



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO**

**Facultad de Agronomía y Veterinaria**

Trabajo Final presentado para optar al Grado de Ingeniero  
Agrónomo

**Estudio de la nodulación en leguminosas nativas**

Modalidad: Proyecto

**Costa Camila**

**DNI N° 35.473.329**

**Director:** Dra. Luciana Bianco

**Co-Director:** Dr. Jorge Angelini

**Río Cuarto – Córdoba**

**Diciembre 2018**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO**

**Facultad de Agronomía y Veterinaria**

**CERTIFICADO DE APROBACIÓN**

Título del Trabajo Final: **Estudio de la nodulación en leguminosas nativas.**

Autor: Costa Camila

DNI: 35.473.329

Director: Dra. Luciana Bianco

Co-Director: Dr. Jorge Angelini

Aprobado y corregido de acuerdo con las sugerencias de la Comisión Evaluadora:

Dra. Carla Bruno \_\_\_\_\_

Dra. Valeria Autrán \_\_\_\_\_

Fecha de Presentación: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

---

Secretario Académico

## AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional de Río Cuarto por darme la oportunidad de estudiar y de formarme como profesional.
- A Luciana Bianco, por su gran apoyo, confianza y paciencia para llevar a cabo este proyecto.
- A Jorge Angelini por acompañarme en esta etapa de mi carrera.
- A los integrantes de la cátedra de Morfología Vegetal, por su ayuda y cariño.
- A mi mamá, papá y hermana por ser quienes me han apoyado siempre, me contuvieron, me dieron ánimos para continuar a pesar de las dificultades y por inculcarme que el estudio es la base para poder desarrollarme como persona y profesional.
- A mi novio por acompañarme y aguantarme en los últimos años de carrera.
- A mis amigos y compañeros de estudio por compartir momentos inolvidables en esta etapa, por ayudarme y alentarme en todo momento.
- A todas aquellas personas que han formado parte de mi vida y que hicieron posible el cumplimiento de este objetivo.
- A todos, muchas gracias...

## ÍNDICE GENERAL

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>4</b>
<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>4</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>4</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>5</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>7</b>
<b>CONCLUSIÓN.....</b>	<b>16</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>17</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla N° 1:</b> .....	<b>5</b>
<b>Tabla N° 2:</b> .....	<b>15</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura N° 1:</b> .....	<b>9</b>
<b>Figura N° 2:</b> .....	<b>10</b>
<b>Figura N° 3:</b> .....	<b>11</b>
<b>Figura N° 4:</b> .....	<b>13</b>
<b>Figura N° 5:</b> .....	<b>14</b>

## RESUMEN

Actualmente es cada vez mayor el territorio cubierto por zonas áridas y semi-áridas en todo el mundo como consecuencia del calentamiento global. Si bien estas áreas se caracterizan por la presencia de una gran diversidad de leguminosas nativas, es poca la información sobre el rol que tanto la nodulación como la fijación biológica del nitrógeno tienen en los hábitats nativos de estas leguminosas. Se han realizado numerosos estudios sobre la nodulación, principalmente en especies de importancia agronómica. No obstante, son muchas las especies nativas que solo se han caracterizado superficialmente y miles permanecen aún sin haber sido exploradas. El estudio sobre la nodulación en las leguminosas nativas y sus rizobios asociados proporcionará conocimientos fundamentales para la conservación y utilización de aquellas especies que se adaptan a vivir en ambientes de condiciones desfavorables. En virtud de lo anterior, el objetivo de este trabajo es evaluar la capacidad de nodulación de especies de leguminosas nativas *in situ* en el área central de la Argentina y la diversidad de simbioses asociados. Para ello se tomaron muestras de semillas y sistemas radicales de leguminosas nativas que se distribuyen en Villa Rumipal, provincia de Córdoba. De cada especie se determinó la nodulación *in situ*, descripción de los distintos fenotipos de nodulación, estructura interna de los nódulos y caracterización de los simbioses asociados. Las leguminosas nativas tienen la capacidad de nodular, a excepción de *Tipuana tipu*, la cual no presentó nódulos. Se observaron nódulos de crecimiento determinado asociados a raíces laterales o adventicias y de crecimiento indeterminado. En cuanto a la estructura anatómica de los nódulos se determinó que presentan una corteza, donde se encuentra la zona meristemática y los haces vasculares, y la zona de infección. Con respecto a los simbioses que nodulan las especies de leguminosas nativas, se observaron que los aislamientos son de crecimiento rápido, colonias de colores claros y oscuros, acuosas y otras secas. Por lo cual se puede presumir que pertenecen al género *Rhizobium*, pero sería importante seguir con los estudios moleculares para confirmar que simbioses son los que nodulan dichas leguminosas.

**PALABRAS CLAVE:** leguminosas nativas, nódulos, simbioses, Argentina.

## SUMMARY

Arid and semi-arid land areas are currently increasing worldwide as a result of global warming. Although legume diversity is large in these land areas, little is known on the role of nodulation and nitrogen fixation in their native habitats. Several studies have been carried out on nodulation mainly in species of agronomic importance. However, several native species still remain completely unexplored. The study of nodulating native legumes and associated rhizobia will provide key knowledge for the conservation and management of species with adaptation to harsh environmental conditions. Therefore, the purposes of this work is to evaluate the nodulation capacity of native legume species *in situ* in the central area of Argentina and the diversity of associated symbionts. To do this, seeds and root systems samples of native legumes were taken. Legumes distributed in Villa Rumipal, province of Córdoba. Nodulation *in situ*, description of the different nodulation phenotypes, internal structure of nodules and characterization of the associated symbionts for each species was determined. The native legumes have the ability to nodulate, with the exception of *Tipuana tipu*, which did not present nodules. Determinate growth nodules associated with lateral or adventitious roots and indeterminate growth were observed. Concerning the anatomical structure of the nodules, it was determined that they present a cortex, where the meristematic zone and the vascular bundles are located, and the infection zone. With regard to the symbionts that nodulate the species of native legumes, it was observed that the isolates are of fast growth, colonies of light and dark colors, watery and other dry. Therefore, it can be presumed that they belong to the genus *Rhizobium*, but it would be important to continue with the molecular studies to confirm which symbionts nodulate these legumes.

**KEY WORDS:** native legumes, nodule, symbionts, Argentina.

## INTRODUCCIÓN

Se ha estimado que alrededor del 90% de las leguminosas son noduladas por bacterias pertenecientes al género *Rhizobium*. La nodulación se observa típicamente en especies que se clasifican dentro de dos grandes subfamilias de Leguminosas, Papilionoideae (97%) y Mimosoideae (96%). Si bien se han observado especies noduladas en la subfamilia Caesalpinioideae, el porcentaje es menor ya que sólo el 23% han sido reportadas como nodulantes (Sprent, 2009).

La nodulación implica la coordinación de dos procesos: un proceso de infección y un proceso de organogénesis, durante el cual se forma el nódulo (Sprent *et al.*, 2013; Ampomah *et al.*, 2017; Afkhami *et al.*, 2018; Ferguson *et al.*, 2018). Dentro del nódulo, las bacterias son capaces de reducir el nitrógeno atmosférico en compuestos nitrogenados que pueden ser utilizado por la planta huésped para la asimilación de compuestos orgánicos tales como aminoácidos y nucleótidos (Sprent *et al.*, 2013). La infección de los rizobios puede ocurrir a través de hilos de infección en los pelos radicales, a través del mecanismo de *crack entry* o directamente por la epidermis (Oldroyd y Downie 2008; Tajima *et al.*, 2008; Oldroyd *et al.*, 2011; Sprent *et al.*, 2013; Sprent *et al.*, 2017). Por lo general, las condiciones del medio establecen cómo y adonde las bacterias colonizarán al huésped (D’Haeze *et al.*, 2000; Oldroyd *et al.*, 2001; Goormachting *et al.*, 2004; Capoen *et al.*, 2007).

