

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y
NATURALES**



TESINA

Caracterización de aislamientos de rizobios nativos que nodulan *Prosopis flexuosa* en ambientes salinos

Alumna: Espinosa Herlein, María de los Ángeles

Directora: Melchiorre, Mariana

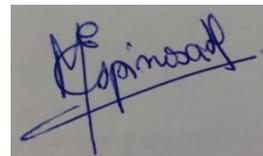
Codirector: López Lauenstein, Diego

Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos Vegetales.
Centro de Investigaciones Agropecuarias. Instituto de
Tecnología Agropecuaria.
Unidad de Doble Dependencia INTA-CONICET (UDEA)



-Tesis para optar por título de Bióloga-

Caracterización de aislamientos de rizobios nativos que nodulan *Prosopis flexuosa* en ambientes salinos



Tesinista: Espinosa Herlein, María de los Ángeles

Firma:.....



JTB. MARIANA MELCHIORRE
Inst. Ag. Procesos Biotecnológicos
Cav. Ing. Química FICYPAN - UNIC
Investigadora CONICET - INTA

Directora: Melchiorre, Mariana

Firma:.....



Codirector: López Lauenstein, Diego

Firma:.....

Universidad Nacional de Córdoba - Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales -
Carrera de Ciencias Biológicas

Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos Vegetales - Centro de Investigaciones
Agropecuarias -CIAP-INTA.
Unidad de Doble Dependencia INTA-CONICET (UDEA).

-Tesina para optar por título de Bióloga-

Caracterización de aislamientos de rizobios nativos que nodulan *Prosopis flexuosa* en ambientes salinos

Tribunal examinador:

Nombre y apellido: Lascano, Ramiro



Firma:

Nombre y apellido: Gurvich, Diego



Firma:

Nombre y apellido: Vega, Carmen.



Firma:

Calificación: 10 (diez)

Fecha: 23/03/2022

Agradecimientos.

- A la Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales – UNC que, al ser pública y gratuita, me permitió formarme a través de los años y a los docentes de la casa.
- A mi directora Mariana y co-director Diego por su paciencia, por guiarme en este camino y comprometerse en mi aprendizaje.
- A Nacira por despertar en mi la curiosidad sobre el tema y el mundo de la Fisiología Vegetal.
- Al comité evaluador Ramiro Lascano, Vega Carmen y Gurvich Diego por las correcciones realizadas y sus aportes.
- Al Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos Vegetales - Centro de Investigaciones Agropecuarias -CIAP-INTA-UDEA y a su directora, Dra. Karina Grunberg, por abrirme las puertas y permitirme no solo realizar la última etapa de mi carrera, sino que además por el aprendizaje y todo tipo de riquezas como estudiante, futuro profesional y persona.
- Al Proyecto Disciplinar INTA: Bioprospección y caracterización de microorganismos benéficos para la protección y producción vegetal. 2019-PD-E4-I069-001 por financiar mi trabajo.
- Al personal del INTA en general, por su tiempo y compromiso ya sea, respondiendo mis dudas, ayudándome tanto en el laboratorio como en el invernadero en el cuidado y riego de los ensayos, cosechando nódulos y midiendo parámetros a los algarrobos, preparando distintas soluciones o enseñándome técnicas de laboratorio y muchísimas cosas más, además de sentir la calidez humana. Y a Paola Suarez, en particular, por su paciencia al enseñarme todo lo que sé de laboratorio y por sus enseñanzas de vida también.
- A mi familia por la posibilidad de permitirme estudiar la carrera universitaria que quería y por su acompañamiento en todo momento en el gran cambio que conllevo empezar la facultad, no solo por ser una etapa nueva sino por el cambio de ciudad.
- A mis amigos de la facultad: Romi, Sol, Emi, Mel, Agos, Colo, Emi C. y Rodri, por todos los momentos compartidos en estos años facultativos, por su amistad, por su paciencia y confianza, por acompañarme y aconsejarme en la vida. No podría elegir otros amigos.
- A mis amigas de Paraná, que a la distancia, estuvieron para mí todos estos años. A mis amigas de entrenamiento, gracias por hacer más divertida la actividad física y por su compañerismo.

Índice

Agradecimientos.....	4
Resumen.....	6
Introducción.....	7
Materiales y Métodos	17
1. Recolección de muestras de suelo	17
2. Caracterización de suelos de Pipanaco y La Antigua.....	17
3. Análisis químicos de muestras de suelo	21
4. Plantas trampa de <i>Prosopis flexuosa</i> y colecta de diversidad de rizobacterias en nódulos	21
5. Crecimiento en plantas trampa de <i>P. flexuosa</i>	21
6. Aislamiento de rizobacterias	21
7. Extracción de ADN total de bacterias y análisis de patrones de amplificación de fragmentos repetidos al azar con primer BoxA1	22
8. Análisis de los patrones electroforéticos	23
9. Evaluación de la tolerancia de rizobacterias aisladas a estrés salino.	23
10. Nodulación de <i>P. flexuosa</i> con rizobacterias tolerantes a salinidad.	24
11. Determinación del contenido de ureidos.	24
Resultados.....	25
Pipanaco y La Antigua: Caracterización química de suelos y <i>Prosopis flexuosa</i> como plantas trampa para estudios de diversidad de rizobacterias	25
Diversidad de rizobacterias obtenida usando plantas trampa de <i>Prosopis flexuosa</i>	26
Aislamiento de rizobacterias a partir de nódulos de plantas trampa de <i>P. flexuosa</i>	29
Rizobacterias aisladas de nódulos: patrones rep_PCR y variabilidad.....	31
Evaluación de la tolerancia a la salinidad en vida libre de rizobacterias aisladas.....	37
Reinoculación de <i>P. flexuosa</i> con aislamientos seleccionados.....	38
<i>Promoción de crecimiento de P. flexuosa.</i>	38
<i>Cuantificación de ureidos.</i>	43
Discusión y conclusiones	46
Bibliografía.....	51
Información complementaria.....	55

Resumen.

Los bosques nativos argentinos, con su gran variedad de ecosistemas, brindan distintos servicios ecosistémicos. En función de la variabilidad climática, edáfica y geomorfológica, en la región Monte, la vegetación se caracteriza por ser un mosaico de distintos tipos de comunidades. En la subregión del Chaco árido, rodeada por sierras que actúan como barreras restringiendo las precipitaciones, se encuentran salinas. Tanto en el Monte como en el Chaco árido, crece entre otras especies, *Prosopis flexuosa*, una leguminosa forestal que además de proporcionar sombra, leña, madera y alimentos, poseen la capacidad de asociarse simbióticamente con rizobacterias para captar nitrógeno atmosférico.

El objetivo de este trabajo fue conocer la diversidad de rizobacterias presentes en ambientes de los salares de “Pipanaco” en Catamarca y “La Antigua” en La Rioja, en la región del Chaco Árido, que se asocian en simbiosis con *P. flexuosa*.

Para capturar la diversidad de rizobacterias con capacidad de establecer simbiosis con *P. flexuosa*, se recolectaron muestras de suelo en dos sitios de cada salar y sembraron semillas de *P. flexuosa*, 30 repeticiones por sitio, en macetas que se mantuvieron 90 días en invernadero, como plantas trampa. En los suelos se determinaron variables químicas y en las plantas, parámetros de crecimiento y nodación.

Las plantas trampa que crecieron en suelo proveniente del sitio La Antigua_2 que posee una CE de 62,5 dS/m no desarrollaron nódulos y crecieron significativamente menos. Contrariamente, en suelo de La Antigua_1, donde la CE fue de 9,7 dS/m, *P. flexuosa* desarrollaron mayor cantidad de nódulos. Las plantas crecidas en suelos de Pipanaco_1 y Pipanaco_2 no mostraron diferencias significativas en el número de hojas, altura ni cantidad de nudos.

Se procesaron aproximadamente el 10% del total de nódulos cosechados de los cuales se aislaron rizobacterias para analizar polimorfismos genéticos por medio de rep-PCR con primer BOX A1R. Los polimorfismos, evaluados por UPGMA a partir de los patrones moleculares de cada sitio, obtenidos en geles de agarosa, permitieron establecer que la mayor diversidad se observó en La Antigua_2. A partir de ello, se seleccionaron un conjunto de 21 aislamientos con más de 60% de distancia entre sí, según el índice de Dice. Quince de los 21 aislamientos seleccionados de los clusters obtenidos en cada sitio, fueron capaces de crecer en vida libre en medio conteniendo 500mM de NaCl.

En un segundo ensayo de nodulación, se inocularon semillas de *P. flexuosa*, en sustrato estéril con los 21 aislamientos de modo independiente con 6 replicas cada uno. A los 60 días se determinaron parámetros de crecimiento y se observó que los aislamientos 13 y 27 aportaron mayormente al crecimiento respecto del control no inoculado y de los otros aislamientos.

En los nódulos de crecimiento indeterminados obtenidos en estas asociaciones, se estableció que el N₂ fijado en *P. flexuosa* es transportado en forma de ureidos como alantoína y alantoato.

Este trabajo aporta información relevante de las interacciones simbióticas que ocurren en áreas salinas en el Chaco Árido, entre *P. flexuosa* y rizobacterias y ha permitido seleccionar un conjunto de aislamientos candidatos para ser utilizados como inoculantes a fin de mejorar la instalación de plantaciones tanto con fines de restauración como en el establecimiento de rodales con fines productivos. Es, según nuestro conocimiento, el primer reporte para *P. flexuosa* que el N₂ fijado biológicamente se transporta en forma de ureidos

Palabras claves: *Prosopis flexuosa*, simbiosis, rizobacterias.

Introducción

Los bosques nativos argentinos, con su gran variedad de ecosistemas que incluyen desde selvas subtropicales hasta bosques subantárticos, brindan distintos servicios ecosistémicos tales como alimentos, agua, madera, regulación del clima, control de la erosión, aspectos recreativos, belleza escénica, formación de suelos y ciclo de nutrientes (Peri *et al.*, 2021). Pero cada vez es más intensa y acelerada su pérdida ocasionado por la fragmentación de hábitats, lo cual es debido a la expansión de las fronteras agrícolas, incremento del tamaño de las ciudades y actividades antrópicas relacionadas a la deforestación (Díaz *et al.*, 2020). En nuestro país la reducción de bosques ha alcanzado una magnitud muy significativa (FAO 2015), la calidad de vida del hombre se ve afectada negativamente por la eliminación a gran escala de las masas boscosas ya que producen cambios en el ambiente físico con alteraciones en el clima local, regional y global (Gavier y Bucher, 2004).

Este trabajo se llevó a cabo con muestras colectadas en los salares de Pipanaco y La Antigua en las provincias de Catamarca (Monte) y La Rioja (Chaco Árido) respectivamente.

La región del Monte ocupa el oeste árido de la Argentina (Fig. 1) con precipitaciones medias anuales entre los 30 y 400 mm, y temperaturas medias que varían entre 13° y 19°C (Labraga y Villalba, 2009). En función de la variabilidad climática, edáfica y geomorfológica, la vegetación se caracteriza por ser un mosaico de distintos tipos de comunidades. La estepa de arbustos dominada por especies de la familia Zygophyllaceae (*Larrea* spp. y *Bulnesia retama*) es la comunidad característica. En las zonas con mayor disponibilidad hídrica aparecen bosques dominados por especies del género *Prosopis*, que forman unidades boscosas de distinta magnitud en el fondo de valles y bolsones. El estrato arbóreo abierto está dominado por *P. flexuosa* o *P. chilensis*, acompañados por *Geoffroea decorticans*; mientras que el estrato arbustivo es dominado por *Atamisquea emarginata*, *Larrea divaricata*, *Suaeda divaricata*, *Atriplex lampa* (Villagra *et al.*, 2021).

La cuenca hidrogeológica del *Salar de Pipanaco* cubre un área total de 17200 Km², está localizada aproximadamente entre los 66° 00' y 67° 15' de longitud oeste y 26° 50' de latitud sur (Zarantonello *et al.*, 1999). Está constituida por numerosos ríos y arroyos que convergen en una depresión central. Limita al Norte, Oeste y Este con las altas montañas y al sur por una planicie. Abarca íntegramente, el departamento de Pomán, la mayor parte de los departamentos de Belén y Andalgalá, y parte sudeste de Tinogasta en la Provincia de Catamarca (Paoli *et al.*, 2011).

El Chaco árido abarca el este de Catamarca y La Rioja, el norte de San Luis, el noroeste de Córdoba y el sudoeste de Santiago del Estero (Fig. 1). Esta subregión está rodeada por sierras que actúan como barreras que restringen las precipitaciones, las cuencas que se forman son autóctonas y endorreicas y la evapotranspiración es superior al aporte de agua. Todo esto saliniza los suelos y promueve la formación de salinas. Las Salinas Grandes son las más extensas de Argentina, con 8400 km² y se extienden por Catamarca, Córdoba, La Rioja y Santiago del Estero. En esta región, la salinidad condiciona el crecimiento de la vegetación y se encuentran distintos tipos abásales, tales como jume (*Suaeda* sp. y *Allenrolfea* sp.) y jarillas (*Larrea* sp.) la cual es típica del Monte también y *Prosopis flexuosa* (Sarmiento *et al.*, 2021).

En el sector sureste de la provincia de La Rioja, entre la sierra Brava y la planicie aluvial del río Salado, se destaca la salina de *La Antigua*, una depresión de aproximadamente 60

km de largo y 7 km de ancho. Los depósitos de esta salina se han formado por la evaporación de lagos efímeros. Los ciclos repetitivos de llegada de agua con sedimentos finos y posterior evaporación generan una sucesión cíclica de finas capas de fango que es cubierto por sales cuando el agua se evapora (Candiani *et al.*, 2017).

Figura 1: Regiones forestales de la Argentina (UMSEF 2014). En color amarillo oscuro la región del Monte y en color verde el Parque Chaqueño. Extraído del libro “Usos sostenibles del bosque. Aportes desde la silvicultura Argentina”.



Las especies de algarrobos son un componente muy importante de la vegetación, ya que proporcionan sombra, leña, madera y alimentos a través de sus frutos con un alto valor nutritivo para seres humanos y animales (Villagra, 2000). La madera de algarrobo es muy valorada por ser consistente y duradera y por este motivo ampliamente explotado en la Argentina desde hace siglos (Roig *et al.*, 1992; Abraham y Prieto 1999).

El género *Prosopis* es un grupo filogenéticamente antiguo dentro de la subfamilia *Mimosoideae*, y la familia Fabácea. Posee una amplia distribución, principalmente en las zonas áridas y semiáridas del mundo, con 44 especies ubicadas principalmente en América del Sur, América del Norte, este de Asia y centro y norte de África (Passera, 2000), de las cuales 4 pertenecen al viejo mundo, y el resto son americanas, donde Argentina posee la mayor cantidad de especies, veintiocho en total y de ellas trece endémicas (Burkart, 1976).

En Argentina es posible encontrar variados tipos biológicos de *Prosopis*, como subarbustos, arbustos y árboles que en su gran mayoría se comportan como oportunistas respecto del uso del agua, es decir con ocurrencia de pulsos de crecimiento en momentos de disponibilidad hídrica y receso vegetativo durante las etapas de sequía. Posee además adaptaciones morfo-fisiológicas que le confieren aptitud para vivir en ambientes xéricos. Otra característica de los *Prosopis* es la gran variedad de ecotipos y biotipos que muestran, bajo características morfológicas semejantes, diferentes respuestas fisiológicas (Passera, 2000).

La especie *Prosopis flexuosa*, llamada vulgarmente “algarrobo dulce”, “algarrobo negro”, “árbol negro” o “lámbaro”, fue descrita por primera vez por De Candolle en 1825. Presenta una amplia distribución en las regiones áridas de Sudamérica, en el centro-norte de Chile y el oeste árido de Argentina, donde abarca la diagonal árida al este de la cordillera de los Andes, comprendiendo parte de las provincias de Salta, Tucumán, Catamarca, La Rioja, San Juan, Mendoza, San Luis, el oeste de Córdoba, La Pampa, el suroeste de Buenos Aires y norte de Río Negro, que corresponden a las provincias fitogeográficas del Monte, Chaqueña, del Espinal, Pampeana y Prepuneña (Oyarzabal *et al.*, 2018). En cuanto a los usos etnobotánicos y comerciales, las algarrobos de *P. flexuosa* era recolectadas por los pueblos originarios para consumo en cuanto al uso medicinal, con las semillas molidas y fermentadas se produce una bebida con propiedades diuréticas y la infusión preparada con hojas se utiliza como anticatarral y las hojas machacadas en infusión se usa para lavaje de ojos

(Roig, 2001, Roig, 1993b). Al igual que las otras especies arbóreas de algarrobo, *P. flexuosa* proporciona alimento, sombra y follaje para el ganado doméstico y postes, leña, carbón para uso humano (Alvarez y Villagra, 2009).

