

Universidad de la República
Facultad de Ciencias

Selección de cepas nativas naturalizadas de
Rhizobium leguminosarum bv trifoli promisorias
para ser usadas como inoculantes de trébol rojo

Tutor: Dr. Jorge Monza Palacios

Bachiller: Laura Ivonne Hernández Gallardo
estudiante de la Licenciatura de Bioquímica

INDICE

Indice	Página
Indice	I
Resumen	IV
Objetivo general	1
Objetivos específicos	1
Introducción	1
1. Dinámica del nitrógeno en los ecosistemas	1
2. Microorganismos llamados rizobios	4
3. 3. El género <i>Trifolium</i>	8
4. Inoculación de tréboles en Uruguay	12
5. Caracterización genética de cepas de <i>rizobios</i>	17
5.1 El gen 16SARN en estudios taxonómicos	17
5.2 Amplificación del gen 16SARN	20
5.3 RFLP-PCR y ARDRA	20
5.4 Hibridación ADN-ADN	23
5.5 Región ITS	24

5.6 Otros genes housekeeping (atpD; glutamintasintetasaII; recA) y genes simbióticos (<i>nifH</i> y <i>nodB</i>)	25
5.7 Estrategias para evaluar la diversidad de cepas	27
Objetivos	33
Estrategia	33
2. Materiales y métodos	34
2.1. Material biológico	34
2.1.1. Plantas	34
2.1.2. Aislamientos de bacterias a partir de nódulos.....	34
2.2. Métodos	35
2.2.1. Aislamiento de bacterias, medios y condiciones de cultivo	32
2.2.2. Esterilización y germinación de semillas	36
2.2.3. Inoculación de las semillas y crecimiento de plantas	37
A. Crecimiento de las plantas <i>in-vitro</i>	37
B. Crecimiento de plantas en maceta	38
2.2.6. Tratamiento estadístico	40
2.3. Aislamiento de ADN	40
2.3.1. Aislamiento del ADN genómico de rizobios	40

2.3.2. Amplificación con <i>primers</i> ERIC	41
2.3.3. Amplificación con primers 16S rRNA y ARDRA	42
2.3.4. Resolución de los productos de amplificación	44
2.3.5. Análisis de los perfiles ERIC	45
Resultados y discusión	46
1. Colección de rizobios aislados de nódulos de <i>trifolium pratense</i> (trébol rojo). Ensayo in vitro.	46
2. Diversidad de aislados que nodulan <i>trifolium pratense</i>	48
2.1 Análisis de perfiles genómicos ERIC-PCR	48
2. 2 Análisis del gen 16S ARN amplificado	56
2.3 Análisis ARDRA del gen 16S ARN	57
3. Evaluación de la biomasa	60
Conclusiones y perspectivas	64
Citas bibliográficas	65

Resumen

El trébol rojo (*Trifolium pratense*), es una de las leguminosas forrajeras preferidas en Uruguay por la abundancia y succulencia de su forraje. Su capacidad de asociación con bacterias del género *Rizobium* (*R. leguminosarum*), por la formación de nódulos radiculares hacen posible la utilización de nitrógeno atmosférico para su desarrollo. Las bacterias fijadoras de nitrógeno fijan el mismo y lo transforman en formas asimilables para las plantas y esto constituye una alternativa para mejorar las praderas sin utilizar fertilizantes nitrogenados.

En el presente trabajo se estudió la diversidad y eficiencia simbiótica de 84 aislados obtenidos a partir de nódulos de *T. pratense*, colectados en dos sitios, con y sin historia de pradera. Se encontraron 21 perfiles diferentes en el análisis de conglomerados realizado a partir de los perfiles ERIC, lo que corresponde a una diversidad del 25%. 21 perfiles de los 84 aislados fueron iguales al del inoculante comercial para *T. pratense*, cepa U204. Se seleccionaron 21 aislados con perfiles diferentes. De ellos se amplificó el gen ARNr de 16S, y se realizó el ARDRA con las endonucleasas *MspI* y *HinfI*, lo que permitió definir 3 ribogrupos. La eficiencia simbiótica de los aislamientos se estudió en *T. pratense*, bajo condiciones controladas. Se evaluó el comportamiento de las distintas cepas aisladas, frente a testigos no inoculados con y sin aporte de nitrógeno e inoculados con el inoculante

comercial cepa U204. Se evaluaron 5 aislados y todos indujeron nódulos en las raíces. La producción de materia seca de la parte aérea de las plantas inoculadas con las cepas P96/9/N5 y P95/13/N2 fue superior a la de las plantas inoculadas con el inoculante comercial cepa U204. Las plantas inoculadas con la cepa P95/13/N2 mostraron valores estadísticamente similares al control utilizado con nitrógeno.

Selección de cepas nativas naturalizadas de *Rhizobium leguminosarum* bv trifoli promisorias para ser usadas como inoculantes de trébol rojo

Objetivo general

Mejorar la fijación de nitrógeno de la simbiosis rizobio - trébol rojo a través de inoculantes con rizobios nativos.

Objetivos específicos

1. Completar una colección de cepas nativas de rizobios que nodulan trébol rojo.
2. Establecer la diversidad de cepas nativas - naturalizadas de una colección.
3. Evaluar y seleccionar cepas nativas que por su eficiencia simbiótica sean promisorias para desarrollar un inoculante para trébol rojo.

Introducción

1. Dinámica del nitrógeno en los ecosistemas

El nitrógeno es un elemento esencial para las plantas, dado que forma parte de compuestos tales como proteínas, ácidos nucleicos y clorofilas, entre otros. Las plantas lo extraen del suelo bajo forma de nitrato (NO_3^-) y amonio (NH_4^+) que ingresan a través de transportadores específicos que se encuentran en la membrana de células epidérmicas de la raíz. A su vez, las

leguminosas noduladas por rizobios, tienen una fuente de NH_4^+ derivado de un proceso conocido como fijación biológica de nitrógeno (FBN), en el cual el nitrógeno (N_2) es reducido a NH_4^+ por la nitrogenasa, una enzima presente en la bacteria fijadora de N_2 .

Como el nitrógeno proviene mayormente de formas orgánicas presentes en restos vegetales y animales se necesita para su transformación microbiana un proceso conocido como mineralización, para que se encuentre disponible para la utilización por las plantas (Urzúa et al., 2001). Las relaciones entre los diferentes estados redox del nitrógeno y el pasaje de éste desde el medio a la biomasa y desde la biomasa a formas inorgánicas se conoce como ciclo del nitrógeno, que se resume en la Figura 1. De esta forma, las relaciones entre los diferentes estados de oxidación del nitrógeno, que en su conjunto conforman ese ciclo, son consecuencia de la actividad metabólica de microorganismos, plantas y animales.

El NH_4^+ , que se produce a partir de los restos de animales, de vegetales y de microorganismos, una vez absorbido por las plantas es asimilado y pasa a formar moléculas orgánicas. Otro destino del NH_4^+ en suelos y aguas es ser oxidado a NO_2^- y este a NO_3^- por diferentes microorganismos, a través de un proceso conocido como nitrificación. A su vez, en condiciones limitantes de O_2 diversos microorganismos pueden reducir NO_3^- a óxido nítrico (NO), éste a óxido nitroso (N_2O) y éste a N_2 (Fig. 1). Este proceso

conocido como desnitrificación, constituye una salida de nitrógeno de los ecosistemas (Monza y Palacios, 2004).

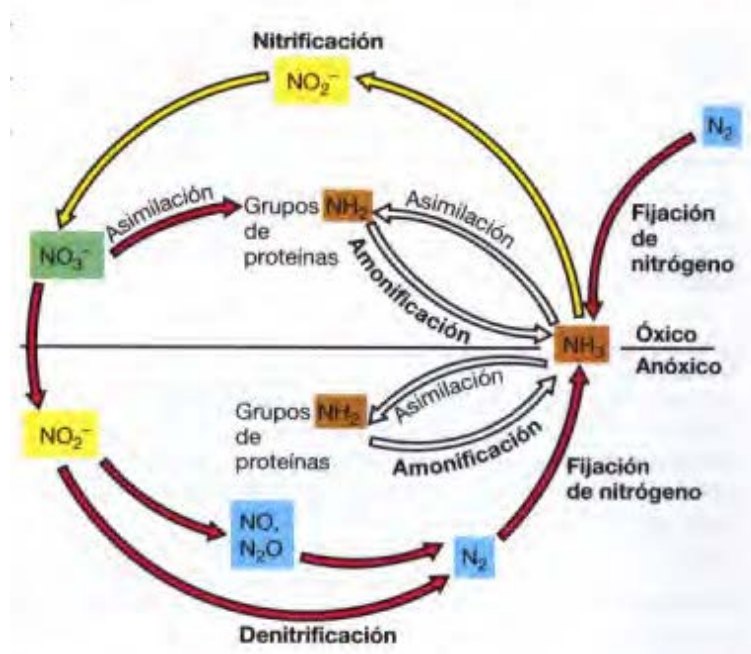


Figura 1. Ciclo del nitrógeno. El nitrógeno puede ser aportado al suelo a través de la descomposición de la materia orgánica, proceso en el cual intervienen bacterias y hongos que convierten el nitrógeno orgánico en NH_4^+ . El NH_4^+ puede ser oxidado por bacterias nitrificantes a NO_3^- (nitrificación) y este puede pasar a N_2 (desnitrificación). La principal entrada de nitrógeno a los ecosistemas ocurre a través de la FBN, proceso realizado por procariotas libres o simbióticos. Las reacciones de oxidación están representadas por flechas amarillas y las de reducción por rojas (Brock et al., 2004).

La FBN o diazotrofía es la principal vía de ingreso de nitrógeno a los ecosistemas, y es un proceso que realizan exclusivamente algunos procariotas, ya sea en condición de vida libre o asociados a plantas, como en la endosimbiosis rizobio – leguminosa. En las raíces de las leguminosas los rizobios inducen estructuras llamadas nódulos, donde se transforman en

bacteroides, estado en el cual se expresa la enzima nitrogenasa, responsable de la reducción de nitrógeno a NH_4^+ . La enzima responsable del proceso es la nitrogenasa, un complejo enzimático que cataliza la siguiente relación:



La liberación de H_2 es considerada como una fuente de ineficiencia energética, dado que se consume ATP y poder reductor para generarlos. De todas formas muy pocos fijadores de nitrógeno tienen un sistema hidrogenasa funcional que les permite utilizar ese H_2 (Balatti et al., 2006).

El NH_4^+ generado es suministrado a la planta mientras ésta provee a los bacteroides de la fuente de carbono, de donde obtienen energía y poder reductor para reducir el N_2 (Balatti et al., 2006). Este hecho constituye una relación favorable para ambos organismos, y se la denomina por eso simbiosis.

De esta forma la mayoría de las leguminosas obtienen un suministro adicional de nitrógeno a través de la asociación simbiótica con bacterias fijadoras de nitrógeno generalmente llamadas rizobios (Urzúa et al., 2001; Olivares, 2006), lo que tiene importantes derivaciones agronómicas tanto para leguminosas de grano, forrajeras y en la recuperación de suelos (Urzúa, et al., 2001).

2. Microorganismos llamados rizobios

Los rizobios lo integran bacterias Gram negativas, aerobias y heterótrofas.

A ella pertenecen varias familias y los géneros: *Rhizobium*, *Sinorhizobium*,

Mesorhizobium, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Allorhizobium* y *Methylobacterium* (Laguerre et al., 2001 y Gallego et al., 2006), cuyos miembros inducen nódulos en leguminosas. La clasificación de los rizobios se basa en características como la o las leguminosas que los hospedan, el tiempo de generación, la producción de ácido o álcali, la utilización de distintos compuestos carbonados, serología, porcentaje de G+C y perfil de plásmidos, entre otras (Jordan, 1984). Actualmente el uso de diferentes técnicas moleculares ha permitido mejorar la sistemática de estos microorganismos, que de todas maneras es dinámica.

La filogenia establecida a través del análisis de secuencia de bases del gen ARNr de 16S agrupa a los rizobios en la división Proteobacteria, dentro del grupo α -Proteobacteria. La topología que resulta del árbol filogenético con este gen coincide a nivel de género con la topología de árboles contruidos con secuencias de otros genes cromosomales como *atpD*, pero es incongruente con la de los genes simbióticos (*nifH* y *nodH*) debido a que por estar codificados en elementos móviles, su transferencia horizontal les ha permitido evolucionar en función de la adecuación a la planta hospedera (Lloret y Martínez-Romero, 2005). La clasificación actual de los rizobios y ejemplos de las leguminosas que los hospedan se resume en el cuadro 1. En el cuadro 2, figuran las especies que incluye el género *Rhizobium*, al que

pertenecen los rizobios estudiados en esta tesis, así como las leguminosas hospedadoras.

Cuadro 1. Sistemática de rizobios basada en análisis de secuencia del gen ARNr de 16S. En el cuadro figuran algunas leguminosas hospedadoras a modo de ejemplo (Lloret y Martínez-Romero, 2005).

Familia	Género	Leguminosa hospedadora
<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Sinorhizobium</i>	<i>Medicae</i> sp. <i>Meliloti</i> sp. <i>Glycine max</i>
	<i>Rhizobium</i>	<i>Trifolii</i> sp. <i>Viceae</i> sp. <i>Phaseolus vulgaris</i>
	<i>Allorhizobium</i>	<i>Sesbania</i> sp.
<i>Bradyrhizobiaceae</i>	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Loti</i> sp. <i>Glycine max</i>
	<i>Blastobacter</i>	<i>Aeschynomene indica</i>
<i>Hypomicrobiaceae</i>	<i>Devosia</i>	<i>Pueraria lobata</i>
	<i>Azorhizobium</i>	<i>Sesbania rostrata</i>
<i>Phyllobacteriaceae</i>	<i>Mesorhizobium</i>	<i>Loti</i> sp.
	<i>Phyllobacterium</i>	<i>Trifolium pratense</i> <i>Trifolium repens</i> <i>Lupinus</i>
<i>Brucelleae</i>	<i>Ochrobactrum</i>	<i>Cicer arietinum</i>
<i>Methylobacteriaceae</i>	<i>Methylobacterium</i>	<i>Lotononis bainesi</i>

Cuadro 2. Especies del género *Rhizobium* y ejemplos de leguminosas hospedadoras. El género *Rhizobium* comprende once especies (Lloret y Martínez-Romero, 2005; NCBI, 2011).

