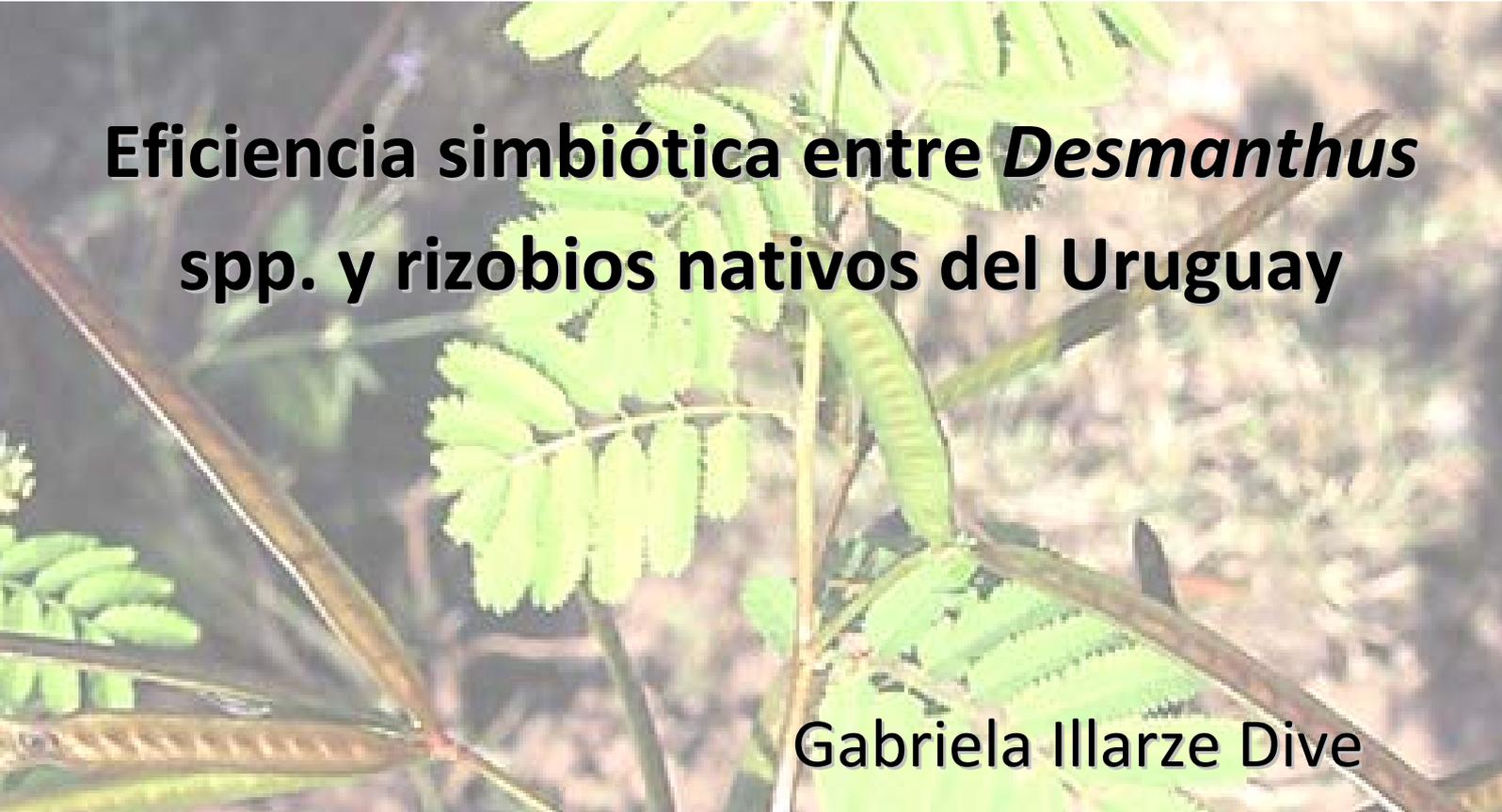


Universidad de la República  
Facultad de Ciencias  
Licenciatura en Ciencias Biológicas



**Eficiencia simbiótica entre *Desmanthus*  
spp. y rizobios nativos del Uruguay**

Gabriela Illarze Dive

Tesis de grado

Orientador: *Ing. Agr. MSc. Elena Beyhaut*

Co-orientador: *Ing. Agr. Dr. Margarita Sicardi*

## Contenido

---

Resumen.....	1
Introducción .....	3
El nitrógeno y su importancia .....	3
Fertilizantes nitrogenados.....	3
Fijación biológica de nitrógeno .....	4
Fijación simbiótica de nitrógeno: leguminosa-rizobio .....	6
Especificidad de la interacción rizobio-leguminosa .....	7
El proceso de nodulación .....	8
Bases moleculares de la especificidad rizobio-leguminosa.....	10
Importancia de las leguminosas en Uruguay .....	13
El género <i>Desmanthus</i> .....	14
Uso de <i>Desmanthus</i> como forrajera .....	15
Fijación simbiótica de nitrógeno por <i>Desmanthus</i> .....	16
Objetivo .....	17
Materiales y métodos.....	18
1. Sitios de muestreo .....	18
2. Material vegetal .....	19
2.1. Escarificación, desinfección y germinación de las semillas .....	19
3. Obtención de cepas de rizobios .....	20
3.1. Aislamiento de rizobios de nódulos.....	22
4. Amplitud de hospedero .....	22
5. Eficiencia simbiótica de combinaciones de rizobios nativos y <i>Desmanthus</i> spp. ....	23
5.1. Ensayos en cámara de crecimiento .....	23
5.2. Ensayos en invernáculo.....	24
6. Análisis estadístico .....	25

Resultados y discusión .....	26
1. <i>Desmanthus</i> spp.-rizobios .....	26
2. Amplitud de hospedero y características de nodulación.....	28
3. Eficiencia simbiótica de combinaciones de rizobios nativos y <i>Desmanthus</i> spp. ....	31
3.1. Ensayos en cámara de crecimiento .....	31
3.2. Ensayo en invernáculo .....	36
Conclusiones.....	40
Anexo 1.....	42
Germinación de semillas de <i>Desmanthus depressus</i> escarificadas por varios métodos .....	42
Anexo 2.....	43
Medios de cultivo, soluciones y esterilización del material .....	43
Referencias bibliográficas.....	45

## Resumen

---

El género *Desmanthus* pertenece a la familia *Leguminosae* y a la subfamilia *Mimosoideae* y tiene un gran potencial forrajero en varios países. En Uruguay 3 especies crecen de manera silvestre: *D. depressus*, *D. virgatus* y *D. tatuhyensis*. Hasta el momento, estas especies no han sido estudiadas en cuanto a su nodulación con rizobios nativos, su potencial de fijación de N<sub>2</sub> en condiciones naturales y su uso como cultivo forrajero o como especie asociada en cultivos forestales.

En este trabajo se planteó el objetivo de evaluar la nodulación y la eficiencia simbiótica de combinaciones especies de *Desmanthus* y cepas de rizobios obtenidas de suelos de zonas donde crece naturalmente: noroeste, Departamento de Paysandú y Salto y noreste en el Dpto. de Rivera. De estas 3 zonas de estudio se obtuvo germoplasma vegetal y rizobios nativos por nodulación en los suelos con los que se inocularon plantas de *Desmanthus* spp.. Los aislamientos de rizobios fueron clasificados por morfología de sus colonias en medio de cultivo y se determinó su amplitud de hospedero y su eficiencia simbiótica en condiciones controladas y en ensayos en macetas con suelos en invernáculo. Cepas de colecciones extranjeras fueron incluidas como referencia.

Todas las especies de *Desmanthus*: *D. velutinus*, *D. bicornutus*, *D. pubescens*, *D. leptophyllus*, *D. virgatus*, *D. illinoensis* y *D. depressus*, nodularon al ser inoculadas con los suelos de las zonas en estudio, obteniéndose nodulación efectiva en todos los suelos. Se observó nodulación efectiva preferentemente en las especies *D. illinoensis* y *D. depressus*. Los rizobios aislados mostraron escasa amplitud simbiótica en otras especies de *Desmanthus*. La especie *D. leptophyllus* resultó ser una especie de amplia capacidad de nodulación, con un porcentaje de nodulación efectiva del 62%.

Se evidenció respuesta significativa en peso seco de la parte aérea en especies de *Desmanthus* inoculadas con rizobios nativos (ensayos en condiciones controladas) e interacción rizobio x especie, indicando especificidad simbiótica en algunas de las combinaciones estudiadas.

Tanto la inoculación de *D. illinoensis* con la cepa UMR 6029 (referencia) y con los aislamientos nativos D2 y D3, como la inoculación de *D. virgatus* con ICB1 (referencia) produjeron incrementos de biomasa aérea seca superior al 300%, siendo las especies con mayor potencial de fijación de nitrógeno en cámara de crecimiento. La determinación de la eficiencia simbiótica en invernáculo mostró que hubo interacción especie x rizobio cuando las plantas crecieron en los suelos Paysandú (alta fertilidad) y Rivera (baja fertilidad). La especie *D. illinoensis* en simbiosis con D67 (nativo) en el suelo Paysandú produjo valores de biomasa aérea 256% más altos que los controles sin inocular, mientras que *D. leptophyllus* con las cepas UMR 6029 y con ICB1 dieron valores 230% y 215% más altos que el control absoluto, respectivamente. Por otro lado, en el suelo Rivera, *D. virgatus* en

simbiosis con D67 (nativo) produjo valores de biomasa aérea de 450% más altos que el control. La producción de materia seca promedio de las especies de *Desmanthus* fue más alta en el suelo Paysandú que en el Rivera debido a diferencias en la fertilidad de los suelos. La especie *D. velutinus* fue la que mostró un menor potencial de crecimiento independientemente de la cepa de rizobio y del suelo.

Los resultados de este trabajo permiten concluir que existen poblaciones de rizobios capaces de nodular especies de *Desmanthus* en los suelos de las zonas estudiadas y que tienen diferencias marcadas en las características de nodulación y en la eficiencia en fijación de nitrógeno. Los resultados de las evaluaciones de las combinaciones rizobio-especie de *Desmanthus* realizadas ameritan a continuar el proceso en condiciones de campo, teniendo en cuenta que este género muestra potencial como forrajera para nuestro país.

## Introducción

---

### El nitrógeno y su importancia

---

El nitrógeno (N) es un elemento esencial para el desarrollo de los seres vivos, constituyendo compuestos como proteínas, ácidos nucleicos, clorofila y otros componentes celulares. Si bien es uno de los elementos más abundantes de la atmósfera terrestre, representando un 78%, no es accesible para la mayoría de los organismos ya que se encuentra en una forma muy estable de triple enlace (Tripathi, 2009).

El nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) solamente se incorpora a los sistemas biológicos cuando ha sido reducido por los organismos fijadores (diazótrofos) o combinado con ciertos elementos como el hidrógeno o el oxígeno en el proceso industrial Haber-Bosch, en forma de nitrato ( $NO_3^-$ ) o de amonio ( $NH_4^+$ ) (Galloway et al., 2004).

La fijación global de nitrógeno en el suelo se estima en unos 300 millones de toneladas (MT) al año. Por causas naturales como descargas eléctricas, erupciones volcánicas y radiaciones ultravioletas se fijan entre 3 y 10 MT. Mediante procesos de fijación industrial Haber-Bosch (dependiente de combustible fósil para el suministro de hidrógeno y energía) se fijan 100 MT, que son destinados principalmente a la producción de fertilizantes nitrogenados. Entre 100 y 300 MT son incorporados a través de la fijación biológica (Field, 2004; Galloway et al., 2004).

### Fertilizantes nitrogenados

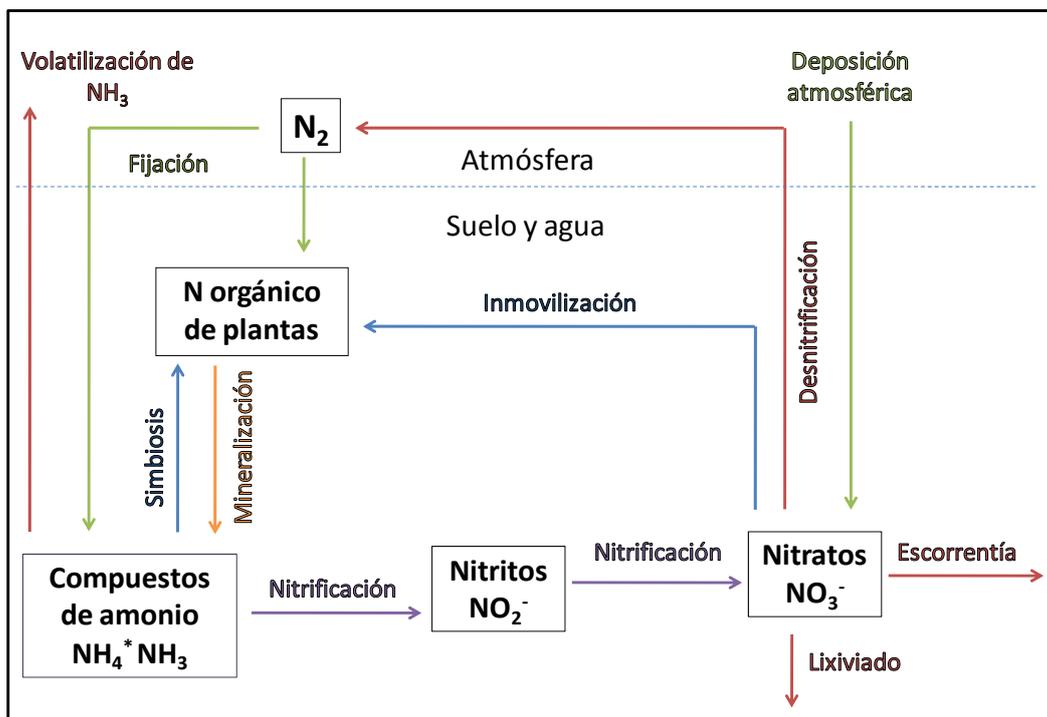
---

En los suelos, el nitrógeno es limitante para el desarrollo vegetal debido a que se acumula principalmente en formas orgánicas y que requiere ser mineralizado a forma  $NO_3^-$  y  $NH_4^+$  para ser absorbido por las plantas (Urzúa, 2005). Esto y el incremento actual de la agricultura, elevan los requerimientos de nitrógeno por los cultivos y explican la intensificación en su uso. Se estima que cada año su utilización se incrementa en 15 MT y la FAO prevé que la demanda mundial aumentará 4.8 MT para el período 2009-2010 (Crews y Peoples, 2004; FAO, Roma, 2005).

Por otro lado, el uso excesivo de fertilizantes nitrogenados incrementa los costos de producción en el sector agropecuario y conlleva efectos de contaminación ambiental. Este encarecimiento es el reflejo de los altos costos en el proceso de industrialización de los fertilizantes nitrogenados. En efecto se utiliza 1.5 kg de petróleo para fijar 1 kg de nitrógeno (Cárdenas-Navarro, et al. 2004). Así, la fijación biológica de nitrógeno cobra más valor dentro del contexto de la agricultura sostenible, ya que puede disminuir el uso excesivo de estos fertilizantes, con el consiguiente ahorro en el consumo de energía no renovable y la disminución de la degradación del medio ambiente (Dixon y Kahn 2004).

En nuestro país se sembraron 800 mil hectáreas de soja en el 2010, estimándose un rendimiento promedio de 2 T/há. Cada tonelada de soja fija 80 kg de N. Si esta cantidad de nitrógeno fuera aportada por fertilizantes nitrogenados en lugar de la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) serían necesarias 277 mil toneladas de urea. Esto se traduce en 170 millones de dólares de ahorro en divisas (INTA 2008; DEIA 2009; ELAGRO 2010).

Asimismo, el uso ineficiente (por exceso y momento de aplicación) de los fertilizantes nitrogenados implica riesgos de contaminación ambiental, fundamentalmente por lixiviación y escorrentía del nitrógeno de suelo no absorbido hacia los mantos freáticos subterráneos eutrofizando ríos y lagos (Figura 1) (Erisman et al., 2007; Foulkes et al., 2009).



**Figura 1.** Esquema del ciclo global del nitrógeno. Los cuadros indican las distintas formas de nitrógeno en el ambiente y las flechas el cambio de estas formas a través de los principales procesos: mineralización, inmovilización, nitrificación, desnitrificación y fijación (modificado de Tripathi, 2009).

## Fijación biológica de nitrógeno

La FBN consiste en la reducción del gas dinitrógeno ( $N_2$ ) hasta  $NH_4^+$  y es un proceso exclusivo de procariontas. Las bacterias y archaeas fijadoras de  $N_2$  se denominan diazótrofes y pueden encontrarse en vida libre, asociadas o en simbiosis con plantas. Representan una amplia variedad de tipos filogenéticos y fisiológicos ocupando nichos ecológicos muy diversos (De Felipe, 2006; Eldor, 2007).

La FBN conforma el 63.6% del total de nitrógeno fijado anualmente. La misma se descompone en 70 MT debida a diazótrofos en vida libre y 80 MT por asociaciones simbióticas, predominando el aporte de los cultivos de leguminosas herbáceas (como soja, tréboles y alfalfa) y de leguminosas arbóreas (De Felipe 2006; Olivares 2008).

La FBN es catalizada por el complejo enzimático nitrogenasa que lleva a cabo el proceso de reducción de  $N_2$ . La enzima consta de dos metaloproteínas, una hierroproteína (Fe-proteína) y una hierro-molibdeno proteína (MoFe-proteína). La MoFe-proteína contiene el sitio activo para la reducción del sustrato y se organiza como un heterotetrámero  $\alpha_2\beta_2$  de un peso molecular de 240 kDa. Consiste en 2 metaloclusters: el P-clúster (un clúster de [8Fe-7S]) y el cofactor FeMo (Mo:7Fe-9S:homocitrato) a nivel del cual ocurre la reducción del  $N_2$ . La Fe-proteína es un homodímero  $\alpha\alpha$  de 60 kDa que contiene un solo clúster 4Fe-4S y dos sitios de unión para MgATP y media el acoplamiento de la hidrólisis del ATP a la transferencia de electrones que serán donados al componente MoFe-proteína para producir la reducción del  $N_2$  (Dixon y Kahn 2004; Rees et al., 2005). La reacción estequiométrica general que lleva a cabo esta enzima es la siguiente:



La FBN requiere un aporte considerable de ATP (al menos 16 moles de ATP por cada mol de  $N_2$  fijado) que debe ser generado por fosforilación oxidativa, exigiendo una gran demanda de oxígeno. A pesar de esto, el complejo nitrogenasa resulta inactivo en presencia de oxígeno, por lo que los diazótrofos han adquirido una variedad de estrategias fisiológicas y morfológicas para proteger a la enzima del  $O_2$  (Marchal y Vanderleyden, 2000; Soto-Urzuá y Bace, 2001).

