3.7467	3.84E-21	AA2016_0598	Proteína de quimiotaxis n
BA135_3025	-3.1718	2.64E-06	AA2016_0599	Metiltransfer
BA135_3026	-2.4843	1.18E-04	AA2016_0600	Regulador de respuesta, prote
BA135_3231	-2.4294	1.46E-05	AA2016_0769	Fosfoenolpiruvato
BA135_3283	-1.5818	0.007	AA2016_0815	Bomba de Cati
BA135_3292	-2.1388	7.23E-09	AA2016_0822	Oxigeno-independente coprop Heml
BA135_3359	-1.7291	1.69E-15	AA2016_0877	Proteína de membra
BA135_3432	-2.1119	1.89E-11	AA2016_0939	<i>Copper chaperon</i>
BA135_3470	-1.9490	1.34E-08	AA2016_0966 Ri (1014533 - 1014670)	Acetiltrans
BA135_3870	-1.7126	0.0019	AA2016_1377 Ri (1442280 - 1442534)	Homocisteina S-metil
BA135_4368	-1.5779	0.0416	AA2016_1796	Glutaredoxina (
BA135_4518	-1.6324	3.13E-10	No existe; sec. exclusiva BA135	Proteína hip
BA135_4521	-2.0687	0.0134	No existe; sec. exclusiva BA135	Posible dioxigenas
BA135_4555	-1.7596	8.91E-11	AA2016_1952	Sarcosina oxidasa subu
BA135_4557	-2.1760	0.0017	AA2016_1954	Sarcosina oxidasa subu
BA135_4578	-1.7049	8.17E-15	AA2016_1972	Transportador ABC, prote
BA135_4584	-2.3124	0.0011	AA2016_1977	Transportador ABC, prote
BA135_4637	-1.9354	8.74E-11	AA2016_2013 /AA2016_2014	Región intergénica (20
BA135_4638	-1.7713	1.36E-12	AA2016_2014	Familia de proteína <i>H</i>
BA135_4688	-1.6908	0.0385	AA2016_2056	Regulador de respuesta, l
BA135_4934	-1.8661	1.15E-04	AA2016_5260	Formato-tetrahydrofolato
BA135_5084	-2.2633	6.51E-05	AA2016_2488 / AA2016_2489	Region intergénica (25
BA135_5362	-1.5577	2.53E-15	AA2016_2728	Proteína universal
BA135_5580	-1.7834	1.80E-05	AA2016_2903	Proteína hip

BA135_5691	-2.1499	6.33E-11	AA2016_2994	Oxidoreductasa FAD-dependie GCV_
BA135_5700	-2.4864	2.47E-11	AA2016_3003	Proteína hip
BA135_5714	-1.8044	1.11E-13	AA2016_3012	5,10-metilenotetrahidrofolato
BA135_5715	-2.3411	1.02E-09	AA2016_3013	MTHFR <i>C-term</i>
BA135_5716	-2.1170	8.73E-09	AA2016_3014	<i>Virulence factor dom</i>
BA135_5725	-2.0520	3.09E-10	AA2016_3021	Trimetilamina me
BA135_5832	-1.6260	0.024	AA2016_3112	<i>Zinc ribbon domai</i>
BA135_5941	-1.7949	1.34E-02	AA2016_3843	L-serina amor
BA135_6340	-2.1288	1.32E-05	AA2016_3474	Diguánilato
BA135_6444	-1.6059	3.97E-08	entre AA2016_3387 y AA2016_3388	Región intergénica (34
BA135_6477	-2.0459	5.49E-14	AA2016_3361	Proteína función descor
BA135_6478	-1.8293	4.93E-05	AA2016_3360	Proteína función descor
BA135_6590	-2.0799	9.61E-08	AA2016_3263	Proteína universal
BA135_6610	-1.9869	2.59E-15	AA2016_3249	Familia DedA, prote
BA135_6616	-1.7334	6.45E-10	AA2016_3244	FAD flavoproteína
BA135_6642	-2.1004	4.54E-12	AA2016_3223	Proteína hip
BA135_6647	-1.8803	0.007	AA2016_3221	Putativa A
BA135_6655	-1.8474	8.88E-12	AA2016_3214	Proteína hip
BA135_6656	-1.5887	4.57E-04	AA2016_3213	Acetiltrans
BA135_6660	-2.0751	9.19E-05	AA2016_3211	Proteína hip
BA135_6665	-1.9489	1.08E-10	AA2016_3206	Proteína universal
BA135_6667	-1.5648	1.76E-04	AA2016_3203	Proteína conservada (DU
BA135_6670	-1.8406	8.23E-11	AA2016_3199	Proteína universal

Locus_tag: Código del gen, **Log2FC:** log2foldChange, **p-adj:** p-valor ajustado, **Ri:** Región intergénica. Los genes se encuentran según identificador (Locus_tag) asignado en la anotación; aquellos adyacentes con fondo coloreado (amarillo) corresponde transcripcionalmente relacionados, p.e., integrar un mismo operón. (≈) indica similaridad no significativa

V.4.2. Cambios en el transcriptoma de BA135 en condiciones de estrés salino-alkalino

Mecanismos de regulación

Entre los genes diferencialmente expresados en condiciones salino-alkalinas, encontramos varios con posible función reguladora. Por un lado, están varios posibles reguladores transcripcionales que tienen sus homólogos en la cepa *Aminobacter* KCTC 2477 (BA135_4594/AA2016_1984; BA135_6409/AA2016_3416; BA135_5436/AA2016_2782; BA135_2477/ AA2016_0065). Los tres primeros mostraron expresión elevada (Tabla V.10), mientras que el cuarto apareció con expresión disminuida bajo condiciones estresantes (Tabla V.11). Se desconoce si se trata de activadores o represores transcripcionales, ni por supuesto sus posibles genes diana.

El gen BA135_4594 pertenece a la familia LacI y posee además de un dominio HTH (*helix-turn-helix*) de unión a ADN, un dominio de unión a ligando, lo cual sugiere que su actividad reguladora puede estar modulada por algún metabolito. Su probable vinculación transcripcional en un operón con otros 4 genes que codifican para proteínas posiblemente implicadas en el metabolismo de un compuesto carbonado, apoyaría esta posibilidad (véase más adelante).

Por su parte, BA135_6409 codifica para una proteína de pequeño tamaño (126 a.a.) que solo posee un dominio HTH de unión a ADN, común en proteínas de la familia XRE (Xenobiotic Response Element) de reguladores transcripcionales. Esta familia incluye a una multitud de proteínas implicadas en la regulación de diversos procesos celulares, incluida la tolerancia a estrés (p.ej., Hu *et al.*, 2019). En *R. etli*, otro gen que codifica para una proteína XRE está regulado por el factor sigma extracitoplásmico de respuesta a estrés abiótico: RpoE4 (Martínez-Salazar *et al.*, 2009). Esta proteína BA135_6409 parece conservada en otras cepas del género *Aminobacter* y en muchos otros Rhizobiales, aunque su función es desconocida. Lo mismo ocurre con otro gen codificante para una posible proteína XRE, (BA135_2477, también muy conservado en Rhizobiales), aunque en este caso su expresión apareció reducida bajo condiciones de estrés (Tabla V.11).

BA135_5436 codifica para una proteína híbrida que posee un dominio HTH de unión a ADN junto a un dominio metiltransferasa. Este gen está bastante conservado en Rhizobiales asociado a *metF*, que codifica para una 5,10-metilenotetrahidrofolato reductasa (MTHFR) que participa en la síntesis de metionina (Cai *et al.*, 1992). *metF* (BA135_5437) también mostró expresión elevada bajo condiciones de estrés (Log₂FC +1,12), si bien no tuvo significación estadística. No obstante, resulta interesante que otros genes relacionados con la síntesis de metionina mostraron expresión elevada bajo condiciones de estrés (véase más adelante).

Por otra parte, el gen BA135_3788 (AA2016_1313) codifica para una proteína de la familia GreA/GreB que interaccionan con la RNA polimerasa; BA135_3788 contiene además un dominio N-terminal Rnk_N. Rnk es un regulador de la actividad nucleósido difosfato kinasa (Shankar *et al.*, 1995). Su posible interacción con RNA polimerasa sugiere el papel regulador de esta proteína. En *R. tropici* se encontró que una mutación en el gen *greA* (factor de elongación de la transcripción GreA) conlleva la pérdida de tolerancia a salinidad (Nogales *et al.*, 2002).

Otros genes con posible papel regulador fueron BA135_4129 (AA2016_1608), que codifica para una proteína pequeña que posee un dominio del receptor (REC) similar a CheY, y BA135_4124 que codifica para una histidina kinasa (HK) (Tabla V.10), que pertenece a una amplia familia de proteínas que son miembros habituales de los denominados sistemas de transducción de señales de dos componentes (S2C) (Karniol y Vierstra, 2004). Cada S2C regula la respuesta celular a cambios o señales ambientales concretos, y está compuesto habitualmente por dos proteínas, una HK sensora cuya función es la de reconocer la señal correspondiente y transducirla mediante procesos de fosforilación-defosforilación a un segundo componente, que suele ser un regulador transcripcional de respuesta (RR) que controla la transcripción (por activación o represión) de determinados grupos de genes o regulones. Las RR poseen un dominio *REC* (susceptible de fosforilación/defosforilación) asociado a un dominio de unión a ADN, aunque a veces ambos dominios pueden estar separados en proteínas diferentes (Hoch, 2000). Cuando una proteína contiene solo un dominio REC se habla de *phosphorelay* que puede modular la actividad del S2C; aunque frecuentemente las proteínas con un único dominio REC interaccionan con proteínas que participan en otros procesos, modulando su actividad. Por ejemplo, en el caso de CheY cuya fosforilación es dependiente de la HK CheA, su función es regular la actividad del flagelo.

Si bien es probable, desconocemos si la actividad de los productos de BA135_4129 y BA135_4124 están relacionadas. No obstante, es de destacar que entre ambos genes se localizan BA135_4126 y BA135_4128, que son homólogos de *phyR* y *ecfG*, respectivamente. Los productos de estos genes, muy conservados en alfafrotebacterias, son reguladores maestros de la respuesta a estrés en bacterias como *Methylobacterium extorquens* o *Bradyrhizobium japonicum*, entre otras (Gourion *et al.*, 2008, 2009). En esta última bacteria, además, son necesarios para el establecimiento de simbiosis efectivas (Gourion *et al.*, 2009). Ambos genes BA135_4126 y BA135_4128 aparecieron también sobreexpresados, aunque con insuficiente calidad estadística (BA135_4126 con $L2FC=0,96$ y BA135_4128 con $L2FC=1,27$) por lo que no aparecen en la tabla V.10. Como se muestra en esta tabla, también encontramos sobreexpresada la región intergénica BA135_4126-BA135_4128 (*phyR-ecfG*). Esta secuencia, que aunque en la anotación actual del genoma de BA135 está propuesta como un ORF independiente, BA135_4127, es probable que no codifique para un producto proteico.

Mientras que la secuencia nucleotídica es 97% idéntica a la región intergénica *phyR-ecfG* de la cepa KCTC2477, el supuesto producto proteico BA135_4127, de apenas 65 aa, no presenta parecido con ninguna otra secuencia proteica disponible en las bases de datos.

Por el contrario, encontramos reducida la expresión de BA135_4688 (Tabla V.11) que codifica para un regulador transcripcional de la familia OmpR. Este gen podría formar parte de un S2C junto al gen adyacente BA135_4687, que codifica para una posible HK que presenta homología con el sensor de osmolaridad EnvZ (Wang *et al.*, 2012).

Otros posibles genes con función reguladora cuya expresión apareció reducida en condiciones de estrés fueron varios codificantes para una posible chaperona (BA135_4638), una posible diguanilato ciclasa (BA135_6340) y para varias proteínas de tipo Usp (BA135_5362, BA135_6590, BA135_6665, BA135_6670) (Tabla V.11). El resultado para estos últimos fue sorprendente, puesto que generalmente las proteínas Usp suelen encontrarse sobreexpresadas en condiciones de estrés (Vollmer y Bark, 2018; Chi *et al.*, 2019). Llamativa y aparentemente contradictoria, también resultó la expresión de BA135_6670 que estuvo disminuida en condiciones de estrés. Como se discutió en la sección anterior, mutaciones en este mismo gen determinaron una reducción de la tolerancia a estrés (mutante LC5410, Tabla V.6). Antes de adelantar posibles explicaciones, será necesario verificar mediante métodos alternativos que la expresión de estos genes de BA135 se encuentre realmente disminuida en condiciones de estrés.

Respuesta a estrés

Además de los genes *usp* mencionados anteriormente, se encontraron diferencialmente expresados varios otros que han sido relacionados con la repuesta a estrés abiótico en otras bacterias. Aparecieron infraexpresados, en condiciones de estrés, múltiples genes codificantes de proteínas reguladoras de la quimiotaxis y la motilidad (*cheA*, *cheR*, *cheB*, *cheY*, etc.; Tabla V.11). La supresión de la motilidad y quimiotaxis suele ser una de las respuestas tempranas de las bacterias frente a situaciones de estrés abiótico (Arora, 2020; Nabti *et al.*, 2010; Dominguez-Ferreras *et al.*, 2006). Entre los genes relacionados con respuesta a estrés se observó la inducción de BA135_3131, que codifica para una pequeña proteína con dominio similar a *CsbD*, (*general stress responsive protein*). *CsbD* ha sido identificada en *Bacillus subtilis* como proteína cuya expresión está aumentada en condiciones de estrés. Su expresión es dependiente del factor sigma alternativo σ^B que controla múltiples genes en respuesta a estrés (Prágai y Harwood, 2002). *CsbD* está estructuralmente relacionado con YjbJ de *E. coli* (IPR036629), una proteína que pertenece al regulón de σ^S y que se induce en condiciones de estrés salino y ácido (Weber *et al.*, 2006; Worden *et al.*, 2009). Aunque

se desconoce la función de YjbJ, se ha puesto de manifiesto que interacciona con el simportador ProP, un transportador osmosensible que participa en la adquisición de osmolitos como prolina y glicina betaina (Romantsov *et al.*, 2018).

Otro posible gen de respuesta a estrés con expresión elevada fue BA135_673 (Tabla V.10), cuyo producto muestra homología con YciF de enterobacterias. YciF es producida en altos niveles bajo condiciones de estrés abiótico y aunque su estructura cristalina ha sido resuelta, su función no es conocida (Hindupur *et al.*, 2006).

El gen BA135_4664 (Tabla V.10) codifica para una probable Homoespermidina sintasa (IPR005097, IPR023181), que participa en la biosíntesis de homoespermidina (homospd) a partir de 2 moléculas de putrescina. Las poliaminas (PAs) están involucradas en una variedad de procesos biológicos y juegan un rol importante frente al estrés abiótico en varios organismos (Bachrach, 2010). Los rizobios generalmente contienen grandes cantidades de homospd a la que se le atribuyen funciones como la amortiguación metabólica para ajustar el pH intra o extracelular frente a estrés ambiental (Fujihara, 2008). En *S. fredii* P220 cultivado en condiciones alcalinas se observó el incremento de los niveles de homospd acompañado de la disminución del pH del medio, sugiriendo el rol neutralizante de homospd sobre los H⁺ incorporados a la célula (Fujihara y Yoneyama 1993). En ensayos simbióticos entre *Medicago sativa* y *S. meliloti* bajo condiciones de salinidad se reportó gran acumulación de homospd en los bacteroides (López-Gómez *et al.*, 2014). Resultados parecidos se observaron en nódulos de garbanzo inoculados con *M. ciceri* en condiciones alcalinas (Singh *et al.*, 2016). La acumulación de homospd parece necesaria para el crecimiento normal de *R. leguminosarum* en medios de cultivo (Shaw *et al.*, 2010).

El gen BA135_2839, cuya expresión apareció disminuida en condiciones de estrés (Tabla V.11), codifica para una proteína con dominio ureidohidrolasa y que podría tener un papel en el metabolismo de las poliaminas. En otros rizobios, este gen codifica para una agmatinasa (*speB*) que participaría en la síntesis de putrescina a partir de agmatina (Becerra-Rivera y Dunn, 2019).

Metabolismo carbonado y energético

Se encontraron sobreexpresados varios genes del operón del metabolismo del glucógeno: *glgA* (BA135_1101), *glgB* (BA135_1106), *glgX* (BA135_1098) y *glgP* (BA135_1107) (Tabla V.10). En algunas bacterias se utiliza el almacenamiento del carbono en forma de glucógeno, como reserva para restaurar el crecimiento celular después del estrés (Han et al 2005). En rizobios, esto está avalado por la fuerte inducción de los genes *glgA2*, *glgB2*, y *glgX*, de *S. meliloti* involucrados en el metabolismo del glucógeno durante estrés osmótico (Domínguez- Ferreras *et al.*, 2006). En *M. ciceri*

la inducción de genes *glg* fue observada bajo condiciones de estrés por sequía inducida por PEG (Yadav *et al.*, 2020), mientras que en *Azospirillum brasilense* se reveló la importancia de la acumulación de glucógeno en respuesta a diferentes estreses (Lerner *et al.*, 2009).

Otros compuestos de reserva de carbono y energía sintetizados durante situaciones de estrés son los poli-hidroxialcanoatos (PHAs). La mayoría de rizobios pueden sintetizar PHB (poli-hidroxibutirato) y almacenarlos en el citoplasma en forma de gránulos. Los gránulos de PHAs suelen estar cubiertos por una capa superficial proteica conformada por varios tipos de proteínas denominadas GAPs (*Granule Associated Proteins*). Entre estas proteínas están las encargadas del metabolismo de los gránulos (polimerasas, depolimerasas, etc), y las Fasinas (*PHAsins*), un grupo heterogéneo de pequeñas proteínas con importantes roles en el metabolismo del PHA y la estructura de los gránulos (Maestro y Sanz, 2017; Mezzina y Pettinari 2016). La expresión de un gen codificante para una posible fasina se vio reprimida en condiciones de estrés (BA135_1431; Tabla V.11), lo que podría sugerir cambios en la síntesis o catabolismo de PHB.

Se encontró sobreexpresado el gen BA135_4460 (AA2016_1874 en la cepa tipo) que codifica para una posible xilosa isomerasa (InterPro IPR001998), enzima que cataliza la conversión de xilosa en xilulosa, compuesto que puede ser metabolizado a través de la ruta de las pentosas fosfato y la glucólisis. Las enzimas bacterianas son diferentes a las de eucariotas, y pueden también isomerizar las ribosa en ribulosa y la glucosa en fructosa (Dauter *et al.*, 1989).

El gen BA135_4594 (regulador transcripcional) mencionado anteriormente, está transcripcionalmente vinculado con BA135_4598 cuya expresión también apareció incrementada en condiciones de estrés (Tabla V.10). Entre ambos genes se localiza BA135_4595 que codifica para una probable anhidro-fructosa reductasa (EC:1.1.1.292), que en *Sinorhizobium morelense* participa en la reducción de anhidro-fructosa y otras keto-aldosas (llamadas osonas) para la formación de anhidro-manitol y mano- y gluco-aldosas, respectivamente (Kühn *et al.*, 2006). Es posible que BA135_4594 responda a alguno de estos azúcares y que estos genes estén implicados en la producción o transformación de algún azúcar que tiene un papel importante en la respuesta a estrés salino-alcalino.

El gen BA135_663 (Tabla V.10) codifica para un probable componente IIB de un sistema lanzadera fosfotransferasa (PTS) de azúcares, implicado en la fosforilación y transporte de algún azúcar que con la información disponible no es posible sugerir. Los sistemas PTS también tienen funciones reguladoras de diversas funciones celulares (Galiniery y Deutscher, 2017).

También aumentó su expresión el gen BA135_174 (AA2016_1634) que codifica para una posible inositol monofosfatasa. Este gen forma parte de un operón que codifica para varias proteínas con dominios fosfatasa y metalofosfatasa, y que se localiza adyacente a otro operón que codifica para un

transportador ABC. En bacterias, el inositol puede sintetizarse intracelularmente o puede ser adquirido desde el medio externo cuando está disponible. La síntesis de inositol se da a partir de glucosa-6-fosfato por intermedio de las enzimas L-mio-inositol 1-fosfato sintasa (MIPS) y mio-inositol monofosfatasa (IMP) (Torabinejad y Gillapsy, 2006). El inositol posee propiedades como osmoprotector, aunque no es un osmolito común en bacterias (Burg y Ferraris, 2008). Archeas y algunas actinobacterias contienen fosfatidilinositol en sus membranas celulares, los cuales son esenciales en su fisiología y ecología. No obstante, este fosfolípido no es habitual en la mayoría de eubacterias, que suelen utilizar el inositol solo como fuente de C y energía (Roberts, 2006).

La proteína BA135_174 muestra casi un 50% de similitud de secuencia (cerca de 35% identidad) con las proteínas SuhB de *E. coli* y *S. meliloti* (SMc03993). SuhB de *E. coli* se ha relacionado con la tolerancia a estrés por temperatura y está demostrado que presenta actividad inositol-1 monofosfatasa y glicerofosfatasa. Aunque inicialmente se sugirió que SuhB podría tener un papel en la síntesis de ciertos fosfolípidos de membrana (p.e., fosfatidilinositol; Matsuhisa *et al.*, 1995), posteriormente se ha reportado que es un componente del complejo Nus, implicado en el adecuado plegamiento del RNA ribosomal y otras funciones relacionadas con el control postranscripcional de la expresión génica (Chen y Roberts 2000; Huang *et al.* 2020). El genoma de BA135 y los de muchos otros rizobios codifican para múltiples proteínas con teórica actividad inositol fosfatasa, cuyas funciones no han sido dilucidadas. En *R. leguminosarum* bv. *trifolii* el gen *pssB* codifica para una inositol fosfatasa y su deficiencia conlleva la sobreproducción de EPS en vida libre y la pérdida de capacidad de fijación de nitrógeno en simbiosis (Janczarek y Skorupska, 2001). Además, el catabolismo de inositol parece ser importante para la utilización de ciertas rizopinas por los rizobios. Las rizopinas son compuestos derivados del inositol, que son sintetizadas por los bacteroides de los nódulos y catabolizadas por sus hermanas que quedan fuera de los mismos. Por tanto, la capacidad para catabolizar las rizopinas es importante para la supervivencia y la competencia de las cepas de rizobios en la rizosfera de sus plantas hospedadoras (Bahar *et al.*, 1998). También se ha reportado la importancia del catabolismo del inositol para la competitividad de *S. meliloti* en la rizosfera de alfalfa (Kohler *et al.*, 2010).

Por otro lado, se redujo la expresión del gen de la fosfoenolpiruvato carboxikinasa (BA135_3231) (PckA, Tabla V.11) bajo condiciones de estrés. PckA es una enzima clave que vincula el ciclo de Krebs y la gluconeogénesis, lo que sugiere una reducción del metabolismo energético, algo que ya se ha observado en bacterias como *S. meliloti* bajo condiciones similares (Domínguez-Ferreras *et al.*, 2006). También se encontró reducida la expresión de *fixG* (BA135_3283), que forma parte del operón *fixGHIS*. Estos genes son necesarios para la fijación de nitrógeno por rizobios, aunque también están presentes en bacterias no fijadoras como *Rhodobacter* y podrían formar un sistema de captación de cobre necesario para el funcionamiento de la oxidasa terminal *cbb3* (Preisig *et al.* 1996). También

se encontró reducida la expresión de *hemN* (BA135_3292), necesario para la síntesis de hemo, un proceso que en bacterias como *Vibrio vulnificus* es particularmente importante bajo condiciones de estrés que limitan la disponibilidad de S-adenosilmetionina (SAM) (Kim *et al.*, 2015).

