

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

**PROSPECCIÓN Y CARACTERIZACION DE RIZOBIOS
PARA EL DESARROLLO DE INOCULANTES PARA
TREBOL Y LOTUS**

por

Leticia BATISTA MONTESANO

**TESIS presentada como uno
de los requisitos para obtener
el título de *Magister* en
Ciencias Agrarias opción
Ciencias Vegetales**

**MONTEVIDEO
URUGUAY
Febrero 2013**

Tesis aprobada por el tribunal integrado por Ing. Agr. (Dr.) Carlos Perdomo, Ing. Agr. (MSc) Mónica Rebuffo y Dra. Andrea Rodríguez Blanco el 27 de febrero de 2013. Director Dr. Jorge Monza, Co-directora Ing. Agr. (MSc) Pilar Irisarri.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todos los que de alguna manera u otra han colaborado en la realización de esta Maestría.

A mi tutor Jorge Monza por depositar su confianza en mí por segunda vez, corregirme la tesis y por estar siempre pendiente en cada paso.

A Pilar Irisarri por sus aportes y disposición en todo momento.

A Mónica Rebuffo por los aportes y por estar presente en la planificación y ejecución de los ensayos a campo. A M^a José Cuitiño y al personal técnico de INIA La Estanzuela que brindaron una mano muy importante en la realización de los ensayos. A Calister S.A. por los materiales y asesoramiento para la realización de los ensayos.

A la gente de Isótopos Estables por permitirme realizar los ensayos y en especial a Cristina por estar siempre dispuesta a ayudarme.

A Pedro por su paciencia en el espectro y por estar siempre dispuesto a responder todas mis dudas con una sonrisa. A Gastón Quero por ayudarme con la estadística.

A Clara Pritsch y Guillermo Galván por sus aportes en los seminarios.

A la ANII por su apoyo con una beca de Maestría.

Al tribunal cuyos aportes mejoraron el resultado final de este trabajo.

A todos mis compañeros de Bioquímica, en especial a mis queridos Maxi, Yoli y Flor por proporcionarme todos esos momentos agradables.

A mi familia y amigos por estar siempre presentes.

A mi Gasty, mi compañero de vida, por su apoyo incondicional.

TABLA DE CONTENIDOS

PÁGINA DE APROBACIÓN-----	II
AGRADECIMIENTOS-----	III
RESUMEN-----	VII
SUMMARY-----	VIII
1. <u>INTRODUCCIÓN</u> -----	1
1.1. INGRESO DE NITRÓGENO EN LOS ECOSISTEMAS-----	1
1.2. SIMBIOSIS RIZOBIO-LEGUMINOSA-----	2
1.2.1. <u>Establecimiento de la simbiosis</u> -----	2
1.2.2. <u>Factores que afectan la nodulación</u> -----	4
1.2.3. <u>Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN)</u> -----	5
1.2.4. <u>Técnicas para la estimación de la FBN</u> -----	6
1.3. USO DE LEGUMINOSAS FORRAJERAS PARA EL MEJORAMIENTO DE PRADERAS-----	8
1.4 BIODIVERSIDAD DE RIZOBIOS-----	11
1.4.1. <u>Estrategias usadas para estimar la diversidad</u> -----	13
1.4.2. <u>Condiciones del suelo que afectan la diversidad de rizobios</u> -----	17
1.5. COMPETENCIA DE LAS CEPAS POR LA OCUPACIÓN DE NÓDULOS--	20
1.5.1. <u>rep-PCR para evaluar la competitividad</u> -----	21
1.5.2. <u>Uso de los genes marcadores en el estudio de competitividad</u> -----	21
1.6. INOCULANTES RIZOBIANOS PARA FORRAJERAS-----	24
1.7. OBJETIVOS -----	27
2. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u> -----	28
2.1. MATERIAL VEGETAL-----	28
2.2. BACTERIAS-----	28
2.2.1. <u>Rizobios</u> -----	28
2.2.2. <u>Escherichia coli</u> -----	29

2.3. CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE BACTERIAS-----	30
2.3.1. <u>Rizobios</u> -----	30
2.3.2. <u>Escherichia coli</u> -----	30
2.4. BIODIVERSIDAD DE LOS AISLADOS-----	31
2.4.1. <u>Aislamiento del ADN genómico</u> -----	31
2.4.2. <u>Generación y análisis de los perfiles ERIC-PCR</u> -----	31
2.4.3. <u>Amplificación de genes</u> -----	32
2.4.4. <u>ARDRA</u> -----	34
2.5. EFICIENCIA SIMBIÓTICA DE LOS AISLADOS -----	34
2.5.1. <u>Preparación del inóculo</u> -----	34
2.5.2. <u>Producción de biomasa en macetas</u> -----	35
2.6. COMPETENCIA Y BIOMASA EN CAMPO-----	36
2.6.1. <u>Determinación de la competencia</u> -----	37
2.6.2. <u>Producción de forraje y número de nódulos</u> -----	38
2.7. COMPETENCIA DE CEPAS EN DIFERENTES SUELOS-----	38
2.7.1. <u>Colecta de suelos</u> -----	38
2.7.2. <u>Marcaje de las cepas con el gen reportero <i>gusA</i></u> -----	39
2.7.3. <u>Verificación de la inserción <i>gusA</i> y cinética de nodulación</u> <u><i>in vitro</i></u> -----	40
2.7.4. <u>Competencia de los inoculantes con las cepas presentes</u> <u>del suelo</u> -----	41
2.7.4.1. Preparación de los inoculantes con cepas marcadas con <i>gusA</i> -----	41
2.7.4.2. Inoculación y siembra en cilindros de suelo- -----	42
2.7.4.3. Ocupación de nódulos-----	42
2.8. USO DEL ¹⁵ N PARA ESTIMAR LA FBN-----	43
2.8.1. <u>FBN por un inoculante vs cepas nativas</u> -----	43
2.8.2. <u>Efecto de la concentración de nitrógeno en el medio</u> <u>sobre la FBN</u> -----	44

3. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u> -----	46
3.1. DIVERSIDAD DE RIZOBIOS QUE NODULAN <i>TRIFOLIUM PRATENSE</i> --	45
3.2. DETERMINACIÓN TAXONÓMICA DE LOS AISLADOS-----	49
3.3. EVALUACIÓN DE AISLADOS SEGÚN SU EFICIENCIA SIMBIÓTICA-----	52
3.4. HABILIDAD COMPETITIVA DE LOS INOCULANTES EN EL CAMPO----	53
3.5. EFICIENCIA SIMBIÓTICA EN CAMPO-----	66
3.6. OCUPACIÓN DE NÓDULOS CON DIFERENTES DOSIS DE INOCULACIÓN-----	68
3.7. EVALUACIÓN A CAMPO DE UNA CEPA EFICIENTE Y FRECUENTE EN NÓDULOS DE TREBOL ROJO-----	72
3.8. COMPETITIVIDAD DE LOS INOCULANTES EN DISTINTOS SUELOS---	73
3.8.1. <u>Validación de los transconjugantes para su uso en ensayos de competencia</u> -----	73
3.8.2. <u>Competitividad de los inoculantes respecto a las cepas nativas de diferentes suelos</u> -----	76
3.9. ESTIMACIÓN DE LA FIJACION DE NITRÓGENO-----	81
3.9.1. <u>Fijación de nitrógeno por el inoculante vs cepas nativas-</u> -----	81
3.9.2. <u>Efecto de la concentración de nitrógeno combinado en el suelo sobre la FBN</u> -----	83
 4. <u>CONCLUSIONES</u> -----	 86
 5. <u>BIBLIOGRAFÍA</u> -----	 87
 6. <u>ANEXO</u> : DIVERSITY AND PHYLOGENY OF RHIZOBIAL STRAINS ISOLATED FROM <i>LOTUS ULIGINOSUS</i> GROWN IN URUGUAYAN SOILS (Artículo aceptado en Applied Soil Ecology).	

RESUMEN

Lotus uliginosus (lotus) y *Trifolium pratense* (trébol) son leguminosas usadas en Uruguay para el mejoramiento de las pasturas. Los rizobios nativos-naturalizados presentes en los suelos son la base para seleccionar cepas y desarrollar inoculantes. En esta tesis, se evaluaron cepas nativas para su posible uso como inoculantes de trébol y se estudió la diversidad y filogenia de rizobios que nodulan lotus. La diversidad de rizobios que nodulan trébol se analizó a partir de 80 aislados de la zona Norte y Sur. La diversidad se situó en un 48 % y la secuencia del gen 16S ARN reveló que son *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii. Las plantas inoculadas con la cepa nativa 317 produjeron más biomasa que las inoculadas con el inoculante comercial U204 en condiciones controladas. Mediante ERIC-PCR se detectó, en campos del Sur, una población de cepas nativas-naturalizadas que compite con los inoculantes introducidos por la formación de nódulos. La habilidad competitiva de los inoculantes vs cepas nativas se estableció marcando con *gusA* los aislados 317, I y la cepa U204, el inoculante comercial. En suelos del Sur la población nativa de rizobios ocupó más del 50 % de los nódulos, pero en suelos del Norte y Este la ocupación por los inoculantes fue del 99 %. La diversidad genética de rizobios que nodulan lotus se evaluó en 111 aislados de 4 sitios. Esta se situó en un 68 % y por ARDRA se establecieron 3 ribogrupos. El análisis filogenético basado en la secuencia del gen 16S ARN, *atpD*, *recA* y *glnII* y de la región ITS indicó que las cepas del ribogrupo A están relacionadas con cepas de *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*. Los aislados del ribogrupo B no se asociaron con ninguna especie de *Bradyrhizobium* sp. descrita y podrían representar una nueva especie de este género. El aislado del ribogrupo C agrupó con la cepa de amplio rango NZP2037 de *Mesorhizobium* sp. Estos rizobios adaptados a las condiciones locales podrían ser usados para el desarrollo de nuevos inoculantes.

Palabras clave: competitividad, *gusA*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*

PROSPECTION AND CHARACTERIZATION OF RHIZOBIA TO DEVELOP INOCULANTS FOR CLOVER AND LOTUS

SUMMARY

Lotus uliginosus (lotus) and *Trifolium pratense* (clover) are legumes used in Uruguay to improve pastures. Native-naturalized rhizobia presents in the soil, are the basis for selecting and developing new inoculants. In this thesis, native strains of clover rhizobia were evaluated for their possible use as inoculants for clover and the diversity and phylogeny of rhizobia nodulating lotus was studied. Diversity of rhizobia nodulating clover was analyzed from 80 isolates of the North and South. Diversity was 48 % and the 16S RNA gene sequence revealed the isolate were associated to *Rhizobium leguminosarum* bv trifolii. The plants inoculated with the native strain 317 produced more biomass than the inoculated with a commercial inoculant U204, under controlled conditions. By using ERIC-PCR, a population of native strains that compete with the inoculants for nodule formation, was detected in southern soils. The competitiveness ability of the inoculants vs native strains was studied, labeling the 317, I and the commercial inoculant U204 strains with *gusA*. In Southern soils, the native rhizobia occupied more than 50 % of the nodules but in Northern and Eastern soils the inoculants occupation was 99 %. Genetic diversity of rhizobia nodulating lotus was assessed in 111 isolates from 4 sites. Diversity was 68 % and 3 ribogroups were settled by ARDRA. Phylogenetic analysis based on the 16S RNA gene sequence, *atpD*, *glnII*, *recA* and ITS region, indicated that ribogroup A strains were associated with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum* strains. Ribogroup B strains were not associated with any kind of *bradyrhizobia* described and may represent a new species of this genus. The ribogroup C strain grouped NZP2037, a broad host range host *Mesorhizobium* sp. These rhizobia may be used for the development of new inoculants adapted to local conditions.

Keywords: Competitiveness, *gusA*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. INGRESO DE NITRÓGENO EN LOS ECOSISTEMAS

El nitrógeno es un elemento esencial para los seres vivos, dado que forma parte de macromoléculas como aminoácidos, ácidos nucleicos y clorofilas, entre otros. Las plantas extraen nitrógeno del suelo en forma de nitrato (NO_3^-) y amonio (NH_4^+) a través de transportadores radiculares, aunque en general se encuentra en cantidades que limitan su crecimiento y por lo tanto la productividad de las pasturas forrajeras. Su principal reservorio se encuentra en la atmósfera bajo la forma de dinitrógeno (N_2) a una concentración cercana al 80 %.

El N_2 es muy estable y no puede ser utilizado como tal por plantas, animales ni hongos. Sólo un grupo minoritario de procariontes denominados diazótrofos, sea en vida libre o asociados a otros organismos, son capaces de reducirlo a NH_4^+ a través de un proceso conocido como Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN). La FBN es un proceso natural que contribuye con el 80 % de la cantidad de nitrógeno fijado en la naturaleza anualmente (250×10^6 toneladas), mientras que el suelo y los fertilizantes aportan un 15 % y las descargas eléctricas un 5 % (Monza y Palacios, 2004).

La simbiosis rizobio leguminosa es la interacción planta-bacteria más estudiada por la importancia agronómica y económica que tiene el cultivo de estas plantas a nivel mundial. En los sistemas agrícolas de nuestra región, algunas simbiosis rizobio-leguminosa de importancia la constituyen *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* - *Trifolium* spp, *Mesorhizobium huakuii* y *Bradyrhizobium* - *Lotus* spp., *R. meliloti*, *Sinorhizobium meliloti* y *Sinorhizobium medicae* - *Medicago* spp, *Sinorhizobium fredii*, *Bradyrhizobium japonicum* - *Glycine* spp.

1.2. SIMBIOSIS RIZOBIO-LEGUMINOSA

1.2.1. Establecimiento de la simbiosis

El establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa comienza con el intercambio de señales entre ambas partes. Las raíces liberan exudados entre los que se encuentran flavonoides, isoflavonoides y no flavonoides (Figura 1). Estos compuestos son quimioatrayentes para los rizobios, promueven el crecimiento bacteriano e inducen la expresión de los genes de nodulación (*nod*) (Skorupska *et al.*, 2010). La localización de los genes *nod* y los genes simbióticos en general varía; en *Bradyrhizobium* y en *Mesorhizobium* se encuentran agrupados en islas simbióticas en el cromosoma (Sawada *et al.*, 2003; Sullivan *et al.*, 2002), mientras que en *Rhizobium* se encuentran en plásmidos simbióticos (Crossman *et al.*, 2008).

Independientemente de la localización, la expresión de los genes *nod* conduce a la producción y secreción de los factores NOD (lipoquitin oligosacáridos). Los factores NOD son específicos y sólo el factor NOD compatible puede inducir la formación del nódulo en la planta huésped (Skorupska *et al.*, 2010). En la raíz el factor NOD induce la curvatura del pelo radical, por donde los rizobios penetran a la planta a través de los hilos de infección y estimulan la formación del primordio nodular. Una vez en el citoplasma de las células los rizobios se diferencian en bacteroides dentro de los simbiosomas, estructuras rodeadas por la membrana peribacteroidal de origen vegetal (Figura 1). El primordio nodular se transforma en nódulo maduro, donde los bacteroides reducen enzimáticamente el N_2 a NH_3 (Maj *et al.*, 2009).

La mayoría de las leguminosas son huéspedes específicos, es decir, sólo pueden ser noduladas por determinado rizobios. Sin embargo, algunos rizobios son extremadamente promiscuos, como lo es la cepa de *Rhizobium* sp. NGR234 que es capaz de nodular a 112 especies huésped (Pueppke y

Broughton, 1999), mientras que otros como *R. leguminosarum* bv. *trifolii* tienen un limitado rango de huésped y nodulan sólo tréboles. Por otro lado, Valverde *et al.* (2005) aislaron y caracterizaron a partir de nódulos de trébol rojo una nueva especie *Phyllobacterium trifolii* que es capaz de nodular *Trifolium pratense* y *Lupinus albus*.

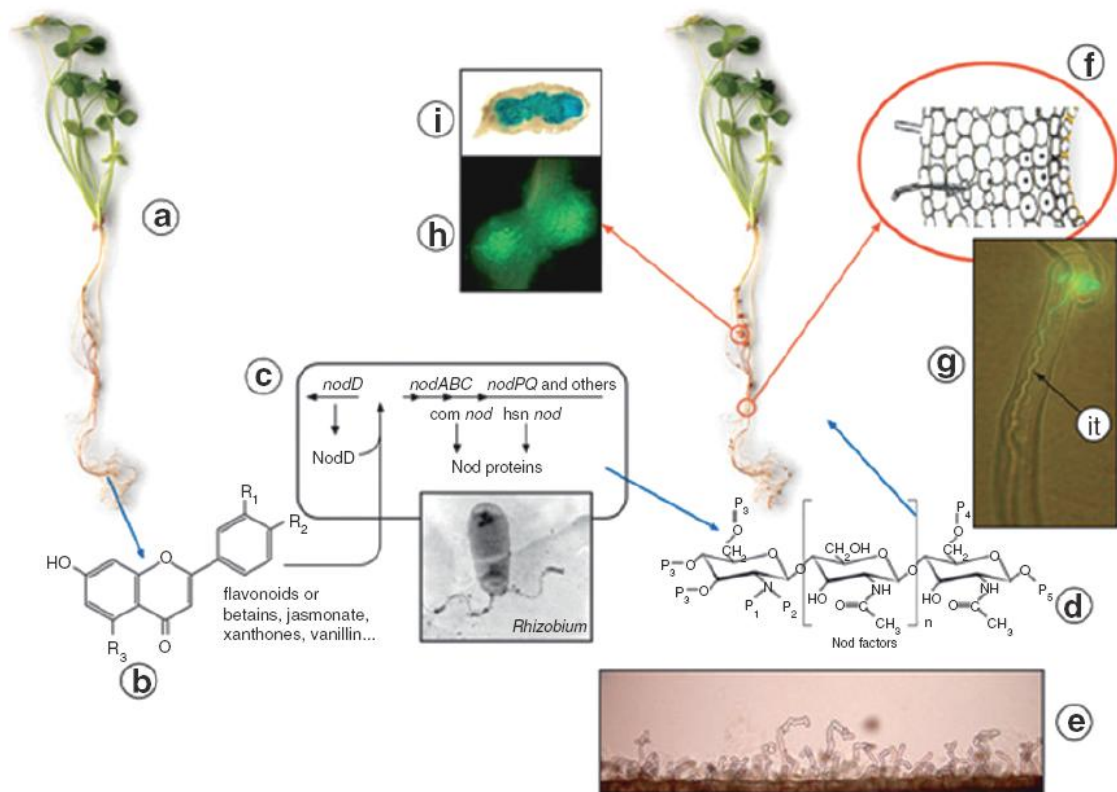


Figura 1. Eventos involucrados en la simbiosis rizobio - leguminosa. Las raíces de las leguminosas (a) exudan compuestos flavonoides (b) que son percibidos por los rizobios (c) y activan los genes *nod*. La expresión de estos genes produce los factores NOD (d) que intervienen en el curvamiento del pelo de la raíz (e) y en el inicio del desarrollo del nódulo (f). Los rizobios se unen a los pelos de la raíz y se forman los hilos de infección (g), por donde penetran en los tejidos de las plantas y se desarrollan los nódulos (h, i) (Tomado y modificado de Skorupska *et al.*, 2010).

En el género *Lotus* se han podido distinguir dos grupos según el rizobio que los nodula: *L. corniculatus* y *L. tenuis*, nodulados típicamente por bacterias del género *Mesorhizobium*, y *L. subbiflorus* y *L. uliginosus* nodulados por bacterias del género *Bradyrhizobium* (Monza *et al.*, 1992). Sin embargo algunas cepas de *Mesorhizobium*, como la NZP2037, tienen amplio rango de hospedero y pueden formar nódulos fijadores de nitrógeno en la mayoría de las especies de *Lotus* (Barrientos *et al.*, 2002). Por otra parte, en el ambiente ocurren eventos de transferencia horizontal de genes entre especies nativas de rizobios e inoculantes introducidos lo cual marca diversificación y estructuración de las poblaciones naturales de rizobios con lo cual el rango de huésped en algunos casos aumenta (Laguerre *et al.*, 2001; Thies *et al.*, 2001).

1.2.2. Factores que afectan la nodulación

La nodulación se ve afectada por la temperatura del suelo, su contenido de agua, acidez, salinidad, concentración de nitrógeno combinado y déficit de fósforo (Liu *et al.*, 2011). En particular, y a los efectos de esta propuesta de tesis, interesó el efecto de la concentración de nitrógeno combinado en el suelo sobre la inducción de nódulos y la competencia.

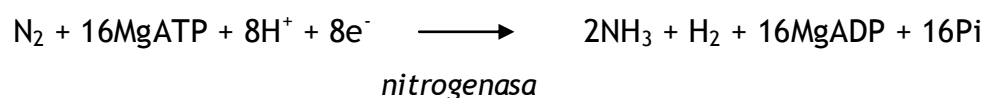
Uno de los factores que determinan la nodulación es la concentración de nitrógeno combinado en el suelo. Se ha demostrado que en el momento de la siembra, la aplicación de nitrógeno combinado como *starter* es ventajosa para el establecimiento de la simbiosis, con concentraciones de NH_4^+ menores a 4 mM y de NO_3^- a 2 mM (Turay *et al.*, 1991). Sin embargo, cuando las concentraciones de nitrógeno combinado son altas, se inhibe la nodulación y por lo tanto disminuye la proporción derivada de la FBN (Gibson y Harper, 1985). La disminución de la nodulación por nitrógeno combinado en suelo puede deberse a la represión de la expresión de genes

nod, a la disminución de la síntesis de lectinas, menor formación de pelos radicales, aborto de los cordones de infección, o inhibición de la transformación de bacterias en bacteroides (Racca y Collino, 2006).

La disminución de la nodulación y de la actividad nitrogenasa en suelos con alto contenido de nitrógeno combinado se debe a que el uso de éste requiere menor gasto energético que la reducción del N₂ atmosférico (Liu *et al.*, 2011). Además se han observado diferencias en la tasa de inhibición de la FBN según la fuente de nitrógeno utilizada. En *Trifolium repens*, Svenning *et al.* (1996) encontraron que la inhibición de la FBN por NO₃⁻ fue mayor que con NH₄⁺ a igual concentración. Gan *et al.* (2004) evaluaron en soja el efecto de concentraciones de nitrógeno mineral altas (10 mM) y bajas (1 y 3,75 mM). Con altas concentraciones de nitrógeno en forma de NO₃⁻ o NH₄⁺ se suprimió significativamente el número de nódulos, el peso seco de los nódulos y el nitrógeno fijado por planta. Sin embargo bajas concentraciones de nitrógeno potenciaron la formación de mayor número de nódulos, peso seco de los nódulos y nitrógeno fijado por la planta.

1.2.3. Fijación de nitrógeno

Todos los diazótrofos tienen a la enzima nitrogenasa como responsable del proceso de reducción del nitrógeno a amonio. Esta enzima está compuesta por dos metaloproteínas, la reductasa dinitrogenasa (proteína Fe) codificada por el gen *nifH* y la dinitrogenasa (proteína Mo-Fe) codificada por los genes *nifD*, *nifK*. Ambas subunidades forman el complejo enzimático de la nitrogenasa, que cataliza una reacción reductiva y endergónica cuya estequiometría teórica es la siguiente:



La reducción de nitrógeno es un proceso energéticamente costoso para el que se requiere de 16 a 18 ATP. La fuente de carbono y poder reductor para la reducción es suplementada por la planta en forma de fotosintatos, que son transportados al bacteroide. El NH_3 producido se exporta a la planta a través de la membrana de peribacteroidal para ser asimilado en el citosol vegetal. Esto constituye una relación favorable para ambos organismos, por lo que se la denomina simbiosis.

1.2.4. Técnicas para la estimación de la FBN

Para estimar la FBN se utilizan diferentes metodologías. La forma más directa y simple de medir la eficiencia de fijación es la comparación de la producción de materia seca de la parte aérea de plantas inoculadas y no inoculadas en un medio libre de nitrógeno (Neira, 1995), debido a que el rendimiento de materia seca de la leguminosa se correlaciona positivamente con la cantidad de nitrógeno derivado de la atmósfera.

Otro método utilizado para medir la FBN es la técnica de reducción del acetileno, que permite cuantificar la actividad nitrogenasa. Esta enzima además de reducir N_2 a NH_3 , puede reducir otros sustratos con triple enlace como el acetileno (C_2H_2) a etileno (C_2H_4). Ambos gases pueden ser detectados y cuantificados por cromatografía de gases (Hardy *et al.*, 1968). Esta estrategia tiene limitaciones debido a que mide la actividad de la nitrogenasa en un momento dado, pero no evidencia lo que ocurre a lo largo del tiempo, entre otras (Danso *et al.*, 1992).

También la FBN puede estimarse mediante la utilización de isótopos de nitrógeno. El nitrógeno tiene 6 isótopos, de los cuales el ^{14}N y ^{15}N son estables y los restantes radiactivos. El isótopo ^{15}N es usado como trazador isotópico ya que presenta mínimas diferencias en las propiedades fisicoquímicas con respecto al isótopo ^{14}N como consecuencia de la diferencia de masa molecular. En la atmósfera la cantidad de ^{15}N es de

0,3663 átomos por 100 del total de N, lo que hace un 99,634 % para el isótopo ^{14}N (Hardarson y Danso, 1990). Esta relación hace posible el uso de materiales enriquecidos en ^{15}N en algunos estudios.

Entre las técnicas isotópicas se encuentran métodos basados en la dilución isotópica de ^{15}N y en la abundancia natural de ^{15}N . La dilución isotópica permite evaluar las diferentes fuentes de nitrógeno de la planta e implica el crecimiento de una planta fijadora de N_2 y no fijadora en un suelo o sustrato enriquecido con ^{15}N . La dosis aplicada debe ser mínima para no afectar el proceso de fijación de nitrógeno, que es lo que se quiere medir. El enriquecimiento en ^{15}N de las plantas fijadoras es diluido por el ^{14}N fijado. El grado de disminución de ^{15}N es un indicador de la cantidad de nitrógeno fijado. Para esto es necesario una planta de referencia no fijadora, que es totalmente dependiente del nitrógeno del suelo para su crecimiento. Una consideración metodológica a tener en cuenta es que la exploración radicular sea similar en ambas, es decir deben obtener nitrógeno de la misma zona del suelo. El error más frecuente en la estimación de FBN ocurre cuando la planta referencia y la leguminosa difieren en la composición isotópica del nitrógeno absorbido del suelo (Danso *et al.*, 1992).

El método de abundancia natural tiene el mismo principio que la técnica de dilución isotópica, pero no se agrega una fuente enriquecida en ^{15}N . Esta técnica se basa en las pequeñas diferencias de abundancia natural de ^{15}N presente en la mayoría de los suelos, respecto al N_2 atmosférico. Es decir, la mayoría de los suelos son ligeramente enriquecidos en ^{15}N (Ledgard y Steele, 1992) debido a procesos físicos químicos y biológicos. En la medida que el ^{15}N acumulado en el suelo es diluido por el nitrógeno fijado se puede estimar la fijación de nitrógeno (Danso *et al.*, 1992).

El espectrómetro de masa es uno de los equipos utilizados para determinar el ^{15}N y ^{14}N . Los métodos basados en determinar isótopos del N tienen la ventaja de que pueden estimar las contribuciones individuales del nitrógeno del suelo, fertilizante y la FBN, además de proveer una medida integrada de la cantidad de nitrógeno fijado acumulado por el cultivo durante toda la estación de crecimiento. También son útiles para evaluar efectos tales como el nitrógeno combinado del suelo sobre la FBN (Danso *et al.*, 1992).

1.3. USO DE LEGUMINOSAS FORRAJERAS PARA EL MEJORAMIENTO DE PRADERAS

Las leguminosas son la base de la producción de leche y carne desde hace siglos (Russelle, 2001). Estas plantas juegan un rol clave en el ecosistema porque aumentan el contenido de nitrógeno del suelo a través de la FBN en simbiosis con bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* y *Allorhizobium*. Asimismo, cuando se manejan adecuadamente las leguminosas son fuentes de proteínas, minerales (Mg^{2+} y Ca^{2+}), fibras y energía (Carámbula, 2003).

Además del alto valor nutritivo, las leguminosas forrajeras contribuyen a la sostenibilidad de la rotación, reducen la erosión y requerimientos de fertilización, mejoran la estructura del suelo y aumentan la materia orgánica incrementando la rentabilidad agrícola (Rebuffo *et al.*, 2006). En Uruguay, las leguminosas usadas en el mejoramiento de praderas son principalmente lotus (*Lotus corniculatus*, *L. uliginosus* y *L. subbiflorus*) y tréboles (*Trifolium pratense* y *T. repens*, trébol rojo y trébol blanco respectivamente).

Las leguminosas pertenecen a la familia Fabaceae que a su vez se divide en tres subfamilias *Caesalpinoideas*, *Mimosoideas* y *Papilonoideas*. El género *Lotus*, de origen mediterráneo, pertenece a la subfamilia *Papilonoideae* e incluye más de 180 especies. Son plantas herbáceas que pueden ser anuales o perennes y están adaptadas a un amplio rango de ambientes. Cuatro especies de este género, *L. corniculatus*, *L. glaber*, *L. uliginosus* y *L. subbiflorus*, han sido domesticadas y mejoradas por selección y tienen un importante valor agronómico a nivel mundial (Díaz *et al.*, 2005). Estas leguminosas presentan buena adaptación a suelos con baja disponibilidad de fósforo, taninos que impiden la ocurrencia de meteorismo (Rebuffo *et al.*, 2007) y alto aporte de proteína que se genera básicamente a partir de nitrógeno derivado de la FBN (Labandera *et al.*, 2005).

El cultivar tetraploide ‘Grasslands Maku’ de *L. uliginosus*, originario de Nueva Zelanda, es el más usado en Uruguay, aún cuando se han evaluado otros cultivares diploides (Hernández *et al.*, 2005), debido, entre otras características, al alto valor proteico y producción forrajera, así como a la capacidad de desarrollarse en suelos ácidos y de soportar anegamiento (Díaz *et al.*, 2005).

En general los lotus establecen simbiosis específicas con rizobios pertenecientes a los géneros *Mesorhizobium* y *Bradyrhizobium* (Jordan, 1982; Pankhurst *et al.*, 1986). *L. corniculatus* y *L. tenuis* son nodulados típicamente por bacterias del género *Mesorhizobium*, mientras que *L. subbiflorus* y *L. uliginosus* son nodulados por bacterias del género *Bradyrhizobium* (Monza *et al.*, 1992). En Uruguay *Lotus uliginosus* es inoculado desde 1995 con la cepa comercial U526 (= NZP2309) introducida de Nueva Zelanda.

Por otra parte, las especies del género *Trifolium* más cultivadas en Uruguay son el trébol rojo y el trébol blanco. Estas leguminosas y las cepas

usadas como inoculantes son introducidas en nuestro país. El trébol rojo es originario de Asia menor y el Sudeste Europeo, mientras que trébol blanco tiene origen en Norte de África y Europa. Ambos tréboles tienen buena capacidad para fijar nitrógeno asociados a rizobios y también es valorada su tolerancia relativa a condiciones impuestas por suelos de acidez moderada (pH 5,2 a 5,6) (Izaguirre, 1995).

Trifolium pratense y *Trifolium repens* establecen simbiosis con bacterias del género *Rhizobium*. En Uruguay estas leguminosas son inoculadas con la cepa U204 de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolli*. Esta cepa obtenida de Nitragin (USA) fue evaluada y seleccionada por el Laboratorio de Microbiología de suelo del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP) en la década del 60'. Desde esa época ha sido recomendado el uso de la cepa U204 como inoculante comercial para ambos tréboles.

En Uruguay los tréboles tienen problemas de implantación de mayor severidad en campos sin historia de inoculación. Las especies utilizadas tienen dificultad para lograr la nodulación y fijación exitosa en determinados suelos debido, bien a la ausencia de rizobios específicos, o a la presencia de cepas nativas que nodulan a *Trifolium polymorfum* (trébol de campo o polimorfo). Estas cepas son parásitas en los tréboles cultivados y compiten por la ocupación de nódulos con el inoculante comercial (Dutto, 2002).

El trébol blanco es el que tiene mayor problema de implantación en Uruguay. Una de las causas es el tamaño pequeño de su semilla, que dificulta llegar al número adecuado de rizobios del inoculante en la superficie de la semilla (Dutto, 2002), lo que tiene consecuencias en la implantación. Aún cuando el trébol rojo tiene un comportamiento

simbiótico similar al trébol blanco, los problemas de nodulación suelen ser menores, debido al mayor tamaño de semilla (Dutto, 2002).

El cultivo de las leguminosas forrajeras se ha visto afectado a consecuencia de la expansión del área agrícola, que genera un desplazamiento a suelos menos productivos y con mayores limitaciones. Además, para esos suelos es necesario contar con diferentes cepas que puedan ser usadas como inoculantes eficientes que ayuden a la implantación del cultivo.

Por otra parte, la temperatura es un factor determinante de la nodulación, en este sentido el trébol se siembra en Uruguay en los meses de marzo a mayo. Si se siembra sobre el final del período, considerando a esto una siembra tardía, la temperatura determina problemas de implantación. En el laboratorio de Bioquímica se realizó un ensayo de nodulación a diferentes temperaturas de *T. repens* con el inoculante comercial para trébol, la cepa U204 de *Rhizobium leguminosarum*, para evaluar el efecto de la temperatura sobre la nodulación. La inhibición de la nodulación en trébol blanco fue clara cuando la temperatura fue igual o inferior a 15 °C (Patricio Gómez y Marcos Miller com. pers., 1/8/12).