Género	Especie	Leguminosa hospedadora
<i>Rhizobium</i>	<i>R. leguminosarum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Viceae</i> sp. - <i>T. repens</i> <i>T. alexandrinum</i> <i>T. polymorphum</i> <i>T. pratense</i>
	<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
	<i>R. fabae</i>	<i>Aphis</i> sp.
	<i>R. galegae</i>	<i>Galega orientalis</i> <i>Galega officinalis</i>
	<i>R. gallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
	<i>R. giardinii</i>	<i>Desmanthus illinoensis</i>
	<i>R. hainanense</i>	<i>Desmodium uncinatum</i> <i>Desmodium incanum</i>
	<i>R. huautlense</i>	<i>Sesbania herbacea</i>
	<i>R. indigoferae</i>	<i>Indigofera</i> sp. <i>Kummerowia stipulacea</i>
	<i>R. loessense</i>	<i>Astragalus</i> sp. <i>Lespedeza</i> sp.
	<i>R. lupini</i>	<i>Lupinus angustifolius</i> L
	<i>R. lusitanum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
	<i>R. mesosinicum</i>	<i>Albizia</i> , <i>Kummerowia</i> <i>Dalbergia</i>
	<i>R. miluonense</i>	<i>Lespedeza</i>
	<i>R. mongolense</i>	<i>Medicago ruthencia</i>
	<i>R. multihospitium</i>	<i>Robinia pseudoacacia</i>
	<i>R. phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
	<i>R. pusense</i>	<i>Cicer arietinum</i> L.
	<i>R. sullae</i>	<i>Hedysarum coronarium</i> L.

	<i>R. tibeticum</i>	<i>Medicago archiducis</i>
	<i>R. tropici</i>	<i>Leucaena sp.</i> <i>Phaseolus vulgaris</i>
	<i>R. undicola</i>	<i>Neptunia sp.</i>
	<i>R. yanglingense</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Gueldenstaedtia sp.</i>

La familia Rhizobiaceae incluye también al género *Agrobacterium*, bacterias no fijadoras de nitrógeno, patógenas pertenecientes a la clase α Proteobacteria. En este género se incluyen las especies patógenas *A. tumefaciens*, *A. radiobacter*, *A. rhizogenes* y *A. rubi*. (Kerstens y De Ley, 1984).

3. El género *Trifolium*

Las pasturas mejoradas con leguminosas forrajeras son la base de la agricultura y ganadería de Uruguay (Rebuffo et al., 2006), y entre estas se encuentran dos especies de tréboles cultivadas en praderas permanentes: *Trifolium repens*, el trébol blanco, y *Trifolium pratense*, el trébol rojo.

El género *Trifolium* es originario de Europa, África y América, y se encuentra desde zonas templadas a frías con cerca de 300 especies, las cuales son perennes o bianuales (Izaguirre, 1995; Howieson et al., 2005).

T. pratense es una especie variable en tamaño, forma de folíolos y color de las flores y sus tallos sólidos no son rizomatosos. Esta especie tiene alta producción de forraje en praderas de suelos húmedos y también prospera en

suelos de baja fertilidad, pesados, o de horizonte superficial. Es una de las leguminosas preferidas para las praderas mixtas artificiales en la zona sur y litoral del país, dado que el volumen y succulencia del forraje son abundantes. Como contraparte de estas características deseables, produce altos índices de meteorismo en ganado en pastoreo directo (Izaguirre, 1995).

T. repens también está adaptado a las condiciones climáticas de Uruguay, y en veranos normales sobrevive en base a los estolones y en los secos en base a su abundante producción de semillas. Se adapta a diferentes tipos de suelos y se comporta bien en suelos profundos, de fertilidad media a alta, pero no se adapta a suelos superficiales. Es perenne, con hojas grandes y pecíolos largos, lo que le da excelente calidad forrajera (Dutto, 2010; Howieson et al., 2005).

En el campo natural se encuentra un trébol nativo, *Trifolium polimorfum*, conocido como trébol polimorfo o trébol de campo, cuyos rizobios son capaces de formar nódulos inefectivos en trébol rojo y blanco, con características de una asociación parasitaria (Dutto, 2005). Esto se manifiesta especialmente en trébol blanco y es la causa de frecuentes problemas y fracasos de su implantación en chacras sin antecedentes de siembra de tréboles. De esta forma, para lograr un buen establecimiento del trébol blanco los rizobios del inoculante deben competir con la población

nativa para ocupar una parte importante de los nódulos (Dutto, 2005; Howieson et al., 2005).

El rasgo más notable del uso de leguminosas perennes en áreas intensivas de Uruguay es su incorporación en las rotaciones con cultivos de trigo, cebada, avenas y otros. Además del alto valor nutritivo del forraje, las leguminosas forrajeras contribuyen a la sostenibilidad de la rotación, reducen la erosión y los requerimientos de fertilización, mejoran la estructura del suelo y aumentan la materia orgánica incrementando la rentabilidad agrícola (Rebuffo et al., 2006).

La caracterización de los sistemas de producción de las diferentes zonas de Uruguay está basada en el tipo de suelo y localización geográfica. De las diferentes regiones agroecológicas (Berretta et al., 2003), a continuación se describen las zonas en las que se siembra trébol rojo y trébol blanco (Fig. 2).

En la zona de las llanuras del este (zona 3), donde el 30% son humedales, el arroz es el único cultivo importante. Cuando este cultivo está ausente, se practica la producción ganadera extensiva. Los rastrojos de arroz son mejorados mediante siembra de raigrás anual (*Lolium multiflorum*) y leguminosas, principalmente trébol blanco y lotus (*Lotus corniculatus*).

En la zona de suelos profundos, las pasturas naturales representan el 93% del área y 6% corresponden a pasturas cultivadas, mejoradas y anuales. El

arroz ha incrementado el área cultivada en esta sub - zona. Luego de la cosecha de arroz, es posible sembrar trébol blanco, trébol rojo (*Trifolium pratense*), lotus, raigrás anual, y festuca (*Festuca arundinacea*).

En la región de suelos arenosos (Fig. 2, zona 5 A), se usa la mezcla de raigrás con *Lotus corniculatus* y trébol blanco (Rebuffo et al., 2006).

De esta forma, las áreas de cultivos de trébol rojo y blanco en el territorio uruguayo, ocupan 36.612 ha, que representan el 12% y el 7% respectivamente de la superficie de leguminosas puras (Rebuffo et al., 2006).

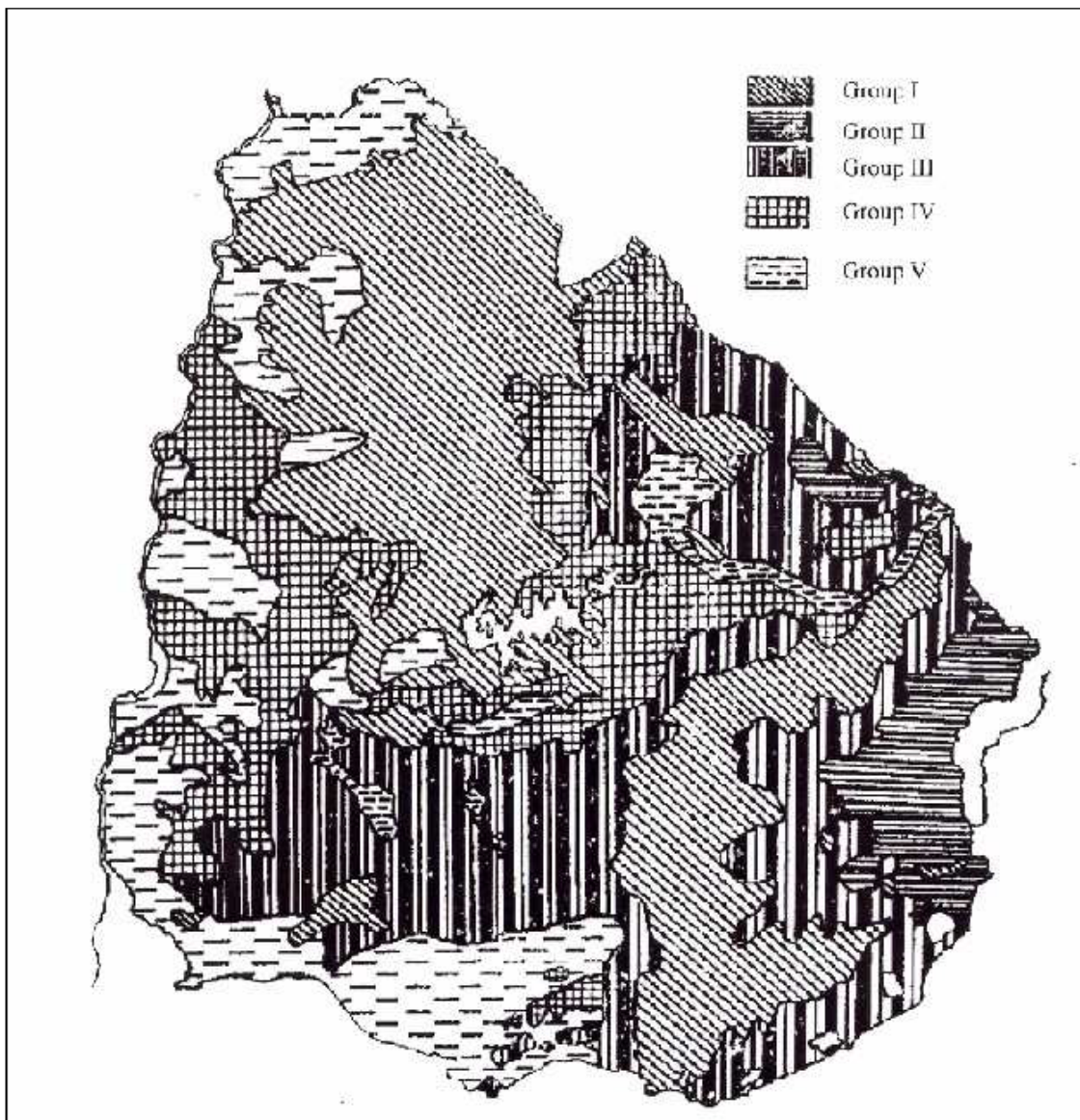


Figura 2. Zonas agroecológicas del Uruguay. Zona 1 Basalto; Zona 2 Sierras del Este; Zona 3 Llanuras del Este; Zona 4 Granito, Cristalino del Centro (4A) y Lomadas del Este (4B); Zona 5 Suelos arenosos (5A) y Noreste (5B) profundos (Berretta et al., 2003).

4. Inoculación de tréboles en Uruguay

La FBN en la simbiosis rizobio - leguminosa contribuye significativamente en la nutrición nitrogenada y productividad de las praderas (Campillo et al.

2003). De todas formas las cepas presentes en los suelos, por lo general no tienen la eficiencia deseada en lo que hace a la capacidad de fijar nitrógeno, por lo que es necesario usar inoculantes comerciales para mejorar la producción de las leguminosas (Selenka-Pobell, 1994).

Las cepas a ser usadas como inoculantes de leguminosas deben de ser eficientes en la fijación de nitrógeno, resistir factores de estrés producidos por el medio ambiente y ser capaces de competir con las poblaciones nativas presentes en el suelo (Selenka-Pobell, 1994).

De esta forma, cuando se introduce una leguminosa a una región hay que realizar la caracterización de la población de rizobios nativos, debido a que tienen buena adaptación y son la base para la selección y mejoramiento de cepas a ser usadas después como inoculantes (Frioni, 1990; Rodríguez et al., 2010).

Por otra parte, la introducción de leguminosas en el campo natural proporciona nitrógeno al sistema, aumentando la calidad y cantidad de gramíneas. De esta forma protege a los recursos genéticos nativos que contribuyen al mantenimiento sustentable de la biodiversidad (Rebuffo et al., 2006).

Las leguminosas como el trébol rojo y el trébol blanco, establecen simbiosis con bacterias del género *Rhizobium* (Balatti et al., 2006). En Uruguay *T. repens* y *T. pratense* son inoculados con la cepa U204 de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*. Esta cepa, obtenida de Nitragin (USA) fue evaluada y seleccionada por el Laboratorio de Microbiología del Suelo del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP) en la década del 60. Desde esa época el uso de la cepa U204 ha sido recomendado como inoculante comercial para ambos tréboles (MGAP, 2008).

Las especies de tréboles utilizadas en el Uruguay pueden tener dificultades para lograr una nodulación y fijación exitosa debido a la presencia en los suelos de cepas que nodulan a *T. polymorfum*, que son parásitas en los tréboles cultivados. Este problema se manifiesta con máxima intensidad en siembras en potreros de campo natural (Labandera y Vincent et al., 1975).

Aún cuando el trébol rojo tiene un comportamiento simbiótico similar al trébol blanco, los problemas de nodulación en trébol rojo suelen ser menores, probablemente debido al mayor tamaño de la semilla (Rebuffo et al., 2006).