Los sistemas fijadores de  $N_2$  son diversos y pueden alcanzar un alto grado de complejidad. Existen diazótrofos de vida libre y asociados en forma no simbiótica o en simbiosis con plantas. Dentro de las asociaciones no simbióticas encontramos diazótrofos interactuando en la rizósfera o en el interior de la raíz, tallo y hojas de las plantas (endófitos). Estos microorganismos se ven favorecidos por un microambiente con baja presión de oxígeno y alta disponibilidad de nutrientes carbonados, brindando a cambio nitrógeno fijado como  $NH_3$  rápidamente asimilado por la planta. Por otro lado, las asociaciones simbióticas incluyen: 1. cianobacterias que ocupan lugares estratégicos de hepáticas, helechos, cícadadas y dicotiledóneas; 2. actinomicetes, como *Frankia*, que forma nódulos con muchos géneros de plantas no leguminosas; y 3. los rizobios que forman nódulos en leguminosas. Estas últimas son consideradas las más eficientes en cuanto a la fijación de  $N_2$  ya que aportan la mayor proporción del nitrógeno fijado a la planta (Baca et al., 2000, Lloret y Martínez-Romero, 2005) y se la denomina fijación simbiótica de nitrógeno (FSN).

La disponibilidad directa del  $N_2$  fijado a la planta hace a la FSN un importante aporte de nitrógeno a los suelos agrícolas, contribuyendo de manera fundamental a la producción de alimentos para el hombre y animales y a la economía de fertilizantes nitrogenados. También mejora la fertilidad del suelo y su ecología, minimizando las pérdidas por volatilización, desnitrificación y lixiviación (Graham 2000).

### Fijación simbiótica de nitrógeno: leguminosa-rizobio

---

El proceso más importante de fijación de  $N_2$  en la agricultura es la asociación simbiótica entre leguminosas y bacterias del suelo. Se estima que esta asociación fija en el orden de 20 a 22 MT de N cada año (Herridge et al. 2008).

Las bacterias del suelo implicadas en esta asociación simbiótica pertenecen a la subdivisión  $\alpha$ -proteobacteria y en menor medida a las  $\beta$ -proteobacterias y  $\gamma$ -proteobacterias. En la subdivisión  $\alpha$ -proteobacteria se distingue la familia *Rhizobiaceae* y se agrupan siete géneros: *Devosia*, *Azorhizobium*, *Methylobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* y *Rhizobium* denominados colectivamente como rizobios. Los cuatro últimos cuentan con el mayor número de especies y se han descrito 51 especies (Lloret y Martínez-Romero, 2005). También se han encontrado bacterias fuera de las *Rhizobiaceae* capaces de inducir nódulos en leguminosas, como es el caso de las  $\beta$ -proteobacterias: *Burkholderia tuberum*, *B. phymatum* y *Ralstonia taiwanensis* (Chen et al., 2003; Benhizia et al., 2004).

Los rizobios son bacilos Gram negativos, heterótrofos, aerobios, no esporulados, que inducen en las leguminosas la formación de un nódulo radical (o en ocasiones en tallo). Dentro del nódulo los rizobios diferenciados en bacteroides reducen el  $N_2$  a  $NH_4^+$ . El  $NH_4^+$  queda disponible para ser asimilado por la planta, la cual brinda compuestos carbonados y otros nutrientes a la bacteria (Graham, 1999; Bécquer et al., 2000; Martínez et al., 2005; Espinoza et al., 2007).

La mayoría de las especies de la familia *Leguminosae* forman esta asociación, y es especialmente frecuente en las subfamilias *Papilionoideae* y *Mimosoideae* y escasa en *Cesalpinoideae*. Esta familia comprende 750 géneros y 19000 especies, algunas de ellas de gran importancia por el aporte de proteínas en sus granos para el consumo humano, forraje para el ganado y como especies agroforestales. Las leguminosas de grano y forrajeras representan el 27% de la producción mundial de cultivos. Asimismo, se ha estimado que las leguminosas de grano constituyen el 33% del nitrógeno incorporado a la dieta humana (Graham, 2003).

Además de la importancia de las leguminosas en el consumo humano, el nitrógeno aportado por esta asociación simbiótica es esencial para el crecimiento de las plantas y para las gramíneas asociadas a leguminosas en las praderas. Se ha observado que el cultivo de leguminosas puede dejar nitrógeno disponible en el suelo para los microorganismos, aumentando su actividad y el reciclaje de nutrientes. La eficiencia de la utilización del nitrógeno fijado por la leguminosa está muchas veces cercana al 100%, en comparación a sólo 50-60% con los fertilizantes nitrogenados aplicados al suelo. Por lo tanto la utilización de leguminosas en la agricultura, inoculadas con sus respectivos rizobios, representa una alternativa valiosa para el rendimiento de los cultivos y para proteger al medio ambiente al no ser contaminante (Giller, 2001; Urzúa, 2005).

### Especificidad de la interacción rizobio-leguminosa

---

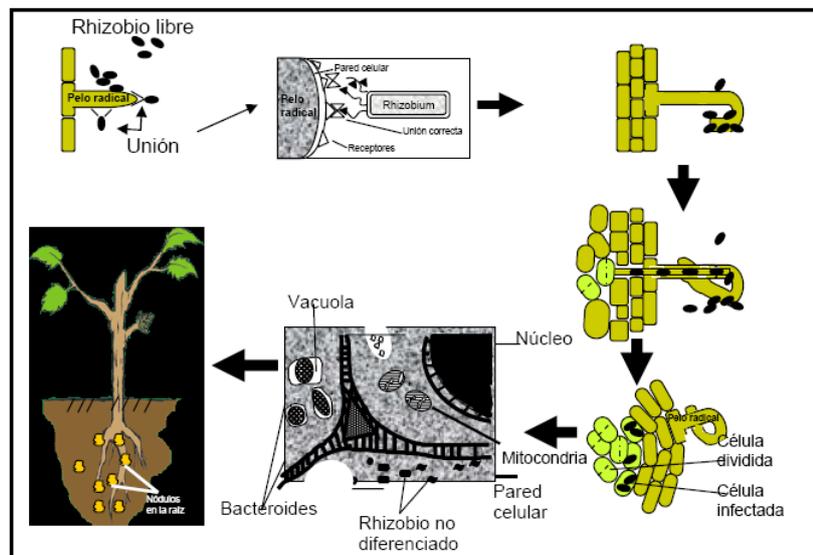
Para establecer una relación simbiótica, la planta hospedera y los rizobios deben intercambiar sucesivas señales moleculares con un alto grado de especificidad (Schultze y Kondorosi, 1998). No obstante, el grado de especificidad varía ampliamente entre los diferentes rizobios. Así algunas cepas tienen un rango de hospedero muy reducido, como por ejemplo *R. leguminosarum* bv *trifolii* que sólo fija nitrógeno en especies de *Trifolium* o *Azorhizobium caulinodans* que sólo nodula *Sesbania rostrata*, y en el extremo opuesto se encuentra la cepa *Sinorhizobium* sp. NGR234 que nodula 232 de 452 leguminosas probadas, incluyendo la no-leguminosa *Parasponia* (Denarie et al., 1996; Lloret y Martínez-Romero, 2005).

Las leguminosas también muestran una alta variabilidad en la interacción con su microsimbionte. La subfamilia *Papilionoideae* contiene a las especies más promiscuas de leguminosas dentro de la tribu *Phaseolae* que incluye a *Vigna unguiculata*, *Phaseolus vulgaris*, *Lablab purpureus* y *Macroptilium atropurpureum*. La subfamilia *Mimosoideae* también contiene especies promiscuas como el género *Acacia*. Por el contrario las leguminosas *Galega officinalis* y *G. orientalis* son noduladas únicamente por *Rhizobium galegae* y *Medicago* sp. por *Sinorhizobium meliloti* (Graham, 1999; Lloret y Martínez-Romero, 2005; Espinoza et al., 2007).

La especificidad es lo que determina la formación de una simbiosis efectiva en términos de fijación biológica de nitrógeno. Existen grandes variaciones entre los rizobios en su capacidad de FSN. También existen cepas de rizobios que fijan muy poco o no tienen capacidad de FSN, las que se califican como inefectivas (Espinoza et al., 2007).

## El proceso de nodulación

El proceso de infección y desarrollo de nódulos radicales entre los rizobios y las leguminosas involucra varias etapas: 1. el reconocimiento de la combinación adecuada planta-bacteria, 2. adherencia de la bacteria a los pelos radicales, 3. curvatura e invasión de los pelos radicales, 4. formación de un canal de infección y desplazamiento de las bacterias hacia la raíz principal, 5. proliferación celular y formación del nódulo maduro, 6. diferenciación de las bacterias en bacteroides en el simbiosoma y su funcionamiento dentro del nódulo (Figura 2).



**Figura 2.** Etapas de infección y desarrollo del nódulo en la simbiosis rizobio-leguminosa, extraído de (Espinoza et al., 2007).

1. Al inicio de la simbiosis el rizobio debe reconocer y responder a la presencia de las raíces de la planta hospedera. El rizobio se multiplica en la rizósfera y censa compuestos exudados de la planta como los flavonoides y responde induciendo genes involucrados en la nodulación, denominados Factores Nod (Masson-Boivin et al., 2009).

2. Estudios sobre la adherencia de los rizobios a los pelos radicales sugieren que ocurre en dos etapas. En la primera ocurre una unión débil dependiente de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) mediado por una proteína específica de adherencia, la ricadesina, que se piensa está presente en la mayoría de los rizobios. La ricadesina actúa captando complejos de calcio en la superficie de los pelos radicales. En una segunda etapa se da una unión estrecha mediada por la síntesis bacteriana de fibrillas de celulosa, requeridas por *R. leguminosarum* para formar biofilms en los pelos radicales (Miklashevichs et al., 2001; Gage, 2004). Otras sustancias como las lectinas, secretadas en los pelos radicales, también cumplen una función en la adherencia específica planta-bacteria. Las lectinas colaboran en la especificidad de la

interacción a través de unir simultáneamente la pared de las células de la planta y los polisacáridos de la superficie de la bacteria compatible (Díaz et al., 1989; Hirsch, 1999; Gage, 2004).

3. Una unión exitosa provoca cambios morfológicos visibles en la planta, producidos por la acción de los factores Nod (FNs). Los FNs inician varios de los cambios de desarrollo vistos en la planta hospedera en etapas tempranas del proceso de nodulación, incluyendo deformación del pelo radical, despolarización de la membrana de las células epidérmicas, oscilaciones de calcio intracelular y la iniciación de la división celular en el cortex radical, que forma un meristema y un primordio nodular (Laeremans y Vanderleyden, 1998; Schultze y Kondorosi, 1998; Miklashevichs et al., 2001). Los pelos radicales responden a los NFs con una rápida y transitoria despolarización de la membrana, con un influjo intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  y un eflujo de cloro y potasio. Estos cambios en el  $\text{Ca}^{2+}$  producen deformación de la pared celular del pelo y el reinicio del crecimiento apical en diferentes direcciones, induciendo la curvatura del pelo radical. Éste es el punto de ingreso de los rizobios al tejido vegetal y donde se producirá la formación del canal de infección (Figura 2). Se sugieren dos vías de entrada, en una la entrada comienza con la invaginación de la pared celular del pelo radical, y en la otra se establece una nueva pared celular debido a que la bacteria degrada la pared en el sitio de infección. Esta última se basa en que los rizobios tienen enzimas capaces de degradar celulosa y otros polisacáridos de la pared celular de la planta (Geurts y Bisseling, 2002; Brewin, 2004; Gage, 2004). Las otras moléculas de importancia en el proceso de nodulación son los carbohidratos de superficie presentes en los rizobios. Éstos incluyen exopolisacáridos (EPS), lipopolisacáridos (LPS) y  $\beta$ -glucanos y participan del acercamiento, penetración e invasión de los pelos radicales (Laeremans y Vanderleyden, 1998). Mutantes defectivos en la síntesis de alguno de estos carbohidratos son incapaces de infectar la planta hospedera y de formar nódulos fijadores de nitrógeno efectivos (Mithofer, 2002; Fraysse et al., 2003).

4. El ingreso de los rizobios a los pelos radicales inducen la formación por parte de la planta de un tubo de composición similar a su pared celular conocido como canal de infección, el cual crece hacia el interior del pelo. Los rizobios dentro del canal crecen y se dividen, por lo que éste queda lleno de bacterias. El canal se ramifica a medida que crece hacia el interior del nódulo en desarrollo. Una vez que el canal de infección penetra la pared de las células epidérmicas, las bacterias se vierten al espacio intracelular (Schultze y Kondorosi, 1998).

5. Además del efecto directo de los NFs en los pelos radicales, éstos también inducen la reactivación del ciclo celular en la corteza y el periciclo de las raíces de la leguminosa compatible (Figura 2). La activación del ciclo celular se extiende a través del cortex interno hasta formar el meristema nodular

y el nódulo maduro. Las bacterias se liberan desde el canal de infección por endocitosis al citoplasma de las células vegetales en división (Gage, 2004).

6. En el interior celular los rizobios quedan separados del citoplasma por una membrana derivada de la planta hospedadora, la membrana peribacteroidal. Estos quedan rodeados individualmente o en pequeños grupos por la membrana peribacteroidal que engloba a uno o más bacteroides, constituyendo el simbiosoma (Figura 2). En esta etapa los rizobios se transforman en los bacteroides que adquieren la capacidad de fijar nitrógeno. Los bacteroides en varias leguminosas hospedadoras (ej. Arveja) se dividen dentro del simbiosoma y la membrana peribacteroidal se divide concomitantemente. En otras leguminosas (ej. *Phaseolus vulagris* y *Glycine max*), los bacteroides se acumulan en grupos de 8 a 12 dentro del simbiosoma como resultado de la fusión de simbiosomas y de la continua división de los bacteroides (Brewin, 2004).

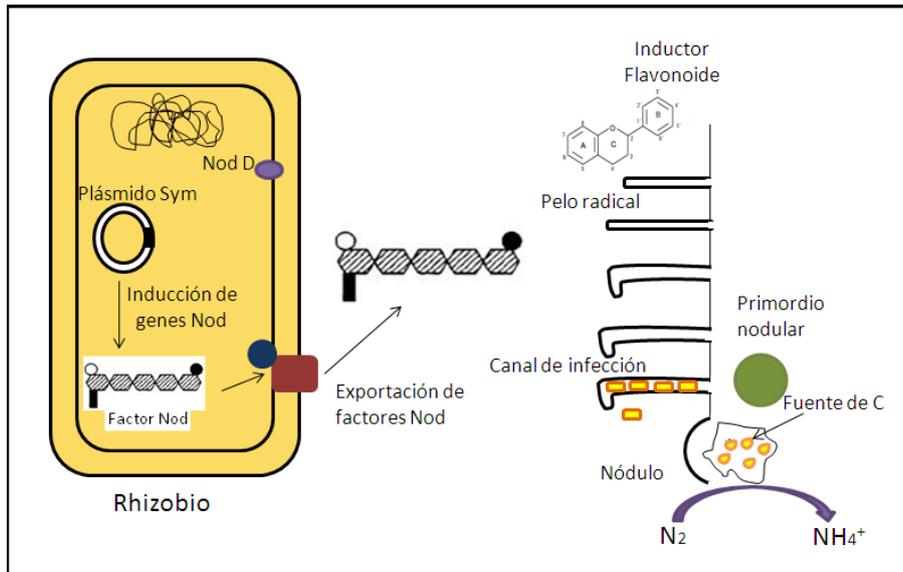
Dependiendo de la leguminosa se pueden distinguir dos tipos de nódulos, los determinados y los indeterminados. Los nódulos indeterminados mantienen un meristema persistente y continúan creciendo durante todo su ciclo de vida, resultando en un gradiente de estados: una zona de diferenciación de bacteroides, una zona madura de fijación de N<sub>2</sub> y una zona de senescencia. Éste tipo de nódulo presenta forma alargada y dependiendo de la leguminosa pueden ser bifurcados o no. Por otro lado, los nódulos determinados no mantienen un meristema activo, tienen forma esférica y una etapa de senescencia definida (Frayse et al., 2003; Krishnan y Bennett, 2006).

### Bases moleculares de la especificidad rizobio-leguminosa

---

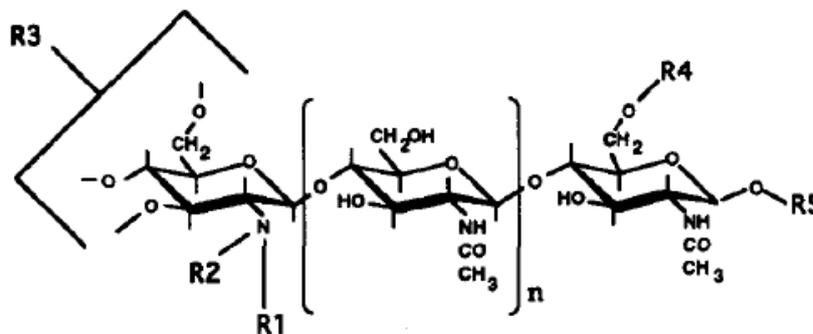
Como se mencionó, la asociación rizobio-leguminosa involucra fenómenos bioquímicos y de reconocimiento altamente específicos junto con una expresión génica y una diferenciación celular coordinada de ambos simbiosomas (Barrera-Necha, 1996).

Las leguminosas excretan metabolitos secundarios hacia la rizósfera, los flavonoides, betaínas y chalconas son los más importantes en esta interacción, y actúan como señales inductoras de los genes de nodulación (genes *nod*) mediante el activador transcripcional Nod D en los rizobios. El gen *nodD* se expresa constitutivamente y la proteína Nod D tiene la capacidad de reconocer los flavonoides específicos secretados por la planta. Este es el primer nivel de especificidad en la interacción (Figura 3). Los genes *nod* producen entonces una señal de retorno, los lipoquitinolisacáridos, comúnmente llamados Factores Nod (FNs), que provocan cambios en el desarrollo radical de la leguminosa y constituyen el segundo nivel de especificidad del hospedero (Figura 3), (Denarie et al., 1996; Laeremans y Vanderleyden, 1998; Schultze y Kondorosi, 1998; Gage, 2004).



**Figura 3.** Comunicación molecular en la simbiosis rizobio-leguminosa, extraído y modificado de (Laeremans y Vanderleyden, 1998).