La salinidad afecta aproximadamente el 20% de las tierras cultivables en el mundo, y Argentina es el tercer país, luego de Rusia y Australia, en poseer suelos salinizados que comprenden aproximadamente el 11 % del territorio (Taleisnik y López Launestain, 2010). En ambientes degradados el incremento de la cobertura con especies de gramíneas para reducir la erosión y la incorporación de árboles, arbustos adaptadas a sequía y/o salinidad y forrajeras fijadoras de nitrógeno que incrementan el volumen de nutrientes del suelo son abordajes que permiten la recuperación de áreas degradadas y la reducción del impacto de los estreses abióticos (Le Houérou, 1995). La presencia de especies forestales nativas, en especial del género *Prosopis* y los microorganismos que interactúan con ellos contribuye a la mejora de suelo en ambientes degradados (Sgroy *et al.*, 2009).

Como el resto de las leguminosas, *Prosopis flexuosa* es capaz de establecer simbiosis fijadora de nitrógeno (N) con rizobacterias del suelo. La simbiosis fijadora de N entre rizobacterias y leguminosas poseen gran importancia ecológica dado que representa una cuarta parte del nitrógeno que se fija anualmente en la tierra. Involucra a la mayoría de las 18.000 especies de leguminosas junto con una colección en expansión de α y β -proteobacterias (Masson-Boivin, 2009). Ha sido descrita una amplia diversidad de microorganismos simbiotes capaces de colonizar *Prosopis* en varias regiones áridas y semiáridas en el mundo, entre ellas el Chaco árido argentino (Iglesias 2007, Räsänen *et al.*, 2001).

El establecimiento de simbiosis entre plantas hospedadoras y rizobacterias simbióticas es un proceso de múltiples pasos. La percepción de las señales emitidas por las raíces de las plantas, principalmente flavonoides exudados por las raíces, son percibidos por las rizobacterias en la rizosfera a través de sus receptores (Fig. 2). Las proteínas NodD a su vez inducen en las rizobacterias los genes de nodulación (nod) para la síntesis de moléculas señalizadoras bacterianas denominados Factores Nod (FN), los cuales son percibidos por un receptor. La percepción del factor Nod inicia una cascada de transducción de señales aguas abajo (Caetano-Anollés and Gresshoff 1991; Dénarié *et al.* 1996; Spaink 2000) Un determinante importante de la especificidad huésped-simbiote se atribuye a los diferentes sustituyentes unidos al esqueleto del oligosacárido (Lerouge *et al.*, 1990; Dénarié *et al.*, 1996)

La presencia de especies de rizobios compatibles y su correspondiente FN es generalmente suficiente para desencadenar el desarrollo de nódulos. La unión de los rizobios a los pelos estimula la deformación del mismo en un plazo de 6 a 8 h y también promueve la división de células corticales (Yao and Vincent 1969; Bhuvaneshwari *et al.*, 1981; Bhuvaneshwari and Solheim 1985).

Las bacterias envueltas en membrana continúan dividiéndose dentro de las células huésped antes de que se diferencien en bacteroides y comiencen a fijar nitrógeno. Entre el interior del nódulo y las células vecinas, la planta y los bacteroides intercambian nutrientes esenciales. El transporte pasivo impulsado por el potencial de membrana a través de la membrana peribacteroide facilita la absorción de nutrientes en los simbiosomas (Udvardi and Day 1997). Estos mecanismos permiten la asimilación de fotosintatos en el nódulo y la exportación de varios compuestos, incluido el nitrógeno fijado, a la raíz.

Existen dos tipos morfológicos principales de nódulos en las leguminosas: determinados e indeterminados. Las diferencias entre los dos tipos de nódulos son el sitio de las primeras divisiones celulares internas, el mantenimiento de una región meristemática y la forma de los nódulos maduros (Newcomb *et al.*, 1979; Gresshoff and Delves 1986; Rolf and Gresshoff 1988).

Los nódulos indeterminados tienen un meristema más persistente, lo que da como resultado nódulos de forma cilíndrica. El meristema apical produce continuamente nuevas células que se infectan con bacterias. En la madurez, contienen una población heterogénea de bacteroides fijadores de nitrógeno debido a la continua actividad de división celular, lo que da lugar a un gradiente de estados de desarrollo a medida que el nódulo continúa elongándose. Estos nódulos también tienen un sistema vascular diferente y menos ramificado que los nódulos determinados.

Los nódulos determinados, por otro lado, suelen ser esféricos, carecen de un meristema persistente y no muestran un gradiente de desarrollo evidente. En la madurez, contienen una población relativamente homogénea de bacteroides fijadores de nitrógeno, ya que la diferenciación de las células infectadas se produce de forma sincrónica, seguida de la senescencia. Estos nódulos tienen una vida útil de unas pocas semanas. Cuando los nódulos viejos envejecen, se forman nuevos en las porciones de la raíz que se han desarrollado recientemente (Ferguson *et al.*, 2010).

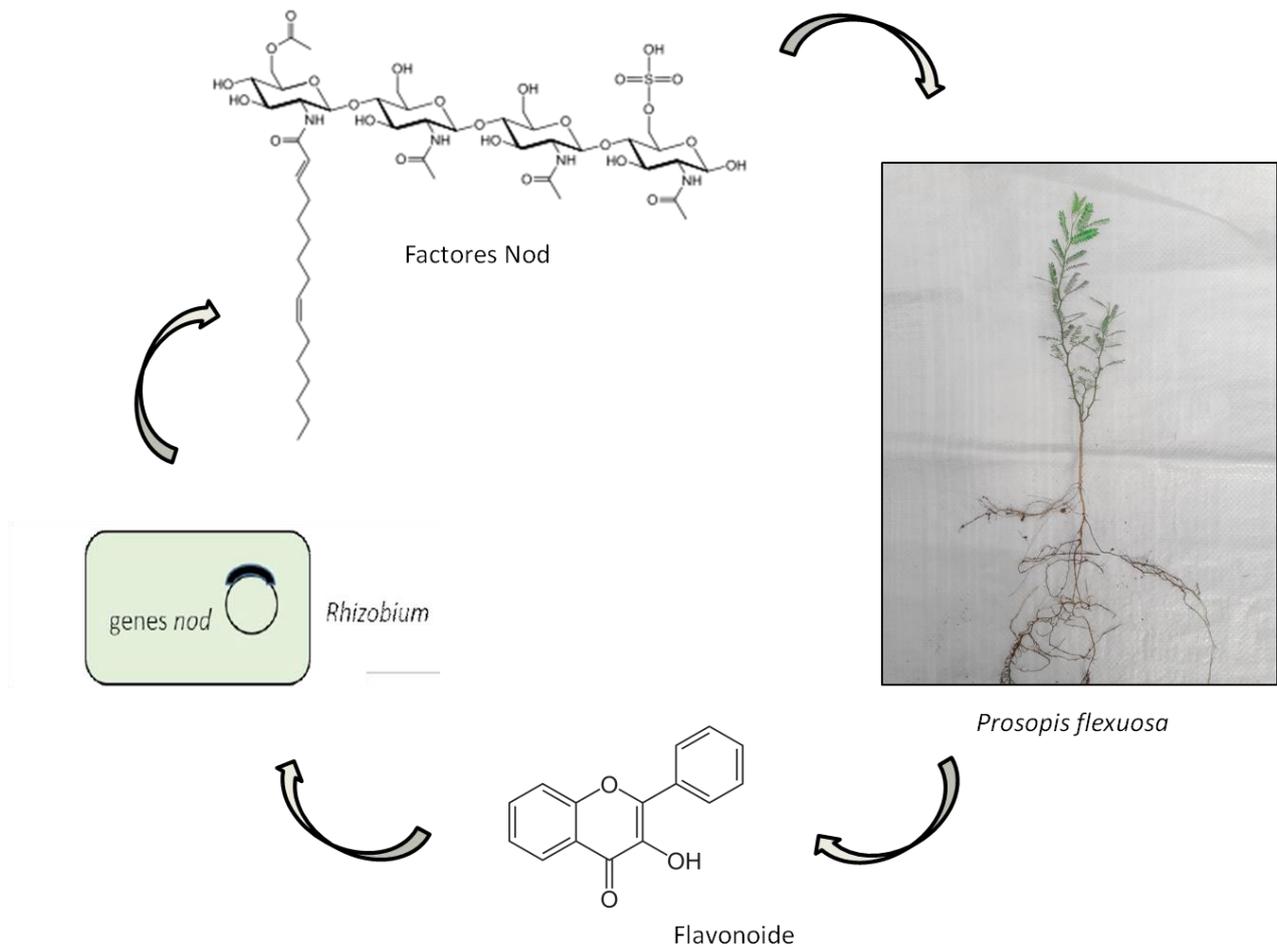


Figura 2: Esquema del establecimiento de simbiosis entre plantas hospedadoras y rizobacterias simbióticas.

El producto primario, luego de la reducción del N_2 , por actividad del complejo Nitrogenasa en bacteroides, es el amonio (NH_4^+), que es secretado al citoplasma de las células del hospedante para ser asimilado en compuestos carbonados para el transporte. En relación a la asimilación del NH_4^+ , las leguminosas pueden ser clasificadas en transportadoras de amidas o de ureidos, dependiendo de la composición en el fluido xilemático de plantas noduladas (Schubert, 1986). Las leguminosas transportadoras de amidas, exportan asparagina, glutamina y 4-metilenglutamina, mientras que las transportadoras de ureidos exportan alantoina, ácido alantoico y citrulina. Además, se ha propuesto que en general las leguminosas originarias de climas templados son principalmente transportadoras de amidas, mientras que las leguminosas de regiones tropicales son principalmente transportadoras de ureidos. Cabe señalar que pueden detectarse niveles bajos de amidas en leguminosas transportadoras de ureidos y viceversa, y que las proporciones absolutas y relativas pueden variar con el estadio de desarrollo y las condiciones ambientales (Schubert, 1986). No obstante, los estudios sobre el transporte de ureidos o amidas en leguminosas y su relación con el ambiente han sido realizados principalmente en plantas cultivadas pero no en árboles, por lo que se desconoce el valor agroforestal acerca de la diferencia en asimilación del NH_4^+ para su transporte en especies leñosas (Nygren et al. 2012).

Específicamente para el género *Prosopis*, al presente no ha sido reportado el modo en que el nitrógeno fijado biológicamente es asimilado por la planta.

La taxonomía de rizobios que nodulan *Prosopis* en Argentina es aún poco conocida. Nuestro grupo caracterizó un conjunto de aislamientos de rizobacterias, pertenecientes a los géneros *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Sinorhizobium* aisladas de nódulos de *P. alba* de la región Chaqueña y fue la primera vez que estos dos últimos géneros se describieron como simbioses de *Prosopis* (Chávez et al., 2013). Con algunos de estos aislamientos de rizobacterias se evaluó que *P. alba* en simbiosis posee mayor tolerancia a estrés hídrico que las plantas no inoculadas (Salto et al., 2015). Por otro lado, se ensayaron los niveles de fertilización con NO_3 y la compatibilidad con el desarrollo y mantenimiento de nódulos funcionales (Salto et al., 2017, Salto et al., 2019). Asimismo, se validaron dos aislamientos rizobianos, ambos provenientes del Chaco semiárido donde se verificó el efecto benéfico y la promoción del crecimiento de *P. alba* en simbiosis y restricciones de suministro de nitrato (Mario et al., 2021).

Para *Prosopis flexuosa* que en Argentina, como se mencionó antes, se distribuye en la subregión del Chaco árido y Monte, se desconoce la diversidad y el/los géneros de rizobacterias que establecen simbiosis, y el modo en que este mutualismo contribuye a la adaptación de *P. flexuosa* a estreses ambientales y en particular a estrés salino. El conocimiento y la selección de aislamientos de rizobacterias con potencial de contribuir a la adaptación a estos ambientes, abre la posibilidad de su empleo como biofertilizante para esta especie.

Se plantean las siguientes hipótesis de trabajo:

- Es posible aislar rizobacterias capaces de establecer simbiosis con *P. flexuosa* en las zonas del salar “Pipanaco” en Catamarca y “La Antigua” en La Rioja.
- Las rizobacterias simbióticas de *P. flexuosa* colectadas en “Pipanaco” y “La Antigua” poseen polimorfismos genéticos y la diversidad de especies de rizobacterias en el suelo disminuye con el incremento de la salinidad.
- Es posible seleccionar microorganismos adaptados a salinidad y ensayarlos para la formulación de un inoculante que contribuya a la implantación y sobrevivencia de *P. flexuosa*.

Objetivo general:

Aislar y caracterizar en base a polimorfismos genéticos y por su adaptación a salinidad, la diversidad de rizobacterias en la región de “Pipanaco” en Catamarca y “La Antigua” en La Rioja y evaluar su capacidad de establecer simbiosis fijadora de N₂ con *Prosopis flexuosa*.

Objetivos específicos:

- Aislar rizobacterias a partir de nódulos de plantas trampa de *Prosopis flexuosa* crecidos en muestras de suelo de los salares “Pipanaco” y “La Antigua”.
- Analizar la diversidad de las rizobacterias aisladas mediante amplificación por PCR de fragmentos repetidos al azar usando el primer BOX A1.
- Seleccionar un conjunto de aislamientos y evaluar su tolerancia en vida libre a salinidad por NaCl en medios de cultivo.
- Determinar la eficiencia de las rizobacterias seleccionadas para contribuir a la fijación biológica de nitrógeno (FBN) en plantas de *P. flexuosa* evaluando parámetros de crecimiento y contenido de ureidos.

Materiales y Métodos

1. Recolección de muestras de suelo

Se recolectaron y georeferenciaron muestras de suelo en las zonas de distribución de *P. flexuosa* (Fig. 3), dos en el salar de Pipanaco en Catamarca y dos en La Antigua, ubicado en la provincia de La Rioja. Los puntos de muestreos son:

- Pipanaco 1: 27°45'57''S - 66°23'52''O
- Pipanaco 2: 28°10'20''S - 66°8'31''O
- La Antigua 1 (peri-salina): 29°48'58''S - 66°06'38''O
- La Antigua 2 (salina): 29°48'57''S - 66°06'36''O

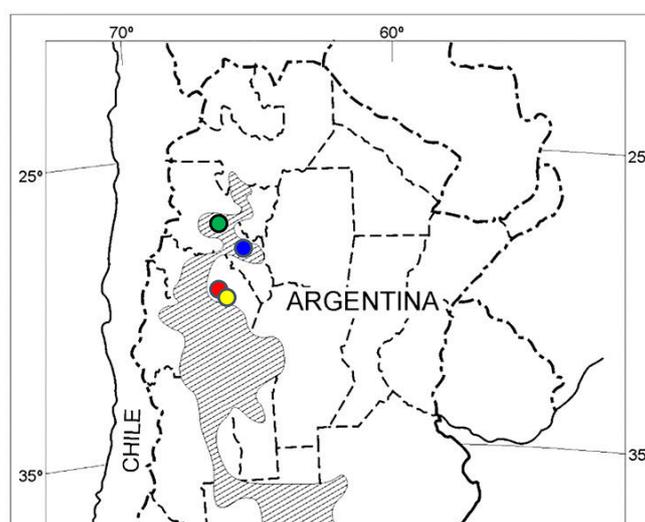


Figura 3: Mapa de distribución de *Prosopis flexuosa* var. *flexuosa*. (Adaptado de Álvarez y Villagra 2009 extraído de Moreno *et al.*, 2018). En círculos de colores se muestran los sitios de muestreos.

Las muestras de suelo se extrajeron debajo de la copa de los árboles, a una profundidad de 25 cm, previo retiro de la hojarasca superficial. Se realizaron dos muestreos en Pipanaco y dos en La Antigua con tres sub-muestras en cada uno de ellos. Las muestras se conservaron refrigeradas hasta su uso para la siembra de semilla de *P. flexuosa* en condiciones controladas de invernadero.

2. Caracterización de suelos de Pipanaco y La Antigua

En dos sitios de cada uno de los salares de Pipanaco, Catamarca y La Antigua, La Rioja se recolectaron muestras de suelo que se identificaron como Pipanaco_1, Pipanaco_2, La Antigua_1 y La Antigua_2.

Las muestras de suelo en La Antigua_1, fueron colectadas en la peri-salina. El suelo se encontraba cubierto parcialmente con vegetación entre las que se observaron además de *Prosopis flexuosa*, *Plectrocarpa tetracantha*, *Opuntia sp.*, *Atriplex cordobensis*, *Geoffroea sp.*, Palo cruz (*Tabebuia nodosa*), Vinagrillo (*Grahamia bracteata*), Chaguar, Tintitaco (*Prosopis torquata*), *Prosopis strombulifera*, Quebracho blanco (*Aspidosperma quebracho-blanco*), *Maytenus viscifolia*. Contrariamente, las muestras de La Antigua_2, se extrajeron de un peladar en la salina con muy escasa vegetación.

En Pipanano_1 y Pipanaco_2, se observó además de *P. flexuosa*, la presencia de *P. chilensis* y *Larrea divaricata*, (jarilla). Los árboles se ubicaban muy espaciados y sin presencia de estrato bajo. Se ha descrito que en Pipanaco las precipitaciones anuales son inferiores a 100 mm y acontecen entre diciembre y febrero. La temperatura media anual es de 19 °C, y alcanza hasta 45 °C en verano, mientras en invierno desciende hasta los -8°C (Sosic, 1973).

Figura 4: Sitio de muestreo **A**. La Antigua_1, en peri salina, La Rioja. **B**. La Antigua_2, salar. La Rioja.