Se pueden distinguir dos tipos de nódulos: determinados e indeterminados, siendo esta característica determinada por la planta hospedera (Ferguson *et al.*, 2010). Las diferencias entre los dos tipos de nódulos son, el primer sitio donde se producen las divisiones celulares, el mantenimiento de los tejidos meristemáticos y la forma del nódulo (Newcomb *et al.*, 1979; Gresshoff y Delves, 1986; Rolfe y Gresshoff, 1988; Guinel, 2009; Sprent *et al.*, 2013; Udvardi y Poole, 2013; Kohlen *et al.*, 2018). En general, los nódulos indeterminados presentan, desde afuera hacia adentro, una primera zona llamada corteza formada por células parenquimáticas. Estas células pueden suberizarse en algunas especies, formando una peridermis (Brown y Walsh, 1994, 1996). La segunda zona está representada por los haces vasculares que se ramifican y rodean la zona de infección, estos haces intercambian compuestos nitrogenados e irrigan al nódulo. La tercera zona es la ocupada por el meristema y la cuarta es la zona de infección, compuesta por células infectadas y no infectadas, éstas últimas denominadas intersticiales o parenquimáticas, importantes en el proceso de asimilación de nitrógeno (Rothschild, 1970; Van de Wiel *et al.*, 1990; Guinel, 2009). Los nódulos indeterminados presentan un meristema persistente y forma elongada. Las primeras divisiones ocurren en el interior de la corteza, seguido por divisiones en la endodermis y el periciclo, generando nuevos tejidos que son infectados por los rizobios. Este tipo de nódulo es funcional por un tiempo prolongado y contiene una población heterogénea de bacteroides

que son alargados. La senescencia no ocurre rápidamente (Hartmann *et al.*, 2002; Ferguson *et al.*, 2010). En general, se asocian con leguminosas de climas templados como trébol (*Trifolium repens*), alfalfa (*Medicago sativa*), *Prosopis alba* y *Acacia* sp. (Newcomb *et al.*, 1979; Räsänen *et al.*, 2001; Ferguson *et al.*, 2010).

Si bien los nódulos determinados presentan una organización anatómica similar a los anteriores, se diferencian de ellos en su forma esférica y en que presentan la zona meristemática de manera temporal, por lo cual son viables durante un corto periodo de tiempo. Generalmente, las primeras divisiones celulares ocurren en las células subepidérmicas de la superficie de la corteza. Los nódulos determinados contienen una población homogénea de bacteroides con forma de bastón (Newcomb *et al.*, 1979; Ferguson *et al.*, 2010). La diferenciación de las células ocurre de manera sincronizada y, al cabo de cierto tiempo, estas mueren. Por lo tanto, estos nódulos viven unas pocas semanas (Rolfe y Gresshoff, 1988). Se encuentran en leguminosas de climas tropicales y subtropicales como soja (*Glycine max*), guisante (*Vigna unguiculata*), poroto común (*Phaseolus vulgaris*) y pongamia (*Pongamia pinnata*), también se encuentran en especies de climas templados como *Lotus japonicus* y *Adesmia bicolor* (Ferguson *et al.*, 2010; Bianco, 2014).

Estudios recientes han propuesto otros tipos de nódulos además de los descriptos anteriormente: nódulos determinados tipo desmoide que son esféricos con lenticelas y están presentes en las tribus Phaseoleae y Loteae, nódulos determinados tipo aeshynomenoide que están asociados con raíces laterales o adventicias y están presentes en las tribus Aeshynomeneae, Adesmiae, Dalbergieae, nódulos tipo lupinoide presente en especies de *Lupinus*, nódulos indeterminados no ramificados que son comunes en la subfamilia Mimosoideae, nódulos indeterminados con una o pocas ramificaciones que están presentes en la subfamilia Papilionoideae, y nódulos indeterminados con muchas ramificaciones que se encuentran en todas las subfamilias. Estos nódulos merecen ser estudiados con mayor profundidad, ya que se observaron en plantas que tienen gran importancia para la agricultura (Sprent, 2007; Sprent, 2009; Sprent *et al.*, 2013; Bianco, 2014; Malpassi *et al.*, 2015; Sprent *et al.*, 2017).

La familia Leguminosae puede ser nodulada por una gran diversidad de bacterias (Denison y Kiers, 2011; Peix *et al.*, 2015). El análisis de la diversidad de rizobios que nodulan las leguminosas nativas ha aportado resultados interesantes en cuanto a la taxonomía rizobiana. En la actualidad se incluyen 13 géneros en los cuales hay más de 98 especies pertenecientes a  $\alpha$ -Proteobacterias y  $\beta$ -Proteobacterias que son capaces de participar en la simbiosis. La mayoría de estas especies bacterianas se encuentran en la familia Rhizobiaceae, clase  $\alpha$ -proteobacterias, y se destacan en los géneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer* y *Bradyrhizobium*. Sin embargo estudios realizados recientemente han demostrado que existen otros géneros además de éstos, dentro de ellos se encuentran

*Aminobacter*, *Azorhizobium*, *Blastobacter*, *Devosia*, *Methylobacterium*, *Microvirga*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium* y *Shinella* correspondientes a la clase  $\alpha$ -Proteobacterias y *Burkholderia* y *Cupriavidus* correspondientes a la clase  $\beta$ -Proteobacterias. Estos géneros han adquirido importancia para la agricultura debido a su capacidad de fijar considerable cantidad de nitrógeno atmosférico en simbiosis con las leguminosas (Gyaneshwar *et al.*, 2011; Ardley *et al.*, 2012; Huancheng *et al.*, 2012; Peix *et al.*, 2015; Weir, 2016; Ardley, 2017; Sprent *et al.*, 2017).

Se sabe que la fijación biológica de nitrógeno (FBN) es afectada por la sequía, anegamiento, salinidad, altura, alta/baja temperatura, alto/bajo pH, escasos nutrientes, toxicidad, entre otros factores. Algunas o todas estas condiciones ambientales son el ambiente natural de muchas leguminosas. En los últimos años ha surgido un gran interés por la simbiosis entre rizobios y leguminosas nativas que viven en condiciones ambientales extremas ya que son capaces de adaptarse a diferentes condiciones ecológicas y de fijar considerables cantidades de nitrógeno (Sprent y Gelhot, 2010).

Con el cambio climático y una población mundial cada vez mayor, hay una gran necesidad de conocer la diversidad de leguminosas nativas noduladas y los microorganismos asociados para introducirlos en ambientes áridos y de condiciones desfavorables. Si bien se han realizado estudios de nodulación y FBN de leguminosas nativas en distintos lugares del mundo (Sprent, 2001; Scheffer-Basso *et al.*, 2001; Wachendorf *et al.*, 2001; Dear *et al.*, 2003; Sprent, 2007; Ng y Hau, 2008; Pawelek *et al.*, 2008; Schimel, 2010; Sprent y Gelhot, 2010; Muniz *et al.*, 2011; Bianco *et al.*, 2012; Ampomah *et al.*, 2012; Sprent *et al.*, 2013; Sprent *et al.*, 2017), en Argentina existe un gran número de especies nativas de esta familia que podrían tener capacidad para nodular y fijar nitrógeno atmosférico, pero que aún no se han estudiado en su hábitat natural. Tales especies y sus simbiontes representan un germoplasma único que pueden adoptarse para potenciar los avances en la agricultura y luego ser utilizadas para la mitigación y adaptación a los efectos del cambio climático. El estudio de nodulación y las características de los simbiontes asociados a las leguminosas nativas permitirá conservar, manejar y utilizar las especies de interés.

## **HIPÓTESIS**

Las especies de leguminosas nativas del área central de la Argentina tienen capacidad de asociarse a su simbionte y nodular en su ecosistema natural.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la capacidad de nodulación de especies de leguminosas nativas *in situ* en el área central de la Argentina y la diversidad de simbiontes asociados.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar el estado de nodulación de las especies de leguminosas herbáceas y arbóreas nativas en su ecosistema natural.
- Determinar la ubicación de nódulos presentes sobre la raíz principal y raíces laterales.
- Describir los distintos fenotipos de nodulación.
- Describir la estructura interna de los nódulos.
- Caracterizar fenotípicamente los simbiontes que nodulan estas leguminosas nativas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Lugar de muestreo y toma de muestras*

Los muestreos se realizaron en el pedemonte de las sierras de Comechingones en Villa Rumipal (32° 11' S y 64° 28' O). Las características del sitio de muestreo son: altura de 550 m.s.n.m., suelo con pH 6,6, de textura franco arenosa muy fina y 3,25% de materia orgánica. Se coleccionaron semillas y sistemas radicales de las especies nativas pertenecientes a la familia Leguminosas que se detallan en la Tabla 1. Se contó con la lista de las especies y la distribución de las mismas (Basconsuelo y Kraus, 2000; Bianco *et al.*, 2001; Basconsuelo, 2004).

Tabla 1. Especies nativas pertenecientes a la familia Leguminosas, clasificadas según las subfamilias y tribus a las que pertenecen.