Los FNs tienen una estructura básica común que consiste en un oligómero de *N*-acetil-D glucosamina con un enlace  $\beta$  1  $\rightarrow$  4 que lleva unido un ácido graso al nitrógeno del extremo no reductor. Varias sustituciones, particularmente en los extremos reducido y no reducido del esqueleto oligosacárido, confieren la especificidad en la interacción (Figura 4) (Brewin, 2004).



**Figura 4.** Estructura de los Factores Nod. Los grupos R1-R5 representan las sustituciones en los extremos reducido y no reducido del esqueleto oligosacárido, extraído de (Denarie et al., 1996).

La información genética requerida para la simbiosis tiene una distribución que varía mucho entre la diversidad de rizobios. En algunos casos los genes simbióticos se encuentran en clusters, en otros casos se encuentran dispersos. Los genes *nod* se distribuyen en plásmidos (denominado Sym) y pueden transferirse con alta frecuencia por conjugación, o se encuentran dispersos entre varios cromosomas y plásmidos. También se vio una transferencia de islas simbióticas en *Mesorhizobium loti* (Long, 2001).

Los genes estructurales necesarios para la biosíntesis de NFs están subdivididos en *nod* ABCIJ encontrados en todas las cepas de rizobio capaces de nodular, y los genes de nodulación específicos del hospedero que son los determinantes de especificidad (Laeremans y Vanderleyden, 1998). La biosíntesis del esqueleto oligosacárido del factor Nod es catalizada por los productos enzimáticos de los genes *nodA*, *nodB* y *nodC*. Su inactivación resulta en la pérdida de la habilidad de obtener cualquier respuesta detectable por parte de la planta hospedera. NodC es una  $\beta(1,4)$  N-acetil-D-glucosaminil transferasa y está involucrado en el control del largo del esqueleto oligosacárido, siendo probable que el gen *nodC* sea determinante del rango de hospedero. Nod B es una deacetilasa que elimina el grupo acetilo del extremo no reductor y Nod A transfiere el ácido graso a esta posición. El gen *nodA* es un determinante de especificidad de la simbiosis ya que puede N-acetilar por varios ácidos grasos en forma especie específica (Denarie et al., 1996; Schultze y Kondorosi, 1998). Los otros genes hallados en todos los rizobios (*nod* IJ) son responsables de la exportación de los FNs (Laeremans y Vanderleyden, 1998).

Existen muchos otros genes *nod* presentes en varias combinaciones en diferentes especies de rizobios, involucrados en la modificación específica de la estructura básica del factor Nod. Mutaciones en estos genes *nod* especie específicos resultan en la alteración del rango de hospedero. Son variados los estudios que sustentan esta información, por ejemplo es bien documentado en *Rhizobium leguminosarum* el rol del gen *nodE* en el control del rango de hospedador y en la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados de varios largos de cadena y el grado de insaturación. También lo es el rol de *nodX* que especifica la síntesis de un NF O-acetilado y la habilidad de nodular nuevos cultivares de arveja. En *Bradyrhizobium japonicum* mutantes en el gen *nodZ* producen FNs sin el residuo metil fucosa y tienen una nodulación defectiva en siratro. La introducción de los genes *nodS* o *nodU* en *Rhizobium fredii* extiende el rango de hospedero a *Leucaena* (Denarie et al., 1996; Schultze y Kondorosi, 1998).

Otra instancia de comunicación molecular entre el rizobio y la leguminosa ocurre a nivel del nódulo, donde los bacteroides fijan nitrógeno a través de la enzima nitrogenasa. Los genes de fijación de nitrógeno llamados genes *nif* presentes en todos los rizobios, codifican la enzima nitrogenasa. El gen *nifH* codifica el componente hierro proteína y la proteína hierro-molibdeno es codificada por los genes *nifD* y *nifK* (Rees et al., 2005; Olivares, 2006). Esta enzima es activa en un ambiente particular ya que es sensible a varios factores (oxígeno, nitrato, etc.), para ello deben ocurrir cambios específicos en el interior del simbiosoma adaptados a los requerimientos de la misma. Los responsables de estos cambios son unas proteínas producidas en el nódulo por la planta, las nodulinas. Entre ellas, la leghemoglobina tiene la función de aportar O<sub>2</sub> a los bacteroides y de

mantener bajos los niveles de O<sub>2</sub> para la nitrogenasa. La leghemoglobina se localiza en el citosol de las células de la planta infectada por bacteroides y es la que da el típico color rosado de los nódulos funcionales (Long, 2001; Olivares, 2003).

## Importancia de las leguminosas en Uruguay

---

En el país las leguminosas presentan gran potencial de uso, como alimento humano y animal, en especies de grano, forrajeras y árboles en los montes nativos y en asociaciones silvopastoriles (Frioni, 2006).

Las pasturas mejoradas, integradas por leguminosas forrajeras, han sido y son una parte importante en la producción ganadera de Uruguay. Las praderas artificiales han tenido un incremento sostenido en el transcurso de cinco décadas en Uruguay, pasando de 17.000 has en 1950 a 1.287.000 en el 2003, lo que representa 7% de área pastoril total (DIEA, 2004).

No obstante que el porcentaje de suelo que se destina a la ganadería continúa siendo muy elevado (90%), el crecimiento de la forestación en décadas recientes ha sido significativo. La actividad forestal, está siendo impulsada por una definida Política Forestal de Estado que favorece la implantación de bosques artificiales. En el año 1989 existían aproximadamente 50.000 ha forestadas superando en el año 2009 las 800.000 ha de bosques en producción (Pou, 2009). Más recientemente, se ha observado un interés en la incorporación de un sistema silvopastoril en los predios medianos y pequeños de los productores forestales con el objetivo de evitar el monocultivo. En el sistema coexisten especies forestales leñosas con pasturas y ganado en una misma unidad productiva, produciendo forraje, productos pecuarios y forestales. Estos sistemas diversifican la producción, aportan beneficios a nivel productivo, económico, ecológico y social (Polla, 1998; Polla, 1999).

El análisis y difusión de estas experiencias silvopastoriles recién ha comenzado y aún no hay suficientes datos científicos (aunque sí empíricos) que validen estos sistemas. Existen experiencias de empresas forestales de silvopastoreo con ovinos en los departamentos de Paysandú, Río Negro, Maldonado y Cerro Largo, tanto en plantaciones de *Eucalyptus* como *Pinus*, asociados a cultivos de leguminosas y gramíneas. Sin embargo la información disponible es muy escasa y es necesario establecer un programa de investigación que aporte información sobre cuáles especies forrajeras utilizar, contemplando aspectos técnicos-productivos, ecológicos, económicos y sociales, proponiendo un manejo integrado y sustentable de los sistemas silvopastoriles (Polla, 1997; Polla, 1998; Polla, 1999).

## El género *Desmanthus*

---

El género *Desmanthus* pertenece a la familia *Leguminosae* y a la subfamilia *Mimosoideae*. Se incluye en el grupo *Dichrostachys* junto con otros 3 géneros caracterizados por tener flores estériles en la base de la inflorescencia. Cuenta con 25 especies en su mayoría herbáceas perennes y sufrútices que muestran una enorme plasticidad, cuyo origen se extiende desde el centro-norte de Estados Unidos, a través de México donde presenta su máxima diversidad, hasta el sur de Brasil, Argentina y Uruguay (Luckow, 1993), donde prosperan en matorrales o campos quebrados de afloramientos rocosos, arenosos y relativamente húmedos (Izaguirre y Beyhaut, 2003). En Uruguay, tres especies del género *Desmanthus* crecen de manera silvestre: *D. depressus*, *D. virgatus* y *D. tatuhyensis* (Izaguirre y Beyhaut, 2003).

*Desmanthus* spp. tiene una distribución natural en climas tropicales y templados. La composición edáfica adecuada para este género va desde arenoso a arcilloso (Skerman, 1977) con un pH de 5-7. Además el género se caracteriza por ser resistente a periodos prolongados de sequía (Adjei y Pitman, 1993).

Existe gran polimorfismo intra e interespecífico del género constituyendo un factor muy importante en la búsqueda de líneas de alta producción forrajera. Las especies herbáceas pueden ser erectas o postradas, las formas postradas usualmente presentan mayor ramificación. Muchas especies son bastante plásticas y manifiestan un amplio rango de variabilidad en caracteres como la altura y grado de ramificación. El pastoreo intensivo o un ambiente desfavorable pueden conducir a formas postradas y muy ramificadas. Por otro lado, la humedad abundante y la sombra pueden llevar a formas erectas, muy poco ramificadas (Luckow, 1993).

Los *Desmanthus* pueden ser glabros o pubescentes. La mayoría de las especies tienen una raíz principal profunda de forma cilíndrica y leñosa. Las estípulas son setiformes y auriculadas hacia la base. Las hojas de *Desmanthus* son alternas, bipinnadas y paripinnadas. La base de los pecíolos, pinnas y foliolos tienen pulvinos bien desarrollados y las hojas son nictinásticas pero no sensibles al tacto. El raquis posee una glándula por debajo o entre el primer par de pinnas y ocasionalmente entre el segundo par y su morfología puede variar entre especies (Luckow, 1993).

La inflorescencia puede ser cabezuelas o espigas densas, axilares. Contiene 3 tipos de flores: estériles en la base, luego masculinas y flores hermafroditas en el ápice. Los frutos consisten en legumbres sésiles lineares o falcadas. Con pericarpo leñoso, coriáceo o raramente cartáceo. Presenta frutos dehiscentes (Luckow, 1993).

Las semillas generalmente son ovadas y dorsiventralmente achatadas. La testa varía desde marrón claro a casi negra y está marcada en ambos lados por un pleurograma en forma de u. Las semillas tienen endosperma y un embrión con una plúmula rudimentaria. La germinación es de tipo epigea y con cotiledones foliares. La tasa de germinación es usualmente alta y varía entre 53 y 100%. El problema mayor en la germinación ocurre cuando la testa falla en romperse y permanece unida a los cotiledones lo que trae como consecuencia que estos no se puedan desarrollar (Luckow, 1993).

El potencial agronómico de *Desmanthus* en términos de su adaptación al suelo y clima, producción de biomasa y calidad de forraje ha sido estudiado en varios países (Gardiner y De A Rangel, 1996; Pengelly, 2000; Gardiner et al., 2004; Ocumpaugh et al., 2004).

Aún cuando existen especies nativas en Uruguay, la información disponible sobre su nodulación con las poblaciones nativas de los suelos, su potencial de fijación de N<sub>2</sub> en condiciones naturales y su uso como cultivo forrajero o como especie asociada en cultivos forestales es muy escasa.

#### Uso de *Desmanthus* como forrajera

---

Numerosas especies de *Desmanthus* se han evaluado por su potencial forrajero en suelos arcillosos en regiones tropicales y subtropicales y varios cultivares de las especies *D. virgatus*, *D. pubescens*, *D. leptophyllus* y *D. illinoensis*, han sido incorporados en varios países (Date, 1991; Posler et al., 1993; Jones y Baron, 1998; Pengelly y Liu, 2001; Kanani et al., 2006; De A Rangel et al. 2009). Estudios en diversas especies de *Desmanthus* demuestran la adaptación de éste género a pastoreo intenso (Jones y Baron, 1998; Pengelly y Liu, 2001), al igual que su compatibilidad en la siembra con una diversidad de gramíneas y otras leguminosas forrajeras (Jones y Baron, 1998; Byun et al., 2004). Jones et al. (2000) encontraron valores de proteína cruda para la planta entera de entre 10.5 y 15.5%, el mismo parámetro en hojas tuvo un promedio de 22.4%. Los contenidos de fibra detergente neutra (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) fueron de 42% y 35% respectivamente. Según los mencionados autores, estos valores pueden considerarse representativos de las distintas especies dentro del género. De A Rangel y Gardiner (2009) reportaron el potencial benéfico de *Desmanthus* spp. como suplemento en la alimentación de ovinos y producción lanar en las pasturas Mitchell en Australia. En el norte de México destaca la importancia de *Desmanthus virgatus* para la ganadería extensiva, ya que es consumida por caprinos, bovinos y ovinos, así como por herbívoros silvestres (Benavides, 1989; Martínez, 1991; Jones et al., 2000).

## Fijación simbiótica de nitrógeno por *Desmanthus*

---

A pesar de haber sido poco estudiadas hasta el momento en términos de su fijación de N<sub>2</sub>, las especies de *Desmanthus* son aparentemente promiscuas en su capacidad de nodular, y más específicas con los rizobios que efectivamente fijan nitrógeno (Date, 1991). La especie más estudiada ha sido *D. virgatus*, de la cual existen cultivares comerciales (Allen y Allen, 1981). Esta especie noduló efectivamente con rizobios aislados de *Prosopis chilensis* y de *Leucaena leucocephala*, pero no formó nódulos o formó nódulos inefectivos con rizobios de *Mimosa púdica*. Además no formó nódulos con rizobios de *Glycine max* y de *Lupinus poluphyllus* (Allen y Allen, 1981). En un estudio sobre fijación de nitrógeno en *Desmanthus illinoensis*, Beyhaut et al. (2006) identificaron cepas con alta eficiencia en fijación de nitrógeno y determinaron que pertenecía a la especie *Rhizobium giardinii*.

Date (1991) estudió la respuesta de seis especies de *Desmanthus* a la inoculación con 17 aislamientos de rizobios, en su mayoría de crecimiento rápido, provenientes de *Leucaena* spp.. El autor observó que la eficiencia en fijación de nitrógeno fue similar para las distintas combinaciones planta/aislamiento. Bahnisch et al. (1998) en un experimento en macetas, determinaron la respuesta a la inoculación de *D. leptophyllus* con CB3126 (aislada de *Leucaena leucocephala*) en ocho suelos de Queensland. Los resultados mostraron que el peso seco aéreo de las plantas se incrementó en un 90% con relación a plantas no inoculadas en dos de los suelos. Las cepas nativas mostraron una efectividad de un 60% con relación a CB3126 y se obtuvo una respuesta significativa a la inoculación en cuatro de los ocho suelos estudiados. Esos resultados fueron confirmados por Brandon et al. (1998) en condiciones de campo. Las respuestas a la inoculación fueron entre el 34% y el 313%. Los autores enfatizan la necesidad de incluir a la inoculación con cepas efectivas como un componente de rutina en la siembra de esta especie.

La hipótesis de este trabajo es que existen poblaciones naturales de rizobios de suelos uruguayos eficientes en simbiosis con *Desmanthus* spp..

## Objetivo

---

El objetivo de este trabajo es evaluar la eficiencia simbiótica de las combinaciones especies de *Desmanthus* y cepas de rizobios colectados en diferentes zonas del país.

### *Objetivos específicos*

- Crear una colección de germoplasma de ecotipos de las especies de *Desmanthus* que existen en el país y de *Desmanthus* spp. provenientes del exterior, conjuntamente con una colección de rizobios nativos y de colección (cepas de referencia).
- Seleccionar las mejores combinaciones en la simbiosis *Desmanthus* spp. - *Rhizobium* spp. eficientes en fijación de nitrógeno.

## Materiales y métodos

### 1. Sitios de muestreo

Se extrajeron muestras de suelo (0-30 cm profundidad) para el aislamiento de rizobios nativos de 3 sitios donde crece en forma natural *Desmanthus* spp. (Tabla 1), (Figura 5).

- 1) Región Basalto de la Estación Experimental INIA-GLENCOE, 130 km de la ciudad de Tacuarembó, sobre ruta 26 al Oeste, Departamento de Paysandú (32°01'32"S, 57°00'39"W).
- 2) Región Arenisca en los Alrededores del vivero de la empresa forestal Colonvade S.A, Tres Cerros 1188, localidad de Tranqueras, Depto. de Rivera (31°14'19"S, 55°38'1.3"W).
- 3) Alrededores de la Estación Experimental San Antonio de la Facultad de Agronomía, Depto. de Salto, 31°21'25"S, 57°46'0.1"W.

**Tabla 1.** Sitios de colecta de muestras de suelo para el aislamiento de rizobios.

Código/sitio	Región	Suelo/manejo
1 - 5, 19	Basalto	Negro profundo (<0.5m), fertilización P y manejo
6 - 10, 20, 21	Basalto	Negro muy profundo (>0.5m), fertilización P y manejo
11 - 15, 18	Basalto	Zona en exclusión por 15 años, sin manejo
16	Arenisca	Bosque <i>Eucalyptus grandis</i> 1er. año
17		Estación Experimental San Antonio - Facultad de Agronomía



**Figura 5.** Mapa del Uruguay, representándose los sitios donde se realizaron muestreos de suelos: Estación Experimental INIA-GLENCOE (circulo rojo), vivero Colonvade S.A (circulo verde) y Estación Experimental San Antonio de la Facultad de Agronomía (circulo azul).

## 2. Material vegetal

Se obtuvieron 8 accesiones exóticas pertenecientes a las siguientes especies de *Desmanthus*: *D. velutinus*, *D. bicornutus*, *D. leptophyllus*, *D. pubescens*, *D. illinoensis* y *D. virgatus*, procedentes de instituciones y bancos de germoplasma de Estados Unidos (Tabla 2). También se colectaron plantas y semillas de ecotipos nativos, de sitios ubicados en la región de Basalto (INIA-GLENCOE). Estos materiales fueron identificados como *Desmanthus depressus* y *Desmanthus virgatus* (L.) Willd. var. *virgatus* por la Cátedra de Botánica de la Facultad de Agronomía (Tabla 2).

**Tabla 2.** Lista de especies de *Desmanthus* obtenidas del exterior y colectadas en Uruguay.

Código	Especie/accesión	Fuente
1	<i>Desmanthus velutinus</i> "Hondo"	Turner Seed Co., Breckenridge, Texas
2	<i>D. bicornutus</i> "BeeWild"	Texas A & M. Agri Research Station, Beeville, Texas
3	<i>D. leptophyllus</i> "Bayamo"	Texas A & M. Agri Research Station, Beeville, Texas
4	<i>D. pubescens</i> "Uman"	Texas A & M. Agri Research Station, Beeville, Texas
5	<i>D. virgatus</i> "Marc"	Shuster Farms, San Juan, Texas
11	<i>D. illinoensis</i> PNL 534 "IBF1"	Perennial native legume collection, U of Minnesota
12	<i>D. illinoensis</i> LI 1011 "IBF2"	The Land Institute Collection, Kansas
13	<i>D. illinoensis</i> LI 1094 "IBF3"	The Land Institute Collection, Kansas
14	<i>D. virgatus</i>	Estación experimental INIA-Glencoe, Paysandú
15	<i>D. depressus</i>	Estación experimental INIA-Glencoe, Paysandú

### 2.1. Escarificación, desinfección y germinación de las semillas

Dada la dificultad que presenta la germinación de las semillas de *Desmanthus* se evaluaron diferentes procesos de escarificación buscando alto % de germinación y viabilidad de las mismas. Se aplicaron dos metodologías: 1) escarificación con papel lija y 2) escarificación con ácido sulfúrico al 96% por 2 y 5 minutos. Las especies importadas *Desmanthus leptophyllus* y *D. pubescens* venían escarificadas. Las semillas de la especie *D. depressus* no respondieron a los métodos de escarificación utilizados, por lo que se adoptaron otros métodos de escarificación (Anexo 1). Las semillas escarificadas con papel lija se desinfectaron en etanol 95% durante 3 segundos, 3 minutos de inmersión en hipoclorito 4% (v/v) y 6 lavados con agua destilada estéril. El tratamiento con ácido sulfúrico fue utilizado tanto como agente escarificante como desinfectante y se lavaron 10 veces con agua destilada estéril. Finalmente se hidrataron en agua destilada estéril por 4 horas y se pasaron a placas de Petri con agar agua (20 g/l de agar) o en recipientes con arena estéril. Para favorecer la germinación se incubaron a 28°C por 24 horas (Somasegaran y Hoben, 1994).