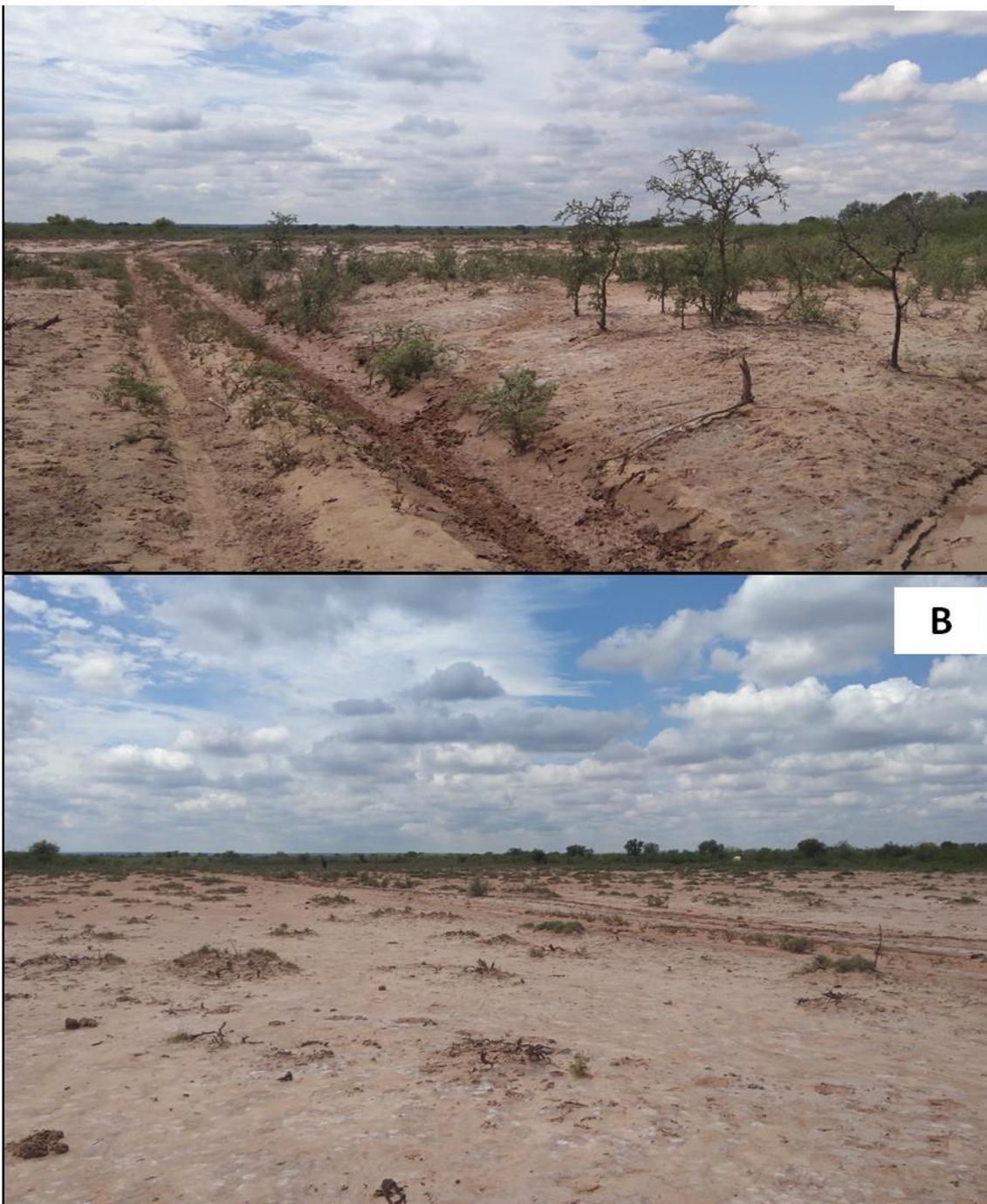


Figura 5: Sitio de muestreo **A.** Pipanaco_1, Catamarca. **B.** Pipanaco_2, Catamarca.

B



3. Análisis químicos de muestras de suelo

En las muestras de suelo se determinaron cationes en extracto (meq/L): Ca⁺², Mg⁺², Na⁺², K⁺; Materia Orgánica (%); Carbono Orgánico (%); Nitrógeno total (%; Relación C:N; pH y Conductividad Eléctrica (CE, dS/m). Los análisis fueron realizados por el servicio del Laboratorio de Suelo y Agua (LABSA) de la Facultad de Ciencias Agropecuarias-UNC.

4. Plantas trampa de *Prosopis flexuosa* y colecta de diversidad de rizobacterias en nódulos

Semillas de *Prosopis flexuosa* provenientes de un rodal semillero de Pipanaco en Catamarca, se escarificaron mecánicamente raspándolas sobre un papel lija fina, se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio 5%, a partir de solución comercial 55g/L, durante 10 min, se enjuagaron con abundante agua y se embebieron durante 24 h en agua a 4° C.

Se sembraron dos semillas por maceta de 3 L conteniendo como sustrato una mezcla 1:1 de arena y suelo de cada uno de los sitios de muestreo con 15 repeticiones. Se regaron con agua destilada y se mantuvieron en invernadero durante 3 meses hasta la cosecha de los nódulos para análisis de la diversidad de rizobacterias presentes en el suelo. Los nódulos se conservaron en tubos con sílica gel a 4 °C hasta su procesamiento.

5. Crecimiento en plantas trampa de *P. flexuosa*

Las plantas trampa se cosecharon a los 90 días y se determinó altura, largo de la raíz, número de nudos, número de hojas y número de nódulos.

Con los resultados de los parámetros de crecimiento y la caracterización de los suelos, se realizó un análisis multivariado, de Componentes Principales (ACP), con el software Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2020).

6. Aislamiento de rizobacterias

Los nódulos obtenidos de las plantas trampa se emplearon para aislar las rizobacterias usando el protocolo descrito en Chávez Díaz *et al* (2013). Brevemente, se desinfectaron con alcohol al 70% durante un minuto y con hipoclorito de sodio al 5% (V/V) durante 20 min., luego se lavaron con abundante agua destilada. Los nódulos se machacaron con varillas de vidrio estériles en campana de flujo laminar y el líquido del macerado se distribuyó por estriado con ansa en medio sólido LMA con rojo congo (Vincent, 1970,

ver Anexo 1). Las placas se incubaron en estufa de 3 a 5 días a 28 °C. Se realizaron subcultivos en igual medio y condiciones hasta obtener un tipo uniforme de morfología de colonias (color, mucosidad, diámetro, transparencia, elevación) y ausencia de otros contaminantes.

Colonias desarrolladas en medio sólido, fueron repicadas a medio LMA líquido y crecidas en agitador orbital a 120 rpm, 28 °C durante 3 a 5 días. Los cultivos se realizaron por duplicado, uno se empleó para la extracción de ADN y el otro se conservó con 50% de glicerol estéril a -80 °C para el establecimiento de una colección de rizobacterias simbioses de *P. flexuosa*.

Por otra parte, cultivos puros de *Bradyrhizobium japonicum* USDA 138 y *B. japonicum* SEMIA5079; *Mesorhizobium loti* MAFF303099 y *M. loti* LL12; *Mesorhizobium Chacoense* LMG19008; *Sinorhizobium meliloti* Sm2011 y *S. meliloti* Sm1021; *Rhizobium etli* 55N1 y *R. etli* SC15 fueron crecidos en LMA líquidos para extracción de ADN.

7. Extracción de ADN total de bacterias y análisis de patrones de amplificación de fragmentos repetidos al azar con primer BoxA1

La extracción de ADN total se realizó a partir de cultivos líquidos bacterianos crecidos en medio LMA usando el protocolo de CTAB adaptado de Ausubel 1987 (ver Anexo 1).

Para obtener los amplificadores de secuencias intercaladas repetidas al azar (rep-PCR fingerprinting) con el primer BOX-A1R se utilizaron 1µl ADN bacteriano (entre 20-50 ng/µL) y el primer 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3' (Versalovic *et al.*, 1994). La reacción de PCR, de 20 µL de vol. final, contuvo: 1 µl ADN bacteriano, 2 µL dNTPs (2 mM); 1,5 µL Primer BOX (50pmol/µL), 4 µL Buffer + loading GoTaq (5X); 0,2 µL Taq polimerasa (2U/µL, GoTaq Promega) y 11,3 µL de H₂O miliQ.

Las condiciones de ciclado fueron: 95 °C 7 min; 35 ciclos de 94 °C 1 min, 53 °C 1 min y 65 °C 8 min y un ciclo de extensión final a 65 °C 16 min.

Para verificar la calidad de los amplificadores, preliminarmente, los productos de PCR se separaron en geles de agarosa 0.8% en buffer TAE (ver Anexo 1) y se tiñeron con 0,025% Gel Red®, se visualizaron bajo luz UV y se digitalizaron usando un transiluminador (ChemiDoc XRS+ BioRad).

Para el análisis del patrón de amplificación se realizaron geles de agarosa 1,5%, de 15 x 20 cm, en buffer TBE (ver Anexo 1). En cada calle del gel se sembraron 7 µL de producto de PCR diluido con 7 µL de H₂O. Se sembraron 3 µL del marcador de peso

molecular 1Kb (Promega, ver Anexo 1). La electroforesis se realizó durante 3,5 h a 120 V/cm a 4 °C.

8. Análisis de los patrones electroforéticos

Los patrones de amplificación, rep-PCR fingerprinting con primer BOX-A1 se analizaron usando el software Gel Compare II versión 4.6 (Applied Math Kortrijk, Bélgica). Los patrones de electroforesis se evaluaron mediante un análisis de clusters con el método UPGMA (“unweighted pair-group method with arithmetic mean” o método aritmético usando promedio no ponderado de pares de agrupamientos), en base a una matriz de similitud basada en el coeficiente de Dice, definido como: $S_{ij} = 2a / (2a + b + c)$, siendo a= la presencia de la banda en ambos individuos comparados, b= la presencia de la banda en el primer individuo y no en el segundo y c= la presencia de la banda en el segundo individuo y no en el primero. La matriz binaria de similitud generada por UPGMA y el coeficiente de Dice se usaron para realizar un análisis de coordenadas principales (ACoP) para evaluar las relaciones entre los aislamientos. Este análisis se efectuaron con el software Infostat (Di Rienzo *et al.* 2020).

A partir de este análisis de diversidad junto a una tabla de contingencia (matriz de distancias), generada desde el ACoP, se seleccionaron un conjunto de aislamientos para ensayar tolerancia a estrés salino en vida libre y posibilidad de mantener su capacidad simbiótica con *P. flexuosa*.

9. Evaluación de la tolerancia de rizobacterias aisladas a estrés salino.

Un conjunto de aislamientos seleccionados a partir del análisis de CLUSTER por UPGMA y distancia de Dice, considerando que poseían menos de 60% de similaridad, fueron evaluados por su tolerancia a condiciones de estrés salino. Brevemente, a partir de un cultivo sólido en medio LMA se seleccionó una colonia que se incubó de 3 a 4 días a 28 °C en 3 mL de LMA líquido. A partir de este tubo, que se consideró tubo -1, se realizaron diluciones seriadas al décimo en solución fisiológica hasta una dilución de -9. Se sembraron 100 µL de las diluciones -9 por triplicado en placas de LMA solido conteniendo de 0, 100, 250 y 500 mM NaCl. El recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) se realizó a los 4 días desde la siembra según la siguiente ecuación:

$UFC.mL^{-1} = N^{\circ} \text{ de colonias contadas} * 10 * \text{factor de dilución.}$

Las colonias que resultaron con mayor nivel de tolerancia a NaCl en vida libre, fueron crecidas en 30 mL de medio LMA líquido durante 5 días, centrifugadas 20 min a 9000xg y suspendidas en agua para obtener a una DO₆₀₀ de 0.4 para ser ensayadas en su capacidad de inducir nódulos en *P. flexuosa*.

10. Nodulación de *P. flexuosa* con rizobacterias tolerantes a salinidad.

Las rizobacterias seleccionadas por su tolerancia a NaCl en vida libre, se evaluaron por su capacidad de nodulación y promoción del crecimiento en *P. flexuosa*. Semillas escarificadas se sembraron en tubetes forestales de 400 mL conteniendo vermiculita estéril, y se inocularon con 100 µL de los aislamientos tratados como se describió precedentemente. Los tubetes se mantuvieron en invernadero regadas alternadamente con agua y medio B y D (Broughton and Dilworth, 1971) (ver Anexo 1) con contenido reducido de NO₃. Las plantas fueron cosechadas a los 60 d. y se evaluó altura, número de nudos con hojas y nodulación.

11. Determinación del contenido de ureidos.

En plantas inoculadas y no inoculadas se determinó el contenido de ureidos totales en hojas, raíces y nódulos. Brevemente, los tejidos fueron homogenizados con N₂ líquido en mortero hasta obtener un polvo fino. La fracción soluble se extrajo colocando 100 mg de polvo con 1,5 mL de Buffer K₃PO₄ 25 mM pH 6 durante 20 min a 100 °C. Las muestras se centrifugaron a 2000 xg 10 min y el sobrenadante se conservó para la posterior hidrólisis alcalino-ácida de alantoina. El contenido de ac. alantoico (alantoato) y alantoína se determinó por absorbancia a 520 nm mediante el análisis diferencial de derivados de glioxalato. (Lescano, 2020, ver Anexo 1)

12. Análisis estadísticos.

La comparación de medias para variables como número de nudos, número de hojas y número de nódulos, cuya distribución es binomial negativa, se realizó usando modelo lineal generalizado mixto (MLGM). Las variables continuas (altura, largo de raíz, etc) se analizaron como modelos lineales generales y mixtos con el software Infostat (Di Rienzo *et al.* 2020).

Resultados

Pipanaco y La Antigua: Caracterización química de suelos y *Prosopis flexuosa* como plantas trampa para estudios de diversidad de rizobacterias

En las muestras de suelo obtenidas en los salares de Pipanaco y La Antigua se determinaron cationes, C, N, materia orgánica, pH y Conductividad eléctrica (Tabla 1)

Tab
ob

		Pipanaco_1	Pipanaco_2	La Antigua_1	La Antigua_2
Conductividad (dS/m)	CE	25,1	20	9,7	62,5
pH	pH	6,7	6,2	7,3	8,2
Cationes (meq/L)	Na ⁺	11,66	16,42	14,33	56,09
	K ⁺	31,46	36,42	2,86	5,71
	Ca ²⁺	356,73	344,86	21,11	20,98
	Mg ²⁺	30,36	147,8	4,69	5,24
C y N (%p/p)	C Total	1,68	1,2	0,34	0,32
	N total	0,153	0,118	0,038	0,038
	Relación C:N	10,98	10,17	8,95	8,42
Materia Orgánica (%)	MO	2,89	2,07	0,59	0,56

En cuanto al contenido de cationes, las muestras provenientes de La Antigua poseen alrededor de 16 veces menos Ca²⁺ que las de Pipanaco. En Pipanaco_2 los niveles de Mg²⁺ fueron 5 veces más altos que en Pipanaco_1 y en ambas muestras de La Antigua los niveles de Mg²⁺ fueron alrededor de 30 veces inferiores que los determinados en Pipanaco_2. El catión K⁺ determinado en suelos de La Antigua_1 fue alrededor de 11 veces inferior al registrado en ambas muestras de Pipanaco, mientras en La Antigua_2 fue 5 veces menor. El nivel de Na⁺ de las muestras de La Antigua_2 es alrededor de 4 veces superior al de las demás muestras. El contenido porcentual de C de las muestras de La Antigua es entre 3 y 5 veces menor al determinado en Pipanaco. Datos similares se observan para el contenido de N. La materia orgánica es casi 5 veces superior en las muestras de Pipanaco que en La Antigua (Tabla 1).

Un suelo se define como salino a partir de los 4dS/m de CE (40 mM NaCl) (Munns *et al.*, 2008). Todas las muestras colectadas corresponden a suelos salinos, no obstante la CE en La Antigua_2 fue 6 veces mayor que en La Antigua_1 y 2.5 y 3 veces superior a las muestras de Pipanaco 1 y 2 respectivamente (Tabla 1).