1.4. BIODIVERSIDAD DE RIZOBIOS

Los rizobios son habitantes comunes del suelo que se encuentran formando parte de comunidades microbianas. Estas comunidades pueden ser caracterizadas a través del estudio de la diversidad de especies que la componen. La diversidad incluye la composición genética de los microorganismos en el ambiente o hábitat donde se encuentran y su rol ecológico o funcional dentro del ecosistema (Schinner, 1996; Hunter-Cevera, 1998).

La diversidad incluye dos componentes: la riqueza, entendida como el número de especies, y la abundancia relativa de éstas o distribución de los

individuos entre esas especies (Begon *et al.*, 2006). Para esto se usan diferentes índices con el fin de caracterizar a las comunidades bacterianas del suelo. Uno de ellos es el índice de diversidad de Simpson (D), que se calcula a partir de la proporción de individuos de cada especie i que contribuyen al total de la muestra (Begon *et al.*, 2006). El índice de diversidad D viene dado por:

$$D=1/\sum p_i^2$$

donde p_i es la proporción de individuos de la especie i

El valor del índice D depende de la riqueza de especie y de la distribución de individuos entre las especies (equitatividad). Para una riqueza dada, D aumenta con la equitatividad y para una equitatividad dada, D aumenta con la riqueza.

Otro índice ampliamente usado en estudios de diversidad es el índice de Shannon-Weaver (H) (Coutinho *et al.*, 1999; Palmer y Young, 2000), que viene dado por:

$$H=-\sum p_i(\ln(p_i))$$

donde p_i es la proporción de individuos de la especie i .

El índice H va de 0, para comunidades con una sola especie, hasta valores altos para comunidades con muchas especies (Brown y Bowman, 2001).

Si bien los índices de diversidad son ampliamente usados en varios estudios, se han encontrado ciertas limitaciones: en el caso particular del índice Simpson se considera que es difícil de interpretar debido a que representa una medida combinada de riqueza y dominancia. Además las relaciones aritméticas no han sido totalmente descriptas y validadas para

las comunidades y poblaciones de rizobios. Por otra parte los métodos de tipificación tienen diferente poder discriminatorio, lo cual influye en el número y el tipo de cepas identificadas y por lo tanto se debe tener precaución dado que no todos los estudios son realmente comparables (McInnes *et al.*, 2004).

1.4.1. Estrategias usadas para estimar la diversidad

La diversidad de especies o de cepas de rizobios presentes en el suelo puede ser estimada usando diferentes métodos. Hace 25 años, para clasificar a los rizobios se consideraba la leguminosa que nodulaban, el tiempo de generación, la utilización de distintos compuestos carbonados y la acidificación o alcalinización del medio. Así se establecieron dos grupos: los rizobios de crecimiento rápido (*Rhizobium*) y de crecimiento lento (*Bradyrhizobium*) (Monza *et al.*, 1992; Irisarri *et al.*, 1996).

Para la identificación de cepas de rizobios se usaron diferentes aproximaciones como la producción de melanina un pigmento de color marrón-negro (Cubo *et al.*, 1988). Con esta estrategia Rodríguez Blanco *et al.* (2010) y Castro *et al.* (2000) pudieron monitorear cepas con cierta facilidad y confiabilidad. También se han usado para estudios de diversidad de rizobios el perfil de lipopolisacáridos (LPS) como para la identificación de *Bradyrhizobium* aislados de *Lotus subbiflorus* (Santamaría *et al.*, 1999). Sin embargo los perfiles de LPS tienen una limitación ya que los patrones dependen de enzimas biosintéticas, y no hay prueba de correlación entre este tipo de enzima de síntesis de LPS y el genoma bacteriano.

Otra técnica ampliamente usada para identificar cepas de rizobios ha sido la resistencia a antibióticos (Turco *et al.*, 1986; Ramírez *et al.*, 1998; Alexandre *et al.*, 2006). Esta metodología tiene limitaciones debido a que los genes de resistencia a antibióticos en algunas poblaciones están

codificados en plásmidos que pueden ser fácilmente transferidos o perdidos. También se utilizaron métodos serológicos, rápidos y útiles para la identificación de algunas bacterias. Aunque este tipo de análisis tiene la limitación de que algunos aislados presentan reacciones cruzadas (Thies *et al.*, 2001).

El perfil de plásmidos y de proteínas totales también han ido usados con el fin de identificar cepas (Monza *et al.*, 1992; Irisarri *et al.*, 1996). Los plásmidos están presentes en tamaños y números variables y proporcionan una base para la caracterización de una cepa (Monza *et al.*, 1992; Corich *et al.*, 2001). Sin embargo el análisis de diversidad según el perfil de plásmidos debe ser tomado con precaución ya que en *Rhizobium leguminosarum* los plásmidos pueden transferirse de una célula a otra (Ibekwe *et al.*, 1997) o perderse. La técnica SDS-PAGE también fue utilizada para caracterizar cepas por el perfil de proteínas totales (Monza *et al.*, 1992; Zahran *et al.*, 1994). Pereira *et al.* (2006) utilizaron esta técnica para evaluar una población de *Rhizobium leguminosarum* biovar *viceae* en presencia de metales pesados. Por otra parte, el perfil de proteínas totales tiene poca capacidad de discriminar entre aislados relacionados (Thies *et al.*, 2001) porque varía con el estado de desarrollo del cultivo, y sólo da información cuando los perfiles son muy diferentes.

Si bien estas técnicas han sido utilizadas en estudios de diversidad, como se vio tienen limitaciones tanto en la identificación precisa de cepas como las que derivan de las dificultades para su aplicación a muchas muestras, como es necesario en ensayos de campo.

Otra forma de estimar la diversidad de los rizobios es mediante la generación de patrones genómicos obtenidos con *primers* específicos dirigidos a secuencias repetitivas dispersas en el genoma, que se amplifican por la *polymerase chain reaction* (PCR) (Mantilla *et al.*, 2004). La PCR

permite generar patrones constantes de fragmentos del ADN amplificado y analizar a partir de ellos la variabilidad entre cepas de rizobios, proporcionando lo que se consideran huellas genéticas (*fingerprints*) adecuadas para su tipificación (Castro y Ferreira, 2006).

Algunos de los elementos repetidos en el genoma que se han empleado para la tipificación de bacterias son los elementos repetitivos extragénicos palindrómicos, REPs (Stern *et al.*, 1984), las secuencias consenso intergénicas repetidas de enterobacterias, ERIC (Versalovic *et al.*, 1991; de Bruijn, 1992) y los elementos BOX localizados en regiones intergénicas.

Con el uso de *primers* ERIC se han realizado estudios de diversidad en *Bradyrhizobium* sp. aislados de nódulos de *Lotus uliginosus* (Batista *et al.*, en prensa), de *Mesorhizobium* sp. aislados de *L. corniculatus* (Sotelo *et al.*, 2011; Agius *et al.*, 1997), así como de aislados de *R. leguminosarum* obtenidos de nódulos de *Trifolium pratense* (Hernández, 2011). Lorite *et al.* (2011) usando *primers* REP analizaron la diversidad de aislados que nodulan *L. uliginosus* de dos regiones de Portugal. Por otra parte rizobios de suelos de Brasil han sido caracterizados usando *primers* BOX (Barcellos *et al.*, 2007; Batista *et al.*, 2007; Pinto *et al.*, 2007).

Para realizar estudios filogenéticos se utilizan frecuentemente como marcador molecular los genes 16S ARN y 23S ARN y la secuencia espaciadora (ITS) ARN 16S - ARN 23S (Graham *et al.*, 1991). El gen 16S ARN que codifica para la subunidad pequeña del ribosoma, es un buen marcador molecular para construir filogenias de linajes a nivel de dominio, división, y género. En algunos casos usando este gen se puede llegar a determinar especie. Sin embargo, dada la alta conservación de éste, a veces no es posible la determinación a nivel de especie (Lloret y Martínez-Romero, 2005).

Una alternativa para buscar información filogenética y taxonómica es al análisis del patrón de restricción del amplificado del gen 16S ARN conocida como *amplified ribosomal DNA restriction analysis* (ARDRA). El análisis de los patrones generados con esta técnica puede ser utilizado para estudios de identificación taxonómica de rizobios (Laguerre *et al.*, 1994; Vandamme *et al.*, 1996).

Por otro lado, la secuencia contenida en el espacio intergénico (ITS) situado entre los genes 16 y 23S ARNr exhibe significantes variaciones en la longitud y secuencia nucleotídica a nivel de género y especie (Barry *et al.*, 1991; van Berkum y Fuhrmann, 2000). Sin embargo, también tiene limitaciones para estimar relaciones filogenéticas debido a que resuelve pobremente las relaciones evolutivas en algunos casos (Vinuesa y Silva, 2004).

De manera alternativa, las inferencias filogenéticas pueden establecerse en base a secuencias de genes *housekeeping*, ampliamente distribuidos entre los taxones, presentes en copia simple y distribuidos por todo el genoma (Gevers *et al.*, 2005). Entre estos genes se encuentran el *atpD*, *recA*, *rpoA*, *rpoB*, *thrC*, *dnaK*, *dnaJ*, *glnII*, *gap*, *glnA*, *gltA*, *gyrB*, *pnp*, que son utilizados en estudios filogenéticos (Gaunt *et al.*, 2001; Vinuesa *et al.*, 2008; Stepkowski *et al.*, 2005; Turner y Young, 2000; Rivas *et al.*, 2009).

Las filogenias establecidas con genes simbióticos como *nifH* y los genes del operón *nodABC* (Haukka *et al.*, 1998; Laguerre *et al.*, 2001) a menudo evidencian que la historia evolutiva difiere de la establecida con los genes cromosomales, estas diferencias a menudo son explicadas por eventos de transferencia horizontal de genes (Haukka *et al.*, 1998; Laguerre *et al.*, 2001). Además, la filogenia establecida con los genes *nod* ha permitido poner en evidencia la coevolución entre la planta huésped y la especie bacteriana que la nodula (Dresler-Nurmi *et al.*, 2009).

Los genes *housekeeping* que codifican proteínas, han sido propuestos como marcadores filogenéticos para distinguir especies cercanamente relacionadas (Stackebrandt *et al.*, 2002). Estos genes tienen una tasa de evolución más rápida que el gen 16S ARNr, pero son lo suficientemente conservados para mantener la información genética. De esta forma, los árboles filogenéticos contruidos a partir de las secuencias de estos genes pueden concatenarse para el análisis, de manera que la señal filogenética se potencia mediante clados fuertemente apoyados (Vinuesa *et al.*, 2005). Por esta razón, el análisis combinado de varios genes *housekeeping* *multilocus sequence analysis* (MLSA) se usa para dilucidar relaciones taxonómicas entre especies (Christensen *et al.*, 2004; Rivas *et al.*, 2009). Igualmente el uso de MLSA está limitado por la disponibilidad de secuencias en las bases de datos (Rivas *et al.*, 2009).

Debido a las restricciones de las técnicas individuales, la taxonomía de rizobios se basa en una aproximación polifásica (Vandamme *et al.*, 1996) es decir con la integración de información fenotípica, genotípica y filogenética.

1.4.2. Condiciones del suelo que afectan la diversidad de rizobios

La diversidad de rizobios se ve afectada por diferentes factores edáficos que influyen tanto en el número de especies como en el de individuos. Uno de estos factores es la temperatura, que afecta la supervivencia y determina la persistencia de los rizobios en el suelo. Aislados tolerantes al frío y al calor han sido reportados en diversos estudios (Drouin *et al.*, 2000; Prevost *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2002). Si bien el efecto de la temperatura es cepa dependiente, en general los rizobios tienen pobre crecimiento a temperaturas por debajo de los 10° C, pero toleran hasta 4° C (Graham, 1992).

El pH del suelo también afecta la diversidad de rizobios. Mientras el número de rizobios en suelos neutros puede alcanzar 10^5 UFC.g⁻¹, en suelos moderadamente ácidos usualmente no excede las 10^2 UFC.g⁻¹ (Brockwell *et al.*, 1991). En general, los rizobios de crecimiento lento *Bradyrhizobium* son más tolerantes a la acidez que los rizobios de rápido crecimiento como *S. meliloti*, *S. medicae*, *R. etli* y *R. leguminosarum* (Brockwell *et al.*, 1991). Estos autores encontraron que *S. meliloti* tuvo un promedio de 89.000 UFC g⁻¹ suelo en suelos de pH alcalinos, pero sólo 37 UFC.g⁻¹ en suelos con pH<6. Aunque *S. meliloti* parece más sensible al pH que la planta huésped, la alfalfa, la acidez del suelo influye tanto sobre el crecimiento de la leguminosa como en el proceso de infección (Hungria y Vargas, 2000). En muchos de nuestros suelos la alfalfa presenta problemas de implantación a pH inferiores a 5,5, ocasionando además mermas de rendimiento y menor persistencia (Morón, 2000).

También la disponibilidad de agua en el suelo puede determinar la diversidad de rizobios. La disponibilidad de este recurso afecta el crecimiento de los microorganismos alterando la difusión y concentración de nutrientes en el suelo. Los rizobios tienen un amplio rango de tolerancia al estrés hídrico, independientemente del criterio taxonómico y relaciones filogenéticas usadas (Sadowsky, 2005). De todas formas Bushby y Marshall (1977) propusieron que los rizobios de *Bradyrhizobium* sp. tolera más el estrés hídrico que otros rizobios, aunque se ha reportado lo opuesto (Mahler y Wollum, 1981). Por otro lado, Sotelo *et al.* (2011) observaron que la diversidad de rizobios que nodulan *Lotus corniculatus* en suelos de las regiones norte y sur de Uruguay era similar, independientemente de la disponibilidad de agua del suelo.

La diversidad de rizobios también se ve afectada por metales pesados en el suelo. En general la presencia de estos metales contaminantes disminuye la diversidad de rizobios (Castro *et al.*, 2003). Sin embargo se

han reportados casos en que la presencia de metales pesados redujo el número de rizobio pero la riqueza de cepas no se vio afectada (Laguerre *et al.*, 2006).

El aumento de la concentración de sal tiene efectos perjudiciales sobre las poblaciones microbianas del suelo debido al estrés osmótico e iónico que esta genera. Si bien en Uruguay no hay suelos salinos, en otras regiones la concentración de sal presente en el suelo constituye un problema. Estrella *et al.* (2009) observaron que la diversidad de simbiontes de *L. tenuis* en la cuenca del Río Salado (Argentina) fue menor en suelos salinos y alcalinos que en suelos con condiciones menos estresantes.

También las prácticas de manejo del suelo afectan la diversidad de rizobios debido a que se crean ambientes altamente selectivos y homogéneos (Martínez-Romero y Caballero-Mellado, 1996). En este sentido Kaschuk *et al.* (2006) evaluaron la diversidad genética de rizobios que nodulan *Phaseolus vulgaris* en sistemas de laboreo convencional y de no laboreo, encontrando mayor diversidad en este último sistema. Este resultado puede deberse a que el sistema de no laboreo es más homogéneo dado que tiene menos oscilaciones de temperatura, mayor contenido de humedad del suelo y disponibilidad de C y N para los microorganismos, comparado con el laboreo tradicional (Hungría y Vargas, 2000).

1.5. COMPETENCIA DE LAS CEPAS POR LA OCUPACIÓN DE NÓDULOS

La competencia por la nodulación es un carácter cuantitativo, determinado por la capacidad de una cepa de rizobio de ocupar los nódulos de la leguminosa huésped, en presencia de otras cepas del suelo (Dowling y Broughton, 1986). La competencia es un fenómeno complejo que depende de parámetros del suelo y de características genéticas, tanto del rizobio como de la planta huésped (Thies *et al.*, 1992). La habilidad competitiva es uno de los factores determinantes en el éxito de la inoculación rizobiana.

Muchos suelos contienen rizobios nativos-naturalizados que son altamente competitivos, mejor adaptados a las condiciones locales (Sadowsky y Graham, 1998) por lo que constituyen barreras que comprometen la habilidad de las cepas introducidas para ocupar nódulos. Esto puede tener consecuencias negativas, cuando esas asociaciones simbióticas no son eficientes fijando nitrógeno (Denton *et al.*, 2002), e incluso se pueden establecer relaciones parásitas. En trébol rojo y trébol blanco ocurre una situación de este tipo en suelos donde hay cepas nativas que nodulan trébol polimorfo, y son parásitas en trébol rojo y trébol blanco (Dutto, 2002).

Ha sido difícil evaluar la competencia a campo entre cepas nativas e inoculantes porque esto implica contar con técnicas precisas para identificar un alto número de aislados. Esto ha llevado a que estudios de este tipo se han realizado en condiciones de laboratorio y en soportes artificiales, alejados de las condiciones naturales del suelo. Dado el avance de las técnicas moleculares, se han desarrollado varios métodos de detección de ácidos nucleicos para su uso en la ecología de rizobios.

1.5.1. rep-PCR para evaluar la competitividad

La evaluación de la habilidad competitiva de rizobios se ha estudiado mediante el empleo de varias técnicas ya descritas en el apartado 1.4.1. entre ellas las técnicas moleculares que son útiles para estudios de diversidad como también para identificar cepas usadas como inóculo, dado que cada cepa posee un perfil característico (Duodu *et al.*, 2006). Menna *et al.* (2009) caracterizaron 68 cepas utilizadas como inoculante comercial con *primers* BOX. Los resultados confirmaron que el BOX-PCR es una herramienta útil para el control de calidad de inoculantes y para la caracterización preliminar de una colección de rizobios. Esta misma metodología fue utilizada por Camargo (2012) en un estudio realizado a campo en INIA la Estanzuela, con el fin de monitorear la habilidad competitiva del inoculante comercial, cepa U526 de *Bradyrhizobium* sp, en un nuevo cultivar de *L. uliginosus* diploide.

Duodu *et al.* (2007) estudiaron la variación genotípica de aislados de rizobios que nodulan *T. pratense* en suelos de Escandinavia utilizando *primers* ERIC. Los resultados mostraron que si bien los aislados se agruparon según la región geográfica, hubo un perfil altamente frecuente sugiriendo que estos aislados con igual perfil estaban mejor adaptados a las condiciones locales y por lo tanto fueron más competitivos en la planta huésped.

1.5.2. Uso de genes marcadores en estudios de competitividad

Los estudios de competencia pueden ser realizados mediante el uso de genes reporteros introducidos en el genoma bacteriano, como el gen *gusA* y *celB* (Sessitsch *et al.*, 1998). El esquema del procedimiento se resume en la figura 2. El gen *gusA* codifica para una enzima, la β -glucoronidasa (GUS), que escinde sustratos de tipo glucurónidos como XglcA (5-bromo-6-cloro-3-

indolyl- β -D-glucuronide) con liberación de un producto de color azul, a través del cual se visualiza (Figura 3).

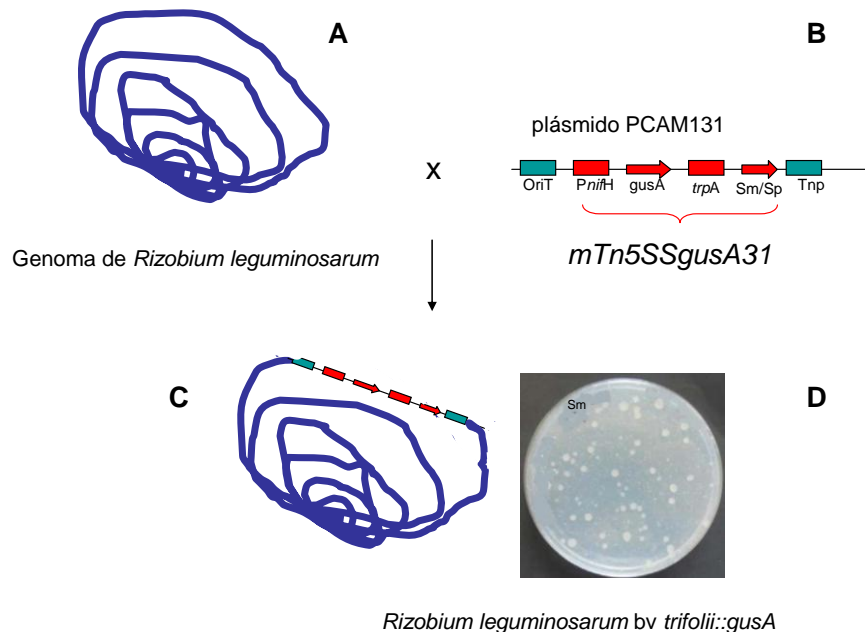


Figura 2. Esquema de la conjugación biparental. (A) rizobio receptor, en nuestro caso *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* y (B) cepa donadora, en nuestro caso *E. coli* S17-1 λ -pir portadora del plásmido PCAM131. (C) inserción del transposón en el genoma del receptor (D) Placa con los transconjugantes seleccionados en medio con antibióticos.

El uso de genes delatores requiere, en primer lugar, insertar en el cromosoma bacteriano un transposón (Figura 2) que contiene el gen en cuestión, en nuestro caso *gusA*. Con la bacteria marcada se inoculan semillas que se siembran en suelos en los que hay rizobios nativos, o se inoculan los suelos donde se siembran las semillas. Una vez crecidas las plantas y formados los nódulos, estos se incuban en presencia del sustrato X-Gluc y se determina a simple vista cuales han sido ocupados por la cepa marcada, que quedan de un azul intenso, y cuales con las cepas nativas que no quedan azules.

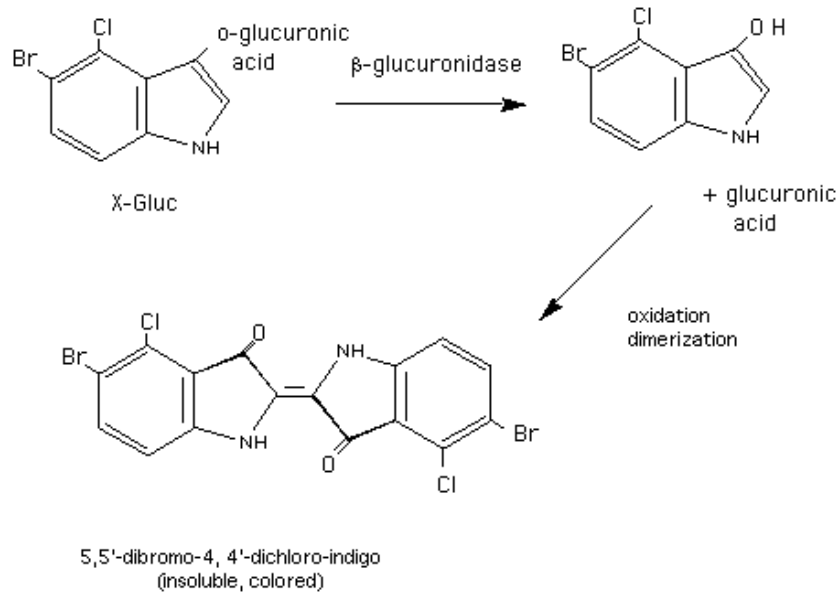


Figura 3. Reacción catalizada por la β -glucoronidasa. El X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucurónico) es escindido por la enzima β -glucoronidasa para producir ácido glucurónico y cloro-bromoindigo. El cloro-bromoindigo dimeriza para producir el precipitado azul insoluble dicloro-dibromoindigo.

El empleo de este marcador tiene la ventaja de ser adecuado para estudios de interacciones planta-microorganismo, dado que la actividad GUS naturalmente no se detecta en plantas o en muchas bacterias de importancia agrícola como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium*, *Azospirillum* y *Pseudomonas* (Wilson *et al.*, 1995). El marcador *gusA* es particularmente apropiado para estudios de competencia de rizobios ya que el ensayo detecta la cepa marcada dentro de los nódulos en el sistema de raíces (Sessitsch *et al.*, 1998). Esta metodología es sencilla dado que los nódulos se tiñen, lo que no hace necesario el aislamiento de bacterias desde nódulos ni la extracción y amplificación de ADN, procedimientos a seguir cuando se usan las técnicas de tipificación basadas en PCR. La principal limitante del uso de genes delatores es que los ensayos no pueden realizarse en el campo, dado que se usan microorganismos modificados genéticamente. Pero sí se pueden usar si el suelo se confina en cilindros,

macetas etc. y el ensayo se realiza en condiciones controladas. Con esta estrategia nos propusimos evaluar la competencia en diferentes suelos de Uruguay.

Denton *et al.* (2003) usaron cepas de rizobio marcadas con *gusA* para evaluar la habilidad competitiva entre rizobios nativos y el inoculante de *Trifolium alexandrinum*. En este estudio se marcó con *PnifH-gusA* a 2 aislados de campo que dominaron la ocupación de nódulos

1.6. INOCULANTES RIZOBIANOS PARA FORRAJERAS

Uno de los objetivos del estudio de poblaciones de rizobios nativos - naturalizados en distintos suelos y localizaciones geográficas es la posibilidad que entre ellos se puedan seleccionar cepas para usarse como inoculantes. En la producción de inoculantes la selección de cepas es el comienzo del proceso y cuanto mayor es la diversidad de éstas mayor es la base sobre la que se realizará la selección. Los principales criterios que se contemplan en la selección de cepas son la efectividad e infectividad, evaluadas en una secuencia que va desde condiciones controladas (laboratorio e invernáculo) al campo.

Así, la inoculación es una tecnología desarrollada con el fin de incorporar rizobios altamente infectivos y eficientes en las leguminosas de interés agronómico. Los inoculantes rizobianos son formulaciones comerciales, con microorganismos vivos, para aplicarse a la semilla o al suelo durante la siembra. Las cepas más eficientes serán aquellas que ocupen la mayor cantidad de nódulos medianos y grandes, ubicados en raíz principal, lo que favorece una rápida y prolongada fijación. Esto es acompañado por una mayor producción de materia seca. Los rizobios menos eficientes inducen nódulos más pequeños, de coloración verde. De esta forma, el uso de inoculantes incrementa la FBN y permite reducir la

aplicación de fertilizantes nitrogenados químicos, por lo que favorecen el desarrollo de una agricultura sustentable.

Como se mencionó anteriormente, la principal característica de una cepa para ser usada como inoculante es ser capaz de producir nódulos y fijar N_2 en una determinada leguminosa. Pero para llegar a esto debe competir con la población de rizobios presentes en el suelo. Además, el inoculante también debe formar nódulos y fijar N_2 en presencia del nitrógeno combinado presente en el suelo o con la dosis de este agregada como *starter*, crecer en los medios de cultivo usados en la industria y dispersarse en el soporte que se use. La cepa seleccionada tiene que sobrevivir sobre las semillas inoculadas, persistir en el suelo y colonizarlo en ausencia de la leguminosa huésped, ser tolerante a factores bióticos y abióticos, mantener estabilidad genética y ser compatible con agroquímicos (Stephens y Rask, 2000; Herridge, 2007).

Un inoculante debe proveer abundante número de rizobios por gramo de producto. En Uruguay, la exigencia establecida por el MGAP es de 2×10^9 rizobios por gramo de producto en el momento de la elaboración y de 1×10^9 rizobios por gramo de producto al vencimiento, a los 6 meses.

En los últimos años la expansión del área agrícola ha generado un desplazamiento de las explotaciones lecheras y ganaderas intensivas a suelos con mayores limitaciones (DIEA, 2007), lo que hace necesario contar con inoculantes que permitan mejorar la implantación, producción y duración de las praderas en este nuevo escenario. Más allá de esta situación, se ha registrado una disminución de la materia seca de las pasturas de trébol en diferentes zonas de Uruguay, después del segundo año de sembradas (Rodríguez Blanco *et al.*, 2010).

A su vez, se viene dando un abandono progresivo de los agricultores de la práctica de inocular, probablemente porque en muchas situaciones no obtengan los beneficios esperados en trébol y lotus (Acosta *et al.*, 2008). Recientemente se han publicado por CAF (Cooperativa Agraria Federada) los datos sobre el uso de inoculación en trébol blanco, trébol rojo y lotus en las siembras asociadas de la región agrícola y en el marco del Proyecto Ampliación de la Base Genética de Leguminosas Forrajeras Naturalizadas Para Sistemas Pastoriles Sustentables (Acosta *et al.*, 2008). Esta encuesta puso en evidencia que el 52 % de los productores no inocula trébol blanco y el 22 % no inocula trébol rojo, una práctica que se asumía como adoptada por la totalidad de los productores (Labandera, 2007). Por esto se hace necesario profundizar en el conocimiento de la interrelación entre las especies introducidas y el ambiente donde se siembran y generar información sobre la diversidad y competitividad de los rizobios que las nodulan. Por esto se evaluaron en esta tesis rizobios nativos-naturalizados que nodulan trébol rojo y *Lotus uliginosus*. En relación a los rizobios que nodulan *L. uliginosus* los resultados son los primeros en Sudamérica sobre la diversidad y filogenia de *Bradyrhizobium* que nodulan a esa leguminosa, y dieron lugar a una publicación incluida en el Anexo.

1.7. OBJETIVOS

Objetivo general

En este trabajo se presentan dos abordajes con un objetivo común: el contar con cepas nativas aptas para desarrollar inoculantes que permitan mejorar la productividad y persistencia de las praderas en el contexto actual de desplazamiento de las pasturas a suelos marginales.

Objetivos específicos

1. Determinar la eficiencia simbiótica y competitividad de las cepas seleccionadas para ser usadas como inoculantes de trébol rojo en campo
2. Evaluar cepas nativas seleccionadas según la competitividad frente a rizobios que nodulan tréboles presentes en diferentes suelos.
3. Analizar el efecto del nitrógeno combinado en el suelo sobre la FBN en la simbiosis rizobio - trébol rojo.
4. Establecer la diversidad y filogenia de rizobios que nodulan *Lotus uliginosus* (ANEXO).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MATERIAL VEGETAL

Se usó como hospedero *Trifolium pratense* L. cv Estanzuela 116 (trébol rojo), cedido por la Ing. Agr. Mónica Rebuffo, INIA La Estanzuela.

2.2. BACTERIAS

2.2.1. Rizobios

Se partió de una colección de rizobios aislados de nódulos de plantas de trébol rojo, colectados en las regiones Norte y Sur de Uruguay en el marco del proyecto FONTAGRO FTG-787/2005-2010. En el momento que se realizó la colecta el contenido de agua disponible en los suelos (abril de 2006) fue de 30 mm en el Norte y 70 mm en el Sur, motivo por el que se seleccionaron estas dos regiones como sitios de muestreo. A su vez, cada región, tuvo diferente historia de manejo, Cangué (Norte) sin historia previa de inoculación, San Pedro y La Estanzuela (Sur) con historia de inoculación (Cuadro 1). Los 80 aislados de rizobios evaluados se obtuvieron de nódulos conservados en solución salina (NaCl 5 % en agua p/v) y glicerol 7 % (v/v) a -80 °C.

Como referencia, para todos los ensayos se usó *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii cepa U204. Esta cepa, introducida de Estados Unidos en la década del '60, es usada en Uruguay como inoculante comercial para *T. pratense* y *T. repens*. En la Colección Nacional de Cepas de Rizobios del MGAP figura con el número 204 (Punschke, 2010) y fue denominada por ese laboratorio como U28 y como CIAT2455 en el CIAT. En esta tesis cuando se haga referencia a ella se la denominará U204.

Cuadro 1. Información de los sitios de colecta donde fueron aislados rizobios de trébol rojo.

Sitios de colecta	Historia del predio	AWC* (mm)	Características del suelo			Número de aislados
			pH agua	%C orgánico	P Bray ($\mu\text{g g}^{-1}$)	
Cangué- Norte 32° 34' S 58° 40' W	Sin Inocular	56±16	6,1	1,96	7,5	38
San Pedro-Sur 34° 20' 42" S 57° 46' 50,9" W	Inoculado	85±25	6,7	2,35	2,4	22
Estanzuela- Sur 34° 20' 47,7" S 57° 72' 62,3" W	Inoculado	85±24	6,0	2,0	21,5	20

*AWC: contenido de agua en el suelo (mm). Promedio \pm desviación estándar del 1 de enero al 31 de mayo del 2006 estimado por períodos de 10 días (GRAS, 2006).

2.2.2. *Escherichia coli*

La cepa S17-1 λ -pir de *E. coli*, que contiene el plásmido PCAM131 que tiene resistencia a ampicilina y es portador del transposón mTn5SSgusA31, se usó como donadora en la conjugación biparental con el rizobio receptor. En esta construcción (Wilson *et al.*, 1995) el gen *gusA* está bajo el control del promotor inducible *PnifH*, tiene fusionado el terminador transcripcional *trpA* y lleva un casete de resistencia a estreptomicina y espectinomicina (Sm y Sp respectivamente) como se observa en la Figura 4.