### 3. Obtención de cepas de rizobios

Los cultivos de rizobios para *Desmanthus* spp. se obtuvieron de colecciones extranjeras (Tabla ) y de aislamientos de suelos colectados en los sitios de muestreo (item 1) cuya vegetación incluye a *Desmanthus* spp.; no fue posible extraer plantas noduladas directamente del campo, aunque se intentó.

De colecciones extranjeras, se obtuvo la cepa recomendada en Estados Unidos para *D. illinoensis*. A su vez, se recibieron también de E.U. inoculantes comerciales para *D. bicornutus* y *D. virgatus* formulados en turba estéril (Tabla 3). Se procedió inoculando cada uno de ellos en sus respectivos hospederos, de forma de obtener nódulos y de ellos aislar las cepas. Este procedimiento se realizó en germinadores de plástico, previamente desinfectados con hipoclorito de sodio. Como soporte se usó una mezcla de turba y arena estériles (autoclave, 121°C, 1 h) y se sembraron 1-2 semillas previamente escarificadas, desinfectadas y germinadas (ítem 2.1). Luego de 3 días las plántulas de *D. bicornutus* y *D. virgatus* se inocularon (10 ml) con una suspensión de 5g de inoculante de cada cepa en 100 ml de agua destilada estéril. Las plantas se incubaron en cámara de crecimiento bajo condiciones controladas de temperatura (28°C) y luz (fotoperíodo de 13 horas luz y 11 horas oscuridad) y se regaron con agua corriente cada 3 días. A los 30 días de la siembra se extrajeron las plantas y se colectaron los nódulos de cada raíz, procediendo luego a realizar los aislamientos de rizobios (ver descripción más adelante).

**Tabla 3.** Origen de la cepa extranjera y de los inoculantes (E.U) utilizados para aislar cepas de rizobio.

Código	Huésped	Fuente
UMR6029	<i>Desmanthus illinoensis</i>	Rhizobium Research Laboratory. University of Minnesota
ICB*	<i>D. bicornutus</i>	Texas. A&M. Agricultural Research Station, Beeville, Texas
ICV*	<i>D. virgatus</i>	Shuster Farms, San Juan, Texas

\*Inoculante comercial

En el aislamiento de rizobios de suelos se utilizaron plantas trampa en sistemas de Magentas en condiciones axénicas (Figura 6 y 7), siguiendo la metodología descrita por Bernal y Graham (2001) con modificaciones.

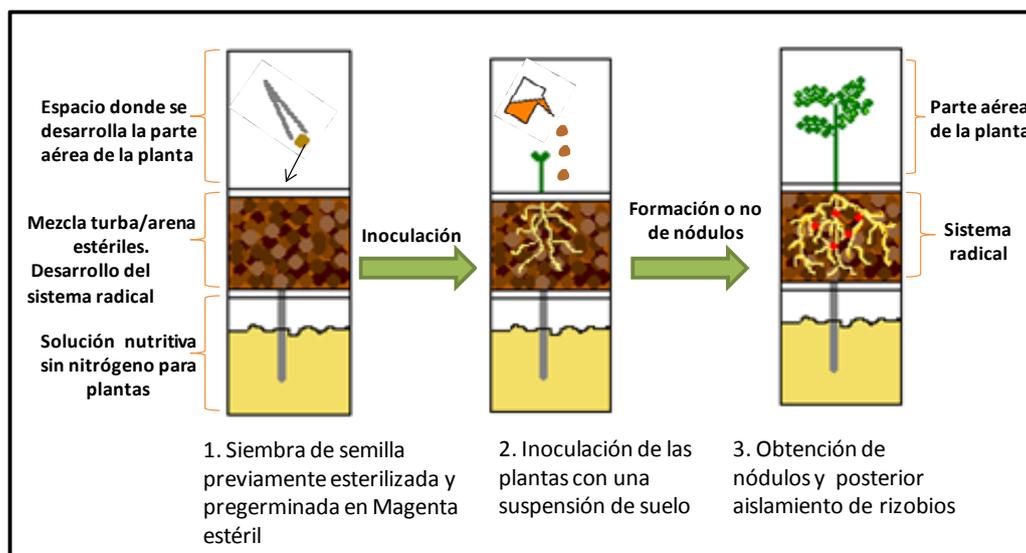
Se prepararon unidades Magenta, utilizando como soporte una mezcla de arena/turba (3:1 v/v), la arena de río previamente lavada. En el recipiente inferior se colocaron 250 ml de solución nutritiva Fahraeus sin nitrógeno (N) (Fahraeus, 1957) (anexo 2). Luego de la esterilización de los sistemas (autoclave, 121°C, 1h) y de que las semillas fueran previamente escarificadas, desinfectadas y germinadas, se sembraron dos especies en cada Magenta, cada una por duplicado: *D. illinoensis* con *D. pubescens*, *D. bicornutus* con *D. leptophyllus* y *D. virgatus* "Marc" con *D. velutinus*.

Los inóculos se prepararon con 1 g de suelo en 10 ml de solución salina (Sambrook et al., 1989) (PBS, anexo 2) de los sitios 1, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 13, 15 y 16 (tamizados previamente en una malla de 5mm x 5mm). La inoculación de las plántulas se realizó con 2 ml por Magenta. Se utilizaron plántulas control (sin inocular) a las que se les añadió 2 ml de buffer fosfato salino (PBS). Las plantas se incubaron en cámara de crecimiento bajo condiciones controladas de luz y temperatura (como se describió anteriormente) y se cosecharon 54 días después de la siembra. Las raíces se lavaron cuidadosamente y se determinó la presencia de nódulos, en cuyo caso fueron extraídos para realizar los aislamientos de rizobios.

Se obtuvieron muy pocos nódulos, por lo que se repitió el ensayo siguiendo la misma metodología pero introduciendo modificaciones. Las Magentas se prepararon solo con arena estéril y se sembraron 2 especies en cada una, sustituyendo *D. illinoensis* por *D. depressus*. Para inocular se mezclaron 20 g de cada suelo con la arena estéril de la Magenta. Los suelos utilizados fueron de los sitios 1, 5, 6, 9, 13, 17, 18, 19, 20 y 21. Luego de la siembra, se regó el recipiente superior de cada Magenta con 20 ml de agua destilada estéril para favorecer la germinación de las semillas. Las plantas se cosecharon 47 días después de la siembra.



**Figura 6.** Unidades Magenta utilizadas en el aislamiento de rizobios a partir de suelos donde crece naturalmente *Desmanthus* spp..



**Figura 7.** Esquema de composición de las unidades Magentas y descripción de la estrategia utilizada (planta trampa) para la obtención de rizobios de suelo.

### 3.1. Aislamiento de rizobios de nódulos

Se utilizó un nódulo por planta inoculada para aislar los rizobios de este y formar una colección de trabajo. Se esterilizaron superficialmente por lavado con etanol 95% por 30 segundos, 2 minutos de inmersión en hipoclorito 3% (v/v) y 10 lavados con agua destilada estéril (Somasegaran y Hoben, 1994). Cada nódulo se aplastó asepticamente entre dos portaobjetos estériles y el jugo obtenido se sembró en estrías en placas de medio extracto de levadura-manitol-agar (EMA) con rojo congo (Vincent, 1970) (anexo 2). Las placas se incubaron a 28°C de 3 a 5 días. Las colonias aisladas de cada cultivo se repicaron en medio EMA hasta obtener cultivos puros de rizobios. Las colonias (provenientes de cada nódulo) se caracterizaron fenotípicamente en medio sólido EMA con rojo congo y se conservaron en tubos de agar inclinado en el mismo medio a 4°C para proceder a su autenticación en el hospedero del cual se aisló. Los aislamientos finalmente fueron conservados en glicerol 25% a -80°C (Sambrook et al., 1989).

## 4. Amplitud de hospedero

A 36 de los aislamientos de rizobios nativos obtenidos de *D. illinoensis* y *D. depressus*, se les determinó su capacidad de nodular a otras especies de *Desmanthus* en ensayos en tubos (Figura 8).

Dos semillas pregerminadas de las especies *D. leptophyllus*, *D. pubescens*, *D. velutinus*, *D. bicornutus* y *D. virgatus* "Marc" se sembraron en tubos para plantas (20 x 2.5 cm) con 20 ml de medio Fahraeus sólido sin nitrógeno (Anexo 2). El ensayo incluyó 36 aislamientos de rizobios nativos, el aislamiento ICB1 (obtenido del inoculante comercial de Estados Unidos) y la cepa UMR 6029 (Universidad de

Minnesota) como referencia. El inóculo de cada aislamiento fue una suspensión bacteriana en 4 ml de medio TY (Tripton-extracto de levadura, anexo 2) (Beringer, 1974) e incubado por 48 horas a 28°C en baño con agitación. Se utilizaron 4 repeticiones por cada cultivo bacteriano y se inoculó 1 ml por tubo una semana después de la siembra. Las plántulas se mantuvieron 20 días en cámara de crecimiento bajo condiciones controladas y se determinó el número de nódulos y sus características por observación visual (morfología, coloración, tamaño, y posición).



**Figura 8.** Experimento in vitro (tubos) para la evaluación visual de la nodulación de cepas aisladas de nódulos de *D. illinoensis* y *D. depressus* en otras especies de *Desmanthus*.

## 5. Eficiencia simbiótica de combinaciones de rizobios nativos y *Desmanthus* spp.

### 5.1. Ensayos en cámara de crecimiento

De forma de evaluar la eficiencia simbiótica de las combinaciones *Desmanthus* spp.-rizobios nativos, se realizaron ensayos en unidades Magenta en condiciones de cámara de crecimiento. El soporte utilizado fue una mezcla estéril de turba/arena (1:6 v/v). En el recipiente inferior se colocaron 250 ml de solución de Fahraeus sin N diluida al medio (anexo 2).

Se realizaron 2 ensayos sucesivos por razones de espacio en la cámara de plantas. En un primer ensayo se sembraron semillas pregerminadas de dos especies de *Desmanthus*, cada Magenta con 4 plántulas (2 por cada especie): *D. velutinus*, *D. bicornutus*, *D. virgatus* y *D. illinoensis*.

El ensayo incluyó: 7 tratamientos inoculados con aislamientos de rizobios nativos preseleccionados (D2, D3, D4, D52, D67, D70, D72), 2 tratamientos con las cepas de referencia ICB1 y UMR 6029, un

control (sin inocular) con 5 ml de agua destilada estéril y un control (sin inocular) con 5 ml de una solución estéril de KNO<sub>3</sub> (5g/l). Se utilizaron tres repeticiones por tratamiento. Las plántulas se inocularon a los 7 días después de la siembra con inóculos preparados en medio TY en una concentración igual o mayor a 10<sup>7</sup> rizobios viables/ml.

Las plantas crecieron durante 45 días en cámara de crecimiento en condiciones controladas. Se determinó peso fresco nodular y peso seco de parte aérea (mg/planta). La parte aérea de las plantas se secó en estufa a 60°C por 48 h hasta peso constante.

En el segundo ensayo se incorporaron nuevas especies de *Desmanthus* y para ahorrar espacio, material y aumentar el número de repeticiones, se sembraron juntas *D. velutinus*, *D. bicornutus* y *D. leptophyllus* y por otro lado *D. illinoensis*, *D. pubescens* y *D. virgatus*, una planta de cada especie en cada Magenta. Los tratamientos fueron: 4 aislamientos de rizobios nativos preseleccionados (D4, D3, D67, D52), 2 tratamientos con las cepas de referencia ICB1 y UMR 6029 y un control sin inocular, cada tratamiento por cuadruplicado. Para la preparación del inóculo se realizó una suspensión en 100 ml PBS por lavado del crecimiento de cada cultivo en dos placas con medio EMA. La inoculación se realizó con 6 ml de cada inóculo por Magenta, 7 días posteriores a la siembra y se cosecharon a los 60 días. Se determinó el peso seco de la parte aérea (mg/pl.).

## 5.2. Ensayos en invernáculo

Con el objetivo de evaluar las combinaciones especies de *Desmanthus* x aislamientos de rizobios nativos más promisorias en fijación de nitrógeno (N<sub>2</sub>) obtenidas en los ensayos en cámara de crecimiento, se realizaron 3 ensayos en invernáculo. Se utilizó un diseño completamente al azar con 4 repeticiones/tratamiento. Se usaron macetas con suelos representativos de las principales zonas forestales del Noreste y litoral Oeste del país, denominados “Paysandú”, “INIA” y “Rivera”. El análisis químico de los suelos (tabla 4) fue realizado en la Dirección de Suelos del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP).

**Tabla 4.** Análisis químico de los suelos utilizados en ensayos de invernáculo.

	pH (agua)	M.O (%)	P (mgKg <sup>-1</sup> )	K (cmol kg <sup>-1</sup> )	Ca (cmol kg <sup>-1</sup> )	Mg (cmol kg <sup>-1</sup> )	Na (cmol kg <sup>-1</sup> )
Paysandú	6.0	2.7	11	0.26	8.29	1.21	0.32
Rivera	6.2	1.3	10	0.27	1.4	0.5	0.06

Las macetas se llenaron con 2 kg de suelo no estéril, previamente secado y tamizado (5x5 mm) y luego se sembraron 2 semillas de *Desmanthus* spp. pregerminadas. El inóculo se preparó con una

suspensión en 100 ml PBS por lavado del crecimiento de cada cultivo en dos placas con medio EMA. La inoculación se realizó a los 7 días de la siembra y se reinoculó de igual forma a los 20 días.

En los suelos "Paysandú" e "INIA" se evaluaron 6 especies de *Desmanthus*: *D. velutinus*, *D. bicornutus*, *D. leptophyllus*, *D. illinoensis*, *D. pubescens* y *D. virgatus*, una planta de cada especie por maceta. En los tratamientos inoculados se utilizaron 6 ml de inóculo por maceta con los cultivos de D4, D3, D67, D52 y las cepas de referencia UMR 6029 y ICB1. Se incluyó un tratamiento control sin inocular y sin nitrógeno. Las plantas se fertilizaron con 150 ml de medio Fahraeus sin nitrógeno y con fósforo una sola vez. La cosecha se efectuó a los 80 días de la siembra.

En el ensayo con suelo "Rivera" se evaluaron 4 especies de *Desmanthus*: *D. velutinus*, *D. bicornutus*, *D. virgatus* y *D. illinoensis*, una planta de cada especie por maceta. Los tratamientos constaron de inoculaciones con 10 ml por maceta de los aislamientos D67, D52, D4 y las cepas de referencia UMR 6029 y ICB1, un control sin inocular y un control sin inocular con KNO<sub>3</sub>. Las plantas se cosecharon a los 67 días de la siembra.

En todos los casos las plantas se regaron con agua corriente según sus necesidades, aproximadamente 4 veces por semana y se rotaron las macetas 2 veces durante el ensayo. Se evaluó el peso seco de la parte aérea de las plantas (mg/pl.) y el índice de eficiencia relativa (IER) de los aislamientos de rizobios utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{IER} = \frac{\text{biomasa aérea seca producida por el aislamiento} \times 100}{\text{biomasa aérea seca producida por el control sin inocular y sin N}}$$

## 6. Análisis estadístico

---

Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANAVA) de un factor, las medias de los tratamientos fueron comparadas usando los test de comparación múltiple de mínima diferencia significativa (DMS), tomando un nivel de significancia de  $\alpha < 0.05$ . El programa utilizado fue Statistica 8.0 (Statsoft company).

## Resultados y discusión

---

### 1. *Desmanthus* spp.-rizobios

---

La colecta de ecotipos nativos de *Desmanthus* en los sitios de muestreo, evidenció la ausencia de nódulos en las plantas encontradas. Esto puede explicarse por escasa nodulación real, desprendimiento de los nódulos en la extracción de las plantas, nódulos formados en raíces muy profundas y lignificación de las raíces por ser especies perennes.

Se formó una colección de 75 aislamientos de rizobios para *Desmanthus* spp. y la cepa de colección extranjera. Los aislamientos fueron de inoculantes comerciales de rizobios de Estados Unidos y aislamientos de suelos en sitios de Uruguay en donde se encuentran especies de *Desmanthus* creciendo naturalmente (Tabla 5).

Si bien se formaron nódulos al inocular especies de *Desmanthus* con todos los suelos (Tabla 6), se observó una escasa nodulación efectiva en las distintas combinaciones especie por suelo. En las especies *D. illinoensis* y *D. depressus* (Tabla 6), se observó nodulación efectiva con 10 de los suelos utilizados. Esto indicaría la presencia de cepas de rizobios nativos potencialmente eficientes en fijación de nitrógeno para estas especies, algo esperable para el caso de *D. depressus* ya que es una especie autóctona. Además, estos resultados sugieren que tanto *D. illinoensis* como *D. depressus* son especies de baja especificidad para las poblaciones naturales de la mayoría de los suelos, no así para el resto de las especies de *Desmanthus*.

La mayoría de los aislamientos de rizobios que integran la colección, se obtuvieron de suelos de la región Basalto (Estación Experimental INIA GLENCOE, Depto. de Paysandú). Los suelos Basalto profundo y muy profundo (pradera natural con pastoreo y fertilización con fósforo) presentaron poblaciones de rizobios “aparentemente” abundantes, capaces de nodular *D. illinoensis* y *D. depressus*, ya que se obtuvieron muchas plantas noduladas y por tanto mayor número de aislamientos de rizobios para estas especies. Cabe destacar, que en el sitio 13 Glencoe con exclusión de pastoreo y en el sitio 17 de Salto, 5 y 4 especies de *Desmanthus* nodularon, respectivamente, obteniéndose aislamientos de todos ellos (Tabla 6). Dado que estos 2 sitios aportan la mayor cantidad de especies noduladas, es esperable encontrar en éstos poblaciones naturales de rizobios más diversas. Por otro lado, en la región Arenisca las poblaciones de rizobios aparentemente serían más específicas y también escasas, ya que únicamente se observó nodulación en *D. illinoensis* (Tabla 6), obteniéndose 2 aislamientos (Tabla 5).