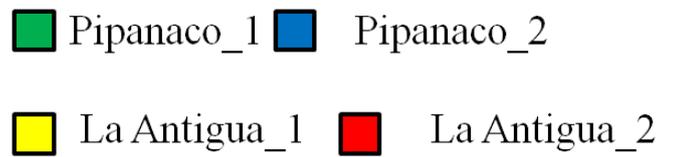
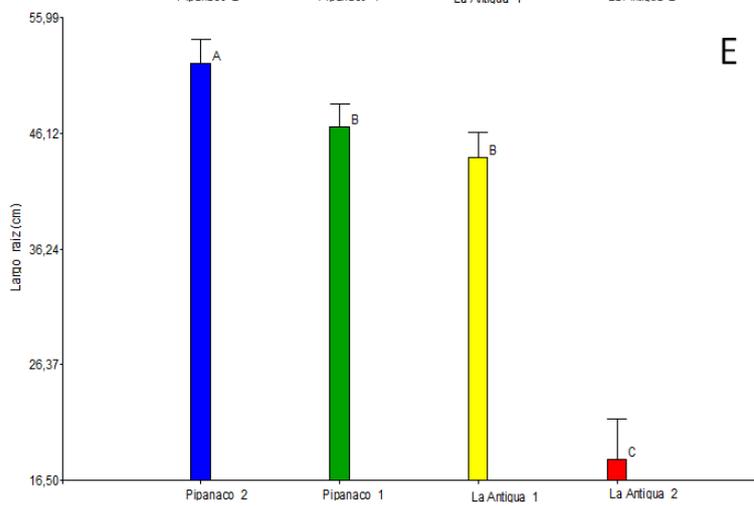
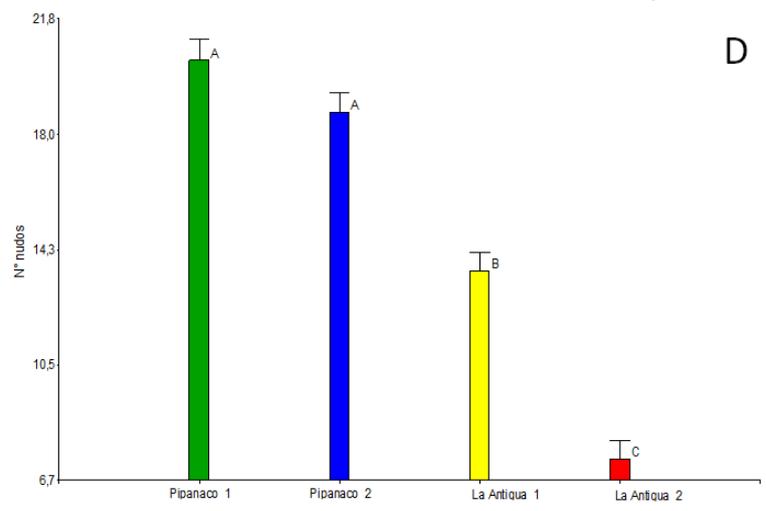
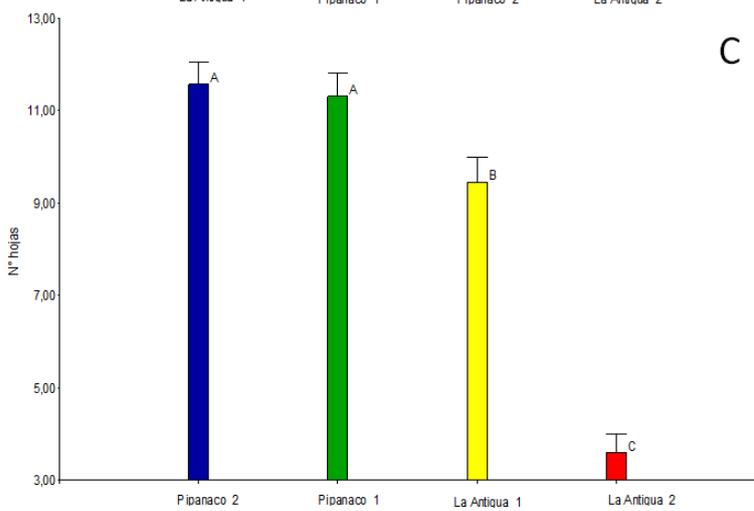
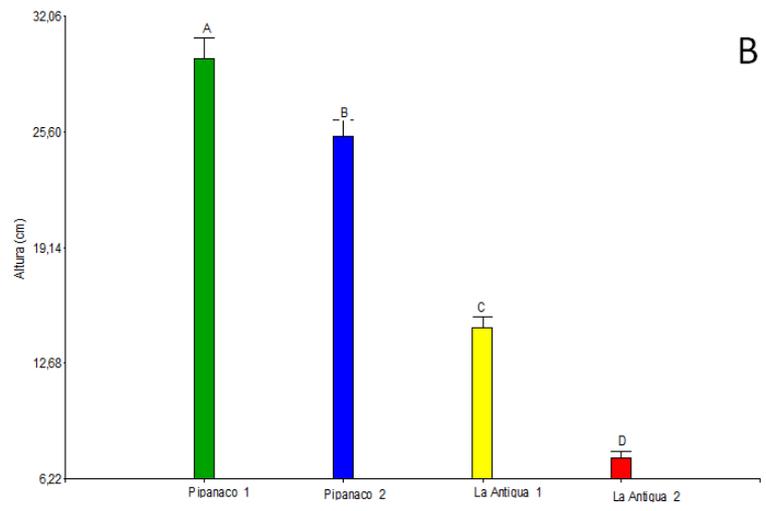
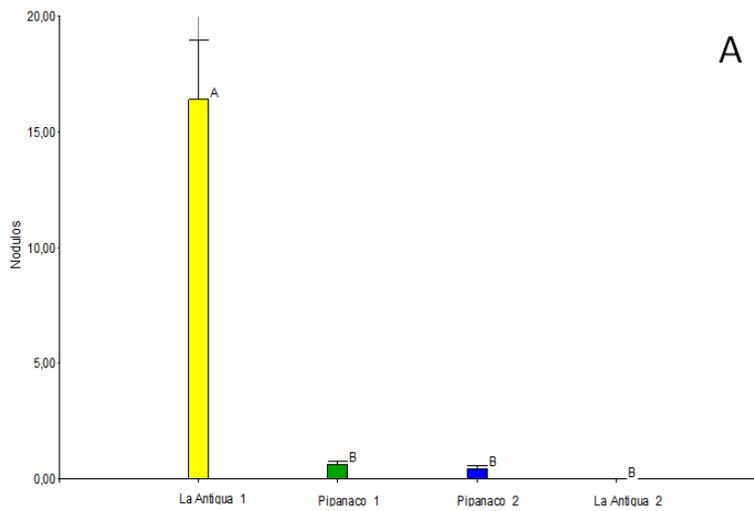
En términos generales las muestras de La Antigua son más pobres en C, N y materia orgánica, que las de Pipanaco. Particularmente en La Antigua_2, el elevado contenido de Na⁺ y la CE extremadamente alta correlaciona con las observaciones de nula vegetación acompañante al momento de la recolección de la muestra (Fig. 3-B) y son una evidencia de la alta capacidad de tolerancia de *P. flexuosa* a condiciones de estrés salino.

Diversidad de rizobacterias obtenida usando plantas trampa de *Prosopis flexuosa*

Se evaluó la emergencia de las plántulas en las cuatro muestras de suelo, y se observó que la germinación fue disminuida a la mitad en el sustrato proveniente de la Antigua_2, mientras para los otros sitios, la germinación superó el 80% (Tabla 2).

Sitio	Germinación (%)
Pipanaco_1	81,7
Pipanaco_2	91,7
La Antigua _1	88,6
La Antigua_2	52,4

Tabla 2: Porcentajes de germinación de las semillas de *P. flexuosa* en muestras de suelo de los salares de Pipanaco y La Antigua



Plantas de 90 días de *P. flexuosa* en suelos de La Antigua y Pipanaco. **A.** Altura, **B.** Número de nudos, **C.** Número de hojas, **D.** Número de nudos, **E.** Largo de raíz. Letras diferentes indican diferencias significativas entre sitios $p > 0.05$.

La CP1 explica el 61,7% de la variabilidad observada y la CP2 explica el 16,7% y se observa que los datos se encuentran agrupadas entre si y diferenciados según los ambientes de donde proceden. Los individuos de Pipanaco_1 y Pipanaco_2 se encuentran a la derecha del eje de la CP1 y se relacionan positivamente con los vectores altura, numero de nudos, numero de hojas, largo de raíz, Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , materia orgánica, carbono y nitrógeno total y relación C:N. Esto es consistente con los mayores valores absolutos para las variables de crecimiento en los individuos de estas procedencias (Fig. 6-B C, D, E). Sobre el eje de la CP2 se ubican los individuos provenientes de La Antigua, pero a ambos lados de la ortogonal. Los de La Antigua_1 se relacionan con el vector nódulos, asociados a la producción significativamente mayor ($p > 0,05$) (Fig. 6-A) y los de La Antigua_2 se relacionan con las variables ambientales conductividad eléctrica (CE), presencia de Na^+ y pH.

Aislamiento de rizobacterias a partir de nódulos de plantas trampa de *P. flexuosa*

Luego de 90 días, se cosecharon, contabilizaron y fotografiaron los nódulos de las plantas de *P. flexuosa* mantenidas en invernadero. Los nódulos, de tipo indeterminado, fueron inducidos a partir de la diversidad de rizobacterias presentes en los suelos de los sitios ensayados. Estas estructuras fijadoras de N_2 , se encontraron frecuentemente en las raíces secundarias, solos o agrupados, los nódulos individuales tenían tamaños de alrededor de 2-3 mm, y los agrupados o palmados alcanzaban 5-7 mm (Fig. 8 y 9).



Figura 8: *Prosopis flexuosa* mostrando nódulos en raíces secundarias



Figura 9: Nódulos agrupados en detalle de *P. flexuosa*.

Sobre el total de plantas cosechadas se contabilizó la proporción de *P. flexuosa* con nódulos (Tabla 3). La proporción de plantas noduladas de Pipanaco_1 y Pipanaco_2 fue del 36.7 % y 25.45% respectivamente. Muy por encima de esos valores se observó el porcentaje de plantas noduladas en las muestras de La Antigua_1, mientras las plantas crecidas en suelo de La Antigua_2 no desarrollaron nódulos (Tabla 3). En cuanto al número total de nódulos en cada sitio, de las plantas de Pipanaco_1 y Pipanaco_2 se cosecharon 31 y 25 nódulos. Debido a su escaso número absoluto, se procesaron para extracción de rizobacterias, el 58% y 32% respectivamente..

De las plantas de La Antigua_1 se cosecharon 639 nódulos, valor significativamente mayor ($p > 0,05$) al de los otros sitios, y para la extracción de rizobacterias se procesó el 7% de los nódulos (Tabla 3).

Sitio	Plantas Totales (N°)	Plantas Noduladas (N°)	Noduladas/Total (%)	Nódulos totales	Nódulos procesados (N°)	Nódulos procesados (%)
Pipanaco_1	49	18	36,73	31	18	58
Pipanaco_2	55	14	25,45	25	8	32
La Antigua_1	39	24	61,54	639	45	7
La Antigua_2	22	0	0	0	0	0

Tabla 3. Nodulacion en plantas trampa de *P. flexuosa* en suelos de Pipanaco y La Antigua

Rizobacterias aisladas de nódulos: patrones rep_PCR y variabilidad

De los nódulos cosechados de cada uno de los sitios de muestreo se obtuvieron un total de 55 aislamientos que fueron conservados en glicerol para la conformación de un banco de germoplasma de simbioses de *P. flexuosa*. De esos aislamientos se extrajo DNA genómico total, se amplificó por PCR empleando el primer BOX-A1R y los patrones de bandas, secuencias intercaladas repetidas (rep-PCR fingerprinting) fueron analizados a fin de evaluar las similitudes entre los aislamientos.

Los patrones electroforéticos, obtenidos en geles de agarosa 1,5 %, como se muestran en el ejemplo, (Fig. 10), fueron analizados con el software Gel Compare II (Applied Math Kortrijk, Bélgica).

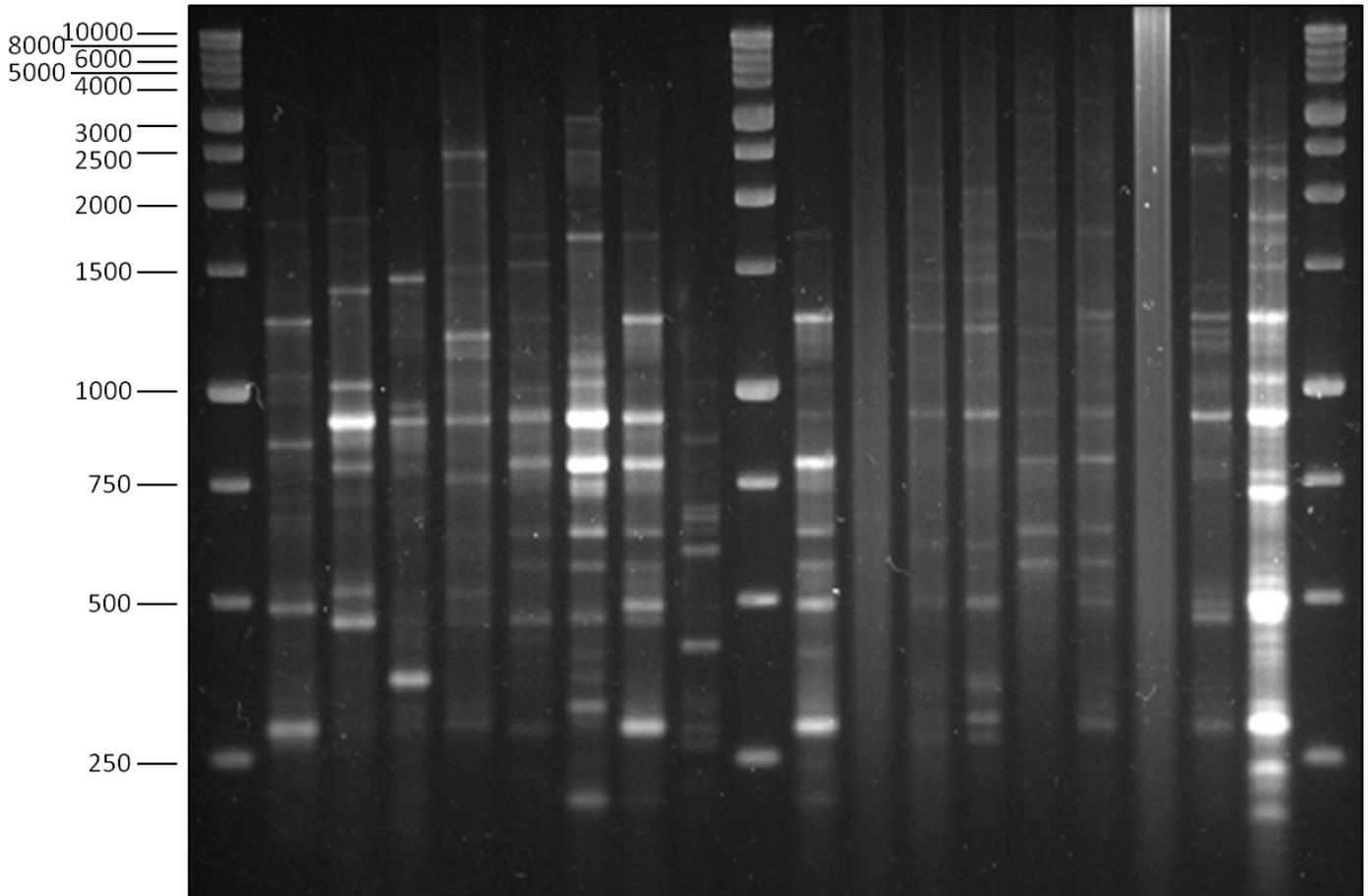


Figura 10: Patrones electroforéticos de rizobacterias de nódulos de *P. flexuosa*, obtenidos por rep-PCR con primer BOXA1R. Marcador de PM 1 Kb (Promega) en calles 1, 10 y 20.

A partir de la matriz binaria de presencia/ausencia de bandas de cada uno de los 55 aislamientos, se realizaron clusters, basado en UPGMA y la distancia de Dice, para cada sitio de muestreo (Anexo 2, Figs. 2 y 3) y un dendrograma general (Anexo 2, Fig. 1) que incluyo las cepas testigo *Sinorhizobium meliloti* SmC2011, Bolsa Palomo 8, E 109, USDA 110, *Mesorhizobium loti* MAFF 303099.

En la Fig. 11 se muestra como ejemplo el dendrograma (UPGMA_Dice) obtenido para los aislamientos de La Antigua_1, señalándose con una línea vertical los grupos de individuos que comparten al menos el 60% de similitud. El 60% de similaridad se estableció como valor de corte (cut off). Los recuadros, muestran los grupos cuyos individuos poseen menos de 60% de similitud, a partir de los que se seleccionaron algunos aislamientos para análisis posteriores.