Sub-familia	Tribu	Especie
Papilionoideae	Aeschynomeneae	<i>Zornia gemella</i> (Wild.) Vogel
		<i>Stylosanthes hyppocampoides</i> Mohlenbr
	Dalbergieae	<i>Tipuana tipu</i> (Benth.) Kuntze
	Galegeae	<i>Coursetia hassleri</i> Chodat
Mimosoideae	Mimoseae	<i>Prosopis chilensis</i> (Molina) Stuntz
		<i>Desmanthus depressus</i> Humb y Bonpl ex Wild
		<i>Prosopis caldenia</i> Burkart
Caesalpinioideae	Caesalpinieae	<i>Bauhinia forficata</i> Link
	Cassieae	<i>Chamaecrista rotundifolia</i> (Persoon) Greene

### ***Determinación de nodulación in situ y descripción de los distintos fenotipos***

En cada sitio de muestreo se detectaron cinco individuos de cada especie a los que se le descubrió la raíz retirando cuidadosamente el suelo alrededor de ella hasta una profundidad aproximada de 0.30 m (Somasegaran y Hoben, 1994). Se determinó la presencia o ausencia de nódulos. También se describió la ubicación, el aspecto fenotípico y su color interior para determinar presencia de leghemoglobina. En el caso de las leguminosas arbóreas *Prosopis caldenia*, *Prosopis chilensis* y *Tipuana tipu* se realizaron ensayos con macetas, utilizando semillas y suelo obtenido en el sitio de muestreo. En el laboratorio se fotografiaron los nódulos de cada especie provenientes del campo con una cámara digital Motic conectada a un microscopio Zeiss Axiophot.

### ***Determinación de la estructura interna de los nódulos de las especies de leguminosas nativas***

Se extrajeron los nódulos y fueron fijados en FAA (etanol: ácido acético: formaldehído 50:5:30:15), deshidratados en serie ascendente de alcoholes e incluidos en Histowax (D'Ambrogio de Argüeso, 1986). Estos materiales, posteriormente, fueron cortados a 12 µm de espesor con micrótopo Minot y teñidos con Safranina-Verde Rápido (Dizeo de Strittmatter, 1979; D'Ambrogio de Argüeso, 1986). Los cortes histológicos fueron analizados y documentados con un microscopio Axiophot Zeiss conectado a una cámara digital Motic.

### ***Caracterización fenotípica de los simbiosomas asociados***

Se obtuvieron nódulos a partir de sistemas radicales de las especies nativas recolectadas en el campo. Los nódulos fueron extraídos mecánicamente de raíz principal y raíces laterales, y fueron esterilizados superficialmente para aislar las bacterias siguiendo la metodología descrita por Vincent (1970). Luego de hidratarlos durante una noche, se los esterilizó un minuto con 300 µl de etanol, tres minutos con 500 µl de hipoclorito de sodio al 6% y se realizaron seis lavados con 500 µl de agua destilada estéril. Luego, cada nódulo se trituró en agua destilada estéril y la suspensión se sembró en medio YEMA. Para corroborar la esterilidad del agua de enjuague, se sembró 100 µl del último lavado en una placa con el mismo medio de cultivo. A partir de las colonias aisladas, se obtuvieron cultivos con lo que se inocularon a plántulas creciendo en soporte inerte estéril para corroborar su capacidad de nodular. Los aislamientos bacterianos fueron caracterizados fenotípicamente según la metodología descrita por Taurian *et al.* (2002, 2006).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Nodulación *in situ* de las especies de leguminosas nativas

En este trabajo se observó que las leguminosas nativas *Bauhinia forficata*, *Coursetia hassleri*, *Desmanthus depressus*, *Prosopis caldenia*, *Stylosanthes hyppocampoides* y *Zornia gemella* presentaron capacidad para nodular en su ecosistema natural (Fig. 1, 2 y 3), estos datos concuerdan con estudios realizados previamente en especies del mismo género *Bauhinia microstachya*, *Coursetia ferruginea*, *Desmanthus paspalaceus*, *Prosopis cineraria*, *Stylosanthes seabrana* y *Zornia glochidiata* (Rothschild 1970; Doignon-Bourcier *et al.*, 1999; Laurent-Fulele *et al.*, 2000; Räsänen *et al.*, 2001; McInnes y Date, 2005; Sprent, 2005; Fornasero 2014). En el caso de *Chamaecrista rotundifolia* y *Prosopis chilensis* se observó que también tuvieron capacidad para nodular (Fig. 1 y 2) en coincidencia con datos reportados en las mismas especies de leguminosas (Morales, 1992; Naisbitt *et al.*, 1992; Acosta *et al.*, 1994; Pedraza *et al.*, 2001; Räsänen *et al.*, 2001). *Tipuana tipu* no presentó nódulos en su sistema radical (Fig. 3D), lo cual difiere de resultados obtenidos por Rothschild (1970) y Sprent (2005) en los cuales la especie muestra capacidad para nodular y sus nódulos fueron de crecimiento determinados tipo aescynomenoide.

### Fenotipos de nodulación

Las especies *Stylosanthes hyppocampoides* y *Zornia gemella* presentaron nódulos de crecimiento determinado tipo aescynomenoide (Fig. 3B y 3F). Este tipo de nódulo está siempre asociado a raíces laterales o adventicias, no posee lenticelas y se encuentra en las tribus Aeschynomeneae, Adesmiae y Dalbergieae pertenecientes a la sub-familia Papilionoideae (Sprent *et al.*, 2013; Sprent *et al.*, 2017). Las especies *Bauhinia forficata*, *Chamaecrista rotundifolia*, *Coursetia hassleri*, *Desmanthus depressus*, *Prosopis caldenia* y *Prosopis chilensis* presentaron nódulos de crecimiento indeterminado (Fig. 1 y 2) característico de la tribu Mimoseae de la sub-familia Mimosoideae, las tribus Caesalpinieae y Cassieae de la sub-familia Caesalpinioideae y tribu Galegeae de la sub-familia Papilionoideae (Sprent y Parsons, 2000; Gehlot *et al.*, 2012; Sprent *et al.*, 2013). En *Prosopis Caldenia* y *Prosopis Chilensis* los nódulos se caracterizaron por su forma elongada y lobulada, presentan ramificaciones en forma de abanico y tienen un tamaño superior a los 5mm. Otras características que poseen los nódulos es que son de color pardo y se ubican sobre raíces secundarias (Fig.2D y 2F). Estos resultados coinciden con estudios realizados por Morales (1992) en especies de *Prosopis Chilensis* nativas de las provincias de Mendoza y San Juan, inoculadas con suelo donde crecen estas poblaciones. Con respecto al género *Bauhinia* estudios realizados por Basak y Goyal (1980), de Souza Moreira *et al.* (1992), Ng y Hau (2009) y de Faria *et al.* (2010) observaron que las especies no nodulaban y las raíces

tenían un color oscuro. En contraste, Rothschild (1970) observó en *Bauhinia microstachya* la presencia de algunos nódulos sobre raíces secundarias, de forma redondeada, de tamaño mediano a pequeño y de color amarillento cuando están maduros. Luego en este mismo estudio se reportó que los nódulos senescentes se vuelven oscuros, rugosos y de forma irregular y suelen perder el tejido bacteriano y quedar reducidos a la corteza hueca. En este trabajo *Bauhinia forficata* presentó pocos nódulos en las raíces secundarias, todos de crecimiento indeterminado y algunos de color amarillento y otros más oscuros (Fig. 1B). En *Coursetia hassleri* se observó la presencia nódulos con crecimiento indeterminado de forma ovoide, sin ramificaciones, distribuidos en raíces secundarias (Fig. 1F). Esta forma ovoide en los nódulos más viejos desarrolla ramificaciones como resultado de la división de los meristemas. Si bien no hay estudios previos realizados en *Coursetia hassleri* los resultados concuerdan con especies pertenecientes a la misma tribu (Galegae) (Lotocka *et al.*, 2012). A diferencia de estos resultados en datos reportados por de Souza *et al.*, (1994) la especie *Coursetia ferruginea* se mostró no nodulante.

En cuanto a *Chamaecrista rotundifolia* se observó la presencia de nódulos que parecen tener un crecimiento indeterminado en raíces secundarias (Fig.1D), pero se ha comprobado que todas las especies herbáceas de este género que han sido examinadas tienen nódulos leñosos de forma intermedia entre las más primitivas y las más avanzadas (de Faria *et al.*, 1987; Naisbitt *et al.*, 1992).

*Desmanthus depressus* presentó nódulos de crecimiento indeterminado de forma ovoide distribuidos principalmente en raíces secundarias (Fig. 2B), estos resultados concuerdan con estudios realizados en México en la especie *Desmanthus virgatus* (Garza Requena y Valdes, 2000).

En todas las especies de leguminosas nativas se observó un color rojo en el interior de los nódulos, signos de presencia de leghemoglobina, por lo cual se puede presumir que son activos y que las leguminosas son capaces de fijar nitrógeno en simbiosis con los rizobios del suelo.



Fig. 1. A. Planta adulta de *Bauhinia forficata*. B. Nódulos indeterminados de *Bauhinia forficata*. C. Planta adulta de *Chamaecrista rotundifolia*. D. Nódulos indeterminados de *Chamaecrista rotundifolia*. E. Planta adulta de *Coursetia hassleri*. F. Nódulos indeterminados de *Coursetia hassleri*. Escala de barra: 3mm. Sierras de Comechingones. Provincia de Córdoba. Año 2015-2017.