El hecho de que se haya obtenido mayor nodulación y por tanto mayor número de aislamientos en la región de Basalto, en contraposición a la región Arenisca, podría deberse a la diferencia en fertilidad y propiedades fisicoquímicas de los mismos. El suelo de región Arenisca se caracteriza por presentar bajos niveles de materia orgánica y pH. Woomer et al. (1988) correlacionan la población total de rizobios en suelos con varios parámetros, como ser: temperatura, pH y contenido de fósforo. Además, la formación de nódulos por las leguminosas y los rizobios se ve afectada por factores como salinidad, humedad, deficiencia de nutrientes, presencia de nitrato en suelo, metales pesados, y pesticidas entre otros (Walsh, 1995). Muchos de estos factores suprimen el crecimiento, sobrevivencia y características simbióticas de los rizobios, a pesar de que varias especies varían en su tolerancia a estas condiciones de estrés (Zaharan, 1999).

**Tabla 5.** Colección de rizobios para *Desmanthus* spp. obtenidos de aislamientos de suelos de Uruguay, cepas de inoculantes y de colecciones extranjeras, según sitio y planta de la cual se aislaron.

Región/Origen	Nombre del sitio	Manejo	Hospedero:	N° de pantas noduladas	Código aislamiento
Basalto	Glencoe profundo <sup>1</sup>	PN, p, f	<i>D. illinoensis</i>	13	D1 - D5 - D6 - D12 - D14 - D15 - D18 - D22 - D23 - D26 - D28 - D29 - D44
			<i>D. depressus</i>	8	D36 - D37 - D50 - D55 - D66 - D67 - D71 - D72
			<i>D. bicornutus</i>	1	D11
Basalto	Glencoe muy profundo <sup>2</sup>	PN, p, f	<i>D. illinoensis</i>	11	D2 - D7 - D10 - D19 - D20 - D21 - D25 - D43 - D45 - D46 - D47
			<i>D. depressus</i>	13	D31 - D32 - D33 - D34 - D35 - D39 - D49 - D51 - D53 - D58 - D60 - D68 - D73
			<i>D. leptophyllus</i>	1	D59
			<i>D. pubescens</i>	1	D62
Basalto	Glencoe <sup>3</sup> exclusión	PN, sin p	<i>D. illinoensis</i>	8	D3 - D8 - D9 - D13 - D16 - D17 - D24 - D30
			<i>D. depressus</i>	6	D42 - D52 - D48 - D38 - D75 - D69
			<i>D. virgatus</i>	1	D74
			<i>D. leptophyllus</i>	1	D57
			<i>D. bicornutus</i>	1	D61
Arenisca	Colonvade <sup>4</sup>	Bosque de <i>Eucalyptus</i>	<i>D. illinoensis</i>	2	D4 - D27
Litoral norte	Salto <sup>5</sup>	PN, p	<i>D. depressus</i>	4	D40 - D41 - D56 - D70
			<i>D. leptophyllus</i>	2	D54 - D64
			<i>D. velutinus</i>	1	D63
			<i>D. pubescens</i>	1	D65
Inoculante <sup>6</sup>			<i>D. bicornutus</i>		ICB1* - ICB2* - ICB3*
Inoculante <sup>7</sup>			<i>D. virgatus</i>		ICV1** - ICV2**
Colección de E.E.U.U			<i>D. illinoensis</i>		UMR 6029

<sup>1</sup> Sitios 1-5 y 19 Glencoe profundo, <sup>2</sup> sitios 6-10 y 20 Glencoe muy profundo, <sup>3</sup> sitios 11-15 y 18 Glencoe exclusión, <sup>4</sup> sitio 16 Colonvade, <sup>5</sup> sitio 17 Salto, <sup>6</sup>inoculante recomendado para *D. bicornutus*, <sup>7</sup> inoculante recomendado para *D. virgatus*, \* presumiblemente las mismas cepas, \*\* presumiblemente las mismas cepas, PN=Pradera natural, p=pastoreo, f=fósforo

**Tabla 6.** Nodulación en especies de *Desmanthus* con suelos de Uruguay, según sitios de muestreo (estrategia de planta trampa).

Sitio	Región	Especies evaluadas						
		<i>illinoensis</i>	<i>velutinus</i>	<i>bicornutus</i>	<i>pubescens</i>	<i>leptophyllus</i>	<i>virgatus</i>	<i>depressus</i>
1	Basalto GP	+	-	-	-	-	-	+
3		+	-	+	-	-	-	nd
4		+	-	-	-	-	-	nd
5		+	-	-	-	-	-	+
19		nd	-	-	-	-	-	+
6	Basalto GMP	+	-	-	-	-	-	+
9		+	-	-	-	+	-	+
20		nd	-	-	+	-	-	+
12	Basalto GE	+	-	-	-	-	-	+
13		+	-	+	-	+	+	+
15		+	-	-	-	-	-	nd
18		nd	-	-	-	-	-	+
16	Arenisca	+	-	-	-	-	-	nd
17	Litoral norte	nd	+	-	+	+	-	+

(+) Indica nodulación, (-) sin nodulación, nd: no determinado.

GP: Glencoe Profundo, GMP: Glencoe Muy Profundo, GE: Glencoe Exclusión.

En general, las colonias de los rizobios aislados presentaron las siguientes características fenotípicas en medio EMA con rojo congo: crecimiento rápido (media 5 días, a 28°C); lechosas (no absorben rojo congo); con una capa abundante de exopolisacáridos y un diámetro promedio de 4.3 mm. Estas características coinciden con los resultados de Date (1991) quien obtuvo aislamientos de rizobios de especies de *Desmanthus* de crecimiento rápido en medio extracto de levadura manitol. Beyhaut et al. (2006) obtuvieron aislamientos de *D. illinoensis* y todos ellos fueron de crecimiento rápido en medio EMA.

## 2. Amplitud de hospedero y características de nodulación

Se realizó un ensayo para evaluar la especificidad simbiótica entre aislamientos de rizobios nativos y especies de *Desmanthus*. Se inocularon 36 aislamientos (obtenidos a partir de *D. illinoensis* y *D. depressus*), y las cepas ICB1 y UMR 6029 en plantas de *D. virgatus*, *D. pubescens*, *D. bicornutus*, *D. leptophyllus* y *D. velutinus*. La Tabla 7 muestra los resultados de la evaluación visual de la nodulación en las especies estudiadas. Una nodulación efectiva se caracterizó por nódulos de color interno rosado, ubicados principalmente en la raíz primaria y de tamaño de 3-5 mm. En cambio una

nodulación inefectiva se caracterizó por nódulos de color interno blanco, distribuidos en todo el sistema radical, en forma de collar y de tamaño menor a 2 mm.

En general, se observó una amplia variabilidad de los aislamientos para formar nódulos en las especies estudiadas independientemente del hospedero original. De los aislamientos evaluados, 25 produjeron nódulos efectivos en al menos una de las especies evaluadas y 17 no produjeron nódulos o fueron inefectivos. Esto último indicaría alta especificidad simbiótica de esos rizobios por haber formado nódulos sólo con *D. illinoensis* y/o *D. depressus*.

La cepa UMR 6029 y los aislamientos D7 y D30 mostraron la mayor amplitud simbiótica, nodulando a 4 de las 5 especies evaluadas. Le siguieron los aislamientos D2, D3, D4, ICB1 y D25 que produjeron nódulos efectivos en 3 especies (Tabla 7).

La especie *D. leptophyllus* presentó el más alto porcentaje de nodulación efectiva de las especies, alcanzando al 62%. Le siguió *D. bicornutus* con el 26%, *D. pubescens* con el 22%, *D. virgatus* con el 20% y *D. velutinus* con el 12%. Otro estudio, sin embargo, reportó alta especificidad en el requerimiento de rizobios en *D. leptophyllus* (Tropical forages, [www.tropicalforages.info/key/Forages/Media/Html/](http://www.tropicalforages.info/key/Forages/Media/Html/Desmanthus_leptophyllus.htm)

[Desmanthus\\_leptophyllus.htm](http://www.tropicalforages.info/key/Forages/Media/Html/Desmanthus_leptophyllus.htm)).

Estudios en *D. virgatus* encontraron que varias de las cepas de rizobios efectivas en nodulación en *Leucaena leucocephala* son igualmente efectivas en esta especie (Burt, 1993; Davis, 1982; Allen y Allen, 1981). Asimismo Allen y Allen (1981) reportaron nodulación efectiva con aislamientos de rizobios de *Prosopis chilensis*, nodulación inefectiva con aislamientos de *Mimosa púdica*, y sin nodulación con aislamientos de *Glycine max* y *Lupinus polyphyllus*. Davis (1982) observó nodulación efectiva en *D. virgatus* con aislamientos de *Mimosa invisa*.

Los resultados de la tabla 7 y los encontrados en la bibliografía confirman que en general, la nodulación efectiva en leguminosas no comerciales (no seleccionadas genéticamente) es muy variable y que se requieren numerosas pruebas para poder llegar a elegir materiales que continúen en el proceso de selección por características simbióticas.

La formación de nódulos en las leguminosas es un proceso muy complejo que no solo se ve influido por factores ambientales, sino también por los genéticos propios de ambos simbioses. La existencia de nodulación, la abundancia o escasez de nódulos, su tamaño, el tiempo entre la germinación y la aparición de los nódulos visibles son caracteres que dependen de la planta huésped y de la bacteria. Por estas razones, se debe considerar el realizar varias evaluaciones de nodulación teniendo en

cuenta que la amplitud de nodulación es una característica deseable pensando en las especies a recomendar.

La nodulación de la leguminosa nativa de Uruguay, *Acacia caven* (*Mimosoideae*) fue estudiada en varios tipos de suelos e inoculada con varias cepas heterólogas (tipos de rizobios) por lo que se la define como especie promiscua, nodulada por rizobios de crecimiento rápido (Frioni et al., 1998 (a); Frioni, et al., 1998 (b)). Aislamientos de rizobios nativos obtenidos de *Desmodium incanum* mostraron alta especificidad. Por otro lado, *D. incanum* no noduló al ser inoculado con cepas de rizobios heterólogas. Esta leguminosa se comportó como muy específica en su nodulación (Crosa et al. 1999).

**Tabla 7.** Amplitud de hospedero y características de nodulación de combinaciones de *Desmanthus* spp. y aislamientos de rizobios nativos en condiciones de cámara de crecimiento en tubos. Cepa UMR 6029 y ICB1 como referencia.

Aislado de:	Aislamiento	Especies de <i>Desmanthus</i>				
		<i>D. virgatus</i>	<i>D. pubescens</i>	<i>D. bicornutus</i>	<i>D. leptophyllus</i>	<i>D. velutinus</i>
<i>D. depressus</i>	D51-D70	sn	i	sn	e	sn
<i>D. depressus</i>	D52	sn	sn	sn	nd	sn
<i>D. depressus</i>	D53-D71	sn	sn	i	e	sn
<i>D. depressus</i>	D58	e	i	sn	e	sn
<i>D. depressus</i>	D55-D56-D69	sn	sn	sn	sn	sn
<i>D. depressus</i>	D60 - D67	sn	sn	sn	e	sn
<i>D. depressus</i>	D72	sn	sn	sn	i	sn
<i>D. depressus</i>	D73	i	sn	i	e	sn
<i>D. depressus</i>	D75	i	sn	e	e	sn
<i>D. illinoensis</i>	D1	nd	i	i	e	sn
<i>D. illinoensis</i>	D2	e	i	sn	e	e
<i>D. illinoensis</i>	D3	e	i	e	e	sn
<i>D. illinoensis</i>	D4	e	i	i	e	e
<i>D. illinoensis</i>	D5-D8-D9	nd	sn	sn	sn	sn
<i>D. illinoensis</i>	D6	nd	e	sn	e	sn
<i>D. illinoensis</i>	D7-UMR6029	e	e	e	e	sn
<i>D. illinoensis</i>	D10	nd	i	sn	e	sn
<i>D. illinoensis</i>	D12	e	nd	i	e	sn
<i>D. bicornutus</i>	ICB1	sn	e	e	e	sn
<i>D. illinoensis</i>	D16-D23-D28	sn	sn	sn	nd	sn
<i>D. illinoensis</i>	D17	sn	sn	e	sn	i
<i>D. illinoensis</i>	D18	nd	e	e	nd	sn
<i>D. illinoensis</i>	D27	sn	e	e	nd	sn
<i>D. illinoensis</i>	D19	sn	e	sn	nd	e
<i>D. illinoensis</i>	D20	sn	sn	sn	sn	sn
<i>D. illinoensis</i>	D25	sn	e	e	nd	e
<i>D. illinoensis</i>	D29	sn	nd	sn	nd	sn
<i>D. illinoensis</i>	D30	sn	e	e	e	e

e: nodulación efectiva, i: nodulación inefectiva, sn: sin nódulos, nd: no determinado

### 3. Eficiencia simbiótica de combinaciones de rizobios nativos y *Desmanthus* spp.

---

#### 3.1. Ensayos en cámara de crecimiento

---

Con el objetivo de determinar la respuesta de *Desmanthus* spp. a la inoculación con los aislamientos nativos, se realizaron ensayos en Magentas en condiciones gnotobióticas de crecimiento. Para ello se determinó el peso fresco de nódulos (PFN) de todas las plantas.

Los resultados de peso fresco de nódulos mostraron que las cepas UMR 6029, D2, D3 y D4 (aislados de *D. illinoensis*) e ICB1 (aislado de *D. bicornutus*) formaron nódulos efectivos en las raíces de las especies de *Desmanthus*. Los valores medios de PFN en las especies estudiadas fueron: *D. velutinus* 8.1, *D. bicornutus* 6.6, *D. virgatus* 17.1 y *D. illinoensis* 60 mg/planta, respectivamente. Como se destacará más adelante, la producción de peso seco de la parte aérea (PSPA) de las plantas de *D. illinoensis* fue significativamente alta, corroborando los valores de PFN que triplican a los obtenidos con el resto de las especies de *Desmanthus*.

Llama la atención que D70 y D67 (aislados de *D. depressus*) no formaron nódulos en estas especies de *Desmanthus*, aunque estos aislamientos dieron aumentos significativos de PSPA comparadas con las del control. Asimismo, los resultados de la tabla 7 muestran que estos aislamientos no fueron capaces de nodular otras especies de *Desmanthus*, excepto *D. leptophyllus*. Lo que indicaría que D70 y D67 tienen especificidad simbiótica con *D. depressus*.

Los aislamientos D52 y D72 tampoco nodularon en *Desmanthus* spp., aunque también produjeron aumentos significativos de PSPA comparado con plantas control. Los resultados representados en la tabla 7 mostraron el mismo comportamiento de estos aislamientos.

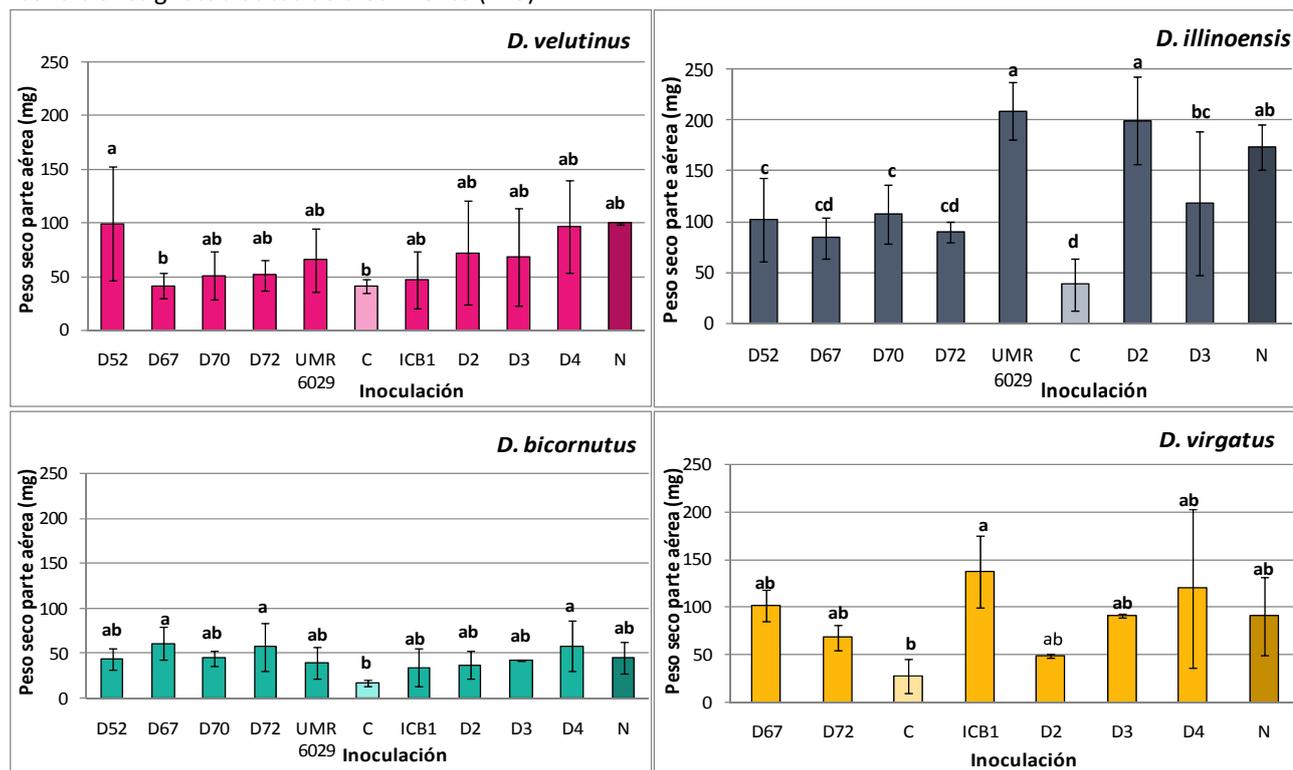
Los incrementos significativos de PSPA obtenidos podrían llevar a plantear la hipótesis de que estos aislamientos poseen otras características para promover el crecimiento vegetal.