Las actividades llevadas a cabo en el Programa Nacional de Selección de Cepas de Rizobios para la Inoculación de Leguminosas están

condicionadas al cumplimiento de los siguientes criterios (Izaguirre-Mayoral et al., 2007):

- a) eficiencia para fijar nitrógeno,
- b) competencia saprofítica,
- c) compatibilidad interespecífica,
- d) estabilidad genética,
- e) comportamiento industrial,
- f) sobrevivencia en semillas y
- g) tolerancia a factores bióticos y abióticos

Rodríguez et al., (2010) evaluaron la competitividad de la cepa U204 y dos cepas nativas de *T. pratense* (cepas T126 y T70), a través de dos métodos fingerprinting y producción de melanina ya que la nodulación se puede identificar en base a la producción de melanina de los nódulos. La cepa nativa T126 es ineficiente en fijación de nitrógeno y productora de melanina; la cepa T70 es ineficiente y no produce melanina; y la cepa U204 es muy eficiente en ambos hospederos pero no produce melanina. La eficiencia simbiótica de la cepa U204 no es afectada por la co-inoculación con las otras dos cepas nativas. La cepa T70 fue un competidor pobre cuándo se usó como co-inóculo en cepas efectivas en los dos experimentos. Los resultados obtenidos confirman una nodulación selectiva porque una simbiosis efectiva ocurre preferencialmente sobre una nodulación

inefectiva en las especies *Trifolium*. La cepa nativa efectiva T126 compite con la cepa U204 para la formación de nódulos en las dos especies de trébol referidas anteriormente, pero la nodulación depende de la concentración del inóculo. (Rodríguez et al. 2010).

En el marco del proyecto Lesis (FONTAGRO 787/05) el laboratorio de Bioquímica de Facultad de Agronomía, generó una colección de cepas de rizobios que nodulan trébol de la zona norte y sur del país obtenidas a partir de aislamientos de nódulos de trébol rojo.

De esta colección se usaron 60 aislamientos que se evaluaron por ERIC PCR como forma de establecer la diversidad, la que se situó en 27%. Las 16 cepas encontradas fueron evaluadas en condiciones controladas según su eficiencia simbiótica a través de la biomasa producida y se encontró que 6 cepas tuvieron la misma eficiencia que la cepa U204 usada como inoculante comercial, y que 10 tuvieron comportamiento parasitario (Batista et al., 2010).

Todas las cepas con buena eficiencia simbiótica habían sido aisladas de nódulos voluminosos y de color rojo, a diferencia de las menos eficientes que habían sido aisladas de nódulos generalmente de menor tamaño y de color verdoso (Batista et al., 2010).

Para esta tesis se partió de 84 cepas aisladas sólo a partir de nódulos rojos que se conservaron a -20°C con el fin de encontrar cepas nativas naturalizadas bien adaptadas y eficientes simbióticamente.

5. Caracterización genética de cepas de rizobios

Hoy se dispone de muchas técnicas para la identificación de género y especie de bacterias, basadas en aproximaciones desde la biología molecular. De todas formas, en general ninguna por separado es capaz de proveer información suficiente como para establecer una ubicación sistemática precisa. Por eso, la combinación de información brindada por técnicas que usan el ADN, suplementada con métodos convencionales como actividades enzimáticas y metabolismo de compuestos carbonados, permiten confirmar de manera precisa la distancia que se determina a partir de la secuencia (De Bruijn, 1992).

5.1 El gen ARNr de 16S en estudios taxonómicos

Entre las distintas aproximaciones moleculares, técnicas como el análisis de secuencias de genes ARNr de 16S proporcionan la base para deducir la posición taxonómica y filogenia de la familia *Rhizobiaceae* (Martínez-Romero, 1994). El gen ARNr de 16S, es un buen marcador molecular para

construir filogenias de linajes a nivel de dominio, división, subdivisión y género, pero a nivel de especie no es suficiente por el alto grado de

conservación que existe dentro de algunas especies, como en las de diferentes rizobios (Lloret-Martínez-Romero, 2005; Vinuesa et al., 1998).

El operón ribosomal (ARNr) de bacterias, que incluye el gen ARNr de 16S, el gen ARNr de 23S y la región espaciadora entre ambos (ITS) se utilizan frecuentemente como marcadores moleculares para realizar estudios filogenéticos (Graham et al., 1991). Los operones ribosomales son altamente propensos a la recombinación homóloga y a menudo resultan en una estructura de mosaico que causa problemas para la estimación filogenética usando los métodos tradicionales de reconstrucción del árbol genético. En algunos géneros el nivel de la secuencia polimórfica del gen ARNr de 16S, es bajo para permitir la resolución de significados estadísticos de la secuencia dividida (Vinuesa et al., 2005).

Los genes ARNr de 16S son altamente conservados y presentan regiones comunes en todos los organismos, pero tienen variaciones que se concentran en zonas específicas (Lloret-Martínez-Romero, 2005). Las alteraciones en la secuencia reflejan cambios aleatorios, y su transmisión es principalmente vertical ya que no está sujeto a transferencia génica

horizontal entre microorganismos. La técnica molecular de amplificación del gen ARNr de 16S es frecuentemente usada ya que por sus características precisas permite identificar y caracterizar bacterias no cultivables, bacterias cuyas características bioquímicas no se adaptan a las de ningún género o especie reconocido, bacterias con elevados requerimientos nutricionales cuya caracterización fenotípica no es suficiente o aquellas con crecimiento muy lento (Jiménez, 2007).

El análisis de los perfiles de restricción de genes de ARNr del 16S, se basa en la relación matemática entre los sitios compartidos por la enzima de restricción o de los fragmentos compartidos del ADN para identificar la divergencia genética. Los modelos matemáticos para hallar la similitud de los patrones de corte se basan en el uso de matrices binarias usando coeficientes de similitud como el de Dice, Jaccard, Nei y Li, entre otros. Estos coeficientes permiten agrupar a los morfotipos en clusters que identifican la distancia genética por el uso de métodos de análisis de agrupamiento tales como el Neighbor –Joining y UPGMA. En los últimos años, la amplificación del gen ARNr de 16S y el análisis de restricción se ha realizado en diferentes géneros como: *Clostridium*, *Streptococcus*, *Mycobacteria*, *Moraxella*, *Leptospira*, *Rhizobia*, *Brevibacterium*, *Acinetobacter*, entre otros (Heyndrickx et al., 1996).

5.2 Amplificación del gen ARNr de 16S

Los primers utilizados para la amplificación del gen ARNr de 16S por PCR, son derivados de regiones conservadas de ese gen y con ellos se puede amplificar casi toda la longitud del gen ARNr de 16S de muchos géneros de bacterias.

El análisis de la secuencia de los genes ARNr de 16S de diferentes grupos filogenéticos, reveló la presencia de una o más secuencias específicas cortas que aparecen en todos o la mayoría de los miembros de un determinado grupo filogenético y raramente están presentes en otros grupos incluidos los más próximos. Por este motivo estas secuencias se pueden usar para ubicar a cada bacteria dentro de su propio grupo (Rodicio y Mendoza, 2004; Heyndrickx et al., 1996; Vinuesa et al., 2005).

5.3 RFLP-PCR y ARDRA

Una posibilidad por la cual se puede obtener información filogenética y taxonómica referente al gen ARNr de 16S es analizar el patrón electroforético que se obtiene después de la digestión de este con enzimas de restricción.

RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) es una técnica usada para la diferenciación de rizobios. El PCR-RFLP permite la identificación de las cepas que nodulan las raíces y es útil para esclarecer la taxonomía de rizobios que nodulan (Laguerre et al., 1994).

Para identificar las diferentes especies, se pueden combinar dos técnicas PCR-RFLP del gen ARNr de 16S y PCR-RFLP de la región 16S-23S ITS ya que esta región presenta importantes variaciones en la longitud y secuencia nucleotídica a nivel de género, especie y subespecie (Barry et al., 1991; van Berkum y Fuhrmann, 2000). El ADN proveniente de la amplificación por PCR del gen del ARNr del 16S purificado de los aislamientos de rizobios se corta con endonucleasas de restricción, y la variación o polimorfismo de la longitud de los fragmentos de ADN se visualiza por electroforesis. Los perfiles de RFLP del gen ribosómico 16S se pueden obtener utilizando dos enzimas de restricción, como ser *Hinf I* y *Bann II*, que permitan distinguir entre las biovariedades existentes de los rizobios (Valverde, et al., 2004). La secuenciación completa del gen ribosómico 16S permitirá así clasificar a las cepas en la biovariedad que corresponda. En estudios de diversidad no es frecuente utilizar el RFLP, porque al cortar todo el genoma bacteriano se generan una enorme cantidad de fragmentos, lo que dificulta su análisis (Thies, et al., 2001).

Para la sistemática de los rizobios, también se usa el ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*), que es una herramienta interesante para estudios de sistemática y diversidad (Kaschuk et al., 2006).

Esta técnica es rápida y sencilla y ha sido ampliamente utilizada para la caracterización genotípica de rizobios. La técnica consiste, en la

amplificación del gen ARNr de 16S y la posterior digestión de los fragmentos amplificados con enzimas de restricción de corte infrecuente (Zilli, 2004).

Los patrones de restricción obtenidos con esas enzimas dependen de los sitios de corte diferentes según la enzima utilizada y la combinación de estos patrones sirve para identificar bacterias comparando los perfiles obtenidos con una biblioteca de perfiles ARDRA (De Baere y de Mendonça, 2002).

El gen del ARNr de 16S, es amplificado por medio de la reacción en cadena por la polimerasa (PCR), usando un par de iniciadores universales para bacterias y el análisis de las secuencias se realiza seleccionando endonucleasas con el más alto número de puntos de corte dentro del gen del ARNr del 16S (Espinoza et al., 2008).

Debido a que las endonucleasas reconocen ciertas secuencias de nucleótidos el uso de éstas debe generar una diferenciación clara, es decir, deben reconocer sitios de corte en el gen del ARNr de 16S y generar morfotipos diferentes para obtener porcentajes de polimorfismos altos, con el fin de diferenciar los productos de PCR. Las herramientas de bioinformática han sido fundamentales para los análisis de restricción ya que permiten simular los cortes de una enzima en determinada secuencia y

de ésta forma diferenciar las enzimas que pueden proporcionar una mayor información. (Jiménez, 2007).

Vinuesa et al., 1998, identificaron un total de 11 cepas de rizobios, nueve de las cuáles se identificaron dentro de los géneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer* y *Bradyrhizobium*. Para ello, se caracterizaron las mismas en base a la amplificación del gen ARNr de 16S usando el método de ARDRA y el análisis de la región intergénica 16S-23S.

De esta forma, la utilización de varios métodos hace posible la identificación a nivel de género.

5.4 Hibridación ADN-ADN

La homología ADN-ADN, basada en la hibridación cuantitativa ADN-ADN, se considera el método estándar para determinar si las cepas pertenecen a la misma especie. El acercamiento filogenético basado en la hibridación DNA-rRNA o la comparación de la secuencia de nucleótidos del gen ARNr de 16S puede ser aplicada a la clasificación de aislamientos de especies.

Está bien establecido que la filogenia de un gen individual no puede confundirse con la filogenia de especies como cada árbol genético es consecuencia de un hecho al azar de un único proceso genealógico (Vinuesa et al., 2005).

5.5 Región ITS

La secuenciación de la región espaciadora ITS también ha aportado a los estudios taxonómicos, ya que esta región presenta importantes variaciones en la longitud y secuencia nucleotídica a nivel de género, especie y subespecie (Barry et al., 1991; van Berkum y Fuhrmann, 2000).

Para diferenciar rizobios que nodulan *Lotus* se ha usado extensamente el análisis de la región ITS, sobre todo para identificar cepas entre un número muy grande de aislados, para después secuenciar el gen del ARNr de 16S de aislados que corresponden a los distintos ribogrupos (Lorite et al., 2009).

Van Berkum y Fuhrmann (2000) compararon secuencias ITS y establecieron relaciones filogenéticas entre 17 ribotipos de *Bradyrhizobium*, obtenidos a partir de la secuencia del gen del ARNr de 16S. Estas secuencias resolvieron mejor que la secuencia del gen del ARNr de 16S las relaciones filogenéticas, dado que la región ITS es menos conservada en *Bradyrhizobium* que el gen del ARNr de 16S. De esta forma, si bien en algunos casos son concordantes, algunas veces las filogenias construidas con el gen del ARNr de 16S y con la región ITS no concuerdan (Rincón et al., 2008; Kwon et al., 2005).

Para la identificación y estudio de los genes simbióticos de cepas de *Mesorhizobium amorphae* y *Mesorhizobium tianshanense*, aisladas de un

nuevo biovar de Lotus, (*Cicer arietinum*), se analizaron las secuencias del ITS 16S - 23SARN, el gen del ARNr de 16S y los genes simbióticos *nodC* y *nifH*. Para clasificar las cepas se realizó el análisis de la secuencia del gen del ARNr de 16S y debido a que las mismas tenían gran similitud entre sí se realizó el análisis de la secuencia de la región ITS a fin de identificar a nivel de especie y analizar la divergencia en la evolución con la cepas tipo de *M. amorphae* y *M. tianshanense*. Con esta metodología se pudo demostrar que la región sirve para la asignación taxonómica y diferentes genes simbióticos pueden encontrarse en cepas de la misma especie (Rivas et al., 2006).

5.6 Otros genes housekeeping (*atpD*; glutaminasintetasaII; *recA*) y genes simbióticos (*nifH* y *nodB*).

Otros genes como *recA* y *atpD* son usados en estudios taxonómicos y evolutivos. Por lo tanto, mediante éste estudio se comprobó la fortaleza y el fundamento de ésta estrategia para construir filogenias a partir de estos genes *housekeeping* (Gaunt, et al., 2001).

Gaunt et al. (2001) comprobaron la fortaleza y el fundamento del uso de estos genes para construir filogenias. Estos autores mediante comparación de secuencias de los genes del ARNr 16S, *recA* y *atpD* realizaron un estudio de filogenia con 25 cepas de bacterias de los géneros *Rhizobium*,

Sinorhizobium, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Agrobacterium*, *Phyllobacterium*, *Mycoplana* y *Brevundimonas*. A su vez, la asignación de bacterias a los actuales géneros *Sinorhizobium* y *Mesorhizobium* ha sido posible debido al estudio de los genes antes mencionados (Gaunt et al., 2001).