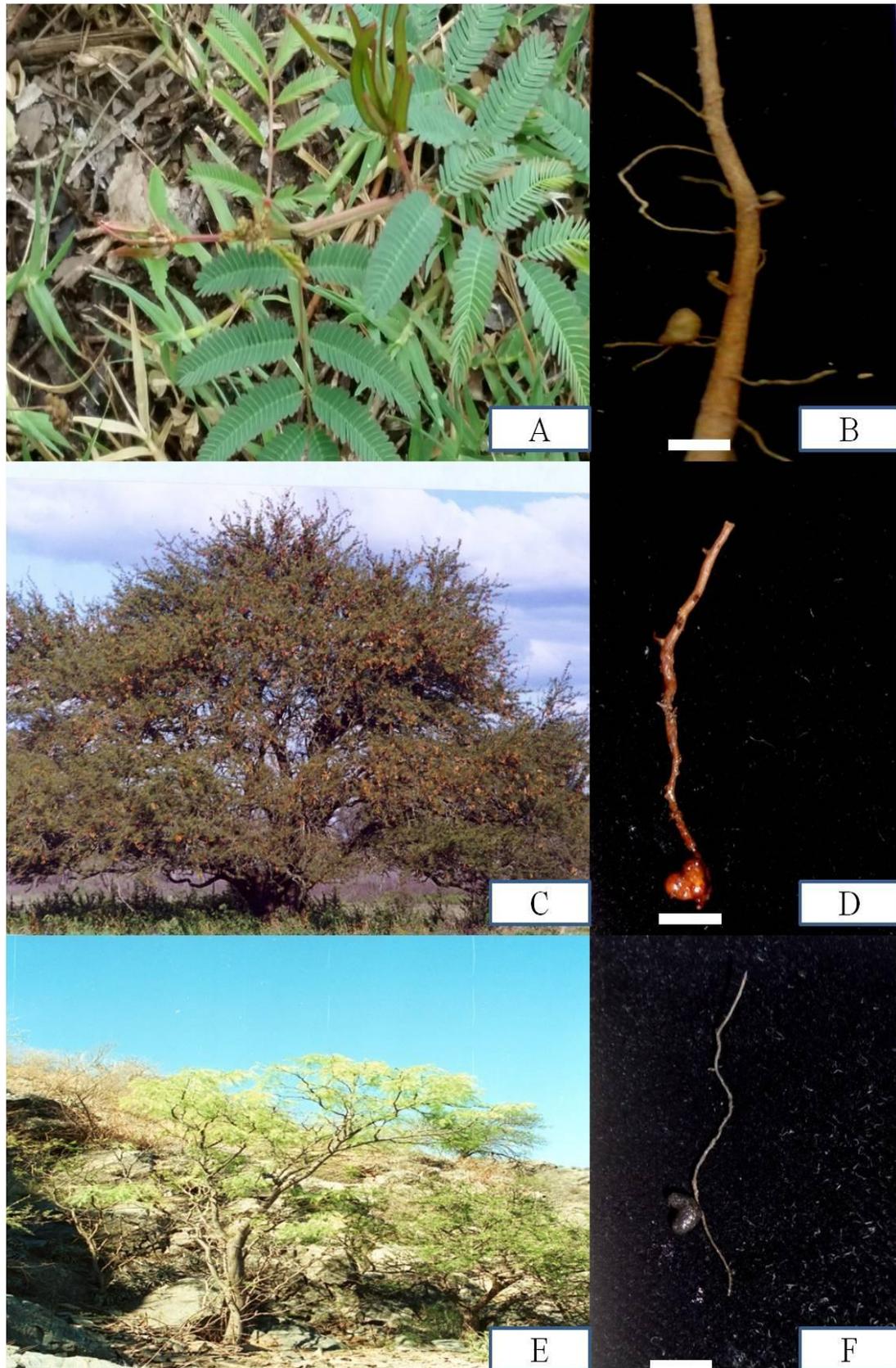


Fig. 2. A. Planta adulta de *Desmanthus depressus*. B. Nódulos indeterminados de *Desmanthus depressus*. C. Planta adulta de *Prosopis caldenia*. D. Nódulos indeterminados de *Prosopis caldenia*. E. Planta adulta de *Prosopis chilensis*. F. Nódulos indeterminados de *Prosopis chilensis*. Escala de barra: 3mm. Sierras de Comechingones. Provincia de Córdoba. Año 2015-2017.

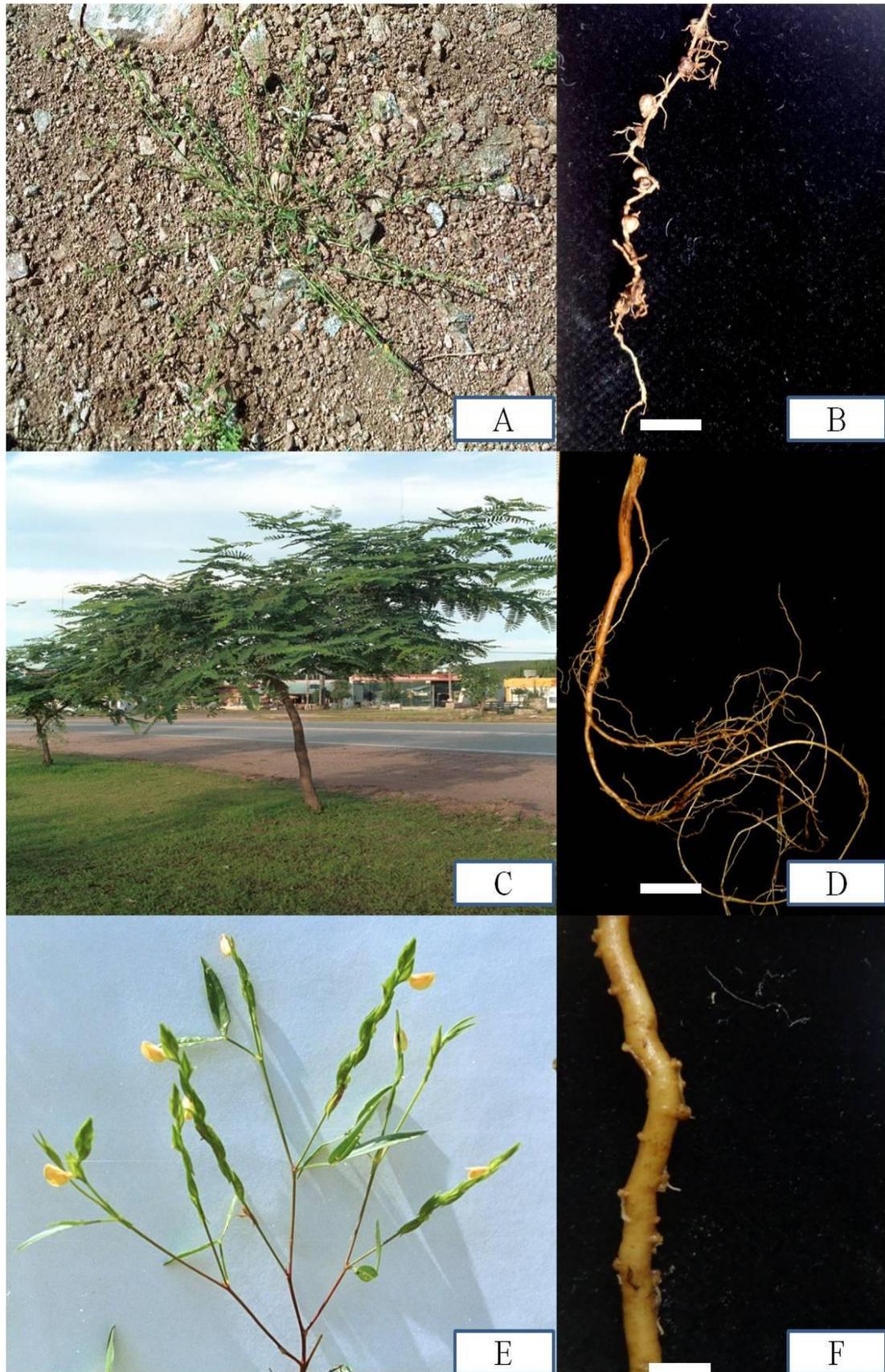


Fig. 3. A. Planta adulta de *Stylosanthes hyppocampoides*. B. Nódulos determinados de *Stylosanthes hyppocampoides*. C. Planta adulta de *Tipuana tipu*. D. Raíz de *Tipuana tipu*. E. Planta adulta de *Zornia gemella*. F. Nódulos determinados de *Zornia gemella*. Escala de barra: 3mm. Sierras de Comechingones. Provincia de Córdoba. Año 2015-2017.