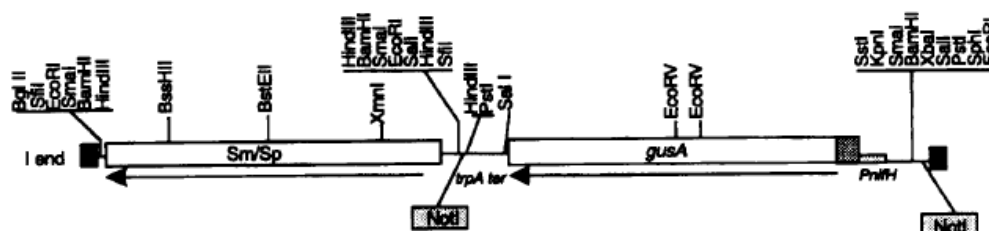


Figura 4. Esquema del transposón mTn5SSgusA31. El transposón contiene al gen *gusA* y genes para resistencia a espectinomicina (Sm) y estreptomicina (Sp) bajo el control inducible *PnifH* y con el terminador transcripcional *trpA*. Tomado de Wilson *et al.* (1995).

Esta cepa se mantuvo a -80 °C en glicerol 20 % y 50 µg/mL de ampicilina.

2.3. CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE BACTERIAS

2.3.1. Rizobios

Los aislados de rizobios y la cepa U204 crecieron en medio YEM (Cuadro 2) a 28 °C. Se usó medio sólido para verificar la pureza de los cultivos a través del aspecto de las colonias y líquido, con agitación orbital de 140 rpm, para aislar ADN y para generar los inóculos. Los aislados y la cepa U204 se mantuvieron en glicerol 7 % en YEM (v/v), a -80 °C para su conservación a largo plazo y a -20 °C para su uso de rutina.

Cuadro 2. Medio YEM (Vincent, 1970)

Compuesto	Cantidad
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
Manitol	5 g
Extracto de levadura	1 g
Agua	1.000 mL
Agar	1,5 g/L
pH	6,8 - 7,0

2.3.2. Escherichia coli

E. coli se creció a 37 °C en medio Luria Bertami (LB), cuya composición (Miller, 1972) figura en el Cuadro 3. Cuando se usó medio líquido se hizo en agitación orbital de 140 rpm.

Cuadro 3. Medio LB (Miller, 1972)

Compuesto	Cantidad
Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g
Agua	1.000 mL
Agar	15 g/L
pH	6,8 - 7,0

2.4. BIODIVERSIDAD DE LOS AISLADOS

2.4.1 Aislamiento del ADN genómico

El ADN de los aislados se obtuvo a partir de lisado celular según Rivas *et al.* (2001) con modificaciones. Se centrifugó 1 mL de cultivo a 13.000 rpm durante 2 min, el precipitado se resuspendió en 100 µL de NaOH 0,05 M, se incubó 4 min a 100 °C y se transfirió a hielo 2 min. Se agregó 500 µl de agua MiliQ estéril, se centrifugó a 13.000 rpm durante 2 min y 100 µl del sobrenadante y se conservó a -20 °C.

2.4.2. Generación y análisis de perfiles ERIC-PCR

Para amplificar el ADN genómico se usaron los cebadores ERIC (de Bruijn, 1992):

ERIC1 (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') y

ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3').

La amplificación por PCR se realizó según Agius *et al.* (1997). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl compuestos por: 5 µL de ADN genómico, 2 µL del cebador ERIC 1 y ERIC 2 (10µM), 0,5 µL de dNTPs (10mM), 0,4 µL de *Taq* ADN polimerasa, 2 µL de MgCl₂ (25 mM) y 2,5 µL de Buffer NH₄SO₄ (10 X). El programa de amplificación utilizado fue: 1 ciclo de 5 min a 95 °C, 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1min a 52 °C, 6 min a 65 °C y 1 ciclo de 16 min a 65 °C.

Los productos de amplificación generados se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,2 % (p/v) con buffer TBE 0,5 X. La corrida se llevó a cabo con voltaje constante (aprox. 10 V/cm) durante 2 h. El ADN se cargó a razón de 10 µL y 4 µL de buffer de carga por pocillo. Como marcador de peso molecular se usó el GeneRuler 1Kb Plus DNA

Ladder Fermentas preparado según las indicaciones del fabricante: marcador de peso molecular 1 µL (0,5 µg), buffer de carga 1 µL y agua desionizada 4 µL. El ADN se tiñó por inmersión del gel en bromuro de etidio 600 µg/mL durante 20 min y se visualizó con transiluminador UV.

Para el análisis digital de la imagen de los productos amplificados y los análisis estadísticos se empleó el software Gelcompar versión 4.2 (Maths applied). El grado de diversidad genética entre los aislados se realizó mediante el análisis de conglomerados (cluster análisis).

La similitud genética fue calculada con el coeficiente de Dice, mientras que la clasificación jerárquica de los aislados fue realizada con el método de agrupamiento UPGMA. Se consideraron para el análisis las bandas conservadas, de buena intensidad y en el rango de 300 y 3.000 pb.

Para el análisis de la diversidad se calculó el índice de Shannon (H) como: $H = -\sum [(n_i/n) \ln(n_i/n)]$ donde n_i es el número de aislados en cada grupo y n es el número de aislados con todos los grupos (Shannon y Weaver, 1949).

2.4.3. Amplificación de genes

El gen 16S ARNr se amplificó para realizar ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) y análisis de secuencia. Se usaron los cebadores (Herrera Cervera *et al.* 1999):

41f 5' GCTCAGATTGAACGCTGGCG 3' y

1488r 5' CGGTTACCTTGTTACGACTTCACC 3'

La reacción de PCR fue llevada a cabo según Herrera Cervera *et al.* (1999) en un volumen final de 25 μ L compuesto por 5 μ L de ADN genómico, 0,5 μ L del iniciador 41f (10 μ M), 0,5 μ L de cebador 1488r (10 μ M), 0,4 μ L de dNTPs (12.5 mM), 0,2 μ L de *Taq* ADN polimerasa, 1,5 μ L de $MgCl_2$ (20 mM) y 2,5 μ L de Buffer NH_4SO_4 (10 X). El programa de amplificación utilizado fue: 1 ciclo de 5 min a 95 $^{\circ}C$; 35 ciclos de 1 min a 94 $^{\circ}C$, 1 min a 56 $^{\circ}C$, 2 min a 72 $^{\circ}C$ y 1 ciclo de 10 min a 72 $^{\circ}C$.

Para amplificar el gen *atpD* se usaron los siguientes cebadores (Gaunt *et al.*, 2001):

273..... 5'SCT GGG SCG YAT CMT GAA CGT3' y
771.....5'GCC GAC ACT TCC GAA CCN GCC TG3'

La reacción de PCR fue llevada a cabo según Gaunt *et al.*, (2001) en un volumen final de 25 μ L compuesto por 5 μ L de ADN genómico, 0.625 μ L del iniciador 273f (10 μ M), 0.625 μ L de cebador 771r (10 μ M), 0,4 μ L de dNTPs (12.5 mM), 0,4 μ L de *Taq* ADN polimerasa (1 unidad), 1,5 μ L de $MgCl_2$ (20 mM) y 2,5 μ L de Buffer NH_4SO_4 (10 X). El programa de amplificación utilizado fue: 1 ciclo de 5 min a 95 $^{\circ}C$; 35 ciclos de 45 seg a 94 $^{\circ}C$, 1 min a 50 $^{\circ}C$, 90 seg a 72 $^{\circ}C$ y 1 ciclo de 4 min a 72 $^{\circ}C$.

Para amplificar el gen *nodC* se usaron los siguientes cebadores (Laguerre *et al.*, 2001):

nodCF2..... 5' AYGTHGTYGAYGACGGCTC 3' y
nodCI5' CGYGACAGCCANTCKCTATTG 3'

La reacción de PCR fue llevada a cabo según Laguerre *et al.* (2001) en un volumen final de 25 μ L compuesto por 5 μ L de ADN genómico, 0.625 μ L del iniciador nodCF2 (10 μ M), 0.625 μ L de cebador nodCI (10 μ M), 0,5 μ L de dNTPs (10 mM), 0,4 μ L de *Taq* ADN polimerasa (1 unidad), 1,5 μ L de $MgCl_2$

(20 mM) y 2,5 μ L de Buffer NH_4SO_4 (10 X). El programa de amplificación utilizado fue: 1 ciclo de 2 min a 95 °C; 35 ciclos de 45 seg a 94 °C, 1 min a 55 °C, 90 seg a 72 °C y 1 ciclo de 4 min a 72 °C.

Los productos de amplificación generados fueron separados como se indica en 2.4.2. El ADN amplificado se cargó a razón de 2 μ L y 2 μ L de buffer de carga por pocillo. El ADN se tiñó como se indica en 2.4.2. Los productos amplificados fueron purificados con el kit QIAquick Gel, extraction (Quiagen, Germantown, MD) y se secuenciaron en Macrogen Inc. (Seoul, Korea).

2.4.4. ARDRA

El producto de amplificación del gen 16S ARNr fue digerido con las enzimas de restricción *Hinfl* y *MspI*, siguiendo las indicaciones del fabricante. La reacción fue llevada a cabo en un volumen final de 15 μ L compuesto por 10 μ L de ADN 16S RNA, 1,5 μ L de Buffer 10 X, 0,5 μ L de la enzima de restricción. La reacción fue incubada a 37 °C durante 1 h. Los productos de restricción se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 3 % (p/v), con buffer TBE 0,5 X. La corrida se llevó a cabo con voltaje constante (aprox. 5 V/cm) durante 3 h. El ADN se tiñó como se indica en 2.4.2. Según el polimorfismo del tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP) se asignaron los ribotipos (Estrella *et al.*, 2009).

2.5. EFICIENCIA SIMBIOTICA DE LOS AISLADOS

2.5.1 Preparación del inóculo

Para los ensayos en condiciones controladas las cepas usadas como inóculo crecieron en 30 mL de medio YEM como se indica en el apartado 2.3.1., hasta una DO_{600} de aproximadamente 0,9, que corresponde a unas

10^8 células/mL. El cultivo se centrifugó a 7.000 rpm 5 min, se lavó con agua estéril y se volvió a centrifugar como se indicó. El precipitado se resuspendió en el mismo volumen de agua estéril. Esta resuspensión se usó como fuente de inóculo.

2.5.2 Producción de biomasa en macetas

Como sustrato para el crecimiento de las plantas se usó arena-vermiculita. La arena se trató 8 h con una solución de 50 mL HCl en 20 L agua, y se lavó con agua corriente hasta alcanzar un pH superior 6,5. La vermiculita se lavó con agua corriente durante 30 min. La mezcla arena-vermiculita (1:1) se colocó en macetas de 350 mL y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 min.

Las semillas se trataron con alcohol 96 °GL durante 2 min seguido de dos enjuagues con agua estéril, hipoclorito de sodio 4 % durante 2 min, y 4 enjuagues con agua estéril. Las semillas permanecieron en agua estéril durante al menos 30 min para que se hidrataran y liberaran taninos. Seguidamente se colocaron en placas de Petri con agar-agua (1 % p/v) estéril y crecieron a 28 °C en cámara hasta que la radícula se desarrollara unos 2 mm. En ese estado se sembraron en macetas con arena vermiculita. Las plantas crecieron en cámara de crecimiento con un fotoperíodo 16/8 h (luz/oscuridad), con una intensidad lumínica de $200 \mu\text{E m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a 20/22 °C de temperatura (día/noche) y una humedad relativa 30/89 % (día/noche).

La inoculación se realizó a razón de 1 mL de inóculo por planta un día después de sembradas. Se regó cada 3 días, alternando uno con agua corriente y otro con solución Hornum sin nitrógeno (Handberg y Stougaard, 1992).

Para evaluar la producción de biomasa de la parte aérea de las plantas se realizaron dos ensayos independientes que incluyeron 9 aislados el primero, y 3 cepas en el segundo. En el primer ensayo se testearon 9 aislados de 80 evaluados, diferentes por ERIC en el estudio de diversidad, mientras que en el segundo ensayo se evaluó la eficiencia de una cepa frecuente en los suelos de la Estanzuela denominada I. Los ensayos se realizaron en condiciones controladas y los cortes de la parte aérea se hicieron a 45 y 78 días después de la siembra. Para localizar las macetas en la cámara de crecimiento se realizó una aleatorización manual con los tratamientos correspondientes a 10 cepas, con 5 repeticiones. Se incluyó un control positivo (inoculante comercial) y control negativo (sin inocular y sin nitrógeno). La variable peso seco de la parte aérea se evaluó a través del análisis de varianza (ANOVA) y para las comparaciones de medias se usó la prueba de Tukey.

2.6. COMPETENCIA Y BIOMASA EN CAMPO

Se realizaron 3 experimentos a campo (1, 2 y 3) que se sembraron en las fechas 22 de abril de 2008, 22 de mayo del 2008 y el 7 de abril del 2010 respectivamente en la Estación Experimental INIA - La Estanzuela (ver información de este sitio en Cuadro 4). El diseño experimental utilizado fue de bloques al azar con 4 repeticiones. Se sembraron parcelas de 1,02 m ancho por 2,6 m de largo con una distancia entre fila de 0,17 m para evitar contaminación. Cada experimento constó de tres tratamientos: parcelas inoculadas con cepa comercial U204, parcelas inoculadas con la cepa experimental (317) y parcelas sin inocular, y en el experimento 3 se incorporó la cepa I. Se incluyó un tratamiento en el que se aumentó la dosis comercial del inoculante X5. Los inóculos, en soporte turba, los prepararon las fábricas de inoculantes Lage y Cía. y CALISTER S.A.

2.6.1. Determinación de la competencia

De cada parcela se cosecharon 15 plantas al azar a los 6 y a los 12 meses después de la siembra. De cada planta se colectaron de forma sistemática nódulos de dos zonas de la raíz, la zona superior (todos los nódulos de la raíz principal) y la zona distal (nódulos de la raíz principal y secundaria) que se conservaron a -20°C pervio a la desinfección. Se consideró zona superior hasta 5 cm por debajo de la corona (Figura 5). Para cada tratamiento se analizaron un total de 25 nódulos de cada región de la raíz.

Los nódulos se lavaron con agua, se sumergieron 1 min en etanol 70 % en agua (v/v), se enjuagaron con agua estéril, se trataron durante 3 min con solución de hipoclorito de sodio al 2 % en agua (v/v) y se realizaron 4 enjuagues sucesivos con agua estéril. Luego de esterilizarlos superficialmente se maceraron individualmente en placas de Petri estériles. Se tomó del macerado una muestra con el ansa y se sembró en estrías en placas de Petri con medio YEM. Las placas se incubaron a 27°C hasta aparición de colonias. Para la identificación de las cepas ocupadas se usó ERIC.PCR. A partir de colonias aisladas se hicieron cultivos en medio YEM líquido para aislar ADN (apartado 2.4.1.) y generar perfiles ERIC (apartado 2.4.2.). A partir de estos perfiles se determinó la ocupación de nódulos a campo.

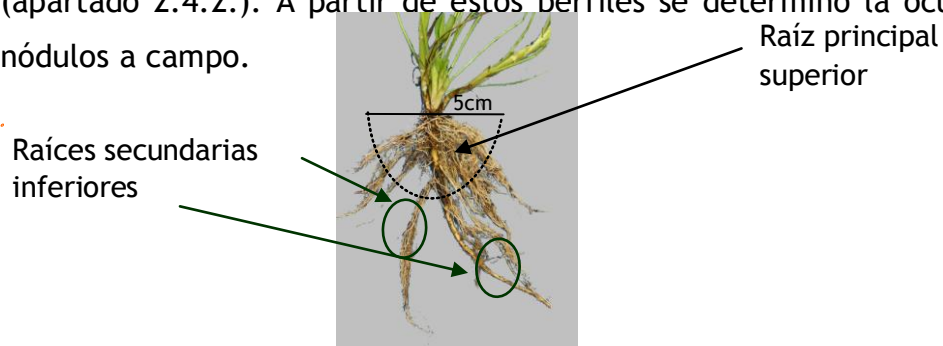


Figura 5. Sectores de la raíz definidos para realizar el muestreo de nódulos. Se consideró zona superior hasta 5 cm del cuello.

2.6.2. Producción de forraje y número de nódulos

La producción de forraje del experimento 2 se determinó durante 3 años. Los cortes se realizaron mecánicamente y el forraje se secó a 60 °C en estufa de aire forzado durante 3 días.

Para cada tratamiento, se realizó un conteo de nodulos verdes y rosados por plantula por sector de la raíz establecidas desde la distancia del cuello de la raíz (Figura 5).

2.7. COMPETENCIA DE CEPAS EN DIFERENTES SUELOS

2.7.1. Colecta de suelos

De 3 regiones de interés agrícola del Uruguay (cuadro 4) se colectaron de cada región de muestreo, al azar, 15 cilindros de PVC de 14 cm de alto por 7,5 cm de diámetro (Figura 6). Se colectó entre el 10 y el 12 de abril de 2012 un total de 45 muestras. Los cilindros se enterraron y se removió la tierra de alrededor para facilitar su extracción, es decir el ensayo se realizó con suelo inperturbado.

Cuadro 4. Sitios de colecta seleccionados para el muestreo de suelos. Se detalla la localización el tipo de suelo su historia.

Sitio de colecta	Localización	Tipo de suelo	Uso de los suelos
La Estanzuela (Colonia)	34° 19' S y 57° 43' O	Brunosol eutrico típico	Rotación agrícola Ganadera
Tambores (Tacuarembó)	31° 54' S y 56° 14' O	Litosol eutrico melánico	Campo natural sobre basalto profundo
Palo a Pique (Treinta y Tres)	33° 14' S y 54° 15' O	Argisol subeutrico	Campo natural de lomadas



Figura 6. Colecta de muestras de suelo. A. enterrado de cilindros. B. cilindro con el suelo colectado.

2.7.2. Marcaje de las cepas con el gen reportero *gusA*

E. coli se cultivó en placa con medio LB sólido (Cuadro 3) Sp y Sm durante 24 h a 37 °C. El cultivo de donador, *E. coli* cepa S 17-1 λ -*pir* (Wilson *et al.*, 1995) se rejuveneció por repique en el mismo medio y con los antibióticos durante 6 h. Los antibióticos estreptomicina (Sm) y espectinomicina (Sp) se prepararon como soluciones 100 X en agua destilada, se esterilizaron con filtros de 0,45 μ m y se conservaron en heladera a 4 °C. La nitrofurantoína, usada para eliminar *E. coli*, se preparó en metanol. La concentración final de los antibióticos en el medio se detalla en el Cuadro 6.

Las cepas 317, I y U204 (receptoras) se crecieron en medio TY sólido (Cuadro 5) durante 48 h. Las conjugaciones se realizaron en medio TY a partir de una ansada de cada cultivo, que se sembró uno sobre otro (receptor y donador) y se mezcló con el ansa. El co-cultivo se dejó 24 h a 28 °C y se resuspendió una ansada en 1 mL de suero fisiológico, que se agitó con vortex vigorosamente 1 min. A partir de esta suspensión se hicieron diluciones de 10^{-1} a 10^{-4} y se sembraron por triplicado 100 μ L de cada dilución, en placas con medio YEM con Sm, Sp y nitrofurantoína

(Cuadro 6). Como controles se usaron las cepas 317, I y U204 de *Rhizobium leguminosarum* y la cepa S17-1 λ -pir de *E. coli* que se sembraron en el mismo medio. Los cultivos se incubaron a 27 °C hasta la aparición de colonias. Los transconjugantes se seleccionaron por la resistencia a antibióticos en placas con medio YEM con antibióticos (Cuadro 6).

Cuadro 5. Medio TY (Beringer, 1974).

Compuesto	cantidad
Triptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,9 g
Agua	1000 mL
Agar	15 g
pH	6,8 - 7,0

Cuadro 6. Concentración final de antibióticos en el medio de cultivo.

Antibiótico	Concentración (µg/mL)	
	<i>R. leguminosarum</i>	<i>E. coli</i>
Sulfato de estreptomina (Sm)	200	50
Espectinomicina (Sp)	150	100
Nitrofurantoína		20

2.7.

3. Verificación de la inserción *gusA* y cinética de nodulación *in vitro*

Para verificar la expresión del gen *gusA* en simbiosis, así como la cinética de nodulación de los transcojugantes respecto a los parentales, se realizó un ensayo *in vitro*. Las plantas de trébol rojo se crecieron en medio Jensen (1942) estéril (Cuadro 7), en tubos de 3 cm x 16 cm. Se usó una cámara de crecimiento con las mismas condiciones que se describen en el apartado 2.5.2.

Cuadro 7. Medio Jensen (1942).

Compuesto	Cantidad
CaHPO ₄	1 g
K ₂ HPO ₄	0,2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,2 g
FeCl ₃	0,1 g
Agua	1000 mL

La cinética de nodulación fue evaluada a través de la aparición del primer nódulo en plantas inoculadas con las cepas parentales (U204, 317 e I) respecto a plantas inoculadas con las cepas transconjugantes (U204::*gusA*, 317::*gusA* e I::*gusA*).

Para el ensayo se usó un diseño experimental con 18 tratamientos, 15 correspondientes a 5 clones de cada transconjugante y los controles con las cepas parentales I, 317, U204. Se usaron 3 repeticiones, para un total de 54 unidades experimentales.

Las raíces se separaron de las plantas, se lavaron con agua destilada durante 15 min y se colocaron en un tubo tipo Falcon con una solución 1 mM X-gluc (5-bromo-4-cloro-3indolil- β -D-glucurónido) en 50 mM de tampón fosfato sódico, pH 7,5 con 1 % de SDS (Wilson *et al.*, 1995). Los tubos abiertos se colocaron en una campana en la que se realizó vacío durante 3 min para que el sustrato se infiltre en el tejido. Los tubos se taparon y permanecieron durante 16 h a 37 °C en oscuridad. Los nódulos ocupados por las cepas transformadas se visualizaron por aparición del color azul.

2.7.4. Competencia de los inoculantes con las cepas presentes del suelo

2.7.4.1. Preparación de los inoculantes con cepas marcadas con *gusA*

La preparación de los inoculantes de trébol en el laboratorio fue realizada con la misma metodología que la usada por la industria para la elaboración de inoculantes rizobianos. Las cepas a multiplicar se sembraron en tubos de ensayo con tapa rosca inclinados con medio YEM y se crecieron durante 3 días a 27 °C. Cada cultivo se resuspendió en 10 mL de agua estéril, y ese volumen se sembró en 300 mL de medio YEM y incubó durante 5 días a 27 °C en agitación constante 140 rpm hasta que llegaron a una DO_{600} de aproximadamente 0,9, que corresponde a unas 10^9 células \cdot mL⁻¹.

De ese cultivo se inyectaron 100 mL en bolsas con soporte de estabilización en base de turba, estéril. Las bolsas, 2 por cada cepa, se incubaron 7 días a temperatura ambiente a 25°C y se las movió periódicamente para favorecer que se mezcle el inóculo.

Con el fin de constatar que el inoculante estaba en la concentración deseada se realizó el recuento de placa de rizobios según la metodología usada en el Laboratorio de Microbiología del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca del Uruguay (Labandera y Mayans, 2006). Para ello, se tomaron 10 g de la formulación y se mezclaron con 90 mL de agua estéril. A partir de esta dilución (10^{-1}) se hicieron diluciones seriadas hasta 10^{-7} y se sembró 1 mL de esta dilución, incorporada al medio YEM en placas de Petri. A los 5 días se realizó el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC).

2.7.4.2 Inoculación y siembra en cilindros de suelo

Con un clon de cada transconjugante se prepararon los inóculos en turba estéril, según se describe en el apartado 2.7.4.1. La inoculación se realizó con la misma proporción inoculante - semilla que la usada en el campo: el inoculante en turba y el adherente a razón 800 mL cada 25 Kg. de semilla. Las semillas peleteadas se dejaron secar y se sembraron a razón de 5 a 8 en los cilindros con los diferentes suelos, sin eliminar la capa vegetal, para simular siembra en cobertura. Las plantas crecieron durante 45 días después de sembradas en las mismas condiciones de luz, temperatura y humedad indicadas en el apartado 2.5.2.

2.7.4.3 Ocupación de los nódulos

Se levantaron 4 plantas de cada cilindro, se desagregó el suelo y las raíces noduladas se lavaron con abundante agua. Las raíces se separaron de las plantas y se tiñeron como se indica en el apartado 2.7.3.

Se usó un experimento factorial dispuesto en un diseño completamente aleatorizado con 2 factores, suelos y transconjugantes, 3 niveles para los suelos de diferentes regiones (cuadro 4) y 3 niveles para los transconjugantes (317::*gusA*, I::*gusA* y U204::*gusA*); con 9 tratamientos y 5 repeticiones para un total de 45 unidades experimentales.

La variable número de nódulos ocupados por 317::*gusA*, I::*gusA* y U204::*gusA* sobre el total de nódulos, expresado como %, se evaluó a través de análisis de varianza (ANOVA). Así se determinó la ocupación de nódulos con los diferentes inoculantes (317::*gusA*, I::*gusA*. y U204::*gusA*) en *T. pratense* y la interacción entre los factores suelo-cepa sobre la ocupación de nódulos. Para la comparación de medias se usó el test de Tukey.

2.8. USO DEL ¹⁵N PARA ESTIMAR LA FBN

Para estimar la cantidad de N fijado por la simbiosis rizobio - trébol rojo se utilizó la técnica de dilución isotópica-DI mediante enriquecimiento de ¹⁵N. Las muestras vegetales se secaron a 65 °C en una estufa de aire forzado hasta peso constante y se molieron con mortero de ágata hasta alcanzar el tamaño granulométrico necesario (consistencia talco).

2.8.1. FBN por un inoculante vs cepas nativas

Para determinar el N proveniente de la FBN cuando se usa un inoculante se empleó suelo de Tambores (Cuadro 7), colectado como se indica en el apartado 2.7.1. En 4 cilindros se sembró trébol rojo inoculado con la cepa nativa 317 como se describe en el apartado 2.7.4.1., seleccionada por la alta eficiencia simbiótica en ese hospedero en condiciones controladas. En otros 4 cilindros se sembró la leguminosa sin inocular para estimar la fijación por cepas nativas y 2 cilindros se dejaron con raigrás (*Lolium perenne*), usado como referencia para estimar el N proveniente del suelo. Después de la emergencia de las plantas se aplicó una dosis única de sulfato de amonio NH₄(SO₄)₂ enriquecido al 10 % At¹⁵N,

equivalente a 10 Kg de N · ha⁻¹ (Campillo *et al.*, 2001). La dosis utilizada reproduce un contenido de N en suelo de aproximadamente 0,7 mM, que no inhibe la nodulación ni el proceso de FBN. Las plantas fueron regadas 3 veces por semana con agua corriente.

Cuando las plantas estuvieron fisiológicamente maduras, criterio asumido por el engrosamiento de la corona a los 90 días, se cosechó la parte aérea, se secó y las hojas de cada cilindro se molieron por separado. La concentración de ¹⁵N de la solución de NH₄(SO₄)₂ se determinó utilizando un analizador elemental Flash EA 112 acoplado a un espectrómetro de masa DeltaPlus (Finnigan MAT, Bremen, Germany).

La estimación de la proporción de N derivado del aire (pNFa) por DI se estimó según Chalk (1985) de la siguiente manera:

$$pNFa = 1 - (\text{at}\%^{15}\text{N fijadora} / \text{at}\%^{15}\text{N referencia})$$

donde la concentración isotópica se expresa como at%¹⁵N. La planta de referencia utilizada para la estimación de pNFA fue raigrás (*Lolium perenne*) crecido sin leguminosas.

2.8.2. Efecto de la concentración de nitrógeno en el medio sobre la FBN

Para conocer el efecto de la dosis de N sobre la FBN se usaron macetas con arena vermiculita (1:1) preparadas como se indica en el apartado 2.5.1. Se sembraron 6 semillas estériles por maceta (apartado 2.5.2.) y al segundo día fueron inoculadas con la cepa nativa 317. El suministro de agua fue semanal y se alternó con solución nutritiva Hornum (Handberg y Stougaard, 1992) libre de N. A los 8 días post-emergencia se raleó a 4 plantas por maceta. Después de que las plántulas de trébol rojo emergieron se hizo una única aplicación de nitrógeno con concentraciones 0,7 mM, 1,2 mM, 1,7 mM, 3 mM y 4 mM en forma de NH₄(SO₄)₂ enriquecido al 10 % At ¹⁵N. La concentración de ¹⁵N de las soluciones de sulfato de

amonio, se determinó utilizando un analizador elemental Flash EA 112 acoplado a un espectrómetro de masa DeltaPlus (Finnigan MAT, Bremen, Germany). El diseño experimental fue completamente aleatorizado, con 5 repeticiones y los tratamientos correspondieron a 5 dosis de nitrógeno aplicadas.

Cuando las plantas estuvieron fisiológicamente maduras y aparecieron las primeras flores (74 días), se cosechó de cada maceta la parte aérea, incluidos los pimpollos, que se secaron y molieron.

A partir del NT y $\text{at}\%^{15}\text{N}$ de las muestras de trébol rojo se estimó la fracción de N de la planta que derivó del fertilizante (NDDF). A partir del principio de dilución isotópica, la estimación de NDDF se calcula como:

$$\text{NDDF} = (\text{at}\%^{15}\text{N de TR} / \text{at}\%^{15}\text{N de fertilizante}) * 100$$

Si el aire atmosférico y el fertilizante fueron las únicas fuentes de N disponibles para la planta, la diferencia respecto al total NT dará la proporción N de la planta que provino del aire.

Si se considera además el rendimiento de NT en la muestra vegetal por maceta, se puede determinar el rendimiento de N del fertilizante en el vegetal y cuál fue la utilización o recuperación del N del fertilizante por el cultivo, de la siguiente manera:

$$\text{Rendimiento de N del fertilizante} = \text{N TR} \times \% \text{NDDF} / 100$$

$$\% \text{Utilización de Fertilizante} = (\text{Rend N del Fertilizante} / \text{Dosis de N fertilizante}) \times 100$$

La diferencia entre el contenido de NT de la planta y el rendimiento de NT del fertilizante permite estimar la cantidad de N que provino del aire.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. DIVERSIDAD DE RIZOBIOS QUE NODULAN *TRIFOLIUM PRATENSE*

El primer paso en la búsqueda de un inoculante es establecer la diversidad genética de las cepas, en este caso nativas-naturalizadas, dado que constituyen la base para la selección. Para lograr éste propósito se caracterizaron 80 aislados de rizobios obtenidos de nódulos de *Trifolium pratense* provenientes de 3 sitios de muestreo (Cuadro 1), y la cepa U204 de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*, el inoculante comercial usado para tréboles, como testigo.

Los perfiles se generaron a partir del ADN genómico obtenido por lisado, que se usó como molde en las reacciones de PCR con *primers* ERIC. Así se obtuvieron 81 perfiles ERIC, con entre 2 y 12 bandas cada uno, comprendidas en un rango de 300 y 2.000 pb y se consideraron iguales los aislados cuyos perfiles tuvieron una similitud de bandas igual o mayor al 60 %. Este valor se asumió por comparación de perfiles generados a partir de ADN de extracciones diferentes del mismo aislado y amplificado en diferentes termocicladores (Figura 7). Establecido este criterio se analizaron los perfiles ERIC de los aislados y se identificaron 38 perfiles genómicos únicos, de manera que la diversidad general se situó en 48 % (Figura 8). Esta diversidad genética de rizobios nativos - naturalizados adaptados a los ambientes locales, da una ventaja para la selección de inoculantes para mejorar la FBN. En este sentido, constituyen una fuente sostenible de cepas que pueden ser usadas para desarrollar inoculantes comerciales (Lindström *et al.*, 2010). Por otra parte una amplia diversidad puede considerarse como un indicador de la salud del suelo y de la productividad (Ferreira *et al.*, 2000; Kaschuk *et al.*, 2006), así como también podría garantizar un efecto amortiguador fomentando la FBN incluso bajo condiciones ambientales estresantes (Loreau *et al.*, 2001).

Si bien la cepa U204 se usa como inoculante comercial para trébol rojo desde el año 1962 (MGAP, 2008), sólo uno de los 80 perfiles analizados, el correspondiente al aislado 758, fue igual al del inoculante comercial (Figura 8). En general, el agrupamiento de los aislados siguió un patrón diferencial por sitio de colecta.

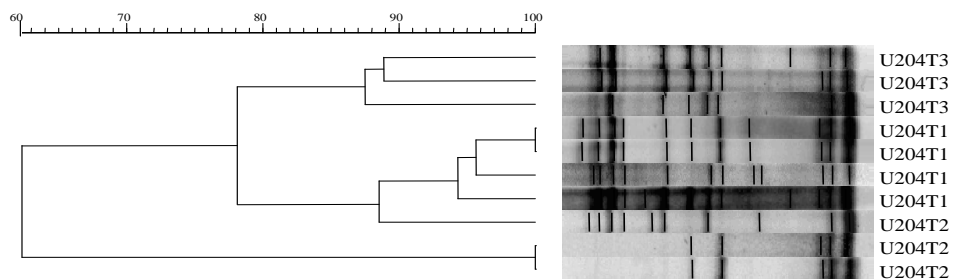


Figura 7. Comparación de perfiles ERIC. El ADN de la cepa U204 se amplificó por triplicado partiendo de diferentes extracciones en 3 termocicladores (T1, T2, T3). Los aislados con igual o más de un 60 % de similitud se consideraron iguales.