Metabolismo de aminoácidos y betaínas

Dos genes que codifican para proteínas del metabolismo de la metionina se observaron sobreexpresados. Se trata de la metionina sintasa (BA135_2604; MS, 5-metiltetrahidrofolato homocisteína S-metiltransferasa) necesaria para la síntesis *de novo* de metionina, y de una posible metionina aminopeptidasa (BA135_2237; MAP) encargada de liberar la metionina situada en posición N-terminal de la mayoría de proteínas celulares. Ambas, MS y MAP, requieren Co para su actividad, si bien la MS utiliza cobalamina como cofactor (Kobayashi y Shimizu, 1999). MAP es una proteína esencial en *E. coli*, muy importante para la síntesis de proteínas dada la propiedad de la metionina como aa señal de inicio de la traducción. MAP también podría ser necesaria para el reciclaje de metionina y asegurar la disponibilidad de este a.a, evitando en lo posible su costosa síntesis *de novo* (Danchin *et al.*, 2020). Por otro lado, la eliminación de la metionina N-terminal de la mayoría de proteínas ha sido descrita como un mecanismo que contribuye a una mayor estabilidad de las mismas (Meinzel *et al.*, 1993), aspecto que puede cobrar mayor relevancia en condiciones de estrés. Una especial necesidad de metionina en condiciones de estrés podría explicar la elevación de la MS. La mayor síntesis de metionina podría ser necesaria para evitar la acumulación del sustrato de la MS, homocisteína, compuesto que en *E. coli* resulta tóxico (Roe *et al.*, 2002). La metionina es un aa esencial por su rol en la síntesis de proteínas (Ferla y Patrick, 2014), pero también porque es necesaria para la síntesis de S-adenosilmetionina (SAM), principal donador de grupos metilo y adenosilo, esenciales en multitud de procesos de la célula como la síntesis de algunos cofactores o la actividad de los ribosomas (Danchin *et al.*, 2020). Relacionado con esto, también se encontró elevada la expresión del gen BA135_3224 (AA2016_0763) que codifica para una S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa, enzima clave en el reciclaje de SAM que cataliza la hidrólisis reversible de S-adenosilhomocisteína a homocisteína y adenosina. Esta enzima se ha encontrado necesaria para la producción de ciertos metabolitos y el normal crecimiento de algunas bacterias como *Mycobacterium tuberculosis* y *Agrobacterium radiobacter* (Singhal *et al.*, 2013; Penyalver *et al.*, 2009). Así pues, 2 de las 4 enzimas que participan en el ciclo de la metionina parecen sobreexpresadas en la cepa BA135 en condiciones de estrés salino-alkalino.

No obstante, se encontró reducida la expresión del gen BA135_5715 (Tabla V.11) que codifica para una 5,10-metilenotetrahidrofolato reductasa (MTHFR; MetF), una flavoproteína que

cataliza la reducción de metilentetrahidrofolato (5,10-CH₂THF) a 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF), este último es utilizado para la metilación de la homocisteína por la MS. Esto es aparentemente contradictorio con el resultado discutido anteriormente, de que la MS es inducida en condiciones de estrés. No obstante, la cepa BA135 podría poseer otra MTHFR codificada por el gen BA135_5437, que junto con BA135_5436 (Tabla V.10) apareció inducido en condiciones de estrés. Ambos genes forman un probable operón que se encuentra conservado en multitud de genomas de Rhizobiales. Una mayor expresión de este segundo gen *metF* podría compensar la disminución del primero, garantizando de esta forma suficiente 5-MTHF para la actividad MS. También se encontró reducida la expresión de BA135_4934 (AA2016_5260), que codifica para una Formato-tetrahidrofolato ligasa (IPR000559) o formiltetrahidrofolato sintetasa (FTHFS). Al igual que para la MTHFR, BA135 podría tener una segunda isoforma de esta enzima, prácticamente idéntica (99%) en secuencia, codificada por el gen BA135_2118 (AA2016_2364 en la cepa de referencia).

En algunos organismos como *S. meliloti*, la metionina puede también ser sintetizada por una actividad alternativa, betaina-homocisteína metiltransferasa (BHMT; SMC04325; MetE), que a diferencia de MetH utiliza glicina betaina como donador de grupos metilo, en lugar de metiltetrahidrofolato. Dada esta interconexión entre la síntesis de metionina y el catabolismo de la glicina betaina (Barra *et al.*, 2006), una mayor actividad de la MS podría también implicar, indirectamente, una mayor disponibilidad de glicina betaina para funciones protectoras frente al estrés. En apoyo de esta hipótesis, se encontró reducida la expresión del gen BA135_3870 (Tabla V.11) que codifica para una proteína con homología a SMC04325 y probable actividad BHMT (metionina sintasa, MetE). Los resultados sugieren que la síntesis de metionina en BA135 es muy importante en condiciones de estrés, aunque para ello emplea preferentemente unas vías metabólicas que no interfieren con otros mecanismos de tolerancia, por ejemplo, con la acumulación de compuestos osmoprotectores.

La acumulación de compuestos osmoprotectores (también conocidos como solutos compatibles) en el citosol tiene la finalidad de proteger las funciones celulares fundamentales mediante la estabilización de macromoléculas y de membranas biológicas bajo condiciones osmóticas perjudiciales. De este modo, la habilidad de las bacterias para acumular o sintetizar estos solutos compatibles resulta fundamental para su supervivencia y competencia en entornos donde la osmolaridad externa no es constante (Wargo, 2013). Entre los osmoprotectores usados para contrarrestar las condiciones estresantes, la glicina betaína (GB), destaca entre los de mayor importancia, por su uso generalizado en varios grupos de bacterias, entre los que se encuentran varios géneros de la familia *Rhizobiaceae* (Boncompagni *et al.*, 1999).

Varias actividades enzimáticas de la ruta catabólica de la glicina betaina (también de la prolina betaina), se han encontrado reprimidas en células en vida libre y en bacteroides de *S. meliloti* y otros

rizobios expuestos a estrés salino y osmótico (Smith *et al.*, 1988; Gloux y Le Rudulier, 1989; Fougere y Le Rudulier 1990; Boncompagni *et al.*, 1999). La glicina betaina y otros compuestos similares pueden ser catabolizados y utilizados como fuentes de C y N, aunque parece que en condiciones de estrés se ve favorecida su salvaguarda y uso como osmoprotector frente a su degradación. Esto también podría ocurrir en la cepa BA135 bajo condiciones de estrés. Varios genes relacionados con el catabolismo de glicina betaina se encontraron reprimidos (Tabla V.11). La pareja BA135_2601-BA135_2602 es ortóloga de *gbcA-gbcB* (PA5410-PA5411), que en *Pseudomonas aeruginosa* constituyen una enzima necesaria para la conversión de glicina betaina (trimetilglicina) en dimetilglicina (Wargo *et al.*, 2008). Ambos genes se encuentran muy conservados en Rhizobiales, Pseudomonadales y muchas otras bacterias. Otro gen con expresión disminuida que podría estar implicado en la degradación de glicina betaina es BA135_5725 (AA2016_3021 en la cepa de referencia), que contiene un dominio trimetilamina metiltransferasa (IPR010426) que en otras bacterias ha sido relacionado con el metabolismo de la glicina betaina (Tikat *et al.*, 2014). Otros genes reprimidos, también involucrados en la ruta catabólica de la glicina betaina, fueron BA135_4555 (AA2016_1952) y BA135_4557 (AA2016_1954) que probablemente codifican para SoxB y SoxD, subunidad beta y delta, respectivamente, de la sarcosina oxidasa implicada en la conversión de sarcosina (metilglicina) en glicina (Wargo *et al.* 2008). También estuvo reducida la expresión de BA135_5691 (AA2016_2994) que codifica para una proteína con dominios GCV_T (aminometiltransferasa, IPR006222) y GCV_T_C (IPR013977), que podría formar parte del complejo multienzimático GCV (*Glycine Cleavage*) encargado de la oxidación de la glicina en bacterias y mitocondrias (Okamura-Ikeda *et al.*, 1993).

Aunque se encontró reprimido el catabolismo de la glicina betaina, no se encontraron inducidos genes relacionados con su síntesis. Como muchos otros rizobios, BA135 posee un posible operón *betICBA* (genes BA135_1081/BA135_1086) para la síntesis de glicina betaina. Y como se ha visto en rizobios (Smith *et al.*, 1988; Boncompagni *et al.*, 1999), es probable que las propias células activen la biosíntesis de este compuesto en respuesta al estrés. Tampoco se descarta la presencia de glicina betaina en el medio de cultivo (que contiene triptona y extracto de levadura), la cual podría ser importada y acumulada en el interior celular. Los rizobios pueden poseer varios tipos de transportadores para la adquisición de betainas, cuya expresión puede o no estar regulada en respuesta a situaciones de estrés (Boscari *et al.*, 2002) Por otro lado, también se encontró reducida la expresión de BA135_5941, que codifica para serina amonio liasa (serina deshidratasa), que convierte serina en piruvato y amonio. Esta actividad también se ha visto inhibida en células de *S. meliloti* en condiciones de estrés osmótico (Smith *et al.*, 1988). Por último, se observó reprimida la expresión del gen BA135_2325 que codifica para una posible fenilalanina hidroxilasa, implicada en la síntesis de

tirosina, aa relacionado con la producción de pigmentos como la melanina. Aunque las colonias de la cepa BA135 muestran una ligera pigmentación en medio TY, esta característica no se vio significativamente alterada en condiciones de estrés.

Transporte

Varios genes que codifican proteínas componentes de transportadores de tipo ABC (BA135_4118/ BA135_4119; BA135_175/ BA135_178; Tabla V.10) se encontraron sobreexpresados y otros más estuvieron infraexpresados (Tabla V.11). Estos constituyen una de las clases más extensas de transportadores estudiados, los cuáles utilizan el ATP para impulsar la translocación de distintos sustratos a través de las membranas celulares. Los transportadores ABC funcionan tanto como importadores de nutrientes y otras moléculas, así como exportadores de toxinas, fármacos y lípidos (Rees *et al.*, 2009). Además, están involucrados en muchos procesos celulares importantes y en su regulación (Dassa y Bougie, 2001), por lo que son cruciales en situaciones nutricionalmente limitantes o en entornos considerados tóxicos. Si bien no es posible determinar con precisión el sustrato asociado a partir las secuencias mencionadas, el contexto genómico acompañante podría permitir hipotetizar el potencial sustrato.

Seis de los siete genes del operón que codifica para un antiportador multicomponente Cation:Protón Na^+/H^+ se encontraron fuertemente inducidos. De este operón, la subunidad A (BA135_1058) y la subunidad D (BA135_1055) han sido señaladas por Morino y col. (2017) como las más importantes y responsables directas de la función transportadora de iones en *Bacillus pseudofirmus* OF4. Esto se explica porque la tolerancia a condiciones salino-alcálinas depende fuertemente de los mecanismos de las bacterias para garantizar la homeostasis con el fin de asegurar el funcionamiento óptimo y la integridad estructural de las proteínas del citoplasma que permitan el crecimiento y viabilidad de la célula. Análisis ómicos, genéticos y fisiológicos revelan que a nivel de envoltura celular se producen una serie de cambios adaptivos que incluyen el elevado uso de transportadores, enzimas y demás ajustes metabólicos que contribuyan a la captura y retención de protones en el citoplasma (Padan *et al.*, 2005). De este modo, la sobreexpresión de este conjunto de genes junto con lo descrito en la sección anterior para los mutantes LC7432, LC6244, LC2702 y LC5310, confirman el uso de las bombas de protones como uno de los mecanismos principales de BA135 para el mantenimiento del equilibrio iónico celular.

Por otro lado, el gen BA135_4458 codifica para una posible proteína de 119 aa que posee un dominio similar a *SnoaLe* (IPR037401). *SnoaL* es una poliketido ciclasa implicada en la síntesis de algunos antibióticos del grupo de las antraciclinas (Sultana *et al.*, 2004). No obstante, *SnoaL* se

relaciona estructuralmente con la superfamilia con dominio similar a *NTF2*(IPR032710), que incluye varias familias de proteínas implicadas en transporte, por lo que no es descartable un posible papel de BA135_4458 en el transporte de algún metabolito. Curiosamente, BA135_4458 se localiza adyacente a BA135_4460 que, como se expuso anteriormente, codifica para una xilosa isomerasa que también resultó sobreexpresada en condiciones de estrés.

A la superfamilia con un dominio similar a *NTF2* también pertenecen las proteínas con dominio similar a TIM44 (IPR007379), como es el caso de la proteína codificada por BA135_4829 que también resultó inducido bajo estrés y que podría también tener un papel en el transporte de alguna molécula importante en estas condiciones.

Reciclaje / Detoxificación

La producción de ROS es una consecuencia inevitable del metabolismo regular de la célula. Al ser agentes altamente dañinos para los componentes celulares incluido lípidos, ADN y proteínas (Wolff, 1986), los mecanismos de eliminación son cruciales para evitar daños críticos y mantener la viabilidad celular (Green, 2004). No obstante, como se mencionó anteriormente, el crecimiento en medios adversos estimula la sobreproducción de ROS hasta niveles tóxicos (Imlay, 2003) sumando además estrés oxidativo. La evidencia de la respuesta a estrés oxidativo en BA135 fue dada por la fuerte inducción de una enzima de la familia de las Oxidoreductasa GMC (BA135_6034) y por la enzima de detoxificación Glioxalasa I (BA135_6031). Las oxidoreductasas de la familia GMC, catalizan una amplia variedad de procesos redox por transferencia de electrones de un reductor a un oxidante y cumplen un rol fundamental en la protección a estrés oxidativo (Bisogno *et al.*, 2010). En *R. leguminosarum*, mutantes GMC fueron deficientes en la tolerancia a H₂O₂ sobre los 5 mM y deficientes en la actividad de la enzima glutatión peroxidasa, involucrada en la protección contra ROS. Además, en el mismo estudio se reportó la reducción del 30% en la actividad fijadora de nitrógeno de los nódulos (Zou *et al.*, 2020). Por otro lado, la glioxalasa I participa en la detoxificación de metilglioxal, producto altamente dañino para la célula. En algunas bacterias, el metilglioxal se produce como un subproducto de la glucólisis a través de la metilglioxal sintasa cuando hay un desequilibrio en la adquisición de carbono vinculado a la limitación de fósforo (Booth *et al.*, 2003). Por otro lado, se encontró sobreexpresado el gen BA135_5503 que codifica para una probable proteína con un dominio diene lactona hidrolasa (IPR002925), la cual está muy conservada en Rhizobiales. Estas enzimas, que participan en la detoxificación de compuestos cloroaromáticos (Camara *et al.*, 2008), pertenecen a la superfamilia alfa/beta hidrolasas (IPR029058; c121494) que incluye diversas enzimas peptidasas, lipasas, peroxidasas, dehalogenasas, etc., que poseen un centro

catalítico similar, con una “triada catalítica” que incluye tres residuos conservados, serina, glutamato/aspartato y histidina (Hotelier *et al.*, 2004). Con la información disponible no es posible asignar una función concreta a este gen.

También apareció inducido el gen BA135_926 que codifica para una posible amidohidrolasa (superfamilia cl00281, hidrolasas dependientes de metales; dominios IPR013108, IPR006680), una superfamilia de proteínas que incluye multitud de enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces amida o amina en diversos sustratos orgánicos como urea, citosina, adenosina, adenina, dihidroorotato, etc. La secuencia de la proteína BA135_926 parece muy conservada (>95%) en otras cepas de *Aminobacter* pero no tanto en otros géneros cercanos como *Mesorhizobium* y otros Rhizobiales, lo cual sugiere que esta proteína pueda tener un papel específico en los primeros.

Envoltura celular

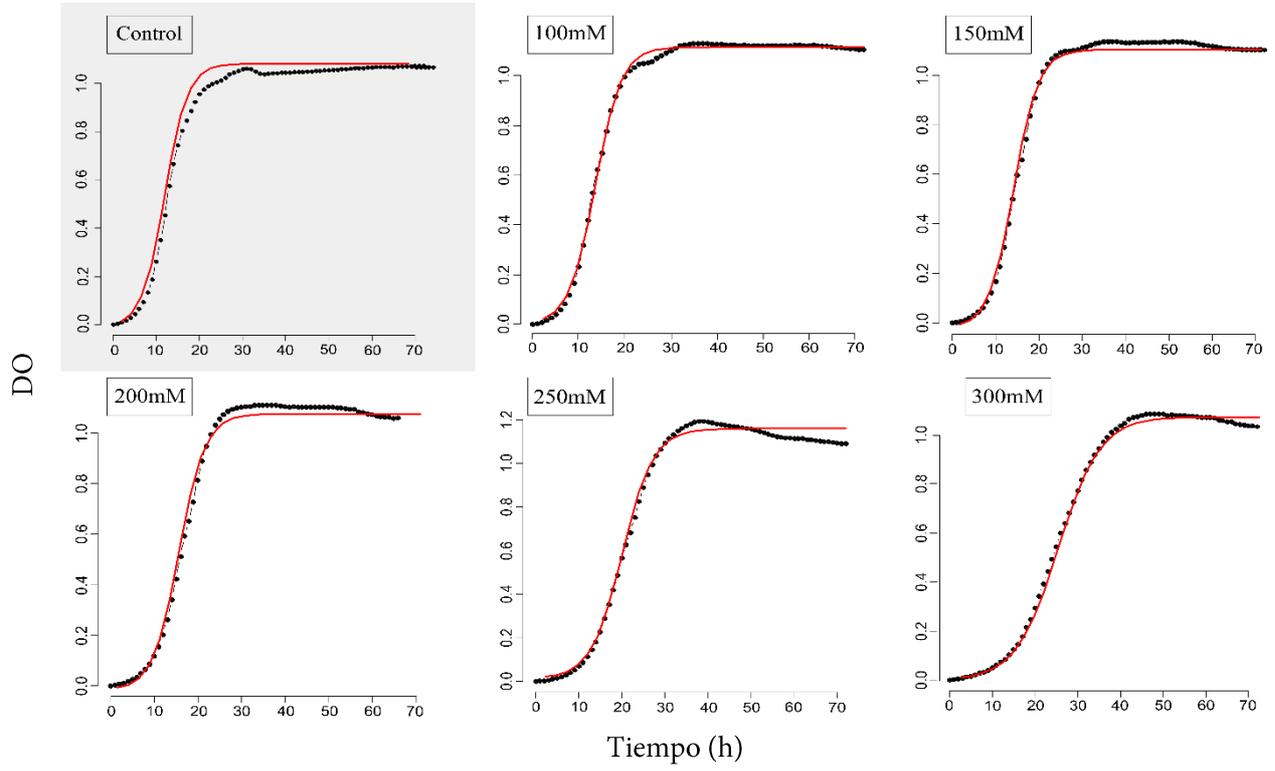
BA135_3534 (AA2016_3534) codifica para una proteína muy conservada en Rhizobiales con un claro dominio YkuD (*L,D transpeptidase*, IPR005490). Este tipo de proteínas como YkuD poseen actividad peptidoglucano transpeptidasa y participan en la formación y reticulado del peptidoglucano de la pared celular (Bielnicki *et al.*, 2006) El incremento de expresión del gen BA135_602 (Tabla V.10) que codifica para una posible N-acetilneuraminato epimerasa podría también estar relacionado con la formación o mantenimiento del peptidoglucano. Estos datos junto con los de los mutantes descritos anteriormente, sugieren que el metabolismo del peptidoglucano es muy importante para la tolerancia de BA135 a las condiciones de estrés.

Los productos de otros dos genes podrían codificar para proteínas localizadas en la envoltura celular. Se trata de BA135_571 (AA2016_4352 en el genoma de referencia) que codifica para una proteína con un motivo de autotransportador presente en sistemas de secreción de tipo 5 (T5SS), que podría ser un tipo de adhesina (Tabla V.10); y de BA135_5735 (AA2016_3029 en genoma de referencia), que codifica para una proteína parecida a YfbK de *E. coli*, una proteína de tipo amiloidogénica que podría ser exportada al exterior de la célula (Antonets *et al.*, 2016).