### **Características anatómicas de los nódulos de las especies de leguminosas nativas**

Los cortes transversales de los nódulos mostraron dos zonas: corteza y zona de infección (Fig 4.A-H), estos resultados coinciden con estudios anatómicos realizados previamente en nódulos de leguminosas (Rothschild, 1970; Vance, 2002; Guinel, 2009; Sprent *et al.*, 2013; Sprent *et al.*, 2017). En todas las especies la corteza está formada por cuatro a diez capas de células parenquimáticas de forma irregular y paredes delgadas. En algunas especies como *Bauhinia forficata*, *Desmanthus depressus*, *Stylosanthes hyppocampoides* y *Zornia gemella* las células que se encuentran en el interior de la corteza presentaron abundante almidón (Fig 5.C). Además en *Bauhinia forficata* se observó una vaina parenquimática con taninos (Fig 5.A). La acumulación de almidón es importante durante las primeras etapas del desarrollo del nódulo, ya que, este se metaboliza para suministrar energía para la FBN y satisfacer las demandas metabólicas de los bacteroides (Forrest *et al.*, 1991). Por otro lado, se observó en los nódulos de *Zornia gemella* la formación de peridermis (Fig 5.D). Esta característica se ha reportado en especies expuestas a períodos prolongados de sequía y es una adaptación que ayuda a retener la humedad y por lo tanto evitar la deshidratación. Se ha observado en especies como *Rhynchosia aurea*, *Tephrosia leptostachya*, *Mimosa* sp. y *Vachellia jacquemontii* que crecen en zonas desérticas (Gehlot *et al.*, 2012).

Dentro de la corteza se pudo observar, además, el sistema vascular que irriga al nódulo y la zona meristemática. Ésta última está formada por una o dos capas de células irregulares y alargadas, es continua y rodea al nódulo (Fig 4.A-H). En nódulos indeterminados la zona meristemática produce células para la formación de todos los tejidos del nódulo y para su auto-mantenimiento; en la mayoría de las especies el meristema no está infectado por rizobios (Lotocka *et al.*, 2012).

Finalmente, la zona de infección está situada en el centro del nódulo, es indivisa y de contorno aproximadamente circular. Está formada por un parénquima cuyas células son isodiamétricas o redondeadas con un núcleo que suele ser visible y de posición central. La mayoría de las células se hallan infectadas por el microorganismo simbiote (Fig 5.B). Aunque los nódulos parecen similares desde el exterior, pueden ser bastante diferentes por dentro. Por ejemplo, en la zona de infección de los nódulos indeterminados de las subfamilia Mimosoideae y Caesalpinioideae presentan una mezcla de células infectadas y no infectadas. A diferencia de especies pertenecientes a las tribus Genisteeae y Crotalariaeae, como en los géneros *Lupinus*, *Cytisus*, y *Crotalaria* en las cuales la zona de infección está infectada de manera uniforme (Sprent *et al.*, 2013).

Con respecto al género *Chamaecrista* se sabe que en especies como *Chamaecrista ensiformis*, *Chamaecrista flexuosa*, *Chamaecrista fasciculata* en la zona de infección los bacteroides se encuentran retenidos dentro de los hilos de infección que son persistentes

durante todo el período de fijación de nitrógeno (Naisbitt *et al.*, 1992; Sprent *et al.*, 2017). Esta característica en este estudio no se pudo observar en *Chamaecrista rotundifolia* por la metodología usada para el análisis anatómico.

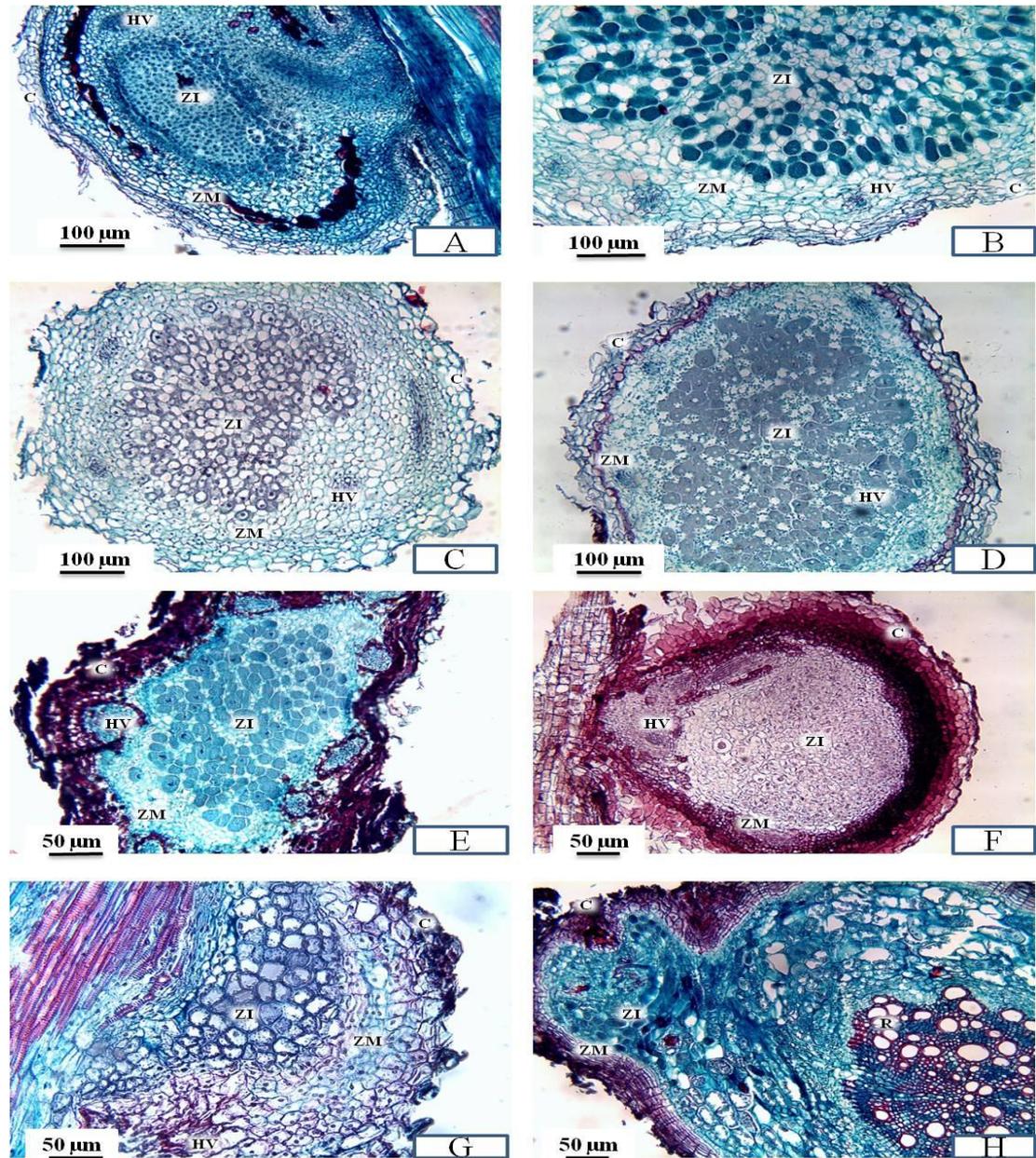


Fig. 4. Caracteres anatómicos de nódulos. A. Nódulo de *Bauhinia forficata*. B. Nódulo de *Chamaecrista rotundifolia*. C. Nódulo de *Coursetia hassleri*. D. Nódulo de *Desmanthus depressus*.

E. Nódulo de *Prosopis caldenia*. F. Nódulo de *Prosopis chilensis*. G. Nódulo de *Stylosanthes hyppocampoides*. H. Nódulo de *Zornia gemella*. Abreviaturas: C: corteza, HV: haz vascular, R: raíz, ZI: zona de infección, ZM: zona meristemática. Sierras de Comechingones. Provincia de Córdoba. Año 2015-2017.