Con el objetivo de evaluar si la diversidad varía con la historia de inoculación del sitio se realizó el análisis de conglomerado por sitio de colecta. El análisis de diversidad mostró el mayor índice de Shannon (2,627) en los aislados provenientes de Cangué, sitio sin historia de inoculación, mientras que los provenientes de San Pedro y La Estanzuela, sitios con historia de inoculación, tuvieron índices menores (2,237 y 2,425 respectivamente). Así, la mayor diversidad en valores absolutos fue encontrada en Cangué, y debe ser considerada sólo como indicador de tendencias, dado que no se pudieron realizar análisis estadísticos para comparar los índices de Shannon, debido a que no contamos con repeticiones para cada sitio. Por otra parte en el momento de realizado el muestreo el sitio Cangué, había pasado un período de sequía de aproximadamente 3 meses por lo que el contenido de agua en el suelo fue

menor (56 mm) al de los sitios San Pedro y la Estanzuela (85 mm) (Cuadro 1).

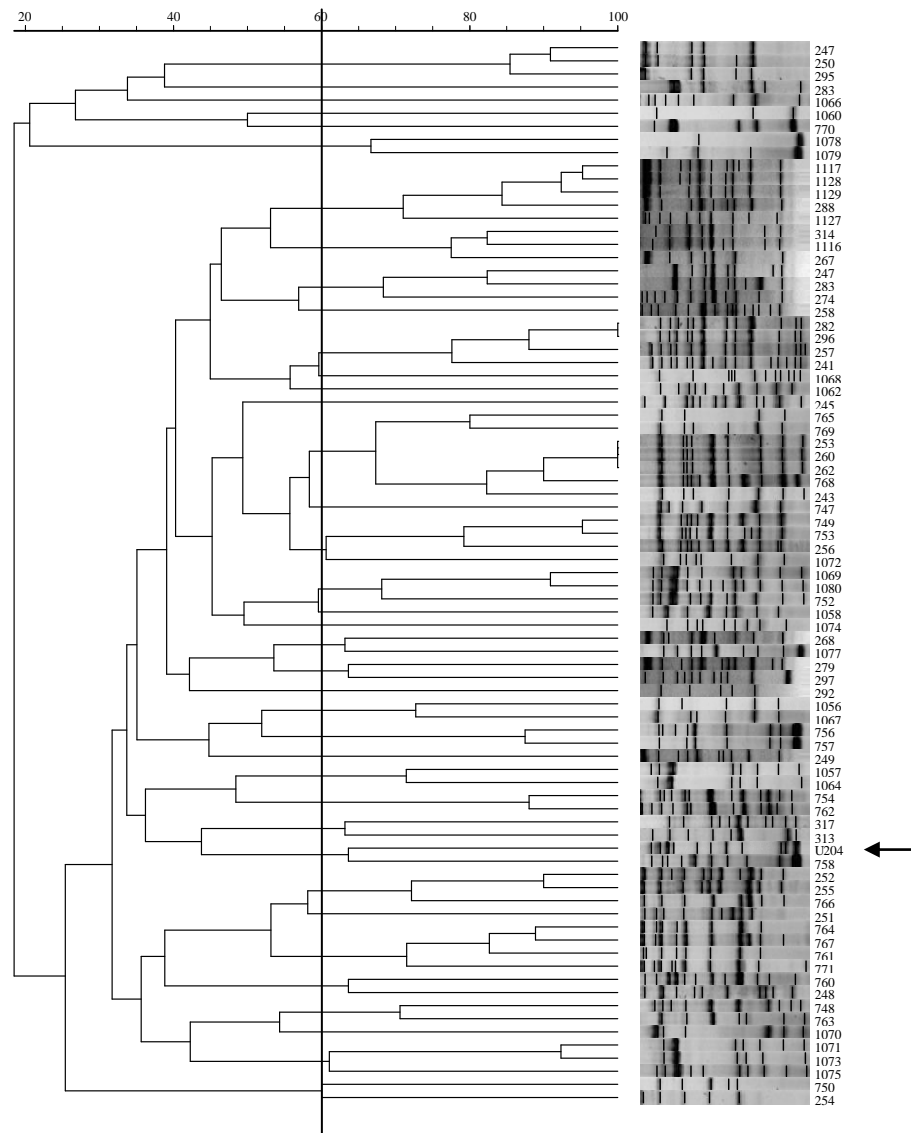


Figura 8. Dendrograma construido con los perfiles ERIC de los 80 aislados y la cepa U204. Se consideraron perfiles iguales cuando la semejanza entre las bandas fue igual o mayor al 60 %. La flecha indica el perfil del inoculante comercial.

Sin embargo, según los valores del índice de Shannon, la falta de agua en Cangué por el período indicado no se puede separar el efecto de la inoculación sobre la diversidad de rizobios. Si bien la diversidad de rizobios

puede haberse visto afectada, es decir disminuida, como consecuencia del estrés, como no se hizo un estudio previo a la sequía no se puede determinar si la población varió como consecuencia de ésta. En un estudio de diversidad de aislados de *Mesorhizobium* sp. obtenidos de nódulos de *Lotus corniculatus*, Sotelo *et al.* (2011) no encontraron diferencias significativas en el índice de Shannon al comparar la diversidad de los 168 aislados procedentes de las mismas dos regiones ($1,18 \pm 0,02$ y $1,11 \pm 0,09$).

Si bien la diversidad genética de las poblaciones puede disminuir por sequía, pH extremos del suelo, presencia de metales pesados y alta salinidad entre otros (Kaschuk *et al.*, 2006; Estrella *et al.*, 2009), no podemos afirmar con nuestros resultados que la diversidad genética de rizobios que nodulan trébol se haya visto afectada por el período de sequía. Del mismo modo Batista *et al.* (2013) usaron el índice de Shannon para estimar la diversidad genética de aislados que nodulan *Lotus uliginosus* colectados en cuatro regiones de Uruguay. En este trabajo determinaron el menor índice de Shannon (1,04) en la región que presentó mayor porcentaje de aluminio en el suelo y menor pH, aunque el coeficiente de correlación entre el índice de diversidad y los valores de aluminio no fue estadísticamente significativo. Por otra parte, Estrella *et al.* (2009) observaron que la diversidad de simbiontes de *Lotus tenuis* en la cuenca del Río Salado (Argentina) fue menor en los suelos alcalinos y salinos de tierras bajas que en los suelos con condiciones menos estresantes.

La diversidad de rizobios puede estar afectada por la temperatura, las horas de luz y diferentes factores edáficos. En este sentido Duodu *et al.* (2007) analizaron la variación de rizobios nativos que nodulan trébol rojo en suelos del Norte de Escandinavia en diferentes estaciones del año, para lo que caracterizaron 431 aislados en otoño y verano mediante ERIC-PCR. Estos autores encontraron que la composición de las poblaciones de rizobios es genéticamente diversa, con pocos cambios asociados a efectos

estacionales. La colecta de los aislados usados en esta tesis se realizó en una única estación, otoño, dado que el objetivo fue evaluar la diversidad de rizobios en relación a diferentes regimenes hídricos y condiciones de inoculación. Si la colecta se hubiera realizado en otra estación con mayor cantidad de horas luz y temperaturas contrastantes, los resultados podrían haber sido diferentes debido a que los muestreos estacionales generan información acerca de la variabilidad y dinámica de las poblaciones de rizobios. En otro estudio, Duodu *et al.* (2006) utilizaron diferentes formas de muestreo para evaluar la diversidad de aislados que nodulan trébol rojo y trébol blanco recuperados de plantas trampa colocadas a campo y de plantas trampa inoculadas con diluciones de suelo en condiciones controladas. Los perfiles ERIC variaron según el método de muestreo y la diversidad de los aislados recuperados de plantas noduladas con diluciones de suelo fue mayor a la obtenida a partir de nódulos de plantas trampa en condiciones de campo. En esta tesis se usaron plantas trampa sembradas en campo un año antes de la colecta, y a partir de nódulos se aislaron los rizobios. De esta forma pudimos haber seleccionado y caracterizado poblaciones de rizobios más competitivas y/o mejor adaptadas a las condiciones edáficas locales.

3.2. DETERMINACIÓN TAXONÓMICA DE LOS AISLADOS

El gen 16S RNA es un buen marcador molecular porque está muy conservado entre géneros bacterianos y evoluciona lentamente en el tiempo (Woese, 1987). Por esto ha sido uno de los primeros genes utilizados en estudios taxonómicos y filogenéticos a nivel de dominio, subdivisión y género, pero a nivel de especie no siempre es suficiente debido al alto grado de conservación que existe dentro organismos muy relacionados (Lloret y Martínez-Romero, 2005; Vinuesa *et al.*, 1998).

Para determinar la especie a la que pertenecen los aislados de trébol en estudio, se amplificó el gen 16S RNA de los 38 aislados con perfiles diferentes. El producto de amplificación se visualizó como una única banda de unos 1.400 pb, tamaño esperado para los genes 16S RNA de la mayoría de los miembros de la familia *Rhizobiaceae* (Laguerre *et al.*, 1994). Ese amplificado se digirió con las endonucleasas *MspI* y *HinfI*, ampliamente usadas en estudios taxonómicos de rizobios (Laguerre *et al.*, 1994; Estrella *et al.*, 2009; Lorite *et al.*, 2012). Todos los aislados y el inoculante comercial presentaron el mismo patrón de restricción con cada enzima (Figura 9). Resultados similares obtuvieron Laguerre *et al.* (1994) con 11 cepas de *Rhizobium leguminosarum* que presentaron un único patrón de restricción con 9 endonucleasas diferentes, entre ellas *MspI* y *HinfI*, lo que evidencia la homogeneidad de las distintas biovariedades (*trifolii*, *viciae*, *phaseoli*).

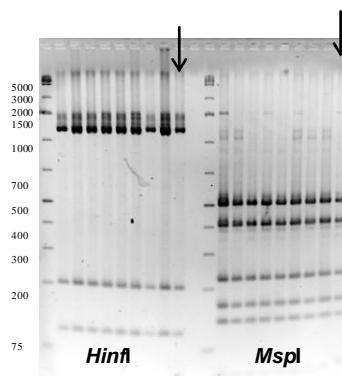


Figura 9. ARDRA del gen 16S RNA generados con *MspI* y *HinfI*. Se muestran 8 perfiles de aislados de nódulos de trébol rojo y el del inoculante comercial, señalado con una flecha. A la izquierda se indica (en pb) el tamaño de los fragmentos del marcador de peso molecular 1kb Plus. En el carril central se repite el marcador de peso molecular

Como los 38 aislados presentaron el mismo ARDRA, se secuenció el gen 16S ARN de dos aislados (317 e I) y el de la cepa U204. El análisis de la secuencia de 1.150 pb del gen 16S RNA permitió establecer una identidad del 100 % con secuencias del gen 16S ARNr de cepas de *Rhizobium*

leguminosarum bv trifolii (Cuadro 8). En ese cuadro se muestran las secuencias de microorganismos cultivables que presentan mayor identidad con las secuencias de los aislados 317, I y la cepa U204.

Los genes con funciones conservadas, conocidos como genes *housekeeping*, se usan también para establecer aproximaciones taxonómicas. Con este fin se analizó la secuencia del gen *atpD* de los aislados 317 e I y el de la cepa U204. El análisis de las secuencias mostró una identidad entre 97 % y 100 % con cepas del género *Rhizobium* sp. En particular, la secuencia del gen *atpD* de la cepa U204 mostró mayor similitud con las cepas BIHB 1167 y BIHB 1164 de *R. leguminosarum* bv *viciae*. Resultados similares obtuvieron Yates *et al.* (2008) al comparar la secuencia del gen *atpD* de los aislados WSM1325 y WSM2304 obtenidos de *Trifolium* sp y *Trifolium polymorphum* respectivamente, ambos con mayor similitud con la secuencia del gen *atpD* de *R. leguminosarum* bv *viceae* (AF169586). Los autores proponen que los aislados en estudio difieren en sus *backgrounds* simbióticos y cromosomales, dado que las secuencias de los genes cromosomales *atpD* y *glnII* tuvieron mayor similitud con especies del biovar *viceae*. Por otra parte, la secuencia del gen *atpD* del aislado 317 no reveló el epíteto específico, mientras que para el aislado I mostró un 97 % de similitud con *R. leguminosarum* bv. *trifolii* cepa WSM2304 (Cuadro 8).

Los genes simbióticos, codificados en plásmidos o integrados al cromosoma, tienen utilidad taxonómica relativa porque pueden ser ganados o perdidos por mecanismos de transferencia horizontal (Ochman y Moran, 2001). La transferencia horizontal implica el movimiento de genes entre células que no necesariamente comparten un ancestro común (Gomes-Barcellos *et al.*, 2007). Los genes de la nodulación son usados para definir biovariedades entre las especies de rizobios. Entre ellos, el gen *nodC* está involucrado en la síntesis de la estructura básica de los factores Nod, el lipoquitín-oligosacárido (LCO), cuya longitud en si misma, puede contribuir

con la especificidad de huésped (Kamst *et al.*, 1997). Variaciones alélicas en el gen *nodC* pueden determinar variaciones en la longitud así como también incorporación de ácidos grasos al LCO, lo cual influye sobre la actividad del factor Nod y por lo tanto el rango de huésped (Roche *et al.*, 1996). En nuestro caso la secuencia del gen simbiótico *nodC* de los aislados 317 e I y el de la cepa U204, evidenció una fuerte relación con cepas de *R. leguminosarum* biovar *trifolii* (Cuadro 8).

Cuadro 8. Comparación de secuencias de los genes 16S RNA, *atpD* y *nodC*. En el cuadro figuran los microorganismos con similitudes iguales o mayores al 97 %.

Cepa	Gen	Bases	Similitud	Especie	Cepa	Nº acceso (NCBI)
317	16S RNAr	1162	100 % 100 %	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	SRDI943 3.22	JN585114.1 JQ795192.1
I	16S RNAr	1185	100 % 100 %	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> <i>R. leguminosarum</i>	SE25a PVR3	JF810503.1 AB608021.1
U204	16S RNAr	1164	100 % 100 %	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	SRDI943 3.22	JN585114.1 JQ795192.1
317	<i>atpD</i>	512	100 % 99 %	<i>R. leguminosarum</i> <i>Rhizobium</i> sp.	CCBAU 65141 CCBAU 83477	HM070198.1 EU152337.1
I	<i>atpD</i>	516	97 % 97 %	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> <i>Rhizobium</i> sp.	WSM2304 RPVR32	CP001191.1 GQ863523.1
U204	<i>atpD</i>	509	100 % 100 %	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	BIHB 1167 BIHB 1164	JF759813.1 JF759812.1
317	<i>nodC</i>	876	98 % 97 %	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	3.22 TT-7A	JX122929.1 HQ650579.1
I	<i>nodC</i>	879	99 % 99 %	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	3.22 R200	JX122929.1 HQ394246.1
U204	<i>nodC</i>	884	98 % 99 %	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	3.22 R200	JX122929.1 HQ394246.1

3.3. EVALUACIÓN DE AISLADOS SEGÚN LA EFICIENCIA SIMBIÓTICA

En la selección de cepas a ser usadas como inoculante el criterio eficiencia simbiótica, es decir la capacidad de fijar nitrógeno en determinado hospedero, es clave. Esta evaluación se hace en invernáculo o en cámara de crecimiento con condiciones controladas, y la forma más directa y simple de determinar la eficiencia simbiótica es la producción de materia seca de la parte aérea de plantas inoculadas y no inoculadas, en un medio libre de nitrógeno (Neira, 1995).

Se evaluaron 9 aislados, 7 de Cangué, sitio sin historia de inoculación, y 2 de La Estanzuela, sitio con historia de inoculación. Entre los aislados se seleccionó el 317, porque en el segundo corte a los 78 días de la siembra, la biomasa de la parte aérea fue mayor a la obtenida cuando se usó el inoculante comercial (Figura 10). Las plantas control sin inocular produjeron la misma cantidad de biomasa que la simbiosis con los aislados 314 y 1116, diferenciándose del tratamiento con el inoculante comercial, U204. El resto de los aislados no se diferenciaron estadísticamente.

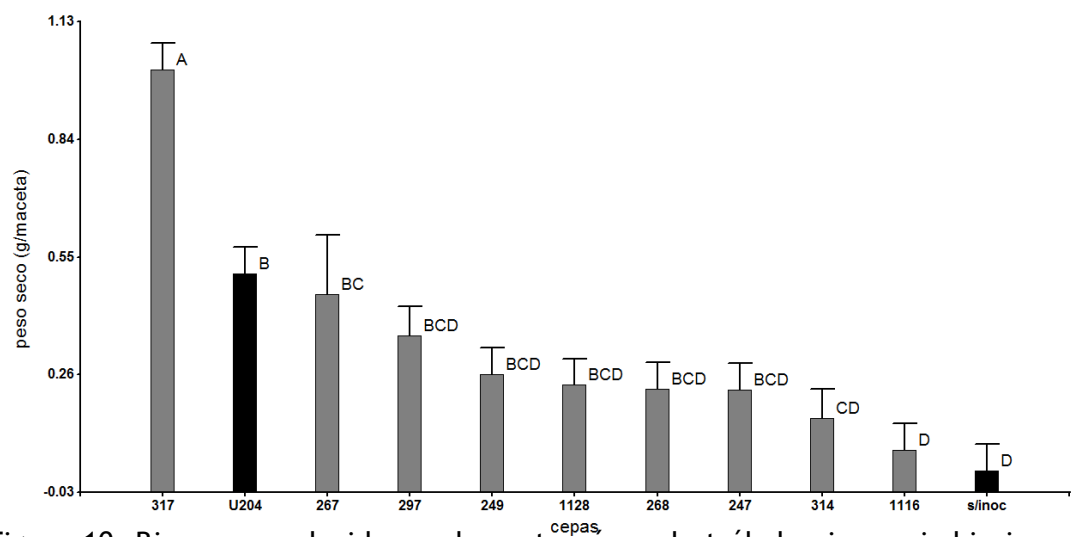


Figura 10. Biomasa producida por la parte aérea de trébol rojo en simbiosis con distintos rizobios. Se incluyó un control sin inocular y sin nitrógeno(s/inoc) y el inoculante comercial cepa U204. La biomasa se expresa como peso seco de la parte aérea por maceta, al segundo corte (78 días después de la siembra). Las diferentes letras indican diferencias significativas (Test de Tukey $p < 0,05$).

3.4. HABILIDAD COMPETITIVA DE LOS INOCULANTES EN EL CAMPO

En distintos ensayos de evaluación de cepas se observó que la selección en base a la eficiencia simbiótica no asegura el éxito de la inoculación en campo (Thies *et al.*, 1992; Dowling y Broughton, 1986; Toro, 1996). La habilidad de una cepa para ocupar nódulos depende de su competitividad y la competitividad del inoculante respecto a las cepas nativas es una característica a tener en cuenta en la selección. Sin embargo

esta propiedad de las cepas ha sido escasamente evaluada en ensayos a campo debido a las dificultades para identificarlas de manera sencilla y en gran número.

En esta tesis se evaluó la competitividad, en condición de campo, de la cepa U204 y del aislado 317 respecto a las cepas nativas presentes en el suelo. El ensayo, realizado en INIA La Estanzuela, constó de tres tratamientos: inoculación con la cepa U204, inoculación con el aislado 317 y sin inocular. Los nódulos se colectaron al azar de la zona superior de la raíz principal (RP) y de la zona distal de raíces secundarias (RS) a los 6 y 12 meses después de la siembra. Para determinar la ocupación de los inoculantes respecto a las cepas del suelo se analizaron para cada tratamiento 50 nódulos tomados al azar de las dos zonas, 25 de la RP y 25 de la RS. La ocupación de nódulos se determinó mediante el perfil ERIC de 50 aislados de cada tratamiento que incluyeron todas las parcelas, de esta forma la unidad experimental fue el tratamiento. Los resultados que se presentan corresponden a 3 ensayos a los que nos referiremos como experimento 1, experimento 2 y experimento 3.

A los 6 meses, los resultados del experimento 1 pusieron en evidencia que la cepa U204 ocupó el 36 % de los nódulos de la RP (Figura 11A y Figura 12) mientras que el aislado 317 ocupó el 72 % de los nódulos (Figura 11B y Figura 12). En las RS el 16 % de los nódulos estaban ocupados por la cepa U204 (Figura 11A y Figura 13) y el 12 % por el aislado 317 (Figura 11B y Figura 13). Debido a dificultades climáticas (sequía al momento de la siembra y temporal de piedra) el experimento 1 fue cosechado a los 6 meses. En el experimento 2, a los 6 meses la cepa U204 ocupó el 40 % de los nódulos de la RP (Figura 11A y Figura 14) mientras que el aislado 317 ocupó el 36 % (Figura 11B y Figura 14). En las raíces secundarias el 20 % de los nódulos estaban ocupados por el aislado 317, mientras que no se encontraron nódulos ocupados por la cepa U204 (Figura

11A y B Figura 15). A los 12 meses después de la siembra el 8 % de los nódulos estaba ocupado por el aislado 317 (Figura 11B), y no se encontraron nódulos ocupados por la cepa U204 en la RP (Figura 11A y Figura 16). Por otro lado, las cepas U204 y 317 ocuparon por igual el 12 % de los nódulos de las RS raíces (Figura 11A, B y Figura 17).

En el experimento 3 se analizó la ocupación a los 6 meses, y la cepa U204 no fue recuperada de ninguno de los nódulos de la RP, ni tampoco de las RS, es decir todos los nódulos estaban ocupados por cepas nativas (Figura 11A y Figura 18). Por otra parte, el aislado 317 fue recuperado de 2 nódulos, uno de la raíz principal y otro de la raíces secundarias (Figura 11B y Figura 19). Las diferencias en el grado de ocupación de las cepas inoculadas podría estar asociada a una menor densidad de cepas nativas como consecuencia de la sequía severa ocurrida previo a la siembra del ensayo 3.

Denton *et al.* (2002) evaluaron, usando ERIC-PCR, la habilidad competitiva del inoculante comercial (TA1) respecto a cepas de rizobios nativas - naturalizadas de suelos alcalinos de Australia obtenidas de *Trifolium alexandrinum*, *T. purpureum* y *T. resupinatum*. La cepa TA1 mostró una baja ocupación de nódulos en 2 de los sitios, aunque en uno de ellos en el primer año ocupó el 39 % de los nódulos de *T. alexandrinum*. Los autores explican la escasa ocupación de nódulos por el inoculante debido a baja sobrevivencia después de la siembra, inhabilidad para alcanzar la zona infectiva de las raíces, escasa adaptación a los suelos alcalinos, y por una pobre interacción planta- rizobio (Denton *et al.*, 2002).

En Islandia, Svenning *et al.* (2001) estudiaron la ocupación de nódulos de trébol blanco por 3 cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii en campo durante tres estaciones de crecimiento, mediante ERIC-PCR. En el tratamiento consistente de inóculo mixto, encontraron que la

cepa 20-15 ocupó el 80-90 % de los nódulos mientras que la cepa 32-28 estuvo presente en el 3 %. Estos autores propusieron que el ERIC-PCR es un método eficiente y confiable para identificar cepas de rizobios a partir de nódulos.

Loureiro *et al.* (2007) evaluaron la diversidad de rizobios que nodulan soja (*Glycine max*) de suelos de Brasil mediante BOX-PCR. Los perfiles generados permitieron evaluar la habilidad competitiva de 4 inoculantes introducidos en las décadas de 1960 y 1970. Los resultados confirmaron que la capacidad saprofítica y la competitividad de SEMIA 5019, seleccionada en la década de 1970 es mayor que la de SEMIA 587 seleccionada en la década de 1960. El 44 % de 240 cepas mostraron similitud con una de las 4 cepas inoculantes. Los autores sugieren que la alta diversidad genética, o la baja similaridad con las cepas de los inoculantes, podrían deberse a factores estresantes que pueden causar una presión selectiva generadora de variabilidad rizobiana. Además se ha evidenciado transferencia horizontal de genes entre cepas de inoculantes e indígenas (Batista *et al.*, 2007) que podrían explicar la alta diversidad genética encontrada. Camargo (2012), utilizando BOX-PCR para evaluar la ocupación de nódulos en campo, determinó la competitividad entre inoculantes experimentales y cepas nativas, para un nuevo cultivar diploide de *Lotus uliginosus*. Los resultados evidenciaron que el inoculante comercial para *L. uliginosus* `Grasslands Maku`, la cepa U526 de *Bradyrhizobium* sp., ocupó el 84 % de los nódulos. Esto demostró que esa cepa introducida es más competitiva que las cepas nativas - naturalizadas del sitio de ensayo. También mediante BOX-PCR Menna *et al.* (2009) reportaron que estos *primers* deben considerarse una importante y eficaz herramienta para el control de calidad de los inoculantes rizobianos en campo.

En Uruguay Rodríguez Blanco *et al.* (2010) evaluaron la habilidad competitiva en condiciones controladas de la cepa U204, usada como inoculante comercial para trébol, y dos aislados nativos de *T. pratense* a través de GTG₅-PCR *fingertprinting* y por producción de melanina. Los experimentos de ocupación de nódulos evidenciaron que la cepa efectiva (T126) tuvo una alta habilidad competitiva en comparación a la cepa no efectiva (T70) cuando con ellas se co-inoculó trébol. Estos resultados mostraron que las cepas efectivas fueron más competitivas en la formación de nódulos que las cepas inefectivas. Por otra parte la cepa efectiva compitió con el inoculante U204 por la formación de nódulos en trébol rojo y trébol blanco, pero la ocupación dependió de la proporción de co-inóculo usado. Como se trató de un estudio en medio estéril, las conclusiones pueden no aplicarse a los estudios a campo de la presente investigación.

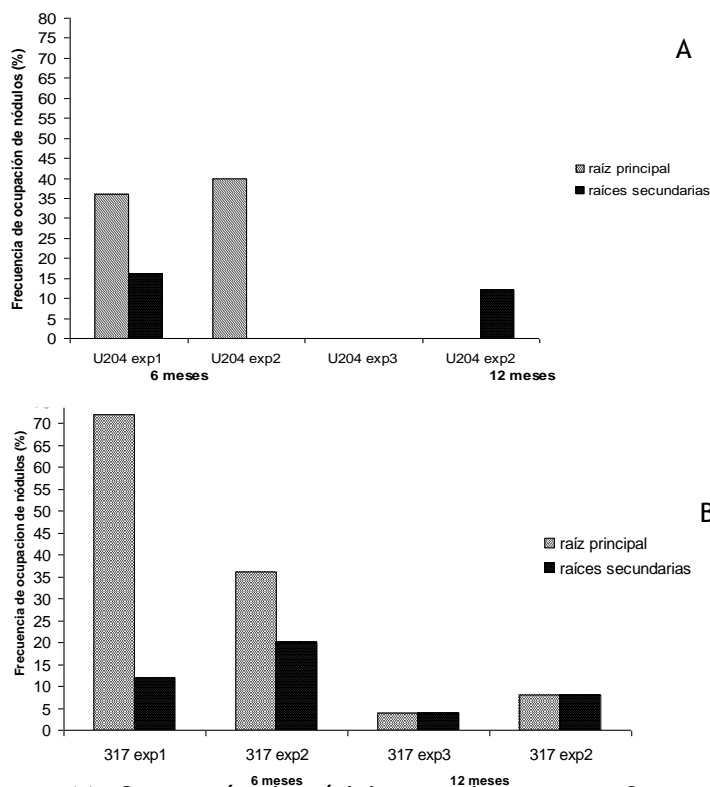


Figura 11. Ocupación de nódulos en el campo en 3 experimentos. A) porcentaje de nódulos ocupados por el inoculante comercial (U204) y B) porcentaje de nódulos ocupados por el inoculante experimental (317). Ambos son respecto a cepas nativas, a los 6 y 12 meses post- siembra.

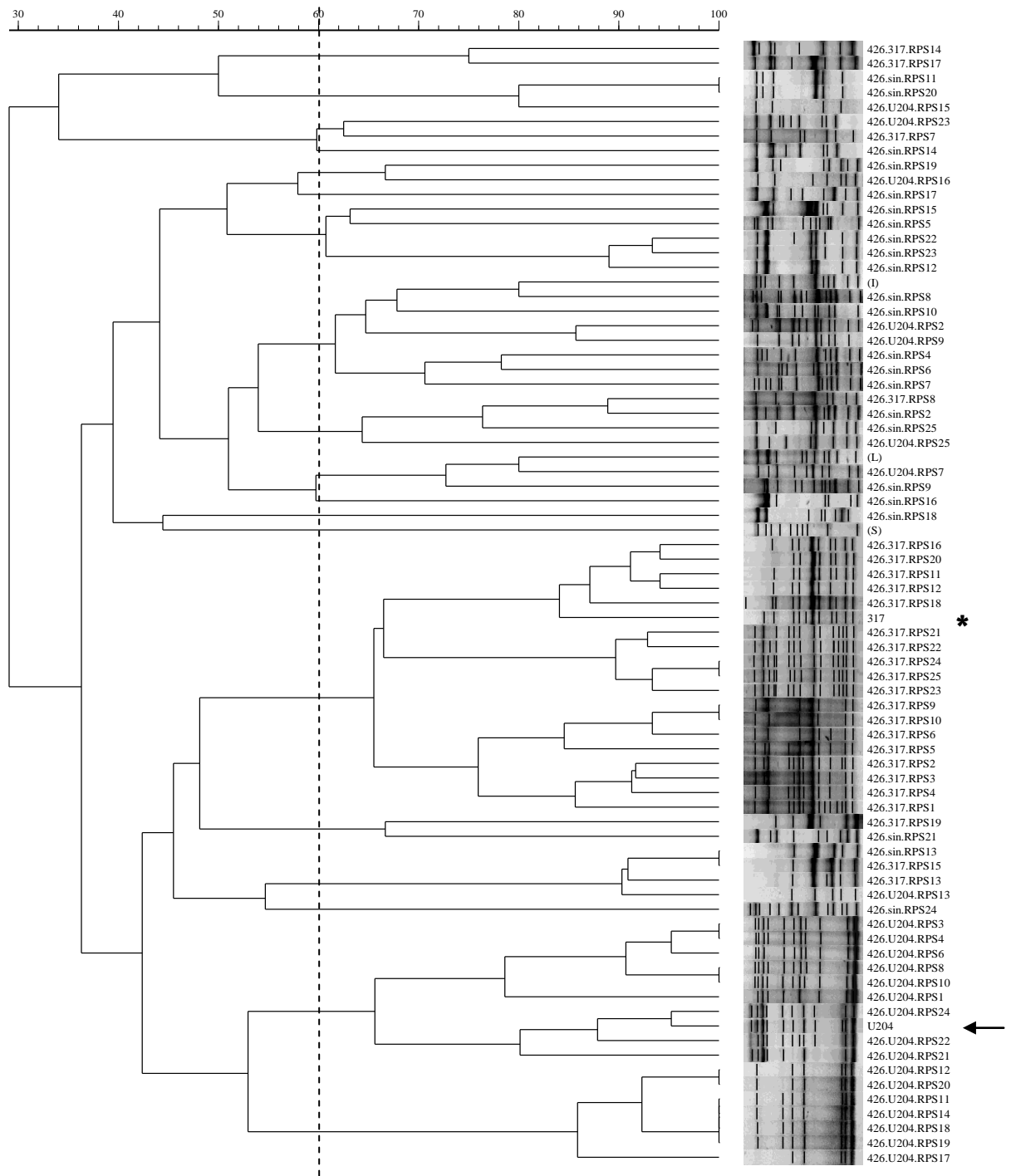


Figura 12. Ocupación de nódulos de la raíz principal (experimento 1) a los 6 meses post-siembra. El dendrograma se construyó a partir de 75 perfiles ERIC, de los cuales 25 corresponden al tratamiento inoculado con la cepa U204, 25 al tratamiento inoculado con la cepa 317 y 25 al tratamiento control sin inocular. La cepa U204 se señala con una flecha, y la cepa 317 con un asterisco.