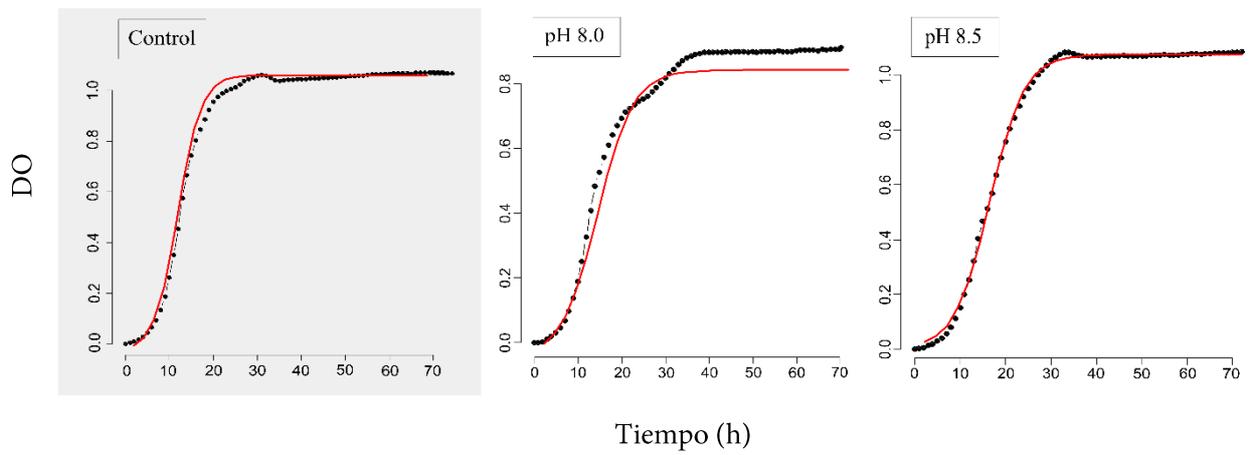
V.5. Anexos

Anexo V.5.1

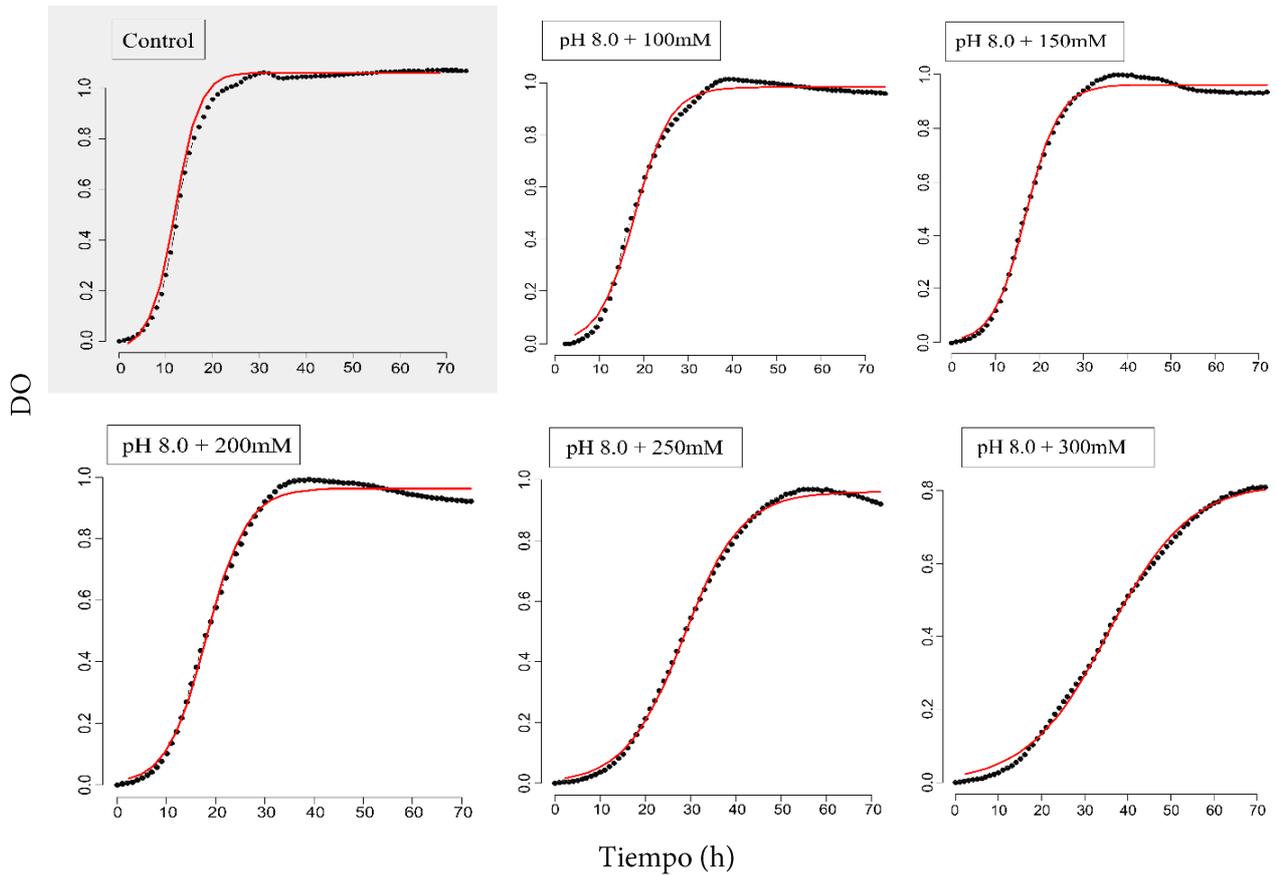
Salinidad



Alcalinidad

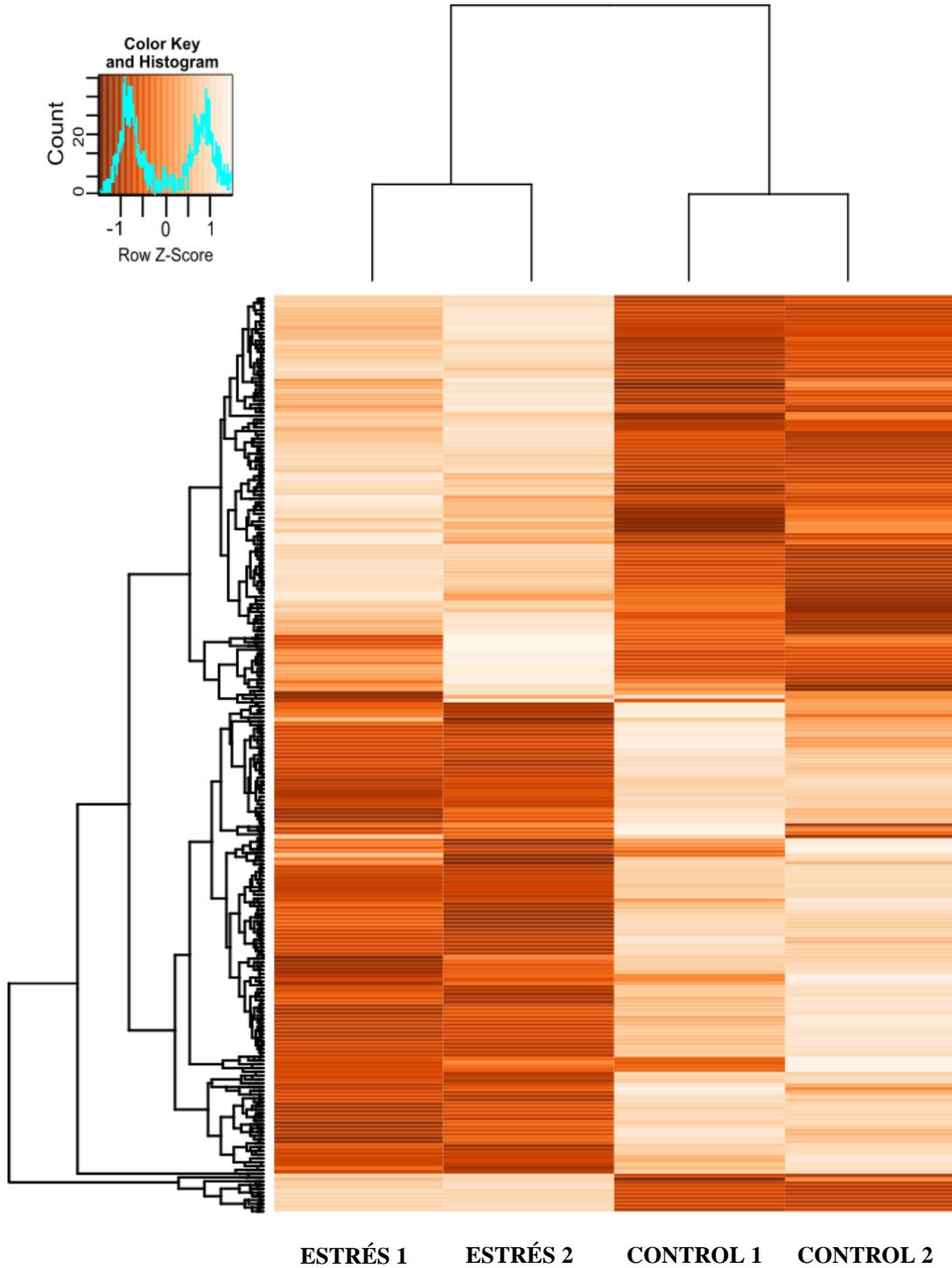


Salinidad – Alcalinidad



Curvas de crecimiento de la cepa *Aminobacter* sp.BA135 en condiciones de estrés salino y/o alcalino. Las bacterias se cultivaron en medio TY (control) y TY con pH ajustado a 8.0 y 8.5, y/o adicionado de distintas concentraciones de NaCl (100-300 mM NaCl). Los cultivos se mantuvieron en agitación constante a 28°C durante 72 horas. Las curvas de crecimiento fueron construidas mediante el modelamiento de la ecuación del crecimiento logístico bacteriano usando el paquete *Growthcurver* en el entorno estadístico R. Así mismo, se muestra el ajuste (línea roja) estimado para cada set de datos analizado.

Anexo V.5.2.



Mapa de calor del análisis transcriptómico del RNA-seq para los 664 genes expresados diferencialmente de la cepa BA135 en condiciones salino-alcálinas. La diferencia de color representa el valor de la expresión de los genes ($\log_2\text{FoldChange}$) en donde los tonos más atenuados representan valores de sobreexpresados y lo más oscuros los infraexpresados.

Discusión general

Como parte del diseño de una estrategia para mejorar la implantación de *L. tenuis* y aprovechar los suelos alcalino-sódicos, se analizaron dos comunidades de bacterias: Bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) y bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN) tolerantes a condiciones salino-alcálicas. Con ese objeto se aislaron 310 bacterias de la rizosfera de *L. tenuis*, con habilidad para solubilizar fósforo. En el ensayo de solubilización en condiciones alcalino-salinas, observamos que una cantidad mayoritaria del total de aislamientos obtenidos (96.13%), fue capaz de crecer y adecuarse a las distintas condiciones restrictivas del medio selectivo, probablemente como reflejo de la buena adaptación de las comunidades microbianas asociadas a la rizosfera de *L. tenuis* en esos ambientes. En ese sentido, dicha adaptación resultó ventajosa para llevar a cabo el objetivo específico 1.1, ya que nos permitió contar con grupo numeroso de aislamientos con amplia plasticidad para solubilizar fosfato en condiciones alcalino-salinas (BSFRA). Entre los aislamientos del grupo BSFRA, se identificaron miembros de la familia *Pseudomonadaceae* y del orden *Enterobacteriales* (este último, el más dominante). Basándonos en el análisis de las secuencias del ARNr 16S, pudimos identificar su relación taxonómica con al menos 7 géneros bacterianos: *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Yokenella*, *Kosakonia* y *Erwinia*, de los cuales el género *Pantoea* fue uno de los más abundante con 9 cepas genéticamente diferentes. Análisis previos realizados por nuestro grupo, en la búsqueda y caracterización de bacterias solubilizadoras de fosfato asociadas a *L. tenuis* en distintas zonas de la Pampa Deprimida del Salado, revelaron un patrón de aislamientos taxonómicamente similares a los nuestros, ya que se reportaron cepas de ambas familias con predominancia de la enterobacterias (*Pseudomonas*, *Pantoea*, *Erwinia* y *Enterobacter*) (Castagno *et al.*, 2011). Esto nos inclina a hipotetizar una potencial asociación específica entre *L. tenuis* y ciertos grupos de enterobacterias. En ese mismo estudio se destacó como cepa promisoría para *L. tenuis* a *P. eucalypti* M91, por su capacidad de solubilizar fosfato, lo cual fue posteriormente confirmado en ensayos de promoción en suelos Natraquoll (pH 6.7) (Castagno *et al.*, 2014). Estos antecedentes, sumados al criterio de “uso de microorganismos seguros”, permitieron seleccionar a las cepas *P. eucalypti* MA66, P76, P63, P163 y P173 para estudios comparativos tanto *in vitro* como en planta. Los ensayos cuantitativos de solubilización de fósforo *in vitro* confirmaron dicha capacidad para las cepas seleccionadas, tanto en condiciones neutras como en condiciones alcalino-sódicas, la cual se incrementó significativamente en función del tiempo de incubación.

Para obtener un panorama más amplio de otras potenciales propiedades PGPR de estas cepas, se realizaron ensayos de caracterización complementarios en donde se observó la capacidad de producción de sideróforos bajo condiciones alcalino-sódicas, así como la producción de AIA.

Los ensayos de promoción de crecimiento de *L. tenuis* en suelos alcalino-sódicos, revelaron efectos diferenciales en algunos tratamientos. Las diferencias significativas en los parámetros de

crecimiento en las comparaciones entre tratamientos, pero no respecto al control (a pesar de la similitud genética y de similares aptitudes detectadas en cultivo *in vitro*), demostraron la variabilidad de los efectos en planta que existen a nivel intra-especie y mucho más aún la importancia de la interacción entre el microorganismo y el huésped al momento de evaluar estrategias de selección de cepas como potenciales inoculantes. En particular estos comportamientos diferenciales significativos se evidenciaron en la variable biomasa de nódulos. Las causas asociadas a estos resultados, se podrían encontrar a niveles hormonales o de regulación, por lo que resultaría interesante investigar los efectos a esos niveles.

La inoculación de estas cepas ocasionó efectos significativos en el estado nutricional de *L. tenuis*. Si bien las concentraciones de nitrógeno y fósforo no cambiaron significativamente, en la variable de acumulación se observó un incremento significativo en el tratamiento R+M91, lo cual nutricionalmente significa una ventaja para fines biotecnológicos en la producción de pasturas de calidad. Por otro lado, se observó la disminución significativa en la concentración Mg para todos los tratamientos inoculados, sugiriendo un rol potencial de estas cepas en la modulación de los niveles de magnesio en la planta. En contraste, la concentración de Zn incrementó significativamente en todas las co-inoculaciones, posiblemente por el incremento de la bio-disponibilidad de este en el medio. El contraste de las respuestas observadas en *L. tenuis* en los tratamientos de co-inoculación con las cepas *P. eucalypti* M91 y P76, evidenciaron la complejidad y especificidad de las interacciones planta – microorganismos, además de la necesidad de realizar estudios más profundos para entender la causa de los fenotipos observados. Otro aspecto importante a resaltar, fue la importancia de realizar evaluaciones en sistemas de interacción tripartita rizobio-BSF-leguminosa, ya que son fundamentales para la correcta selección de microorganismos promotores de crecimiento en leguminosas.

En simultaneo el análisis de la comunidad de las bacterias solubilizadoras de fosfato asociados a *L. tenuis* mostraron una amplia diversidad genética entre los simbiontes, que forman nódulos en *L. tenuis* bajo las condiciones restrictivas naturales que imponen los suelos alcalino-sódicos. Por otra parte, la identificación taxonómica de los aislamientos por la técnica de MALDI-TOF y/o análisis de la secuencia del ARNr 16S reveló que dicha diversidad está mayoritariamente acotada a miembros del género *Mesorhizobium*, lo cual guarda relación con los estudios previos realizados en *L. tenuis*, en este y otros tipos de suelos obtenidos ya sea mediante aislamiento directo de nódulo o el sistema de “planta trampa” (Estrella *et al.*, 2009). Además del género *Mesorhizobium*, entre los rizobios aislados se identificaron simbiontes de otros miembros de la familia *Phyllobacteriaceae*, como las cepas A65, A66, A67, A68 y A69 del género *Aminobacter*, así como las cepas A4 y A7 del género *Phyllobacterium*. Estos resultados, si bien constituyen una primera aproximación acerca de la diversidad taxonómica de los rizobios simbiontes de *L. tenuis* en los ambientes naturales más

restrictivos de la región de la Pampa Deprimida del Salado, sugieren que la función para la simbiosis mutualista con esta leguminosa está distribuida en al menos tres taxones de la familia *Phyllobacteriaceae*. En ese sentido sería interesante extender los estudios y profundizar en el conocimiento acerca de la diversidad de especies que componen a la población de rizobios en estos ambientes con el análisis de marcadores filogenéticos complementarios al ARNr 16S que permitan resolver la identidad hasta el nivel de especie. En adición, resultó llamativo el hallazgo de rizobios infectivos de los géneros *Aminobacter* y *Phyllobacterium*, teniendo en cuenta que la interacción simbiótica mutualista es un proceso complejo que requiere de la expresión de un conjunto de genes en coordinación con el huésped específico, que están usualmente acotados a un grupo reducido de bacterias (Oldroyd *et al.*, 2011, Wang *et al.*, 2012). Estos resultados sugieren que estas cepas no solo los poseen, sino que expresan adecuadamente las funciones simbióticas necesarias para interactuar con *L. tenuis*, de manera similar a los simbioses del género *Mesorhizobium*. Dichas funciones posiblemente hayan sido adquiridas por eventos de transferencia horizontal génica (THG), que podrían ser identificados mediante la caracterización de los genes simbióticos lo cual, integrado al análisis de diversidad filogenética, permitiría conocer con mayor detalle las características genéticas y funcionales de la población de rizobios que colonizan estos ambientes restrictivos.

El análisis *in vitro* reveló que, desde una perspectiva general, la población de rizobios es mayoritariamente sensible a salinidad y alcalinidad, lo cual resultaría razonable teniendo en cuenta que la población de rizobios está dominada por miembros del género *Mesorhizobium*, de crecimiento intermedio. Estudios realizados en las cepas tipo de este género han demostrado que mayoritariamente son poco tolerantes a alcalinidad y salinidad (Laranjo *et al.*, 2011). Observaciones similares se han descrito para la población de *Mesorhizobium* asociada a *Lotus lancerottensis* en suelos alcalinos en Lanzarote (Islas Canarias), que evidenciaron mayor sensibilidad a condiciones alcalinas (pH 9) (Leon-Barrios *et al.*, 2017). En ese sentido, resulta esperable encontrar mayor cantidad de aislamientos sensibles del género *Mesorhizobium*.

Por otro lado, el análisis de tolerancia en el suelo indicó que, si bien el comportamiento es similar a lo observado en las condiciones *in vitro*, las condiciones de suelo para el crecimiento de los aislamientos no resultaron tan restrictivas como las de las condiciones *in vitro* con los medios de cultivo modificados. Una explicación a estos resultados podría fundamentarse en que los sistemas *in vitro* no permiten el despliegue de estrategias comunitarias de adaptación. Por ejemplo, los rizobios como muchas otras bacterias del suelo, persisten con mayor probabilidad en la naturaleza formando parte de comunidades bacterianas sésiles conocidas como biopelículas, que le permiten sobrevivir a las condiciones hostiles del ambiente (Rinaudi y Giordano, 2010). No obstante, es necesario resaltar que las probabilidades de supervivencia de un rizobio tolerante en la transición desde su etapa

plantónica a la comunitaria (biopelículas) sería mucho mayor a uno no tolerante. Se debe tener en cuenta además que el ensayo en suelo se realizó por aproximadamente 28 días, por lo que para obtener un mejor panorama sobre la correlación entre los fenotipos observados *in vitro* y en suelo alcalino-sódico, sería ideal extender el tiempo de evaluación de la supervivencia.

Como se vió en el capítulo III, son muy importantes las evaluaciones a nivel de interacción en planta, ya que estas pueden variar a pesar de los buenos atributos *in vitro* de las cepas. En ese contexto es más que necesario ampliar los análisis a niveles de interacción simbiótica con *L. tenuis*.

Del conjunto total de aislados, las cepas del grupo *Aminobacter* fueron las más destacadas en cuanto a sus habilidades de adaptación a las condiciones salino-alcálinas *in vitro* y en suelo. Fueron las únicas cepas con capacidad de crecer casi sin problemas en todas las condiciones y sistemas evaluados. En ese sentido, resultó interesante profundizar en el estudio de los mecanismos involucrados en la capacidad de tolerancia a estrés salino-alcálinos que exhiben los rizobios del género *Aminobacter* como BA135 (trabajo previo) y A65, A66, A67, A68 y A69 (este trabajo), asunto que fue abordado en el capítulo V.

En dicho capítulo se identificaron genes y potenciales mecanismos involucrados en la respuesta a condiciones salino-alcálinas de la cepa BA135, mediante la integración de dos abordajes experimentales complementarios, mutagénesis aleatoria y transcriptómica. La cercanía filogenética, el alto grado de similitud genómica de las cepas del género *Aminobacter* con los simbiontes habituales de *L. tenuis* del género *Mesorhizobium* y sus destacadas habilidades adaptativas, hacen de *Aminobacter* sp. BA135 un organismo interesante para la exploración de los mecanismos envueltos en la respuesta al estrés. Con ese objetivo, y tomando como base los resultados obtenidos en el capítulo IV, se seleccionó como organismo modelo a la cepa *Aminobacter* sp. BA135, un simbionte aislado de *L. tenuis* natural de los bajos-salinos de la Pampa Deprimida, cuyo genoma ha sido secuenciado, ensamblado y anotado por nuestro grupo.

En la etapa de la mutagénesis aleatoria describimos 16 mutaciones involucradas en la respuesta al estrés salino y/o alcálinos. La estrategia de búsqueda de los mutantes sensibles en ambas condiciones por separado nos permitió establecer con exactitud la relación entre el fenotipo y la función interrumpida, así como el hallazgo de una posible dependencia de la respuesta a estrés alcálinos de la del estrés salino, pero no a la inversa. Esto podría explicarse por el fenómeno de protección de estrés cruzada que sostiene que, en un contexto de exposición a factores ambientales limitantes, las bacterias expresan mecanismos adaptativos a más de un tipo de estrés abiótico en simultáneo (Dragosits *et al.*, 2013, Zorraquino *et al.*, 2017, Dragosits y Matanovich.2013).

En nuestras condiciones experimentales las inserciones del transposón pueden generar dos fenotipos: sensibilidad a salinidad o sensibilidad simultánea a salinidad y alcalinidad, que pueden

variar desde súper sensibilidad hasta una ligera disminución de la tolerancia. De acuerdo a los mutantes descritos se concluye que entre las estrategias empleadas en la respuesta a salinidad está la modificación de la estructura de la pared bacteriana empleando enzimas de las familias de las PBPs y NALAAAs, involucradas en la síntesis y modificación de los peptidoglicanos, principal polímero que compone la pared celular bacteriana. Esto se debe a que la pared celular es la principal barrera de defensa de las células bacterianas con el medio externo por lo que el mantenimiento de su integridad resulta esencial (Scheffers & Pinho, 2005, Yadav A. *et al* 2018). La enzima intermediaria glucosa-6-fosfato isomerasa (PGI), también resultó ser importante. El rol que cumpliría PGI es el de ser una de las proteínas intermediarias importantes en la biosíntesis de trehalosa, un osmolito compatible sintetizado en situaciones de estrés abiótico (Jawahar *et al.*, 2019). Una función similar se deduce para *livK*, involucrada en la adquisición de aminoácidos (Ile, Val, Leu). Los aminoácidos, al igual que la trehalosa son considerados solutos u osmolitos compatibles, que se sintetizan o adquieren del medio para ser empleados como estrategia de defensa en contra de las lesiones nocivas que genera el estrés osmótico. Estos solutos estabilizan el estado natural de las proteínas y los lípidos (Robert *et al.*, 1999; Brhada *et al.*, 2001). Si bien el fenotipo del mutante *phoB*, sugiere que es importante en la respuesta a estrés, el rol que desempeña no queda completamente claro. No obstante, podría estar cumpliendo una función reguladora. En simultaneo a la respuesta al estrés salino, BA135 requiere además del control del estrés oxidativo que se desencadena en consecuencia del crecimiento en el medio adverso, por lo que requiere la acción de la enzima alkyl hydroperoxido reductasa, de la familia de las peroxireductasas, que cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno. Por ultimo respecto a la mutación en la región intermedia entre *ftsE* y *ftsX*, que participan en la división celular (Newton y Ota, 1990) la deficiencia podría deberse a la limitación del crecimiento, por lo que el efecto sería indirecto, aunque también tendría que ver con la mutante LC3215 (*amiC*), dado que FtsEX son necesarias para la activación de algunas amidasas periplásmicas (Cook *et al.*, 2020).

En respuesta al estrés combinado de salinidad y alcalinidad, el principal mecanismo empleado por BA135 es asegurar la homeostasis celular. Para ello BA135 utiliza un antiportador Na^+/H^+ Mrp (*Multiple resistance and pH*) que cumple un rol muy importante en el mantenimiento del equilibrio iónico y del pH citoplasmático, especialmente en medios alcalinos, que involucra la importación activa de H^+ del medio externo relativamente pobre en protones (Saier *et al.*, 2009, Krulwich *et al.*, 2011). La cobalamina también fue muy importante en la respuesta al estrés combinado, pero no tanto a la salinidad. Esto se debe posiblemente a su rol como cofactor de varias actividades enzimáticas que incluye la síntesis de enzimas importante en la respuesta al estrés como metionina sintasa *MetH* o ribonucleótido reductasa *NrdJ* (Taga y Walker, 2010, Jiang *et al.*, 2004) por lo que su deficiencia perjudicaría indirectamente la respuesta al estrés. La *uspA* también sería

importante en condiciones salino-alcálinas, y aunque su participación frente a diversos estreses está bien documentada (Chou, *et al.*, 2007), no se puede explicar con claridad el rol que cumple *UspA*. Finalmente, también se observó la importancia del factor EnvC, involucrado en la activación de las amidasas de peptidoglucano (PG) periplásmicas, requeridas para la división del PG septal que permite la constricción de la membrana externa que sigue de cerca a la membrana interna en la división celular (Peters *et al.*, 2011). En este aspecto, la mutación LC7030 (EnvC⁻) estaría relacionada con la LC209 (amidasa de peptidoglucano) y con la LC3215, dado que EnvC interacciona con FtsEX para la activación de las amidasas de peptidoglucano periplásmicas (Cook *et al.*, 2020). Nuevamente, queda evidenciada la importancia del metabolismo de la pared celular para la adaptación al estrés de la cepa BA135 así como el vínculo entre los mecanismos de tolerancia a alcalinidad y salinidad.

Ninguna de estas mutaciones afectó de manera definitiva a la capacidad de BA135 para la formación de nódulos en *L. tenuis*. No obstante, en varios casos se observaron retrasos en la nodulación y, particularmente en los mutantes relacionados con la síntesis de vitamina B12 y el factor EnvC, una reducción de la eficiencia simbiótica. Este resultado concuerda con otros previos que indican que los rizobios utilizan los mismos mecanismos de tolerancia a estrés tanto en vida libre como para su adaptación durante la interacción simbiótica con la planta huésped (Nogales *et al.*, 2002; da Silva *et al.*, 2017). Sobre EnvC, dada su función como activador de amidasas de peptidoglucano periplásmicas, no se descarta que la reducción simbiótica observada sea consecuencia de una deficiencia en el mantenimiento de la pared celular y/o en la división celular. Por otro lado, el rol de la cobalamina podría ser más complejo, ya sea por su acción como cofactor de enzimas importantes como MetH y NrdJ (Taga y Walker, 2010), o por alguna otra relación, directa o indirecta, de la síntesis de cobalamina con el proceso de simbiosis. Por ejemplo, los defectos simbióticos de un mutante *cobO* de *S. fredii* no fueron totalmente restaurados tras la suplementación nutricional con cobalamina o metionina (Medina *et al.*, 2008). En ese sentido, sería interesante profundizar en la función de la cobalamina en la interacción rizobio-leguminosa, así como en la tolerancia al estrés abiótico.

La siguiente etapa para corroborar la función de los genes interrumpidos es mediante la complementación de los mutantes. Aunque los fenotipos de algunos mutantes fueron evaluados mediante técnicas microbiológicas, particularmente los que implican cambios auxanográficos, la estrategia más certera es mediante la complementación genética, por lo que se prevé el uso de esta metodología en el futuro para corroborar los resultados obtenidos.

El uso de tecnologías ómicas permite el análisis desde una perspectiva más global. A nivel transcriptómico se observó la inducción de algunos de los genes mutados anteriormente o de genes estrechamente relacionados con ellos. La caracterización de los genes más relevantes permitió deducir que, en condiciones de estrés combinado salino-alcálico, BA135 regula la homeostasis celular

mediante la fuerte inducción del operón del antiportador Na^+/H^+ . También se observaron cambios de expresión en sistemas de transporte, posiblemente como estrategia en la optimización de la adquisición y/o excreción de sustratos, con el fin de alcanzar o mantener los niveles necesarios requeridos para las funciones celulares. Aunque no fue posible determinar con precisión el sustrato asociado, el contexto genómico acompañante podría permitir hipotetizar la identidad de dichos sustratos.