Para estudiar la diversidad de una población de *R. gallicum*, Vinuesa, et al., (2005) usaron un conjunto de marcadores moleculares que incluyeron las secuencias parciales de tres genes cromosomales *rrs* (gen del ARNr 16S), *glnII* (gen de la glutamino sintetasa II) y *atpD* (gen que codifica la subunidad beta de la ATP sintetasa), y dos genes simbióticos *nifH* y *nodB*, junto con experimentos de nodulación, para mostrar que los dos grupos genéticos estudiados corresponden a dos especies previamente descritas. De esta manera mostraron que tanto los análisis filogenéticos, como los de genética molecular sirven para tener una mejor perspectiva sobre una determinada población bacteriana y ubicarla en un contexto filogenético. Los genes cromosomales *rrs*, *glnII* (provee de glutamina para la biosíntesis y interviene en la asimilación de amonio) y *atpD*, son indispensables para el mantenimiento celular y los genes ligados al plásmido simbiótico *nifH* y *nodB*, están involucrados en la interacción simbiótica con las plantas.

Los análisis de poblaciones basados en las secuencias de los genes *glnII* y *atpD*, sirven para conocer el patrón filogeográfico de las poblaciones

bacterianas. Si estos patrones no muestran una diferencia significativa, las poblaciones en estudio, se las considera como una misma población (Vinuesa et al., 2005; Gaunt et al., 2001; Rochefort y Benson, 1990).

Aunque el gen del ARNr de 16S es el marcador genético más utilizado, cada vez queda más claro que por su frecuencia de recombinación y número variable de copias por genoma, no es el locus más adecuado para estudios filogenéticos y ecológicos (Vinuesa et al., 2005). Se propone entonces analizar genes conservados que codifican para proteínas, ya que contienen mayor información y existen más herramientas para analizar sus procesos de evolución molecular. Por eso, son útiles para estudiar la similitud entre cepas los métodos basados en la delimitación de especies bacterianas, pero no es válido imponer puntos de corte arbitrarios para delimitar especies (Vinuesa et al., 2005).

5.7 Estrategias para evaluar la diversidad de cepas

Análisis de RAPD y otros basados en el análisis de los perfiles de secuencias repetitivas (BOX-PCR, REP-PCR y ERIC-PCR) obtenidos por PCR con primers específicos de un gen o de una región de ADN han sido aplicados a un amplio rango de bacterias. Esta aproximación constituye un método útil para analizar el genoma de las mismas (De Bruijn, 1992; Gomes et al., 2007).

Una variante de PCR que se usa para diferenciar especies de rizobios entre sí es el REP-PCR. El mismo se basa en la existencia de secuencias repetidas invertidas, altamente conservadas en el genoma (De Bruijn, 1992).

Estas técnicas de identificación se basan en que en bacterias entéricas se identificaron secuencias intergénicas repetidas cortas (De Bruijn, 1992; Willems et al., 2001). Estas secuencias contienen una región central repetida altamente conservada y pueden dividirse en dos clases caracterizadas por:

La Clase I, secuencias repetidas palindrómicas extragénicas (REPs).

La Clase II, secuencias repetidas consenso intergénicas de Enterobacterias (ERIC).

Elementos repetitivos formados de combinaciones de tres subunidades de secuencias (boxA, boxB y boxC), localizados en regiones intergénicas, constituyen los elementos BOX (Vinuesa et al., 2005).

La función de estas secuencias altamente repetidas, no es conocida aunque se cree que intervienen en la estabilización del ARNm y recombinación homóloga, entre otras (De Bruijn, 1992; Vinuesa et al., 2005).

Secuencias complementarias a los elementos repetitivos ERIC, REP y BOX pueden ser usadas como iniciadores específicos en reacciones de PCR (Lupski y Weinstock, 1992). El cuadro 3 muestra las diferentes

secuencias de primers usados. La misma es una herramienta muy usada para el análisis de la genética y taxonomía bacteriana, que permite llegar a nivel de cepas. (Versalovic et al., 1991; de Bruijn 1992).

Cuadro 3. Secuencia de *primers* usados en sistemática de rizobios. (Tomado de Thies et al., 2001).

Primers	Secuencias 5'-3'	Longitud	Referencia
ERIC 1R	ATGTAAGCTCCTGGGG ATTCAC	22	<i>Versalovic et al., 1991</i>
ERIC 2	AAGTAAGTGACTGGGG TGAGCG	22	<i>Versalovic et al., 1991</i>
BOXA 1R	CTACGGCAAGGCGACG CTGACG	22	<i>Versalovic et al., 1994</i>
REP 1R	IIIICGICGICATCIGGC	18	<i>Versalovic et al., 1994</i>
REP 2	ICGICTTATCIGGCCTAC	18	<i>Versalovic et al., 1994</i>

Agius et al. (1997), compararon las secuencias CER, ERIC, así como también primers arbitrarios (RAPD) para identificar cepas de *R. loti*. Estos autores mostraron que las secuencias CER y ERIC tuvieron mayor poder de resolución que RAPD para la identificación de las cepas. Esto se debió a que las secuencias CER y ERIC tuvieron mayor habilidad para generar patrones individuales, mientras que los patrones generados por RAPD no diferenciaron algunas cepas entre sí.

Santamaría et al. (1999), compararon dos técnicas para la identificación de cepas de *Bradyrhizobium* aisladas de *L. subbiflorus*, y encontraron que el perfil de ERIC-PCR fue una estrategia útil para diferenciar los aislamientos.

Análisis de aislamientos de *R. meliloti* utilizando REP y ERIC PCR, revelaron que existía una buena correlación, entre datos generados filogenéticamente y datos proporcionados por otras técnicas (De Bruijn et al. 1992).

Willians, 1990, utilizó *PCR-fingerprinting* para amplificar secuencias de ADN polimórfico usando primers cortos de secuencias arbitrarias que se aparean a regiones próximas en el genoma y delimitan la región a ser amplificada. A este método se lo llamó RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). El polimorfismo genético detectado por los marcadores RAPD puede tener para el análisis naturaleza binaria, esto es, un segmento amplificado (banda en el gel) está presente o ausente (Ferreira y Grattapaglia, 1996). El RAPD es una técnica que ha sido usada exitosamente en el estudio de la diversidad genética de rizobios (Harrison et al., 1992).

Hay un procedimiento basado en PCR llamado 2 primers (TP)-RAPD porque usa dos primers universales usados en la amplificación del gen del ARNr de 16S, con los primers 8F (forward) y 1491R (reverse), para obtener

huellas de PCR de diferentes especies de bacterias. La peculiaridad de esta técnica es que utiliza dos primers largos de 20 nt aproximadamente para obtener los patrones a diferencia de otras técnicas que usan un solo primer pequeño para amplificar el gen del ARNr de 16S. Este procedimiento es rápido, sensible, confiable, altamente reproducible y adecuado para experimentos con un gran número de microorganismos (Rivas et al., 2001).

Se pueden analizar por este método varios géneros de bacterias y varias especies del mismo género. También se pueden analizar los patrones de crecimiento de rizobios en sus distintas fases (Rivas et al., 2001).

En contraste con otros PCR, esta técnica puede ser usada para la identificación de bacterias a nivel de especie y para estudios taxonómicos. Los patrones de TP-RAPD no muestran variaciones con el contenido del plásmido y tienen la ventaja de mostrar amplificaciones al azar del ADN cromosómico. Rivas et al. concluyeron que los patrones obtenidos con los primers 8F y 1491R no dependen del contenido del plásmido ni de la fase de crecimiento y cepas de la misma especie muestran los mismos patrones.

Esta técnica podría utilizarse para caracterizar mediante el análisis de perfiles de TP-RAPD (Two Primers-Random Amplified Polymorphic DNA) cepas aisladas de los nódulos efectivos de diferentes especies como *Trifolium pratense*, *Trifolium repens*, *Vicia sativa*, *Vicia faba*, *Lens culinaris*, *Pisum sativum*, *Lathyrus odoratus* y *Phaseolus vulgaris*, para

demostrar que los aislados pertenecen a la misma especie si todos ellos presentan el mismo perfil (Rivas et al., 2001).

Objetivos

1. Completar una colección de cepas nativas de rizobios que nodulan trébol rojo.
2. Establecer la diversidad de cepas nativas - naturalizadas de una colección.
3. Evaluar y seleccionar cepas nativas que por su eficiencia simbiótica sean promisorias para desarrollar un inoculante para trébol rojo.

Estrategia

Para cumplir con el primer objetivo se aislaron rizobios a partir de los nódulos de trébol rojo provenientes de diferentes predios de colecta. Luego se comprobó que las mismas nodularon trébol rojo al realizarse un ensayo in vitro el cuál se describe en la estrategia número 3.

El segundo objetivo se llevó a cabo analizando los patrones genómicos generados por ERIC-PCR y el grado de diversidad se evaluó por el análisis de conglomerados mediante la construcción de un dendrograma.

El tercer objetivo se realizó con el fin de comprobar la capacidad de nodular de los aislados y generar la colección de cepas. Para ello se efectuó primeramente un ensayo in vitro inoculando trébol rojo con la totalidad de los aislados y se usó un control fertilizado con nitrógeno, un control negativo o sea sin inocular con ninguna cepa de rizobio y un control positivo que fue inoculado con una cepa de inoculante comercial U204. Luego se eligieron los aislados que tuvieron mayor producción de biomasa y se procedió a un ensayo en maceta con los mismos.

2. Materiales y métodos

2.1. Material biológico

2.1.1. Plantas. Como hospedero se usó *Trifolium pratense* cv LE116 (trébol rojo), suministrado por la Ing. Agr. Mónica Rebuffo (INIA La Estanzuela).

2.1.2. Aislamientos de bacterias a partir de nódulos. Los rizobios se aislaron a partir de nódulos de trébol rojo que estaban conservados en solución salina (NaCl 5% en agua p/v) y glicerol 20% (v/v), a -20°C. Los predios de donde se colectaron se identificaron como P87, P88, P89 (puntos (P) de San José) y P95 y P96 (puntos (P) de Colonia). En el cuadro 4 figura el número de aislados de los sitios de colecta y las características de los mismos. Para la selección se consideraron sólo nódulos de coloración de rosada a roja. La colecta la definió y la realizó la Ing. Agr. Mónica Rebuffo (INIA Estanzuela).

Como cepa control para evaluar la producción de biomasa de la simbiosis rizobio – trébol rojo y como cepa de referencia para los estudios genéticos se usó *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* cepa CIAT 2455 (=U204 en la colección del MGAP), el inoculante comercial para trébol rojo usado en Uruguay.

Cuadro 4. Cantidad de aislados y sitios de colecta de nódulos. Se resume la historia de los sitios de donde se colectaron, la planta de dónde se aislaron los nódulos y la cantidad de nódulos de donde se realizan aislados.

Sitio y punto de colecta	Coordenadas	Historia de la chacra	Plantas elegidas	Nódulos aislados
San José 87	S 3436034 W 05681457	Avena cosechada alta, quedó resto seco.	11	7
			14	8
			15	7
San José 88	S 3436519 W 05681189	Avena corte bajo para enfardar, casi no tenía rastrojo. Plantas muy pequeñas.	3	5
			6	2
San José 89	S 3436521 W 05681188	Suelo arcilloso. Panes de suelo bien formados características de suelo no es historia pradera.	6	6
			10	7
			11	3
Colonia 95	S 3417558 W 05745520	Pradera primer año.	14	7
			13	6
Colonia 96	S 3423136 W 05749449	Pradera de 4 años muy engramillada, con pasto blanco. Casi no existían plantas.	15	9
			9	6
			16	4

2.2. Métodos

2.2.1. Aislamiento de bacterias, medios y condiciones de cultivo

Los nódulos se desinfectaron superficialmente con NaClO al 20% en agua (v/v) durante 3 min, se siguió de un lavado con alcohol al 90% durante 1 min, y sucesivos lavados con agua estéril durante 10 min.

Los nódulos desinfectados superficialmente se aplastaron con una varilla de vidrio en cajas de Petri estériles, sobre 100 µL de agua estéril. Con un ansa se colectó una muestra del aplastado que se sembró en placa con medio

YEM (*Yeast Extract Manitol*) (Vincent, 1970) cuya composición figura en el cuadro 5. Las placas se incubaron en estufa a 28°C durante 3 días y a partir de colonias aisladas se inoculó medio líquido.

Para preparar los inóculos los aislados crecieron en medio YEM líquido incubados con agitación a 100 rpm a 28°C, hasta llegar a una turbidez máxima. Los aislados se conservaron en YEM - glicerol 20% (v/v) a -80 °C para uso a largo plazo y una copia a -20°C para el uso de rutina.

2.2.2. Esterilización y germinación de semillas

Las semillas se desinfectaron superficialmente con alcohol 90% durante 3 min, se realizó un lavado con agua estéril, seguido de NaClO 40% (v/v) durante 3 min y sucesivos lavados con agua estéril. Las semillas germinaron en agar-agua estéril 1% (p/v) durante 3 días a 23°C.

Cuadro 5. Composición del medio YEM (Vincent, 1970).

K ₂ HPO ₄	0.5g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2g
NaCl	0.1g
Manitol	5.0g
Extracto de levadura	1.0g
Agar	15 g
H ₂ O	c.s.p. 1L
Ajustar pH a 6.8 - 7.0	

2.2.3. Inoculación de las semillas y crecimiento de plantas

Las plantas se inocularon con 500 μ l de una suspensión de los microorganismos. Esta suspensión se preparó a partir de 1 mL de cultivo crecido en medio líquido YEM, separando las células por centrifugación a 8000 rpm por 4 min. El pellet se resuspendió en 500 μ L de agua estéril.

Las plantas inoculadas permanecieron en una cámara de crecimiento durante 45 días a 28°C, con fotoperíodo 16/8h (luz/oscuridad), 25/18°C de temperatura y 50% de humedad relativa, con una intensidad lumínica de 300 μ E/m².s.

A. Crecimiento de las plantas *in-vitro*

Para confirmar la capacidad de nodular de los aislados y generar la colección de cepas, se inocularon semillas de trébol rojo desinfectadas superficialmente, en tubos con medio Jensen, cuya composición figura en el cuadro 6. Se sembraron tres semillas por tubo y las plántulas se inocularon al día siguiente de la siembra con 500 μ L de una suspensión de cada aislamiento.