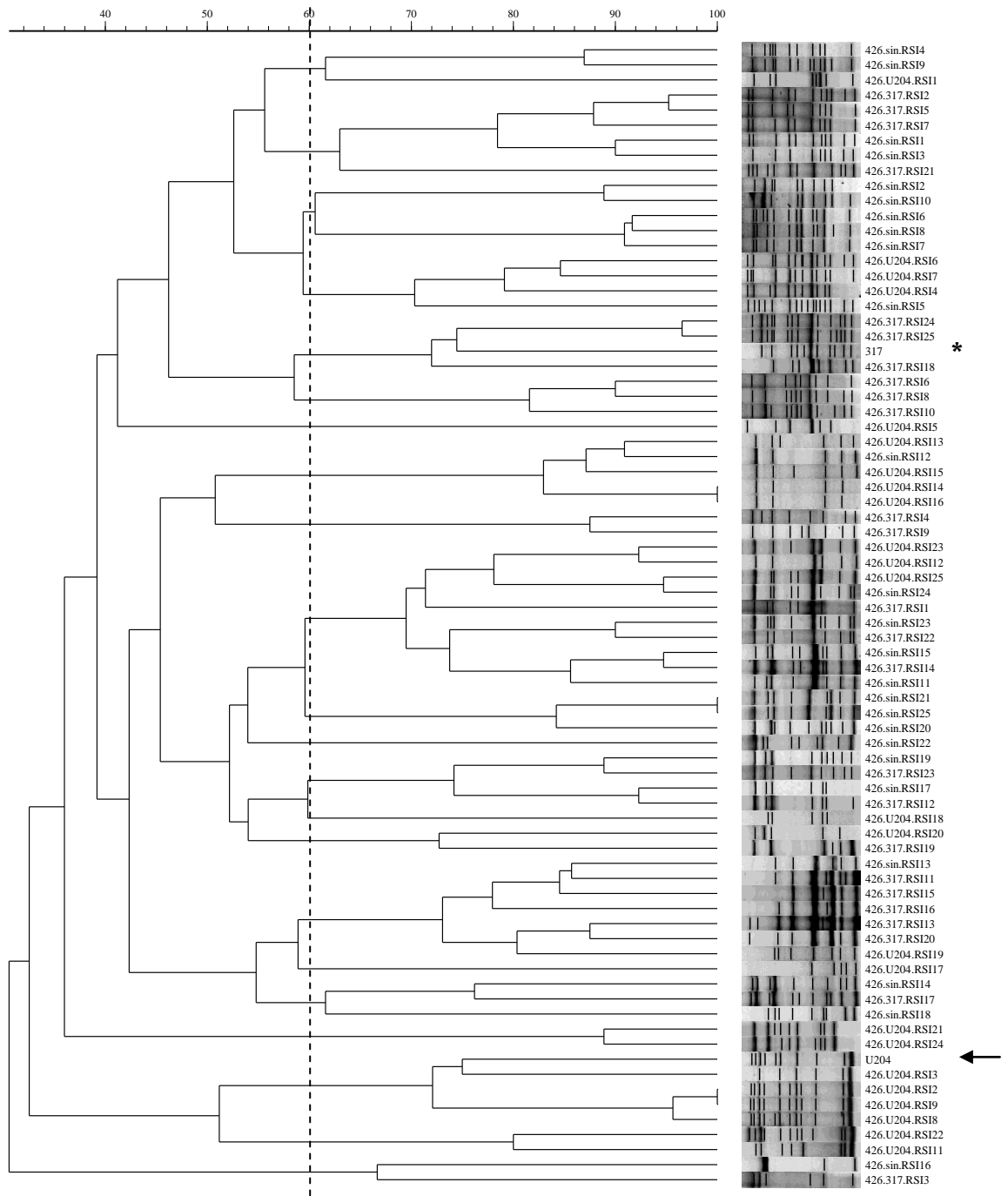


Figura 13. Ocupación de nódulos de las raíces secundarias (experimento 1) a los 6 meses post-siembra. El dendrograma se construyó a partir de 75 perfiles ERIC, de los cuales 25 corresponden al tratamiento inoculado con la cepa U204, 25 al tratamiento inoculado con la cepa 317 y 25 al tratamiento control sin inocular. La cepa U204 se señala con una flecha, y la cepa 317 con un asterisco.

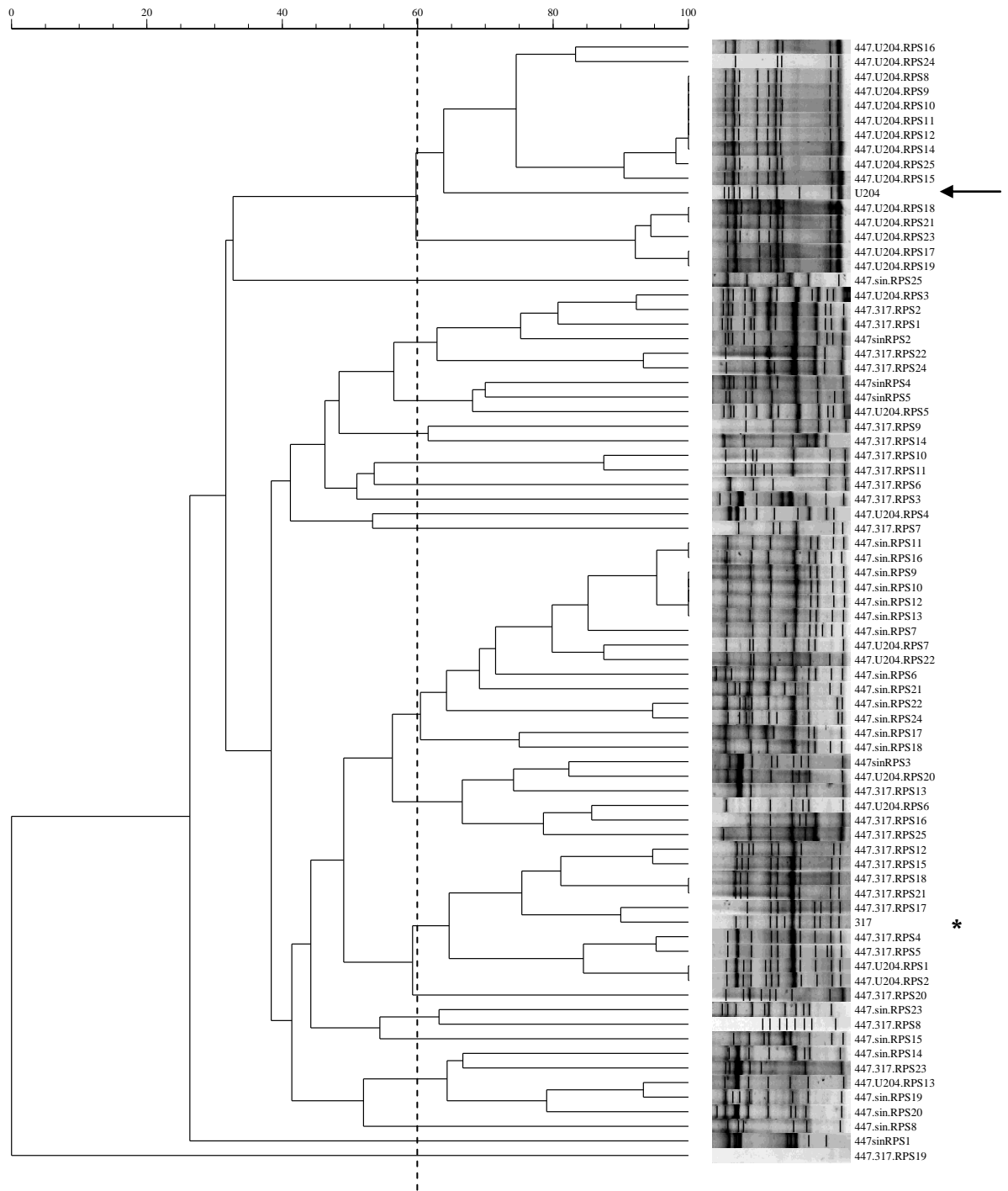


Figura 14. Ocupación de nódulos de la raíz principal (experimento 2) a los 6 meses post-siembra. El dendrograma se construyó a partir de 75 perfiles ERIC, de los cuales 25 corresponden al tratamiento inoculado con la cepa U204, 25 al tratamiento inoculado con la cepa 317 y 25 al tratamiento control sin inocular. La cepa U204 se señala con una flecha, y la cepa 317 con un asterisco.

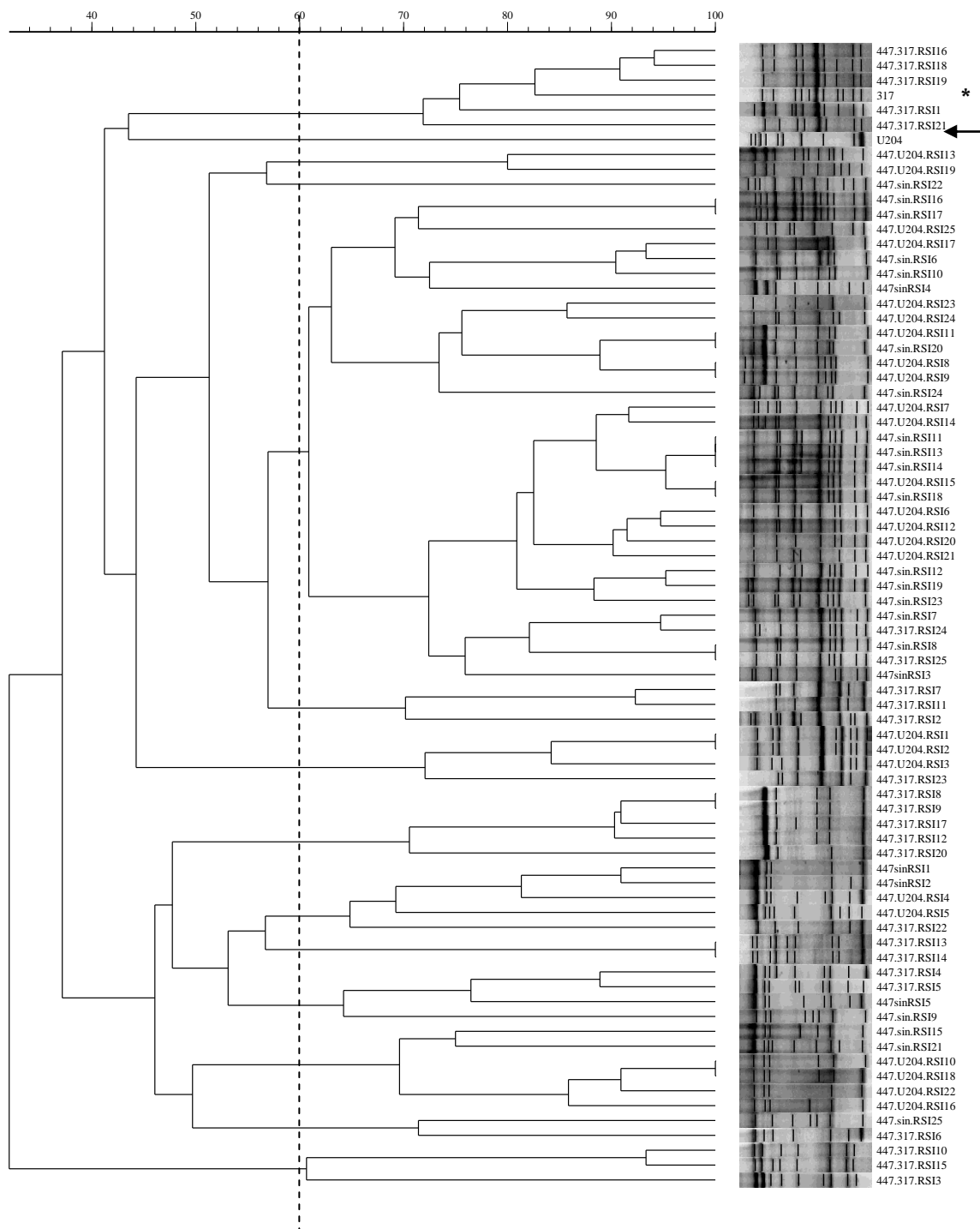


Figura 15. Ocupación de nódulos de las raíces secundarias (experimento 2) a los 6 meses post siembra. El dendrograma se construyó a partir de 75 perfiles ERIC, de los cuales 25 corresponden al tratamiento inoculado con la cepa U204, 25 al tratamiento inoculado con la cepa 317 y 25 al tratamiento control sin inocular. La cepa U204 se señala con una flecha, y la cepa 317 con un asterisco.

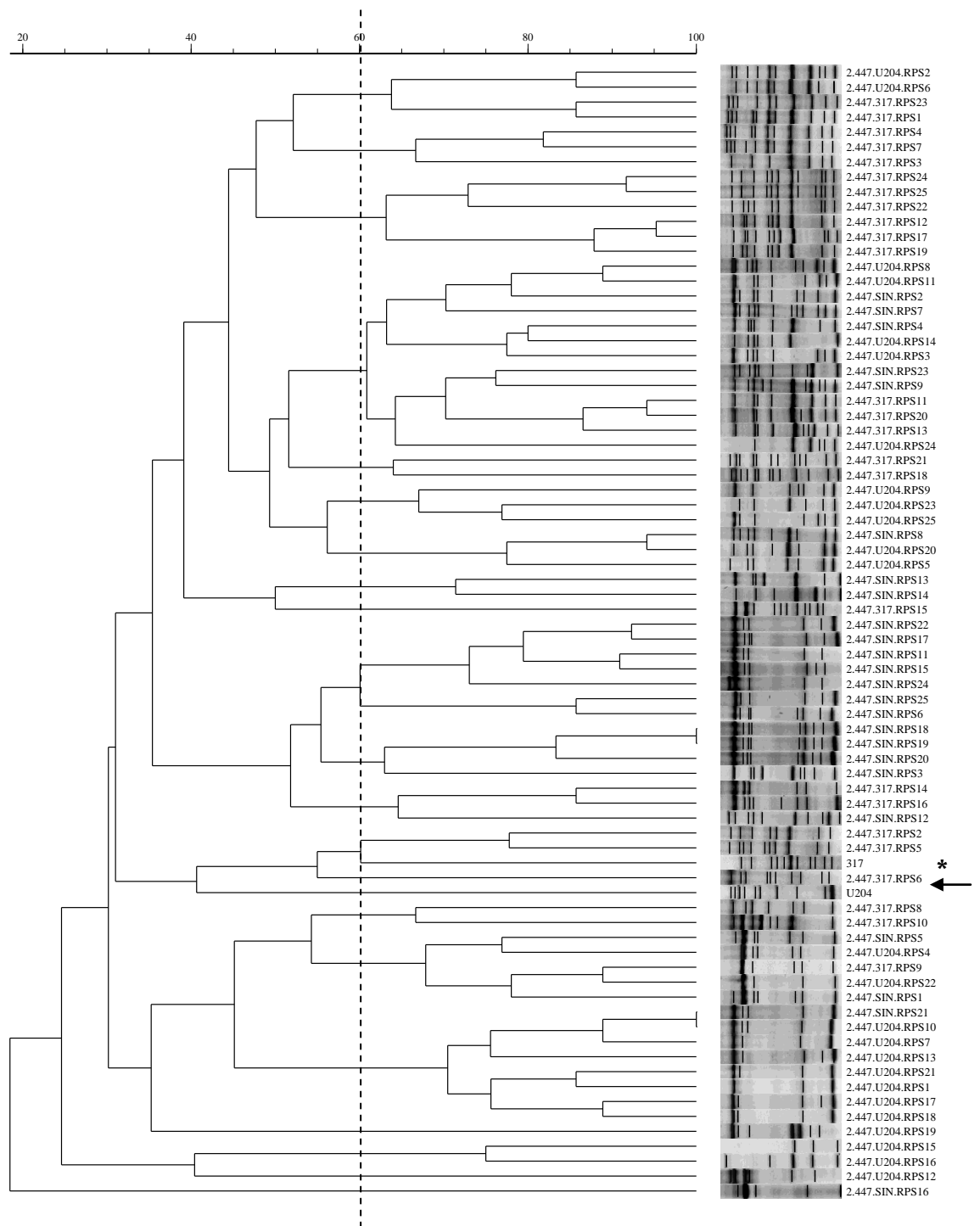


Figura 16. Ocupación de nódulos de la raíz principal (experimento 2) a los 12 meses post-siembr. El dendrograma se construyó a partir de 75 perfiles ERIC, de los cuales 25 corresponden al tratamiento inoculado con la cepa U204, 25 al tratamiento inoculado con la cepa 317 y 25 al tratamiento control sin inocular. La cepa U204 se señala con una flecha, y la cepa 317 con un asterisco.

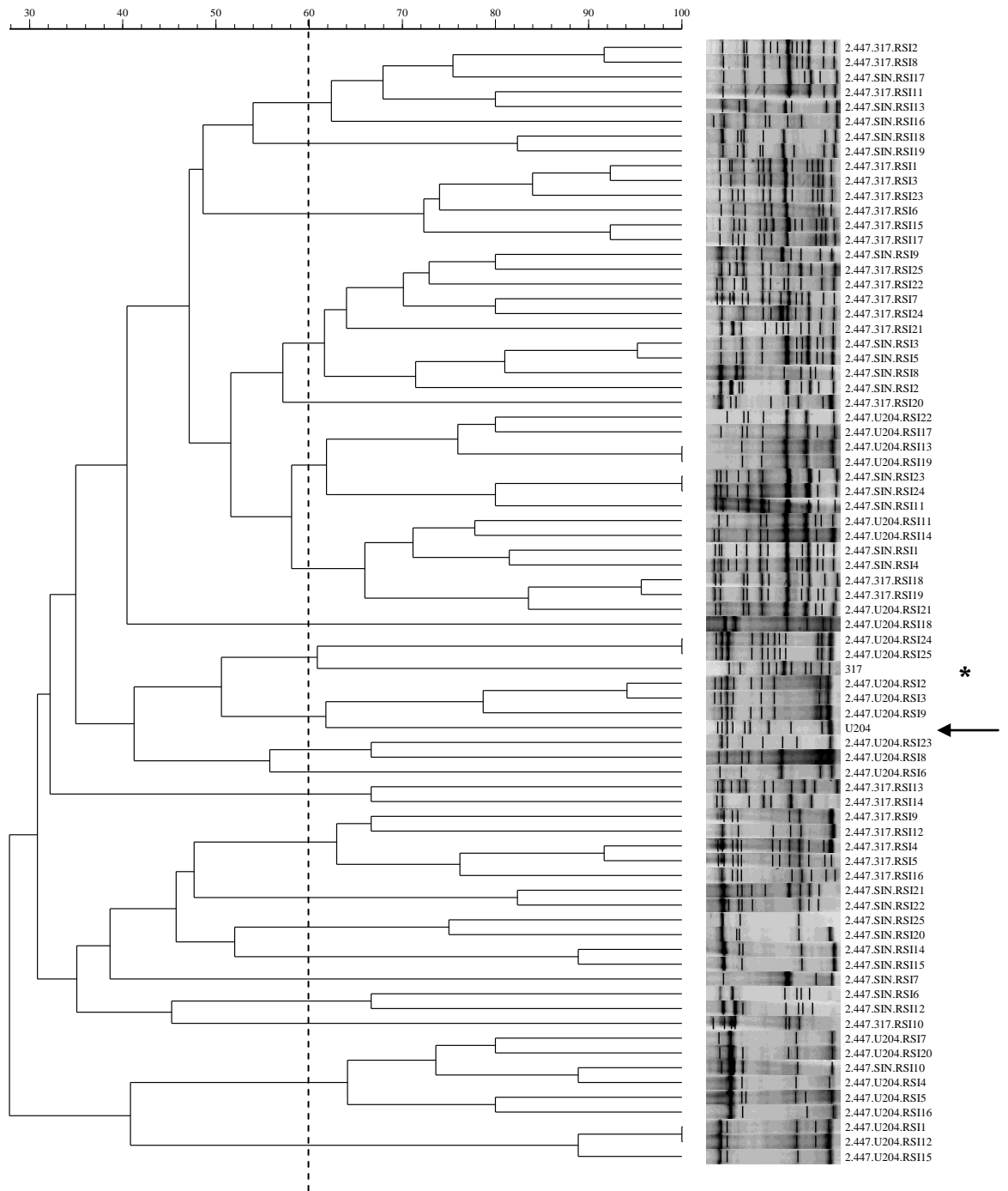


Figura 17. Ocupación de nódulos de las raíces secundarias (experimento 2) a los 12 meses post-siembra. El dendrograma se construyó a partir de 75 perfiles ERIC, de los cuales 25 corresponden al tratamiento inoculado con la cepa U204, 25 al tratamiento inoculado con la cepa 317 y 25 al tratamiento control sin inocular. La cepa U204 se señala con una flecha, y la cepa 317 con un asterisco.

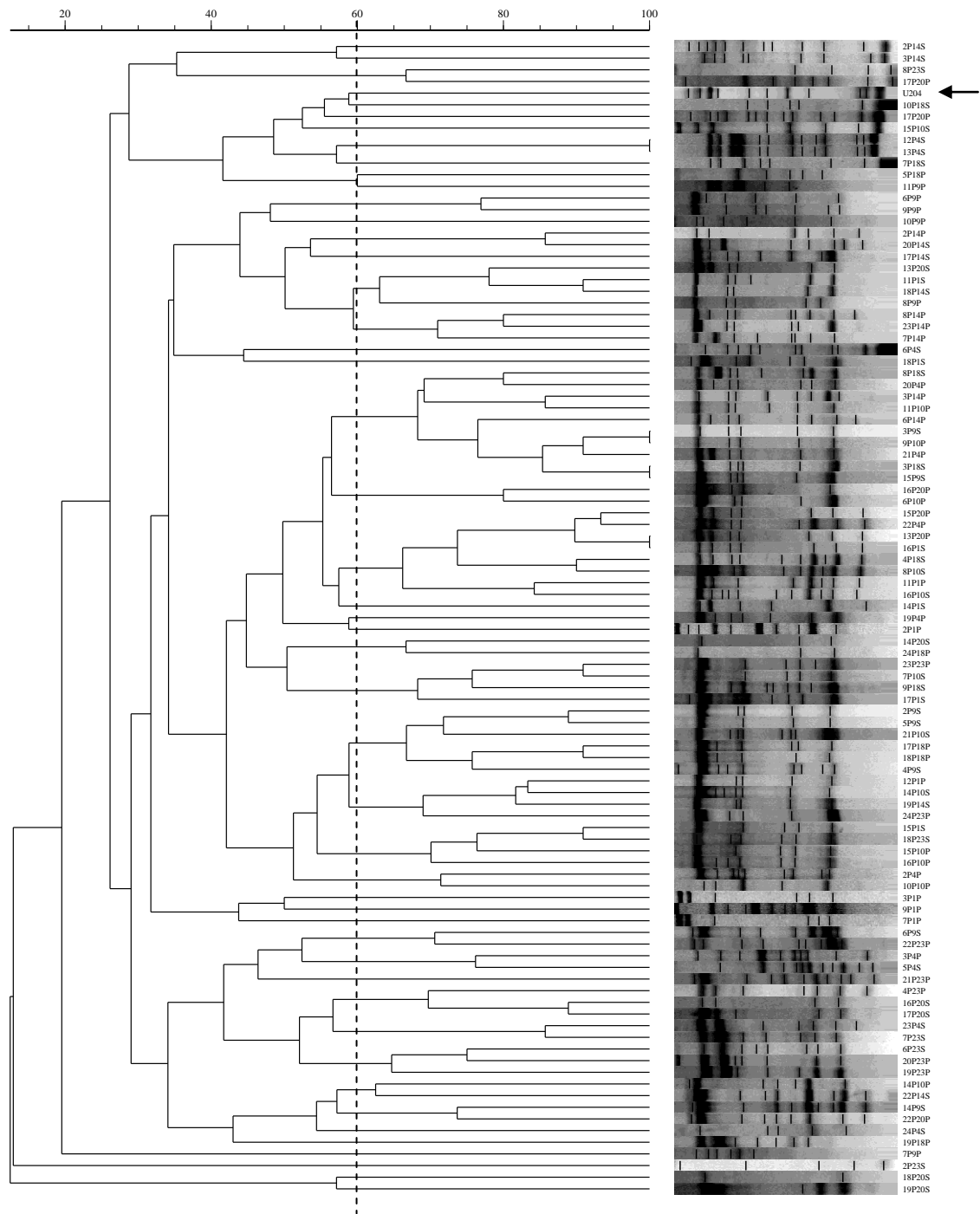


Figura 18. Ocupación de nódulos de raíces primarias y secundarias (experimento 3) a los 6 meses post-siembra. El dendrograma se construyó a partir de 100 perfiles ERIC, de los cuales 50 corresponden al tratamiento inoculado con la cepa U204 y 50 al tratamiento control sin inocular. La cepa U204 se señala con una flecha.

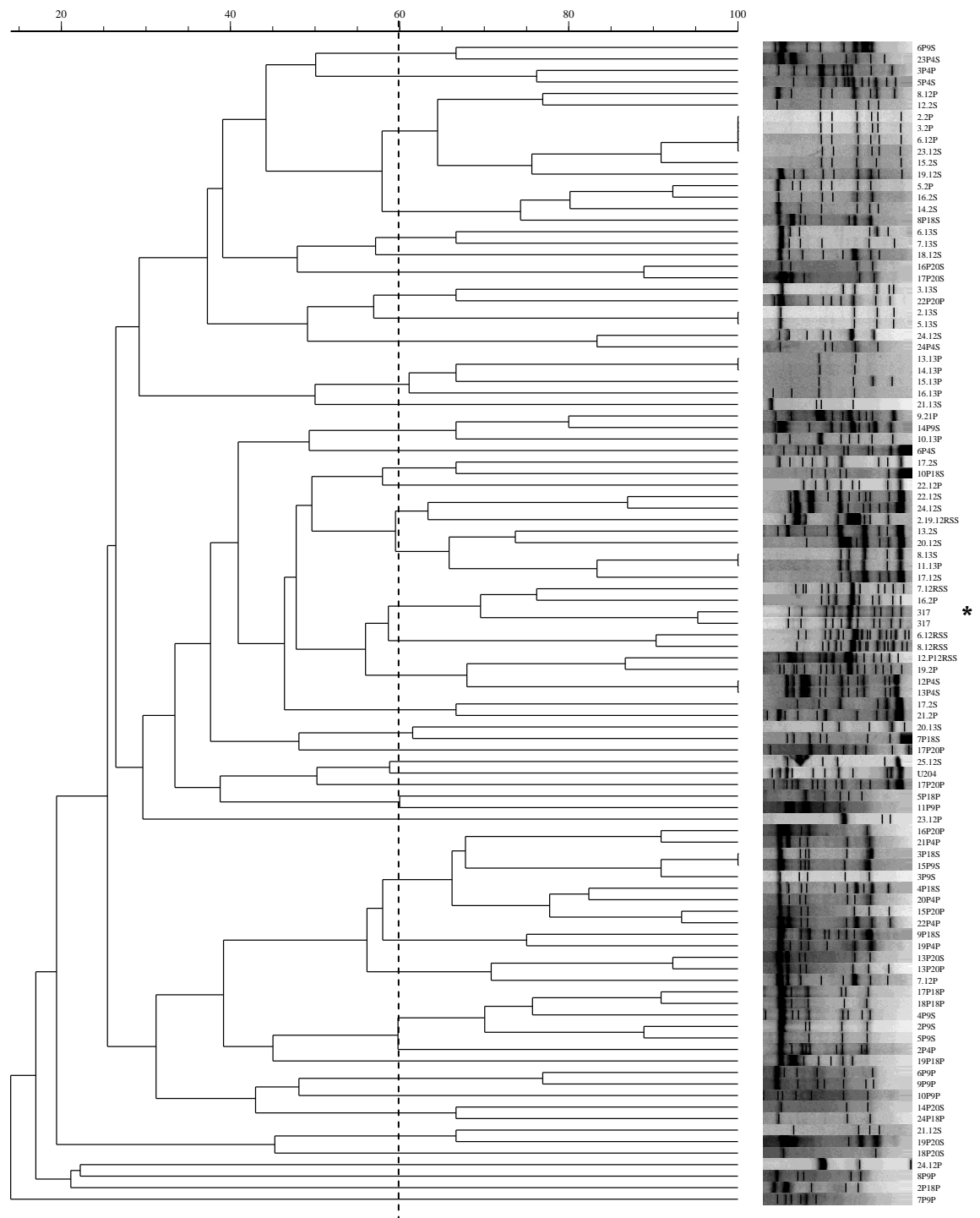


Figura 19. Ocupación de nódulos de raíces primarias y secundarias (experimento 3) a los 6 meses post-siembr. El dendrograma se construyó a partir de 100 perfiles ERIC, de los cuales 50 corresponden al tratamiento inoculado con la cepa 317 y 50 al tratamiento sin inocular. La cepa 317 se señala con un asterisco.

3.5. EFICIENCIA SIMBIÓTICA EN CAMPO

Otro de los parámetros usados para evaluar la FBN es el número de nódulos producido por las plantas. Para esto, se realizaron dos experimentos en los que se determinó, en diferentes zonas de las raíces, los nódulos inducidos a los 60 días después de la siembra en plantas inoculadas con el aislado 317, con la cepa U204 y sin inocular. En el experimento 1, el número de nódulos inducidos en plantas inoculadas con la cepa U204 no se diferenció estadísticamente del obtenido cuando el inoculante fue la cepa 317 y al tratamiento sin inocular (p-valor = 0,851) (Figura 20A). Los resultados del experimento 2 tampoco mostraron diferencias al analizar el número de nódulos inducidos en plantas inoculadas con la cepa U204, con la 317 y sin inocular (p-valor=0,595) (Figura 20B). De esta forma, la proporción de nódulos inducidos por cada inoculante y por los rizobios nativos en las distintas zonas de la raíz fue la misma (Figura 20).

En esta tesis se determinó la ocupación de nódulos de las cepas inoculantes en dos zonas de la raíz (raíz principal superior y de las raíces secundarias inferiores), de tal forma que la proporción de nódulos analizados por ERIC-PCR en el apartado 3.4., corresponde aproximadamente al 50 % de los nódulos totales presentes en la raíz principal y superior (Figura 20). Es importante tener en cuenta que los inoculantes ocupan mayormente la raíz principal y los primeros centímetros de las laterales dado que el desplazamiento de los rizobios es limitado (Fernández-Canigia, 2003). Por estas razones consideramos justificadas las zonas analizadas.

La eficiencia simbiótica en campo fue evaluada mediante el peso seco de la parte aérea de los tratamientos inoculados con las cepas U204 y

317, con dos dosis de inoculación, la normal (X 1) y cinco veces más (X 5). El experimento 2 se mantuvo por 3 años, durante los cuales se realizaron 8 cortes para determinar la eficiencia de los pares simbióticos y del control sin inocular. No se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos inoculados X1 y sin inocular en ninguna de las fechas evaluadas (Figura 21).

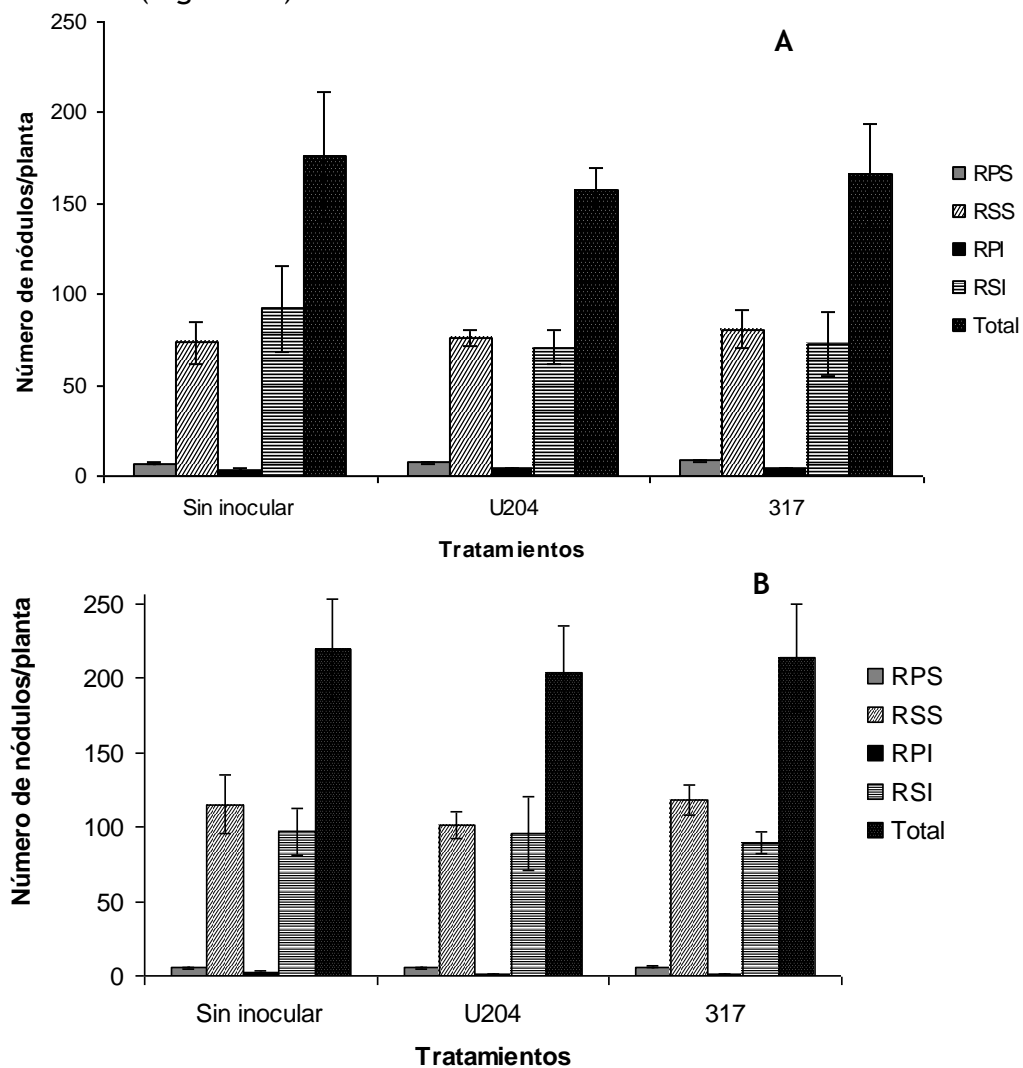


Figura 20, Nódulos inducidos en diferentes zonas de la raíz de *Trifolium pratense* en campo. Los valores corresponden al promedio del número de nódulos de plantas inoculadas con la cepa U204, el aislado 317 y el testigo sin inocular. En A experimento 1 y en B experimento 2. Las barras verticales representan el error estándar. RPS:raíz principal superior, RSS:raíces secundarias superiores, RPI: raíz principal inferior, RSI: raíces secundarias inferiores.