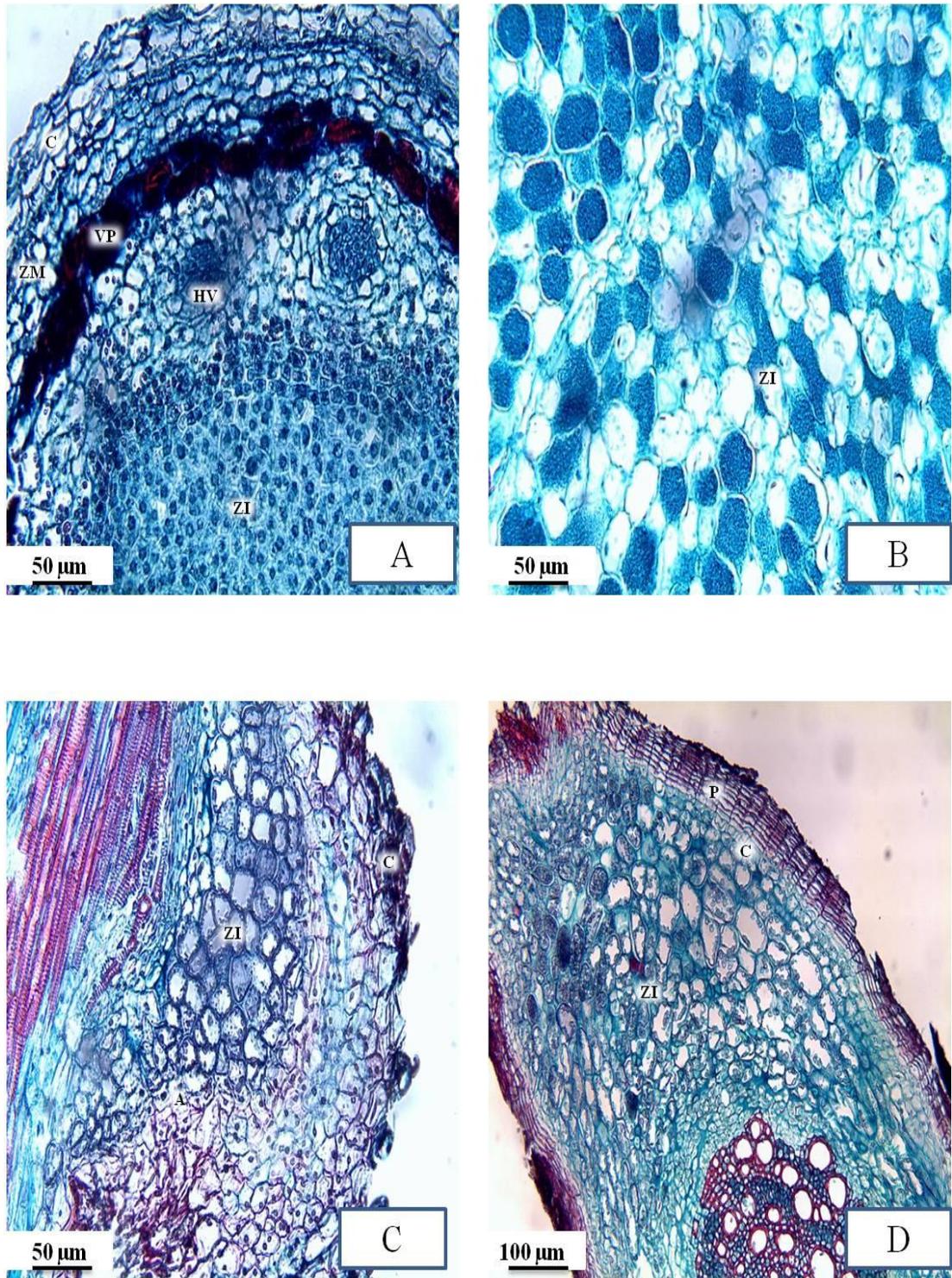


Fig. 5. Caracteres anatómicos de nódulos. A. Detalle de vaina parenquimática en nódulo de *Bauhinia forficata*. B. Detalle de zona de infección en nódulo de *Chamaecrista rotundifolia*. C. Detalle de almidón en corteza de nódulo de *Stylosanthes hyppocampoides*. D. Detalle de peridermis en nódulo y raíz de *Zornia gemella*. Abreviaturas: A: almidón, C: corteza, HV: haz vascular, P: peridermis, VP: Vaina parenquimática, ZI: zona de infección, ZM: zona meristemática. Sierras de Comechingones. Provincia de Córdoba. Año 2015-2017.

### **Características fenotípicas de los simbioses que nodulan las especies de leguminosas nativas**

Se obtuvieron aislamientos de las especies de leguminosas nativas en el medio de cultivo YEMA a partir de los nódulos extraídos de plantas provenientes del campo (Tabla 2). Las colonias presentaron colores claros y oscuros, algunas fueron acuosas y otras secas. Midieron de 2 a 4 mm de diámetro entre los 3 y 5 días de incubación. Los aislamientos obtenidos de *Chamaecrista rotundifolia*, *Desmanthus depressus*, *Prosopis chilensis*, *Prosopis caldenia*, *Stylosanthes hyppocampoides* y *Zornia gemella* mostraron crecimiento rápido, lo cual concuerda con estudios realizados previamente en especies del mismo género como *Chamaecrista rotundifolia* (Pedraza *et al.*, 2001), *Desmanthus paspalaceus* (Fornasero *et al.*, 2014), *Desmanthus virgatus*, *Stylosanthes scabra*, *Prosopis chilensis* (Morales, 1992) y *Zornia glochidiata* (Laurent- Fulele, 2000). Los aislamientos obtenidos de *Chamaecrista rotundifolia* y *Zornia gemella* también mostraron crecimiento rápido. En contraste con estos datos, en un ensayo realizado por Doignon-Bourcier *et al.*, (1999) en leguminosas nativas de climas áridos, se observó que en *Chamaecrista* sp. y *Zornia glochidiata* los aislamientos fueron de crecimiento lento. Con respecto a *Bauhinia forficata* y *Coursetia hassleri* se obtuvieron aislamientos de crecimiento rápido con características fenotípicas similares al resto de los aislamientos. En la mayoría de los estudios realizados en el género *Bauhinia* y *Coursetia* las especies se registran como no nodulantes, por lo cual no se encuentra información sobre las características de los rizobios que nodulan estas leguminosas nativas (Basak y Goyal, 1980; de Souza Moreira *et al.*, 1992; de Souza *et al.*, 1994; de Faria *et al.* 2010).

Tabla 2. Número de aislamientos obtenidos de las especies de leguminosas nativas. Sierras de Comechingones. Provincia de Córdoba. Año 2015-2017.

<b>ESPECIES</b>	<b>Nº DE AISLAMIENTOS</b>
<i>Bauhinia forficata</i>	6
<i>Chamaecrista rotundifolia</i>	6
<i>Coursetia hassleri</i>	26
<i>Desmanthus depressus</i>	4
<i>Prosopis caldenia</i>	12
<i>Prosopis chilensis</i>	20
<i>Stylosanthes hyppocampoides</i>	21
<i>Tipuana tipu</i>	0
<i>Zornia gemella</i>	16

## CONCLUSIÓN

Se concluye que las especies de leguminosas nativas en el área central de Argentina, tienen la capacidad de nodular *in situ*, a excepción de *Tipuana tipu*, la cual no presentó nódulos. Solo en dos de las ocho especies estudiadas se observan nódulos de crecimiento determinado asociados a raíces laterales o adventicias. Mientras que en el resto de las especies los nódulos son de crecimiento indeterminado. En cuanto a la estructura anatómica de los nódulos se determinó que presentan una corteza, donde se encuentra la zona meristemática y los haces vasculares, y la zona de infección. En algunas especies se observó también la presencia de peridermis y sustancias de reserva en células de la corteza. La peridermis se forma generalmente en respuesta a condiciones de sequía.

Con respecto a los simbiontes que nodulan las especies de leguminosas nativas, se observó que los aislamientos son de crecimiento rápido, colonias de colores claros y oscuros, acuosas y otras secas. Por lo cual se puede presumir que pertenecen al género *Rhizobium*, pero sería importante seguir con los estudios moleculares para confirmar que simbiontes son los que nodulan dichas leguminosas.

Este estudio debería continuar para conocer cómo se comportan las leguminosas nativas junto con los simbiontes en la FBN. Este proceso es significativo a nivel ecológico y las especies nativas cumplen una función importante en la restauración de los ecosistemas degradados y en el mantenimiento de la biodiversidad.