Cuadro 6. Composición del Medio Jensen (Jensen, 1942).

CaHPO ₄	1.0g
--------------------	------

K_2HPO_4	0.25g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2g
NaCl	0.15g
$FeCl_3$	0.1g
Agar	10g
H_2O	c.s.p. 1L
Ajustar pH a 6.5-7.0	

Las observaciones se hicieron cada 48 hs y se registraron: tiempo de aparición de los nódulos, número de nódulos por planta, número de nódulos en la cosecha y peso seco de la parte aérea por planta.

B. Crecimiento de plantas en maceta

Como soporte para crecer las plantas y evaluar la eficiencia simbiótica se usó arena dulce lavada con HCl (50 mL de HCl en 1 L de agua) durante 8 h y sucesivos lavados con abundante agua, en la que se verificó que el pH estuviera en el entorno de 6,5. La arena preparada como se indicó se mezcló en una relación de 1:1 con vermiculita lavada con agua durante 1 h. En las macetas se colocó un papel en la parte inferior para evitar la salida del sustrato, se cubrieron con papel aluminio y se autoclavaron 20 min a 121°C.

El ensayo se realizó por quintuplicado y se sembraron 7 plantas por cada maceta de 400 ml.

La inoculación se realizó a los 3 días después de sembradas las plantas a razón de 500 µl por planta y a los 10 días de la inoculación se ralearon las

plantas para dejar 4 por maceta. El ensayo permaneció durante 45 días.

Como control se usó la cepa U204, el inoculante comercial, y se incluyó un control sin inocular y sin nitrógeno y otro sin inocular con nitrógeno.

El riego se realizó con solución estéril de Hornum (Handberg y Stougaard, 1992) sin nitrógeno y al control sin inocular y sin nitrógeno con la misma solución agregando NH_4NO_3 5 mM, alternando cada dos riegos con solución nutritiva uno con agua estéril. La composición de la solución de riego figura en los cuadros 7 y 8.

Cuadro 7. Composición de la solución de micronutrientes (x 100)

Solución micronutrientes (1 L)
X 100

Reactivo	Masa (g)
(para 1L)	
MnSO_4	0.12
H_3BO_3	0.12
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.04
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.04
$\text{Na}_2\text{MO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.008

Cuadro 8. Composición de la solución de macronutrientes X100

Reactivo	Masa (gramos)
sin nitrógeno (para 1Litro)	
KCl	59.6
$\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	30.0
$\text{NaH}_2 \text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10.0
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	30.0
FeEDTA	2.0

La composición de la solución de macronutrientes con nitrógeno X100 utilizada es la misma que figura en el cuadro 8, pero se le agregó NH_4NO_3 a una concentración de 5 mM (40 g /1 L).

La biomasa de la parte aérea de las plantas se evaluó en dos cortes, el primero a los 45 días después de la inoculación y el segundo a los 30 días después del primer corte y de mantener a las mismas en una cámara de crecimiento. La materia verde se secó durante 72 h en estufa a 60° C.

2.2.6. Tratamiento estadístico

Para determinar cuál de las cepas aisladas es más eficiente en FBN, se analizó estadísticamente los datos de la biomasa obtenida del ensayo en macetero, tomando como unidad experimental la maceta y como diseño experimental 4 plantas.

Para analizar la variación total de los resultados experimentales y saber como interactúan los diferentes tratamientos entre sí se utilizó el análisis de varianza.

Para realizar comparaciones múltiples de medias, se aplicó la prueba de rangos múltiples de Tukey.

2.3. Aislamiento de ADN

2.3.1. Aislamiento del ADN genómico de rizobios

Para la extracción de ADN, se lisó 1 mL de cultivo previamente crecido en medio líquido y las células se separaron por centrifugación a 13.000 rpm durante 2 min. El pellet se resuspendió en 100 μ L de NaOH 0,05 M, se incubó durante 4 min a 100 °C y se transfirió a hielo durante 2 min. Seguidamente se agregaron 500 μ L de agua MiliQ, se centrifugó a 13.000 rpm por 2 min y se recogieron 100 μ L que se conservaron a -20 °C, (modificado de Rivas, et al., 2001).

2.3.2. Amplificación con *primers* ERIC

Para analizar la diversidad de las cepas de rizobios se amplificó el ADN por PCR (Versalovic et al., 1991). Se utilizaron los primers ERIC (De Bruijn, 1992):

ERIC1 (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3')

ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3')

En el cuadro 9 se resumen la concentración y los volúmenes usados para la amplificación.

Cuadro 9. Volúmenes usados para la amplificación de ADN de rizobios.

Componentes de la mezcla de reacción	Volumen en μ L
Buffer NH_4SO_4 (10X)	2,5
MgCl_2 (25 μ M)	2
dNTPs (10nM)	0,5
Primer ERIC 1 (25 pmol/ μ L)	2
Primer ERIC 2 (25 pmol/ μ L)	2

Taq DNAp	0,4
DNA lisado	5
Agua MiliQ	10,6
Volumen final	25

La solución de primers de concentración 100 μ molar se llevó a una concentración 25 μ molar a partir de una dilución con agua MiliQ (25 μ l de ERIC y 75 μ l de agua MiliQ). La solución de nucleótidos dNTPs (10 nmolar) se preparó a una concentración 1,4 nmolar por dilución con agua MiliQ (10 μ l de dTTP, dATP, dGTP, dCTP y 60 μ l de agua MiliQ).

Como control negativo se realizó una reacción de amplificación sin ADN, según se detalla en el cuadro 9, pero se sustituyó el ADN por el igual volumen de agua MiliQ.

Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo de desnaturalización a 95°C 5 min, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C 1min, annealing 52°C 1 min, extensión 65°C 6 min, y un ciclo de extensión final 65°C 16 min (De Bruijn, 1992).

2.3.3. Amplificación con *primers* 16S rRNA y ARDRA

Para amplificar el gen del ARNr de 16S se usaron los primers 41f y 1488r descritos por Lloret y Martínez-Romero (2005), que permiten amplificar casi la totalidad del gen (1400 pb). La secuencia de los primers es:

41f (5-GCTCAAGATTGAACGCTGGCG-3)

1488r (5-CGGTTACCTTGTTACGACTTCACC-3)

En el cuadro 10 figuran los volúmenes usados en la reacción de amplificación.

Cuadro 10. Mezcla de reacción para la amplificación del gen del ARNr de 16S.

Reactivo	Volumen (μl)
Buffer NH ₄ SO ₄ (10X)	2.5
MgCl ₂ 25μM	1.5
dNTPs (10mM)	0.5
1525r (25 pmol/μl)	0.5
27f (25 pmol/μl)	0.5
Taq DNApol	0.2
DNA lisado	5.0
Agua MilliQ	14.5
Volumen final	25.0

Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo de desnaturalización a 94°C 3 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C 18 seg, *annealing* 58°C 1 min, extensión 72°C 1 min, y un ciclo de extensión final 72°C 10 min (De Bruijn, 1992).

El producto de la amplificación del gen del ARNr de 16S se utilizó para realizar el ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*), (Thies et al., 2001). Para la digestión se utilizaron las enzimas de restricción *Hinf* I y *Msp*I (Lorite et al., 2005). Para las digestiones, que se incubaron a 37°C 1 h, se usaron los volúmenes que figuran en el cuadro 11

y la inactivación de la enzima se realizó por incubación a 80°C, durante 10 min.

Cuadro 11. Concentraciones usadas en las digestiones con *Hinf* I y *Msp* I.

Reactivo	Volumen (μl)
Buffer R (10X) <i>Msp</i> I o	
Buffer Tango (10X) <i>Hinf</i> I	1.5
<i>Hinf</i> I o <i>Msp</i> I	0.5
Producto de PCR	10.0
MiliQ	3.0
Volumen total	15.0

2.3.4. Resolución de los productos de amplificación

Los productos amplificados con los primers ERIC se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 2,5 % en buffer TBE 1X (Tris, Acido Bórico, EDTA 0.5 M pH 8), mientras que para los productos de amplificación del gen del ARNr de 16S , se usó gel de agarosa 1,2% en buffer TBE 0,5X.

El ADN amplificado se sembró a razón de 10 μL en cada pocillo, al que se adicionaron previamente 2 μL de buffer de carga. Como marcador de peso molecular se usó Gene Ruler 100 pb plus ladder (Fermentas), que se sembró en ambos extremos del gel.

Las corridas se llevaron a cabo con voltaje constante (100 V) durante 3 h.

Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (Sambrook et al. 1989) durante

15 min, el ADN se visualizó con un transiluminador de luz UV y se fotografió con un equipo Kodak (Gel logic 100 imaging system).

2.3.5. Análisis de los perfiles ERIC

Para el análisis de los patrones genómicos generados por ERIC-PCR se usó el *software* Gelcompar versión 4.2 (Maths applied) y se consideraron las bandas con buena intensidad, comprendidas en el rango de 300 y 3000 pb.

El grado de diversidad genética fue evaluado mediante el análisis de conglomerados (cluster análisis). La similitud genética se evaluó mediante el coeficiente de Dice y para la clasificación jerárquica de los aislados se usó el método de agrupamiento UPGMA.

Resultados y discusión

1. Colección de rizobios aislados de nódulos de *Trifolium pratense* (trébol rojo). Ensayo *in vitro*.

Se obtuvieron un total de 84 aislados capaces de nodular *in vitro* a *T. pratense*. El ensayo *in vitro* mostró que un 31% de los aislados generaron entre 7 y 10 nódulos por planta, el 10% entre 12 y 16, el 30% entre 18 y 20 y el 29 % restante más de 20 nódulos por planta igual que el inoculante comercial U204. Los nódulos presentaron forma indeterminada característico de especie y una coloración rosada (Figura 3).

Para establecer si los aislados presentan la capacidad de fijar nitrógeno, es decir si son fix^+ o fix^- , se realizó una comparación de la biomasa de la parte aérea. Los 84 aislados fueron fix^+ dada que la biomasa generada fue siempre superior que el control sin inocular (cuadro 12).

A su vez las plantas que presentaron mayor número de nódulos, mayor a 20, mostraron una tendencia a producir mayor cantidad de materia seca en la parte aérea en relación con el resto de las plantas inoculadas con menor número de nódulos.

Se encontró también que un 60% de los aislados presentaron una masa seca promedio de 10 mg, mientras que el 40% restante presentó una masa

entorno a 20mg y 50mg. Así mismo, las plantas inoculadas con la cepa U204 presentaron una masa seca de 50mg.

Es así, que el análisis de la producción de biomasa de la parte aérea permitió establecer 2 categorías de cepas que se muestra en el cuadro 12.

Cuadro 12. Relación entre biomasa de la parte aérea y el número de nódulos. Se establecen para su comparación 2 categorías de cepas en cuanto al número de nódulos inducidos en ensayo *in vitro*.

Nº aislados	MS aérea (mg/planta)	Nº de nódulos/planta
51	≤ 10	≤ 20
33	20-50	> 20
Control positivo Inoculante comercial, cepa U204	50	> 20
Control sin inocular	< 10	< 10



Figura 3. Nódulos inducidos en raíces de *T. pratense*.

2. Diversidad de aislados que nodulan *Trifolium pratense*

2.1 Análisis de perfiles genómicos ERIC-PCR

Para el estudio de la diversidad, se utilizó los 84 aislados de rizobios que nodulan *T. pratense* provenientes de los 2 sitios de muestreo (Cuadro 13), se aisló ADN genómico por lisis alcalina y se amplificó por la técnica rep-PCR.

Cuadro 13. Sitios de colecta (puntos analizados) y cantidad de aislados analizados por ERIC-PCR.

Sitio de colecta	Puntos(P) analizados	Cantidad de aislados	Diversidad (%)
San José	P87	22	45
	P88	8	38
	P89	22	41
Colonia	P95	15	60
	P96	17	59
Total de aislados		84	25

El ADN genómico fue usado como molde en las reacciones de rep-PCR con *primers* ERIC para generar los *fingerprinting*. Se obtuvieron 84 perfiles genómicos y el inoculante comercial cepa U204. Cada perfil produjo entre 8 y 12 bandas en el rango entre 200 y 3000 pares de bases.

En la figura 4 se muestran 21 perfiles genómicos diferentes de aislados de *T. pratense*, más el inoculante comercial U204.

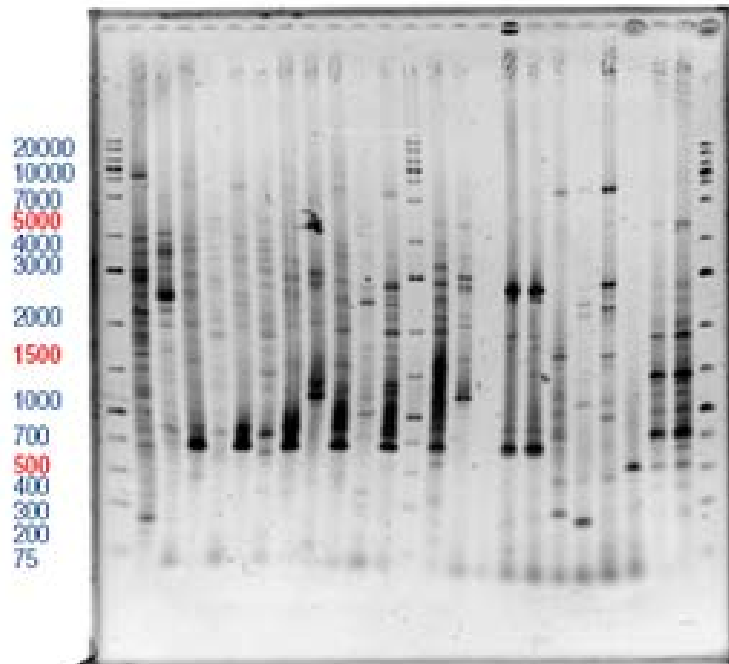


Figura 4. Perfiles genómicos de 21 aislados de *T. pratense* utilizando cebadores ERIC. En los carriles 1, 13 y 25 se encuentra el marcador de peso molecular (Gene Ruler 1Kb Plus DNA Ladder Fermentas). En el carril 12 se encuentra el inoculante comercial U204.