Otra estrategia de respuesta ante el estrés salino alcalino de BA135 se relaciona con el uso y acumulación de osmoprotectores. Se indujo la expresión de enzimas involucradas en la síntesis tanto de homoespermidina (homospd) como de inositol, de los cuales el uso de homospd, como estrategia de amortiguación metabólica para ajustar el pH intra o extracelular es más frecuente en rizobios, mientras que el inositol por su parte no es un osmolito común en bacterias (Burg y Ferraris, 2008). Otro posible osmolito compatible de importancia para BA135 es la glicina-betaína (GB). Se observó la represión de varias enzimas involucradas en el catabolismo de GB, posiblemente para garantizar la conservación de la misma, dado su rol osmoprotector. Para corroborar el papel osmoprotector de la GB, será necesario determinar si la expresión de los genes y/o enzimas de biosíntesis de GB se inducen en condiciones de estrés abiótico en BA135, como ha sido descrito para otros rizobios (Smith *et al.*, 1988; Boncompagni *et al.* 1999).

En relación a esto último, y quizá uno de los resultados más interesantes hallados en esta sección, es la interconexión entre la síntesis de metionina y el catabolismo de la glicina-betaína como respuesta al estrés de BA135. Se observó la sobreexpresión de varias de las enzimas involucradas en la síntesis de metiotina, algunas como la metionina sintasa (MS) y la metionina aminopeptidasa (MAP), dependientes de cobalamina y cobalto, respectivamente. La metionina cumple un rol fundamental como a.a señal de inicio de la traducción, así como para la síntesis y estabilidad de proteínas, aspectos que posiblemente cobran mayor relevancia en situaciones de estrés. Adicionalmente la metionina es fundamental para la síntesis de S-adenosilmetionina (SAM), principal donador de grupos metilo y adenosilo esenciales para múltiples procesos celulares. Relacionado a ello se encontró inducida una S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa, enzima clave para el reciclaje de SAM.

La síntesis de metionina requiere de la acción de la enzima MS, la cual cataliza la reacción de metilación de homocisteína mediante la transferencia de un grupo metilo proveniente de 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF). Este último es producto de la reducción de metilentetrahidrofolato (5,10-CH₂THF) por acción de la enzima 5,10-metilenetetrahidrofolato reductasa (MTHFR; MetF). Aunque se encontró la represión del gen BA135_5715 que condifica para MetF, lo que resultaría contradictorio con la importancia sugerida de la MS, también observamos la sobreexpresión de una

segunda copia de *metF* presente en BA135 (BA135_5437), lo cual podría compensar la menor expresión del primero en condiciones de estrés.

La cepa BA135 posee una probable segunda actividad metionina sintasa MetE, una betaina-homocisteína metiltransferasa (codificada por el gen BA135_3870) que utiliza la glicina betaina en lugar metil-tetrahidrofolato como donador de grupos metilo. Al contrario que *metH*, la expresión de *metE* apareció reducida en condiciones de estrés, junto con la de varios genes relacionados con el catabolismo de GB. En ese sentido, planteamos la hipótesis de que, en condiciones de estrés, BA135 induce la síntesis de metionina usando como principal molécula donadora de grupos metilo el 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF), por delante de GB. Al mismo tiempo parece salvaguardar los niveles de esta, posiblemente para su uso como osmolito compatible, algo también observado previamente en rizobios (Smith *et al.*, 1988; Gloux y LeRudulier, 1989; Fougere y LeRudulier 1990; Boncompagni *et al.*, 1999). Así pues, BA135 priorizaría determinadas actividades metabólicas que no interfieren con otros mecanismos de tolerancia al estrés, lo cual ayuda a explicar la duplicidad de ciertos genes y actividades enzimáticas.

Las modificaciones a nivel del metabolismo del carbono, son fundamentales en la adaptación de BA135 a la salinidad y alcalinidad. Se indujo significativamente el operón involucrado en la síntesis y degradación del glucógeno, posiblemente debido a la necesidad de almacenamiento de este polímero de reserva. En bacterias el almacenamiento de fuentes de carbono en forma de glucógeno, se utiliza como estrategia para la restauración del crecimiento celular después del impacto del estrés (Han *et al.*, 2005). Otros posibles compuestos de reserva de carbono usados fueron los poli-hidroxicanoatos (PHAs) y azúcares como la xilosa. Se observó la represión de la fosfoenolpiruvato carboxikinasa, una enzima clave que vincula el ciclo de Krebs y la gluconeogenesis, sugiriendo una reducción del metabolismo energético en condiciones de estrés. A esto se adiciona la represión del operón responsable de la quimiotaxis en BA135. Esta respuesta es frecuentemente reportada tras la exposición de las células bacterianas a condiciones estresantes, y podría representar una estrategia de adaptación a condiciones adversas, mediante la limitación de procesos, como la motilidad, con alto requerimiento energético (Domínguez-Ferreras *et al.*, 2006).

Adicionalmente a las estrategias de almacenamiento de recursos energéticos y protectantes, se encontró la búsqueda de equilibrio celular en base al control de los niveles de ROS. Si bien la producción de ROS es una consecuencia inevitable del metabolismo regular de la célula, su acumulación se ve particularmente estimulada en medios adversos alcanzando niveles tóxicos. En ese sentido en BA135 se encontró la inducción de las enzimas oxidoreductasas y de detoxificación posiblemente como en respuesta al estrés oxidativo ocasionado por el estrés salino-alcalino.

También se encontraron diferencialmente expresados los genes codificantes para proteínas de respuesta general al estrés y chaperonas, las cuales se encontraron en su mayoría reprimidas a excepción de BA135_673 y BA135_3131. La inducción o represión de este tipo de proteínas bacterianas es común en estudios de estrés abiótico. No obstante, para la mayoría de ellas no se ha caracterizado con precisión la función que podrían llevar a cabo. Entre los genes de respuesta al estrés de tipo *usp*, el resultado más llamativo fue la reducción de la expresión de BA135_6670, gen cuya mutación provocó una significativa pérdida de tolerancia a salinidad y alcalinidad (mutante LC5410, Tabla V.4). Aunque a priori ambos resultados parecen contradictorios, hay que tener en cuenta que desconocemos la función de esta proteína Usp. Y como se discutió anteriormente, es posible un efecto polar de la mutación en LC5410 sobre el gen situado aguas abajo de BA135_6670, que podría tener algún papel en procesos de protección celular.

Otros varios genes con potencial función regulatoria fueron hallados, entre ellos se destaca un gen codificante para una proteína con un dominio REC similar a CheY, posiblemente involucrado en la regulación de la actividad del flagelo; y otro que codifica para una proteína con un dominio HTH de unión a ADN asociado con un dominio metiltransferasa. Este gen parece ser altamente conservado en rizobiales y asociado a *metF*, el cual está involucrado en la síntesis de metionina, que como se mencionó anteriormente, podría ser un mecanismo principal durante la adaptación de BA135 al estrés.

Al igual que lo comentado anteriormente para la mutagénesis aleatoria, es necesario validar los resultados transcriptómicos derivados el RNAseq, por una metodología independiente como es la cuantificación de la transcripción de un conjunto significativo de genes. Estos estudios utilizan PCR cuantitativa (qPCR; Real Time PCR) y están en progreso actualmente. No obstante, limitaciones de tiempo y algunos inconvenientes inesperados, han impedido incluir los resultados en el presente manuscrito.

El estrés abiótico salino-alcalino afecta duramente la fisiología de los rizobios y su potencial interacción con su huésped. Los resultados de este estudio indican que la respuesta a estrés de BA135 es un proceso complejo y coordinado, que desencadena una variedad de procesos en simultáneo para asegurar la viabilidad de la célula. El conocimiento de estos mecanismos de respuesta podría sentar las bases para futuros abordajes biotecnológicos, dirigidos a mejorar la capacidad de adaptación y eficacia de los inoculantes de *L. tenuis*.

Conclusiones

1. Existe una comunidad de bacterias asociadas a la rizosfera de *Lotus tenuis* con una amplia plasticidad adaptativa para solubilizar fosfato bajo condiciones de estrés *in vitro*, que, además resultó estar compuesta exclusivamente por miembros del filo *Proteobacteria* (orden *Enterobacteriales* y familia *Pseudomonadaceae*). De todos estos, es llamativa la dominancia y la “*performance*” de especies del género *Pantoea*, en particular *Pantoea eucalypti*, no solo por su abundancia y su diversidad genética en la rizosfera de *L. tenuis*, sino también por sus diferentes capacidades PGPR y, en consecuencia, potencial efecto promotor en *L. tenuis*.
2. A pesar de la similitud genética y funcional entre las cepas de *P. eucalypti*, estas ejercen efectos diferenciales tanto en las variables de crecimiento como en la composición nutricional de *L. tenuis* en co-inoculación con *Mesorhizobium sanjuanii*. Mientras que las cepas M91 y P163 incrementan positivamente el peso seco total, peso seco del vástago y peso seco de nódulos de *L. tenuis*, la cepa P76, los disminuye significativamente. El mismo patrón diferencial se produce sobre las concentraciones de Mg y Zn, evidenciando la capacidad de estas cepas para modular la adquisición de nutrientes por la planta. Estos efectos en el incremento de la concentración y acumulación de nutrientes representan una ventaja nutricional para fines biotecnológicos en la producción de pasturas de calidad en suelos alcalino-sódicos.
3. El contraste de las respuestas observadas en *L. tenuis*, en los tratamientos de co-inoculación con las cepas *P. eucalypti* M91 y P76 resalta la complejidad y especificidad de las interacciones planta–microorganismos. Además, a pesar de los promisorios efectos desplegados *in vitro*, es muy importante realizar evaluaciones en sistemas de interacción tripartita rizobio-BSF-leguminosa, ya que son fundamentales para la correcta selección de microorganismos promotores del crecimiento que tengan potencial interés como biofertilizantes para leguminosas.
4. A diferencia de las bacterias solubilizadoras de fosfato, es menos probable encontrar rizobios asociados a *L. tenuis* tolerantes a condiciones de estrés salino-alcalino *in vitro*, lo que sugiere “*a priori*” la necesidad de un mayor esfuerzo de muestreo para este tipo de bacterias como consideración para un futuro diseño experimental. Además, las notables diferencias adaptativas observadas entre ambas comunidades posiblemente sean reflejo del nicho ecológico que desempeñan en el ambiente.
5. Los simbioses de *L. tenuis* en los suelos alcalino-sódicos, son mayoritariamente sensibles a salinidad y alcalinidad en condiciones *in vitro*, y están dominados por miembros del género *Mesorhizobium*. No obstante, el hallazgo de rizobios infectivos de los géneros *Aminobacter* y *Phyllobacterium* evidencia que la comunidad de simbioses está extendida a miembros de

otros géneros. Asimismo, a pesar de lo observado en condiciones *in vitro*, el crecimiento en suelo por parte de los rizobios no se ve tan perjudicado, posiblemente debido a que los sistemas *in vitro* no permiten el despliegue de estrategias comunitarias de adaptación.

6. De todos los simbioses aislados las cepas del grupo *Aminobacter* fueron las más destacadas en cuanto a sus habilidades de adaptación a las condiciones salino-alcálicas *in vitro* y en suelo. Fueron las únicas cepas con capacidad de crecer casi sin problemas en todas las condiciones y sistemas evaluados. Este resultado nos llevó a hipotetizar que los rizobios de este género podrían ser interesantes como objeto de estudios que permitan obtener información acerca de sus mecanismos de tolerancia.
7. En respuesta al estrés salino-alcálico, la cepa de *Aminobacter* sp. BA135 emplea una variedad de mecanismos complejos y coordinados con el fin de mantener las funciones centrales y asegurar la viabilidad celular. Estos incluyen el mantenimiento de la homeostasis iónica y el pH intracelular, modificaciones estructurales de la pared celular, la expresión de genes de respuesta al estrés y la acumulación de compuestos osmoprotectores, modificaciones en el metabolismo energético y de carbono, cambios en la importación y exportación de sustratos, o el control de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS).
8. La activación de un sistema antiportador catión/protón de BA135 es un mecanismo central de adaptación al estrés salino-alcálico que es compartido con otras bacterias, mientras que resulta más novedoso el fomento de una ruta específica de síntesis de metionina dependiente de folato y de cobalamina, dirigida a garantizar la síntesis de proteínas y los niveles del principal donador celular de grupos metilo, la S-adenosilmetionina, sin que se afecte la acumulación de osmoprotectores como la glicina betaina.
9. No ha sido posible obtener mutantes de BA135 sensibles a alcalinidad que mantengan intacta la tolerancia a la salinidad, lo que sugiere que los mecanismos de respuesta a estrés alcálico son dependientes de la respuesta al estrés salino, pero no a la inversa.
10. Aunque ninguno de los mecanismos de respuesta al estrés salino-alcálico parece esencial para la nodulación de BA135 con *Lotus tenuis*, algunos de esos mecanismos sí son necesarios para alcanzar una óptima eficiencia de fijación simbiótica de nitrógeno.

Referencias

1. Abd-Alla, M. H., & Wahab, A. M. A. (1995). Survival of *Rhizobium leguminosarum* biovar viceae subjected to heat, drought and salinity in soil. *Biologia Plantarum*, 37(1), 131–137. <https://doi.org/10.1007/BF02913008>
2. Abd-Alla, M. H., El-Enany, A. W. E., Nafady, N. A., Khalaf, D. M., & Morsy, F. M. (2014). Synergistic interaction of *Rhizobium leguminosarum* bv. viceae and arbuscular mycorrhizal fungi as a plant growth promoting biofertilizers for faba bean (*Vicia faba* L.) in alkaline soil. *Microbiological Research*, 169(1), 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.07.007>
3. Abdiev, A., Khaitov, B., Toderich, K., & Park, K. W. (2019). Growth, nutrient uptake and yield parameters of chickpea (*Cicer arietinum* L.) enhance by *Rhizobium* and *Azotobacter* inoculations in saline soil. *Journal of Plant Nutrition*, 42(20), 2703–2714. <https://doi.org/10.1080/01904167.2019.1655038>
4. Abhilash, P. C., Dubey, R. K., Tripathi, V., Gupta, V. K., & Singh, H. B. (2016). Plant growth-promoting microorganisms for environmental sustainability. *Trends in biotechnology*, 34(11), 847–850.
5. Adeolu, M., Alnajjar, S., Naushad, S., & Gupta, R. S. (2016). Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘Enterobacteriales’: Proposal for enterobacterales ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morgane*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(12), 5575–5599. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001485>
6. Adhya, T. K., Kumar, N., Reddy, G., Podile, A. R., Bee, H., & Samantaray, B. (2015). Microbial mobilization of soil phosphorus and sustainable P management in agricultural soils. *Current Science*, 108(7), 1280–1287.
7. Aguirre, A., Bernal, P., Maureira, D., Ramos, N., Vásquez, J., Urrutia, H., Gentina, J. C., & Aroca, G. (2018). Biofiltration of trimethylamine in biotrickling filter inoculated with *Aminobacter aminovorans*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 33, 63–67. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2018.04.004>
8. Alloway, B. J. (2009). Soil factors associated with zinc deficiency in crops and humans. *Environmental Geochemistry and Health*, 31(5), 537–548. <https://doi.org/10.1007/s10653-009-9255-4>
9. Anders, S., Pyl, P. T., & Huber, W. (2015). HTSeq-A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, 31(2), 166–169. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu638>
10. Anderson, A. J., & Kim, Y. C. (2020). Insights into plant-beneficial traits of probiotic *Pseudomonas chlororaphis* isolates. In *Journal of Medical Microbiology* (Vol. 69, Issue 3, pp. 361–371). Microbiology Society. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001157>
11. Andreote, F. D., & Pereira e Silva, M. de C. (2017). Microbial communities associated with plants: learning from nature to apply it in agriculture. *Current Opinion in Microbiology*, 37, 29–34. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.03.011>
12. Andrews, M., De Meyer, S., James, E. K., Stepkowski, T., Hodge, S., Simon, M. F., & Young, J. P. W. (2018). Horizontal transfer of symbiosis genes within and between rhizobial genera: Occurrence and importance. *Genes*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/genes9070321>
13. Antonets, K. S., Volkov, K. V., Maltseva, A. L., Arshakian, L. M., Galkin, A. P., & Nizhnikov, A. A. (2016). Proteomic analysis of *Escherichia coli* protein fractions resistant to solubilization by ionic detergents. *Biochemistry (Moscow)*, 81(1), 34–46. <https://doi.org/10.1134/S0006297916010041>
14. Arelovich, H. M., Bravo, R. D., & Martínez, M. F. (2011). Development, characteristics, and trends for beef cattle production in Argentina. *Animal Frontiers*, 1(2), 37–45. <https://doi.org/10.2527/af.2011-0021>
15. Arias, A., Cervenansky, C., Gardiol, A., & Martinez-Drets, G. (1979). *Phosphoglucose isomerase* mutant of *Rhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, 137(1), 409–414. <https://doi.org/10.1128/jb.137.1.409-414.1979>
16. Ariza, A., Moroz, O. V., Blagova, E. V., Turkenburg, J. P., Waterman, J., Roberts, S. M., Vind, J., Sjøholm, C., Lassen, S. F., de Maria, L., Glitsoe, V., Skov, L. K., & Wilson, K. S. (2013). Degradation

- of Phytate by the 6-Phytase from *Hafnia alvei*: A Combined Structural and Solution Study. PLoS ONE, 8(5), e65062. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065062>
17. Arora, S., & Dagar, J. C. (2019). Salinity Tolerance Indicators. In Research Developments in Saline Agriculture (pp. 155–201). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-5832-6_5
 18. Arora, S., Singh, A. K., & Singh, Y. P. (2017). Bioremediation of salt affected soils: An Indian perspective. In Bioremediation of Salt Affected Soils: An Indian Perspective. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-48257-6>
 19. Atieno, M., & Lesueur, D. (2019). Opportunities for improved legume inoculants: enhanced stress tolerance of rhizobia and benefits to agroecosystems. Symbiosis, 77(3), 191–205. <https://doi.org/10.1007/s13199-018-0585-9>
 20. Bachrach, U. (2010). The early history of polyamine research. Plant Physiology and Biochemistry, 48(7), 490–495. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.02.003>
 21. Bakhtiyarifar, M., Enayatizamir, N., & Mehdi Khanlou, K. (2021). Biochemical and molecular investigation of non-rhizobial endophytic bacteria as potential biofertilisers. Archives of Microbiology, 203(2), 513–521. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02038-z>
 22. Bano, A., & Fatima, M. (2009). Salt tolerance in *Zea mays* (L). following inoculation with *Rhizobium* and *Pseudomonas*. Biology and Fertility of Soils, 45(4), 405–413. <https://doi.org/10.1007/s00374-008-0344-9>
 23. Barnett, M. J., & Long, S. R. (2018). Novel genes and regulators that influence production of cell surface exopolysaccharides in *Sinorhizobium meliloti*. Journal of Bacteriology, 200(3), 1–22. <https://doi.org/10.1128/JB.00501-17>
 24. Barra, L., Fontenelle, C., Ermel, G., Trautwetter, A., Walker, G. C., & Blanco, C. (2006). Interrelations between glycine betaine catabolism and methionine biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti* strain 102F34. Journal of Bacteriology, 188(20), 7195–7204. <https://doi.org/10.1128/JB.00208-06>
 25. Batista, W., & Taboada, M. (2005). Asociación entre comunidades vegetales y suelos de pastizal de la Pampa Deprimida. M Oesterheld, MR ..., 113–129. <http://por.agro.uba.ar/users/batista/science/pdf/batistaetal05.pdf>
 26. Becerra-Rivera, V. A., & Dunn, M. F. (2019). Polyamine biosynthesis and biological roles in rhizobia. In FEMS Microbiology Letters (Vol. 366, Issue 7). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz084>
 27. Beijerinck, M. W., & Van Delden, A. (1902). On a colourless bacterium, whose carbon food comes from the atmosphere. *Koninklijke Nederlandse Akademie Van Wetenschappen Proceedings Series B Physical Sciences*, 5, 398–413.
 28. Ben Laouane, R., Meddich, A., Bechtaoui, N., Oufdou, K., & Wahbi, S. (2019). Effects of Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Rhizobia Symbiosis on the Tolerance of Medicago Sativa to Salt Stress. *Gesunde Pflanzen*, 71(2), 135–146. <https://doi.org/10.1007/s10343-019-00461-x>
 29. Ben Zineb, A., Trabelsi, D., Ayachi, I., Barhoumi, F., Aroca, R., & Mhamdi, R. (2020). Inoculation with Elite Strains of Phosphate-Solubilizing Bacteria Enhances the Effectiveness of Fertilization with Rock Phosphates. *Geomicrobiology Journal*, 37(1), 22–30. <https://doi.org/10.1080/01490451.2019.1658826>
 30. Berasategui, L. A., & Barberis, L. A. (n.d.). Los suelos de las comunidades vegetales de la región Castelli-Pila, Depresión del Salado (Provincia de Buenos Aires).
 31. Berg, G., Grube, M., Schloter, M., & Smalla, K. (2014). Unraveling the plant microbiome: Looking back and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 5(JUN), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00148>
 32. Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 62:293-300
 33. Bielnicki, J., Devedjiev, Y., Derewenda, U., Dauter, Z., Joachimiak, A., & Derewenda, Z. S. (2006). B. subtilis ykuD protein at 2.0 Å resolution: Insights into the structure and function of a novel, ubiquitous family of bacterial enzymes. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 62(1), 144–151. <https://doi.org/10.1002/prot.20702>

34. Billah, M., Khan, M., Bano, A., Hassan, T. U., Munir, A., & Gurmani, A. R. (2019). Phosphorus and phosphate solubilizing bacteria: Keys for sustainable agriculture. *Geomicrobiology Journal*, 36(10), 904-916
35. Bisogno, F. R., Rioz-Martínez, A., Rodríguez, C., Lavandera, I., de Gonzalo, G., Torres Pazmiño, D. E., Fraaije, M. W., & Gotor, V. (2010). Oxidoreductases Working Together: Concurrent Obtaining of Valuable Derivatives by Employing the PIKAT Method. *ChemCatChem*, 2(8), 946–949. <https://doi.org/10.1002/cctc.201000115>
36. Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
37. Boncompagni, E., Østerås, M., Poggi, M. C., & Le Rudulier, D. (1999). Occurrence of choline and glycine betaine uptake and metabolism in the family *Rhizobiaceae* and their roles in osmoprotection. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(5), 2072–2077. <https://doi.org/10.1128/aem.65.5.2072-2077.1999>
38. Booth, I. R., Ferguson, G. P., Miller, S., Li, C., Gunasekera, B., & Kinghorn, S. (2003). Bacterial production of methylglyoxal: A survival strategy or death by misadventure? *Biochemical Society Transactions*, 31(6), 1406–1408. <https://doi.org/10.1042/bst0311406>
39. Boscari, A., Mandon, K., Dupont, L., Poggi, M. C., & Le Rudulier, D. (2002). BetS is a major glycine betaine/proline betaine transporter required for early osmotic adjustment in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, 184(10), 2654–2663. <https://doi.org/10.1128/JB.184.10.2654-2663.2002>
40. Boscari, A., Van De Sype, G., Le Rudulier, D., & Mandon, K. (2006). Overexpression of BetS, a *Sinorhizobium meliloti* high-affinity betaine transporter, in bacteroids from *Medicago sativa* nodules sustains nitrogen fixation during early salt stress adaptation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(8), 896–903. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0896>
41. Botsford, J. L., & Lewis, T. A. (1990). Osmoregulation in *Rhizobium meliloti*: Production of Glutamic Acid in Response to Osmotic Stress. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(2).
42. Bradstreet, R. B. (1954). Kjeldahl Method for Organic Nitrogen. *Analytical Chemistry*, 26(1), 185–187. <https://doi.org/10.1021/ac60085a028>
43. Brady, C., Cleenwerck, I., Venter, S., Coutinho, T., & De Vos, P. (2013). Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA): Proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottia nimipressuralis* comb. nov. and *Lelliottia amnigena* comb. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 36(5), 309–319. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.03.005>
44. Brady, C., Cleenwerck, I., Venter, S., Vancanneyt, M., Swings, J., & Coutinho, T. (2008). Phylogeny and identification of *Pantoea* species associated with plants, humans and the natural environment based on multilocus sequence analysis (MLSA). *Systematic and Applied Microbiology*, 31(6–8), 447–460. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2008.09.004>
45. Bray, R. H., & Kurtz, L. T. (1945). Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soils. *Soil science*, 59(1), 39-46.
46. Brhada, F., Poggi, M. C., Van de Sype, G., & Le Rudulier, D. (2001). Osmoprotection mechanisms in rhizobia isolated from *Vicia faba* var. major and *Cicer arietinum*. *Agronomie*, 21(6–7), 583–590. <https://doi.org/10.1051/agro:2001148>
47. Brígido, C., Nascimento, F. X., Duan, J., Glick, B. R., & Oliveira, S. (2013). Expression of an exogenous 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene in *Mesorhizobium* spp. reduces the negative effects of salt stress in chickpea. *FEMS Microbiology Letters*, 349(1), 46–53. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12294>
48. Brodt, S., Six, J., Feenstra, G., Ingels, C. & Campbell, D. (2011) Sustainable Agriculture. *Nature Education Knowledge* 3(10):1
49. Broos, K., Beyens, H., & Smolders, E. (2005). Survival of rhizobia in soil is sensitive to elevated zinc in the absence of the host plant. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(3), 573–579. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.08.018>