## BIBLIOGRAFIA

- ACOSTA, M.; L. OLIVA; A. ABRIL. 1994. Colección de rhizobios de *Prosopis* arbóreos en la zona semiárida de la provincia de Córdoba (Argentina). *Ciencia del suelo*.12: 38-40.
- AFKHAMI, M.E.; D.L. MAHLER; J.H. BURNS; M.G. WEBER; M.F. WOJCIECHOWSKI; J. SPRENT y S.Y. STRAUSS. 2018. Symbioses with nitrogen-fixing bacteria: nodulation and phylogenetic data across legume genera. *Ecology*. 99: 502.
- AMPOMAH, O.Y.; E.K. JAMES; P.P.M. IANNETTA; G. KENICER; J.I. SPRENT y K. HUSS-DANNEL. 2012. Nodulation and ecological significance of indigenous legumes in Scotland and in Sweden. *Symbiosis*. 57: 133–148.
- AMPOMAH, O.Y.; S.A. MOUSAVI; K. LINDSTRÖMB; K. HUSS-DANELL. 2017. Diverse *Mesorhizobium* bacteria nodulate native *Astragalus* and *Oxytropis* in arctic and subarctic areas in Eurasia. *Systematic and Applied Microbiology*. 40: 51–58.
- ARDLEY, J.K.; M.A. PARKER; S.E. DE MEYER; R.D. TRENGOVE; G.W O' HARA; W.D. REEVE; R.J. YATES; M.J. DILWORTH; A.WILLEMS; J.G. HOWIESON. 2012. *Microvirga lupini* sp. nov., *Microvirga lotononidis* sp. nov., and *Microvirga zambiensis* sp. nov. Are Alphaproteobacterial root nodule bacteria that specifically nodulate and fix nitrogen with geographically and taxonomically separate legume hosts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 62: 2579–2588.
- ARDLEY, J. 2017. Legumes of the Thar desert and their nitrogen fixing Ensifer symbionts. *Plant Soil*. 410:517–520.
- BASAK, M. K. y S. K. GOYAL. 1980. Studies on tree legumes: II. Further additions to the list of nodulating tree legumes. *Plant and Soil*.56: 33-37.
- BASCONSUELO, S. y T. KRAUS. 2000. Morfología del sistema radical de *Rhynchosia edulis* (Fabaceae). *Phyton*. 69: 119-126.
- BASCONSUELO, S. 2004. Root system of *Rhynchosia* and *Galactia* species (Leguminosae). Morphology and anatomy. *Beitrage zur Biologie der Pflanzen*. 73: 25-34.
- BIANCO, C. A.; CANTERO, J. J.; NUÑEZ C.O. y PETRINA, L. 2001. Flora del Centro de la Argentina. Iconografía. Universidad Nacional Río Cuarto. I.S.B.N.:950-665-169-8. 291p.
- BIANCO, L.; J. ANGELINI; A. FABRA; y R. MALPASSI. 2012. Diversity and symbiotic efficiency of indigenous rhizobia-nodulating *Adesmia bicolor* in soils of central Argentina. *Current Microbiology*. 66:174–184. doi 10.1007/s00284-012-0260-y.
- BIANCO, L. 2014. Rhizobial infection in *Adesmia bicolor* (Fabaceae) roots. *Archives of Microbiology*. 196: 675–679.

- BROWN, S.M. y K.B. WALSH. 1994. Anatomy of the legume nodule cortex with respect to gas permeability. *Australian Journal of Plant Physiology*. 21: 49-68.
- BROWN, S.M. y K.B. WALSH. 1996. Anatomy of the legume nodule cortex: species survey of suberisation and intercellular glycoprotein. *Australian Journal of Plant Physiology*. 23: 211-225.
- CAPOEN, W.; J. DEN HERDER; S. ROMBAUTS; J. DE GUSSEM; A. DE KEYSER, M. HOLSTERS y S. GOORMACHTIG. 2007. Comparative transcriptome analysis reveals common and specific tags for root hair and crack-entry invasion in *Sesbania rostrata*. *Plant Physiology*. 144: 1878-1889.
- D'AMBROGIO DE ARGÜESO A. 1986. Manual de técnicas en histología vegetal. Buenos Aires, Hemisferio Sur. 83p.
- DEAR B.S.; G.A. MOORE; y S.J. HUGHES. 2003. Adaptation and potential contribution of temperate perennial legumes to the southern Australian wheatbelt: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 43: 1-18.
- DENISON, R.F.; E.T. KIERS. 2011. Life histories of symbiotic rhizobia and mycorrhizal fungi. *Current Biology*. 21: 775-785.
- DE FARIA, S.M.; S.G. MCINROY y J.I. SPRENT. 1987. The occurrence of infected cells, with persistent infection threads, in legume root nodules. *Canadian Journal of Botany*. 65: 553-558.
- DE FARIA, S.M.; A.G. DIEDHIU; H.C. DE LIMA; R.D. RIBEIRO; A. GALIANA; A.F. CASTILHO; y J.C. HENRIQUES. 2010. Evaluating the nodulation status of leguminous species from the Amazonian forest of Brazil. *Journal of Experimental Botany*. 61: 3119-3127.
- DE SOUZA MOREIRA, F. M.; M.F. DA SILVA; y S. M. DE EARIA. 1992. Occurrence of nodulation in legume species in the Amazon region of Brazil. *New Phytol*. 121: 563-570.
- DE SOUZA, L.A.G.; M.F. da SILVA y F.W. MOREIRA. 1994. Capacidade de nodulação de cem leguminosas da Amazônia. *Acta Amaz*. 24: 9-18.
- D'HAENZE, W.; P. MERGAERT; J. C. PROMÉ y M. HOLSTERS. 2000. Nod factor requirements for efficient stem and root nodulation of the tropical legume *Sesbania rostrata*. *The Journal of Biological Chemistry*. 275: 15676-15684.
- DIZEO DE STRITTMATER C. 1979. Modificación de una técnica de colaboración safranina-fast green. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*. 18:121-122.
- DOIGNON-BOURCIER, F.; SY. ABDOULAYE; A. WILLEMS; U. TORCK; B. DREYFUS; M. GILLIS y P. DE LAJUDIE. 1999. Diversity of Bradyrhizobia from 27 Tropical *Leguminosae* Species Native of Senegal. *Systematic and Applied Microbiology*. 22:647-661.

- FERGUSON, B.J.; A. INDRASUMUNAR; S. HAYASHI; M.H. LIN; Y.H. LIN; D.E. REID y P.M. GRESSHOFF. 2010. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of Integrative Plant Biology*. 52: 61-76.
- FERGUSON B.J.; C. MENS; A.H. HASTWELL; M. ZHANG; H. SU; C.H. JONES; X. CHU; P.M. GRESSHOFF. 2018. Legume nodulation: The host controls the party. *Plant Cell Environment*. 1–11 p.
- FORNASERO, L.V.; M.F. DEL PAPA; J.L. LÓPEZ; F.J. ALBICORO; J.M. ZABALA; M.A. TONIUTTI; J.F. PENSIERO; A. LAGARES. 2014. Phenotypic, Molecular and Symbiotic Characterization of the Rhizobial Symbionts of *Desmanthus paspalaceus* (Lindm.) Burkart That Grow in the Province of Santa Fe, Argentina. PLoS ONE. 9:104636.
- FORREST S.I.; VERMA D.P.S. y DHINDSA R.S. 1991. Starch content and activities of starch-metabolizing enzymes in effective and ineffective root nodules of soybean. *Canadian Journal of Botany*. 69: 697-701.
- GARZA REQUENA, F. DE LA; M. VALDÉS. 2000. Tamaño de la población microbiana del suelo y desarrollo inicial de *desmanthus virgatus* (L.) willd Agrociencia. 445-451p.
- GEHLOT, H.S.; D. PANWAR; N. TAK; A. TAK; I .S. SANKHLA; N. POONAR; R. PARIHA; N.S. SHEKHAWAT; M. KUMAR; R. TIWARI; J. ARDLEY; E.K JAMES y J.I. SPRENT. 2012. Nodulation of legumes from the Thar desert of India and molecular characterization of their rhizobia. *Plant Soil*. 357: 227-243.
- GOORMACHTIG, S.; W. CAPOEN y M. HOLSTERS. 2004. Rhizobium infection: lessons from the versatile nodulation behaviour of water-tolerant legumes. *Trends in Plant Science*. 9: 518–522.
- GRESSHOFF, P.M. y A.C. DELVES. 1986. Plant genetic approaches to symbiotic nodulation and nitrogen fixation in legumes. In: A.D. Blonstein & P.J. King (eds.). Plant gene research III. *A genetical approach to plant biochemistry*. Springer Verlag, Wien.159-206p.
- GUINEL, F.C. 2009. Getting around the legume nodule: I. The structure of the peripheral zone in four nodule types. *Botany* 87: 1117-1138.
- GYANESHWAR, P.; A.M. HIRSCH; L. MOULIN; W.M. CHEN; G.N. ELLIOTT; C. BONTEMPS; P. ESTRADA DE LOS SANTOS; E. GROSS; F.B. DOS REIS; J.I. SPRENT; J.P.W. YOUNG; E. K. JAMES. 2011. Legume nodulating beta proteobacteria: diversity, host range and future prospects. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 24: 1276–1288.
- HARTMANN, K.; E. PEITER; K. KOCH; S. SCHUBERT y L. SCHREIBER. 2002. Chemical composition and ultrastructure of broad bean (*Vicia faba* L.) nodule endodermis in comparison to the root endodermis. *Planta*. 215: 14-25.