Dice (Opt:1.00%) (Tot: 1.0%-1.0%) (#t>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
Geles grandes

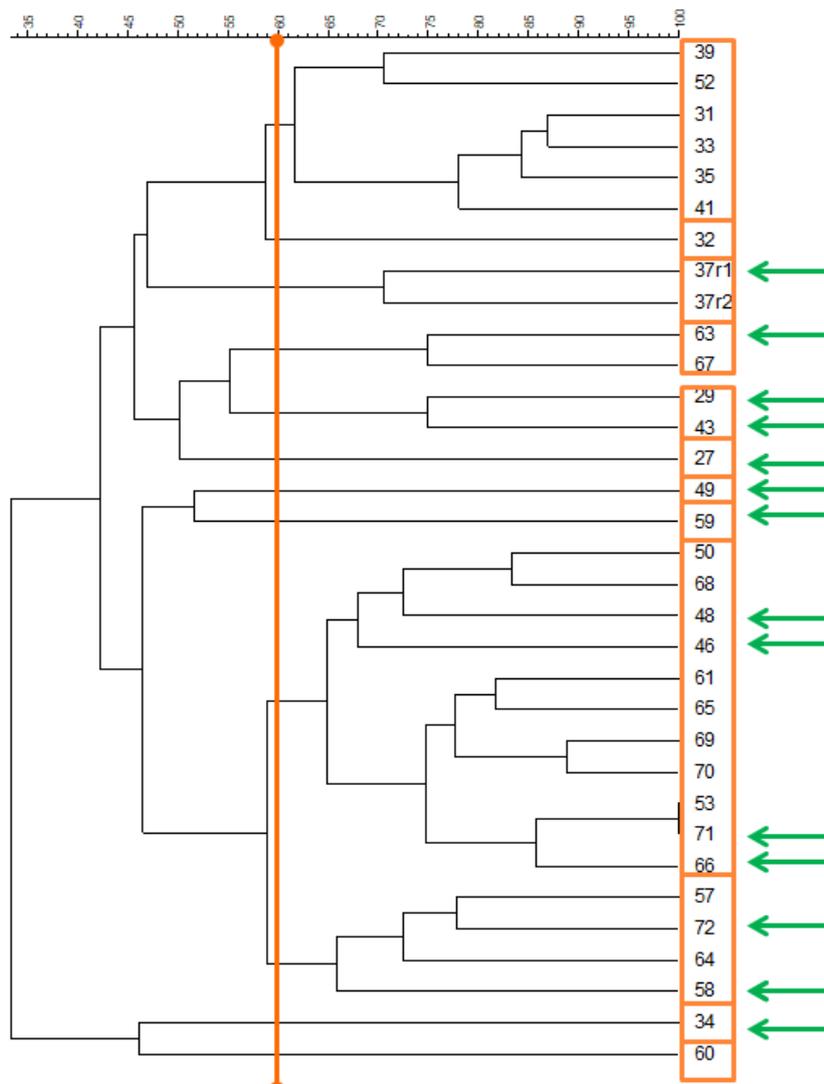


Figura 11: Análisis de cluster Dice-UPGMA realizado sobre los aislamientos de La Antigua_1. La línea vertical delimita al 60% de similitud. Los rectángulos agrupan aislamientos con al menos 60% de similitud (en total 12). Las flechas identifican las cepas seleccionadas para ensayos posteriores.

La Tabla 4 muestra el número de aislamientos de rizobacterias obtenidas de cada sitio, y la cantidad de grupos observados de acuerdo al criterio de corte establecido. Los 16 aislamientos obtenidos de Pipanaco_1 se encontraban distribuidos en 6 grupos, 37,5% del total analizado, con menos de 60% de similitud. En el mismo sentido en cuanto a la distribución porcentual (33%), se obtuvieron 12 grupos con menos de 60% de similitud a partir de los 33 aislamientos de La Antigua_1. Entre los individuos de Pipanaco_2 hubo mayor diversidad en los patrones de amplificación, determinándose 4 grupos a partir de 6 aislamientos (66 %).

Sitio	Aislamientos obtenidos (N°)	Grupos con <60% de similitud (N°)	Aislamiento seleccionadas (N°)
Pipanaco_1	16	6	6
Pipanaco_2	6	4	1
La Antigua_1	33	12	14

Tabla 4: Total de rizobacterias aisladas de nódulos *P. flexuosa* por sitio. Grupos con menos del 60% de similitud en cluster según Dice-UPGMA e individuos seleccionadas para ensayos posteriores

El detalle de la nomenclatura de los aislamientos incluidos en los agrupamientos con <60% de similitud y la nomenclatura de los aislamientos seleccionados, se muestra en Tabla 5.

Tabla 5: ensayos

Sitio	Aislamientos (N°)	Denominación de aislamientos	Denominación de aislamientos seleccionadas
Pipanaco_1	16	1,2,3,4r3,6,7r1,7r2,8,10,11,12,13,14,15,16,17	1,2,3,6,10,13
Pipanaco_2	6	19,20,21,22,25,26	26
La Antigua_1	33	27,29,31,32,33, 34,35,37r1,37r2,39,41,43,46,48,49,50,52,53,57,58,59,60,61,63,64,65, 66,67,68,69,70, 71,72	27,29,34,37r1,43,46,48,49,58,59,63,66,71,72

Utilizando los sitios de muestreo como criterio de clasificación, se realizó un análisis de conglomerados donde se observa la menor distancia entre individuos de Pipanaco_1 y Pipanaco_2 y que este agrupamiento se une a La Antigua_1 en 0.83 (Fig. 12).

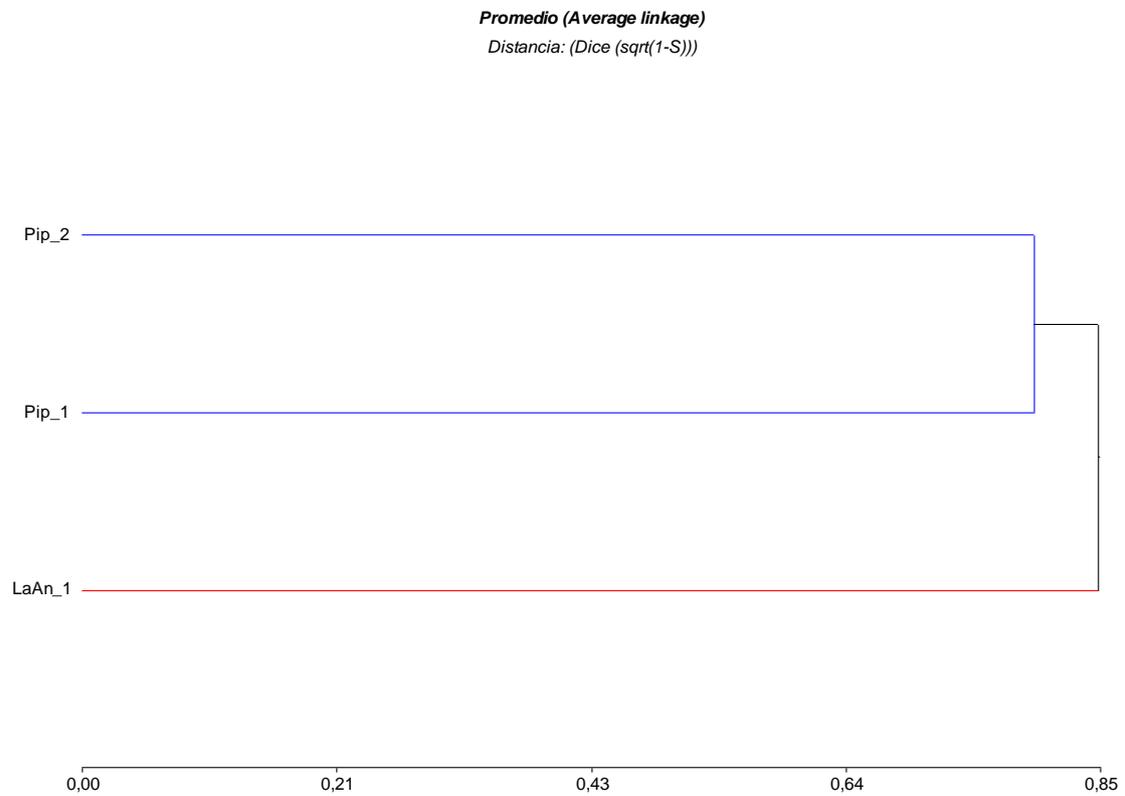


Figura 12: Análisis de conglomerado de rizobacterias aisladas de nódulos *P. flexuosa* con los sitios como criterio de clasificación y distancia de Dice.

El Análisis de Coordenadas principales (ACoP) (Fig. 13), la Coordenada 1 (CP1) explica el 22.1% de la variabilidad observada mientras la CP2 el 9.4%. Los aislamientos de rizobacterias de La Antigua_1 poseen la mayor variabilidad genética y la misma se encuentra homogéneamente distribuida en ambos ejes, mientras que los aislamientos provenientes de Pipanaco_1 y Pipanaco_2 se agrupan a la izquierda de la ortogonal de PC1.

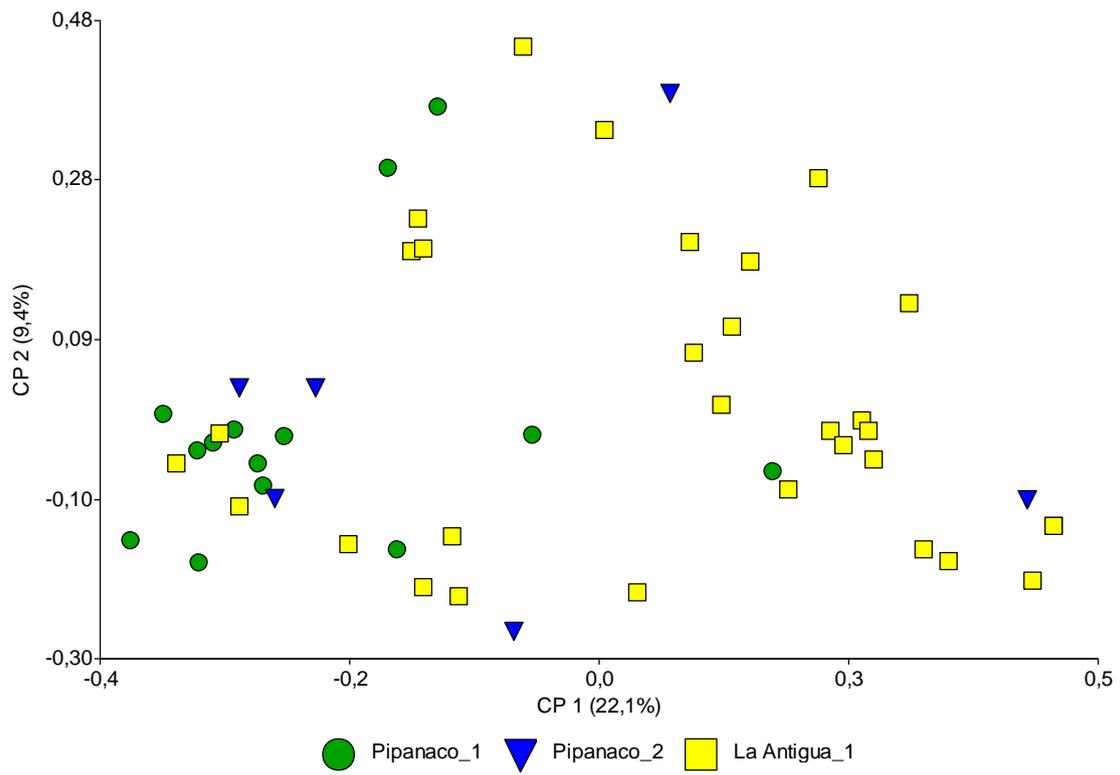


Figura 13: Análisis de Coordenadas principales (ACoP) de los aislamientos rizobianos de nódulos de *P. flexuosa*, en base a la matriz binaria de los patrones de amplificación por PCR-BoxA1 de los sitios Pipanaco_1, Pipanaco_2 y La Antigua_1.

Para conocer cuál o cuáles de los aislamientos analizados presentaban las máximas diferencias se construyó una tabla de contingencia. A partir del ACoP se generó una matriz de distancias, donde la máxima distancia entre los aislamientos comparados de a pares poseen un valor de uno (1) y los menos distintos un valor de cero (0). A partir de esa matriz se obtuvo la tabla de contingencia que es un ordenamiento jerarquizado de los aislamientos para identificar cuáles posee las mayores diferencias. En la tabla se contabilizó la cantidad de veces que un individuo posee un valor de uno en comparaciones independientemente de a pares con otros. Se observó que el aislamiento 2 procedente de Pipanaco_1 mostró las mayores diferencias, seguido de los aislamientos 34 de La Antigua_1, 3 y 66 de Pipanaco_1 y La Antigua_1 respectivamente (Anexo 2, Tabla 1).

Evaluación de la tolerancia a la salinidad en vida libre de rizobacterias aisladas

Un total de 21 aislamientos con menos del 60% de similitud según agrupamiento UPGMA-Dice, (Tabla 5), fueron ensayados en su tolerancia en vida libre a NaCl, cultivándolos en medio LMA suplementado con 0, 100, 250 y 500 mM NaCl. El 71.2% de los aislamientos seleccionados de los tres sitios, 15 en total, fueron capaces de sobrevivir a 500mM NaCl. La Antigua_1 es el sitio que mostro el mayor porcentaje de aislamientos tolerantes a 500mM NaCl (Tablas 6 y 7).

Sitio	Sobrev. Control	%	Sobrev. 100mM	%	Sobrev. 250mM	%	Sobrev. 500mM	%
Pipanaco_1	6	28,5	6	28,5	5	23,8	3	14,2
Pipanaco_2	1	4,7	1	4,7	1	4,7	1	4,7
La Antigua_1	14	66,6	14	66,6	12	57,1	11	52,3

Tabla 6: Proporción de aislamientos de nódulos de *P. flexuosa* tolerantes a NaCl en vida libre.

Tabla 7: Nomenclatura de aislamientos de nódulos de *P. flexuosa* tolerantes a NaCl en vida libre.

Sitios	Aislamientos	Total	Control	Sobrev. a 100mM	Sobrev. a 250mM	Sobrev. a 500mM
Pipanaco_1	1-2-3-6-10-13	6	1-2-3-6-10-13	1-2-3-6-10-13	1-3-6-10-13	3 6 13
Pipanaco_2	26	1	26	26	26	26
La Antigua_1	27-29-34-37r1-43-46-	14	27-29-34-37r1-43-46-	27-29-34-37r1-43-46-	27-29-37r1-43-46-48-49-	27-29-37r1-43-46-48-49-

Reinoculación de *P. flexuosa* con aislamientos seleccionados.

Promoción de crecimiento de *P. flexuosa*.

Con cada uno los 21 aislamientos seleccionados según agrupamiento UPGMA-Dice, (Tabla 5), se preparó un inóculo cultivando las rizobacterias en medio LMA líquido para inocular semillas de *Prosopis flexuosa* que se sembraron en sustrato estéril y se mantuvieron en invernadero para evaluar su efecto en la promoción de crecimiento (Fig. 14-A). Luego de 60 días, se cosecharon las plantas, se contó el número de nódulos (Fig. 14-B) y se determinaron parámetros de crecimiento como longitud de la parte aérea y raíz, peso fresco y seco total y de parte aérea y radicular.



Figura 14: A-Ensayo de *P. flexuosa* inoculados con los aislamientos de rizobacterias seleccionados. B-Detalle de nódulos de plantas de 60 días.



Las respuestas de crecimiento en las plantas de *P. flexuosa* promovidas por la inoculación con los 21 aislamientos seleccionados, fueron evaluadas mediante un análisis multivariado de componentes principales (ACP) (Fig. 15).

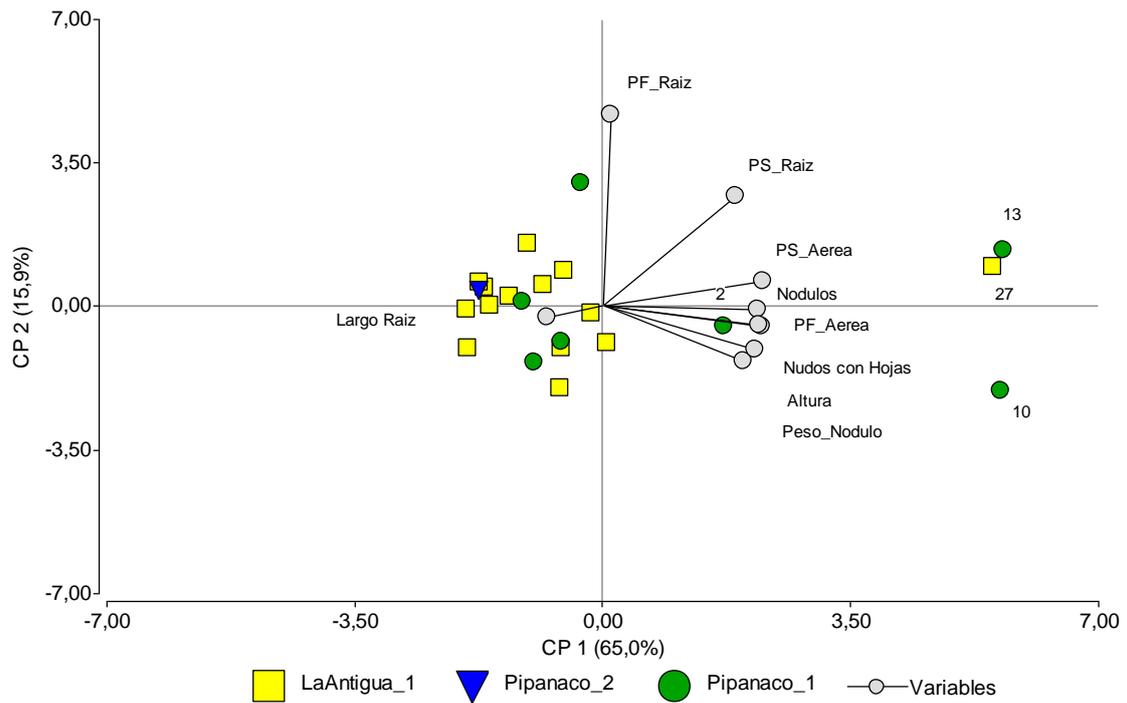


Figura 15: Análisis de componentes principales (ACP) de aislamientos de rizobacterias inóculos de *P. flexuosa* y parámetros de crecimiento

La CP1 explica el 65 % de la variabilidad observada y la CP2 explica el 15,9 %. Las variables altura de planta, peso fresco y peso seco de parte aérea, número y peso de nódulos están correlacionadas. Los aislamientos que se encuentran positivamente relacionados a los autovectores son el 27 de La Antigua_1, el 13, 10 y 2, provenientes de Pipanaco_1 aunque este último con menor grado de asociación a las variables descriptas. En cuanto a su comportamiento frente a NaCl, los aislamientos 13 y 27 fueron caracterizados como tolerantes a 500 mM NaCl y 10 y 2 capaces de crecer en 100 mM en vida libre (Tabla 7).