Se realizó el análisis de los perfiles ERIC de la totalidad de los 84 aislados para construir el dendrograma general (Figura 5).

Para evaluar el grado de reproducibilidad de los perfiles ERIC se debe seleccionar, de cada sitio de muestreo, un aislado al azar con su duplicado. El análisis de conglomerado mostró para *R. leguminosarum* que cada aislado se agrupaba con su duplicado con valores de similitud mínima de

60% y máxima de 100%. Por lo tanto los aislados que presentaron similitudes iguales o mayores al 60% fueron considerados iguales. Establecido este criterio, se realizó el análisis de los perfiles ERIC, de la totalidad de los aislados, para construir el dendrograma general (Batista, et al., 2010).

Este análisis evidenció 21 perfiles diferentes con una similitud igual o mayor a 60%, por lo que la diversidad encontrada fue del 25%. La misma se calculó con la relación matemática; n° de perfiles diferentes $\times 100 / n^{\circ}$ de totalidad de aislados.

De los 84 perfiles analizados 21 de ellos fueron iguales al inoculante comercial cepa U204 (figura 5), por lo que esta cepa fue recuperada en un 25% de los aislados analizados. No todos los aislados recuperados provienen de sitios con historia previa de inoculación. Solamente los sitios pertenecientes al departamento de Colonia identificados como P95 y P96 cuentan con historia de pradera (datos aportados por la Ing. Agr. Mónica Rebufo).

Para evaluar como fue preservada la estructura de los datos por el análisis se calculó, para los dendrogramas realizados, el coeficiente de correlación cofenética (CCC). Este coeficiente establece la correlación entre la matriz de similitud original de los datos y la matriz cofenética obtenida a partir del

dendrograma. Un alto valor de coeficiente cofenético representa un buen ajuste entre ambas matrices, y por lo tanto una buena representación de los datos por el método empleado. Generalmente los valores de coeficiente de correlación cofenética oscilan entre 60% y 95%, y se ha demostrado empíricamente que valores superiores al 70% indican una buena representación de la matriz de similitud por parte del dendrograma (Crisci y López, 1983).

El coeficiente de correlación cofenética para este estudio fue de 76 % lo que indica una buena representación de la matriz de similitud por parte del dendrograma.

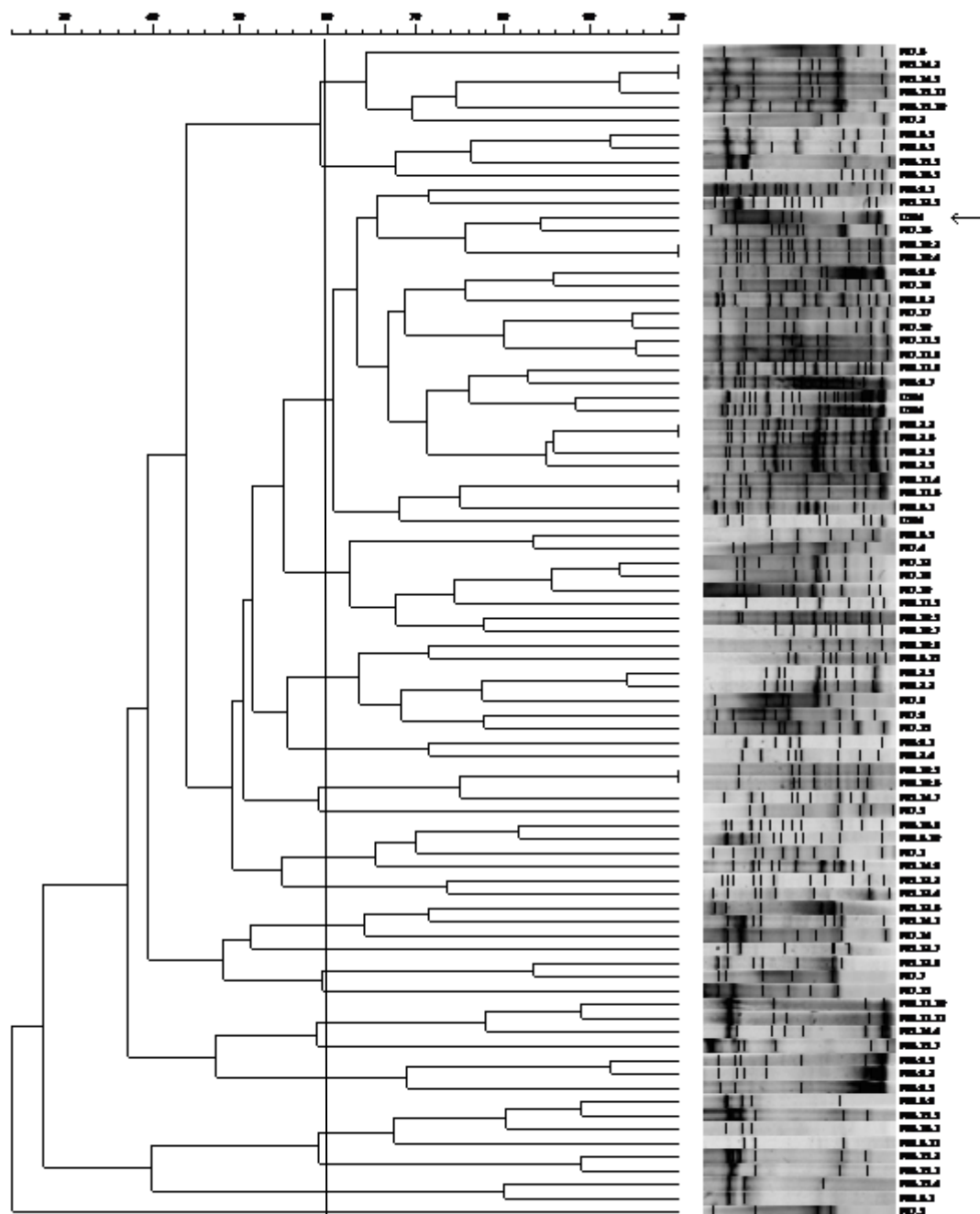


Figura 5. Dendrograma con los 84 aislados procedentes de los puntos de muestreo y el inoculante comercial, cepa U204, señalado con una flecha. Se realizó con el coeficiente de similitud DICE y el método de agrupamiento UPGMA. El coeficiente de correlación cofenética fue de 76 % y la diversidad de 25 %. Se observaron 21 perfiles diferentes de los 84 analizados con una similitud igual o mayor al 60%.

Referencias: La nomenclatura utilizada para los aislados obedece al siguiente orden: P punto de colecta; entre barras número de planta y finalmente número de nódulo (N) de esa planta.

Con el fin de determinar la utilidad de los métodos REP y ERIC PCR, para clasificar cepas del mismo género y especie De Bruijn, (1992), analizó una colección de cepas de *R. meliloti* aisladas de nódulos de una variedad de *Medicago sp.* El estudio reveló patrones similares con ambos métodos, sugiriendo que tanto REP como ERIC-PCR son métodos útiles para identificar y clasificar las cepas bacterianas.

Santamaría *et al.* (1999) identificaron cepas de *Bradyrhizobium sp.* a través de dos técnicas, el perfil de lipopolisacáridos (LPS) y por perfiles genómicos usando ERIC-PCR. En este trabajo, se optó por el método ERIC-PCR porque permite, además de diferenciar aislados, inferir relaciones filogenéticas más sólidas. Los perfiles LPS tienen una limitación en este sentido, debido a que esos patrones dependen de enzimas biosintéticas, y no hay prueba de alguna correlación entre este tipo de enzima de síntesis de LPS y el genoma bacterial. Además, la metodología LPS, es de mayor costo y la extracción es más compleja que en la otra técnica mencionada y en cualquiera de los dos casos se está midiendo expresión de genes. Por esto no se pueden sacar conclusiones sobre

relaciones filogenéticas y evolutivas a través de la comparación de estos patrones (Santamaría *et al.*, 1999).

Por otro lado, se estudió la diversidad de cepas de *Bradyrhizobium japonicum* en Polonia y se encontró que la población se dividía en dos grupos según el perfil de Rep-PCR estando uno de ellos relacionada con una cepa de *B. japonicum* usada como inoculante comercial en EEUU (Madrzak, *et al.*, 1995). Saldana *et al.*, (2003), encontraron un nivel considerable de diversidad genética entre rizobios de crecimiento rápido que nodulan soja basándose en la identificación por Rep-PCR y RAPD.

Por medio del análisis del perfil de proteínas totales y ensayos inmunoquímicos de los aislados Irisarri *et al.*, (1996) encontraron que 15 aislados de rizobios de nódulos de *L. subbiflorus* de suelos de Florida y Durazno presentaban una diversidad del 53%. De los 15 aislados, 13 fueron clasificados como bacterias de crecimiento lento, mientras que los dos restantes fueron de rápido crecimiento. De los 13 aislados de crecimiento lento, 8 presentaron diferente perfil proteico por lo que se consideraron cepas diferentes.

Por el análisis de perfil de proteínas totales se caracterizó una población de rizobios nativos que nodulaban las raíces de *L. corniculatus* de suelos de Uruguay con distintas propiedades fisicoquímicas. Los 15 aislados

estudiados fueron 100% diversos y se revelaron 15 perfiles únicos, por lo que se concluyó que los 15 aislados representaban diferentes cepas de rizobios (Monza *et al.* 1992).

Se estudió la diversidad genética de rizobios del género *Mesorhizobium*, que nodulan *L. tenuis* en suelos del Valle del Río Salado (Argentina). Para el estudio de la diversidad se analizaron perfiles genómicos de un total de 103 aislados a través de REP-PCR, y se obtuvieron 77 perfiles únicos, lo que corresponde a un nivel de diversidad genética, entre los aislados, del 75% (Estrella *et al.* 2009).

Hay diversos factores que afectan la diversidad genética de rizobios como ser la salinidad, el pH, la contaminación y el uso de los suelos, debido a que se obtienen diversas respuestas bajo diferentes condiciones (Kaschuk *et al.*, 2006; Estrella *et al.*, 2009).

El crecimiento de la mayoría de las especies de *R. trifolli* y *R. leguminosarum* se ve reducido por debajo de pH 5. En cuanto a la salinidad *R. trifolli* y *R. leguminosarum* admiten sólo el 1% mientras *R. melioli* crece en concentraciones del 3,5% de NaCl; mostrándose más sensible *B. japonicum* tolerando concentraciones máximas del 0,5% (Kaschuk *et al.*, 2006; Estrella *et al.*, 2009).

Con referencia a las condiciones del suelo un factor que influye es la fertilización nitrogenada de los mismos ya que el proceso de nodulación y fijación de nitrógeno se reduce con altas dosis de nitrógeno en el suelo. Otro factor, es la contaminación de los suelos con herbicidas que pueden interferir en el proceso de nodulación (Kaschuk et al., 2006; Estrella et al., 2009).

2.2 Análisis del gen 16S ARN amplificado

Para el ensayo de diversidad se amplificó el ADN genómico del gen del ARNr de 16S con los primers 41f y 1488r y se seleccionaron 21 aislados con un perfil ERIC distinto (Figura 5).

Para hacer el ARDRA, se utilizó el producto de la amplificación del gen del ARNr de 16S el cuál se visualizó como una única banda de 1400 pb (Figura 6), en los 21 aislados.

El tamaño obtenido corresponde al esperado para los genes del ARNr de 16S de Bacteria (Laguerre *et al.*, 1994).

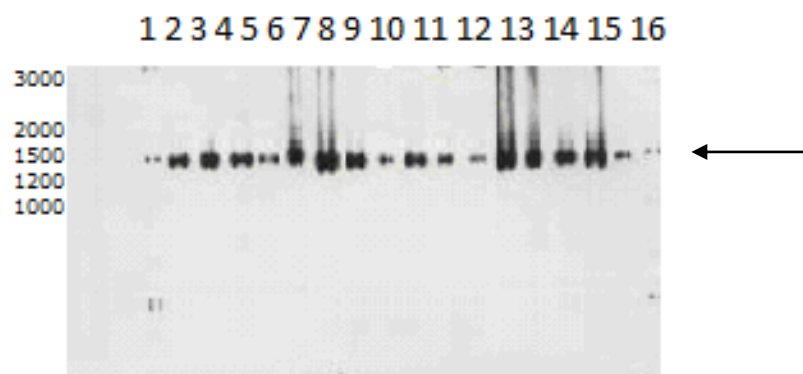


Figura 6. Gel de electroforesis de productos de amplificación del gen 16S ARN. Se señala con una flecha la única banda del producto de amplificación a 1400 pb. Se observan 15 aislados. Carriles: 1: marcador de peso molecular; 2: P96/15/N11; 3: P89/6/N5; 4: P89/10/N2; 5: P89/10/N8; 6: P96/9/N1; 7: P89/10/N5; 8: P89/6/N10; 9: P95/13/N3; 10: P95/13/N6; 11: P95/13/N8; 12: P89/11/N10; 13: P96/9/N2; 14: P89/6/N9; 15: P96/15/N3; 16: P89/6/N1.