Tampoco se determinaron diferencias en el rendimiento de forraje al aumentar X5 la dosis de inoculación. La igualdad en la producción de biomasa en todos los tratamientos posiblemente sea consecuencia de que el nitrógeno combinado en el suelo suplió las necesidades de este macroelemento para la etapa de crecimiento de la planta, o que las cepas presentes en el suelo, fueron más competitivas que los inoculantes, nodulando (Figura 20) y aportando suficiente nitrógeno para el desarrollo de las plantas.

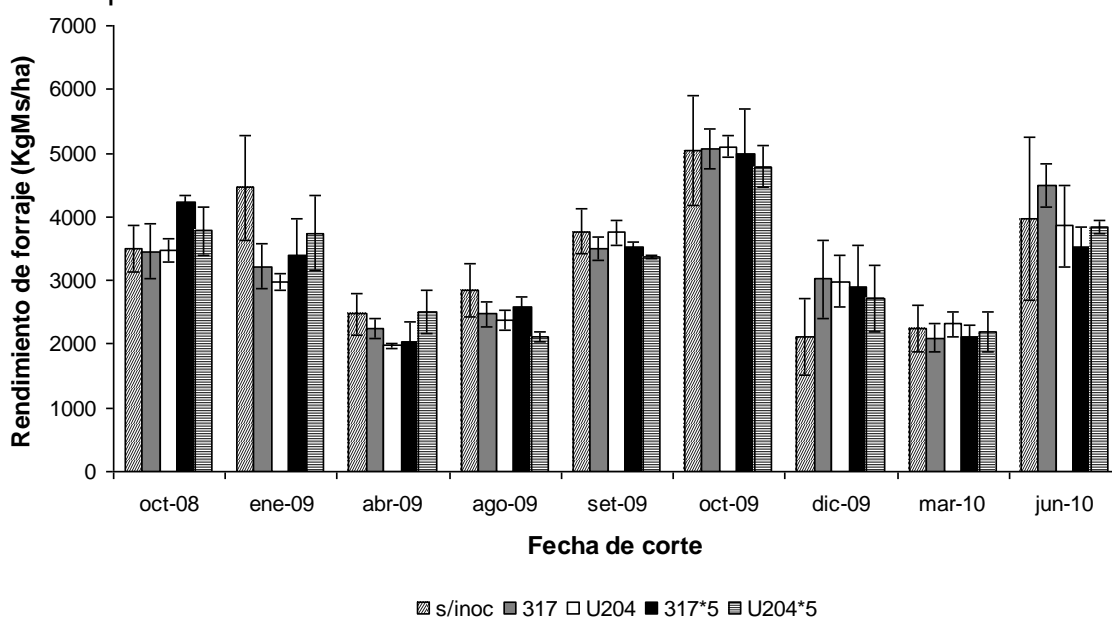


Figura 21. Biomasa producida por la parte aérea de plantas de *Trifolium pratense*. Los tratamientos corresponden a plantas inoculadas con la cepa U204 y el aislado 317 con dos dosis de inoculación, la recomendada comercialmente (X 1) y cinco veces mayor (X 5). Se incluyó un tratamiento sin inocular. Los valores corresponden a la media del peso seco del forraje y las barras verticales al desvío estándar. No hubo diferencias significativas entre los tratamientos en ninguno de los 2 experimentos ($p > 0,05$).

3.6. OCUPACIÓN DE NÓDULOS CON DIFERENTES DOSIS DE INOCULACIÓN

La baja ocupación de nódulos por un inoculante puede ser superada con una práctica que consiste en aumentar la dosis del inoculante recomendada (Catroux *et al.*, 2001). Esta práctica es recomendada cuando

las cepas nativas son muy competitivas o parásitas, práctica con la que se ha logrado aumentar el número de rizobios del inoculante por semilla, y con ello la nodulación (Dutto, 2002).

Para mejorar la ocupación de nódulos por la cepa U204, el inoculante comercial para trébol, se aumentó cinco veces la dosis de inoculación, y los ensayos se instalaron en INIA La Estanzuela. La ocupación de nódulos se siguió a través del patrón ERIC-PCR de 50 aislados de nódulos de parcelas inoculadas y 50 aislados de nódulos de parcelas sin inocular, en dos momentos, a los 6 y 12 meses después de la siembra en el experimento 2. Los resultados evidenciaron que de los 50 nódulos analizados a los 6 y 12 meses en las dos zonas de la raíz (RP y RS), ninguno estaba ocupado por el inoculante comercial (Figuras 22 y 23). Mediante esta práctica, también conocida como “hiperinoculación”, si bien se quintuplicó la concentración del inoculante comercial no se logró aumentar el número de nódulos ocupados por él. Estos resultados hacen pensar que las cepas nativas - naturalizadas de los suelos de La Estanzuela tienen una competitividad mayor que la del inoculante, o bien que éste no persiste. La ausencia de respuesta en biomasa aérea estaría indicando que las cepas nativas fueron eficientes.

El aumento de la dosis de inoculación se usó en un semillero de trébol blanco en el Departamento de Lavalleja, en presencia de cepas parásitas quedando la planta amarilla y enana. En ese ensayo se evaluaron 3 niveles de inoculación: alta media y baja, donde la media corresponde a la dosis usada en la siembra por los productores. En este ensayo se observó un marcado efecto sobre la implantación y producción de trébol blanco como consecuencia del aumento de la dosis de inoculación (Dutto, 2002). Aumentando la dosis de inoculante en este ambiente se mejora la colonización de cepas efectivas.

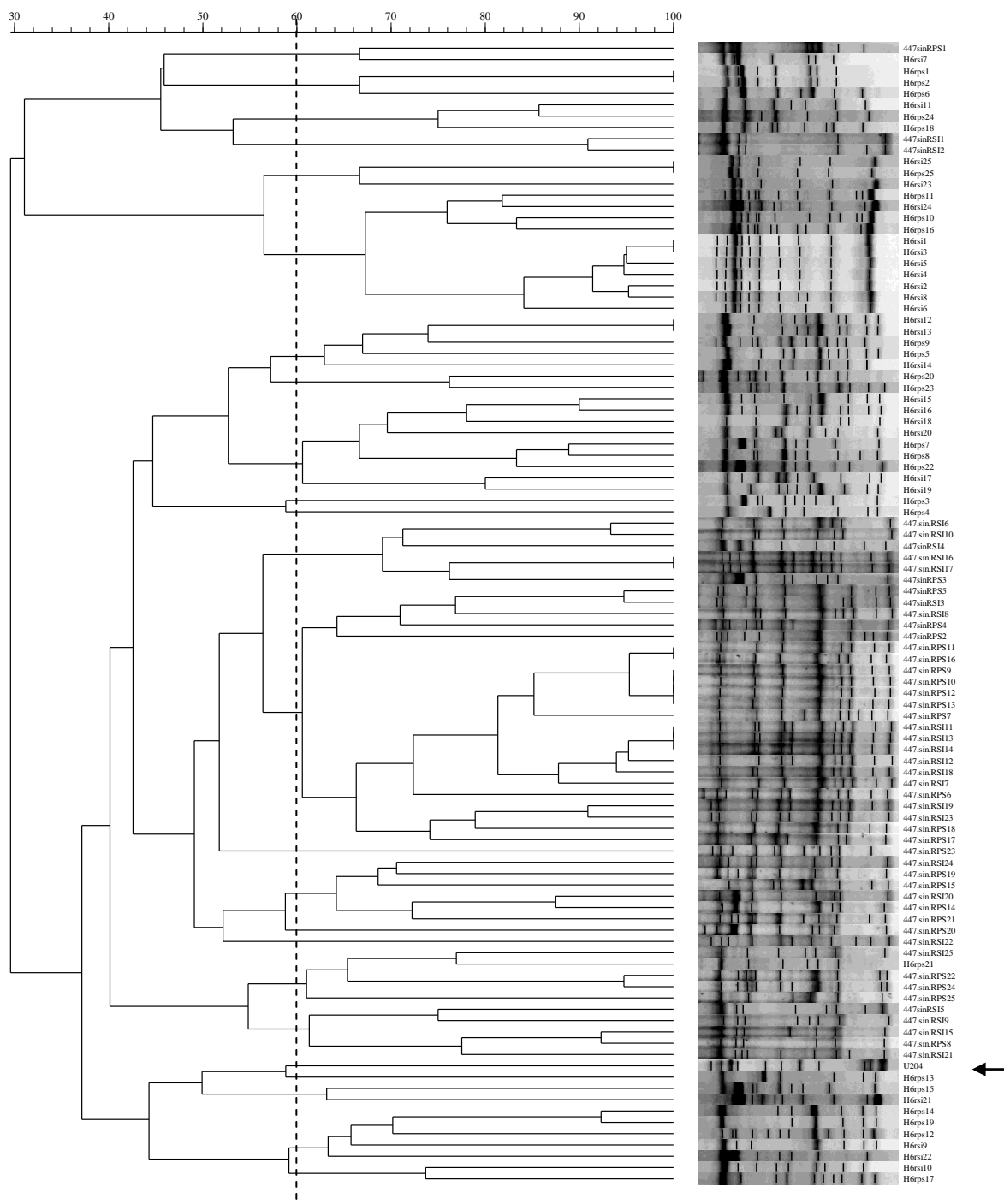


Figura 22. Dendrograma construido con perfiles ERIC de aislados de nódulos a los 6 meses post-inoculación de plantas inoculadas con una dosis X 5 y sin inocular. Se usaron 100 aislados de raíces primarias (RP) y secundarias (RS), 50 del tratamiento inoculado con la cepa U204 X 5 (H) y 50 del tratamiento sin inocular (sin). La cepa U204 se señala con una flecha.

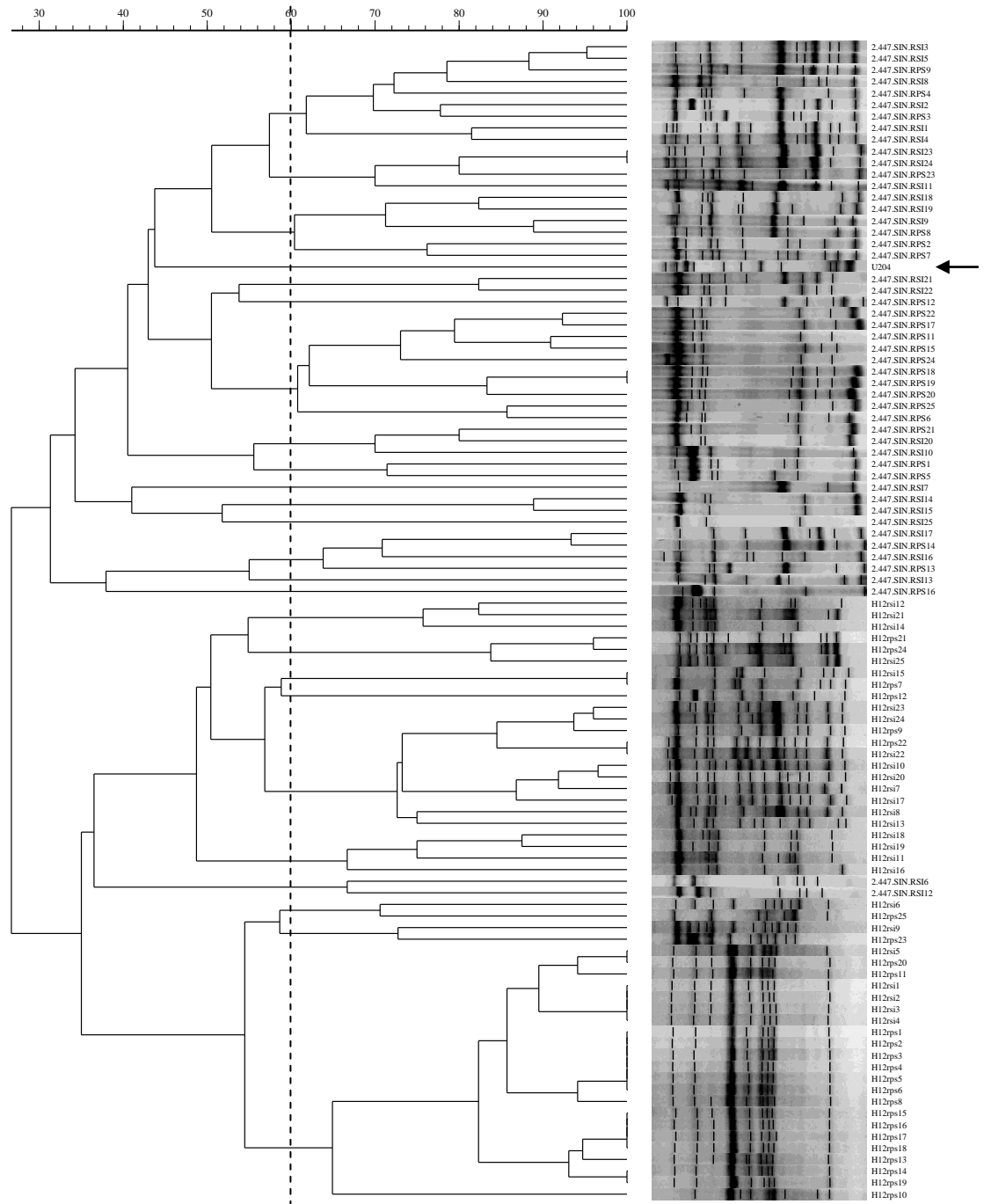


Figura 23. Dendrograma construido con perfiles ERIC de aislados de nódulos a los 12 meses post-inoculación realizada con dosis X 5 y sin inocular. Se usaron 100 aislados de raíces primarias (RP) y secundarias (RS), 50 del tratamiento inoculado con la cepa U204 X 5 (H) y 50 del tratamiento sin inocular (sin.). La cepa U204 se señala con una flecha.

3.7. EVALUACIÓN A CAMPO DE UNA CEPA EFICIENTE Y FRECUENTE EN NÓDULOS DE TRÉBOL ROJO

En general, la selección de rizobios se realiza entre cepas con buena eficiencia simbiótica obtenida en condiciones controladas, antes de evaluar su persistencia y/o tolerancia en campo (Howieson *et al.*, 2000). Con este criterio se seleccionó el aislado 317, como se vio en el apartado 3.3. Sin embargo hay una aproximación alternativa que consiste en ensayar las capacidades simbióticas y competitivas de aislados nativos - naturalizados que colonizan gran parte de los nódulos colectados en campo (Denton *et al.*, 2003).

Los experimentos en INIA La Estanzuela pusieron en evidencia que un aislado, denominado I, ocupó el 44 % de los nódulos del tratamiento no inoculado (Figura 15) en el ensayo 2, lo que supone una competitividad interesante. Por esto se evaluó la eficiencia simbiótica en condiciones controladas de ese aislado. En esas condiciones, la biomasa de la parte aérea de plantas inoculadas con el aislado I, al segundo corte, fue la misma que la obtenida cuando se inoculó con la cepa U204 o con el aislado 317 (Figura 24).

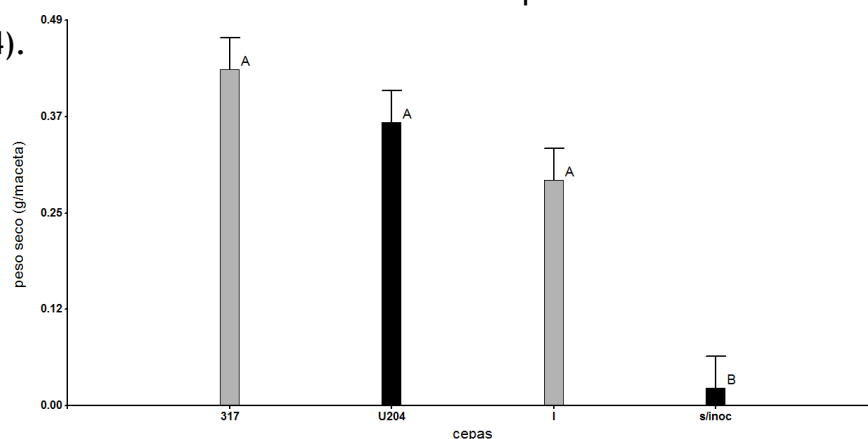


Figura 24. Biomasa producida por la parte aérea de plantas de *Trifolium pratense* en condiciones controladas. Se incluyó el aislado nativo 317, el inoculante comercial cepa U204 y un control sin inocular y sin nitrógeno(s/inoc). La biomasa se expresa como el peso seco por maceta al segundo corte (78 días post-siembra). Las diferentes letras indican diferencias significativas (Test de Tukey $p < 0,05$).

El ensayo a campo con el aislado I se realizó en INIA La Estanzuela, con dos tratamientos, inoculado con I y sin inocular (ensayo 3). Los nódulos se colectaron y analizaron procediendo como se indica en el apartado 3.4 de este capítulo. A los 6 meses de sembrado no se recuperó el aislado I de ninguno de los 50 nódulos analizados, 25 de RP y 25 de RS (Figura 25). Dado que el ensayo se realizó en el mismo suelo donde fue colectado el aislado I, y que se elaboró en la industria con el mismo procedimiento y controles que los usados para producir el inoculante comercial, los resultados podrían explicarse por las condiciones climáticas. El ensayo 3 estuvo instalado en un ambiente húmedo normal durante 1 año pero fue posterior a una sequía. Por lo tanto seguramente este estrés haya afectado las poblaciones de rizobios, dado que las mismas fueron diferentes.

3.8. COMPETITIVIDAD DE LOS INOCULANTES EN DISTINTOS SUELOS

3.8.1. Validación de los transconjugantes para su uso en ensayos de competencia

Para evaluar la competitividad de la cepa U204 y de los aislados usados como inoculantes experimentales, el 317 y el I, se marcaron las cepas con el gen delator *gusA* a efecto de poder analizar de forma rápida un número alto de nódulos. Como la inserción del transposón que contiene el gen *gusA* ocurre al azar en el genoma del receptor, la misma puede generar mutaciones por inserción que afecten genes requeridos para la simbiosis (Sessitsch *et al.*, 1997; Anyango *et al.*, 1998). Por esto el uso de estos mutantes requiere la evaluación respecto a su parental en relación a la característica a ser evaluada. En nuestro caso, una vez verificada la inserción del transposón por selección en medio con antibióticos, se evaluaron 10 clones de cada transconjugante, designados como U204::*gusA*, 317::*gusA* e I::*gusA*, en relación al tiempo de aparición del primer nódulo y

número de nódulos inducidos respecto a cada cepa salvaje, en condición *in vitro*.

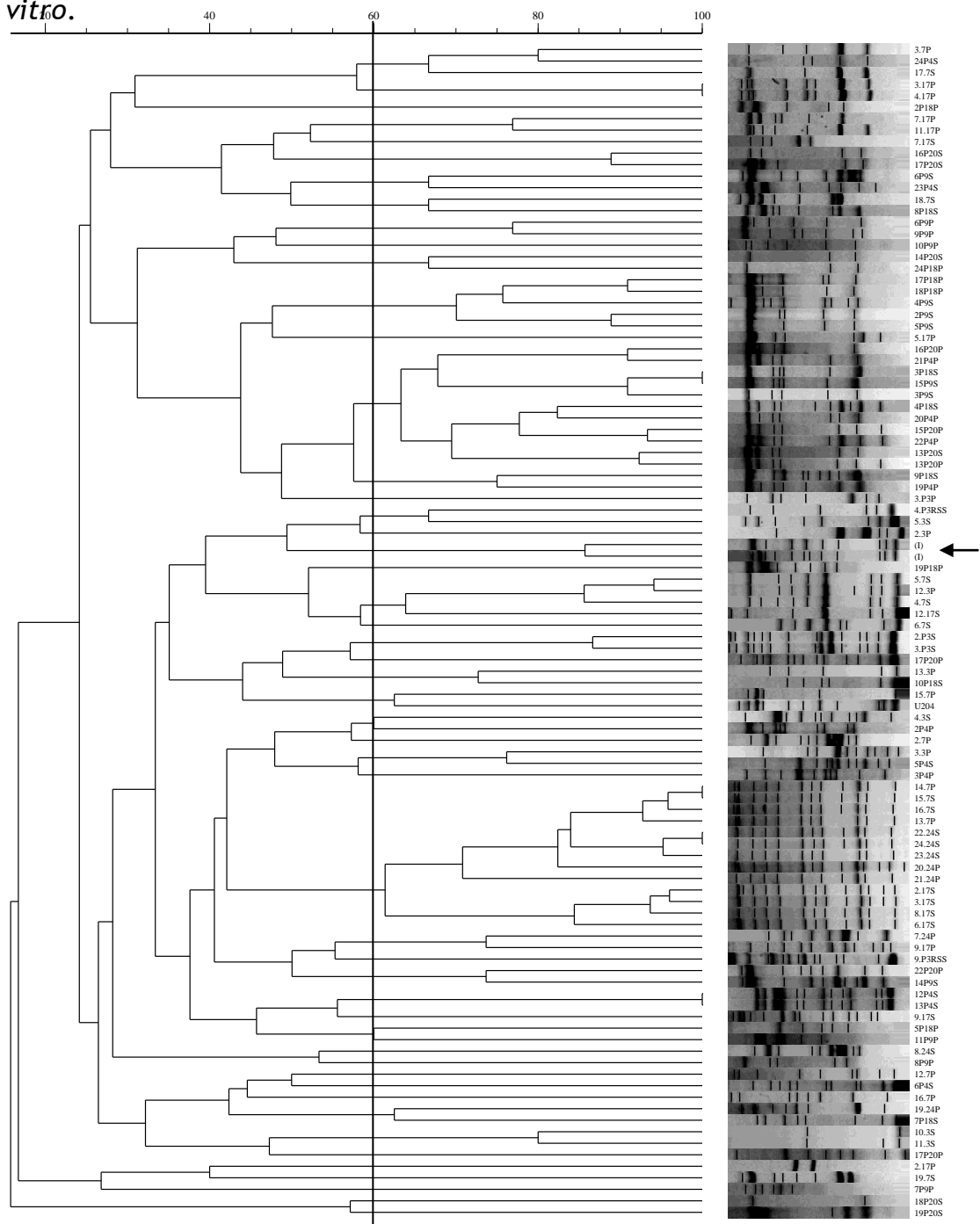


Figura 25. Ocupación de nódulos en raíces primarias y secundarias (experimento 3) a los 6 meses post-siembra. El dendrograma se construyó a partir de 100 perfiles ERIC, de los cuales 50 corresponden al tratamiento inoculado con el aislado I y 50 al tratamiento sin inocular. La cepa I se señala con una flecha.

El tiempo de aparición del primer nódulo fue a los 12 -14 días después de la inoculación, tanto cuando se usó como inóculo U204::*gusA*, 317::*gusA* e I::*gusA* como cuando se usaron los respectivos parentales. No se encontraron diferencias significativas en la inducción de nódulos por U204::*gusA* y el parental U204, cuando se compararon sus pendientes, que tuvieron un p-valor=0,584 (Figura 26 A y B). Tampoco se observaron diferencias significativas en la ocupación de nódulos entre I::*gusA* e 317::*gusA* con sus parentales I e 317, con un p-valor 0,974 y 0,199 respectivamente (Figura 26 C, D, E y F).

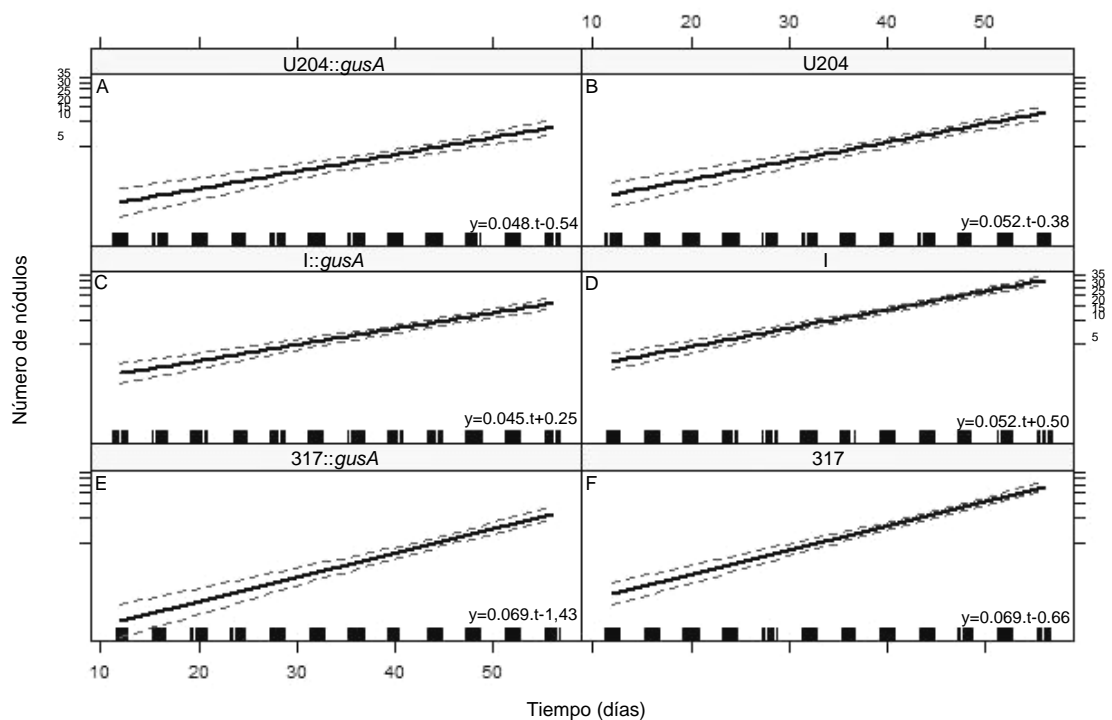


Figura 26. Cinética de nodulación de los transconjugantes y los parentales. Se representa el número de nódulos en función del tiempo (días) para los transconjugantes (U204::*gusA*, I::*gusA* y 317::*gusA*) y sus respectivos parentales (U204, I y 317). En cada caso se muestran los modelos de regresión lineal general asumiendo una distribución tipo Poisson.

Estos resultados indican que el patrón de nodulación de las cepas marcadas no se afectó como consecuencia de la inserción del gen *gusA*, por

lo que se usaron en los ensayos de competencia planteados en esta tesis. Este material permitió evaluar de manera sencilla y confiable la competitividad del inoculante comercial y de los experimentales en diferentes suelos, en condiciones controladas.

3.8.2. Competitividad de los inoculantes respecto a la de cepas nativas de diferentes suelos

Con U204::*gusA*, 317::*gusA* e I::*gusA* se prepararon inoculantes, para lo que crecieron en YEM y el soporte turba se impregnó con ese cultivo. A los 7 días, la concentración final en turba de U204::*gusA* fue $5,9 \times 10^9$ ufc.g⁻¹, la de 317::*gusA* $4,7 \times 10^9$ ufc.g⁻¹ y la de I::*gusA* $5,7 \times 10^9$ ufc.g⁻¹. De esta forma con los transconjugantes en turba se logró la concentración de rizobios necesaria para su uso como inoculante según lo establece la normativa de control de calidad de inoculantes del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, que exige para la comercialización de los mismos una concentración inicial superior de 2×10^9 ufc.g⁻¹ (Labandera y Mayans, 2006).

Para evaluar la habilidad competitiva de los inoculantes respecto a las cepas nativas se usaron suelos, confinados en cilindros, de tres localidades: La Estanzuela, Tambores y Palo a Pique. Este procedimiento reproduce en forma adecuada el perfil biológico del suelo, dado que contiene los primeros 10 cm de profundidad, que es el espacio en el cual hay mayor biomasa de raíces en los pastizales pastoreados (López, 2011).

El número de nódulos ocupados por U204::*gusA*, 317::*gusA* e I::*gusA* fue determinado a partir del conteo de nódulos que adquirirían color azul, después de la inmersión de los sistemas radiculares completos en buffer fosfato con el sustrato X-glu (Figura 27).

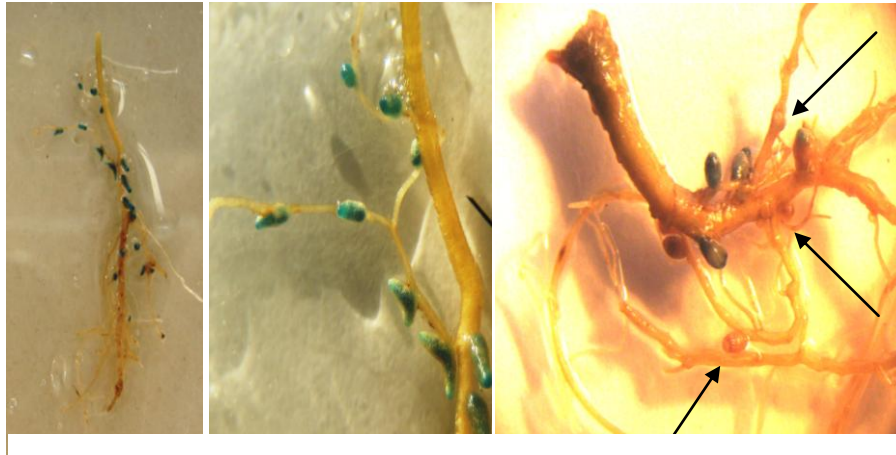


Figura 27. Ocupación de nódulos en raíces de trébol rojo por U204::*gusA* y cepas nativas. Los nódulos azules están ocupados por U204::*gusA* y los nódulos sin color, indicados con flechas, por rizobios del suelo.

La habilidad competitiva de los inoculantes marcados respecto a las cepas nativas en diferentes suelos se expresó como el número de éxitos, es decir los nódulos ocupados (porcentaje de nódulos azules) sobre el total de los nódulos (azules y blancos) en cada cilindro, la unidad experimental. La variable dependiente, porcentaje de nódulos azules, fue analizada a nivel del efecto de: i) de la interacción suelo-cepa sobre el número de nódulos ocupados, ii) la cepa inoculante sobre el número de nódulos ocupados y iii) del suelo sobre el número de nódulos ocupados.

El efecto de la interacción suelo-cepa sobre el número de nódulos ocupados, la interacción fue significativa con un p -valor= 0,0244. En La Estanzuela 317::*gusA* ocupó el doble de nódulos que U204::*gusA*, mientras que el número de nódulos ocupados por I::*gusA* mostró valores intermedios y no se diferenció del número de nódulos ocupados por 317::*gusA* y U204::*gusA* (Cuadro 9). En los suelos de Tambores y Palo a Pique la cantidad de nódulos ocupados por los inoculantes marcados fue la misma.

Se pudo establecer que las cepas nativas-naturalizadas presentes en el suelo de La Estanzuela son más competitivas que U204::*gusA*, es decir que el inoculante comercial, mientras que la ocupación de nódulos por

317::*gusA* fue similar a la lograda por las cepas nativas (Cuadro 9). Los resultados obtenidos en La Estanzuela coinciden con los obtenidos en ensayos a campo en el mismo sitio usando técnicas moleculares (ERIC-PCR), anteriormente descritos (apartado 3.4.). En La Estanzuela los suelos tienen uso agrícola-ganadero y el trébol es inoculado con la cepa U204 de *Rhizobium leguminosarum* desde la década de 1970. Es probable que la repetida inoculación permita el establecimiento de poblaciones de rizobios naturalizadas, derivadas de los inoculantes introducidos (Dutto, 2002), pero con mayor competitividad. De esta forma, a lo largo del tiempo las cepas introducidas habrían experimentado un proceso de deriva genética y de éste habrían resultado poblaciones con distinto grado de eficiencia simbiótica y capacidad para formar nódulos (Loureiro *et al.*, 2007; Batista *et al.*, 2013). Esto explicaría la menor ocupación de nódulos por U204 respecto a los rizobios nativos en las plantas de trébol sembradas en este suelo (Cuadro 9).

Sin embargo, en los suelos del Norte y Este se observó una situación diferente, dado que los inoculantes utilizados fueron más competitivos que las cepas nativas. Entre un 93 y el 98 % de los nódulos estaban ocupados por las cepas usadas como inoculantes. Es decir, en los suelos de Tambores y Palo a Pique el porcentaje de nódulos ocupados por cepas nativas fue bajo, entre el 2 y el 9 %, mientras que en La Estanzuela entre el 48 y el 74 % de los nódulos estaban ocupados por cepas del suelo. Los suelos colectados en Tambores y Palo a Pique son suelos de campo natural, sin historia previa de inoculación, por lo que la población nativa de rizobios no proviene del inoculante comercial. En esas zonas hay un trébol nativo (*Trifolium polimorfum*) cuyos rizobios asociados pueden formar nódulos inefectivos y parásitos en trébol rojo y trébol blanco. En estos casos el éxito de la implantación del cultivo dependerá que los rizobios del inoculante compitan más que los rizobios de las poblaciones nativas, y formen más nódulos efectivos (Dutto, 2002). De todas formas los resultados

obtenidos en los suelos de Tambores y Palo a Pique evidencian que, si bien hay cepas nativas, los inoculantes son más competitivos que estas, o bien estas se encuentran en cantidades muy bajas.