50. Buchbinder L., Baris Y., Aldd E., Reynolds E., Dilon E., Pessin V., Pincas L. and Strauss A., 1951. Publ. Hlth. Rep., 66:327.
51. Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., Van Themaat, E. V. L., & Schulze-Lefert, P. (2013). Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual Review of Plant Biology*, 64, 807–838. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120106>
52. Bünemann, E. K. (2015). Assessment of gross and net mineralization rates of soil organic phosphorus - A review. *Soil Biology and Biochemistry*, 89, 82–98. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.06.026>
53. Burg, M. B., & Ferraris, J. D. (2008). Intracellular organic osmolytes: Function and regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 283(12), 7309–7313. <https://doi.org/10.1074/jbc.R700042200>
54. Burkart, S. E., Garbulsky, M. F., Ghersa, C. M., Guerschman, J. P., León, R. J. C., Oesterheld, M., Aguiar, M., Ghersa, C., & Paruelo, J. (2005). Las comunidades potenciales del pastizal pampeano bonaerense. *La Heterogeneidad de La Vegetación de Los Agroecosistemas. Un Homenaje a Rolando León*. Ed. Facultad de Agronomía. Buenos Aires, Argentina, 379–400.
55. Cai, X. Y., Jakubowski, H., Redfield, B., Zaleski, B., Brot, N., & Weissbach, H. (1992). Role of the metF and metJ genes on the vitamin B12 regulation of methionine gene expression: involvement of N5-methyltetrahydrofolic acid. *Biochemical and biophysical research communications*, 182(2), 651–658.
56. Cameron, K. C., Di, H. J., & Moir, J. L. (2013). Nitrogen losses from the soil/plant system: A review. *Annals of Applied Biology*, 162(2), 145–173. <https://doi.org/10.1111/aab.12014>
57. Campbell, G. R. O., Taga, M. E., Mistry, K., Lloret, J., Anderson, P. J., Roth, J. R., & Walker, G. C. (2006). *Sinorhizobium meliloti* bluB is necessary for production of 5,6-dimethylbenzimidazole, the lower ligand of B12. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(12), 4634–4639. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509384103>
58. Campestre, María Paula, Castagno, L. N., Estrella, M. J., & Ruiz, O. A. (2016). *Lotus japonicus* plants of the Gifu B-129 ecotype subjected to alkaline stress improve their Fe²⁺ bio-availability through inoculation with *Pantoea eucalypti* M91. *Journal of Plant Physiology*, 192, 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.01.001>
59. Campestre, Maria Paula, Castagno, N. L., Antonelli, C. J., Maguire, V. G., Escaray, F. J., & Ruiz, O. A. (2020). Characterization of alkaline stress tolerance mechanisms in *Lotus* forage species modulated by *Pantoea eucalypti*. *BioRxiv*, 2020.06.06.138230. <https://doi.org/10.1101/2020.06.06.138230>
60. Canfield, D. E., Glazer, A. N., & Falkowski, P. G. (2010). The evolution and future of earth's nitrogen cycle. *Science*, 330(6001), 192–196. <https://doi.org/10.1126/science.1186120>
61. Cao, Y., Halane, M. K., Gassmann, W., & Stacey, G. (2017). The Role of Plant Innate Immunity in the Legume-Rhizobium Symbiosis. *Annual Review of Plant Biology*, 68, 535–561. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042916-041030>
62. Castagno, L. N., Estrella, M. J., Sannazzaro, A. I., Grassano, A. E., & Ruiz, O. A. (2011). Phosphate-solubilization mechanism and in vitro plant growth promotion activity mediated by *Pantoea eucalypti* isolated from *Lotus tenuis* rhizosphere in the Salado River Basin (Argentina). *Journal of Applied Microbiology*, 110(5), 1151–1165. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.04968.x>
63. Castagno, L. N., Sannazzaro, A. I., Gonzalez, M. E., Pieckenstain, F. L., & Estrella, M. J. (2021). Phosphobacteria as key actors to overcome phosphorus deficiency in plants. *Annals of Applied Biology*, November 2020, 1–12. <https://doi.org/10.1111/aab.12673>
64. Castagno, Luis Nazareno, García, I. V., Sannazzaro, A. I., Bailleres, M., Ruiz, O. A., Mendoza, R. E., & Estrella, M. J. (2014). Growth, nutrient uptake and symbiosis with rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi in *Lotus tenuis* plants fertilized with different phosphate sources and inoculated with the phosphate-solubilizing bacterium *Pantoea eucalypti* M91. *Plant and Soil*, 385(1–2), 357–371. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2237-z>
65. Charron, D., Pingret, J. L., Chabaud, M., Journet, E. P., & Barker, D. G. (2004). Pharmacological evidence that multiple phospholipid signaling pathways link rhizobium nodulation factor perception in *Medicago truncatula* root hairs to intracellular responses, including Ca²⁺ spiking and specific ENOD gene expression. *Plant Physiology*, 136(3), 3582–3593. <https://doi.org/10.1104/pp.104.051110>

66. Chen, L., & Roberts, M. F. (2000). Overexpression, purification, and analysis of complementation behavior of *E. coli* SuhB protein: Comparison with bacterial and archaeal inositol monophosphatases. *Biochemistry*, 39(14), 4145–4153. <https://doi.org/10.1021/bi992424f>
67. Chen, T., Duan, L., Zhou, B., Yu, H., Zhu, H., Cao, Y., & Zhang, Z. (2017). Interplay of pathogen-induced defense responses and symbiotic establishment in *Medicago truncatula*. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAY), 973. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00973>
68. Cheng, B., Meng, Y., Cui, Y., Li, C., Tao, F., Yin, H., Yang, C., & Xu, P. (2016). Alkaline response of a halotolerant alkaliphilic *Halomonas* strain and functional diversity of Its Na⁺(K⁺)/H⁺ antiporters. *Journal of Biological Chemistry*, 291(50), 26056–26065. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.751016>
69. Chi, Y. H., Koo, S. S., Oh, H. T., Lee, E. S., Park, J. H., Phan, K. A. T., Wi, S. D., Bae, S. Bin, Paeng, S. K., Chae, H. B., Kang, C. H., Kim, M. G., Kim, W. Y., Yun, D. J., & Lee, S. Y. (2019). The physiological functions of universal stress proteins and their molecular mechanism to protect plants from environmental stresses. *Frontiers in Plant Science*, 10, 750. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00750>
70. Chou, M. X., Wei, X. Y., Chen, D. S., & Zhou, J. C. (2007). A novel nodule-enhanced gene encoding a putative universal stress protein from *Astragalus sinicus*. *Journal of Plant Physiology*, 164(6), 764–772. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2006.05.009>
71. Cohen, G. N. (2014). *Microbial biochemistry*, third edition. *Microbial Biochemistry*, Third Edition, 1–611. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-8908-0>
72. Compant, S., Samad, A., Faist, H., & Sessitsch, A. (2019). A review on the plant microbiome: ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *Journal of advanced research*, 19, 29–37.
73. Cook, J., Baverstock, T. C., McAndrew, M. B. L., Stansfeld, P. J., Roper, D. I., & Crow, A. (2020). Insights into bacterial cell division from a structure of EnvC bound to the FtsX periplasmic domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(45), 28355–28365. <https://doi.org/10.1073/pnas.2017134117>
74. Costa-Silva, J., Domingues, D., & Lopes, F. M. (2017). RNA-Seq differential expression analysis: An extended review and a software tool. *PLoS ONE*, 12(12), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190152>
75. Covelli, J. M. (2013). *Biofertilización con Bradyrhizobium japonicum para la agricultura sustentable: aspectos ecofisiológicos del problema de la competición para la nodulación* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).
76. Cruz Barrera, M., Jakobs-Schoenwandt, D., Persicke, M., Gómez, M. I., Ruppel, S., & Patel, A. V. (2020). Anhydrobiotic engineering for the endophyte bacterium *Kosakonia radicincitans* by osmoadaptation and providing exogenously hydroxyectoine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(1), 6. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2780-0>
77. da Silva, C. F., Vitorino, L. C., Soares, M. A., & Souchie, E. L. (2018). Multifunctional potential of endophytic and rhizospheric microbial isolates associated with *Butia purpurascens* roots for promoting plant growth. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 111(11), 2157–2174. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1108-7>
78. Dall’Agnol, R.F., Bournaud, C., Faria, S.M., Béna, G., Moulin, L., Hungria, M.(2017) Genetic diversity of symbiotic Paraburkholderia species isolated from nodules of *Mimosa pudica* (L.) and *Phaseolus vulgaris* (L.) grown in soils of the Brazilian Atlantic Forest (Mata Atlântica). *FEMS Microbiol. Ecol.* 93, 1–15.
79. Danchin, A., Sekowska, A., & You, C. (2020). One-carbon metabolism, folate, zinc and translation. *Microbial Biotechnology*, 13(4), 899–925. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13550>
80. Darch, T., McGrath, S. P., Lee, M. R. F., Beaumont, D. A., Blackwell, M. S. A., Horrocks, C. A., Evans, J., & Storkey, J. (2020). The mineral composition of wild-type and cultivated varieties of pasture species. *Agronomy*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/agronomy10101463>

81. Dassa, E., & Bouige, P. (2001). The ABC of ABCs: A phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. *Research in Microbiology*, 152(3–4), 211–229. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(01\)01194-9](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01194-9)
82. Dauter, Z., Dauter, M., Hemker, J., Witzel, H., & Wilson, K. S. (1989). Crystallisation and preliminary analysis of glucose isomerase from *Streptomyces albus*. *FEBS Letters*, 247(1), 1–8. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)81227-X](https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)81227-X)
83. De Bruijn, F. J. (2015). Biological nitrogen fixation. In *Principles of Plant-Microbe Interactions: Microbes for Sustainable Agriculture* (pp. 215–224). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-08575-3_23
84. Dear, B. S., Moore, G. A., & Hughes, S. J. (2003). Adaptation and potential contribution of temperate perennial legumes to the southern Australian wheatbelt: A review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 43(1), 1–18. <https://doi.org/10.1071/EA01202>
85. Degtjareva, G. V., Kramina, T. E., Sokoloff, D. D., Samigullin, T. H., Valiejo-Roman, C. M., & Antonov, A. S. (2006). Phylogeny of the genus *Lotus* (Leguminosae, Loteae): Evidence from nrITS sequences and morphology. *Canadian Journal of Botany*, 84(5), 813–830. <https://doi.org/10.1139/B06-035>
86. Degtjareva, Galina V, Kramina, T. E., Sokoloff, D. D., Samigullin, T. H., Sandral, G., & Valiejo-Roman, C. M. (2008). New data on nrITS phylogeny of *Lotus* (Leguminosae, Loteae). Dekker, New York, pp. 203±226.
87. Delamuta, J.R.M., Ribeiro, R.A., Menna, P., Bangel, E.V., Hungria, M. (2012) Multilocus sequence analysis (MLSA) of Bradyrhizobium strains: revealing high diversity of tropical diazotrophic symbiotic bacteria. *Braz. J. Microbiol.* 43, 698–710
88. Dhar, R., Sägesser, R., Weikert, C., & Wagner, A. (2013). Yeast adapts to a changing stressful environment by evolving cross-protection and anticipatory gene regulation. *Molecular Biology and Evolution*, 30(3), 573–588. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss253>
89. diCenzo, G. C., Sharthiya, H., Nanda, A., Zamani, M., & Finan, T. M. (2017). PhoU allows rapid adaptation to high phosphate concentrations by modulating PstSCAB transport rate in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, 199(18), 1–20. <https://doi.org/10.1128/JB.00143-17>
90. Dixit, V. K., Misra, S., Mishra, S. K., Tewari, S. K., Joshi, N., & Chauhan, P. S. (2020). Characterization of plant growth-promoting alkalotolerant *Alcaligenes* and *Bacillus* strains for mitigating the alkaline stress in *Zea mays*. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 113(7), 889–905. <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01399-1>
91. Domínguez-Ferreras, A., Pérez-Arnedo, R., Becker, A., Olivares, J., Soto, M. J., & Sanjuán, J. (2006). Transcriptome profiling reveals the importance of plasmid pSymB for osmoadaptation of *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, 188(21), 7617–7625. <https://doi.org/10.1128/JB.00719-06>
92. Domínguez-Ferreras, A., Soto, M. J., Pérez-Arnedo, R., Olivares, J., & Sanjuán, J. (2009). Importance of trehalose biosynthesis for *Sinorhizobium meliloti* osmotolerance and nodulation of alfalfa roots. *Journal of Bacteriology*, 191(24), 7490–7499. <https://doi.org/10.1128/JB.00725-09>
93. Doncel, B., Capelesso, A., Giannitti, F., Cajarville, C., Macías-Rioseco, M., Silveira, C., Costa, R. A., & Riet-Correa, F. (2019). Hypomagnesemia in dairy cattle in Uruguay. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 39(8), 564–572. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-6215>
94. Dragosits, M., & Mattanovich, D. (2013). Adaptive laboratory evolution - principles and applications for biotechnology. *Microbial Cell Factories*, 12(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-64>
95. Dragosits, M., Mozhayskiy, V., Quinones-Soto, S., Park, J., & Tagkopoulos, I. (2013). Evolutionary potential, cross-stress behavior and the genetic basis of acquired stress resistance in *Escherichia coli*. *Molecular Systems Biology*, 9(643), 1–13. <https://doi.org/10.1038/msb.2012.76>
96. Dutta, J., & Thakur, D. (2017). Evaluation of multifarious plant growth promoting traits, antagonistic potential and phylogenetic affiliation of rhizobacteria associated with commercial tea plants grown in Darjeeling, India. *PLoS ONE*, 12(8), e0182302. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182302>

97. Egamberdieva, D., Berg, G., Lindström, K., & Räsänen, L. A. (2013). Alleviation of salt stress of symbiotic *Galega officinalis* L. (goat's rue) by co-inoculation of *Rhizobium* with root-colonizing *Pseudomonas*. *Plant and Soil*, 369(1–2), 453–465. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1586-3>
98. Emanuel, V., Adrian, V., & Diana, P. (2010). Microbial biofilm formation under the influence of various physical-chemical factors. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 24(3), 1993–1996.
99. Enebe, M. C., & Babalola, O. O. (2018). The influence of plant growth-promoting rhizobacteria in plant tolerance to abiotic stress: a survival strategy. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(18), 7821–7835. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9214-z>
100. Epstein, E., & Bloom, A. J. (2005). *Mineral nutrition of plants: principles and perspectives*, 2nd edn. Sinauer Assoc. Inc., Sunderland, UK, 2005.
101. Escaray, F. J. (2012). Taninos condensados en leguminosas del género *Lotus*: estudio de sus funciones biológicas y evaluación de su utilidad en el mejoramiento de la calidad forrajera de especies de importancia agronómica. 190. <https://doi.org/http://ri.agro.uba.ar/cgi-bin/library.cgi?a=d&c=tesis&d=2012escarayfrancisco>
102. Escaray, F. J., Menendez, A. B., Gárriz, A., Pieckenstein, F. L., Estrella, M. J., Castagno, L. N., ... & Ruiz, O. A. (2012). Ecological and agronomic importance of the plant genus *Lotus*. Its application in grassland sustainability and the amelioration of constrained and contaminated soils. *Plant science*, 182, 121–133.
103. Estrella, M. J., Muñoz, S., Soto, M. J., Ruiz, O., & Sanjuán, J. (2009). Genetic diversity and host range of rhizobia nodulating *Lotus tenuis* in typical soils of the Salado River Basin (Argentina). *Applied and Environmental Microbiology*, 75(4), 1088–1098. <https://doi.org/10.1128/AEM.02405-08>
104. Eynard, A., Lal, R., & Wiebe, K. (2005). Crop response in salt-affected soils. *Journal of Sustainable Agriculture*, 27(1), 5–50. https://doi.org/10.1300/J064v27n01_03
105. FADA (2015). *Carnes Argentinas, actualidad propuestas y futuro*. Recuperado de http://fundacionfada.weebly.com/uploads/9/8/5/0/9850131/carnes_argentinas_final.pdf
106. Fageria, N. K., & Moreira, A. (2011). The Role of Mineral Nutrition on Root Growth of Crop Plants. In *Advances in Agronomy* (1st ed., Vol. 110, Issue C). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385531-2.00004-9>
107. Fageria, N. K., Baligar, C., & Clark, R. B. (2002). Micronutrients in crop production. In *Advances in Agronomy* (Vol. 77). Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/s0065-2113\(02\)77015-6](https://doi.org/10.1016/s0065-2113(02)77015-6)
108. Fageria, N. K., Baligar, V. C., & Li, Y. C. (2008). The role of nutrient efficient plants in improving crop yields in the twenty first century. In *Journal of Plant Nutrition* (Vol. 31, Issue 6, pp. 1121–1157). Taylor & Francis Group. <https://doi.org/10.1080/01904160802116068>
109. Fageria, N. K., Gheyi, H. R., & Moreira, A. (2011). Nutrient bioavailability in salt affected soils. *Journal of Plant Nutrition*, 34(7), 945–962. <https://doi.org/10.1080/01904167.2011.555578>
110. FAO 2019. FAOSTAT- Cultivos. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>
111. Ferla, M. P., & Patrick, W. M. (2014). Bacterial methionine biosynthesis. *Microbiology (United Kingdom)*, 160(PART 8), 1571–1584. <https://doi.org/10.1099/mic.0.077826-0>
112. Fernandez-Aunián, C., Hamouda, T. Ben, Iglesias-Guerra, F., Argandña, M., Reina-Bueno, M., Nieto, J. J., Aouani, M. E., & Vargas, C. (2010). Biosynthesis of compatible solutes in rhizobial strains isolated from *Phaseolus vulgaris* nodules in Tunisian fields. *BMC Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-192>
113. Ferreira, C. M. H., Soares, H. M. V. M., & Soares, E. V. (2019). Promising bacterial genera for agricultural practices: An insight on plant growth-promoting properties and microbial safety aspects. *Science of the Total Environment*, 682, 779–799. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.225>
114. Figueredo, M. S., Tonelli, M. L., Taurian, T., Angelini, J., Ibañez, F., Valetti, L., Muñoz, V., Anzuay, M. S., Ludueña, L., & Fabra, A. (2014). Interrelationships between *Bacillus* sp. CHEP5 and *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 in the induced systemic resistance against *Sclerotium rolfsii* and symbiosis on peanut plants. *Journal of Biosciences*, 39(5), 877–885. <https://doi.org/10.1007/s12038-014-9470-8>

115. Fitzpatrick, R. W. (2002). Land degradation processes Groundwater geochemistry for mineral exploration View project Forensic Geology View project Land Degradation Processes. Retrieved May 18, 2021, from <https://www.researchgate.net/publication/228776735>
116. Flores-Félix, J. D., Carro, L., Velázquez, E., Valverde, Á., Cerda-Castillo, E., García-Fraile, P., & Rivas, R. (2013). *Phyllobacterium endophyticum* sp. nov., isolated from nodules of *Phaseolus vulgaris*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(PART3), 821–826. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.038497-0>
117. Fougere, F., & Le Rudulier, D. (1990). Uptake of glycine betaine and its analogues by bacteroids of *Rhizobium meliloti*. *Journal of General Microbiology*, 136(1), 157–163. <https://doi.org/10.1099/00221287-136-1-157>
118. Fridman, O., Goldberg, A., Ronin, I., Shoshani, N., & Balaban, N. Q. (2014). Optimization of lag time underlies antibiotic tolerance in evolved bacterial populations. *Nature*, 513(7518), 418–421. <https://doi.org/10.1038/nature13469>
119. Frossard, E., Condron, L. M., Oberson, A., Sinaj, S., & Fardeau, J. C. (2000). Processes Governing Phosphorus Availability in Temperate Soils. *Journal of Environmental Quality*, 29(1), 15–23. <https://doi.org/10.2134/jeq2000.00472425002900010003x>
120. Frossard, Emmanuel, Brossard, M., Hedley, M. J., & Metherell, A. (1995). Reactions Controlling the Cycling of P in Soils. *Phosphorus in the Global Environment: Transfers, Cycles, and Management*, 54, 107–138.
121. Fujihara, S., & Yoneyama, T. (1993). Effects of pH and Osmotic Stress on Cellular Polyamine Contents in the Soybean Rhizobia *Rhizobium fredii* P220 and *Bradyrhizobium japonicum* A1017. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(4).
122. Fujishige, N. A., Kapadia, N. N., De Hoff, P. L., & Hirsch, A. M. (2006). Investigations of *Rhizobium* biofilm formation. *FEMS Microbiology Ecology*, 56(2), 195–206. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2005.00044.x>
123. Fujishige, N. A., Lum, M. R., De Hoff, P. L., Whitelegge, J. P., Faull, K. F., & Hirsch, A. M. (2008). *Rhizobium* common nod genes are required for biofilm formation. *Molecular Microbiology*, 67(3), 504–515. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06064.x>
124. Fulchieri, M. M., Estrella, M. J., & Iglesias, A. A. (2001). Characterization of *Rhizobium loti* strains from the Salado River Basin. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 79(2), 119–125. <https://doi.org/10.1023/A:1010221208619>
125. Gage, D. J. (2004). Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(2), 280–300. <https://doi.org/10.1128/mubr.68.2.280-300.2004>
126. Galinier, A., & Deutscher, J. (2017). Sophisticated Regulation of Transcriptional Factors by the Bacterial Phosphoenolpyruvate: Sugar Phosphotransferase System. In *Journal of Molecular Biology* (Vol. 429, Issue 6, pp. 773–789). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.02.006>
127. Galloway, J. N., Dentener, F. J., Capone, D. G., Boyer, E. W., Howarth, R. W., Seitzinger, S. P., ... & Vöosmarty, C. J. (2004). Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry*, 70(2), 153–226.
128. Galloway, J. N., Winiwarter, W., Leip, A., Leach, A. M., Bleeker, A., & Erismann, J. W. (2014). Nitrogen footprints: Past, present and future. *Environmental Research Letters*, 9(11). <https://doi.org/10.1088/1748-9326/9/11/115003>
129. García-Salamanca, A., Molina-Henares, M. A., van Dillewijn, P., Solano, J., Pizarro-Tobías, P., Roca, A., Duque, E., & Ramos, J. L. (2013). Bacterial diversity in the rhizosphere of maize and the surrounding carbonate-rich bulk soil. *Microbial Biotechnology*, 6(1), 36–44. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2012.00358.x>
130. Garg, N., & Geetanjali. (2009). Symbiotic nitrogen fixation in legume nodules: Process and signaling: A review. In *Sustainable Agriculture* (Vol. 27, pp. 519–531). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-90-481-2666-8_32
131. Garrido-Sanz, D., Arrebola, E., Martínez-Granero, F., García-Méndez, S., Muriel, C., Blanco-Romero, E., Martín, M., Rivilla, R., & Redondo-Nieto, M. (2017). Classification of isolates from the