2.3 Análisis ARDRA del gen 16S ARN

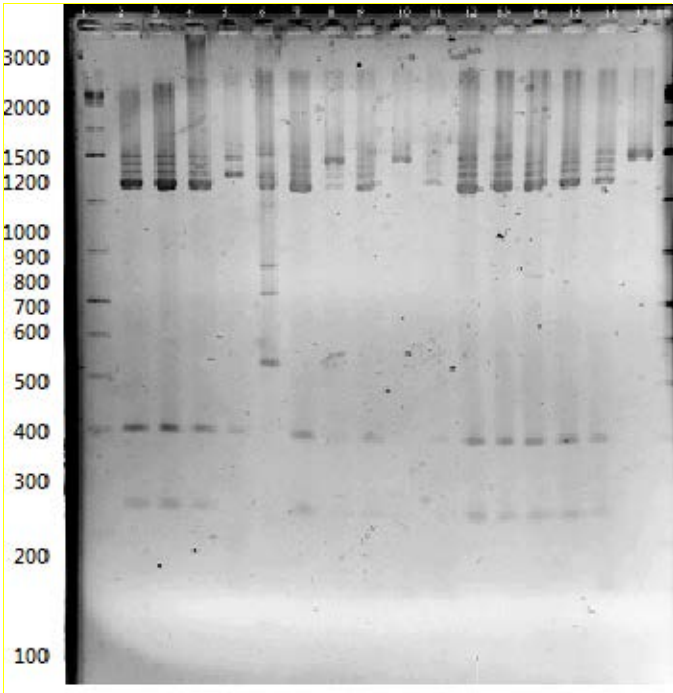
El estudio ARDRA del gen del ARNr de 16S se hizo seleccionando dos endonucleasas de restricción, *MspI* y *HinfI* (Laguerre *et al.*, 1994; Estrella *et al.*, 2009). A través del estudio de los patrones generados por ARDRA se estimó la posición taxonómica de los aislados por comparación de sus perfiles de restricción con perfiles de restricción de cepas de referencia.

Para ambas enzimas *HinfI* (Figura 7 I) y *MspI* (figura 7 II), se obtuvieron 2 patrones de restricción diferentes. A cada patrón se le asignó arbitrariamente una letra (a y b) para diferenciarlos. Esto permitió diferenciar 3 ribogrupos aa, ba y ab.

De los 21 aislados, 12 corresponden al ribogrupo aa provenientes de 3 puntos de muestreo de San José y Colonia, 1 corresponde al ribogrupo ab proveniente de un punto de muestreo de San José y 8 al ribogrupo ba provenientes de dos puntos de muestreo de la zona de Colonia. El inoculante comercial U204 corresponde al ribogrupo aa.

(I) *Hinf I*

a a a b a a b a b b a a a a a b



(II) *MspI*

a a a a b a a a a a a a a a

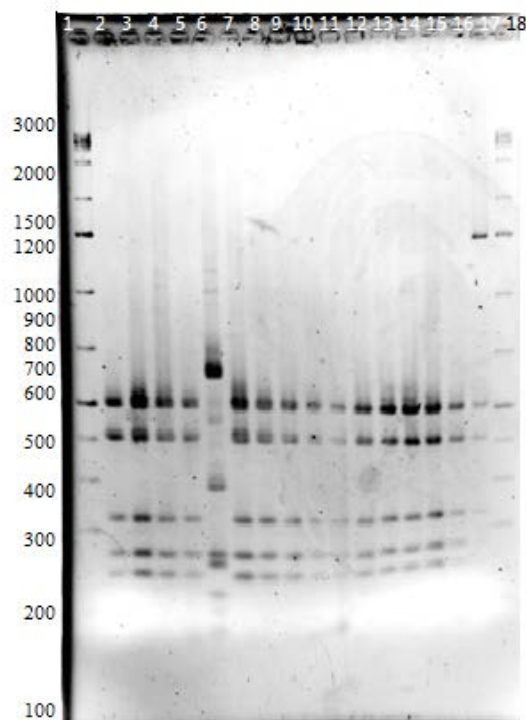


Figura 7. Perfiles de restricción del gen del ARN de 16S de aislados de *T. pratense* y el inoculante comercial, cepa U204. En (I) se muestra el patrón de bandas obtenido por digestión con la enzima *Hinf*I y en (II) se muestra el patrón de bandas obtenido con la enzima *Msp*I. Se identifican como a y b los patrones obtenidos tanto con la enzima *Hinf*I como con la enzima *Msp*I. Para las figuras I y II, los carriles 1 y 18 corresponden a marcadores de peso molecular; 2: P96/15/N11; 3: P89/6/N5; 4: P89/10/N2; 5: P89/10/N8; 6: P96/9/N1; 7: P89/10/N5; 8: P89/6/N10; 9: P95/13/N3; 10: P95/13/N6; 11: P95/13/N8; 12: P89/11/N10; 13: P96/9/N2; 14: P89/6/N9; 15: P96/15/N3; 16: P89/6/N1 y 17: U204.

Laguerre et al., (1994), estudiaron 11 cepas de *R. leguminosarum* y observaron un único patrón de restricción con nueve endonucleasas

diferentes utilizadas. El resultado obtenido muestra la homogeneidad de las especies a pesar del biovar. La generación de un solo patrón de restricción usando varias enzimas a diferencia de los diferentes patrones obtenidos en el presente trabajo usando solamente dos enzimas de restricción, suele deberse a la alta diversidad genética de las cepas en relación a las cepas utilizadas por Laguerre et al (Laguerre et al.; 1994)

3. Evaluación de la biomasa

De los 21 perfiles de ERIC que se obtuvieron se eligieron 5 aislados (P89/10/N2; P96/16/N8; P96/9/N5; P95/13/N2; P95/13/N3); para realizar el ensayo en macetero debido a que los mismos presentaron mayor número de nódulos en el ensayo *in vitro*. De los aislados seleccionados 3 pertenecen al ribogrupa aa (P96/16/N8, P96/9/N5, P95/13/N2) y 2 al ribogrupa ba (P95/13/N3, P89/10/N2).

La eficiencia simbiótica se evaluó por el peso seco de la parte aérea de las plantas. Se inocularon 5 plantas y se realizaron 5 repeticiones.

Se realizó el primer corte a los 45 días luego de que fueron sembradas las semillas. En este corte todos los aislados presentaron una considerable mayor producción de biomasa en relación al control sin inocular, no

evidenciándose en el análisis estadístico diferencias ni entre los tratamientos ni con el control positivo (inoculante comercial U204).

La biomasa del control con nitrógeno fue ampliamente superior a la de los diferentes aislados, siendo ésta 3 veces mayor (figura 8).

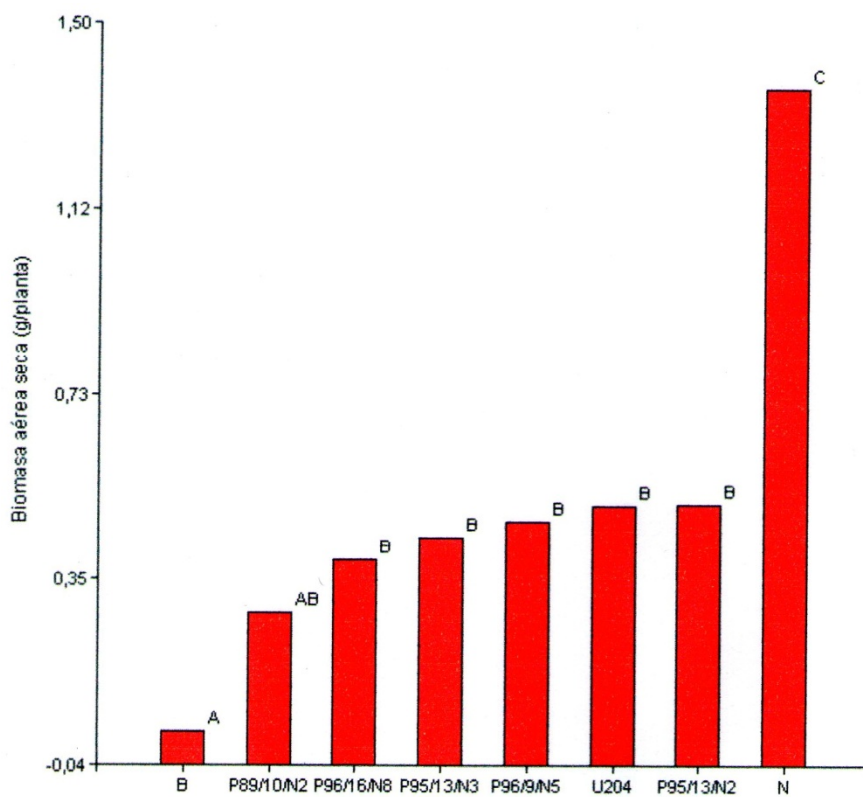
Treinta días después del primer corte se realizó un segundo corte, dónde todos los aislados presentaron una producción de biomasa superior al control sin inocular.

Se observa que las plantas inoculadas con los aislados P95/13/N3, P96/9/N5 y P95/13/N2 mostraron los mayores valores de biomasa y a su vez uno de ellos (P95/13/N2) es igual estadísticamente al control con nitrógeno.

Por otro lado también se diferenciaron 2 aislados P96/16/N8 y P89/10/N2, los cuáles presentaron menores valores de biomasa.

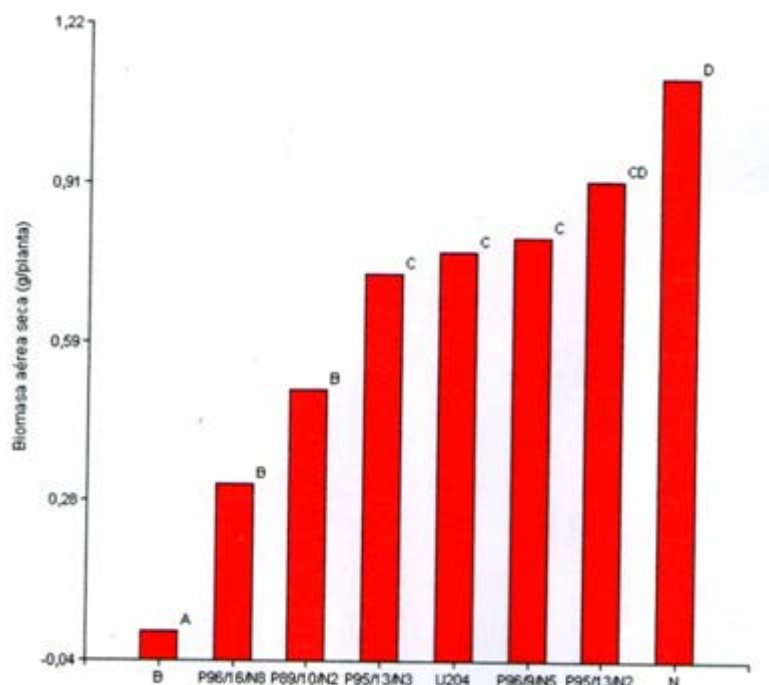
Los aislados P95/13/N2 y P96/9/N5, presentaron valores promedios de biomasa mayores al control positivo (inoculante comercial U204) y todos los aislados evaluados presentaron una biomasa promedio menor que el control con nitrógeno. Así mismo los aislados P95/13/N2 y P96/9/N5, si bien presentaron una biomasa inferior al control con nitrógeno no se apreciaron diferencias importantes (figura 9).

Los valores promedios de biomasa del inoculante comercial cepa U204 y del aislado P95/13/N3 fueron iguales (figura 9).



B: blanco (control sin inocular), **N:** control con nitrógeno, **U204:** inoculante comercial , **P89/10/N2, P96/16/N8, P95/13/N3, P96/9/N5, P95/13/N2:** aislados

Figura 8. Biomasa de la parte aérea de *T. pratense* en el primer corte, a los 45 días inoculado con aislados y el inoculante comercial, cepa U204, un control sin inocular y un control con nitrógeno. Las diferentes letras indican diferencias significativas. (Test de Tukey, $p < 0,05$).



B: blanco (control sin inocular), **N:** control con nitrógeno, **U204:** inoculante comercial , **P89/10/N2, P96/16/N8, P95/13/N3, P96/9/N5, P95/13/N2:** aislados

Figura 9. Biomasa de la parte aérea de *T. pratense* en el segundo corte, a los 75 días inoculado con aislados y el inoculante comercial, cepa U204, un control sin inocular y un control con nitrógeno. Las diferentes letras indican diferencias significativas. (Test de Tukey, $p < 0,05$).

Conclusiones y perspectivas

A través de la aplicación de diferentes procedimientos y herramientas de biología molecular se completó una colección de cepas nativas de rizobios que nodulan trébol rojo. A sí mismo, se pudo establecer la diversidad de dichas cepas nativas.

Cuando se analizó el patrón generado por ARDRA, se observó que el patrón generado por digestión con la enzima *Hinf*I de la cepa P96/9/N1, no coincidió con los demás perfiles obtenidos y por lo tanto se debe proceder a estudiar la secuencia del gen del ARN de 16S de la cepa P96/9/N1 antes mencionada y compararla con la secuencia del gen del ARN de 16S de *R. leguminosarum* a fin de comprobar la similitud con la misma.

A pesar de que todas las leguminosas estudiadas ratifican la eficiencia del mecanismo biológico de fijación de nitrógeno, en las condiciones del ensayo, particularmente la cepa P95/13/N2, mostró una producción de biomasa similar a la del control con nitrógeno por lo que sería una cepa promisorio para el desarrollo de un inoculante para trébol rojo.

Para verificar su capacidad como inoculante, debería de realizarse un ensayo de campo bajo determinadas condiciones de suelo y clima para así de esta forma comprobar si posee mayor eficiencia en la fijación biológica de nitrógeno que las cepas usadas como control (inoculante comercial U204 y control con nitrógeno).

Citas bibliográficas

Agius F., Sanguinetti C. y Monza J. 1997. Strain-specific fingerprints of *Rhizobium loti* generated by PCR with arbitrary and repetitive sequences. FEMS. Microbiology and Ecology. **24**: 87-92.

Balatti, P., Martínez Alcántara, V., Diosma, G., Pastorino, G., Videira, L., Pecari, A., Hernández Lois, G., Scarano, P. y Hungría, M. 2006. Los suelos del NOA Argentino constituye una fuente de nuevos rizobios que nodulan la soja (*glycine max* l. merr). <http://www.engormix.com/MA-agricultura/soja/articulos/los-suelos-noa-argentino-t971/415-p0.htm> Fecha de acceso: 3 junio de 2009.

Barry, T., Colleran, G., Glennon, L., Dunican, K., y Gannon, F. 1991. The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. PCR Methods Application. **1**: 51-56.