El gen *gusA* ha sido utilizado para evaluar la habilidad competitiva de cepas de rizobios. En este sentido Denton *et al.* (2003) evaluaron la habilidad competitiva del inoculante comercial TA1 de *Trifolium alexandrinum* y 2 aislados nativos de suelos alcalinos del Sur de Australia. Los autores marcaron con *PnifH-gusA* a los aislados nativos RW185D y RW855D que presentaban alta frecuencia de ocupación de nódulos a campo. Para evaluar la competencia entre las cepas nativas y el inoculante comercial sembraron semillas inoculadas con éste en suelos alcalinos esterilizados, e inocularon con los aislados marcados. Los autores demostraron que aumentando el número de células de rizobios marcados en el suelo y reduciendo el número de células del inoculante comercial, la proporción de nódulos ocupados por el inoculante se reducía. Por esto concluyeron que la habilidad de las cepas de campo para dominar la ocupación de nódulos se debe a la pobre sobrevivencia del inoculante comercial. Este estudio tuvo un abordaje diferente al utilizado en esta tesis, dado que las cepas con alta frecuencia se evaluaron contra el inoculante comercial, y no en relación a las cepas nativas presentes en el suelo.

La habilidad competitiva de las cepas promisorias frente al inoculante comercial usado en nuestro país debería ser considerada en futuras evaluaciones.

Cuadro 9. Competitividad de los inoculantes con las cepas nativas de diferentes sitios. Las semillas se inocularon con U204::*gusA*, 317::*gusA* e I::*gusA* y se sembraron en cilindros con los distintos suelos, por quintuplicado. El ensayo se levantó 45 días después de la inoculación. La eficiencia de ocupación se expresa como la media del número de nódulos ocupados por el inoculante respecto al total de nódulos. Las letras diferentes indican diferencias significativas (Test Tukey $p < 0,05$).

Sitios	Inoculantes marcados	% de nódulos ocupados por inoculantes marcados	% de nódulos ocupados por rizobios del suelo
La Estanzuela (LE)	U204:: <i>gusA</i>	25,80 c	74,20 a
	317:: <i>gusA</i>	51,60 b	48,40 b
	I:: <i>gusA</i>	34,00 bc	66,00 ab
Tambores (T)	U204:: <i>gusA</i>	97,80 a	2,20 c
	317:: <i>gusA</i>	98,20 a	1,80 c
	I:: <i>gusA</i>	93,20 a	6,80 c
Palo a Pique (PP)	U204:: <i>gusA</i>	98,20 a	1,80 c
	317:: <i>gusA</i>	88,25 a	9,40 c
	I:: <i>gusA</i>	98,00 a	2,00 c

El efecto de la cepa inoculante sobre el número de nódulos en los 3 suelos se situó entre 74 y 79 % (Cuadro 10). Esto quiere decir que, independientemente del inoculante usado, el número de nódulos ocupados fue el mismo ya que no se determinaron diferencias significativas entre los tres inoculantes (p -valor=0,4454). Sin embargo cuando se evaluó el efecto del suelo sobre la variable números de nódulos inducidos por los inoculantes marcados se registraron diferencias significativas (p -valor = 0,0001). En los suelos de Tambores y Palo a Pique ocurrieron los porcentajes de ocupación más altos, y se diferenciaron de los obtenidos en suelos de La Estanzuela, en donde el porcentaje de ocupación de nódulos por los inoculantes fue menor (Cuadro 11).

Cuadro 10. Competencia de los inoculantes respecto a los rizobios presentes en suelos de Tambores, Palo a Pique y La Estanzuela. Las diferentes letras indican diferencias significativas (Test Tukey $p < 0,05$).

Inoculantes marcados con <i>gusA</i>	% de nódulos ocupados
317:: <i>gusA</i>	79,35a
I:: <i>gusA</i>	75,13a
U204:: <i>gusA</i>	73,93a

Cuadro 11. Efecto del suelo sobre el total de nódulos ocupados por las cepas usadas como inoculantes. Las letras diferentes indican diferencias significativas (Test Tukey $p < 0,05$).

Suelo	% de nódulos ocupados por cepa marcada
Tambores	96,0a
Palo a Pique	94,82a
Estanzuela	37,20b

3.9. ESTIMACIÓN DE LA FIJACIÓN DE NITRÓGENO

3.9.1. Fijación de nitrógeno por el inoculante vs. cepas nativas

Para evaluar el nitrógeno proveniente de la FBN mediante la técnica de dilución isotópica del ^{15}N se usó el aislado 317 en suelo de Tambores confinado en cilindros. El porcentaje de nitrógeno de las plantas de trébol proveniente de la fijación, cuando se usó la cepa 317 como inoculante, no mostró diferencias significativas ($p\text{-valor} = 0,4529$) con las plantas sin inocular (Figura 28). A pesar de no haber diferencias en el promedio de los tratamientos, si se observó gran variabilidad de los valores en las plantas

sin inocular. En el tratamiento inoculado el % de nitrógeno fijado fue homogéneo (entre 71 y 84 %), mientras que en el tratamiento sin inocular la variación fue grande (entre 2 y 97 %). Es probable que la FBN haya variado menos cuando se inoculó porque la demanda de nitrógeno fue aportada mayormente por el inoculante, mientras que en el tratamiento sin inocular depende de la cepa que ocupa el nódulo, sea esta parásita o más o menos efectiva. El bajo porcentaje de nitrógeno fijado que se observó en una repetición del tratamiento sin inocular, podría deberse a que cepas inefectivas que establecen simbiosis con el trébol nativo *Trifolium polimorfum* se hayan asociado a las plantas de trébol rojo (Dutto, 2002). En suelos sin historia de inoculación y con presencia de cepas parásitas la práctica de inoculación sería imprescindible para aumentar el éxito en el establecimiento del trébol rojo, dado que disminuiría la infección con cepas de rizobios nativas no efectivas.

Barrientos *et al.* (1995) utilizaron ^{15}N para determinar diferencias en la fijación de nitrógeno de 11 cepas de *R. leguminosarum* bv. trifolii en trébol blanco en suelos agrícolas de Chile. Los resultados pusieron en evidencia que esas cepas después de 3 ó 4 cortes llegaron a ser la única fuente de N para las plantas. Del mismo modo Campillo *et al.* (2003) estudiaron la contribución de la FBN en cuatro leguminosas forrajeras, trébol blanco (*Trifolium repens* L.), trébol rojo (*Trifolium pratense* L.), trébol subterráneo (*Trifolium subterraneum* L.) y alfalfa (*Medicago sativa* L.), con y sin inoculación específica de rizobio, mediante la metodología de dilución isotópica. Los resultados no evidenciaron diferencias significativas al efecto de la inoculación con *Rhizobium*, excepto en alfalfa y sólo en la primera temporada. La cantidad de N fijado en todas las temporadas fue alta y con todas las leguminosas, variando entre 60 y 770 kg.ha⁻¹.año⁻¹ para trébol subterráneo y alfalfa respectivamente.

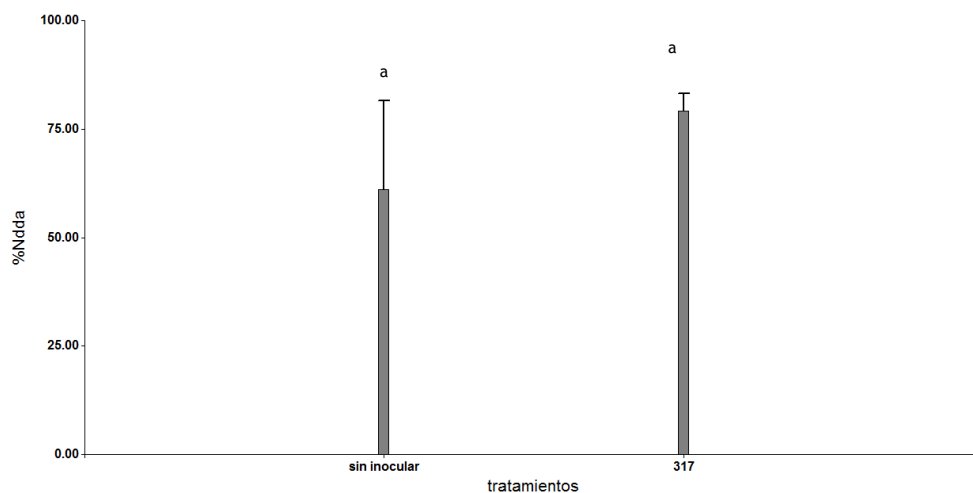


Figura 28. Nitrógeno proveniente de la fijación en la simbiosis rizobio-trébol rojo. La concentración de nitrógeno se determinó por dilución isotópica del ^{15}N suministrado como $\text{K}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Las diferentes letras indican diferencias significativas (Prueba T $p < 0,05$).

3.9.2. Efecto de la concentración del nitrógeno combinado del suelo sobre la FBN

El nitrógeno proveniente de la fertilización presente en el suelo puede inhibir la FBN. Para evaluar la dosis de fertilización que puede inhibir la nitrogenasa y a consecuencia afectar la fijación se realizó un ensayo con diferentes dosis de nitrógeno en arena vermiculita. El efecto de la fertilización con $\text{K}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sobre la FBN fue significativo (p -valor= 0,001) dado que cuando su concentración fue 3 mM disminuyó el porcentaje de nitrógeno proveniente de la atmósfera. En la figura 29 se muestra que el nitrógeno proveniente de la fijación es menor a medida que aumenta la concentración de $\text{K}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en el medio. El porcentaje de nitrógeno fijado con concentraciones de $\text{K}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 0,7, 1,2 y 1,7 mM fue mayor y significativamente diferente al de las concentraciones 3 y 4 mM.

Si bien este ensayo fue realizado en condiciones controladas, la inhibición de la nitrogenasa y por lo tanto de la FBN también sucede en condición de campo. La cantidad de fertilizante máxima que podría ser agregada al suelo sin afectar la tasa de fijación se encuentra en el entorno de 1,7 mM (Figura 29), que corresponde a 24 Kg de N /ha. Este cálculo fue realizado considerando que el volumen de 1 ha de suelo son 2.000 m³ para un suelo tipo y a capacidad de campo, en el cual el 50 % está compuesto por suelo, 25 % de aire y el 25 % de agua. A partir de esa concentración de nitrógeno la planta utiliza nitrógeno proveniente del fertilizante y la FBN se inhibe gradualmente. En futuros estudios debería evaluarse además como es el efecto de estas dosis de nitrógeno con respecto a la nodulación.

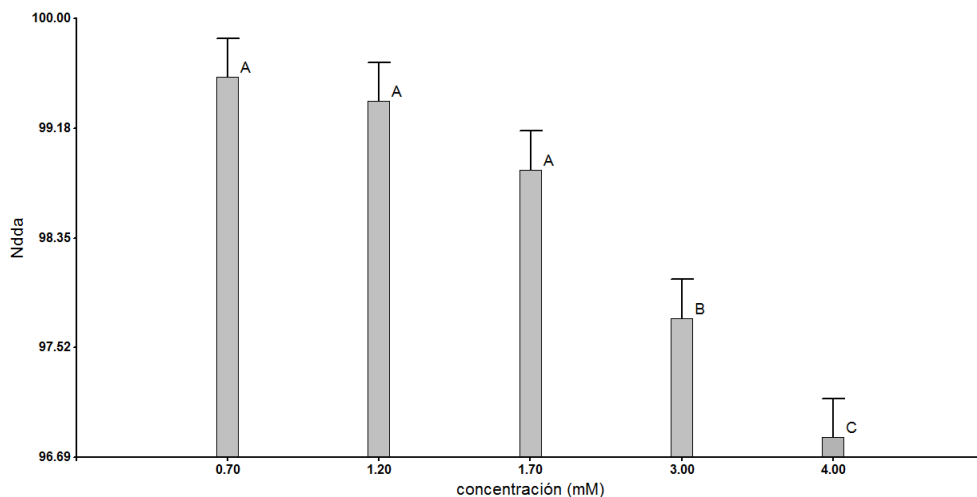


Figura 29. Nitrógeno proveniente de la fijación en la simbiosis del aislado 317 con trébol rojo. Se evaluaron 5 concentraciones de nitrógeno (0,7 mM, 1,2 mM, 1,7 mM, 3 mM y 4 mM) suministrado en forma de $\text{KNH}_4(\text{SO}_4)_2$, enriquecido al 10 % At^{15}N . Diferentes letras indican diferencias significativas Test de Duncan $p < 0,05$.

Resultados similares han sido reportados por Hellsten y Huss-Danell (2000) al evaluar como el nitrógeno afecta la nodulación de trébol rojo. Para ello utilizaron 3 concentraciones de nitrógeno que consideraron baja, media y alta, correspondientes a 0,07, 0,7 y 7,1 mM. Los resultados evidenciaron que el nitrógeno reduce la biomasa de los nódulos y la tasa de

fijación de N. Es decir, encontraron efectos negativos mayormente sobre la materia seca de los nódulos, debido a que hubo un mayor tamaño de nódulos individual por plantas a bajas concentraciones de N así como también una alta actividad nitrogenasa. En esta tesis el efecto inhibitorio del nitrógeno fue estimado través de la proporción de N fijado, en futuros estudios debería evaluarse conjuntamente otros parámetros como son el número de nódulos y actividad nitrogenasa.

Por otra parte en experimentos de campo, en mezclas de gramíneas y leguminosas Høgh-Jensen y Schjørring (1994) evaluaron los efectos de fertilización de N inorgánico en trébol rojo, trébol blanco y raigrás (*Lolium perenne*). Para ello fertilizaron con 2 niveles N, correspondientes a 400 y 20 kg N/ha. La fijación de nitrógeno derivado de la atmósfera fue estimada por 2 métodos, dilución isotópica y abundancia natural del ^{15}N . Ambos métodos mostraron que a 400 kg N/ha se redujo la fijación significativamente. Con altas tasas de fertilización N inorgánico, el nitrógeno proveniente de la fijación fue marcadamente reducido, en un rango de 0,73 a 0,96 a 20 kg N ha por año, y de 0,50 a 0,64 a 400 kg de fertilizante de N/ha por año (Høgh-Jensen y Schjørring, 1994).

4. CONCLUSIONES

La diversidad de los rizobios que nodulan trébol constituye una base genética interesante para la selección de cepas.

El ERIC-PCR permite explorar la diversidad y la habilidad competitiva de cepas en forma precisa y sencilla en ensayos de campo y laboratorio.

El efecto de inoculación en relación a la ocupación de nódulos es evidente cuando en suelos sin historia de inoculación.

El gen *gusA* permite evaluar la competitividad de cepas en diferentes suelos, y con esto incorporar ese criterio en la selección de inoculantes.

Dado que en campos con historia de inoculación el inoculante ocupa la minoría de los nódulos, el N fijado proviene de las cepas nativas.

El uso de DI permite proponer que la práctica de inocular mantiene estables las tasas de fijación en campos sin historia de inoculación.

En los suelos de Uruguay hay *Bradyrhizobium* sp y *Mesorhizobium* sp. nativos - naturalizados que nodulan *Lotus uliginosus* adaptados a las condiciones locales, que pueden ser la base para la selección y desarrollo de inoculantes adecuados para suelos marginales.

La cepa comercial para *L. uliginosus* no es recuperada a campo desde nódulos de plantas inoculados, pero hay cepas nativas - naturalizadas bien adaptadas a las condiciones locales, que establecen simbiosis eficiente con esta leguminosa y pueden ser una fuente para el desarrollo de un inoculante que será objeto de futuras evaluaciones. Estos resultados son los primeros informados en Sudamérica sobre la diversidad y filogenia de *Bradyrhizobium* que nodulan *Lotus uliginosus*.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta J, Zarza R, Hernández A, Ferrari J, Saavedra C, Rebuffo M. 2008. Diagnóstico de la calidad de insumos y procesos en la zona agrícola de Uruguay. In Fontagro 787/05 Ampliación de la base genética de leguminosas forrajeras naturalizadas para sistemas pastoriles sustentables. Informes Técnicos: Anual II, 72 - 78 p.
- Agius F, Sanguinetti C, Monza J. 1997. Strain-specific fingerprints of *Rhizobium loti* generated by PCR with arbitrary and repetitive sequences. FEMS Microbiology Ecology, 24: 87 - 92.
- Alexandre A, Laranjo M, Oliveira S. 2006. Natural populations of Chickpea rhizobia evaluated by antibiotic resistance profiles and molecular methods. Microbial Ecology, 51: 128 - 136.
- Anyango B, Wilson K, Giller K, 1998. Competition in Kenyan soils between *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli Kim5 and *R. tropici* strain CIAT899 using the *gusA* marker gene. Plant and Soil, 204(1): 69 - 78.
- Barcellos FG, Menna P, Batista ISS, Hungria M. 2007. Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strain to indigenous *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian savannah soil. Applied and Environmental Microbiology, 73(8): 2635 - 2643.
- Barrientos LM, Higuera H, Acuña H, Guerrero J, Ortega F, Seguel I. 2002. Efectividad simbiótica de cepas naturalizadas de *Mesorhizobium loti* y *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) en plantas de tres especies del género *Lotus*. Agricultura Técnica, 62: 226 - 236.
- Barrientos L, Pino I, Méndez E. 1995. Efectividad y competitividad de cepas nativas de *Rhizobium* evaluadas en suelos de la IX Región. Agricultura Técnica, 55: 226 - 232.
- Barry T, Collieran G, Glennon L, Dunican K, Gannon F. 1991. The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. PCR Methods Application, 1: 51 - 56.

- Batista JSS, Hungría M, Barcellos FG, Ferreira MC, Mendes LC. 2007. Variability in *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* seven years after introduction of both the exotic microsymbiont and the soybean host in a cerrados soil. *Microbial Ecology*, 53(2): 270 - 284.
- Batista L, Tomasco I, Lorite MJ, Sanjuán J, Monza J. 2013. Diversity and phylogeny of rhizobial strains isolated from *Lotus uliginosus* grown in Uruguayan soils. *Applied Soil Ecology*, en prensa.
- Begon M, Townsend CR, Harper JL. 2006. *Ecology: From individuals to ecosystems*. Malden, Blackwell Science, 759 p.
- Beringer JE. 1974. Factor de transferencia en *Rhizobium leguminosarum*. *General Microbiology*, 84: 188 - 198.
- Brockwell J, Pilka A, Holliday RA. 1991. Soil pH is the major determinant of the numbers of naturally-occurring *Rhizobium meliloti* in non-cultivated soils in New South Wales. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 31(2): 211 - 219.
- Brown MV, Bowman JP. 2001. A molecular phylogenetic survey of sea-ice microbial communities (SIMCO). *FEMS Microbiol Ecology*, 35(3): 267 - 275.
- Bushby HVA, Marshall KC. 1977. Water status of rhizobia in relation to their susceptibility to desiccation and to their protection by montmorillonite. *Journal of general microbiology*, 99: 19 - 27.
- Camargo D. 2012. Desarrollo de un inoculante rizobiano para un nuevo cultivar de *Lotus uliginosus*. Tesis de Maestría en Biotecnología, Montevideo. Facultad de Ciencias, 93 p.
- Campillo R, Urquiaga S, Pino I, Montenegro A. 2003. Estimation of biological nitrogen fixation in forage legumes using a ¹⁵N labeling methodology. *Agricultura Técnica*, 63: 169 - 179.
- Carámbula M. 2003. *Pasturas y Forrajes. Potenciales y alternativas para producir forraje*. Tomo Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires Hemisferio Sur. 357 p.

- Castro S, Carrera I, Martínez-Drets G. 2000. Methods to evaluate nodulation competitiveness between *Sinorhizobium meliloti* strains using melanin production as a marker. *Journal of Microbiological Methods*, 41(2): 173 - 177.
- Castro IV, Ferreira EM, McGrath SP. 2003. Survival and plasmid stability of rhizobia introduced into a contaminated soil, *Soil Biology and Biochemistry*, 35(1): 49 - 54.
- Castro IV, Ferreira EM. 2006. Contaminación y fertilización: metales pesados y lodos de depuradoras. En: Bedmar EJ, González J, Lluch C, Rodelas B. (Eds.). *Fijación de nitrógeno: fundamentos y aplicaciones*. Granada, Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno. 291 - 303.
- Catroux G, Hartmann A, Revellin, C. 2001. Trends in rhizobial inoculant production and use. *Plant Soil*, 230: 21 - 30.
- Christensen P, Kuhnert H, Olsen JE, Bisgaard M, 2004. Comparative phylogenies of the housekeeping genes *atpD*, *infB* and *rpoB* and the 16S rRNA gene within the Pasteurellaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 1601 - 1609.
- Corich VA, Giacomini M, Carlot R, Simon HV, Tichy A, Squartini A, Nuti MP. 2001. Comparative strain typing of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* natural populations. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(6): 580 - 584.
- Coutinho HLC, Oliveira VM, Lovato A, Maia AHN, Manfio GP. 1999. Evaluation of diversity of rhizobia in Brazilian agricultural soils cultivated with soybeans. *Applied Soil Ecology*, 13(2): 159 - 167.
- Crossman LC, Castillo-Ramírez S, McAnnula C, Lozano L, Vernikos GS, Acosta JL, Ghazoui ZF, Hernández-González I, Meakin G, Walker AW, Hynes MF, Young JPW, Downie JA, Romero D, Johnston AWB, Dávila G, Parkhill J, González V. 2008. A common genomic framework for a diverse assembly of plasmids in the symbiotic nitrogen fixing bacteria. *PLoS ONE*, 3:e2567.

- Cubo TM, Buendía-Claveria AM, Beringer JE, Ruiz-Sainz JE. 1988. Melanin production by *Rhizobium* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(4): 1812 - 1817.
- Danso SKA, Hardarson G, Zapata F. 1993. Misconceptions and practical problems in the use of ^{15}N soil enrichment techniques for estimating N_2 fixation. *Plant and Soil*, 152(1): 25 - 52.
- Danso SKA, Bowen GD, Sanginga N. 1992. Biological nitrogen fixation in trees in agro-ecosystems. *Plant and Soil*, 141(1-2): 177 - 196.
- de Bruijn F. 1992. Use of Repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 58 (7): 2180 - 2187.
- Denton MD, Reeve WG, Howieson JG, Coventry DR. 2003. Competitive abilities of common field isolates and a commercial strain of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii for clover nodule occupancy. *Soil Biology and Biochemistry*, 35(8): 1039 - 1048.
- Denton MD, Coventry DR, Murphy PJ, Howieson JG, Bellotti WD. 2002. Competition between inoculant and naturalized *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii for nodulation of annual clovers in alkaline soils. *Crop and Pasture Science*, 53(9): 1019 - 1026.
- Díaz P, Borsani O, Monza J. 2005. *Lotus japonicus* related species and their agronomic importance. En: Lotus Handbook Márquez A. J. (Ed.). Springer-Verlag, Dordrecht. 25 - 37 p.
- DIEA. 2007. Anuario Estadístico Agropecuario 2010 [En línea]. Montevideo: MGAP. Consultado 26 abril 2012. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,352,O,S,0,MNU;E;27;6;MNU;,.>
- Dresler-Nurmi A, Fewer DP, Räsänen L, Lindström K. 2009. The diversity and evolution of rhizobia. In: K. Pawlowski (Ed.), Prokaryotic

Symbionts in Plants, Berlin Springer-Verlag, 8: 3 - 41.

- Drouin P, Prevost D, Antoun H. 2000. Physiological adaptation to low temperatures of strains of *Rhizobium leguminosarum* bv viciae associated with *Lathyrus* spp. *FEMS Microbiology Ecology*, 32: 111 - 120.
- Duodu S, Carlsson G, Huss-Danell K, Svenning MM. 2007. Large genotypic variation but small variation in N₂ fixation among rhizobia nodulating red clover in soils of northern Scandinavia. *Journal of Applied Microbiology*, 102(6): 1625 - 1635.
- Duodu S, Nsiah EK, Bhuvaneshwari TV, Svenning MM. 2006. Genetic diversity of a natural population of *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii analysed from field nodules and by a plant infection technique. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(5): 1162 - 1165.
- Dutto P. 2002. Recomendaciones para situaciones con problemas: Inoculación de Leguminosas. *Revista del Plan Agropecuario*, 102: 54 - 57.
- Dowling DN, Broughton WJ. 1986. Competition for nodulation of legumes. *Annual Review of Microbiology*, 40: 131 - 157.
- Estrella MJ, Muñoz S, Soto MJ, Ruiz O, Sanjuán J, 2009. Genetic diversity and host range of rhizobia nodulating *Lotus tenuis* in typical soils of the Salado River Basin (Argentina). *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (4): 1088 - 1098.
- Fernández-Canigia M. 2003. Manual de Nodulación, 21 - 32 p.
En:www.nitragin.com.ar/Manual%20de%20nodulacion-Sept03.pdf
- Ferreira MC, Andrade DS, Chueire LMO, Takemura SM, Hungria M. 2000. Tillage method and crop rotation on the population sizes and diversity of bradyrhizobia nodulating soybean, *Soil Biology and Biochemistry*, 32(5): 627 - 637.
- Gan Y, Stulen I, van Keulen H, Kuiper PJC. 2004. Low concentrations of nitrate and ammonium stimulate nodulation and N₂ fixation while

- inhibiting specific nodulation (nodule DW g⁻¹ root dry weight) and specific N₂ fixation (N₂ fixed g⁻¹ root dry weight) in soybean, *Plant Soil* 258(1): 281 - 292.
- Gaunt MW, Turner SL, Rigottier-Gois L, Lloyd-Macgilp SA, Young JPW. 2001. Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 51: 2037 - 2048.
- Gevers D, Cohan FM, Lawrence JG, Spratt BG, Coenye T, Feil EJ, Stackebrandt E, Van de Peer YV, Vandamme P, Thompson FL, Swings J. 2005. Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Reviews Microbiology*, 3: 733 - 739.
- Gibson AH, Harper JE. 1985. Nitrate effect on nodulation of soybean by *Bradyrhizobium japonicum*. *Crop Science*, 25: 497 - 501.
- Gomes-Barcellos F, Menna P, da Silva Batista J, Hungría M. 2007. Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum* inoculat strain to indigenous diazotrophs *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian Savannah soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 2635 - 2643.
- Graham PH. 1992. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, 38(6): 475 - 484.
- Graham P, Sadowsky M, Keyser H, Barnet Y, Bradley R, Cooper J, De Ley, D, Jarvis, B, Roslycky E, Strijdom B, Young J. 1991. Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root- and stem-nodulating bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41: 582 - 587.
- GRAS. 2006. Agua Disponible acumulada cada 10 días y mensualmente. 1er Trimestre 2006. 2do. Trimestre 2006. Accessed: 1 June 2006. <http://www.inia.org.uy/online/site/14807011.php>.

- Handberg K, Stougaard J. 1992. *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *The Plant Journal*, 2: 487 - 496.
- Hardy RWF, Holsten RD, Jackson EK, Burns RC. 1968. The C₂H₂-C₂H₄ assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiology*, 43: 1185 - 1207.
- Hardarson G, Danso SKA. 1990. Use of ¹⁵N methodology to assess biological nitrogen fixation. En Hardarson G. (ed.). *Use of nuclear techniques in studies of soil-plant relationships*. Vienna, International Atomic Energy Agency, 129 - 160 p.
- Haukka K, Lindström K, Young P. 1998. Three phylogenetic groups of *nodA* and *nifH* genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolates from leguminous trees growing in Africa and Latin America. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 419 - 426.
- Hellsten A, Huss-Danell K. 2000. Interaction effects of nitrogen and phosphorus on nodulation in red clover (*Trifolium pratense* L.). *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B. Soil and Plant Science* 50: 135 - 142.
- Herrera-Cervera JA, Caballero-Mellado J, Laguerre G, Tichy HV, Requena N, Amarger N, Martínez-Romero E, Olivares J, Sanjuán J. 1999. At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. *FEMS Microbiol Ecology*, 30(1): 87 - 97.
- Hernández S, Rebuffo M, Arrivillaga S, Jaurena M, Labandera C, Risso D, Ciliuti J. 2005. Evaluation of the genotype-environment interaction in the establishment of *Lotus uliginosus* (Schkuhr) with soil-cores *Lotus* Newsletter, 35 (1):120 - 130.
- Hernández L. 2011. Identificación y selección de cepas nativas de *Rhizobium leguminosarum* bv trifolii. Tesis de grado, Montevideo, Facultad de Ciencias, 76 p.

- Herridge DF. 2007. Inoculation technology for legumes. Nitrogen fixing leguminous symbioses 7: 77 - 115.
- Hill, GT, Mitkowski NA, Aldrich-Wolfe L, Emele LR, Jurkonie DD, Ficke A, Maldonado-Ramírez S, Lynch ST, Nelson EB. 2000. Methods for assessing the composition of soil microbial communities. Applied Soil Ecology, 15(1): 25 - 36.
- Howieson JG, Malden J, Yates RJ, O'Hara GW. 2000. Techniques for the selection and development of elite inoculant rhizobial strains in southern Australia. Symbiosis, 28: 33 - 48.
- Høgh-Jensen H, Schjørring JK. 1994. Measurement of biological dinitrogen fixation in grassland: comparison of the enriched ¹⁵N dilution and the natural ¹⁵N abundance methods at different nitrogen application rates and defoliation frequencies. Plant and Soil, 166(2): 153 - 163.
- Hungría M, Vargas MAT. 2000. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. Field Crops Research, 65(1-2): 151 - 164.
- Hunter-Cevera, J. 1998. The Value of Microbial Diversity. Current Opinion in Microbiology, 1: 278 - 285.
- Ibekwe AM, Angle JS, Chaney RC, van Berkum P. 1997. Differentiation of clover *Rhizobium* isolated from biosolids-amended soils with varying pH. Soil Science Society of America Journal, 61(6): 1679 - 1684.
- Irisarri P, Milnitsky F, Monza J, Bedmar EJ. 1996. Characterization of rhizobia nodulating *Lotus subbiflorus* from Uruguayan soils. Plant and Soil, 180(1): 39 - 47.
- Izaguirre P. 1995. Especies indígenas y subespontáneas del género *Trifolium* L. (Leguminosae) en el Uruguay. INIA (instituto Nacional de Investigación Agropecuaria). Serie Técnica, 58: 1-22.
- Jensen HL. 1942. Nitrogen fixation in leguminous plants. I. General characters of nodule-bacteria isolated from species of *Medicago* and

- Trifolium* in Australia. Proceedings of the Linnean Society of New South Wales, 66: 98 - 108.
- Jordan DC. 1982. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. International Journal of Systematic Bacteriology, 32: 136 -139.
- Kamst E, Pilling J, Raamsdonk LM, Lugtenberg BJJ, Spaink HP. 1997. *Rhizobium* nodulation protein NodC is an important determinant of chitin oligosaccharide chain length in Nod factor biosynthesis. Journal of Bacteriology, 179(7): 2103 - 2108.
- Kaschuk G, Hungría M, Andrade DS, Campo RJ. 2006. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. Applied Soil Ecology, 32(2): 210 - 220.
- Labandera C. 2007. Actividades en fijación biológica de nitrógeno: situación actual y perspectivas en Uruguay. En: Izaguirre-Mayoral ML, Labandera C, y Sanjuán J (Eds). Biofertilizantes en Iberoamérica una visión técnica, científica y empresarial. Red Iberoamericana de Biofertilizantes Microbianos para la Agricultura. Montevideo, Denad Internacional SA, 75-78 p.
- Labandera C, Mayans M. 2006. Control de inoculantes en Uruguay. Dpto. de Microbiología de Suelos. Dirección General de Recursos Naturales. En: Memorias Curso Internacional de Producción de Biofertilizantes desde laboratorio hasta la aplicación en campo. Universidad Nacional. Bogotá, Colombia, 585 p.
- Labandera C, Jaureana M y Biassini G 2005. Inoculación de Lotus MAKU. Revista Plan Agropecuario de Uruguay, 44-46.
- Laguerre G, Courde L, Nouaim R, Lamy I, Revellin C, Breuil MC, Chaussod R. 2006. Response of rhizobial populations to moderate copper stress

- applied to an agricultural soil. *Microbiology Ecology Journal*, 52(3): 426 - 435.
- Laguerre G, Nour SM, Macheret V, Sanjuan J, Drouin, P, Amarger N. 2001. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology*, 147: 981-993.
- Laguerre G, Allard M, Revoy F, Amarger N. 1994. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Applied Environmental Microbiology*, 60: 56 - 63.
- Ledgard SF, Steele KW. 1992. Biological nitrogen fixation in mixed legume/grass pastures. *Plant and Soil*, 141: 137 - 153.
- Lindström K, Murwira M, Willems A, Altier N. 2010. The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: The case of rhizobia. *Research in Microbiology*, 161: 453 - 463.
- Liu Y, Wu L, Baddeley J, Watson C. 2011. Models of biological nitrogen fixation of legumes. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 31: 155 - 172.
- Lloret L, Martínez-Romero E. 2005. Evolución y filogenia de *Rhizobium*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 47: 43 - 60.
- Lorite M, Videira e Castro I, Muñoz S, Sanjuán J. 2012. Phylogenetic relationship of *Lotus uliginosus* symbionts with bradyrhizobia nodulating genistoid legumes. *FEMS Microbiology Ecology*, 79: 454-474.
- Loreau M, Naeem S, Inchausti P, Bengtsoom J, Grime JP, Hector A, Hooper DU, Huston MA, Raffaelli D, Schmid B, Tilman D, Wardle DA. 2001. Biodiversity and ecosystem functioning: current knowledge and future challenges. *Science*, 294: 804-808.
- López L. 2011. Biomasa y productividad primaria neta subterráneas de pastizales naturales de Uruguay. Tesis de Maestría en Biología, Montevideo, Facultad de Ciencias, 70 p.