En la Tabla 8 se observan las respuestas del crecimiento de los plantines de *P. flexuosa* no inoculadas e inoculadas con los aislamientos de rizobacterias, tomando el promedio de todos los aislamientos ensayados, y los valores promedio de los plantines controles no inoculados.

El ANAVA para estas comparaciones no permitió identificar diferencias significativas, excepto para el número de nódulos y peso ($p > 0,01$), lo cual es esperable dado que los controles carecen de nódulos.

	No_Inoculados	Inoculados
Nodulos/pl (N°)	0	2,92 ± 6,2
Peso_Nodulo (mg)	0	16,2±31,3
PF_Aerea (mg)	205 ± 40,7	251,8± 140
PF_Raiz (mg)	349,25 ± 148,3	337,88 ± 131,3
Nudos con Hojas (N°)	6,6 ± 1,5	7,42 ± 2,99
Altura (cm)	11,62 ± 2,08	13,32 ± 4,45
Largo Raiz (cm)	19,92 ± 1,83	21,03 ± 1,93
PS_Aerea (mg)	82,1 ± 26,5	100,13 ± 52,0
PS_Raiz (mg)	60,75 ± 25,1	73,1 ± 25,6

Tabla 8: Efecto sobre el crecimiento de *P. flexuosa* inoculados con aislamientos seleccionados de los sitios Pipanaco_1, Pipanaco_2 y La Antigua_1. (media±/DE). *Inoculados representa el efecto promedio de todas las rizobacterias ensayadas

Cuando se analizan las respuestas de crecimiento, considerando de modo individual cada aislamiento ensayado, se observa que los aislamientos 27, 13, 10 y 2 aportan a la promoción del crecimiento en todas las variables consideradas, por encima de lo obtenido si se analiza la inoculación con el conjunto de aislamientos, de manera mucho más notoria si se considera en relación a las plantas no inoculadas (Tabla 9). La magnitud de las diferencias observadas, se muestran en una tabla en anexo 2.

Aislamiento	Nodulos (N°)	Peso_Nod (mg)	PF_Aerea (mg)	PF_Raiz (mg)	Nudos con Hojas (N°)	Altura (cm)	Largo Raiz (cm)	PS_Aerea (mg)	PS_Raiz (mg)
27	21,2	43,3	434,3	378,7	12,7	18,5	20,5	188,3	107,7
10	12,7	90,3	494,0	250,0	11,7	22,7	20,3	199,7	82,7
13	10,7	73,5	460,2	411,0	12,0	20,3	20,5	199,5	115,8
2	5,8	45,0	298,0	314,8	9,6	14,3	19,7	114,8	75,8
72	3,6	34,2	233,6	305,8	8,6	14,3	22,3	81,2	67,8
3	2,8	22,3	189,5	313,0	8,3	13,8	21,3	70,5	59,3
63	1,5	11,0	224,5	272,3	6,7	12,6	20,2	99,3	61,7
46	0,8	5,8	245,0	301,5	7,3	12,6	20,3	106,5	76,0
6	0,7	15,7	214,3	250,8	7,8	11,8	22,5	79,0	65,3
59	0,3	9,5	191,5	340,5	6,0	11,3	20,5	86,3	79,3
1	0,2	1,2	238,5	500,7	5,8	12,3	21,0	101,5	92,5
43	0,0	0,0	265,2	380,4	7,2	11,6	21,3	95,6	76,4
60	0,0	0,0	189,2	352,3	7,0	11,6	23,3	88,8	61,3
34	0,0	0,0	203,3	416,5	5,8	11,1	20,8	87,5	77,3
29	0,0	0,0	192,0	341,0	6,0	11,2	20,8	84,4	67,8
Control	0,0	0,0	205,0	349,3	6,7	11,6	19,9	82,1	60,8
49	0,0	0,0	169,4	322,0	4,6	10,1	20,6	77,6	61,4
26	0,0	0,0	167,8	347,7	5,0	10,4	20,8	74,5	67,3
48	0,0	0,0	151,4	369,0	6,4	11,0	22,2	70,6	69,4
37r1	0,0	0,0	179,7	358,7	6,0	9,7	20,7	70,3	65,0
58	0,0	0,0	270,0	264,6	5,2	8,4	21,2	61,2	58,0
66	0,0	0,0	275,6	251,8	6,0	20,7	20,7	57,4	57,0

Tabla 9: Crecimiento de *P. flexuosa* (60 d) en respuesta a los diferentes inóculos

En la Tabla 10 se muestra el porcentaje de aporte al crecimiento de los plantines de *P. flexuosa* de los aislamientos que contribuyeron de manera más significativa (Tabla 9), respecto al control no inoculado. Se observó que, para las variables peso fresco y peso seco aéreo, la contribución superó el 100% excepto en la inoculación con el aislamiento 2 donde la biomasa aérea incrementó alrededor del 40%. Los aislamientos 27, 10 y 13 contribuyeron a incrementar la cantidad de nudos con hojas más del 75% en relación al control, mientras que el aporte a la longitud de los plantines (altura) superó el 59%. En

estas comparaciones se omiten las variables número y peso de nódulos, dado que el control no inoculado no desarrolló nódulos. De lo que se evidencia el efecto en la promoción del crecimiento de la presencia de estos microorganismos benéficos seleccionados.

Tabla 10: Porcentaje de aporte de los aislamientos 27, 10, 13 y 2 con respecto al Control sin inocular.

Aislamiento	PF_Aerea (mg)	PF_Raiz (mg)	Nudos con Hojas (N°)	Altura (cm)	Largo Raiz (cm)	PS_Aerea (mg)	PS_Raiz (mg)
27	111,9	8,4	90,0	59,1	2,9	129,4	77,2
10	141,0	-28,4	75,0	95,0	2,1	143,2	36,1
13	124,5	17,7	80,0	74,9	2,9	143,0	90,7
2	45,4	-9,9	44,0	23,0	-1,1	39,9	24,8

Cuantificación de ureidos.

La determinación de ac. alantoico y alantoína se realizó a partir de extractos de tejidos secos de hojas, raíces y nódulos inoculados y no inoculados de *P. flexuosa* de 60d.

El contenido de ureidos totales (ac. alantoico + alantoína) fue significativamente diferente ($p > 0,10$) cuando se consideró la inoculación como variable de clasificación con $2,1 \pm 0,98$ nmol/mg PS las muestras no inoculadas y $8,96 \pm 0,7$ nmoles/mg PS las inoculadas. En el mismo sentido, las diferencias fueron significativas ($p > 0,10$) cuando se compararon tejidos, raíces ($3,22 \pm 0,92$ nmoles/ mg PS), hojas ($9,22 \pm 0,89$ nmoles/ mg PS) y nódulos ($6,22 \pm 1,25$ nmoles/ mg PS). La interacción inoculación*tejido resultó significativa ($p > 0,10$), y se observa que en todos los tejidos analizados provenientes de plantas en simbiosis, el contenido de ureidos totales es mayor, y la acumulación más alta ocurre en hojas (Tabla 11).

Ureidos Totales nmol/mgPS		
No_Inoculado	Nodos	nd A
	Raiz	1,95±1,30 B
	Hojas	2,25±1,20 B
Inoculado	Nodos	6,2±1,25 B
	Raiz	4,49±1,20 B
	Hojas	16,18±1,25 C

Tabla 11: Ureidos totales (nmoles/ mg peso seco) en tejidos de plantines de *P. flexuosa* de 60 d. inoculados con aislamientos seleccionados.

El contenido de alantoato mostró diferencias significativas ($p > 0,10$) cuando se compararon muestras no inoculadas respecto de plantas noduladas, no obstante, el contenido de ac. alantoico no difirió entre los tejidos analizados y la interacción inoculación *tejidos tampoco fue significativa ($p > 0,10$) (Fig. 16 y Tabla 12). Contrariamente, el contenido de alantoína fue significativamente diferente ($p > 0,10$) entre plantas inoculadas y no inoculadas, así como en los tejidos analizados y en la interacción inoculación *tejidos, y la mayor acumulación de este metabolito se observó en hojas (Fig. 16 y Tabla 12).

Este trabajo, es a nuestro entender, la primera evidencia que el transporte de compuestos nitrogenados a larga distancia en *P. flexuosa* noduladas ocurre vía ureidos.

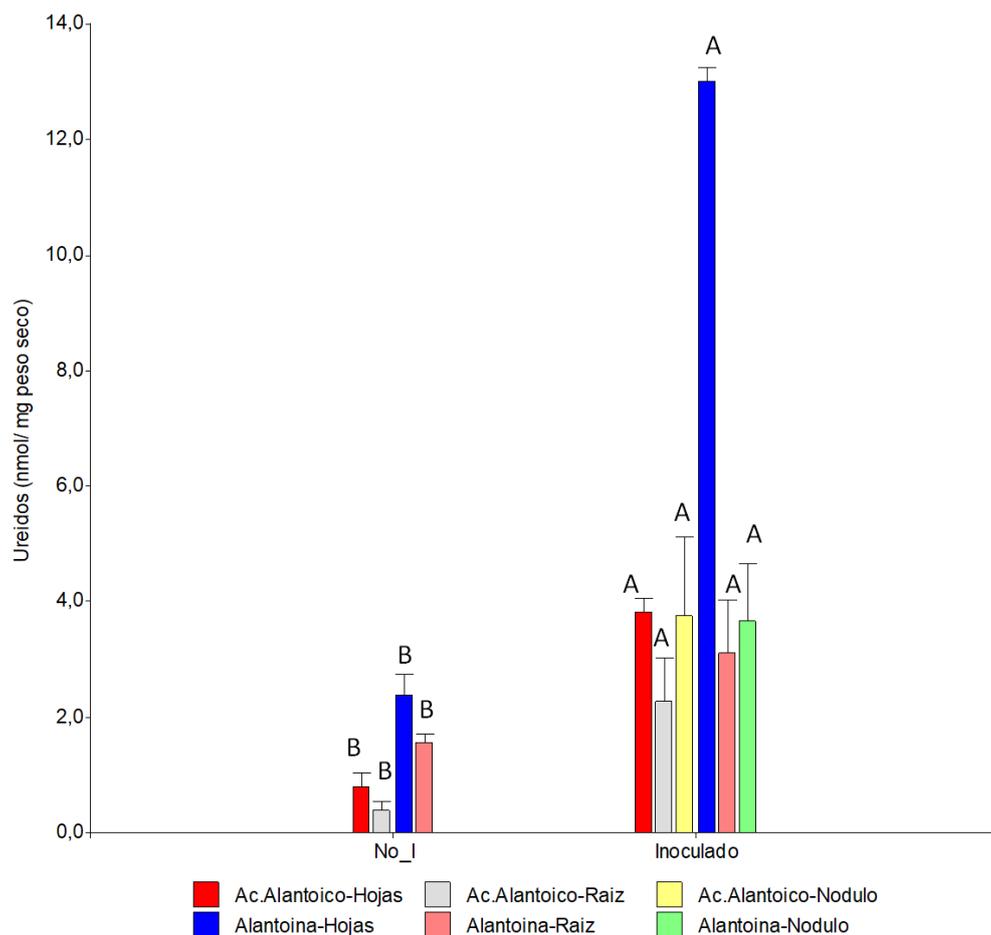


Figura 16: Ac Alantoico y alantoina (nmoles/ mg peso seco) en tejidos de plantines de *P. flexuosa* de 60 d. inoculados con aislamientos seleccionados.

Tejido	Inoculación	Ac Alantoico (nmol /mg PS)	Alantoína (nmol /mg PS)
Nodulo	NO_Inoculado	nd	nd
Raiz		0,39±0,30 B	1,56±0,34 B
Hojas		0,79±0,53 B	2,38±0,71 B
Nodulo	Inoculado	3,75±3,3 C	3,67±1,9 B
Raiz		2,28±1,67 C	3,1±2,0 B
Hojas		3,81±,54 C	13,01±0,57 C

Tabla 12: Ac Alantoico y alantoina (nmoles/ mg peso seco) en tejidos de plantines de *P. flexuosa* de 60 d. inoculados con aislamientos seleccionados.

Discusión y conclusiones

Este trabajo es una aproximación al estudio de las rizobacterias capaces de establecer simbiosis fijadora de N_2 con *Prosopis flexuosa* en ambientes salinos y presenta el análisis del modo en que la nodulación contribuye a su crecimiento y adaptación. Los estudios realizados con muestras de suelo extraídos de los salares Pipanaco y La Antigua permitieron, mediante plantas trampa de *P. flexuosa*, que las rizobacterias presentes en las muestras colonizaran las raíces y formaran nódulos funcionales.

Las plantas difieren mucho en su tolerancia a la salinidad, y esto se evidencia en sus respuestas de crecimiento variable en estas condiciones. El crecimiento de las plantas bajo estrés salino es frecuentemente limitado por efecto osmótico de la sal en el suelo, que puede a la vez asociarse a efectos tóxicos de la sal en el interior de las células de planta. La reducción en el crecimiento ocurre en dos fases: una respuesta rápida al aumento de la presión osmótica externa y una respuesta más lenta debido a la acumulación de Na^+ en las hojas.

La primera fase osmótica, comienza inmediatamente después de que la concentración de sal alrededor de las raíces aumenta hasta un nivel umbral, por lo cual la tasa de crecimiento disminuye significativamente. Este valor es de aproximadamente 40 mM de NaCl para la mayoría de las plantas, o puede ser menor en plantas sensibles como el arroz y *Arabidopsis thaliana*. La segunda fase, provocada por la acumulación de iones, hasta niveles tóxicos en el interior de las células que induce senescencia acelerada en hojas y finalmente la muerte. Si la tasa a la que mueren es mayor que la tasa de producción de hojas nuevas, la capacidad fotosintética de la planta ya no puede satisfacer los requisitos de esqueletos carbonados de los tejidos de las hojas jóvenes, provocando la disminución y/o cese de crecimiento (Munns *et al.*, 2008).

Los análisis de conductividad eléctrica (CE), contenido de Na total y pH de los suelos de donde procedían las muestras contribuyeron a explicar los efectos ambientales en la diversidad de rizobacterias presentes así como la nodulación y el crecimiento y de las plantas de *P. flexuosa*.

A partir de ellos fue posible analizar la diversidad presente y seleccionar aislamientos con alta variabilidad según los patrones moleculares y ensayar su tolerancia a salinidad por NaCl en vida libre. Con esta reducción del universo de

aislamientos se re-inocularon semillas y se determinó su contribución al crecimiento de plantines de *P. flexuosa* y el transporte de N₂ fijado como ureidos. Según nuestro conocimiento, este es el primer reporte que señala para *P. flexuosa* que el N₂ fijado en simbiosis es transportado en forma de alantoína y alantoato. Estos experimentos mostraron que la mayor diversidad de rizobacterias capaces de asociarse en simbiosis y de tolerar hasta 500 mM NaCl, provino de La Antigua_1 (Tablas 5 y 7). Los aislamientos seleccionados por su mayor contribución al crecimiento de *P. flexuosa* y alta tolerancia a NaCl provinieron de La Antigua_1, aislamiento 27- 500mM y de Pipanaco_1, aislamientos 10 y 13- 250 mM (Tabla 9).