Batista, L., Sánchez, M., Irisarri, P., Cuitiño, MJ., Rebuffo, M., Sanjuán, J. y Monza, J. 2010. Competitive ability and diversity of native rhizobia strains nodulating *Trifolium pretense*. XIII National Meeting of the Spanish Society of Nitrogen Fixation and Portuguese-Spanish congress on Nitrogen Zaragoza (Spain).

Berretta, E. 2003. Perfiles del recurso pastura/forraje. Uruguay. http://www.fao.org/ag/agP/agpc/doc/Counprof/spanishtrad/uruguay_sp/Uruguay3_sp.htm Fecha de acceso: 30 de setiembre de 2010.

Brock,T., Madigan, M., Martinko, J., y Parker, J. 2004. Biología de los microorganismos. Décima edición. 654-656.

Campillo, R., Urquiaga, S., Pino, I., y Montenegro, A. 2003. Estimation of biological nitrogen fixation in forage legumes using a ^{15}N labeling methodology. *Agricultura Técnica*. **63** (2): 169-179.

Crisci, J., y Lopez, M. 1983. Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica. OEA, Programa regional de desarrollo científico y tecnológico. Serie Biología. Monografía. **26**. 132-140.

De Baere, T., y de Mendonça, R. 2002. Evaluation of amplified rDNA restriction analysis (ARDRA) for the identification of cultured mycobacteria in a diagnostic laboratory. *BMC Microbiology*. **2**: 4-6.

De Bruijn, F. 1992. Use of Repetitive (Repetitive Extragenic Palindromic and Enterobacterial Repetitive Intergeneric Consensus) Sequences and the Polymerase Chain Reaction To Fingerprint the Genomes of *Rhizobium meliloti* Isolates and Other Soil Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. **58** (7): 2180-2187.

Dutto, P. 2010. Recomendaciones para situaciones con problemas. Inoculación de leguminosas. Revista del plan agropecuario. Departamento de Microbiología de Suelos – MGAP. 54-56

Espinoza Mendoza, A., Kogad, I., y Zavaleta I, A. 2008. Amplified 16S Ribosomal DNA Restriction Analysis for Identification of *Avibacterium paragallinarum* Avian Diseases **52**(1):54-58.

Estrella, M., Muñoz, S., Soto, M., Ruiz, O., y Sanjuan, J. 2009. Genetic diversity and host range of rhizobia nodulating *Lotus tenuis* in typical soils of the Salado River Basin (Argentina). *Applied and Environmental Microbiology*. **75**: 1088-1098.

Ferreira, M., y Grattapaglia, D. 1996. Clases de marcadores moleculares para análise genética. En: *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 2ª Ed. Brasília: Embrapa-Cenargen. 220-225.

Frioni, L. 1990. Asociación *Rhizobium*-leguminosa. Ecología microbiana del suelo. Departamento de publicaciones de la Universidad de la República, Montevideo. 203-208.

Gallego, V., García, M., y Ventosa, A. 2006. *Methylobacterium adhaesivum* sp. nov., a methylophilic bacterium isolated from drinking water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **56**: 339-342.

Gaunt, M., Turner, S., Rigottier-Gois, L., Lloyd-Macgilp, S., y Young J. 2001. Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **51**: 2037-2048.

Gomes, F., Menna, P., Da Silva, J., y Hungria, M. 2007. Evidence of Horizontal Transfer of Symbiotic Genes from a *Bradyrhizobium japonicum* Inoculant Strain to Indigenous Diazotrophs *Sinorhizobium (Ensifer) fredii*

and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian Savannah Soil. *Applied and Environmental Microbiology*. **73**: 2635–2643.

Handberg, K., y Stougaard, J. 1992. *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *The plant Journal*. **2**: 487-496.

Harrison, S., Mytton, L., Skot, L., Dye, M., y Cresswell, A. 1992. Characterisation of *Rhizobium* isolates by amplification of DNA polymorphisms using random primers. *Canadian Journal of Microbiology*. **38**: 1009–1015.

Heyndrickx, M., Vauterin, L., Bañadme, P., Kesters, P., y De Vos, P. 1996. Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction análisis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy. *Journal of Microbiological Methods*. **26** : 247-259.

Howieson, J., Yates, R., O'Hara, G., Ryder, M., y Real, D. 2005. The interactions of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* spp. From diverse centres of origin. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. **45**: 199-207.

Izaguirre-Mayoral, M., Labandera, C., y Sanjuán, J. 2007. Biofertilizantes en Iberoamérica: una visión técnica, científica y empresarial. Montevideo, Uruguay. 1ª Edición. CYTED. Madrid. 76-78.

Izaguirre, P. 1995. Especies indígenas y subespontáneas del género

Trifolium L. (Leguminosae) en el Uruguay. INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria). Serie Técnica **58**. 1-22. (1,13,14).

Jensen, H. 1942. Nitrogen fixation in leguminous plants. I. General characters of root-nodule bacteria isolated from species of *Medicago* and *Trifolium* in Australia. Proceedings of the Linnean Society of New South Wales. **66**: 98-108

Jiménez Avella, D. 2007. Caracterización molecular de cepas nativas colombianas de *Azotobacter* spp. Mediante el análisis de restricción del DNA ribosomal 16S. Facultad de Ciencias Básicas. Tesis en microbiología industrial. Bogotá, D.C. Colombia. 16.

Jordan, D. 1984. *Rhizobiaceae*. En Bergey's Manual Systematic Bacteriology. Ed N.R.Krieg. Williams and Wilkins. Baltimore. 234-242

Kaschuk, G., Hungria, M., Andrade, D. S., y Campo, R.J. 2006. Genetic diversity of rhizobia associated whit common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. Applied Soil Ecology. **32**: 210-220

Kerster, K., y De Ley, J. 1984. Genus III *Agrobacterium* Conn. 1942. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams& Wilkins Co., Baltimore. **1**:244-254.

Kwon, S., Park, J., Kim, J., Kang, J., Cho, Y., Lim, C., Parker, M., y Lee, G. 2005 Phylogenetic analysis of the genera *Bradyrhizobium*,

Mesorhizobium, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* on the basis of 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequences. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. **55**: 263–270.

Labandera, C., y Vincent, J. 1975. Competition between an introduced strain and native Uruguayan strains of *Rhizobium trifolii*. Plant Soil **42**:327-347.

Labandera, C., y Vincent, J. 1975. Loss of symbiotic capacity in commercially useful strains of *Rhizobium trifolii*. Applied Bacteriology. **39**:209-211.

Laguerre, G., Allard, M., Revoy, F y Amarger, N. 1994. Rapid Identification of rhizobia by Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified 16S rRNA Genes. Applied and Environmental Microbiology. **60**(1): 56-63.

Laguerre, G., Nour, S., Macheret, V., Sanjuán, J., Drouin y Amarger, N. 2001. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. Microbiology. **147**: 981-983.

Lloret, L., y Martinez-Romero, E. 2005. Evolución y filogenia de *Rhizobium*. Revista Latinoamericana de Microbiología. **47**: 43-60.

Lorite, M., Muñoz, S., Olivares, J., Soto, M., y Sanjuán, J. 2009. Characterization of strains unlike *Mesorhizobium loti* that nodulate *Lotus* in

saline soils of Granada (Spain). Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos. Estación Experimental del Zaidín, CSIC. Applied and Environmental Microbiology. **76**:4019-4026.

Lupski, J., y Weinstock., G. 1992. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. Journal of Bacteriology. **174**: 4525–4529.

Madrzak, C., Golinska, B., Kroliezak, J., Pudelko, K., Lazewska, D., Lampka, B., and Sadowsky, M. 1995. Diversity among field population of *Bradyrhizobium japonicum* in Poland. Applied Environmental Microbiology. **61**: 1194-1200.

Martinez-Romero, E. 1994. Recent developments in *Rhizobium* taxonomy. Plant and Soil. **161**: 11-20.

Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Departamento de Microbiología de Suelos. 2008. Colección Nacional de CEPAS de *Rhizobium* spp. Montevideo. Uruguay. 1-18.

Monza, J., Fabiano, E., y Arias, A. 1992. Characterization of and idigenous population of rhizobia nodulating *Lotus corniculatus*. Soil Biology Biochemistry. **24**: 241–247.

Monza, J., y Palacios, J. 2004. Fijación biológica de nitrógeno en la simbiosis rizobio-leguminosa. En: El metabolismo del nitrógeno en las

plantas. Monza, J., y Márquez, A. (Eds). Almuzara estudios, S.A. 1-38, 121-138.

National Center for Biotechnology Information (NCBI). 2011. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> Fecha de acceso: 8 de julio de 2011.

Olivares, J. 2006. Nitrogenasa. Enzima clave en la fijación. En: Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno. 328-332.

Rebuffo, M., Bemhaja, M., y Risso, D. 2006. Uso de leguminosas forrajeras en sistemas pastoriles: situación actual de Uruguay. **36**.
<http://www.inia.org.uy/sitios/lnl/vol36/rebuffo2.pdf> Fecha de acceso: 8 de agosto de 2009.

Rincón, A., Arenal, F., González, I., Manrique, E., Lucas, M., y Pueyo, J. 2008. Diversity of rhizobial bacteria isolated from nodules of the gypsophyte *Ononis tridentata* L. growing in spanish soils. Microbial Ecology **56**: 223–233.

Rivas, R., Laranjo, M., Mateos, P., Oliveira, S., Martínez-Molina, E. y Velázquez, E. 2006. Strains *Mesorhizobium amorphae* and *Mesorhizobium thianshanense*, carrying symbiotic genes of common chickpeas endosymbiotic species, constitute a novel biovar (*ciceri*) capable of nodulating *Cicer arietinum*. Letters in Applied Microbiology. **4**:412-418.

- Rivas, R., Velázquez, E., Valverde, A., Mateos, P., y Martínez-Molina, E.** 2001. A two primers random amplified polymorphic DNA procedure to obtain polymerase chain reaction fingerprints of bacterial species. *Electrophoresis* . **22**: 1086–1089.
- Rochefort, D., y Benson, D.** 1990. Molecular Cloning, Sequencing and Expression of de Glutamine Synthetase (*glnII*) Gen from the Actinomycete Root Nodule Symbiont *Frankia* sp. Strain Cp I1. *Journal of Bacteriology*. **172**: 5335-5342.
- Rodicio, M., y Mendoza, M.** 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S. Fundamento, metodología y aplicaciones microbiología clínica. Departamento de biología funcional. Area de microbiología. Universidad de Oviedo. España. 81-87.
- Rodríguez, A., Sicardi, M., y Frioni, L.** 2010. Competition for nodule occupancy between introduced and native strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Biology and Fertility of Soils*. **46**. 419-425.
- Saldana, G., Martinez-Alcantara, V., Vinardell, J., Bellogin, R., Ruiz-Sainz, J., and Balatti, P.** 2003. Genetic diversity of fast-growing rhizobia that nodulate soybean (*Glycine max* L. Merr). *Archives Microbiology*. **180**: 45-52.
- Sambrook, J., Fritsch, E., y Maniatis, T.** 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. 2ª Ed.

- Santamaría, M., Agius, F., Monza, J., Gutierrez-Navarro, A-M., y Corzo J.** 1999. Comparative performance of enterobacterial repetitive intragenic consensus-polymerase chain reaction and lipopolysaccharide electrophoresis for the identification of *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) strains. FEMS Microbiology Ecology. **28**: 163-168.
- Selenska-Pobell, S.** 1994. How monitor released rhizobia. Plant and Soil. **166**: 187-191.
- Thies, J., Holmes, E., y Vachot, A.** 2001. Application of molecular techniques to studies in *Rhizobium* ecology: a review. Australian Journal of Experimental Agriculture **41**: 299–319.
- Urzúa, H., Urzúa, M. y Pizarro, R.** 2001. Pre-selección de cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viceae* en vicia forrajera, para abonos verdes. Ciencia e Investigación Agraria. **28 (1)**: 3-6.
- Valverde, A., Peix, A., Trujillo, M., Cervantes, E., Rivas, R., Cruz Sánchez, J., Igual, J., Mateos, P., Martínez Molina, E., y Velázquez, E.** 2004. Characterization of bacterial strains belonging to the *Rhizobium leguminosarum* cross-inoculation group, isolated from effective nodules of legumes growing in the Northwest of Spain. Reunión Científica de la Sociedad Española para el Estudio de los Pastos. Gráficas Cervantes Salamanca **44**:157-161.
- Van Berkum, P., y Fuhrmann, J.** 2000. Evolutionary relationships among

the soybean bradyrhizobia reconstructed from 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequence divergence. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. **50**: 2165-2172

Versalovic, J., Koeuth, T., y Lupski, J. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Research **19**: 6823–6831.

Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F., y Lupski, J. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. Methods in Molecular and Cellular Biology **5**: 25–40

Vincent, J. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. IBP Handbook 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 6-7.

Vinuesa, P., Rademaker, J., Bruijn, J., y Werner, D. 1998. Genotypic Characterization of *Bradyrhizobium* Strains Nodulating Endemic Woody Legumes of the Canary Islands by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Genes Encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA Intergenic Spacers, Repetitive Extragenic Palindromic PCR Genomic Fingerprinting, and Partial 16S rDNA Sequencing. Applied and Environmental Microbiology. **64**: 2096-2104.

Vinuesa, P., Silva, C., Lorite., M., Izaguirre-Mayoral, M., Bedmar, L., y Martínez-Romero, E. 2005. Molecular systematics of rhizobia based on

maximum likelihood and *Bayesian* phylogenies inferred from *rrs*, *atpD*, *recA* and *nifH* sequences, and their use in the classification of *Sesbania* microsymbionts from Venezuelan wetlands. *Systematic and Applied Microbiology*.**28**:702-716.

Willems, A., Coopman, R., y Gillis, M. 2001. Phylogenetic and DNA–DNA hybridization analyses of *Bradyrhizobium* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **51**: 111–117.

Zilli, J. 2004. Assessment of cowpea rhizobium diversity in Cerrado areas of northeastern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. **35**: 281-287.