- Pseudomonas fluorescens* complex into phylogenomic groups based in group-specific markers. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAR), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00413>
132. Geiger, O., Röhrs, V., Weissenmayer, B., Finan, T. M., & Thomas-Oates, J. E. (1999). The regulator gene *phoB* mediates phosphate stress-controlled synthesis of the membrane lipid diacylglyceryl-N,N,N-trimethylhomoserine in *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*. *Molecular Microbiology*, 32(1), 63–73. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01325.x>
 133. Giaever, H. M., Styrvold, O. B., Kaasen, I., & Strøm, A. R. (1988). Biochemical and genetic characterization of osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 170(6), 2841–2849. <https://doi.org/10.1128/jb.170.6.2841-2849.1988>
 134. Glaeser, S. P., & Kämpfer, P. (2015). Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. *Systematic and Applied Microbiology*, 38(4), 237–245. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.03.007>
 135. Glick, B R, Patten, C. L., Holguin, G., & Penrose, D. M. (2011). Biochemical and Genetic Mechanisms used by Plant Growth Promoting Bacteria. *Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria*. <https://doi.org/10.1142/9781848160521>
 136. Glick, Bernard R. (2015). Beneficial plant-bacterial interactions. *Beneficial Plant-Bacterial Interactions*, 1–243. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-13921-0>
 137. Gloux, K., & Le Rudulier, D. (1989). Transport and catabolism of proline betaine in salt-stressed *Rhizobium meliloti*. *Archives of Microbiology*, 151(2), 143–148. <https://doi.org/10.1007/BF00414429>
 138. Goldstein, A. H. (1995). Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by gram negative bacteria. *Biological Agriculture and Horticulture*, 12(2), 185–193. <https://doi.org/10.1080/01448765.1995.9754736>
 139. Goldstein, A. H., & Liu, S. T. (1987). Molecular cloning and regulation of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola*. *Bio/Technology*, 5(1), 72–74. <https://doi.org/10.1038/nbt0187-72>
 140. Gonzalez-Gonzalez, R., Botsford, J. L., & Lewis, T. (1990). Osmoregulation in *Rhizobium meliloti*: Characterization of enzymes involved in glutamate synthesis. *Canadian Journal of Microbiology*, 36(7), 469–474. <https://doi.org/10.1139/m90-082>
 141. Gordon, S. A., & Weber, R. P. (1951). Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant physiology*, 26(1), 192. <https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12859-016-1016-7>
 142. Gouffi, K., Pica, N., Pichereau, V., & Blanco, C. (1999). Disaccharides as a new class of nonaccumulated osmoprotectants for *Sinorhizobium meliloti*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(4), 1491–1500. <https://doi.org/10.1128/aem.65.4.1491-1500.1999>
 143. Goulart, C. L., Barbosa, L. C., Bisch, P. M., & von Krüger, W. M. A. (2016). Catalases and PhoB/PhoR system independently contribute to oxidative stress resistance in *Vibrio cholerae* O1. *Microbiology (United Kingdom)*, 162(11), 1955–1962. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000364>
 144. Gourion, B., Francez-Charlot, A., & Vorholt, J. A. (2008). PhyR is involved in the general stress response of *Methylobacterium extorquens* AM1. *Journal of Bacteriology*, 190(3), 1027–1035. <https://doi.org/10.1128/JB.01483-07>
 145. Gourion, B., Sulser, S., Frunzke, J., Francez-Charlot, A., Stiefel, P., Pessi, G., Vorholt, J. A., & Fischer, H. M. (2009). The PhyR-σEcfG signalling cascade is involved in stress response and symbiotic efficiency in *Bradyrhizobium japonicum*. *Molecular Microbiology*, 73(2), 291–305. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06769.x>
 146. Grattan, S. R., & Grieve, C. M. (1998). Salinity-mineral nutrient relations in horticultural crops. *Scientia Horticulturae*, 78(1–4), 127–157. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(98\)00192-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(98)00192-7)
 147. Grattan, S.R., Grieve, C.M., 1994. Mineral nutrient acquisition and response by plants grown in
 148. Gray, D. A., Dugar, G., Gamba, P., Strahl, H., Jonker, M. J., & Hamoen, L. W. (2019). Extreme slow growth as alternative strategy to survive deep starvation in bacteria. *Nature Communications*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08719-8>
 149. Green, J., & Paget, M. S. (2004). Bacterial redox sensors. *Nature Reviews Microbiology*, 2(12), 954–966.

150. Guñazú, L. B., Andrés, J. A., Papa, M. F. Del, Pistorio, M., & Rosas, S. B. (2010). Response of alfalfa (*Medicago sativa* L.) to single and mixed inoculation with phosphate-solubilizing bacteria and *Sinorhizobium meliloti*. *Biology and Fertility of Soils*, 46(2), 185–190. <https://doi.org/10.1007/s00374-009-0408-5>
151. Gulati, R. (2018). Legume symbiosis under abiotic stresses-a review. *Mol Physiol Abiotic Stress Plant Prod*, 186.
152. Gupta, G., Parihar, S. S., Ahirwar, N. K., Snehi, S. K., & Singh, V. (2015). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture. *J Microb Biochem Technol*, 7(2), 096-102.
153. Gutiérrez-Barranquero, J. A., Cazorla, F. M., Torés, J. A., & De Vicente, A. (2019). *Pantoea agglomerans* as a new etiological agent of a bacterial necrotic disease of mango trees. *Phytopathology*, 109(1), 17–26. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-18-0186-R>
154. Haag, A. F., Arnold, M. F. F., Myka, K. K., Kerscher, B., Dall'Angelo, S., Zanda, M., Mergaert, P., & Ferguson, G. P. (2012). Molecular insights into bacteroid development during *Rhizobium*-legume symbiosis. *FEMS Microbiology Reviews*, 37, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.2012.12003>
155. Hamid, A., & Ahmad, L. (2012). Soil phosphorus fixation chemistry and role of phosphate solubilizing bacteria in enhancing its efficiency for sustainable cropping-A review. *J Pure Appl Microbiol*, 66, 1905-1911.
156. Han, Y., Zhou, D., Pang, X., Zhang, L., Song, Y., Tong, Z., ... & Zhai, J. (2005). Comparative transcriptome analysis of *Yersinia pestis* in response to hyperosmotic and high-salinity stress. *Research in microbiology*, 156(3), 403-415.
157. Hartman, K., van der Heijden, M. G. A., Roussely-Provent, V., Walser, J. C., & Schlaeppli, K. (2017). Deciphering composition and function of the root microbiome of a legume plant. *Microbiome*, 5(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0220-z>
158. Hawker JS (1985) Sucrose. In PM Dey, RA Dixon, eds *Biochemistry of storage carbohydrates in green plants*. Academic Press, London, pp 1-48
159. Helene, L.C.F., Dall'Agnol, R.F., Delamuta, J.R.M., Hungria, M. (2019) *Mesorhizobium atlanticum* sp. nov., a new nitrogen-fixing species from soils of the Brazilian Atlantic Forest biome. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 69, 1800–1806.
160. Helene, L.C.F., Delamuta, J.R.M., Ribeiro, R.A., Ormeno-Orrillo, E., Rogel, M.A., Martínez-Romero, E., Hungria, M. (2015) *Bradyrhizobium viridifuturi* sp. nov., encompassing nitrogen-fixing symbionts of legumes used for green manure and environmental services. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 4441–4448.
161. Helene, L.C.F., Delamuta, J.R.M., Ribeiro, R.A., Hungria, M. (2017) *Bradyrhizobium mercantei* sp. nov., a nitrogen-fixing symbiont isolated from nodules of *Deguelia costata* (syn. *Lonchocarpus costatus*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67, 1827–1834.
162. Herigstad, B., Hamilton, M., & Heersink, J. (2001). How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 44(2), 121–129. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00241-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00241-4)
163. Herrera-Estrella, L., & López-Arredondo, D. (2016). Phosphorus: The Underrated Element for Feeding the World. *Trends in Plant Science*, 21(6), 461–463. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.04.010>
164. Herrera-Cervera, J. A., Caballero-Mellado, J., Laguerre, G., Tichy, H. V., Requena, N., Amarger, N., ... & Sanjuan, J. (1999). At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 30(1), 87-97.
165. Herridge DF, Peoples MB, Boddey RM (2008) Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant Soil* 311:1–18

166. Hindupur, A., Liu, D., Zhao, Y., Bellamy, H. D., White, M. A., & Fox, R. O. (2006). The crystal structure of the *E. coli* stress protein YciF. *Protein Science*, 15(11), 2605–2611. <https://doi.org/10.1110/ps.062307706>
167. Hoch, J. A. (2000). Two-component and phosphorelay signal transduction. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 3, Issue 2, pp. 165–170). Current Biology Ltd. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00070-9](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00070-9)
168. Horcajo, P., De Pedro, M. A., & Cava, F. (2012). Peptidoglycan plasticity in bacteria: Stress-induced peptidoglycan editing by noncanonical D-amino acids. In *Microbial Drug Resistance* (Vol. 18, Issue 3, pp. 306–313). Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA. <https://doi.org/10.1089/mdr.2012.0009>
169. Hosie, A. H. F., & Poole, P. S. (2001). Bacterial ABC transporters of amino acids. *Research in Microbiology*, 152(3–4), 259–270. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(01\)01197-4](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01197-4)
170. Hotelier, T., Renault, L., Cousin, X., Negre, V., Marchot, P., & Chatonnet, A. (2004). ESTHER, the database of the α/β -hydrolase fold superfamily of proteins. *Nucleic Acids Research*, 32(DATABASE ISS.), 145–147. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh141>
171. Hu, Y., Hu, Q., Wei, R., Li, R., Zhao, D., Ge, M., Yao, Q., & Yu, X. (2019). The XRE family transcriptional regulator SrtR in *Streptococcus suis* is involved in oxidant tolerance and virulence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9(JAN), 452. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00452>
172. Huang, Y. H., Hilal, T., Loll, B., Bürger, J., Mielke, T., Böttcher, C., Said, N., & Wahl, M. C. (2020). Structure-Based mechanisms of a molecular RNA polymerase/Chaperone machine required for ribosome biosynthesis. *Molecular Cell*, 79(6), 1024–1036.
173. Huber, D. M., & Jones, J. B. (2013). The role of magnesium in plant disease. *Plant and Soil*, 368(1–2), 73–85. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1476-0>
174. Imlay, J. A. (2003). Pathways of Oxidative Damage. *Annual Review of Microbiology*, 57, 395–418. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090938>
175. INTA – SENASA (2015). Caracterización de la Producción Bovina, https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_caracterizacion_de_la_produccion_bovina.pdf
176. Ito, M., Morino, M., & Krulwich, T. A. (2017). Mrp antiporters have important roles in diverse bacteria and archaea. *Frontiers in Microbiology*, 8(NOV), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02325>
177. Jain, R., & Pandey, A. (2016). A phenazine-1-carboxylic acid producing polyextremophilic *Pseudomonas chlororaphis* (MCC2693) strain, isolated from mountain ecosystem, possesses biocontrol and plant growth promotion abilities. *Microbiological Research*, 190, 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.04.017>
178. Janczarek, M., & Skorupska, A. (2001). The *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii pssB gene product is an inositol monophosphatase that influences exopolysaccharide synthesis. *Archives of Microbiology*, 175(2), 143–151. <https://doi.org/10.1007/s002030000250>
179. Jarvis, B. D. W., Pankhurst, C. E., & Patel, J. J. (1982). *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 32(3), 378–380. <https://doi.org/10.1099/00207713-32-3-378>
180. Jawahar, G., Rajashekar, G., Maheshwari, P., Punita, D. L., Jalaja, N., Kumari, P. H., Kumar, S. A., Afreen, R., Karumanchi, A. R., Rathnagiri, P., Sreenivasulu, N., & Kishor, P. B. K. (2019). Osmolyte diversity, distribution, and their biosynthetic pathways. In *Plant Signaling Molecules: Role and Regulation under Stressful Environments* (pp. 449–458). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816451-8.00028-9>
181. Jiang, J. Q., Wei, W., Du, B. H., Li, X. H., Wang, L., & Yang, S. S. (2004). Salt-tolerance genes involved in cation efflux and osmoregulation of *Sinorhizobium fredii* RT19 detected by isolation and characterization of Tn5 mutants. *FEMS Microbiology Letters*, 239(1), 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.08.029>

182. Johnson, B. K., Scholz, M. B., Teal, T. K., & Abramovitch, R. B. (2016). SPARTA: Simple Program for Automated reference-based bacterial RNA-seq Transcriptome Analysis. *BMC Bioinformatics*, 17(1), 4–7. <https://doi.org/10.1186/s12859-016-0923-y>
183. 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 Bacteriology*, 32(1), 136–139. <https://doi.org/10.1099/00207713-32-1-136>
184. Kaasen, I., Falkenberg, P., Styrvold, O. B., & Strom, A. R. (1992). Molecular cloning and physical mapping of the otsBA genes, which encode the osmoregulatory trehalose pathway of *Escherichia coli*: Evidence that transcription is activated by KatF (AppR). *Journal of Bacteriology*, 174(3), 889–898. <https://doi.org/10.1128/jb.174.3.889-898.1992>
185. Kajić, S., Hulak, N., & Sikora, S. (2016). Environmental stress response and adaptation mechanisms in Rhizobia. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 81(1), 15–19.
186. Kämpfer, P. (2007). Taxonomy of phosphate solubilizing bacteria. First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization, 101–106. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5765-6_13
187. Kamran, S., Shahid, I., Baig, D. N., Rizwan, M., Malik, K. A., & Mehnaz, S. (2017). Contribution of zinc solubilizing bacteria in growth promotion and zinc content of wheat. *Frontiers in Microbiology*, 8(DEC). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02593>
188. Karmakar, K., Rana, A., Rajwar, A., Sahgal, M., & Johri, B. N. (2015). Legume-rhizobia symbiosis under stress. In *Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets* (pp. 241–258). Springer India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2068-8_12
189. Karniol, B., & Vierstra, R. D. (2004). The HWE Histidine Kinases, a New Family of Bacterial Two-Component Sensor Kinases with Potentially Diverse Roles in Environmental Signaling. *Journal of Bacteriology*, 186(2), 445–453. <https://doi.org/10.1128/JB.186.2.445-453.2004>
190. Khaitov, B., Kurbonov, A., Abdiev, A., & Adilov, M. (2016). Effect of chickpea in association with *Rhizobium* to crop productivity and soil fertility. *Eurasian Journal of Soil Science (Ejss)*, 5(2), 105. <https://doi.org/10.18393/ejss.2016.2.105-112>
191. Khan, A. A., Jilani, G., Akhtar, M. S., Saqlan, S. M., & Rasheed, M. (2009). Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms and their Role in Crop Production. *Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 1(1), 48–58.
192. Khan, M. S., Zaidi, A., & Musarrat, J. (2014). Phosphate solubilizing microorganisms: Principles and application of microphos technology. In *Phosphate Solubilizing Microorganisms: Principles and Application of Microphos Technology*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-08216-5>
193. Kim, E. J., Oh, E. K., & Lee, J. K. (2015). Role of HemF and HemN in the heme biosynthesis of *Vibrio vulnificus* under S-adenosylmethionine-limiting conditions. *Molecular Microbiology*, 96(3), 497–512. <https://doi.org/10.1111/mmi.12951>
194. Kim, K. Y., McDonald, G. A., & Jordan, D. (1997). Solubilization of hydroxyapatite by *Enterobacter agglomerans* and cloned *Escherichia coli* in culture medium. *Biology and Fertility of Soils*, 24(4), 347–352. <https://doi.org/10.1007/s003740050256>
195. Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.
196. Kobayashi, M., & Shimizu, S. (1999). Cobalt proteins. *European Journal of Biochemistry*, 261(1), 1–9. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00186.x>
197. Kohler, P. R. A., Zheng, J. Y., Schoffers, E., & Rossbach, S. (2010). Inositol catabolism, a key pathway in *Sinorhizobium meliloti* for competitive host nodulation. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(24), 7972–7980. <https://doi.org/10.1128/AEM.01972-10>
198. Krapp, A. (2015). Plant nitrogen assimilation and its regulation: A complex puzzle with missing pieces. *Current Opinion in Plant Biology*, 25, 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.05.010>
199. Krol, E., & Becker, A. (2004). Global transcriptional analysis of the phosphate starvation response in *Sinorhizobium meliloti* strains 1021 and 2011. *Molecular Genetics and Genomics*, 272(1), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s00438-004-1030-8>

200. Krulwich, T. A., Sachs, G., & Padan, E. (2011). Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 9, Issue 5, pp. 330–343). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2549>
201. Kühn, A., Yu, S., & Giffhorn, F. (2006). Catabolism 1,5-anhydro-D-fructose in *Sinorhizobium morelense* S-30.7.5: Discovery, characterization, and overexpression of a new 1,5-anhydro-D-fructose reductase and its application in sugar analysis and rare sugar synthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(2), 1248–1257. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1248-1257.2006>
202. Kumar S., Stecher G., and Tamura K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874.
203. Kushwaha, P., Kashyap, P. L., Bhardwaj, A. K., Kuppusamy, P., Srivastava, A. K., & Tiwari, R. K. (2020). Bacterial endophyte mediated plant tolerance to salinity: growth responses and mechanisms of action. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(2), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-2804-9>
204. Lambers, H., & Oliveira, R. S. (2019). Mineral Nutrition. In *Plant Physiological Ecology* (pp. 301–384). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-29639-1_9
205. Langille, M. G. I., Hsiao, W. W. L., & Brinkman, F. S. L. (2008). Evaluation of genomic island predictors using a comparative genomics approach. *BMC Bioinformatics*, 9, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-329>
206. Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9(4), 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
207. Laouane, R. B., Meddich, A., Bechtaoui, N., Oufdou, K., & Wahbi, S. (2019). Effects of arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia symbiosis on the tolerance of *Medicago sativa* to salt stress. *Gesunde Pflanzen*, 71(2), 135-146.
208. Laranjo, M., & Oliveira, S. (2011). Tolerance of Mesorhizobium type strains to different environmental stresses. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 99(3), 651–662. <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9539-9>
209. Lavado, R. S., Taboada, M. A., & Aires, B. (1988). Water salt and sodium dynamics in a natraquoll in Argentina. 15, 577–594.
210. Lavado, R. S., & Taboada, M. A. (2009). The Argentinean Pampas: A key region with a negative nutrient balance and soil degradation needs better nutrient management and conservation programs to sustain its future viability as a world agrosresource. *Journal of Soil and Water Conservation*, 64(5), 150–153. <https://doi.org/10.2489/jswc.64.5.150A>
211. Lebrazi, S., & Benbrahim, K. F. (2014). Environmental stress conditions affecting the N₂ fixing *Rhizobium*-legume symbiosis and adaptation mechanisms. *African Journal of Microbiology Research*, 8(53), 4053–4061. <https://doi.org/10.5897/AJMR2014.7213>
212. Lei, X., En, ., Wang, T., Feng, W., Xin, C. ., Sui, H., & Chen, W. X. (2008). Diverse bacteria isolated from root nodules of wild Vicia species grown in temperate region of China. *Arch Microbiol*, 190, 657–671. <https://doi.org/10.1007/s00203-008-0418-y>
213. Lemire, J., Alhasawi, A., Appanna, V. P., Tharmalingam, S., & Appanna, V. D. (2017). Metabolic defence against oxidative stress: the road less travelled so far. In *Journal of Applied Microbiology* (Vol. 123, Issue 4, pp. 798–809). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/jam.13509>
214. León, R. J. C., Rusch, G. M., & Oesterheld, M. (1984). Pastizales pampeanos - impacto agropecuario. *Phytocoenologia*, 12(2–3), 201–218. <https://doi.org/10.1127/phyto/12/1984/201>
215. León-Barrios, M., Pérez-Yépez, J., Dorta, P., Garrido, A., & Jiménez, C. (2017). Alkalinity of Lanzarote soils is a factor shaping rhizobial populations with *Sinorhizobium meliloti* being the predominant microsymbiont of *Lotus lancerottensis*. *Systematic and Applied Microbiology*, 40(3), 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2016.12.005>
216. Lerner, A., Castro-Sowinski, S., Lerner, H., Okon, Y., & Burdman, S. (2009). Glycogen phosphorylase is involved in stress endurance and biofilm formation in *Azospirillum brasilense* Sp7. *FEMS Microbiology Letters*, 300(1), 75–82. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01773.x>

217. Li, B., Qiu, Y., Shi, H., & Yin, H. (2016). The importance of lag time extension in determining bacterial resistance to antibiotics. *Analyst*, 141(10), 3059–3067. <https://doi.org/10.1039/c5an02649k>
218. Li, J., Qiao, Z., Shi, M., Zhang, Y., & Wang, G. (2019). Regulation of antimonite oxidation and resistance by the phosphate regulator PhoB in *Agrobacterium tumefaciens* GW4. *Microbiological Research*, 226, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.04.008>
219. Lipa, P., & Janczarek, M. (2020). Phosphorylation systems in symbiotic nitrogen-fixing bacteria and their role in bacterial adaptation to various environmental stresses. *PeerJ*, 8, e8466. <https://doi.org/10.7717/peerj.8466>
220. Lippi, D., De Paolis, M. R., Di Mattia, E., Grego, S., Pietrosanti, T., & Cacciari, I. (2000). Effect of salinity on growth and starvation-survival of a tropical *Rhizobium* strain. *Biology and Fertility of Soils*, 30(4), 276–283. <https://doi.org/10.1007/s003740050003>
221. Liu, A., Contador, C. A., Fan, K., & Lam, H. M. (2018). Interaction and regulation of carbon, nitrogen, and phosphorus metabolisms in root nodules of legumes. *Frontiers in Plant Science*, 871(December), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01860>
222. López-Gómez, M., Hidalgo-Castellanos, J., Iribarne, C., & Lluch, C. (2014). Proline accumulation has prevalence over polyamines in nodules of *Medicago sativa* in symbiosis with *Sinorhizobium meliloti* during the initial response to salinity. *Plant and Soil*, 374(1–2), 149–159. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1871-1>
223. Lu, L., Chang, M., Han, X., Wang, Q., Wang, J., Yang, H., Guan, Q., & Dai, S. (2021). Beneficial effects of endophytic *Pantoea ananatis* with ability to promote rice growth under saline stress. *Journal of Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/jam.15082>
224. Maâtallah, J., Berraho, E. B., Muñoz, S., Sanjuan, J., & Lluch, C. (2002). Phenotypic and molecular characterization of chickpea rhizobia isolated from different areas of Morocco. *Journal of Applied Microbiology*, 93(4), 531–540. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01718.x>
225. Macheboeuf, P., Contreras-Martel, C., Job, V., Dideberg, O., & Dessen, A. (2006). Penicillin binding proteins: Key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 30, Issue 5, pp. 673–691). Oxford Academic. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00024.x>
226. MacLean, A. M., Finan, T. M., & Sadowsky, M. J. (2007). Genomes of the symbiotic nitrogen-fixing bacteria of legumes. *Plant Physiology*, 144(2), 615–622. <https://doi.org/10.1104/pp.107.101634>
227. Madsen, E. B., Madsen, L. H., Radutoiu, S., Olbryt, M., Rakwalska, M., Szczyglowski, K., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N., & Stougaard, J. (2004). A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Chemtracts*, 17(9), 508–514.
228. Maestro, B., & Sanz, J. M. (2017). Polyhydroxyalkanoate-associated phasins as phylogenetically heterogeneous, multipurpose proteins. In *Microbial Biotechnology* (Vol. 10, Issue 6, pp. 1323–1337). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12718>
229. MAGYP (2020). Monitor de estimaciones agrícolas. <https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/estimaciones/monitor/index.php>
230. Manchanda, G., & Garg, N. (2007). Endomycorrhizal and rhizobial symbiosis: How much do they share?. *Journal of Plant Interactions*, 2(2), 79–88.
231. Mantelin, S., Fischer-Le Saux, M., Zakhia, F., Béna, G., Bonneau, S., Jeder, H., de Lajudie, P., & Cleyet-Marel, J. C. (2006). Emended description of the genus *Phyllobacterium* and description of four novel species associated with plant roots: *Phyllobacterium bourgognense* sp. nov., *Phyllobacterium ifriqiense* sp. nov., *Phyllobacterium leguminum* sp. nov. and *Phyllobacterium brassic*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(4), 827–839. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63911-0>
232. Manuel-Navarrete, D., Gallopín, G. C., Blanco, M., Díaz-Zorita, M., Ferraro, D. O., Herzer, H., Laterra, P., Murmis, M. R., Podestá, G. P., Rabinovich, J., Satorre, E. H., Torres, F., & Viglizzo, E. F. (2009). Multi-causal and integrated assessment of sustainability: The case of agriculturization in the Argentine Pampas. *Environment, Development and Sustainability*, 11(3), 621–638. <https://doi.org/10.1007/s10668-007-9133-0>