Otra posible explicación a esto puede encontrarse en la variabilidad genética de las especies de *Desmanthus*, dado que se trata de semillas de especies con un corto período de domesticación. Menos probable, aunque no descartable, es asumir una infección de raíces más lenta de esas cepas lo que daría por resultado una nodulación posterior. La variabilidad genética de las semillas fue uno de los factores que influyó en los resultados del ensayo y se vio reflejada en los coeficientes de variación, entre 43% y 53%. No eran de esperar coeficientes tan altos, si se tiene en cuenta que se utilizaron sistemas estériles de crecimiento de plantas y condiciones controladas. Las diferencias en requerimientos de temperatura y fotoperíodo entre las especies de *Desmanthus* podría ser otra

explicación. Este género se distribuye desde la zona Norte al Sur de América, por lo tanto existen especies adaptadas a climas tropicales y subtropicales. Por ejemplo, *D. illinoensis* es una especie de estación cálida nativa del centro y Sureste de Estados Unidos. Por otro lado *D. virgatus* es nativa del centro y sur de América, en regiones tropicales y subtropicales.

En el gráfico 1 se presentan los resultados de las respuestas a la inoculación de especies de *Desmanthus* expresados en peso seco de la parte aérea/planta.

**Gráfico 1.** Respuestas a la inoculación en peso seco de la parte aérea (mg/planta) de *Desmanthus* spp. en condiciones gnotobióticas de crecimiento (n=3).



Tratamientos con igual letra no difieren significativamente entre sí ( $p=0.05$ ). C= control sin inocular y sin nitrógeno, N= control con nitrógeno. Líneas sobre barras representan el desvío estándar.

En primer lugar, se destaca que de las cuatro especies de *Desmanthus* estudiadas, *D. illinoensis* fue la que mostró mayor biomasa aérea. Asimismo fue la especie con mayor respuesta a la inoculación conjuntamente con *D. virgatus*.

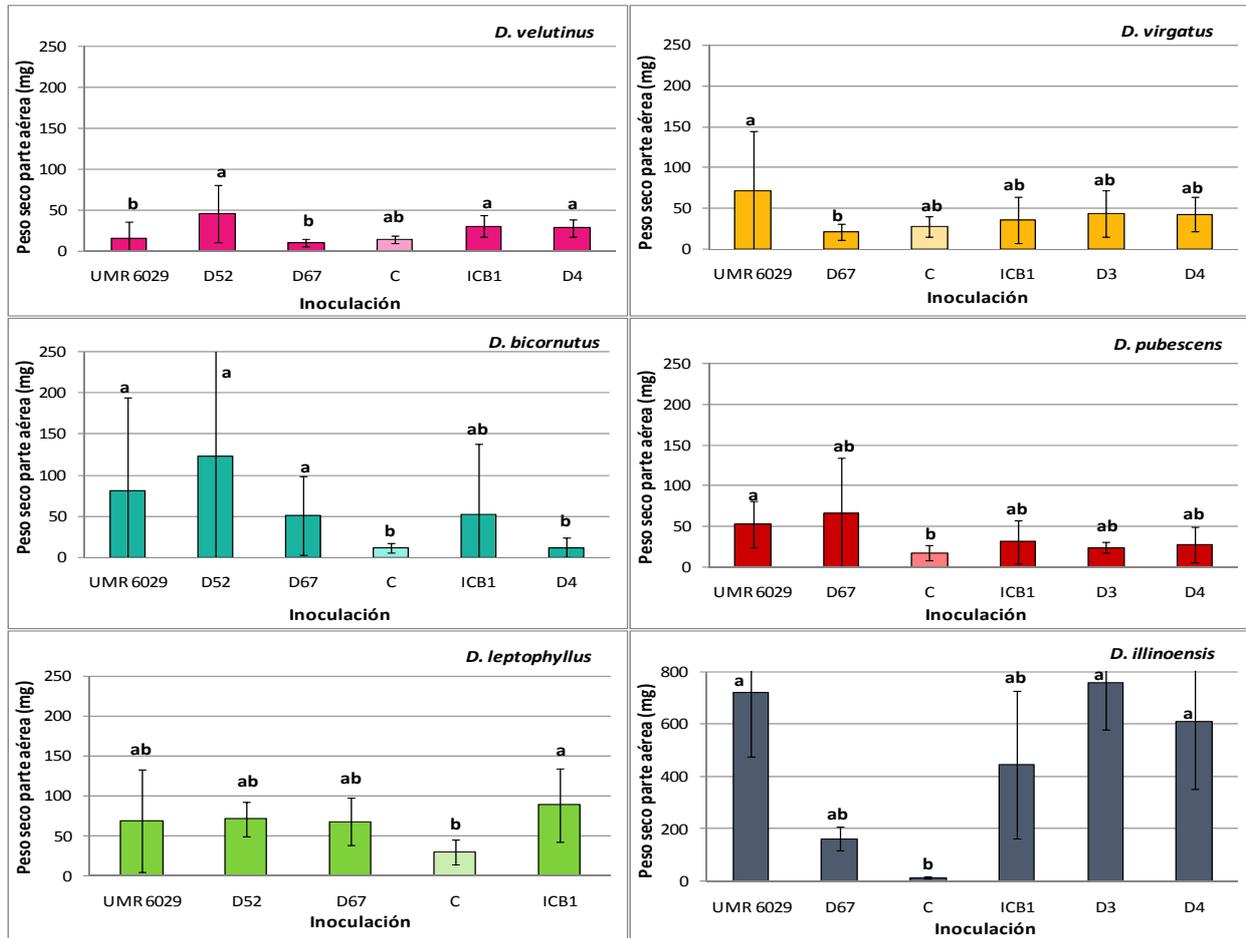
Todas las especies de *Desmanthus* mostraron respuesta significativa en biomasa aérea a la inoculación con rizobios (gráfico 1). La respuesta a la inoculación se vio en: D52 para *D. velutinus*, D67, D72 y D4 para *D. bicornutus*, D52, D70, D3, UMR 6029 y D2 para *D. illinoensis* y ICB1 para *D. virgatus*. Estos resultados demuestran una respuesta diferencial de las especies de *Desmanthus* a la inoculación con las distintas cepas.

La inoculación con la cepa de referencia UMR 6029 y D2 en *D. illinoensis* y la cepa ICB1 en *D. virgatus* producen un incremento de biomasa seca del 300%, comparado con las plantas control (sin inocular y sin N). La inoculación con D67, D72 y D4 en *D. bicornutus* produjeron un incremento de biomasa seca de 240% en promedio. Por el contrario, *D. velutinus* fue la especie que mostró menor potencial de fijación de nitrógeno en estas condiciones experimentales. Sin embargo, esa especie formó una simbiosis eficiente con D52, con un incremento en biomasa seca del 140% comparado con el tratamiento control. Estos resultados concuerdan con los de Muir y Pitman (2004) que estudiaron el establecimiento de especies de *Desmanthus* en interfilas con dos pastizales y encontraron que *D. velutinus* tiene un crecimiento bajo en comparación con *D. illinoensis* y *D. virgatus*.

La respuesta a la fertilización nitrogenada en las distintas especies no mostró diferencias significativas del tratamiento control, excepto en *illionensis*. Los resultados indican que todas las especies de *Desmanthus* estudiadas requieren mayor aporte de nitrógeno para expresar su máximo potencial de crecimiento.

Se realizó un segundo ensayo de evaluación de la eficiencia simbiótica de rizobios bajo las mismas condiciones que el anterior y cuya finalidad fue la de incorporar otras especies de *Desmanthus*. En el gráfico 2 se representan las respuestas a la inoculación medidas en PSPA (mg/planta) de especies de *Desmanthus*.

**Gráfico 2.** Respuesta a la inoculación en peso seco de la parte aérea de plantas de *Desmanthus* spp. en condiciones gnotobióticas de crecimiento (n=5).



Tratamientos con igual letra no difieren significativamente ( $p=0.05$ ). C: control sin inocular y sin N. Líneas sobre barras representan el desvío estándar. El gráfico de *D. illinoensis* difiere en escala de los restantes debido a los mayores valores de PSPA.

Los resultados indican que existe respuesta significativa a la inoculación con rizobios en 4 de las 6 especies de *Desmanthus* evaluadas, siendo nuevamente *D. illinoensis* la de mayor respuesta en fijación de nitrógeno (gráfico 1 y 2). Los resultados de la simbiosis de *D. illinoensis* y las cepas UMR 6029 y D3 indicarían que se trata de una especie que muestra alto potencial de fijación de nitrógeno en condiciones controladas dado que produce una biomasa aérea media de 722 y 760  $\text{mg}\cdot\text{pl}^{-1}$  respectivamente, 46 veces superior a la de las plantas sin inocular. Beyhaut et al. (2006) evaluaron la eficiencia de fijación de nitrógeno de esta especie con aislamientos obtenidos de suelos, en

condiciones controladas de crecimiento en sistemas Magenta, y obtuvieron porcentajes de incremento de biomasa seca de plantas inferiores a los presentados en este trabajo.

La especie *D. bicornutus* responde a la inoculación con las cepas D52, UMR 6029 y D67 con incrementos de PSPA del 925%, 582% y 327% por encima de las plantas control, respectivamente. La cepa UMR 6029 resulta eficiente en fijación de nitrógeno en simbiosis con *D. pubescens* con un incremento del 196% en comparación con plantas no inoculadas. La especie *D. leptophyllus* es otra de las que responde a la inoculación con ICB1 con un incremento de biomasa seca aérea del 195%. Todas las cepas inoculadas en *D. virgatus* y *D. velutinus* produjeron un PSPA promedio que no difirió de aquel de las plantas sin inocular. Por lo tanto, estas cepas resultan ineficientes en fijación de nitrógeno en esas especies de *Desmanthus*.

Al analizar en conjunto ambos ensayos de eficiencia simbiótica, se concluye que se obtuvieron rizobios nativos de alta eficiencia en fijación de nitrógeno, aislados de suelos de las 3 zonas de estudio para las especies de *Desmanthus*. De los aislamientos evaluados 9 provocaron diferencias significativas con el control. Los patrones de respuesta de eficiencia simbiótica de los aislamientos fue variable entre las especies de *Desmanthus*. Estos resultados concuerdan con Date (1991), que en un estudio de eficiencia de fijación de nitrógeno de rizobios en 48 accesiones de *Desmanthus* en condiciones gnotobióticas encontró que los patrones de respuesta a la inoculación variaron en las distintas accesiones de *Desmanthus*. Aún así, este estudio sugiere que este género tiene un bajo requerimiento por cepas de rizobios para una fijación de nitrógeno eficiente.

Es de destacar el comportamiento simbiótico de la cepa de referencia UMR 6029. Formó una simbiosis de alta eficiencia en fijación de nitrógeno con *D. illinoensis* y con la mayoría de las especies evaluadas. Es una cepa que forma una nodulación efectiva y eficiente en fijación de nitrógeno en esa especie y que tiene además amplitud simbiótica. Comparativamente, los aislamientos D2, D3 y D4 (aislados de *D. illinoensis*) mostraron un comportamiento simbiótico con *D. illinoensis* similar a la cepa de referencia UMR 6029.

Contrariamente a lo esperado, el aislamiento ICB1 obtenido del inoculante comercial para *D. bicornutus*, no mostró una simbiosis eficiente en esa y en las otras especies, excepto con *leptophyllus*. Esta cepa es una de las más variables desde el punto de vista de su comportamiento simbiótico en el género *Desmanthus*.

Por otra parte, se debe tener en cuenta que en la literatura se menciona que el género *Desmanthus* tiene polimorfismo, lo cual añade un factor más de variabilidad en las evaluaciones de combinaciones especie x cepa.

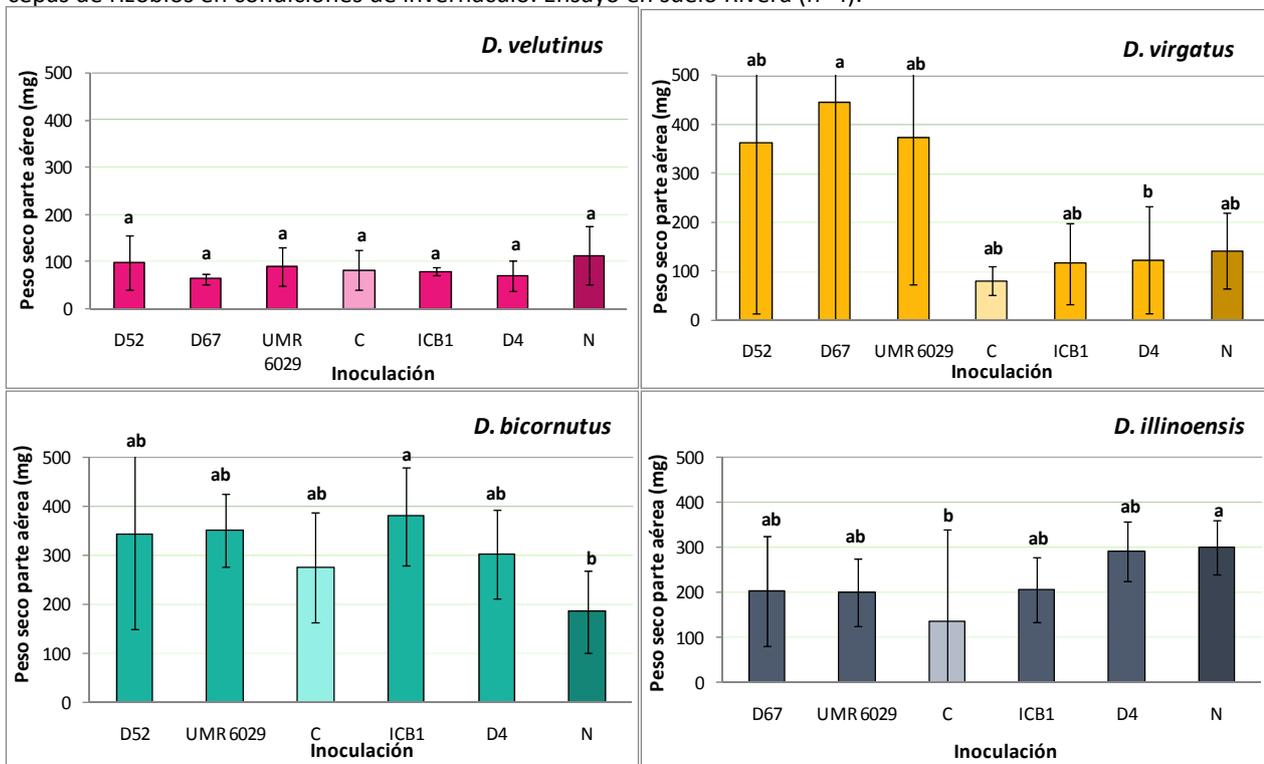
Alta variabilidad en la producción de biomasa aérea fue señalada para este género en ensayos en campo por Hack et al. (2005) y Zabala et al. (2008). Anteriormente, Luckow (1993) mencionó el gran polimorfismo intra e interespecie del género, constituyendo un factor muy importante en la búsqueda de líneas de alta producción forrajera. Gardiner y Burt (1995) también destacan el poliformismo existente en el género *Desmanthus*.

Los ensayos realizados evidenciaron que en los suelos se encuentran poblaciones de rizobios eficientes para el género, caracterizadas por una alta variabilidad simbiótica al probar las distintas combinaciones especies x rizobio. La especie *D. illinoensis* se presenta como la más promisoría en formar una asociación con bacterias fijadoras de nitrógeno nativas.

### 3.2. Ensayo en invernáculo

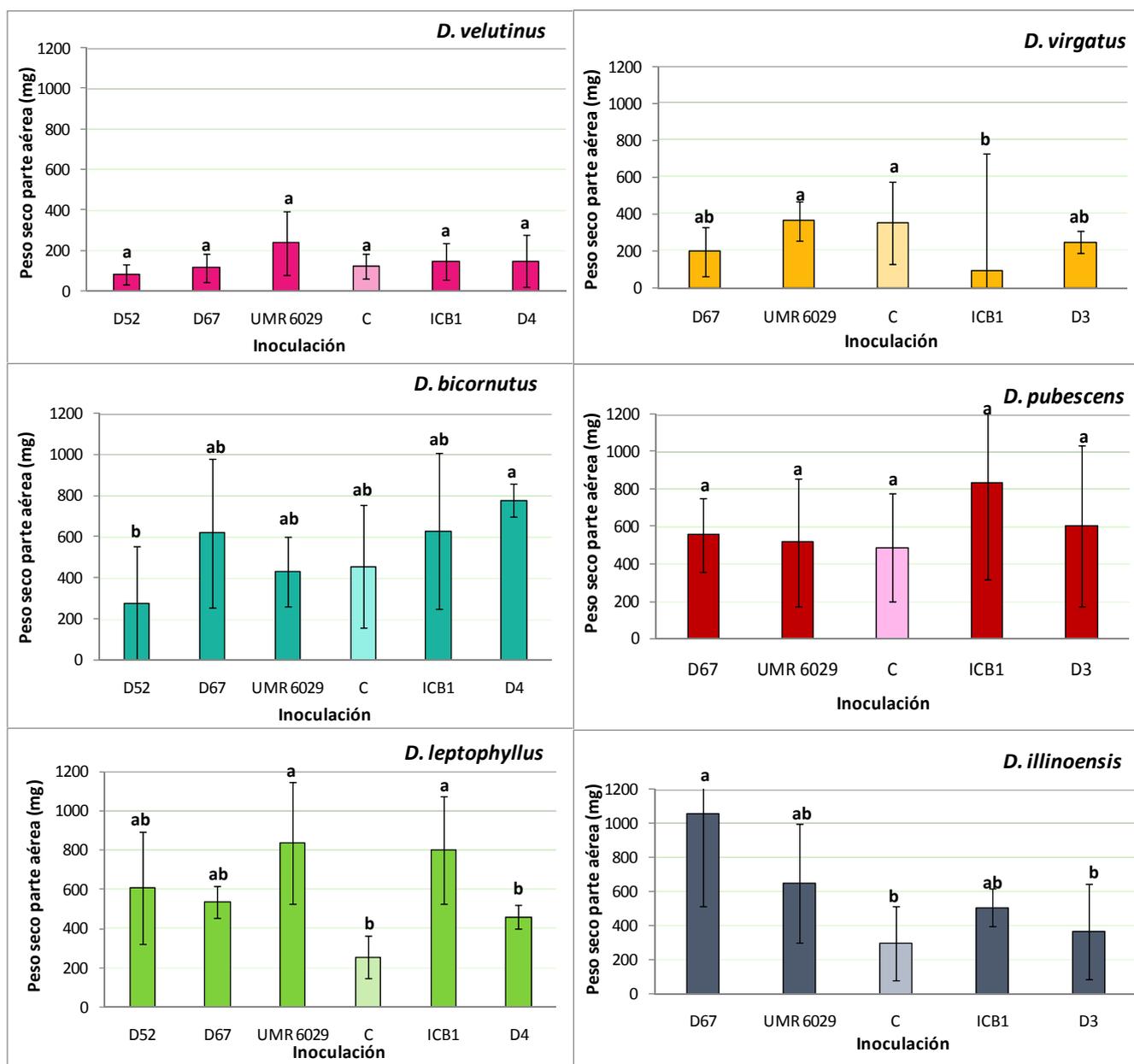
En base a los resultados de amplitud de hospedero y eficiencia simbiótica en cámara de crecimiento se seleccionaron las cepas a evaluar en el invernáculo, en suelos representativos de las principales zonas forestales del país (litoral Oeste: Paysandú y Noreste: Rivera). En los gráficos 3 y 4 se muestran las respuestas de las combinaciones especie x rizobio expresadas en PSPA (mg/planta). No se presentan los datos del experimento con suelo "INIA" por mal crecimiento de las plantas.