- HUANCHENG, M.A.; W.U. JIANRONG; Z. XIAOHONG; Z. DONGHUA; X. ZHI; X.U. JIANPING. 2012. Diversity and stress-tolerance of symbiotic nitrogenfixing bacteria from legumes in the dry-hot valleys of southwest China. *African Journal of Microbiology Research* 6: 1675-1684.
- KOHLLEN, W.; J.L.P NG; E.E. DEINUM y U. MATHESIUS. 2018. *Journal of Experimental Botany*. 69: 229–244.
- LAURENT-FULELE, E; P.DE LAJUDIE; M. GILLIS; M. NEYRA. 2000. Diversité des rhizobia associés aux légumineuses herbacées *Zornia* spp. et *Tephrosia* spp. dans les jachères au Sénégal. *La jachère en Afrique Tropicale*. 333-340p.
- LOTOCKA, B., J. KOPCINSKA y M. SKALNIAK. 2012. Review article: The meristem in indeterminate root nodules of Faboideae. *Symbiosis* 58: 63-72.
- MALPASSI, R.; T. KRAUS; L. BIANCO; M. GROSSO; S. BASCONSUELO; J. RAMOS. 2015. Roots of Fabaceae: Structure and Funcion. En: V Conferencia Internacional de Leguminosas, VILC. ISBN 978-987-693-131-1. 169-186p.
- MCINNES A.B Y R.A. DATE. 2005. Improving the survival of rhizobia on *Desmanthus* and *Stylosanthes* seed at high temperature. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 45: 171-182.
- MORALES, R. 1992. Atrapamiento y caracterización de cepas de rizobios procedentes de suelos del Algarrobal del Monte. *Multequina*. 1: 181–188.
- MUNIZ, A.W.; G.L. DALL'AGNOL; J.A. WORDELLFILHO; y E.L. SACCOL DE SÁ. 2011. Promoção do crescimento de espécies de *Adesmia* por rizobactérias de nódulos produtoras de ácido indolacético. *Agropecuária Catarinense*. 24: 60-64.
- NAISBITT, T.; E.K. JAMES y J.I. SPRENT. 1992. The evolutionary significance of the genus *Chamaecrista* as determined by nodule structure. *New Phytologist*. 122: 487-492.
- NG, A.Y.S. y B.C.H. HAU. 2008. Nodulation of native woody legumes in Hong Kong. *Plant and Soil*. 316, 35–43.
- NG, A.Y.S. y B.C.H. HAU. 2009. Nodulation of native woody legumes in Hong Kong. *Plant and Soil*. 316: 35–43.
- NEWCOMB, W.; D. SIPPEL y R.L. PETERSON. 1979. The early morphogenesis of *Glycine max* and *Pisum sativum* root nodules. *Canadian Journal of Botany* 57: 2603-2616.
- OLDROYD, G. E. D.; E. M. ENGSTROM y S. R. LONG. 2001. Ethylene inhibits the Nod factor signal transduction pathway of *Medicago truncatula*. *Plant Cell*. 13:1835–1849.
- OLDROYD, G.E.D. y J.A. DOWNIE. 2008. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in Legumes. *Annual Review of Plant Biology*. 59: 519-546.

- OLDROYD, G. E. D.; J. D. MURRAY; P. S. POOLE y J. A. DOWNIE. 2011. The Rules of Engagement in the Legume-Rhizobial Symbiosis. *Annual Review of Genetics*. 45:119–44.
- PAWELEK, D.L.; J.P. MUIR; B.D. LAMBERT; y R.D. Wittie. 2008. In: sacco rumen disappearance of condensed tannins, fiber, and nitrogen from herbaceous native Texas legumes in goats. *Animal Feed Science and Technology*. 142:1–16.
- PEDRAZA, R.O; C.S. RONCEDO; S.C. DE BELLONE; C.H. BELLONE; H.E. PÉREZ. 2001. Diferenciación de rizobios nativos que nodulan cuatro leguminosas forrajeras en Tucumán, Argentina. *Ciencia del suelo*. 19:79-81.
- PEIX, A.; M.H. RAMÍREZ-BAHENA; E. VELÁZQUEZ; E. J. BEDMAR. 2015. Bacterial associations with legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 34: 17–42.
- RÄSÄNEN, L.A.; J.I. SPRENT y K. LINDSTRÖM. 2001. Symbiotic properties of sinorhizobia isolated from *Acacia* and *Prosopis* nodules in Sudan and Senegal. *Plant and Soil*. 235: 193–210.
- ROLFE, B.G. y P.M. GRESSHOFF. 1988. Genetic analysis of legume nodule initiation. *Annual Review of Plant Physiology*. 39: 297-319.
- ROTHSCHILD, D.I. 1970. “Anatomía nodular en especies de leguminosas del norte argentino”. “VI Reunion Latinoamericana sobre Rhizobium”. Montevideo.54-61p.
- SCHEFFER-BASSO, S.M.; M. VOSS y A.V. ÁVILA JACQUES. 2001. Nodulacao e fijacao biológica de nitrogenio de *Adesmia latifolia* e *Lotus corniculatus* em vasos de Leonard. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 30:1-12.
- SCHIMEL, D.S. 2010. Drylands in the earth system. *Science*. 327:418–419.
- SOMASEGARAN, P. y H.J. HOBEN .1994. Handbook for Rhizobia: methods in legume-*Rhizobium* technology. Springer- Verlag, New York.
- SPRENT J.I. 2001. Nodulation in Legumes. Kew, Royal Botanical Gardens, Surrey, UK.
- SPRENT, J.I. 2005. Nodulated legume trees. In: D. Werner & W.E. Newton (eds.). Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment. Springer, Dordrecht. 113-141p.
- SPRENT J.I. 2007. Evolving ideas of legume evolution and diversity: A taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. *New Phytologist*. 174:11-25.
- SPRENT J.I. 2009. Legume nodulation. In: Wiley-Blackwell (ed). *A global perspective*. Oxford, UK, 183p.
- SPRENT, J.I. y H.S. GEHLOT. 2010. Nodulated legumes in arid and semi-arid environments: are they important. *Plant Ecology y Diversity*. 3:211–219.
- SPRENT, J.I.; J.K. ARDLEY y E.K. JAMES. 2013. From North to South: A latitudinal look at legume nodulation processes. *South African Journal of Botany*. 89: 31–41.

- SPRENT, J. I.; J. ARDEY y E.K. JAMES. 2017. Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts. *New Phytologist*. 215:40-56.
- SPRENT, J.I.; R. PARSONS. 2000. Nitrogen fixation in legume and non-legume trees. *Field Crops Research*. 65: 183-196.
- TAURIAN, T.; O. M. AGUILAR y A. FABRA. 2002. Characterization of nodulating peanut rhizobia isolated from a native soil population in Córdoba, Argentina. *Symbiosis*. 33: 59-72.
- TAURIAN, T.; F. IBÁÑEZ; A. FABRA y O. M. AGUILAR. 2006. Genetic diversity of rhizobia nodulating *Arachis hypogaea* L. in central Argentinean soils. *Plant and Soil*. 282:41-52.
- TAJIMA, R.; J. ABE; O. NEW LEE; S. MORITA y A. LUX. 2008. Developmental changes in peanut root structure during root growth and root-structure modification by nodulation. *Annals of Botany*. 101: 491-499.
- UDVARDI, M. y P.S. POOLE. 2013. Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Annual Review of Plant Biology*. 64:781-805.
- VAN DE WIEL, C.; B. SCHERES; H. FRANSSSEN; M.J. VAN LIEROP; A. VAN LAMIEREN; A. VAN KAMMEN y T. BISSELING. 1990. The early nodulin transcript ENOD2 is located in the nodule parenchyma (inner cortex) of pea and soybean root nodules. *The EMBO Journal*. 9: 1-7.
- VANCE, C.P. 2002. Root-bacteria interactions: symbiotic N<sub>2</sub> fixation. In: Waisel, Y.; A. Eshel y U. Kafkafi, (eds.). *Plant roots. The hidden half*. 3<sup>o</sup> ed. Marcel Dekker, Inc., New York. 839-868p.
- VINCENT J.M. 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. IBP Handbook N°15. Blackwell, Oxford.
- WACHENDORF, M.; R.P. COLLINS; J. CONNOLLY; A. ELGERSMA; M. FOTHERGILL; B.E. FRANKOW-LINDBERG; A. GHESQUIERE; A. GUCKERT; M.P. GUINCHARD; A. HELGADÓTTIR; A. LÜSCHER; T. NOLAN; P. NYKÄNEN-KURKI; J. NÖSBERGER; G. PARENTE; S. PUZIO; I. RHODES; C. ROBIN; A. RYAN; B. STÄHELI; S. STOFFEL y F. TAUBE. 2001. Overwintering of *Trifolium repens* L. and succeeding growth: results from a common protocol carried out at twelve european sites. *Annals of Botany*. 88:669-682.
- WEIR, B.S. 2016. The current taxonomy of rhizobia. NZ Rhizobia website. <https://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia>. Last updated: X Jan, 2016.