233. Marschner, P., Yang, C. H., Lieberei, R., & Crowley, D. E. (2001). Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(11), 1437–1445. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(01\)00052-9](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00052-9)
234. Martens, M., Dawyndt, P., Coopman, R., Gillis, M., De Vos, P., & Willems, A. (2008). Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: A case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(1), 200–214. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65392-0>
235. Martínez-Romero, E., & Caballero-Mellado, J. (1996). *Rhizobium* Phylogenies and Bacterial Genetic Diversity. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 15(2), 113–140. <https://doi.org/10.1080/07352689.1996.10393183>
236. Martínez-Salazar, J. M., Salazar, E., Encarnación, S., Ramírez-Romero, M. A., & Rivera, J. (2009). Role of the extracytoplasmic function sigma factor RpoE4 in oxidative and osmotic stress responses in *Rhizobium etli*. *Journal of Bacteriology*, 191(13), 4122–4132. <https://doi.org/10.1128/JB.01626-08>
237. Matsuhisa, A., Suzuki, N., Noda, T., & Shiba, K. (1995). Inositol monophosphatase activity from the *Escherichia coli* *subB* gene product. *Journal of Bacteriology*, 177(1), 200–205. <https://doi.org/10.1128/jb.177.1.200-205.1995>
238. Maynaud, G., Willems, A., Soussou, S., Vidal, C., Mauré, L., Moulin, L., & Brunel, B. (2012). Molecular and phenotypic characterization of strains nodulating *Anthyllis vulneraria* in mine tailings, and proposal of *Aminobacter anthyllidis* sp. nov., the first definition of *Aminobacter* as legume-nodulating bacteria. *Systematic and applied microbiology*, 35(2), 65–72.
239. McInnes, A., Thies, J. E., Abbott, L. K., & Howieson, J. G. (2004). Structure and diversity among rhizobial strains, populations and communities - A review. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(8), 1295–1308. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.04.011>
240. Meena, K. K., Sorty, A. M., Bitla, U. M., Choudhary, K., Gupta, P., Pareek, A., Singh, D. P., Prabha, R., Sahu, P. K., Gupta, V. K., Singh, H. B., Krishanani, K. K., & Minhas, P. S. (2017). Abiotic stress responses and microbe-mediated mitigation in plants: The omics strategies. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 8, p. 172). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00172>
241. Meinel, T., Mechulam, Y., & Blanquet, S. (1993). Methionine as translation start signal: A review of the enzymes of the pathway in *Escherichia coli*. *Biochimie*, 75(12), 1061–1075. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(93\)90005-D](https://doi.org/10.1016/0300-9084(93)90005-D)
242. Menna, P., Pereira, A. A., Bangel, E. V., & Hungria, M. (2009). Rep-PCR of tropical rhizobia for strain fingerprinting, biodiversity appraisal and as a taxonomic and phylogenetic tool. *Symbiosis*, 48(1–3), 120–130. <https://doi.org/10.1007/BF03179991>
243. Mergaert, J., Cnockaert, M. C., & Swings, J. (2002). *Phyllobacterium myrsinacearum* (subjective synonym *Phyllobacterium rubiacearum*) emend. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(5), 1821–1823. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-5-1821>
244. Mezzina, M. P., & Pettinari, M. J. (2016). Phasins, multifaceted polyhydroxyalkanoate granule-associated proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(17), 5060–5067. <https://doi.org/10.1128/AEM.01161-16>
245. Miles, A. A., Misra, S. S., & Irwin, J. O. (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *Journal of Hygiene*, 38(6), 732–749. <https://doi.org/10.1017/S002217240001158X>
246. Miller-Williams, M., Loewen, P. C., & Oresnik, I. J. (2006). Isolation of salt-sensitive mutants of *Sinorhizobium meliloti* strain Rm1021. *Microbiology*, 152(7), 2049–2059. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28937-0>
247. Moore, S. J., & Warren, M. J. (2012). The anaerobic biosynthesis of vitamin B12. *Biochemical Society Transactions*, 40(3), 581–586. <https://doi.org/10.1042/BST20120066>
248. Moreau, D., Bardgett, R. D., Finlay, R. D., Jones, D. L., & Philippot, L. (2019). A plant perspective on nitrogen cycling in the rhizosphere. In *Functional Ecology* (Vol. 33, Issue 4, pp. 540–552). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13303>

249. Morel, M., Braña, V., Castro-Sowinski, S. (2012) Legume Crops, Importance and Use of Bacterial Inoculation to Increase Production
250. Morino, M., Natsui, S., Swartz, T. H., Krulwich, T. A., & Ito, M. (2008). Single gene deletions of *mrpA* to *mrpG* and *mrpE* point mutations affect activity of the Mrp Na⁺/H⁺ antiporter of alkaliphilic *Bacillus* and formation of hetero-oligomeric Mrp complexes. *Journal of Bacteriology*, 190(12), 4162–4172. <https://doi.org/10.1128/JB.00294-08>
251. Morino, M., Ogođa, S., Krulwich, T. A., & Ito, M. (2017). Differences in the phenotypic effects of mutations in homologous MrpA and MrpD subunits of the multi-subunit Mrp-type Na⁺/H⁺ antiporter. *Extremophiles*, 21(1), 51–64. <https://doi.org/10.1007/s00792-016-0877-z>
252. Morino, M., Suzuki, T., Ito, M., & Krulwich, T. A. (2014). Purification and functional reconstitution of a Seven-Subunit Mrp- Type Na⁺/H⁺ Antiporter. *Journal of Bacteriology*, 196(1), 28–35. <https://doi.org/10.1128/JB.01029-13>
253. Moussaid, S., Domínguez-Ferreras, A., Muñoz, S., Aurag, J., Berraho, E. B., & Sanjuán, J. (2015). Increased trehalose biosynthesis improves *Mesorhizobium ciceri* growth and symbiosis establishment in saline conditions. *Symbiosis*, 67(1–3), 103–111. <https://doi.org/10.1007/s13199-015-0338-y>
254. Muresu, R., Polone, E., Sulas, L., Baldan, B., Tondello, A., Delogu, G., Cappuccinelli, P., Alberghini, S., Benhizia, Y., Benhizia, H., Benguedouar, A., Mori, B., Calamassi, R., Dazzo, F. B., & Squartini, A. (2008). Coexistence of predominantly nonculturable rhizobia with diverse, endophytic bacterial taxa within nodules of wild legumes. *FEMS Microbiology Ecology*, 63(3), 383–400. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00424.x>
255. Murphy, J. A. M. E. S., & Riley, J. P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica chimica acta*, 27, 31–36.
256. Murray, S. A. (2011). Murray_2011.pdf. In *Mol. Biol. Evol.* (Vol. 28, pp. 1173–1182).
257. Mylona, P., Pawlowski, K., & Bisseling, T. (1995). Symbiotic nitrogen fixation. In *Plant Cell* (Vol. 7, Issue 7, pp. 869–885). American Society of Plant Physiologists. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.7.869>
258. Nabti, E., Sahnoune, M., Ghoul, M., Fischer, D., Hofmann, A., Rothballer, M., Schmid, M., & Hartmann, A. (2010). Restoration of Growth of Durum Wheat (*Triticum durum* var. waha) Under Saline Conditions Due to Inoculation with the Rhizosphere Bacterium *Azospirillum brasilense* NH and Extracts of the Marine Alga *Ulva lactuca*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 29(1), 6–22. <https://doi.org/10.1007/s00344-009-9107-6>
259. Nagar, S. D., Aggarwal, B., Joon, S., Bhatnagar, R., & Bhatnagar, S. (2016). A Network Biology Approach to Decipher Stress Response in Bacteria Using *Escherichia coli* As a Model. *OMICS A Journal of Integrative Biology*, 20(5), 310–324. <https://doi.org/10.1089/omi.2016.0028>
260. Naik, P. R., Raman, G., Narayanan, K. B., & Sakthivel, N. (2008). Assessment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing fluorescent pseudomonads isolated from rhizospheric soil. *BMC Microbiology*, 8, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-230>
261. Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS microbiology Letters*. 170(1). 265–270.
262. Newton, A., & Ohta, N. (1990). REGULATION OF THE CELL DIVISION CYCLE AND DIFFERENTIATION IN BACTERIA. In *Annu. Rev. Microbiol* (Vol. 44). www.annualreviews.org
263. Newton, W. E. (2007). Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology of Nitrogen Fixation. *Biology of the Nitrogen Cycle*, 109–129. <https://doi.org/10.1016/B978-044452857-5.50009-6>
264. Nilsson, J. F., Castellani, L. G., Draghi, W. O., Pérez-Giménez, J., Torres Tejerizo, G. A., & Pistorio, M. (2019). Proteomic Analysis of *Rhizobium favelukesii* LPU83 in Response to Acid Stress. *Journal of Proteome Research*, 18(10), 3615–3629. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00275>
265. Nogales, J., Campos, R., BenAbdelkhalik, H., Olivares, J., Lluch, C., & Sanjuan, J. (2002). *Rhizobium tropici* genes involved in free-living salt tolerance are required for the establishment of efficient nitrogen-fixing symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(3), 225–232. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.3.225>

266. Nyström, T., & Neidhardt, F. C. (1994). Expression and role of the universal stress protein, UspA, of *Escherichia coli* during growth arrest. *Molecular Microbiology*, 11(3), 537–544. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb00334.x>
267. Odee, D. W., Sutherland, J. M., Makatiani, E. T., McInroy, S. G., & Sprent, J. I. (1997). Odee 1997 rhizobia woody legumes kenya (trap host □ dual occupancy □ slow-fast □ host specificity).pdf. 65–75.
268. Ogle, D., & Loren, J. St. (2010). Plants for saline to sodic soil conditions. USDA- Natural Resources Conservation Service, February, 1–10.
269. OKAMURA-IKEDA, K., OHMURA, Y., FUJIWARA, K., & MOTOKAWA, Y. (1993). Cloning and nucleotide sequence of the *gcv* operon encoding the *Escherichia coli* glycine-cleavage system. *European Journal of Biochemistry*, 216(2), 539–548. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18172.x>
270. Oksanen J., Guillaume Blanchet F., Friendly M., Kindt R., Legendre P., McGlinn D., Minchin P., O'Hara R. B., Simpson G.L., Solymos P., Stevens M.H.H, Szoecs E., Wagner H. (2020). Package vegan: Community Ecology Package. <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/vegan.pdf>
271. Oldroyd, G. E. D., Murray, J. D., Poole, P. S., & Downie, J. A. (2011). The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annual Review of Genetics*, 45, 119–144. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132549>
272. Oldroyd, G. E., & Downie, J. A. (2008). Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 519–546.
273. Oshone, R., Ngom, M., Chu, F., Mansour, S., Sy, M. O., Champion, A., & Tisa, L. S. (2017). Genomic, transcriptomic, and proteomic approaches towards understanding the molecular mechanisms of salt tolerance in *Frankia* strains isolated from *Casuarina* trees. *BMC Genomics*, 18(1), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4056-0>
274. Padan, E., Bibi, E., Ito, M., & Krulwich, T. A. (2005). Alkaline pH homeostasis in bacteria: New insights. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1717(2), 67–88. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.09.010>
275. Pandey, R. (2015). Mineral nutrition of plants. In *Plant Biology and Biotechnology: Plant Diversity, Organization, Function and Improvement* (Vol. 1, pp. 499–538). Springer India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2286-6_20
276. Patriarca, E. J., Tate, R., Ferraioli, S., & Iaccarino, M. (2004). Organogenesis of legume root nodules. *Int. Rev. Cytol*, 234, 201–262.
277. Pavankumar, M. G., Ambalal, B. C., Rajendra, D. S., & Navin, D. D. (2019). Microbial Augmentation of Salt-Affected Soils: Emphasis on Haloalkalitolerant PGPR. In *Microbial Interventions in Agriculture and Environment* (pp. 255–302). Springer, Singapore.
278. Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H., Velázquez, E., & Bedmar, E. J. (2015). Bacterial Associations with Legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34, 17–42. <https://doi.org/10.1080/07352689.2014.897899>
279. Peix, A., Rivas-Boyer, A. A., Mateos, P. F., Rodríguez-Barrueco, C., Martínez-Molina, E., & Velázquez, E. (2001). Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(1), 103–110. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00120-6](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00120-6)
280. Peix, Alvaro, Ramírez-Bahena, M. H., & Velázquez, E. (2018). The current status on the taxonomy of *Pseudomonas* revisited: An update. *Infection, Genetics and Evolution*, 57, 106–116. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.10.026>
281. Penyalver, R., Oger, P. M., Su, S., Alvarez, B., Salcedo, C. I., López, M. M., & Farrand, S. K. (2009). The S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase gene *ahcY* of *Agrobacterium radiobacter* K84 is required for optimal growth, antibiotic production, and biocontrol of crown gall disease. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 22(6), 713–724. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-6-0713>
282. Perelman, S. B., Chaneton, E. J., Batista, W. B., Burkart, S. E., & León, R. J. C. (2007). Habitat stress, species pool size and biotic resistance influence exotic plant richness in the Flooding Pampa grasslands. *Journal of Ecology*, 95(4), 662–673. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2007.01255.x>

283. Perelman, S. B., León, R. J. C., & Oesterheld, M. (2001). Cross-scale vegetation patterns of Flooding Pampa grasslands. *Journal of Ecology*, 89(4), 562–577. <https://doi.org/10.1046/j.0022-0477.2001.00579.x>
284. Pérez-Miranda, S., Cabirol, N., George-Téllez, R., Zamudio-Rivera, L. S., & Fernández, F. J. (2007). O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *Journal of Microbiological Methods*, 70(1), 127–131. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.03.023>
285. Perry, B. J., & Yost, C. K. (2014). Construction of a mariner-based transposon vector for use in insertion sequence mutagenesis in selected members of the Rhizobiaceae. *BMC Microbiology*, 14(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0298-z>
286. Peters, N. T., Dinh, T., & Bernhardt, T. G. (2011). A Fail-safe mechanism in the septal ring assembly pathway generated by the sequential recruitment of cell separation amidases and their activators. *Journal of Bacteriology*, 193(18), 4973–4983. <https://doi.org/10.1128/JB.00316-11>
287. Petzoldt T. (2020). Estimations of Growth Rates with packages growthrates. <https://cran.r-project.org/web/packages/growthrates/vignettes/Introduction.html>
288. Pieterse, C. M. J., de Jonge, R., & Berendsen, R. L. (2016). The Soil-Borne Supremacy. *Trends in Plant Science*, 21(3), 171–173. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.018>
289. Pikaar, I., Matassa, S., Rabaey, K., Bodirsky, B. L., Popp, A., Herrero, M., & Verstraete, W. (2017). Microbes and the Next Nitrogen Revolution. *Environmental Science and Technology*, 51(13), 7297–7303. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b00916>
290. Piuri, M., Sanchez-Rivas, C., & Ruzal, S. M. (2005). Cell wall modifications during osmotic stress in *Lactobacillus casei*. *Journal of Applied Microbiology*, 98(1), 84–95. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02428.x>
291. Poole, L. B. (2005). Bacterial defenses against oxidants: mechanistic features of cysteine-based peroxidases and their flavoprotein reductases. *Archives of biochemistry and biophysics*, 433(1), 240–254.
292. Popp, C., & Ott, T. (2011). Regulation of signal transduction and bacterial infection during root nodule symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(4), 458–467. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.03.016>
293. Postgate, J. R. (1982). *The fundamentals of nitrogen fixation*. CUP Archive.
294. Prabhu, N., Borkar, S., & Garg, S. (2019). Phosphate solubilization by microorganisms: Overview, mechanisms, applications and advances. In *Advances in Biological Science Research: A Practical Approach*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817497-5.00011-2>
295. Pradhan, N., & Sukla, L. B. (2006). Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. *African Journal of Biotechnology*, 5(10), 850–854. <https://doi.org/10.4314/ajb.v5i10.42884>
296. Prágai, Z., & Harwood, C. R. (2002). Regulatory interactions between the Pho and σ B-dependent general stress regulons of *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, 148(5), 1593–1602. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-5-1593>
297. Preisig, O., Zufferey, R., & Hennecke, H. (1996). The *Bradyrhizobium japonicum* fixGHIS genes are required for the formation of the high-affinity cbb3-type cytochrome oxidase. *Archives of Microbiology*, 165(5), 297–305. <https://doi.org/10.1007/s002030050330>
298. Príncipe, A., Jofré, E., Alvarez, F., & Mori, G. (2009). Role of a serine-type d-alanyl-d-alanine carboxypeptidase on the survival of *Ochrobactrum* sp. 11a under ionic and hyperosmotic stress. *FEMS Microbiology Letters*, 295(2), 261–273. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01604.x>
299. Putnoky, P., Kereszt, A., Nakamura, T., Endre, G., Grosskopf, E., Kiss, P., & Kondorosi, Á. (1998). The pha gene cluster of *Rhizobium meliloti* involved in pH adaptation and symbiosis encodes a novel type of K⁺ efflux system. *Molecular Microbiology*, 28(6), 1091–1101. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00868.x>

300. Qurashi, A. W., & Sabri, A. N. (2012). Bacterial exopolysaccharide and biofilm formation stimulate chickpea growth and soil aggregation under salt stress. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(3), 1183–1191. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000300046>
301. Radutoiu, S., Madsen, L. H., Madsen, E. B., Felle, H. H., Umehara, Y., Grønlund, M., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Sandal, N., & Stougaard, J. (2003). Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature*, 425(6958), 585–592. <https://doi.org/10.1038/nature02039>
302. Rath, K. M., Fierer, N., Murphy, D. V., & Rousk, J. (2019). Linking bacterial community composition to soil salinity along environmental gradients. *ISME Journal*, 13(3), 836–846. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0313-8>
303. Rathinasabapathi, B., Liu, X., Cao, Y., & Ma, L. Q. (2018). Phosphate-Solubilizing Pseudomonads for Improving Crop Plant Nutrition and Agricultural Productivity. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Crop Improvement through Microbial Biotechnology* (pp. 363–372). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63987-5.00018-9>
304. Rearte, D. H. (2010). Documento programa nacional de carnes. 1–57.
305. Rees, D. C., Johnson, E., & Lewinson, O. (2009). ABC transporters: The power to change. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(3), 218–227. <https://doi.org/10.1038/nrm2646>
306. Ren, C. G., Bai, Y. J., Kong, C. C., Bian, B., & Xie, Z. H. (2016). Synergistic Interactions Between Salt-tolerant Rhizobia and Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Salinity Tolerance of *Sesbania cannabina* Plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 35(4), 1098–1107. <https://doi.org/10.1007/s00344-016-9607-0>
307. Rengasamy, P. (2002). Transient salinity and subsoil constraints to dryland farming in Australian sodic soils: An overview. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 42(3), 351–361. <https://doi.org/10.1071/EA01111>
308. Rengasamy, Pichu. (2006). World salinization with emphasis on Australia. *Journal of Experimental Botany*, 57(5), 1017–1023. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj108>
309. Rengasamy, Pichu. (2010). Soil processes affecting crop production in salt-affected soils. *Functional Plant Biology*, 37(7), 613–620. <https://doi.org/10.1071/FP09249>
310. Rezzonico, F., Smits, T. H., Montesinos, E., Frey, J. E., & Duffy, B. (2009). Genotypic comparison of *Pantoea agglomerans* plant and clinical strains. *BMC Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-204>
311. Rfaki, A., Zennouhi, O., Aliyat, F. Z., Nassiri, L., & Ibjibjen, J. (2020). Isolation, Selection and Characterization of Root-Associated Rock Phosphate Solubilizing Bacteria in Moroccan Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Geomicrobiology Journal*, 37(3), 230–241. <https://doi.org/10.1080/01490451.2019.1694106>
312. Ribeiro, R.A., Barcellos, F.G., Thompson, F.L., Hungria, M. (2009) Multilocus sequence analysis of Brazilian Rhizobium strains microsymbionts of common beans (*Phaseolus vulgaris*) reveals unexpected taxonomic diversity. *Res. Microbiol.* 160, 297–306
313. Ribeiro, R.A., Rogel, M.A., López-López, A., Ormeno-Orrillo, E., Barcellos, F.G., Martínez, J., Thompson, F.L., Martínez-Romero, E., Hungria, M. (2012) Reclassification of *Rhizobium tropici* type A strains as *Rhizobium leucaenae* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62, 1180–1185
314. Richards, L. A. (1954). *Diagnosis and improvement of saline and alkali soils* (Vol. 78, No. 2, p. 154). LWW.
315. Rigaud, J., & Puppo, A. (1975). Indole-3-acetic acid catabolism by soybean bacteroids. *Microbiology*, 88(2), 223–228.
316. Rimski-Korsakov, H., Alvarez, C. R., & Lavado, R. S. (2015). Cover crops in the agricultural systems of the Argentine Pampas. *Journal of Soil and Water Conservation*, 70(6), 134A–140A. <https://doi.org/10.2489/jswc.70.6.134A>

317. Rinaudi, L., Fujishige, N. A., Hirsch, A. M., Banchio, E., Zorreguieta, A., & Giordano, W. (2006). Effects of nutritional and environmental conditions on *Sinorhizobium meliloti* biofilm formation. *Research in Microbiology*, 157(9), 867–875. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2006.06.002>
318. Rivas, R., García-Fraile, P., & Velázquez, E. (2009). Taxonomy of Bacteria Nodulating Legumes. *Microbiology Insights*, 2, MBI.S3137. <https://doi.org/10.4137/mbi.s3137>
319. Robert, H., Le Marrec, C., Blanco, C., & Jebbar, M. (2000). Glycine betaine, carnitine, and choline enhance salinity tolerance and prevent the accumulation of sodium to a level inhibiting growth of *Tetragenococcus halophila*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(2), 509–517. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.2.509-517.2000>
320. Roberts, M. F. (2006). Chapter 5 Inositol in Bacteria and Archaea. Regulation.
321. Rodrigo da-Silva, J., Alexandre, A., Brígido, C., & Oliveira, S. (2017). Can stress response genes be used to improve the symbiotic performance of rhizobia? *AIMS Microbiology*, 3(3), 365–382. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.3.365>
322. Rodríguez, A., & Jacobo, E. (2012). Manejo de pastizales naturales para una ganadería sustentable en la pampa deprimida. In *Buenas Prácticas Para una Ganadería sustentable de Pastizal*.
323. Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17(4–5), 319–339. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(99\)00014-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00014-2)
324. Roe, A. J., O’Byrne, C., McLaggan, D., & Booth, I. R. (2002). Inhibition of *Escherichia coli* growth by acetic acid: A problem with methionine biosynthesis and homocysteine toxicity. *Microbiology*, 148(7), 2215–2222. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-7-2215>
325. Rogel, M. A., Ormeño-Orrillo, E., & Martínez Romero, E. (2011). Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. *Systematic and Applied Microbiology*, 34(2), 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.11.015>
326. Romantsov, T., Gonzalez, K., Sahtout, N., Culham, D. E., Coumoundouros, C., Garner, J., Kerr, C. H., Chang, L., Turner, R. J., & Wood, J. M. (2018). Cardiolipin synthase A colocalizes with cardiolipin and osmosensing transporter ProP at the poles of *Escherichia coli* cells. *Molecular Microbiology*, 107(5), 623–638. <https://doi.org/10.1111/mmi.13904>
327. Rosas, S. B., Andrés, J. A., Rovera, M., & Correa, N. S. (2006). Phosphate-solubilizing *Pseudomonas putida* can influence the rhizobia-legume symbiosis. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(12), 3502–3505. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.05.008>
328. Rubio, G., Pereyra, F. X., & Taboada, M. A. (2019). *Soils of the Pampean Region*. Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-76853-3_6
329. Saeki, K., & Kouchi, H. (2000). The lotus symbiont, *Mesorhizobium loti*: Molecular genetic techniques and application. *Journal of Plant Research*, 113(4), 457–465. <https://doi.org/10.1007/pl00013956>
330. Saier, M. H., Yen, M. R., Noto, K., Tamang, D. G., & Elkan, C. (2009). The Transporter Classification Database: Recent advances. *Nucleic Acids Research*, 37(SUPPL. 1), 274–278. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn862>
331. Sánchez, M., Bahena-Ramírez, M. H., Peix, A., Lorite, M. J., Sanjuán, J., Velázquez, E., & Monza, J. (2014). *Phyllobacterium loti* sp. nov. Isolated from nodules of *Lotus corniculatus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(PART 3), 781–786. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.052993-0>
332. Sannazzaro, A. I., Bergottini, V. M., Paz, R. C., Castagno, L. N., Menéndez, A. B., Ruiz, O. A., ... & Estrella, M. J. (2011). Comparative symbiotic performance of native rhizobia of the Flooding Pampa and strains currently used for inoculating *Lotus tenuis* in this region. *Antonie van Leeuwenhoek*, 99(2), 371–379.
333. Sannazzaro, A. I., Tejerizo, G. T., Fontana, M. F., Cumpa Velásquez, L. M., Hansen, L. H., Pistorio, M., & Estrella, M. J. (2018). *Mesorhizobium sanjuanii* sp. Nov., isolated from nodules of *lotus tenuis*