**Gráfico 3.** Respuesta en peso seco de la parte aérea (mg/planta) de especies de *Desmanthus* a la inoculación con cepas de rizobios en condiciones de invernáculo. Ensayo en suelo Rivera (n=4).



Tratamientos con igual letra no difieren significativamente entre sí ( $p=0.05$ ). C: control sin inocular y sin nitrógeno. N: control inoculado con  $KNO_3$  (5g/l).

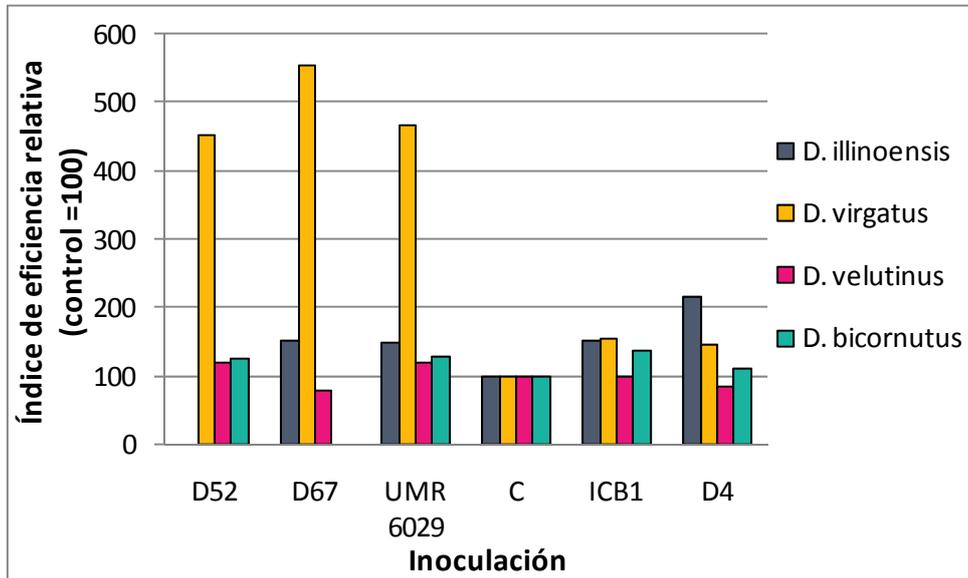
**Gráfico 4.** Respuesta en peso seco de la parte aérea (mg/planta) de especies de *Desmanthus* a la inoculación con cepas de rizobios en condiciones de invernáculo. Ensayo en suelo Paysandú (n=4).



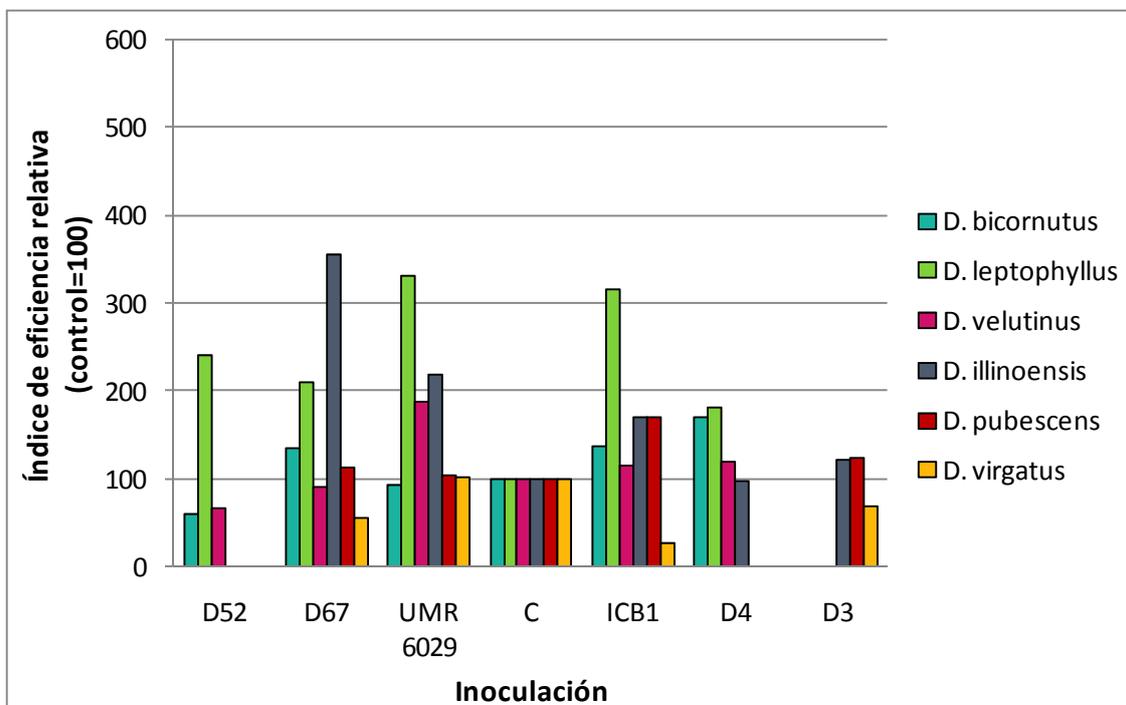
Tratamientos con igual letra no difieren significativamente entre sí (p=0.05). C: control sin inocular y sin nitrógeno.

Los gráficos 5 y 6 muestran el índice de eficiencia relativa como parámetro para evaluar la eficiencia de las cepas de rizobios en relación al control sin inocular y sin nitrógeno.

**Gráfico 5.** Índice de eficiencia relativa (control=100) de combinaciones de especies de *Desmanthus* x cepas de rizobios en invernáculo, suelo Rivera (n=4).



**Gráfico 6.** Índice de eficiencia relativa (control=100) de combinaciones de especies de *Desmanthus* x cepas de rizobios en invernáculo, suelo Paysandú (n=4).



La producción de materia seca promedio por las especies fue mayor en el suelo Paysandú comparado con el suelo Rivera, con una media de 437 y 209 mg.pl<sup>-1</sup> respectivamente (Gráfico 3 y 4). Este resultado era esperable dada la mayor fertilidad del suelo Paysandú, con un porcentaje de materia orgánica de 2.7 comparado con 1.3 en Rivera (Tabla 4). Los datos de PSPA muestran una alta variabilidad en las especies, coincidiendo con lo visto en ensayos en cámara de crecimiento. En base a los resultados en suelo Paysandú las especies se pueden ordenar por producción de biomasa aérea seca de la siguiente manera: *D. illinoensis* > *D. leptophyllus* > *D. pubescens* > *D. bicornutus* > *D. virgatus* > *D. velutinus*. En el suelo Rivera el orden es: *D. virgatus* > *D. bicornutus* > *D. illinoensis* > *D. velutinus*.

La determinación de interacciones entre especie x cepa x suelo (ANOVA de 3 factores) no se realizaron porque no fue posible realizar los experimentos simultáneamente. Los valores obtenidos sugieren una interacción positiva entre cepa x suelo, es decir, que las distintas cepas se adaptan en forma diferente a los dos ambientes edáficos.

En el suelo Paysandú, las cepas inoculadas en *D. leptophyllus* presentaron un alto índice eficiencia que varió entre 180 y 330% (Gráfico 6), siendo las cepas ICB1 y UMR 6029 las de más alta eficiencia simbiótica, alcanzando una biomasa seca aérea promedio de 799 y 838 mg.pl<sup>-1</sup> respectivamente, triplicando los valores de las plantas control. Las cepas D67 y UMR 6029 tuvieron un buen comportamiento simbiótico en *illinoensis*, con índices de eficiencia de 355 y 219%, respectivamente. La inoculación de esta especie con D67 acumuló 256% más materia seca que plantas sin inocular. Las especies *D. velutinus*, *D. virgatus*, *D. bicornutus* y *D. pubescens* no respondieron a la inoculación con las cepas en suelo Paysandú. En general, las cepas inoculadas en estas especies presentaron bajos índices de eficiencia.

En el suelo Rivera, no se observó respuesta significativa a la inoculación en las distintas combinaciones especie x cepa evaluadas (Gráfico 3). Por el contrario, llama la atención el comportamiento simbiótico de la especie *D. virgatus*, específicamente con D67, UMR 6029 y D52, que mostraron altos índices de eficiencia, 451, 465 y 553%, respectivamente (Gráfico 5), y con un aumento promedio de la biomasa seca de 400% con respecto al tratamiento control, aunque no significativos. El hecho de que esta especie haya tenido un crecimiento destacado comparado con las otras especies en el suelo de menor fertilidad, indicaría que probablemente se trate de una especie más adaptada a condiciones adversas de disponibilidad de nutrientes Burt (1993), en las cuales puede expresar su potencial simbiótico. Banhisch et al. (1998) evaluaron la respuesta de *D. virgatus* a la inoculación con la cepa CB3126 en 8 suelos, en experimentos en invernáculo. Los autores

obtuvieron un aumento de PSPA significativo del 90% a los 100 días de la siembra en 4 suelos arcillosos del centro y sur de Queensland.

Se obtuvo un alto coeficiente de variación en el suelo de Rivera (50%) y en el de Paysandú (55%) lo cual indica que los factores extra tratamiento en sí, incidieron en gran medida en los resultados. Valores altos de coeficientes de variación también fueron obtenidos en los ensayos en condiciones controladas como se mencionó. En nuestra opinión, parte de esa variación se debe a factores ambientales y también a la variabilidad genética de las semillas de las diferentes especies.

Los valores de PSPA de *D. virgatus* inoculado con D67 en el suelo Rivera y de *D. illinoensis* con D67 en el suelo Paysandú, nos muestran dos combinaciones promisorias desde el punto de vista simbiótico, que deberán tenerse en cuenta en próximas evaluaciones.

A diferencia de *D. virgatus*, *D. velutinus* mostró en los dos suelos una producción de materia seca baja, sin respuesta significativa a la inoculación con rizobios, confirmando los resultados obtenidos en los experimentos en condiciones controladas. Por su parte, las especies *puebescens* y *D. bicornutus* tampoco respondieron a la inoculación con las cepas evaluadas, por lo que se requeriría nuevas cepas y evaluaciones para obtener fijación simbiótica de nitrógeno en estas especies.

Varios estudios en leguminosas nativas en Uruguay mencionan la obtención de rizobios nativos eficientes en fijación de nitrógeno. Por ejemplo Crosa et al. (1999) obtuvieron rizobios nativos aislados de nódulos de *Desmodium incanum*, los cuales mostraron eficiencia en fijación de nitrógeno al ser inoculados en esta especie en experimentos de invernáculo con un suelo pobre en nitrógeno. Las cepas presentaron diferente capacidad para fijar nitrógeno en el hospedero, lo que evidencia la importancia de la selección de cepas. Asimismo, Rodríguez et al. (2008) evaluaron la eficiencia simbiótica de la población de rizobios de 3 suelos donde crecen naturalmente especies nativas de *Sesbania* en Uruguay, confirmando que estas poblaciones de rizobios pueden formar una simbiosis eficiente en esta leguminosa nativa, con incrementos significativos de biomasa aérea.

## Conclusiones

---

1. Este trabajo es un aporte original al conocimiento de la asociación simbiótica entre el género *Desmanthus* spp. y rizobios nativos de suelos de Uruguay.
2. Existen poblaciones de rizobios en los suelos de los 3 sitios estudiados y capaces de formar nódulos con especies de *Desmanthus* nativas e introducidas. En general, los rizobios son de rápido crecimiento y hay alta especificidad en la simbiosis *Desmanthus*-rizobio. La nodulación por rizobios nativos es particularmente efectiva en las especies *D. illinoensis* y *D. depressus*.

3. *D. leptophyllus* fue la especie introducida que se destacó por su amplia capacidad de nodulación con rizobios nativos en condiciones experimentales controladas.
4. Se identificaron cepas de rizobios nativas con alta eficiencia simbiótica en varias de las especies de *Desmanthus*; con producción de biomasa aérea significativamente más alta que las obtenidas con cepas de referencia.
5. La cepa de referencia UMR 6029 es de destacar, ya que presentó alta eficiencia simbiótica en varias especies de *Desmanthus*: *D. leptophyllus*, *D. illinoensis*, *D. pubescens*, *D. bicornutus*.
6. *D. illinoensis* mostró capacidad de formar simbiosis eficientes con cepas nativas tanto en cámara de crecimiento como en suelo en invernáculo. La especie introducida *D. virgatus* deberá tenerse en cuenta en futuras evaluaciones por su buen comportamiento simbiótico en suelo de baja fertilidad (invernáculo).
7. Los resultados de este trabajo generan nuevas expectativas de continuar la evaluación de las simbiosis *Desmanthus*-rizobio en ensayos en campo, teniendo en cuenta que se evidenció su respuesta simbiótica con rizobios nativos en condiciones controladas y en suelos y que es un género con potencial forrajero para nuestro país.

## Anexo I

---

### Germinación de semillas de *Desmanthus depressus* escarificadas por varios métodos

---

Se tuvo dificultad para que las semillas de *Desmanthus depressus* germinaran con las técnicas más clásicas del laboratorio. A diferencia de las semillas de otras especies (obtenidas de colecciones y bancos internacionales) las de *D. depressus* provienen de colecta directa en campo. Por lo tanto, es probable que la no germinación se deba a inmadurez de la semilla. Además de la germinación, se recogieron escasas semillas lo que limitó la cantidad de ensayos con esta especie.

A continuación se describen los métodos utilizados en la germinación de las semillas de *D. depressus*. Inicialmente se procedió a observar las semillas en el microscopio óptico, de forma de seleccionar aquellas similares por comparaciones de sus características morfológicas. Se descartaron semillas dañadas, muy pequeñas o aparentemente deshidratadas.

Métodos de escarificación:

1. Tratamiento de agua hirviendo: El tratamiento consistió en sumergir 30 semillas en agua hirviendo durante 5 segundos, e inmediatamente enfriarlas en agua a temperatura ambiente para enfriarlas. Por último, las semillas fueron embebidas en agua destilada estéril por 24 hs en estufa a 28°C (Hopkinson y English, 2004).
2. Tratamiento con ácido sulfúrico 96%: Las semillas se trataron con ácido sulfúrico a dos tiempos. 30 semillas fueron tratadas durante 4 minutos y otras 30 tratadas durante 6 minutos. Finalmente se realizaron 10 enjuagues en agua destilada estéril y se embebieron en la misma a 28°C durante 24 hs (Medina-Sanchez y Lindig-Cisneros, 2004).
3. Tratamiento mecánico con un bisturí: Se realizó un corte sobre la cubierta externa de 30 semillas en la zona opuesta al micrópilo. Luego se esterilizaron en etanol 95% por 30 segundos, en hipoclorito 4% por 3 minutos y varios enjuagues en agua destilada estéril. Se embebieron en agua destilada estéril en estufa a 28°C por 24 hs (Kelting, 1994).

Pasadas las 24 hs de incubación en estufa, para todos los tratamientos, las semillas se colocaron en arena estéril en estufa a 28°C y otra parte en cuarto de luces con un fotoperíodo de 12h a 28°C.

## Anexo 2

### *Medios de cultivo, soluciones y esterilización del material*

Composición del medio Fahraeus (Fahraeus, 1957)

Componentes	Cantidad por litro
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	15 g
Fe Citrato	0.5 g
CaCl <sub>2</sub>	10 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	12 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 g
Solución micronutrientes	1 ml
Agar	12 g
pH	7.0

En la siguiente tabla se detalla la composición de la solución de micronutrientes.

Composición de la Solución de micronutrientes para el medio Fahraeus

Componente	Cantidad por litro
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.18 mg
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.017 mg
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.216 mg
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.050 mg
NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.007 mg
CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.056 mg

Composición del medio Extracto de levadura-manitol-agar (EMA) con Rojo Congo (Vincent, 1970)

Componente	Cantidad por litro
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2 g
NaCl	0.1 g
Manitol	10 g
Extracto de levadura	0.4 g
Agar	18 g
Rojo Congo	250 mg
pH	7.0

Composición del medio Triptone Yeast Extract (Ty) (Beringer, 1974)

Componente	Cantidad por litro
Triptona	5.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Cl <sub>2</sub> Ca2H <sub>2</sub> O	0.87g

Composición del medio Phosphate-buffered saline (PBS) (Sambrook et al., 1989)

Componente	Cantidad por litro
NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24 g
pH	7.0

En la preparación de las Magentas se utilizó una mezcla de turba y arena, y una solución nutritiva sin nitrógeno para el crecimiento de las plantas (medio Fahraeus). Una vez preparadas las Magentas, éstas se esterizaron en autoclave por una hora a 121°C y 1.1 atm.