En lotes con historia de uso agrícola y posterior abandono debido a su baja producción en áreas de riego del Rio Dulce en Santiago del Estero, Sarmiento *et al.*, (2021) valorizan el grado de mejora y restauración ambiental por la implantación de bosques con *P. alba*. En estos sitios, al momento del establecimiento de las plantaciones de *P. alba*, la CE de los suelos en los 30 cm superficiales era de 21,3 dS/m y el pH mayor a 8. Luego de veinte años de establecimiento del bosque, la CE y el pH disminuyeron a 6,3 dS/m y 7,8, lo que muestra el valor del uso de especies nativas de la región chaqueña en la restauración de áreas degradadas. En este mismo sentido, en este trabajo se ha analizado el comportamiento de *P. flexuosa* y sus simbiontes en condiciones de CE que variaron desde 9.7 a 62.5 dS/m, y excepto en el sitio donde la salinidad era extrema, fue posible recuperar simbiontes capaces de colonizar las raíces e inducir el desarrollo de nódulos funcionales. El crecimiento y nodulación de *P. flexuosa* y la diversidad de rizobacterias aisladas, según se observó a través de patrones moleculares, estuvo fuertemente influenciada por las condiciones de salinidad de los suelos de origen. En este trabajo fue posible aislar rizobacterias capaces de establecer simbiosis con plantas de *P. flexuosa* y la diversidad observada entre sitios disminuyó con el aumento de la salinidad. En los dos puntos de muestreo provenientes del salar La Antigua, La Antigua_1 y La Antigua_2, con una conductividad eléctrica (CE) de 9.7 dS/m y 62.5 dS/m respectivamente el crecimiento y la nodulación de *P. flexuosa* fueron máximas y fue posible aislar la mayor cantidad de rizobacterias, 45 aislamientos en total a partir de 7% de nódulos obtenidos cuando las muestras provinieron de La Antigua_1. La diversidad en los patrones moleculares en estas muestras fue también la más alta y fue posible definir 12 clusters con menos del 60% de similitud, con 34 muestras analizadas. En el mismo sentido, las diferencias en cuanto a la diversidad de rizobacterias presentes en los sitios se

evidencia en el análisis de coordenadas principales. En cuanto a los dos sitios de Pipanaco, con niveles de CE intermedias respecto de ambos puntos de La Antigua, no se observaron diferencias significativas en los parámetros de crecimiento de *P. flexuosa*, ni en la cantidad de nódulos cosechados. La variabilidad en los patrones moleculares de las rizobacterias provenientes de Pipanaco es similar entre ambos sitios y menor a la observada en La Antigua como se refleja en el análisis de conglomerados (Fig. 12).

La supervivencia de las cepas de rizobios en el suelo depende de su adaptación a las condiciones ambientales cambiantes, como fluctuaciones en el pH, los nutrientes, la temperatura y la disponibilidad de agua, la cual a veces se asocia a cambios en la salinidad. La temperatura y la salinidad reducen la supervivencia y el crecimiento de rizobios en el suelo e inhibe la simbiosis rizobio-leguminosa (Zahran, 1999 en Laranjo y Oliveira, 2011) La tolerancia de los rizobios a la sequía y a la salinidad es diversa (Chávez Díaz *et al.*, 2013), por ejemplo *B. japonicum* es sensible al estrés osmótico (Chang *et al.*, 2007; Melchiorre *et al.*, 2011). En este trabajo se realizaron ensayos de tolerancia a NaCl hasta 500 mM y se pudo observar, contra intuitivamente, que la mayoría de los aislamientos que sobrevivieron provienen de La Antigua_1, sitio en donde la CE fue de 9,7 dS/m, la más baja de todos los sitios ensayados, que corresponde a 99.4 mM NaCl. La Antigua_1 se obtuvo el aislamiento 27, que además de su capacidad de tolerar hasta 500 mM NaCl en vida libre, en simbiosis mostró la mayor promoción de crecimiento en *P. flexuosa*. Las plantas inoculadas con este aislamiento, además de desarrollar nódulos activos, produjeron más del doble de biomasa aérea, el 90% más de nudos con hojas y fueron 60% más altas que los controles no inoculados. Aunque de diferente magnitud, efectos similares en la promoción de crecimiento se observan en plantines inoculados con los aislamientos 10 y 13, obtenidos de Pipanaco_1 cuya tolerancia a NaCl en vida libre fue 250 mM. Ha sido citado que varias especies de *Mesorhizobium* y *Ensifer meliloti* en vida libre pueden tolerar la salinidad causada por 300 a 700 mM de NaCl (Laranjo y Oliveira 2011).

En las plantas noduladas con estos aislamientos se determinó además el contenido de ureidos. Alantoína y ácido alantoico, constituyen la principal forma de transporte de N orgánico a larga distancia en especies de leguminosas tropicales, y representan entre el 60 y el 90% del N total en la savia del xilema de soja, caupí (*Vigna unguiculata*), porotos (*Phaseolus vulgaris*) y otras leguminosas cultivadas en

simbiosis (Schubert, 1986, Lescano, 2017). Dependiendo de las condiciones de crecimiento, los ureidos pueden acumularse en raíces o transportarse a la parte aérea (Lescano, 2017). En nuestros ensayos, el contenido de ureidos totales fue significativamente mayor en plantas noduladas y la mayor acumulación se observó en parte aérea y en nódulos (Figura 16 y Tabla 10). Si bien se cita frecuentemente que en las leguminosas tropicales que poseen nódulos determinados el N se transporta como ureidos (Tajima et al., 2004), en este trabajo se muestra que *P. flexuosa* una leguminosa sub-tropical que desarrolla nódulos indeterminados, es decir, que posee forma cilíndrica con meristema persistente, similar a la que se observa en *P. alba* (Chávez Díaz et al., 2013), transporta el N₂ fijado en forma de ureidos.

Las hipótesis de trabajo y los resultados obtenidos, permiten concluir que es posible aislar rizobacterias capaces de establecer simbiosis con *P. flexuosa* en las zonas del salar Pipanaco en Catamarca y La Antigua en La Rioja.

Que estos ambientes poseen una gran variedad y diversidad de rizobacterias nodulantes, como se observó por el análisis de polimorfismos genéticos. Si bien el nivel de polimorfismos, disminuye con el aumento de la salinidad algunos microsimbiontes fueron capaces de contribuir al crecimiento de esta importante leguminosa forestal, por encima del promedio de todos los aislamientos ensayados y mucho más aun en relación a *P. flexuosa* sin inocular.

En este sentido, se pudieron proponer a los aislamientos 27, 10, 13, y 2, en ese orden, como candidatos para formulación de inoculantes específicos para *P. flexuosa* en condiciones de vivero.

Las respuestas de crecimiento observadas, en simbiosis con estas rizobacterias seleccionadas permiten postular que la adaptación de plantines nodulados con estos aislamientos será superior tanto para su uso en programas de restauración de ambientes degradados, en instalación de rodales semilleros o en producciones forestales, entre otros aspectos benéficos de la simbiosis por que se ha verificado FBN mediada por estos microorganismos seleccionados y su transporte en forma de ureidos.

Como perspectivas de continuidad de este trabajo, restan al menos i) la asignación de género y especie a estos aislamientos, mediante la secuenciación de un conjunto de genes específicos y altamente conservados (genes housekeeping) que se emplean corrientemente en taxonomía molecular como 16S rRNA (DNA ribosomal 16 S) glnII

(glutamina sintetasa II), *recA* (proteína de recombinación RecA) (Menna *et al.*, 2009) y ii) la evaluación de respuestas de plantines de *P. flexuosa* inoculados con estos aislamientos en ensayos controlados y sometidos a salinidad.

Bibliografía

- **Abraham, E. M. y Prieto, M.R.** 1999. Vitivinicultura y desertificación en Mendoza. En: B. García Martínez (Comp.). Estudios de historia y ambiente en América: Argentina, Bolivia, México, Paraguay. IPGH - Colegio de México. México.
- **Alvarez, J. A. & Villagra, P. E.** 2009. *Prosopis flexuosa* DC. (Fabaceae, Mimosoideae). Tomo 35 (1): 49-63.
- **Burkart, A.** 1976. A monograph of the genus *Prosopis* (Leguminosae subfam. Mimosoideae): catalogue of the recognized species of *Prosopis*. J Arnold Arbor 57:450–525.
- **Candiani, J.C. y Cravero, O.** 2017. Hoja Geológica 2966-III La Rioja. Provincias de La Rioja y Catamarca. Instituto de Geología y Recursos Minerales, Servicio Geológico Minero Argentino. Boletín 424, 59pp., Buenos Aires.
- **Chang, Woo-Suk; Franck, William L.; Cytryn, Eddie; Jeong, Sooyoung; Joshi, Trupti; Emerich, David W.; Sadowsky, Michael J.; Xu, Dong and Stacey, Gary.** 2007. An Oligonucleotide Microarray Resource for Transcriptional Profiling of *Bradyrhizobium japonicum*. MPMI Vol. 20, No. 10, 2007, pp. 1298–1307.
- **Chávez Díaz, L., González, P., Rubio, E., Melchiorre, M.** 2013. Diversity and stress tolerance in rhizobia from Parque Chaqueño region of Argentina nodulating *Prosopis alba*. Biol Fertil Soils 49:1153–1165.
- **Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C.W.** InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- **Díaz, S., Settele, J., Brondízio, E., Ngo, H., Guèze, M., Agard, J. and Chan, K.** 2020. Summary for Policymakers of the Global Assessment Report on Biodiversity and Ecosystem Services of the Intergovernmental Science and Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services, (11), 16.
- **FAO (2015).** The Global Forest Resources Assessment, 55
- **Ferguson, B.J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M. Lin, Y., Reid, D. E. and Gresshoff, P. M.** 2010. Molecular Analysis of Legume Nodule Development and Autoregulation. Journal of Integrative Plant Biology 2010, 52 (1): 61–76.
- **Gavier, G. I., & Bucher, E. H.** 2004. Deforestation of the Sierras Chicas de Córdoba (Argentina) in the period 1970-1997, (101), 1-27.
- **Iglesias, O., Rivas, R., Garcia-Fraile, P., Abril, A., Mateos, P., Martinez-Molina, E., Velázquez, E.** 2007. Genetic characterization of fastgrowing rhizobia able to nodulate *Prosopis alba* in North Spain. FEMS Microbiol Lett 277:210–216.

- **Labraga, J.C., Villalba, R.,** 2009. Climate in the Monte Desert: past trends, present conditions, and future projections. *Journal of Arid Environments* 73, 154-163.
- **Laranjo, M. and Oliveira, S.** 2011. Tolerance of Mesorhizobium type strains to different environmental stresses. Article in *Antonie van Leeuwenhoek*.
- **Le Hou´erou, H. N.** 1995. Climate change, drought and desertification. *Journal of Arid Environments* 34: 133–185.
- **Lescano, Ignacio.** 2020. Determination of Ureides Content in Plant Tissues. *Bio-protocol* 10(11): e3642.
- **López Lauenstein, Diego & Vega, Carmen & Luna, Celina & Sagadin, Mónica & Melchiorre, Mariana & Pozzi, Ezequiel & Salto, Carla & Oberschelp, Gustavo Pedro Javier & Torales, Susana & Pomponio, Maria & Kees, Sebastian & Chávez-Díaz, Lucía & Gómez, Carlos & Verga, A.** 2015. Subprograma Prosopis en Domesticacion de especies forestales (pags. 113-135). MAGyP, UCAR, INTA.
- **Lotus Broughton W.J., Dilworth M.J.** Control of leghemoglobin synthesis in snake beans. *Biochem Journ.* 1971; 125:1075-1080.
- **Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X. & Batut, J.** 2009. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends in Microbiology*, Vol.17, No.10, Pags. 458-466.
- **Melchiorre, Mariana & de Luca, Marcos J. & Gonzalez Anta, Gustavo & Suarez, Paola & Lopez, Carlos & Lescano, Ramiro & Racca, Roberto W.** 2011. Evaluation of bradyrhizobia strains isolated from field-grown soybean plants in Argentina as improved inoculants. *Biol Fertil Soils* (2011) 47:81–89.
- **Moreno, M. C., Torres, L. y Campos, C.** 2018. Nuevos aportes al uso de prosopis flexuosa en el centro oeste de argentina y su interpretación en el marco general de la ecorregión del monte. *Revista Etnobiología*. Vol 16, Num. 3. Diciembre 2018. pp: 18-35.
- **Munns, R. and Tester, M,** 2008. Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2008. 59:651–81. 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911
- **Nygren P., Fernández M.P., Harmand J.M. and Leblanc H.A.** (2012). Symbiotic dinitrogen fixation by trees: an underestimated resource in agroforestry systems? *Nutrient cycling in agroecosystems*, 94: 123-160.
- **Oyarzabal, M. et al.** 2018. Unidades de vegetación de la Argentina. *Ecología Austral* 28:040-063.
- **Paoli H., Elena H., Mosciaro J., Ledesma F., Noé Y.** 2011. Caracterización de las cuencas hídricas de las provincias de Salta y Jujuy. EEA Salta-INTA.
- **Passera, C. B.** 2000. Fisiología de Prosopis spp. En: *MULTEQUINA*. Latin American Journal of Natural Resources. Ed. Board, 9(2): 53-80.
- **Peri, P.L., Martínez Pastur, G. J., Schlichter, T. M.** 2021. Uso sostenible del bosque. Aportes desde la Silvicultura Argentina. Ed. Ministro de Ambiente y Desarrollo Sostenible de la Nación.

- **Räsänen, L.R., Sprent, J.I., Lindstrom, K.** 2001. Symbiotic properties of Sinorhizobia isolated from Acacia and Prosopis nodules in Sudan and Senegal. *Plant Soil* 235:193–210.
- **Roig, F. A.** 1993b. Aportes a la etnobotánica del género Prosopis, En IADIZA, ed. Contribuciones Mendocinas a la Quinta Reunión de Regional para América Latina y el Caribe de la Red de Forestación del CIID. Conservación y Mejoramiento de Especies del Género Prosopis., 99-119, Mendoza, Argentina.
- **Roig, F. A.** 2001. Flora medicinal mendocina. Las plantas medicinales y aromáticas de la provincia de Mendoza (Argentina). (Aborígenes, exóticas espontáneas o naturalizadas y cultivadas) EDIUNC, Mendoza.
- **Roig, F. A., Berra, A., González Loyarte, M., Martínez Carretero, E. y C. Wuilloud, C.** 1992. *La Travesía de Guanacache, tierra forestal*, en: *Multequina*, 1, pp. 83-91.
- **Salto, C. S., Melchiorre, M. N., Obershelp, G. P. J., Pozzi, E., Harrand, L.** 2019. Evaluación simultánea de la fertilización e inoculación con rizobios nativos en plantines de Prosopis alba; Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- **Salto, C., Oberschelp, J., Melchiorre, M., Pozzi, E., Harrand, L.** 2015a. Efecto de la fertilización e inoculación con rizobios sobre el crecimiento de plantines de algarrobo blanco en condiciones de vivero. XXIX Jornadas Forestales de Entre Ríos. 24 y 25 de septiembre de 2015.
- **Salto, C.S., Melchiorre, M., Oberschelp, G.P.J., Pozzi, E. and Harrand, L.** 2017. Effect of fertilization and inoculation with native rhizobial strains on growth of Prosopis alba seedlings under nursery conditions. *Agroforest Syst* 93, 621–629 (2019). <https://doi.org/10.1007/s10457-017-0156-8>.
- **Sarmiento, M; Brassiolo, M; Senilliani, María G.; Kunst, Carlos; Navall, Marcelo; Kees, Sebastián; Gómez, Carlos; López, Dardo R.; Carranza, Carlos; Alaggia, Francisco; Galetto, Leonardo, Torres, C.; Cassino, W., Carignano, L. y D'Angelo, P.** 2021. Uso sostenible del bosque. Aportes desde la Silvicultura Argentina (pags. 606-691). Ed. Ministro de Ambiente y Desarrollo Sostenible de la Nación.
- **Schubert, K.R.** 1986. Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport, and metabolism. *Annual Review of Plant Physiology*. 37: 539-574.
- **Sgroy, V., Cassán, F., Masciarelli, O., Del Papa, M. F., Lagares, A. & Luna, V.** 2009. Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*.
- **Sosic, M.V.J.** 1973. Descripción Geológica de la Hoja 14 e, Salar de Pipanaco. Provincias de Catamarca y La Rioja. Escala 1:200.000. Carta Geológico-Económica de la República Argentina. Boletín 137, 61 p. Buenos Aires, Servicio Nacional Minero Geológico.

- **Taleisnik, E. y López Launestain, D.** 2010. Leñosas perennes para ambientes afectados por salinidad. Una sinopsis de la contribución argentina a este tema. *Ecología Austral* 21:3-14.
- **Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F., Lupski, J.R.** 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol Cell Biol* 5:25–40.
- **Villagra, P. E.** 2000. Aspectos ecológicos de los algarrobales argentinos, en: *Multequina*, 9, pp. 21-36.
- **Villagra, P. E., Cony, M. A., Mantován, N. G., Rossi, B. E., González Loyarte, M. M., Villalba, R. y Marone, L.** 2004. Ecología y Manejo de los algarrobales de la Provincia Fitogeográfica del Monte, en: Arturi, M. F., Frangi, J. L., Goya, J. F. (Ed.), *Ecología y Manejo de Bosques Nativos de Argentina*, pp. 1-32. La Plata: Editorial Universidad Nacional de La Plata.
- **Villagra, P. E., Alvarez, J. A., Karlin, M., Meglioli, P. A., Vega Riveros, C., Zapata, R., Abraham, E. M., Alvarez, L., Aschero, V., Cesca, E., Coirini, R., Cony, M., Gatica, G., Karlin, U. O., Melián, E., Mora, S., Morales, M. S., Prieto, M. R., Pucheta, E., Ribas, Y., Roig Juñent, S. A., Rojas, F.; Rolhauser, A.G., Rubio, Ce., Rubio, C., Sartor, C. y Tonolli, A.** 2021. Uso sostenible del bosque. Aportes desde la Silvicultura Argentina (pags. 442-541). Ed. Ministro de Ambiente y Desarrollo Sostenible de la Nación.
- **Zarantonello, A., & Mamani, M.** 1999. Balance hídrico en la cuenca del Salar de Pipanaco, provincias de Catamarca y La Rioja. In *Hidrología Subterránea, II Congreso Argentino de Hidrogeología, IV Seminario Argentino sobre temas actuales de la hidrología subterránea*. Santa Fé, Argentina. Serie de Correlación Geológica N°13.