- in the saline-alkaline lowlands of Flooding Pampa, Argentina. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(9), 2936–2942. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002924>
334. Santi, C., Bogusz, D., & Franche, C. (2013). Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Annals of Botany*, 111(5), 743–767. <https://doi.org/10.1093/aob/mct048>
335. Santos-Beneit, F. (2015). The Pho regulon: A huge regulatory network in bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 6(APR), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00402>
336. Sanz-Saez, A., Morales, F., Arrese-Igor, C., & Aranjuelo, I. (2017). P Deficiency: A Major Limiting Factor for Rhizobial Symbiosis. In *Legume Nitrogen Fixation in Soils with Low Phosphorus Availability* (pp. 21-39). Springer, Cham.
337. Sarker, A., Islam, T., Biswas, G., Alam, S., Hossain, M., & Talukder, N. (2012). Screening for phosphate solubilizing bacteria inhabiting the rhizosphere of rice grown in acidic soil in Bangladesh. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*, 59(2), 199-213.
338. Saurin, W., Hofnung, M., & Dassa, E. (1999). Getting in or out: Early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. *Journal of Molecular Evolution*, 48(1), 22–41. <https://doi.org/10.1007/PL00006442>
339. Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J. A., & Charlier, P. (2008). The penicillin-binding proteins: Structure and role in peptidoglycan biosynthesis. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 32, Issue 2, pp. 234–258). Oxford Academic. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00105.x>
340. Savci, S. (2012). An Agricultural Pollutant: Chemical Fertilizer. *International Journal of Environmental Science and Development*, 3(1), 73–80. <https://doi.org/10.7763/ijesd.2012.v3.191>
341. Schmidt, K. L., Peterson, N. D., Kustusch, R. J., Wissel, M. C., Graham, B., Phillips, G. J., & Weiss, D. S. (2004). A Predicted ABC Transporter, FtsEX, Is Needed for Cell Division in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 186(3), 785–793. <https://doi.org/10.1128/JB.186.3.785-793.2004>
342. Schollenberger, C., & Dreibels, F. R. (1930). Analytical methods in base exchange investigations on soils. *Soil Science*, 30(3), 161-174.
343. Schwyn, B., & Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160(1), 47–56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)
344. SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). 2011. Sistema de Gestión Sanitaria. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, Buenos Aires, Argentina. Accessed Aug. 8, 2011. <http://www.senasa.gov.ar>
345. Shahid, I., Rizwan, M., Baig, D. N., Saleem, R. S., Malik, K. A., & Mehnaz, S. (2017). Secondary metabolites production and plant growth promotion by *Pseudomonas chlororaphis* and *P. Aurantiaca* strains isolated from cactus, cotton, and para grass. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(3), 480–491. <https://doi.org/10.4014/jmb.1601.01021>
346. Shailendra Singh, G. G. (2015). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 07(02). <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000188>
347. Sharthiya, H., Nanda, A., Zamani, M., & Finan, T. M. (2017). PhoU allows rapid adaptation to high phosphate concentrations by modulating PstSCAB transport rate in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of bacteriology*. 199(18). e00143-17.
348. Shaw, F. L., Elliott, K. A., Kinch, L. N., Fuell, C., Phillips, M. A., & Michael, A. J. (2010). Evolution and multifarious horizontal transfer of an alternative biosynthetic pathway for the alternative polyamine sym-homospermidine. *Journal of Biological Chemistry*, 285(19), 14711–14723. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.107219>
349. Shridhar, B. S., Author, C., Shrimant Shridhar, B., Shridhar, B. S., Author, C., & Shrimant Shridhar, B. (2012). Review: Nitrogen Fixing Microorganisms. *International Journal of Microbiological Research*, 3(1), 46–52. <https://doi.org/10.5829/idosi.ijmr.2012.3.1.61103>
350. Shrivastava, P., & Kumar, R. (2015). Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(2), 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.12.001>

351. Simon, R., Priefer, U., & Pühler, A. (1983). A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technology*, 1(9), 784–791. <https://doi.org/10.1038/nbt1183-784>
352. Simontacchi, M., García-Mata, C., Bartoli, C. G., Santa-María, G. E., & Lamattina, L. (2013). Nitric oxide as a key component in hormone-regulated processes. In *Plant Cell Reports* (Vol. 32, Issue 6, pp. 853–866). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00299-013-1434-1>
353. Singh KN, Chatrath R (2001) Salinity Tolerance. In: Reynolds MP, Monasterio JIO, McNab A (eds) Application of physiology in wheat breeding. CIMMYT, Mexico, DF, pp 101–110
354. Singh, D. P., & Prabha, R. (2019). Microbial interventions in agriculture and environment. In *Microbial Interventions in Agriculture and Environment: Volume 3: Soil and Crop Health Management* (Vol. 2). <https://doi.org/10.1007/978-981-32-9084-6>
355. Singh, K. N., & Chatrath, R. (2001). Breeding for adaptation to environmental factors. *Chapter 8. Salinity Tolerance*.
356. Singh, R. P., Manchanda, G., Singh, R. N., Srivastava, A. K., & Dubey, R. C. (2016). Selection of alkalotolerant and symbiotically efficient chickpea nodulating rhizobia from North-West Indo Gangetic Plains. *Journal of Basic Microbiology*, 56(1), 14–25. <https://doi.org/10.1002/jobm.201500267>
357. Singhal, A., Arora, G., Sajid, A., Maji, A., Bhat, A., Virmani, R., Upadhyay, S., Nandicoori, V. K., Sengupta, S., & Singh, Y. (2013). Regulation of homocysteine metabolism by *Mycobacterium tuberculosis* S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Scientific Reports*, 3(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep02264>
358. Singleton, P. W., El Swaify, S. A., & Bohlool, B. B. (1982). Effect of salinity on *Rhizobium* growth and survival. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(4), 884–890. <https://doi.org/10.1128/aem.44.4.884-890.1982>
359. Smith, L. T., Pocard, J. A., Bernard, T., & Le Rudulier, D. (1988). Osmotic control of glycine betaine biosynthesis and degradation in *Rhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, 170(7), 3142–3149. <https://doi.org/10.1128/jb.170.7.3142-3149.1988>
360. Soares, R., Trejo, J., Lorite, M. J., Figueira, E., Sanjuán, J., & E Castro, I. V. (2020). Diversity, phylogeny and plant growth promotion traits of nodule associated bacteria isolated from lotus parviflorus. *Microorganisms*, 8(4), 499. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040499>
361. Solanki, M. K., Solanki, A. C., Kumari, B., Kashyap, B. K., & Singh, R. K. (2019). Plant and soil-associated biofilm-forming bacteria: Their role in green agriculture. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Biofilms Current Research and Future Trends in Microbial Biofilms*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64279-0.00012-8>
362. Son, H. J., Park, G. T., Cha, M. S., & Heo, M. S. (2006). Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt- and pH-tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. *Bioresource Technology*, 97(2), 204–210. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.02.021>
363. Sparks, D. L. (2003). The chemistry of saline and sodic soils. *Environmental soil chemistry*, 285–300.
364. Sprouffske, K., & Wagner, A. (2016). Growthcurver: An R package for obtaining interpretable metrics from microbial growth curves. *BMC Bioinformatics*, 17(1), 17–20. <https://doi.org/10.1186/s12859-016-1016-7>
365. Srivastava, P., Wu, Q., & Giri, B. (2019). Salinity: An Overview. 3–18.
366. Steil, L., Hoffmann, T., Budde, I., Völker, U., & Bremer, E. (2003). Genome-Wide Transcriptional Profiling Analysis of Adaptation of *Bacillus subtilis* to High Salinity. *Journal of Bacteriology*, 185(21), 6358–6370. <https://doi.org/10.1128/JB.185.21.6358-6370.2003>
367. Stein, L. Y., & Klotz, M. G. (2016). The nitrogen cycle. *Current Biology*, 26(3), R94–R98. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.12.021>
368. Stofella, S. G. P. & M. C. (1998). Phenotypic plasticity and genetic variation of *Lotus tenuis* populations from soils with different pH. Variabilidad fenotípica y genotípica de poblaciones de *Lotus*

- tenuis* que habitan suelos con distinto pH. *Ecología Austral*. <http://www.ecologiaaustral.com.ar/index2.php?volumen=8&numero=1&orden=8>
369. Sturz, A. V., Christie, B. R., Matheson, B. G., & Nowak, J. (1997). Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. *Biology and Fertility of Soils*, 25(1), 13–19. <https://doi.org/10.1007/s003740050273>
370. Sullivan, J. T., & Ronson, C. W. (1998). Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(9), 5145–5149. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.9.5145>
371. Sullivan, J. T., Patrick, H. N., Lowther, W. L., Scott, D. B., & Ronson, C. W. (1995). Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(19), 8985–8989. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.19.8985>
372. Sultana, A., Kallio, P., Jansson, A., Wang, J. S., Niemi, J., Mäntsälä, P., & Schneider, G. (2004). Structure of the polyketide cyclase SnoaL reveals a novel mechanism for enzymatic aldol condensation. *EMBO Journal*, 23(9), 1911–1921. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600201>
373. Taboada, M. A., Lavado, R. S., Svartz, H., & Segat, A. M. L. (1999). Structural stability changes in a grazed grassland natraquoll of the Flooding Pampa (Argentina). *Wetlands*, 19(1), 50–55. <https://doi.org/10.1007/BF03161732>
374. Taga, M. E., & Walker, G. C. (2010). *Sinorhizobium meliloti* requires a cobalamin-dependent ribonucleotide reductase for symbiosis with its plant host. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23(12), 1643–1654. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-10-0151>
375. Tewari, S., & Sharma, S. (2020). Rhizobial exopolysaccharides as supplement for enhancing nodulation and growth attributes of *Cajanus cajan* under multi-stress conditions: A study from lab to field. *Soil and Tillage Research*, 198(December 2019), 104545. <https://doi.org/10.1016/j.still.2019.104545>
376. Torabinejad, J., & Gillaspay, G. E. (2006). Functional genomics of inositol metabolism. *Subcellular Biochemistry*, 39, 47–70. https://doi.org/10.1007/0-387-27600-9_3
377. Turner, S. L., & Young, J. P. W. (2000). The glutamine synthetases of rhizobia: phylogenetics and evolutionary implications. *Molecular Biology and Evolution*, 17(2), 309–319.
378. Uehara, T., Dinh, T., & Bernhardt, T. G. (2009). LytM-domain factors are required for daughter cell separation and rapid ampicillin-induced lysis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 191(16), 5094–5107. <https://doi.org/10.1128/JB.00505-09>
379. Urakami, T., Araki, H., Oyanagi, H., Suzuki, K. I., & Komagata, K. (1992). Transfer of *Pseudomonas aminovorans* (den Dooren de Jong 1926) to *Aminobacter* gen. nov. as *Aminobacter aminovorans* comb. nov. and description of *Aminobacter aganoensis* sp. nov. and *Aminobacter niigataensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 42(1), 84–92.
380. Valverde, A., Velázquez, E., Fernández-Santos, F., Vizcaíno, N., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E., Igual, J. M., & Willems, A. (2005). *Phyllobacterium trifolii* sp. nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(5), 1985–1989. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63551-0>
381. Velázquez, E., García-Fraile, P., Ramírez-Bahena, M. H., Rivas, R., & Martínez-Molina, E. (2017). Current status of the taxonomy of bacteria able to establish nitrogen-fixing legume symbiosis. In *Microbes for Legume Improvement, Second Edition* (pp. 1–43). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-59174-2_1
382. Velázquez, E., Martínez-Hidalgo, P., Carro, L., Alonso, P., Peix, A., Trujillo, M. E., & Martínez-Molina, E. (2013). Nodular endophytes: an untapped diversity. *Beneficial Plant-Microbial Interactions: Ecology and Applications*, 215–235.
383. Veneciano, J. H., & Frasinelli, C. A. (2014). Cría y recría de bovinos. *Sitio Argentino de Producción Animal*, 1–50.
384. Vermassen, A., Leroy, S., Talon, R., Provot, C., Popowska, M., & Desvaux, M. (2019). Cell wall hydrolases in bacteria: Insight on the diversity of cell wall amidases, glycosidases and peptidases

- toward peptidoglycan. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 10, Issue FEB, p. 331). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00331>
385. Versalovic, J., Koeuth, T., & Lupski, R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to finerprinting of bacterial enomes. *Nucleic acids research*, *19*(24), 6823-6831.
386. Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F. J., & Lupski, J. R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in molecular and cellular biology*, *5*(1), 25-40.
387. Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, *255*(2), 571–586. <https://doi.org/10.1023/A:1026037216893>
388. Viglizzo, E. F., Carreño, L. V, Pereyra, A. M., Ricard, F., Clatt, J., & Pincén, D. (2010). Dinámica de la frontera agropecuaria y cambio tecnológico. *Expansión de La Frontera Agropecuaria En Argentina y Su Impacto Ecológico-Ambiental*, January, 100.
389. Vincent, J. M. (1970). *A Manual for the Practical Study of Root-nodule Bacteria*, I.B.P. Handbook. Blackwell Scientific Publisher, Oxford, UK, 1970., 8(3), 164.
390. Vitousek, P. M., Cassman, K., Cleveland, C., Crews, T., Field, C. B., Grimm, N. B., Howarth, R. W., Marino, R., Martinelli, L., Rastetter, E. B., & Sprent, J. I. (2002). Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. *Biogeochemistry*, *57–58*(McKey 1994), 1–45. <https://doi.org/10.1023/A:1015798428743>
391. Vollmer, A. C., & Bark, S. J. (2018). Twenty-Five Years of Investigating the Universal Stress Protein: Function, Structure, and Applications. In *Advances in Applied Microbiology* (1st ed., Vol. 102). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2017.10.001>
392. Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P., & Foster, S. (2008). Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 32, Issue 2, pp. 259–286). Oxford Academic. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00099.x>
393. Vriezen, J. A. C., De Bruijn, F. J., & Nüsslein, K. (2007). Responses of rhizobia to desiccation in relation to osmotic stress, oxygen, and temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(11), 3451–3459. <https://doi.org/10.1128/AEM.02991-06>
394. Walkley, A., & Black, I. A. (1934). An examination of the degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. In *Soil Science* (Vol. 37, Issue 1, pp. 29–38). <https://doi.org/10.1097/00010694-193401000-00003>
395. Walterson, A. M., & Stavrinides, J. (2015). *Pantoea*: Insights into a highly versatile and diverse genus within the Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiology Reviews*, *39*(6), 968–984. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv027>
396. Wang, D., Yang, S., Tang, F., & Zhu, H. (2012). Symbiosis specificity in the legume - rhizobial mutualism. *Cellular Microbiology*, *14*(3), 334–342. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01736.x>
397. Wang, L. C., Morgan, L. K., Godakumbura, P., Kenney, L. J., & Anand, G. S. (2012). The inner membrane histidine kinase EnvZ senses osmolality via helix-coil transitions in the cytoplasm. *EMBO Journal*, *31*(11), 2648–2659. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.99>
398. Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics in Western Equatoria State. *Nature Reviews Genetics*, *10*(1), 57.
399. Wanner, B. L. (1996). Phosphorus Assimilation and Control of the Phosphate Regulon. *Escherichia Coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, *1*(46), 1357–1381.
400. Wargo, M. J. (2013). Homeostasis and catabolism of choline and glycine betaine: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, *79*(7), 2112–2120. <https://doi.org/10.1128/AEM.03565-12>
401. Wargo, M. J., Szwergold, B. S., & Hogan, D. A. (2008). Identification of two gene clusters and a transcriptional regulator required for *Pseudomonas aeruginosa* glycine betaine catabolism. *Journal of Bacteriology*, *190*(8), 2690–2699. <https://doi.org/10.1128/JB.01393-07>
402. Warren, M. J., Raux, E., Schubert, H. L., & Escalante-Semerena, J. C. (2002). The biosynthesis of adenosylcobalamin (vitamin B12). *Natural Product Reports*, *19*(4), 390–412. <https://doi.org/10.1039/b108967f>

403. Watson, S. P., Clements, M. O., & Foster, S. J. (1998). Characterization of the starvation-survival response of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 180(7), 1750–1758. <https://doi.org/10.1128/jb.180.7.1750-1758.1998>
404. Weber, A., Kögl, S. A., & Jung, K. (2006). Time-dependent proteome alterations under osmotic stress during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 188(20), 7165–7175. <https://doi.org/10.1128/JB.00508-06>
405. WEI, G. H., YANG, X. Y., ZHANG, Z. X., YANG, Y. Z., & LINDSRÖM, K. (2008). Strain Mesorhizobium sp. CCNWGX035: A Stress-Tolerant Isolate from *Glycyrrhiza glabra* Displaying a Wide Host Range of Nodulation. *Pedosphere*, 18(1), 102–112. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(07\)60108-8](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(07)60108-8)
406. Wezel, A., Casagrande, M., Celette, F., Vian, J. F., Ferrer, A., & Peigné, J. (2014). Agroecological practices for sustainable agriculture. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 34(1), 1–20. <https://doi.org/10.1007/s13593-013-0180-7>
407. Witty, J., Minchin, F., Skøt, L., plant, J. S.-O. surveys of, & 1986, undefined. (n.d.). Nitrogen fixation and oxygen in legume root nodules. Cabdirect.Org. Retrieved March 11, 2021, from <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19880715194>
408. Wolff, S. P., Garner, A., & Dean, R. T. (1986). Free radicals, lipids and protein degradation. *Trends in Biochemical Sciences*, 11(1), 27–31. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(86\)90228-8](https://doi.org/10.1016/0968-0004(86)90228-8)
409. Worden, C. R., Kovac, W. K., Dorn, L. A., & Sandrin, T. R. (2009). Environmental pH affects transcriptional responses to cadmium toxicity in *Escherichia coli* K-12 (MG1655). *FEMS Microbiology Letters*, 293(1), 58–64. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01508.x>
410. Wu, C., Wei, X., Sun, H. L., & Wang, Z. Q. (2005). Phosphate availability alters lateral root anatomy and root architecture of *Fraxinus mandshurica* Rupr. seedlings. *Journal of Integrative Plant Biology*, 47(3), 292–301
411. Yadav, A., Ansari, W. A., Singh, A. L., & Singh, M. (2020). Transcriptional response of *otsA*, *P5CR*, *glgX*, *nodC*, and molecular chaperone genes under the PEG-induced drought stress in *Mesorhizobium ciceri* Ca181. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 23(September 2019), 101459. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101459>
412. Yamaguchi, T., Tsutsumi, F., Putnoky, P., Fukuhara, M., & Nakamura, T. (2009). pH-dependent regulation of the multi-subunit cation/proton antiporter Pha1 system from *Sinorhizobium meliloti*. *Microbiology*, 155(8), 2750–2756. <https://doi.org/10.1099/mic.0.028563-0>
413. Yin, L., Xue, Y., & Ma, Y. (2015). Global microarray analysis of alkaliphilic halotolerant bacterium *Bacillus* sp. N16-5 salt stress adaptation. *PLoS ONE*, 10(6), e0128649. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128649>
414. Youseif, S. H., Abd El-Megeed, F. H., Abu Zeid, A. Z. A., Abd-Elrahman, R. A. M., Mohamed, A. H., Khalifa, M. A., & Saleh, S. A. (2020). Alleviating the deleterious effects of soil salinity and alkalinity on faba bean (*Vicia faba* L.) production using *Rhizobium/Agrobacterium* inoculants. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 0(0), 1–17. <https://doi.org/10.1080/03650340.2020.1849626>
415. Yuan, H., Zhang, J., Cai, Y., Wu, S., Yang, K., Chan, H. C. S., Huang, W., Jin, W. B., Li, Y., Yin, Y., Igarashi, Y., Yuan, S., Zhou, J., & Tang, G. L. (2017). GyrI-like proteins catalyze cyclopropanoid hydrolysis to confer cellular protection. *Nature Communications*, 8(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01508-1>
416. Yuan, Z. C., Zaheer, R., & Finan, T. M. (2005). Phosphate limitation induces catalase expression in *Sinorhizobium meliloti*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular Microbiology*, 58(3), 877–894. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04874.x>
417. Yuan, Z. C., Zaheer, R., & Finan, T. M. (2006). Regulation and properties of PstSCAB, a high-affinity, high-velocity phosphate transport system of *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, 188(3), 1089–1102. <https://doi.org/10.1128/JB.188.3.1089-1102.2006>
418. Zaheer, A., Malik, A., Sher, A., Mansoor Qaisrani, M., Mehmood, A., Ullah Khan, S., Ashraf, M., Mirza, Z., Karim, S., & Rasool, M. (2019). Isolation, characterization, and effect of phosphate-zinc-

- solubilizing bacterial strains on chickpea (*Cicer arietinum* L.) growth. Saudi Journal of Biological Sciences, 26(5), 1061–1067. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.04.004>
419. Zahran, H. H. (1999). *Rhizobium*-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 63(4), 968–989. <https://doi.org/10.1128/membr.63.4.968-989.1999>
420. Zakhia, F., Jeder, H., Willems, A., Gillis, M., Dreyfus, B., & De Lajudie, P. (2006). Diverse bacteria associated with root nodules of spontaneous legumes in Tunisia and first report for nifH-like gene within the genera Microbacterium and Starkeya. Microbial Ecology, 51(3), 375–393. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9025-0>
421. Zelal, A. (2017). Hypomagnesemia tetany in cattle. Advances in Dairy Research, 5(2), 2-9.
422. Zgadzaj, R., Garrido-Oter, R., Jensen, D. B., Koprivova, A., Schulze-Lefert, P., & Radutoiu, S. (2016). Root nodule symbiosis in *Lotus japonicus* drives the establishment of distinctive rhizosphere, root, and nodule bacterial communities. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 113(49), E7996–E8005. <https://doi.org/10.1073/pnas.1616564113>
423. Zhang, J., Singh, D., Guo, C., Shang, Y., & Peng, S. (2020). Rhizobia at extremes of acidity, alkalinity, salinity, and temperature. In Microbial Versatility in Varied Environments: Microbes in Sensitive Environments (pp. 51–65). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-3028-9_4
424. Zheng, B.-X., Hao, X.-L., Ding, K., Zhou, G.-W., Chen, Q.-L., Zhang, J.-B., & Zhu, Y.-G. (2017). Long-term nitrogen fertilization decreased the abundance of inorganic phosphate solubilizing bacteria in an alkaline soil OPEN. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/srep42284>
425. Zhu, J., Li, M., & Whelan, M. (2018). Phosphorus activators contribute to legacy phosphorus availability in agricultural soils: A review. Science of the Total Environment, 612, 522–537. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.095>
426. Zorraquino, V., Kim, M., Rai, N., & Tagkopoulos, I. (2017). The genetic and transcriptional basis of short and long term adaptation across multiple stresses in *Escherichia coli*. Molecular Biology and Evolution, 34(3), 707–717. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw269>
427. Zou, Q., Luo, S., Wu, H., He, D., Li, X., & Cheng, G. (2020). A GMC Oxidoreductase GmcA Is Required for Symbiotic Nitrogen Fixation in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. Frontiers in Microbiology, 11(March), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00394>
428. Zurayk, R., Adlan, M., Baalbaki, R., & Saxena, M. C. (1998). Interactive effects of salinity and biological nitrogen fixation on chickpea (*Cicer arietinum* L.) Growth. Journal of Agronomy and Crop Science, 180(4), 249–258. <https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.1998.tb00531.x>