## Referencias bibliográficas

---

- Adjei, M. B. y Pitman, W. D.** (1993). Response of *Desmanthus* to clipping on a phosphatic clay mine-spoil. *Tropical Grasslands* 27, 94-99.
- Allen, O. N. y Allen, E. K.** (1981). The *Leguminosae*: A source book of characteristics, uses, and nodulation. Univ. of Wisconsin Press, Madison, WI.
- Baca, B.E.; Soto, L. y Pardo, M<sup>a</sup>.P.** (2000); Fijación biológica de nitrógeno; Revista Elementos, Ciencia y Cultura 38: 43.
- Bahnisch, G. A.; Date, R. A.; Brandon, N. J. y Pittaway, P.** (1998). Growth responses of *Desmanthus virgatus* to inoculation with *Rhizobium* strain CB3126.I. A pot trial with 8 clay soils from central and southern Queensland. *Tropical Grasslands* 32, 13-19.
- Barrera-Necha, L. L.** (1996). Diversidad genética de las cepas mexicanas de *Bradyrhizobium* simbiosites de *Lupinus* sp. , (ed. I. P. Nacional), México.
- Bécquer, C.J.; Prévost, D. y Prieto, A.** (2000). Caracterización fisiológica-fisiológica-bioquímica de cepas de rizobios, aislados en leguminosas forrajeras. Revista de Biología, vol 14, n° 1.
- Benavides, G. T.** (1989). Experiencias en el manejo de producción de zacate buffel y otras opciones en el norte de Nuevo León. Manejo de Pastizales 3, 33-39.
- Benhizia, Y.; Benhizia, H.; Benguedouar, A.; Muresu, R.; Giacomini, A. y Squartini, A.** (2004). Gamma Proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. *System. Appl. Microbiol.* Elsevier 27, 462-468.
- Beringer, J. E.** (1974). R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of General Microbiology* 84, 188-198.
- Bernal, G. y Graham, P. H.** (2001). Diversity in the rhizobia associated with *Phaseolus vulgaris* L. in Ecuador, and comparisons with Mexican bean rhizobia. *Canadian Journal of Microbiology* 47, 526-534.
- Beyhaut, E.; Tlustý, B.; Van Berkum, P. y Graham, P. H.** (2006). *Rhizobium giardinii* is the microsymbiont of Illinois bundleflower (*Desmanthus illinoensis* (Michx.) Macmillan) in midwestern prairies. *Canadian Journal of Microbiology* 52, 903-907.
- Beyhaut, E.; DeHaan, L.R.; Byun, J.L.; Sheaffer, C.C. y Graham, P.H.** (2006). Response to inoculation in Illinois bundleflower. *Canadian Journal of Plant Science*, 919-926.
- Brandon, N. J.; Date, R. A.; Clem, R. L.; Robertson, B. A. y Graham, T. W. G.** (1998). Growth responses of *Desmanthus virgatus* to inoculation with rhizobium strain CB3126. II. A field trial at 4 sites in south-east Queensland. *Tropical Grasslands* 32, 20-27.
- Brewin, N. J.** (2004). Plant cell wall remodelling in the rhizobium-legume symbiosis. *Critical Reviews in Plant Sciences* 23, 293-316.
- Burt, R.L.** (1993) *Desmanthus*: A tropical and subtropical legume. Part I. General review. *Herbage Abstracts*, 63, 401-41.
- Byun, J.; Sheaffer, C. C.; Russelle, M. P.; Ehlke, N. J.; Wyse D. L. y Graham, P. H.** (2004). Dinitrogen fixation in Illinois bundleflower. *Crop Science* 44, 493-500.

- Cárdenas-Navarro, R.; Sánchez-Yáñez, J. M.; Farías-Rodríguez, R. y Peña-Cabriales, J. J.** (2004). Los aportes de nitrógeno en la agricultura. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 10, 173-178.
- Chen, W-M.; Moulin, L.; Bontemps, C.; Vandamme, P.; Béna, G. y Boivin-Masson, C.** (2003). Legume Symbiotic Nitrogen Fixation by  $\beta$ -Proteobacteria Is Widespread in Nature. *Journal of Bacteriology* 185, 7266–7272.
- Crews, T. E. Peoples, M.B.** (2004). Legume versus fertilizer sources of nitrogen: ecological tradeoffs and human needs. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. Elsevier B.V. 102, 279–297.
- Crosa, M.; Olivera, A.; Goyenola, R. y Frioni, L.** (1999). Comportamiento simbiótico de *Desmodium incanum* en Uruguay. *Agrociencia* vol. 3: No.1, pp 38-43
- Date, R. A.** (1991). Nitrogen fixation in *Desmanthus*: strain specificity of *Rhizobium* and responses to inoculation in acidic and alkaline soil. *Tropical Grasslands* 25, 47-55.
- Date, R. A.** (1991). Nodulation success and persistence of recommended inoculum strains for subtropical and tropical forage legumes in northern Australia. *Soil Biol. Biochem.*, 23, 533-541.
- Davis, P. E.** (1982). *Desmanthus virgatus* as a test plant for dilution-frequency infection tests using *Leucaena leucocephala* rhizobia. *Soil Biol. Biochem.* 14, 313-314.
- De a Rangel, J. H. y Gardiner, C. P.** (2009). Stimulation of wool growth by *Desmanthus* spp. as a supplement to a diet of Mitchell grass hay. *Tropical Grasslands* 43, 106-111.
- De A Rangel, J. H. y Gomide, C.** (2005) *Desmanthus*: a new forage legume to improve wool growth in tropical Australia.
- De Felipe, M. R.** (2006). Fijación biológica de dinitrógeno atmosférico en vida libre. In Fijación de Nitrógeno: fundamentos y aplicaciones, (ed. E. J. Bedmar, González, J., Lluch, C., Rodelas, M<sup>a</sup> B. (eds)), pp. 9: SEFIN (editorial).
- Denarie, J.; Debelle, F. y Prome, J. C.** (1996). *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu Rev Biochem* 65, 503-35.
- Díaz, C.; Melchers, L.S.; Hooykaas, P.J.J.; Lugtenberg, B.J.J. y Kijne, J.W.** (1989). Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Nature* 338,579-581.
- DIEA.** (2004). Anuario estadístico Agropecuario 2003. Montevideo, Uruguay: Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección de Estadísticas Agropecuarias.
- Dixon, R. y Kahn, D.** (2004). Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature Reviews. Microbiology* 2, 621-631.
- ELAGRO.** (2010) <http://www.elagro.com/articulo.php?not=812&busqueda=la%soja%sigue%avanzando>
- Eldor, A. P.** (2007). Biological N inputs. In *Soil microbiology, ecology, and biochemistry*, 365-387.
- Erismán, J. W.; Bleeker, A.; Galloway, J. y Sutton, M.S.** (2007). Reduced nitrogen in ecology and the environment. *Environmental Pollution*, 150, 140-149.
- Espinoza, Y. y Malpica, L.** (2007). El género *Rhizobium* como inoculante para leguminosas. En CENIAP/INIA. Rev. Digital del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Maracay, Venezuela.
- Fahraeus, G.** (1957). The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *J. Gen. Microbiol* 14, 374-381.

- FAO** (Roma, 2005). Tendencias mundiales actuales y perspectivas de los fertilizantes al 2009/10, (<http://www.fao.org>)
- Field, S.** (2004). Global nitrogen cycling out of control. *Environmental Health Perspectives* 112, A557–A563.
- Foulkes, M. J.; Hawkesford, M.J.; Barraclough, P.B.; Holdsworth, M.J.; Kerr, S.; Kightley, S. y Shewry, P.R.** (2009). Identifying traits to improve the nitrogen economy of wheat: Recent advances and future prospects. *Field Crops Research*, 114, 329–342.
- Frayse, N.; Couderc, F. y Poinso, V.** (2003). Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium–legume symbiosis. *Eur. J. Biochem.* 270, 1365–1380.
- (a) Frioni, L.; Dodera, R.; Malatés, D. y Irigoyen, I.** (1998) An assessment of nitrogen fixation capability of leguminous trees in Uruguay. *Applied Soil Ecology*, 7, 271-279.
- (b) Frioni, L.; Malatés, D.; Irigoyen, I.; Dodera, R.** (1998). Promiscuity for nodulation and effectivity in the N<sub>2</sub> -fixing legume tree *Acacia caven* in Uruguay. *Applied Soil Ecology*, 7, 239-244.
- Frioni, L.** (2006). Microbiología. Básica, ambiental y agrícola. Montevideo, Uruguay: Universidad de la República.
- Gage, D. J.** (2004). Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev* 68, 280-300.
- Galloway, J. N.; Dentener, F.J.; Capone D.G.; Boyer, E.W.; Howarth, R.W.; Seitzinger, S.P.; Asner, G.P.; Cleveland, C.C.; Green, P.A.; Holland, E.A.; Karl, D.M.; Michaels, A.F.; Porter, J.H.; Townsend, A.R. y Vörösmarty, C.J.** (2004). Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry*. 70, 153–226.
- Gardiner, C. P. y Burt, R.L.** (1995). Performance characteristics of *Desmanthus virgatus* in contrasting tropical environments. *Tropical Grasslands*, 29, 183 – 187.
- Gardiner, C. P. y De A Rangel, J.H.** (1996). Agronomic and nutritional aspects of *Desmanthus virgatus*. Brown, J. (ed.) The future of tropical savannas, an Australian perspective. Poster paper, 18-19.
- Gardiner, C. P.; Bielig, L.; Schlink, A.; Coventry, R. y Waycott, M.** (2004). *Desmanthus* - a new pasture legume for the dry tropics. Proceedings of the 4th International Crop Science Congress, Brisbane, Queensland. [http://www.cropscience.org.au/icsc2004/poster/S/2/573\\_gardinerc.htm](http://www.cropsscience.org.au/icsc2004/poster/S/2/573_gardinerc.htm).
- Geurts, R. y Bisseling, T.** (2002). *Rhizobium* Nod Factor Preception and Signalling. *The Plant Cell*, S239-S249.
- Giller, K. E.** (2001). Nitrogen fixation in tropical cropping systems, (ed. W. CABI, Oxon, UK). New York, Estados Unidos.
- Graham, P. H.** (1999). Biological Dinitrogen Fixation: Symbiotic. In Principles and applications of soil microbiology, (ed. D. F. Sylvia, J.; Hartel, P.G.; Zuberer, D.), pp. 405-417. Upper Saddle River, NJ, Estados Unidos: Prentice Hall. Inc.
- Graham, P. H.** (2000). Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. *Field Crops Research*. 65, 93-106.
- Graham, P. H. y Vance, C. P.** (2003). Legumes: Importance and Constraints to Greater Use. *Plant Physiology*, 131, 872–877, American Society of Plant Biologists. [www.plantphysiol.org](http://www.plantphysiol.org)
- Hack, C.M.; Tomei, C.E.; Ciotti, E.M. y Castelán, M.E.** (2005). Evaluación agronómica de accesiones del género *Desmanthus* Willd. del Nordeste Argentino. *Revista Argentina de Producción animal* 25, 19-26.

- Herridge, D.F.; Peoples, M.B. y Boddey, R. M.** (2008). Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant Soil* 311: 1–18.
- Hirsch, A. M.** (1999). Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. *Curr Opin Plant Biol* 2, 320-326.
- Hopkinson, J.M. y English, B.H.** (2004). Germination and hardseededness in *desmanthus*. *Tropical Grasslands*, 38, 1–16.
- INTA** (2008). <http://www.inta.gov.ar/concepcion/informacion/boletines/hie/02/67.htm>
- Izaguirre, P. y Beyhaut., R.** (2003). Las leguminosas del Uruguay y regiones vecinas. Parte 2: *Caesalpinoideae* y *Mimosoideae* Montevideo, Uruguay.
- Jones, R. M. y Baron, N. J.** (1998). Persistence and productivity of eight accessions of *Desmanthus virgatus* under a range of grazing pressures in subtropical Queensland. *Tropical Grasslands* 32, 145-152.
- Jones, R. M.; Bishop, H. G.; Clem, R. L.; Conway, M. J.; Cook, B. G.; Moore, K. y Pengelly, B. C.** (2000). Measurements of nutritive value of a range of tropical legumes and their use in legume evaluation. *Topical Grasslands* 34, 78-90.
- Kanani, J.; Lukefahr, S. D. y Stanko, R. L.** (2006). Evaluation of tropical forage legumes (*Medicago sativa*, *Dolichos lablab*, *Leucaena leucocephala* and *Desmanthus bicornutus*) for growing goats. *ScienceDirect, Small Ruminant Research* 65, 1-7.
- Kelting, R.W.** (1994). Longevity of Illinois Bundle Flower (*Desmanthus illinoensis*) seeds. *The Southwestern Naturalist*, 39, 212-213.
- Krishnan, H.B.; y Bennett J.O.** (2006). *Rhizobium*-legume symbioses: molecular signals elaborated by rhizobia that are important for nodulation. *Springer, Plant-Associated Bacteria*, 57–104.
- Laeremans, T. y Vanderleyden, J.** (1998). Review: Infection and nodulation signaling in *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 14, 787-808.
- Lloret, L. y Martínez-Romero, E.** (2005). Evolución y filogenia de *Rhizobium*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 47, 43-60.
- Long, S. R.** (2001). Genes and signals in the rhizobium-legume symbiosis. *Plant Physiol* 125, 69-72.
- Luckow, M.** (1993). Monograph of *Desmanthus (leguminosae-mimosoideae)*. **Syst. Bt. Monograph** 38, 166.
- Marchal, K. y Vanderleyden, J.** (2000). The "oxigen paradox" of dinitrogen fixing bacteria. *Biol Fertil Soils*, 30, 363-373.
- Martínez, J. A.** (1991). Análisis de crecimiento del huizchillo *Desmanthus virgatus* (L.) var. *depressus* (Willd.) y efecto del agobio hídrico sobre su germinación. Tesis profesional. Universidad Autónoma de Nuevo León, México, 35p.
- Martínez, M. C.; Moreno, J.M.; Ruiz, M. y Álvarez, C.** (2005). Aislamiento e identificación de *Rhizobium* en *Lupinus* silvestres por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *Scientia-CUCBA* 7, 175-181.
- Masson-Boivin,C.; Giraud, E.; Perret, X. y Batut, J.** (2009). Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes?. *Trends in Microbiology*, 17, 458-466.
- Medina-Sanchez, E. y Lindig-Cisneros, R.** (2004). Research note: Effect of scarification and growing medium on seed germination of *Desmanthus bicornutus*. *Tropical Grasslands* 38, 253–255.

- Miklashevichs, E.; Röhrig, H.; Schell, J. y Schmidt, J.** (2001). Perception and Signal Transduction of Rhizobial NOD Factors. *Critical Reviews in Plant Sciences* 20, 373-394.
- Mithofer, A.** (2002). Suppression of plant defence in rhizobia-legume symbiosis. *Trends Plant Sci* 7, 440-4.
- Muir, J.P. y Pitman, W.D.** (2004). Establishment of *Desmanthus* species in existing grass stands. *Native plants*, 5-13.
- Ocuppaugh, W. R., Grichar, W. J., Hussey, M. A., Abrameit, A. H., Owens, M. K., Reed, R. L., Muir, J. P., Bade, D. y Reilley, J. L.** (2004). Registration of 'BeeTAM-08' Bundleflower. *Crop Science* 44, 1862-1863.
- Olivares, J.** (2003). Cuatro décadas en la simbiosis rhizobium-leguminosa. Granada, España: Academia de Ciencias Matemáticas, Físico-Químicas y Naturales de Granada.
- Olivares, J.** (2006). Nitrogenasa. Enzima clave en la fijación. In Fijación de Nitrógeno: fundamentos y aplicaciones. ed SEFIN. pp. 29.
- Olivares, J.** (2008). Fijación biológica de Nitrógeno. <http://www.eez.csic.es/~olivares/ciencia/fijacion/>
- Pengelly, B. C. y Coway, M.J.** (2000). Pastures on cropping soils: wich tropical pasture legume to use? *Tropical Grasslands* 34, 162-168.
- Pengelly, B. C. y Liu, C. J.** (2001). Genetic relationships and variation in the tropical mimosoid legume *Desmanthus* assessed by random amplified polymorphic DNA. *Genetics Resources and Crop Evolution* 48, 91-99.
- Polla, M. C.** (1997). Silvopastoreo con ovinos. Dirección General Forestal - M.G.A.P. Uruguay. <http://www.mgap.gub.uy/forestal/SILVOPASTOREOCONOVINOS.pdf>
- Polla, M. C.** (1998). Estrategias de acción en el tema silvopastores. En actas seminario: "Manejo Silvopastoral". Trabajo n° 8. Young, Río Negro, Uruguay.
- Polla, M. C.** (1999). Experiencias en Sistemas Productivos Agroforestales y Silvopastoriles en Uruguay. División forestal, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Montevideo, Uruguay. <http://www.fao.org/ag/AGa/AGAP/FRG/AFRIS/espanol/Document/AGROF99/PollaMC.htm>
- Posler, G. L.; Lenssen, A. W. y Fine, G. L.** (1993). Forage yield, quality, compatibility and persistence of warm-season grass legume mixtures. *Agron.J.* 85, 554-560.
- Pou, R. y asociados.** (2009). Agenda forestal, pp. 104. Montevideo, Uruguay.
- Rees, D. C.; Tezcan, F. A.; Haynes, C. A.; Walton, M. Y.; Andrade, S.; Einsle, O. y Howard, J. B.** (2005). Structural basis of biological nitrogen fixation. *Phil. Trans. R. Soc. A* 363, 971-984.
- Rodríguez, A., Csukasi, F., Abreu, C., Sicardi, M.** (2008) Characterization of rhizobia from *Sesbania* species native to seasonally wetland areas in Uruguay. *Biol Fertil Soils*, 44:925–932
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F. y Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning: A Laboratory Manual. Nueva York: *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Schultze, M. y Kondorosi, A.** (1998). Regulation of symbiotic root nodule development. *Annu Rev Genet* 32, 33-57.
- Skerman, P. J.** (1977). Tropical Forage Legumes. United Nations Food and Agriculture Organization: Rome, Italy.

- Somasegaran, P. and Hoben, H. J. 1994.** Handbook for rhizobia: Methods in legume-*Rhizobium* technology. Springer Verlag, New York, NY. 450 pp.
- Soto-Urzúa, L. y Bace, B.E.** (2001). Mecanismos de Protección de la Nitrogenasa a la Inactivación por Oxígeno. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 43, 37-49.
- Tripathi, S. K.** (2009). Human influences on mobility of nitrogen in the environment: Needs for research and management. *Acta Ecologica Sinica* 29, 130–135.
- Tropical Forages** (consultado 05/2011)
- [http://www.tropicalforages.info/key/Forages/Media/Html/Desmanthus\\_leptophyllus.htm](http://www.tropicalforages.info/key/Forages/Media/Html/Desmanthus_leptophyllus.htm)
- Urzúa, H.** (2005). Beneficios de la Fijación Simbiótica de Nitrógeno en Chile. *Ciencia e investigación Agraria* 32, 133-150.
- Vincent, J. M.** (1970). A Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria. Oxford: *Blackwell Scientific Publications*.
- Walsh K B.** (1995). Physiology of the legume nodule and its response to stress. *Soil Biol Biochem*, 27:637–655.
- Zabala, J.M.; Giavedoni, J.; Tomas, P.A. y Budin, E.A.** (2010). Variabilidad en caracteres morfológicos relacionados con la implantación de *Desmanthus virgatus* (L.) Willd. y *Desmanthus paspalaceus* (Lindm.) Burkart. *Agriscientia*, 2010, 2, 97-105.
- Zahran, H.H.** (1999). Rhizobium-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. *Microbiol. Mol.Biol. Reviews*, 63: 968-989.