Información complementaria

Anexo 1

- Medio LMA (para 1L pH 6,8-7)
 - Manitol 10g
 - Extracto de levadura 0,5g
 - K₂HPO₄ 0,5g
 - MgSO₄ 0,2g
 - NaCl 0,1g
 - Rojo congo 5mL
 - Agar 15g

- Buffer Tris-acetato (TAE) (para 1L 50X)
 - Tris base 242g
 - Ácido acético glacial 57,1mL
 - EDTA 0,5M (pH8) 100mL

- Buffer Tris-borato (TBE) (para 1L 5X)
 - Tris base 54g
 - Ácido bórico 27,5g
 - EDTA 0,5M (pH8) 20mL

- Medio ByD (para 1L 10X pH 6,5-6,7)
 - Solución A 5mL
 - Sequestrene 0,25g
 - Solución B 5mL
 - NH₄NO₃ 0,2g
 - Solución D 5mL

- Marcador de peso molecular Ladder 1 Kb
 - Ladder 20 µL
 - Loading 4 µL

- Protocolo CTAB
 1. Crecimiento de la bacteria en 5 mL de medio de cultivo
 2. Ajustar el cultivo a una densidad óptica (DO) de 0.3 a 600 nm
 3. Centrifugar 1,5 mL del cultivo a 14000 xg por 2 minutos y descartar sobrenadante.
 4. Resuspender el pellet en 1 mL de agua destilada estéril, centrifugar otra vez a 14000 xg por 2 minutos.
 5. Resuspender el pellet en 582 µL de buffer TE, adicionar 15 µL de SDS 20% y 3 µL de Proteinasa K (20mg/mL), mezclar bien e incubar por 1 hora a 37°C
 6. Adicionar 5 µL de NaCl 5M y mezclar bien
 7. Adicionar 80 µL de solución CTAB/NaCl (4,1g NaCl y 10 g CTAB en 100mL de agua) precalentado, mezclar bien e incubar 10-20 min a 65°C.
 8. Adicionar 700 µL de la mezcla cloroformo-isoamilalcohol (24:1), mezclar bien por 10 min y centrifugar por 5 min en microcentrifuga. Tomar fase acuosa (800 µL del sobrenadante) a tubo nuevo.

9. Adicional 500 μ L de fenol-cloroformo-isoamil alcohol (25:24:1), mezclar bien por 10 min a temperatura 21°C
10. Centrifugar por 5 min a máxima velocidad.
11. Transferir 300 a 500 μ L del sobrenadante a tubo nuevo, si forma interfase blanca repetir el paso 10.
12. Adicional 0,6 V (180 o 300 μ L) de isopropanol para precipitar el ADN. Mover el tubo hasta que se forme un precipitado blanco.
13. Incubar por 10 min a -80°C o -20°C por 4 horas o overnight.
14. Centrifugar por 20-25 min a velocidad máxima. Descartar sobrenadante a 4°C
15. Lavas ADN con etanol al 70% (900 μ L)
16. Centrifugar por 10 min a máxima velocidad para volver a obtener pellet.
17. Redisolver el pellet en 25-100 μ L de Buffer TE o 20 μ L agua destilada estéril.

- Determinación de ureidos. Protocolo Lescano, 2020.

Extracción

1. Material vegetal seco en estufa a 85°C.
2. Pesar 100 mg de material seco.
3. Añadir 1500 μ l de Buffer K_3PO_4 25 mM pH 6
4. Poner al baño maría durante 20 minutos a 100°C
5. Centrifugar a 9000xg 5 minutos.
6. Rescatar el sobrenadante.
7. La extracción se puede almacenar a 4 ° C

Reactivos	A) Glioxilato	B) Alantoato	C) Alantoina
a. Muestra	100 μ l	100 μ l	100 μ l
b. H ₂ O	500 μ l	300 μ l	200 μ l
c. Na(OH) 0,5 N			100 μ l
d. Incubacion a 100 °C			8 min
e. Poner en baño frio por 1 minuto			
f. HCl		100 μ l	100 μ l
		0,15N	0,65N
g. Incubar a 100 °C		4 min	4 min
h. Poner en baño frio por 1 minuto			

i. Buffer K_3PO_4 0,4M <u>pH 7</u>		100 μ l	100 μ l
j. Phenylhydrazine 3 mg/ml	100 μ l	100 μ l	100 μ l
k. Incubar por 5 min a temperatura ambiente			
l. HCl puro	500 μ l	500 μ l	500 μ l
m. $K_3[Fe(CN)_6]$ 16mg/ml	100 μ l	100 μ l	100 μ l
n. Mezclar varias veces e incubar por 10 min.			
o. Medir absorbancia a 520 nm inmediatamente.			

Anexo 2

Dice (Opt:1.00%) (Tol 1.0%-1.0%) (H=0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
Geles grandes

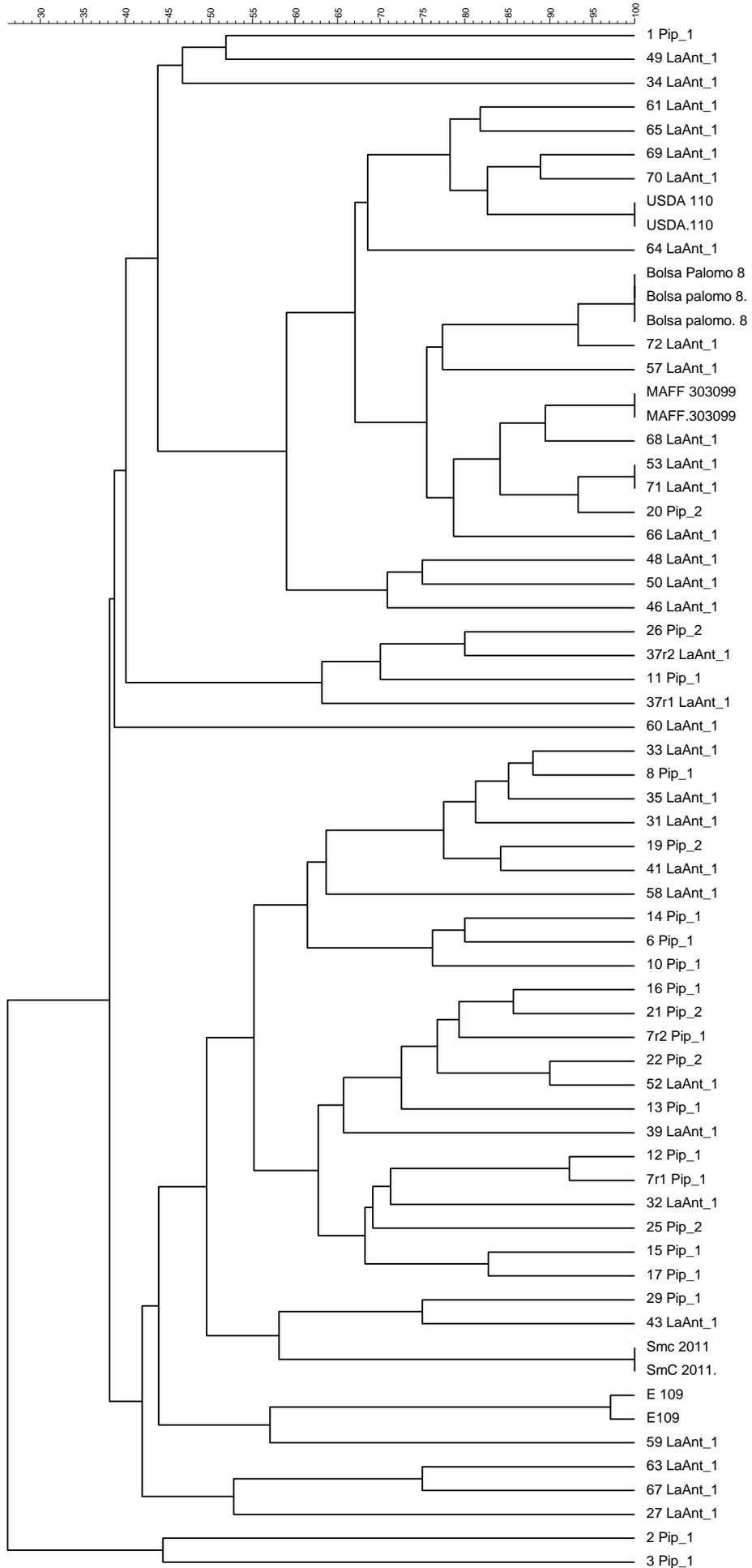


Figura 1: Dendrograma Dice-UPGMA realizado a partir de la matriz binaria de presencia/ausencia.

Dice (Opt:1.00%) (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
Geles grandes

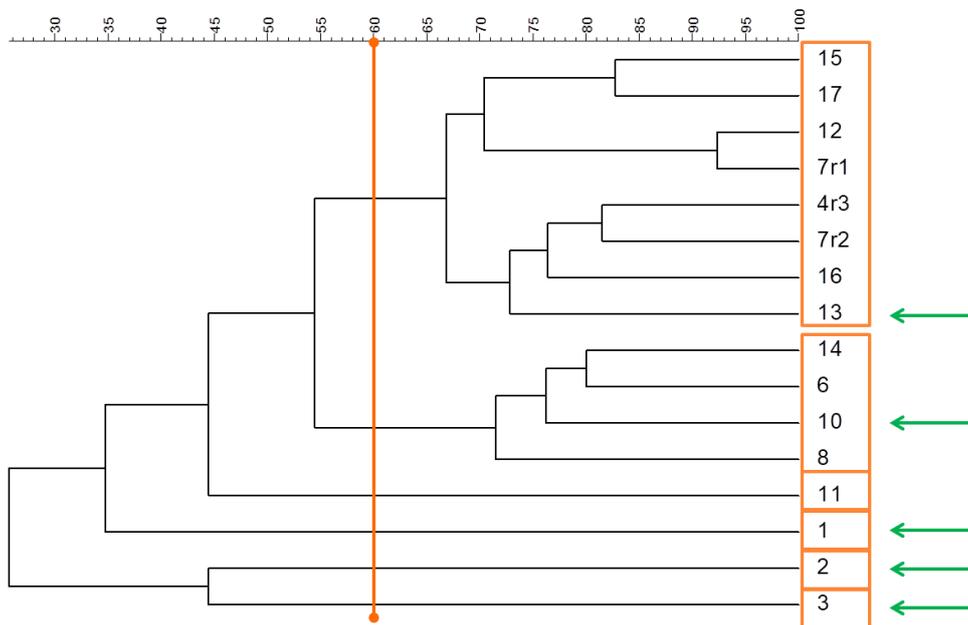


Figura 2: Dendrograma Dice-UPGMA realizado sobre los aislamientos de Pipanaco_1. La línea naranja delimita al 60% de similitud. Los rectángulos delimitan cada grupo de aislamientos con al menos 60% de similitud (en total 6). Las flechas verdes identifican aquellas cepas seleccionadas para el ensayo posteriores.

Dice (Opt:1.00%) (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
Geles grandes

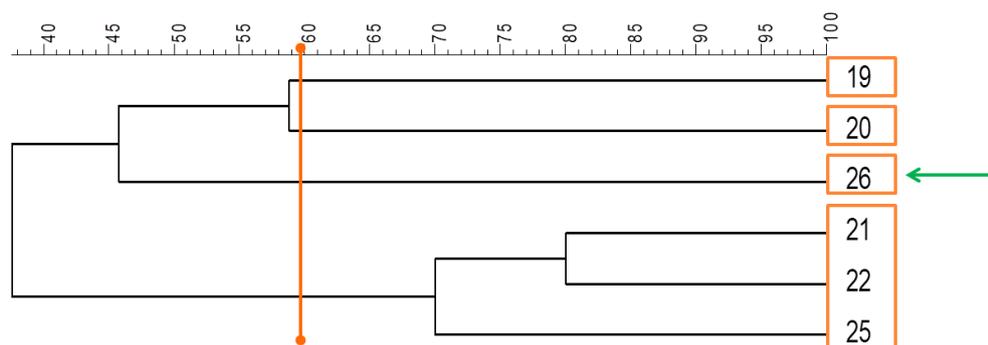


Figura 3: Dendrograma Dice-UPGMA realizado sobre los aislamientos de Pipanaco_2. La línea naranja delimita al 60% de similitud. Los rectángulos delimitan cada grupo de aislamientos con al menos 60% de similitud (en total 4). Las flechas verdes identifican aquellas cepas seleccionadas para el ensayo posteriores.

Aislamiento	Procedencia
2	Pip_1
34	LA_1
3	Pip_1
66	LA_1
6	Pip_1
72	LA_1
10	Pip_1
17	Pip_1
27	LA_1
53	LA_1
7	Pip_1
71	LA_1
20	Pip_2
50	LA_1
48	LA_1
63	LA_1
60	LA_1
52	LA_1
22	Pip_2
29	Pip_2
13	Pip_1
39	LA_1
14	Pip_1
371	LA_1
25	Pip_2
37	LA_1
15	Pip_1
11	Pip_1
32	LA_1
58	LA_1
59	LA_1
21	Pip_2
16	Pip_1

Tabla 1: Tabla de contingencia.

Aislamiento	Nodos (N°)	Peso_Nod (mg)	PF_Aerea (mg)	PF_Raiz (mg)	Nodos con Hojas (N°)	Altura (cm)	Largo Raiz (cm)	PS_Aerea (mg)	PS_Raiz (mg)
27	21,2	43,3	229,3	29,4	6,0	6,9	0,6	106,3	46,9
10	12,7	90,3	289,0	-99,3	5,0	11,0	0,4	117,6	21,9
13	10,7	73,5	255,2	61,8	5,3	8,7	0,6	117,4	55,1
2	5,8	45,0	93,0	-34,5	2,9	2,7	-0,2	32,7	15,1
Promedio de inoculos	2,93	16,20	46,80	-11,37	0,75	1,70	1,14	18,05	13,37
72	3,6	34,2	28,6	-43,5	1,9	2,7	2,4	-0,9	7,1
3	2,8	22,3	-15,5	-36,3	1,6	2,1	1,3	-11,6	-1,5
63	1,5	11,0	19,5	-76,9	0,0	1,0	0,3	17,3	0,9
46	0,8	5,8	40,0	-47,8	0,6	1,0	0,3	24,4	15,3
6	0,7	15,7	9,3	-98,4	1,2	0,2	2,6	-3,1	4,6
59	0,3	9,5	-13,5	-8,8	-0,7	-0,4	0,6	4,2	18,5
1	0,2	1,2	33,5	151,4	-0,8	0,7	1,1	19,4	31,8
66	0,0	0,0	70,6	-97,5	-0,7	9,1	0,8	-24,7	-3,8
58	0,0	0,0	65,0	-84,7	-1,5	-3,2	1,3	-20,9	-2,8
43	0,0	0,0	60,2	31,2	0,5	0,0	1,4	13,5	15,7
Control No Inoculado	0,0	0,0	205,0	349,3	6,7	11,6	19,9	82,1	60,8
34	0,0	0,0	203,3	416,5	5,8	11,1	20,8	87,5	77,3
29	0,0	0,0	192,0	341,0	6,0	11,2	20,8	84,4	67,8
60	0,0	0,0	189,2	352,3	7,0	11,6	23,3	88,8	61,3
37r1	0,0	0,0	179,7	358,7	6,0	9,7	20,7	70,3	65,0
49	0,0	0,0	169,4	322,0	4,6	10,1	20,6	77,6	61,4
26	0,0	0,0	167,8	347,7	5,0	10,4	20,8	74,5	67,3
48	0,0	0,0	151,4	369,0	6,4	11,0	22,2	70,6	69,4
63	2,8	22,3	-220,5	-385,5	-5,1	-9,5	-18,6	-93,7	-62,3
46	1,5	11,0	-185,5	-426,2	-6,7	-10,7	-19,7	-64,8	-59,8
6	0,8	5,8	-165,0	-397,0	-6,1	-10,6	-19,6	-57,7	-45,5
59	0,7	15,7	-195,7	-447,7	-5,5	-11,4	-17,3	-85,2	-56,2
1	0,3	9,5	-218,5	-358,0	-7,3	-12,0	-19,3	-77,9	-42,3
43	0,2	1,2	-171,5	-197,8	-7,5	-10,9	-18,8	-62,7	-29,0
60	0,0	0,0	-134,4	-446,7	-7,3	-2,6	-19,1	-106,8	-64,5
34	0,0	0,0	-140,0	-433,9	-8,1	-14,9	-18,6	-103,0	-63,5
29	0,0	0,0	-144,8	-318,1	-6,1	-11,7	-18,5	-68,6	-45,1

Tabla 2: Diferencias en los parámetros de crecimiento de plantas de *P flexuosa* inoculadas con aislamientos selectos respecto de plantas control no inoculadas.