- Loureiro MF, Kaschuk G, Alberton O, Hungría M. 2007. Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] rhizobia diversity in Brazilian oxisols under various soil, cropping, and inoculation management. *Biology and Fertility of Soils*, 43: 665 - 674.
- Maj D, Wielbo J, Marek-Kozaczuk M, Skorupska A. 2009. Pretreatment of clover seeds with Nod factors improves growth and nodulation of *Trifolium pratense*. *Journal of Chemical Ecology*, 35: 479 - 487.
- Mahler RL, Wollum AG. 1981. The influence of soil water potential and soil texture on the survival of *Rhizobium japonicum* and *Rhizobium leguminosarum* isolates in the soil. *Soil Science Society of America Journal*, 45: 761 - 766.
- Martínez-Romero, E, Caballero-Mellado J. 1996. *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 15(2): 113 - 140.
- Mantilla R, García T, Espinel A, Valenzuela E. 2004. Estandarización de tres sistemas de rep-PCR para la tipificación de *Klebsiella pneumoniae*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*, 33 (1): 48 - 58.
- McInnes A, Thies JE, Abbott L, Howieso JG. 2004. Structure and diversity among rhizobial strains, populations and communities-a review. *Soil Biology y Biochemistry*, 36(8): 1295 - 1308.
- Menna P, Pereira AA, Bangel EV, Hungría M. 2009. Rep-PCR of tropical rhizobia for strain fingerprinting, biodiversity appraisal and as a taxonomic and phylogenetic tool. *Symbiosis*, 48: 120 - 130.
- Miller JH. 1972. *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory. 466 p.
- Monza J, Palacios J. 2004. Fijación biológica de nitrógeno en la simbiosis rizobio-leguminosa. En: Monza J, Márquez A. (Eds.). *El metabolismo del nitrógeno en las plantas*. Almuzara estudios. 176 p.

- Monza J, Fabiano E, y Arias A. 1992. Characterization of and idigenous population of rhizobia nodulating *Lotus corniculatus*. *Soil Biology Biochemistry*, 24(3): 241 - 247.
- Morón A. 2000. Alfalfa: fertilidad de suelos y estado nutricional en sistemas agropecuarios de Uruguay. *Informaciones Agronómicas del Cono Sur* 8: 1 - 6.
- MGAP (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca) 2008. Departamento de Microbiología de Suelos. Colección Nacional de Cepas de *Rhizobium* spp.
- Neira, 1995 Manual técnico de la fijación simbiótica del nitrógeno: leguminosa-Rhizobium. Roma : FAO (1985), p. irr.
- Ochman H, Moran N. 2001. Genes lost and genes found: Evolution of bacterial pathogenesis and symbiosis. *Science*, 292: 1096 - 1098.
- Palmer KM, Young JPW. 2000. Higher diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* populations in arable soils than in grass soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2445 - 2450.
- Pankhurstst C, Macdonald P, Reeves J. 1986. Enhanced nitrogen fixation and competitiveness for nodulation of *Lotus pedunculatus*. *Journal of General Microbiology*, 132: 2321 - 2328.
- Pereira SIA, Lima AIG, Figueira EMA. 2006. Heavy metal toxicity in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* isolated from soils subjected to different sources of heavy-metal contamination: Effects on protein expression. *Applied Soil Ecology*, 33: 286 - 293.
- Pinto FGS, Hungría M, Mercante FM. 2007. Polyphasic characterization of Brazilian *Rhizobium tropici* strains effective in fixing N₂ with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Soil Biology and Biochemistry*, 39: 1851-1864.
- Prevost D, Drouin P, Laberge S, Bertrand A, Cloutier J, and Levesque G. 2003. Cold-adapted rhizobia for nitrogen fixation in temperate regions. *Canadian Journal of Botany*, 81: 1153 - 1161.

- Pueppke SG, Broughton WJ. 1999. *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12: 293 - 318.
- Punschke K. 2010. Colección Nacional de cepas de *Rhizobium* spp. Departamento de Microbiología de Suelos Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Montevideo, Uruguay. 18 p.
- Racca RW, Collino DJ. 2006. Bases fisiológicas para el manejo de la fijación biológica del nitrógeno en soja. En: Memorias Curso Internacional de Producción de Biofertilizantes desde laboratorio hasta la aplicación en campo. Universidad Nacional. Bogotá, Colombia. 585 p.
- Ramírez ME, Israel DW, Wollum AG. 1998. Using spontaneous antibiotic-resistant mutants to assess competitiveness of bradyrhizobial inoculants for nodulation of soybean. *Canadian Journal of Microbiology*, 44: 753-758.
- Rebuffo M, Zarza R, Borzani O, Casaretto M, Díaz P, Monza J. 2007. Recursos genéticos de leguminosas forrajeras para sistema agropastoriles en Uruguay. *Lotus Newsletter*, 37(2):56.
- Rebuffo M, Bemhaja M, Risso D. 2006. Utilization of forage legumes in pastoral systems: state of art in Uruguay. *Lotus Newsletter*, 3:22-33.
- Rivas R, Martens M, de Lajudie P, Willems A. 2009. Multilocus sequence analysis of the genus *Bradyrhizobium*. *Systematic and Applied Microbiology*, 32:101 - 110.
- Rivas R, Velázquez E, Valverde A, Mateos PF, Martínez-Molina E. 2001. A two primers random amplified polymorphic DNA procedure to obtain polymerase chain reaction fingerprints of bacterial species. *Electrophoresis* 22(2): 1086 - 1089.
- Roche P, Maillet F, Plazanet C, Debelle F, Ferro M, Truchet G, Prome JC, Denarie J. 1996. The common *nodABC* genes of *Rhizobium meliloti* are host-range determinants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 15305 - 15310.
- Rodríguez Blanco A, Sicardi M, Frioni L. 2010. Competition for nodule

- occupancy between introduced and native strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii. *Biology and Fertility of Soils*, 46(4): 419-425.
- Russelle M. 2001. Alfalfa. *American Scientist*, 89: 252-259.
- Sadowsky MJ. 2005. Soil stress factors influencing symbiotic nitrogen fixation. En: Werner D, Newton WE (Eds.). *Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment*. Netherlands, Springer. 89-112 p.
- Sadowsky MJ, Graham PH. 1998. Soil biology of the Rhizobiaceae. En: Spaink HP, Kondorosi A, Hooykaas PJJ (Eds.). *The Rhizobiaceae. Molecular Biology of Plant Associated Bacteria*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. 155 - 172 p.
- Santamaría M, Agius F, Monza J, Gutiérrez-Navarro AM, Corzo J. 1999. Comparative performance of enterobacterial repetitive intragenic consensus-polymerase chain reaction and lipopolysaccharide electrophoresis for the identification of *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) strains. *FEMS Microbiology Ecology*, 28: 163 - 168.
- Sawada H, Kuykendall D, Young JM. 2003. Changing concepts in the systematic of bacterial nitrogen-fixing legume symbiosis. *The Journal general and Applied Microbiology*, 49: 155 - 179.
- Schinner F. 1996. Introduction. En Schinner F, Öhlinger R, Kandeler E, Margesin R. *Methods in soil biology*. Springer-Verlag. 3 - 6 p.
- Sessitsch A, Hardarson, G, de Vos WM, Wilson KJ. 1998. Use of marker genes in competition studies of *Rhizobium*. *Plant and Soil*, 204: 35-45.
- Sessitsch A, Jemap K, Hardarson G, Akkermans ADL, Wilson K. 1997. Measurement of the competitiveness index of *Rhizobium tropici* strain CIAT899 derivatives marked with the *gusA* gene. *Soil Biology Biochemistry*, 29: 1099 - 1110.
- Shannon CE, Weaver W, 1949. *The Mathematical Theory Of Communication*. The University of Illinois Press, Urbana. 177 p.

- Skorupska A, Wielbo J, Kidaj D, Marek-Kozaczuk, M. 2010. Enhancing Rhizobium legume symbiosis using signaling factors. In: Khan MS, Zaidi A, Musarrat J. (Eds.). *Microbes for Legume Improvement*, New York, Springer-Verlag. 23 - 43 p.
- Sotelo M, Irisarri P, Lorite M, Casaretto E, Rebuffo M, Sanjuan J, Monza J. 2011. Diversity of rhizobia nodulating *Lotus corniculatus* grown in northern and southern regions of Uruguay. *Applied Soil Ecology*, 49: 197 - 207.
- Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont PAD, Kampfer P, Maiden MCJ, Nesme X, Rossello R, Swings J, Truper HG, Vauterin L, Whitman WB. 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52: 1043 - 1047.
- Stephens LHG, Rask HM. 2000. Inoculant production and formulation, *Field Crops Research*, 65 (2-3): 249 - 258.
- Stepkowski T, Moulin L, Krzyzanska A, McInnes A, Law I, Howieson J. 2005. European origin of *Bradyrhizobium* populations inflecting lupins and serradella in soils of western Australia and south Africa. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 7041 - 7052.
- Stern M, Ames F, Smith N, Robinson E, Higgins C. 1984. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. *Cell*, 37: 1015 - 1026.
- Sullivan J, Trzebiatowski J, Cruickshank R, Gouzy J, Brown S, Elliot R, Fleetwood D, McCallum N, Rossbach U, Stuart G, Weaver J, Webby R, de Bruijn F, Ronson C. 2002. Comparative Sequence Analysis of the Symbiosis Island of *Mesorhizobium loti* Strain R7A. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 184: 3086 - 3095.
- Svenning MM, Gudmundsson J, Fagerli IL, Leinonen P. 2001. Competition for nodule occupancy between introduced strains of *Rhizobium*

- leguminosarum* biovar *trifolii* and its influence on plant production. *Annals of Botany*, 88(1): 781 - 787.
- Svenning MM, Junttila O, Macduff H. 1996. Differential rates of inhibition of N₂ fixation by sustained low concentrations of NH₄⁺ and NO₃⁻ in northern ecotypes of white clover (*Trifolium repens* L.). *Journal of Experimental Botany*, 47(299): 729-38.
- Thies J, Holmes E, Vachot A. 2001. Application of molecular techniques to studies in *Rhizobium* ecology: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 41: 299 - 319.
- Thies JE, Bohlool BB, Singleton PW. 1992. Environmental effects on nodulation for nodule occupancy between introduced and indigenous rhizobia and among introduced strains. *Canadian Journal of Microbiology*, 38: 493 - 500.
- Toro N. 1996. Nodulation competitiveness in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12: 57 - 162.
- Turay KK, Andrews M, McKenzie BA. 1991. Effects of starter nitrogen on early growth and nodulation of lentil (*Lens culinaris* Medik.). *Proceedings Annual Conference - Agronomy Society of New Zealand*, 21: 61 - 65.
- Turco RF, Moorman T, Bezdicek D. 1986. Effectiveness and competitiveness of spontaneous antibiotic-resistant mutant of *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium japonicum*. *Soil Biological Biochemistry*, 18: 259 - 262.
- Turner SL, Young JPW. 2000. The glutamine synthetases of rhizobia: phylogenetics and evolutionary implications. *Molecular Biology and Evolution*, 17: 309 - 319.
- Valverde A, Velázquez E, Fernández-Santos F, Vizcaíno N, Rivas R, Mateos PF, Martínez-Molina E, Igual JM, Willems A. 2005. *Phyllobacterium trifolii* sp. nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils.

- International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55: 1985 - 1989.
- van Berkum P, Fuhrmann JJ. 2000. Evolutionary relationships among the soybean bradyrhizobia reconstructed from 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequence divergence. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology. 50: 2165 - 2172.
- Vandamme P, Pot B, Gillis M, De Vos P, Kersters K, Swings J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 60: 407 - 439.
- Versalovic J, Koeuth T, Lupski J. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Research, 19: 6823 - 6831.
- Vincent J. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. IBP Handbook 15. Oxford. Blackwell Scientific Publications. 6 p.
- Vinuesa P, Rojas-Jimenez K, Contreras-Moreira B, Mahna SK, Prasad BN, Moe H, Selvaraju SB, Thierfelder H, Werner D. 2008. Multilocus sequence analysis for assessment of the biogeography and evolutionary genetics of four *Bradyrhizobium* species that nodulate soybeans on the Asiatic Continent. Applied and Environmental Microbiology, 74: 6987 - 6996.
- Vinuesa P, Silva C, Werner D, Martínez-Romero E. 2005. Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and recombination in *Bradyrhizobium* species cohesion and delineation. Molecular Phylogenetics and Evolution, 34: 29-54.
- Vinuesa P, Silva C. 2004. Species delineation and biogeography of symbiotic bacteria associated with cultivated and wild legumes. En: Werner D. (Ed.). Biological Resources and Migration. Berlin, Springer. 143 - 155 p.

- Vinuesa P, Rademaker JLW, de Bruijn FJ, Werner D. 1998. Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rRNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rRNA sequencing. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 2096 - 2104.
- Wilson K, Sessitsch A, Corbo J, Giller K, Akkermans A, Jefferson R. 1995. β -Glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other Gram-negative bacteria. *Microbiology*, 141(7): 1691 -1705.
- Woese CR. 1987. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 51: 221 - 271.
- Yates RJ, Howieson JG, Reeve WG, Brau L, Speijers J, Nandasena K, Real D, Sezmis E, O' Hara GW. 2008. Host-strain mediated selection for an effective nitrogen-fixing symbiosis between *Trifolium* spp. and *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii. *Soil Biology Biochemistry*, 40: 822 - 833.
- Zahran HH, Räsänen LA, Karsisto M, Lindström K. 1994. Alteration of lipopolysaccharide and protein profiles in SDS-PAGE of rhizobia by osmotic and heat stress. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 10: 100 - 105.
- Zhang H, Charles TC, Driscoll BT, Prithiviraj B, Smith DL. 2002. Low temperature tolerant *Bradyrhizobium japonicum* strains allowing improved soybean yield in short-season areas. *Agronomy Journal*, 94: 870 - 875.

ANEXO

Artículo publicado en la revista Applied Soil Ecology:

Diversity and phylogeny of rhizobial strains isolated from *Lotus uliginosus* grown in Uruguayan soils



Diversity and phylogeny of rhizobial strains isolated from *Lotus uliginosus* grown in Uruguayan soils

Leticia Batista^a, Ivanna Tomasco^b, María J. Lorite^c, Juan Sanjuán^c, Jorge Monza^{a,*}

^a Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Av. Garzón 809, 12900 Montevideo, Uruguay

^b Departamento de Ecología y Evolución, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, Montevideo, Montevideo 11.44, Uruguay

^c Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Prof. Alvareda N 1, Granada E-18008, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 August 2012

Received in revised form 14 January 2013

Accepted 16 January 2013

Keywords:

Bacterial diversity

Symbiosis

Bradyrhizobia

Housekeeping genes

Symbiotic genes

ABSTRACT

Lotus uliginosus is generally nodulated by rhizobia of the genus *Bradyrhizobium* when used for improvement of Uruguayan pastures. The genetic diversity and phylogenetic relationships of 111 isolates from nodules of *L. uliginosus* collected from four fields with or without prior inoculation history were analyzed in this study. Genetic diversity estimated by ERIC-PCR revealed 75 different genomic fingerprints, and showed a relatively greater value compared with other methods and varied by soil type. 16S ribosomal RNA gene RFLP analysis revealed three different ribogroups, A, B and C, with 71 isolates in ribogroup A, three isolates in ribogroup B and only one in ribogroup C. Phylogenetic analyses based on 16S RNA gene sequences, ITS, as well as *atpD*, *recA* and *glnII* gene sequences indicated that ribogroup A strains were affiliated with *B. japonicum* bv. *genistearum* strains. The three isolates in ribogroup B did not clearly associate with any *Bradyrhizobium* species described previously and could represent a novel species within this genus. Unlike *B. japonicum* strains these isolates were able to nodulate and fix nitrogen with other *Lotus* species as well as with *Spartium*, a leguminous shrub. The unique isolate in ribogroup C clustered with *Mesorhizobium* and appeared genetically and phenotypically related to broad host-range *Mesorhizobium* sp. NZP2037. Our data suggest that Uruguayan soils contain native or naturalized bradyrhizobia that are able to nodulate *L. uliginosus* as efficiently as the commercial strain NZP2309 but could have adaptive advantages making them more suitable for inoculant purposes.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Lotus includes about 130 species of legumes, including *Lotus corniculatus*, *L. glaber*, *L. uliginosus* and *L. subbiflorus*, which have been domesticated and genetically modified in order to improve pastures (Díaz et al., 2005a). In addition, *L. japonicus* is used as a model for genetic and molecular studies (Díaz et al., 2005b). Like most legumes, *Lotus* spp. can establish symbioses with nitrogen-fixing rhizobia, usually of the genera *Mesorhizobium* or *Bradyrhizobium* (Jordan, 1982; Pankhurst et al., 1986; Lorite et al., 2012) as well as *Rhizobium* or *Aminobacter* (Estrella et al., 2009). Moreover, it was recently found that *L. lancerottensis*, *L. creticus* and *L. arabicus* establish highly specific symbioses with *Ensifer* (*Sinorhizobium*) species (Leon-Barrios et al., 2009; Merabet et al., 2010). *L. uliginosus* is known to be nodulated by slow-growing rhizobia (Irisarri et al., 1996), but very few reports have verified the taxonomic affiliation

of these bacteria within the *Bradyrhizobium* genus (Lorite et al., 2012). The number of species within the *Bradyrhizobium* genus is low relative to other genera with 12 species described so far: *B. betae* (Rivas et al., 2004), *B. canariense* (Vinueza et al., 2005), *B. denitrificans* (van Berkum et al., 2006), *B. elkanii* (Kuykendall et al., 1992), *B. iriomotense* (Islam et al., 2008), *B. japonicum* (Jordan, 1982), *B. jicamae* (Ramírez-Bahena et al., 2009), *B. liaoningense* (Xu et al., 1995), *B. pachyrhizi* (Ramírez-Bahena et al., 2009), *B. yuanmingense* (Yao et al., 2002), *B. cytisi* (Chahboune et al., 2011) and *B. lablabi* (Chang et al., 2011).

Use of 16S rRNA gene sequences for taxonomical purposes in *Bradyrhizobium* can not be done with great certainty because of the high similarity between species as well as the occurrence of horizontal gene transfer (Willems et al., 2001b; Gevers et al., 2005). Although sequences from the intergenic spacers (ITS) between 16S and 23S rRNA genes show higher variability (Barry et al., 1991), there are limitations for use of ITS sequences in phylogenetic analyses in *Bradyrhizobium*. The ITS region can be horizontally transferred (Gevers et al., 2005) and the region has a relatively low evolutionary rate (Vinueza and Silva, 2004). Protein-encoding housekeeping genes have been proposed for use as phylogenetic markers to help in distinguishing

* Corresponding author. Tel.: +598 23540229.

E-mail addresses: ibatista@fagro.edu.uy (L. Batista), ivanna@fcien.edu.uy (I. Tomasco), mjlorite@eez.csic.es (M.J. Lorite), juan.sanjuana@eez.csic.es (J. Sanjuán), jmonza@fagro.edu.uy, monzajorge@gmail.com (J. Monza).

these closely related species (Stackebrandt et al., 2002). Although these genes have a higher evolution rate than 16S rRNA genes, they are sufficiently conserved so as to provide informative phylogenetic data. Furthermore, by using a concatenation of these gene sequences the phylogenetic signal can be enhanced to provide highly supported clades (Vinueza et al., 2005). For this reason, the combined analyses of several housekeeping genes (MultiLocus Sequence Analysis, MLSA) is used for estimating taxonomic relationships among species (Christensen et al., 2004; Rivas et al., 2009). These single-copy genes are broadly distributed amongst genomes and taxons (Gevers et al., 2005). For phylogenetic purposes, *atpD*, *recA*, *rpoA*, *rpoB*, *thrC*, *dnaK*, *dnaJ*, *glnH*, *gap*, *glnA*, *gltA*, *gyrB*, and *pnp* gene sequences have been used (Gaunt et al., 2001; Vinueza et al., 2008; Stępkowski et al., 2005; Turner and Young, 2000; Rivas et al., 2009). Another concern in using a molecular phylogeny approach is the observation that rhizobial genomes are extremely plastic and subject to internal rearrangements and horizontal transfer events (Galli-Terasawa et al., 2003; Minamisawa et al., 1998; Sawada et al., 2003).

The aim of this work was to establish the genetic diversity and taxonomic affiliation of rhizobia that nodulate *L. uliginosus* in Uruguayan soils, where this legume was introduced in the 1980s. *L. uliginosus* is widely used for improvement of pastures, and inoculated since 1995 with a *Bradyrhizobium* sp. strain NZP2309 from New Zealand. The existing rhizobial diversity may be the basis for the selection of novel strains for development of inoculants adequate for marginal soils, considering that pasture areas in Uruguay are being displaced to marginal soils due to the expansion of agriculture.

2. Materials and methods

2.1. Sampling sites and bacteria isolation

L. uliginosus plants were collected at four different locations, Palo a Pique, Glencoe, La Magnolia and Litoral (Table 1). Two sites of each location, with or without previous inoculation history were sampled, except for Litoral where fields had always been inoculated in the past. Fields with history of inoculation had pastures inoculated at least 7 years back. In each site, all the nodules of the upper 5 cm of roots from 10 plants were collected. Nodules were washed and surface sterilized for 1 min in 90% (v/v) ethanol followed by two

washes with sterile water and treated for 3 min in NaClO 4% (v/v). Nodules were finally rinsed three times with sterile water and kept in glycerol 7% (v/v) at -20°C .

At least three nodules from each plant collected in the inoculated sites were selected at random. In the case of non inoculated sites all the plant nodules were selected (Table 1). Nodules were individually crushed, plated on YEM agar (Vincent, 1970) and incubated at 28°C until bacterial growth was evident. The native strain collection was provided by the Laboratorio de Microbiología, Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. The isolates were kept in glycerol 20% (v/v) YEM at -80°C .

2.2. Isolation of genomic DNA, ERIC-PCR and diversity analysis

Genomic DNA was isolated and purified according to Estrella et al. (2009). Primers ERIC1 and ERIC2 (de Bruijn, 1992) were used to amplify genomic DNA according to Agius et al. (1997), see Table S1. The analysis of ERIC-PCR genomic fingerprints was done using Gelcompar 4.2 (Maths applied). Genetic similarity was estimated using the Dice coefficient and UPGMA was applied for hierarchical clustering. Diversity was calculated by using the Shannon index: $H' = -\sum S[(n_1/n)\ln(n_1/n)]$ (Shannon and Weaver, 1949), where n_1 is the number of isolates in each group and n is the number of isolates in all groups. To determine the relationship between the diversity and the natural aluminum soil content, the Pearson correlation coefficient was used.

2.3. Gene amplification, RFLP and sequencing

16S rRNA genes of the isolates were amplified using primers 41f and 1488r according to Herrera-Cervera et al. (1999), see Table S1. The amplified 16S rRNA gene fragments were digested with the endonucleases *MspI* and *HinfI* according to the manufacturer's instructions (Fermentas). The RFLP patterns were resolved on 3% (w/v) agarose gels for 2 h at 80V. The restriction patterns were compared manually and grouped according to their RFLP patterns into rRNA gene ribotypes (Estrella et al., 2009). The ITS region was amplified using primers FGPS1490-72F/FGPL132'-38R (Normand et al., 1996) using the same PCR amplification conditions as for the 16S rRNA gene (Herrera-Cervera et al., 1999; see Table S1).

The *atpD* gene was amplified with primers atpD-273F and atpD-771R according to Gaunt et al. (2001), see Table S1. The *glnII* and *recA*

Table 1

Origin of *Lotus uliginosus* nodule isolates and some features of soils and sampling sites. Strains from soils without history of inoculation (non-inoculated) were designated CN and strains from fields inoculated previously as Lu, followed by the location initials. pH was measured in water; OM, organic matter; (P) phosphorous expressed as P-Bray ($\mu\text{g/g}$); Al, aluminum expressed as milliequivalents per 100 g of soil.

Location coordinates	Isolates and soil of origin	Soil characteristics			
		pH	OM %	P	Al
Palo a Pique S 33° 14' W 54° 14'	Non inoculated CNP19, CNP21, CNP22, CNP29	5.3	>9.0	4	0.10
	Inoculated LUP1, LUP2, LUP3, LUP4, LUP5, LUP6, LUP7, LUP8, LUP9, LUP12, LUP13, LUP14, LUP16, LUP18, LUP19, LUP20, LUP21, LUP23, LUP24, LUP25, LUP27, LUP28, LUP29, LUP30	5	4.4	7	0.15
Glencoe S 32° 24' W 57° 08'	Non inoculated CNG1, CNG2, CNG4, CNG7, CNG8	5.8	>9	3	0
	Inoculated LUG1, LUG2, LUG3, LUG4, LUG5, LUG7, LUG10, LUG11, LUG12, LUG13, LUG14, LUG16, LUG17, LUG20, LUG21, LUG22, LUG23, LUG24, LUG25, LUG27, LUG28, LUG29, LUG30	5.4	>9	16	0.05
La Magnolia S 31° 42' W 55° 49'	Non inoculated CNL1, CNL2, CNL4, CNL7, CNL8, CNL9	4.8	4.9	5	0.57
	Inoculated LUL1, LUL3, LUL4, LUL5, LUL6, LUL7, LUL9, LUL11, LUL2, LUL13, LUL15, LUL16, LUL17, LUL18, LUL20, LUL21, LUL23, LUL24, LUL25, LUL26, LUL27, LUL28, LUL29, LUL30	4.5	2.6	9	0.71
Litoral S 33° 30' W 57° 47'	Inoculated LULIT1, LULIT3, LULIT4, LULIT5, LULIT6, LULIT7, LULIT8, LULIT9, LULIT11, LULIT12, LULIT13, LULIT16, LULIT17, LULIT18, LULIT19, LULIT20, LULIT21, LULIT23, LULIT24, LULIT25, LULIT26, LULIT27, LULIT2, LULIT29, LULIT30	6.4	5.3	3	0

genes were amplified using primers pairs *glnII2F/glnII689R* and *recA41F/recA640R*, respectively, following Vinuesa et al. (2005), see Table S1. The *nodC* and *nifH* genes were amplified with the primers *nodCF2/nodCI* and *nifHI/nifHF*, respectively, according to Laguerre et al. (2001), see Table S1. An aliquot of the PCR products was checked by agarose 1% (w/v) gel electrophoresis, and the remaining was purified (QIAquick Gel extraction kit, Qiagen, Germantown, MD) and sequenced (Macrogen Inc., Seoul, South Korea).

The isolates selected for gene sequencing were all the ones of ribogroup A that nodulated *L. corniculatus* and *L. uliginosus* (LUG11, LUP27, CNL1, LULIT25, CNL2, LULIT23, LUP4) and three others selected randomly (LUP3, CNP29, CNG1) and all the ones from the ribogroup B (CNL7, CNL8, CNL9) and C (LULIT12). Sequences were deposited in GenBank under the accession numbers were JX316034 to JX316048 for 16S rRNA, JX316049 to JX316065 for *atpD*, JX316066 to JX316079 for *glnII*, JX316117 to JX316131 for *recA*, JX316080 to JX316092 for ITS regions, JX316093 to JX316107 for *nifH* and JX316108 to JX316116 for *nodC*.

2.4. Phylogenetic analysis

The sequences obtained in this study were edited manually and compared with others available in GenBank. Alignments were performed with CLUSTALX (Thompson et al., 1997) with default options. In case of coding sequences the absence of in/dels that shift the reading frame in the alignment was verified, in order to assume the right positional homology. Phylogenetic reconstructions were conducted in MEGA5 (Tamura et al., 2011) and inferred using the Neighbor-Joining method (Saitou and Nei, 1987) with the *p* distance (number of base pair differences per site) and the option "pairwise deletion". The relative support for each clade in reconstructions was assessed by 50% majority rule consensus trees from 1000 bootstrap replications (Felsenstein, 1985). Phylogenies were inferred separately for each gene as well as for concatenated sequences of three housekeeping genes (*atpD*, *glnII* and *recA*) to generate the species tree in a more robust way. There were a total of 1527, 296, 865, 784, 1945, 604 and 487 positions in the final dataset for 16S rRNA, *atpD*, *nodC*, *nifH*, ITS, *glnII* and *recA* genes, respectively, and 1416 positions for the tree obtained from concatenated sequences of the *atpD-recA-glnII* genes.

2.5. Host specificity tests

The symbiotic ability of all isolates was tested in the original host, *L. uliginosus* 'Grass-lands Maku' as well as *L. corniculatus* 'San Gabriel.' Selected isolates from different ribogroups, *Bradyrhizobium* sp. NZP2309 (commercial inoculant) and *Mesorhizobium* sp. NZP2037 (a broad host range inoculant) were also tested in other legumes: *L. tenuis* 'Esmeralda', *L. subbiflorus* 'El Rincón', *L. japonicus* 'Gifu', *Lupinus gibertianus* 'Smith', *Lupinus bracteolaris* var. *leptophyllus* 'Bentham' and *Spartium junceum*.

Seeds were surface sterilized for 2 min in 90% (v/v) ethanol, rinsed twice with sterile water followed by 2 min in 10% (v/v) NaClO and rinsed three times with sterile water. Seeds were then germinated on sterile water-agar (1%, p/v) in petri dish in the dark at 25 °C. After the radicle reached a 2–3 mm length, three seedlings were sown in a tube containing nitrogen-free Jensen agar medium (Jensen, 1942).

For each strain three tubes were inoculated with 300 µL bacterial suspensions containing 10⁶ cells mL⁻¹. Plants were grown for 40 days in a chamber with 16/8 h light/darkness (200 µE m⁻² s⁻¹) at 22/20 °C day/night and 30/80% day/night relative humidity. The efficiency of symbiosis in these monoxenic systems was determined by visual inspection of nodules and by comparing size and appearance of inoculated plants with nitrogen-starved, non-inoculated control plants. The symbiosis was considered Fix⁺ when

plants did not show N-deficiency symptoms (Sotelo et al., 2011) at 40 days post inoculation.

3. Results and discussion

3.1. Soil characteristic and bacteria isolation

The four soils sampled chosen were different in pH, organic matter, phosphorus and aluminum. pH ranged from the most acid soil La Magnolia (pH 4.5–4.8) to the most basic soil in Litoral (pH 6.4), the organic matter percentage varies from the highest amount from soils at Glencoe and Palo a Pique without inoculation (>9) to the lowest value found in La Magnolia inoculated fields. Additionally the quantity of aluminum were highest in soils from La Magnolia and lowest in Litoral (Table 1), thus soils from La Magnolia showed the most adverse conditions while soils from Litoral have in general better conditions for bacterial growth and survival.

A total of 111 isolates were collected from plant nodules at the four different sites from Uruguay. All fields with the exception of Litoral have soils with and without inoculation history and nodules from both sites were collected naming isolated from soils with inoculation past starting by LU and soils without inoculation past starting by CN.

We sampled a total of 28 isolates from Palo a Pique, 4 of them were isolated from soils without inoculation history (CNP) and 24 isolates proceeded from inoculated soils (LUP). 28 isolates were collected at Glencoe, whenever isolates come from soils without inoculations past (5 isolates) were named as CNG, while the 23 isolates from inoculated soils were named as LUG. A total of 30 isolates were obtained from La Magnolia, 6 isolates (CNL) were collected from soils without inoculation history and 24 isolates were obtained from soils that were previously inoculated (LUL). The 25 isolates at Litoral were named as LULIT as all the fields from this place had an inoculation past (Table 1).

3.2. Analysis of ERIC genomic fingerprints

ERIC genomic fingerprints from the 111 isolates and the commercial inoculant strain *Bradyrhizobium* sp. strain NZP2309 (known as U526 in Uruguay) were obtained (Fig. S1). Fingerprints showed 3–17 bands in a range of 300–3000 bp. In order to assess the degree of reproducibility of the fingerprints, an isolate from each sampling site was chosen at random and amplified twice. The conglomerate analysis showed that each isolate clustered together with its duplicate with a minimum similarity value of 80% and a maximum of 100%. Therefore, isolates showing a similarity equal to or greater than 80% were considered identical. The ERIC analysis resolved 75 distinct fingerprints which corresponded to a diversity of 68% (Fig. S1) and a cophenetic correlation of 72%. None of fingerprints of the isolates were identical to that of the commercial strain U526 (Fig. S1).

The highest Shannon diversity index among isolates at a given location (1.40) was found in Palo a Pique and Glencoe, those isolated from Litoral showed an intermediate value (1.18) and La Magnolia the lowest (1.04). The differences among sites may be due to the soil conditions. Thus, soils in La Magnolia may represent more adverse conditions since these showed the highest aluminum concentration and the lowest pH values (Table 1) that may cause the lower diversity found in this site. When the relationship between diversity estimated by Shannon index and the aluminum content in soils, a negative correlation coefficient (−0.78) was found. This coefficient indicates an inverse relationship among soil aluminum content and rhizobial diversity. However, this relation was not significant since the *p*-value was 0.22. Factors

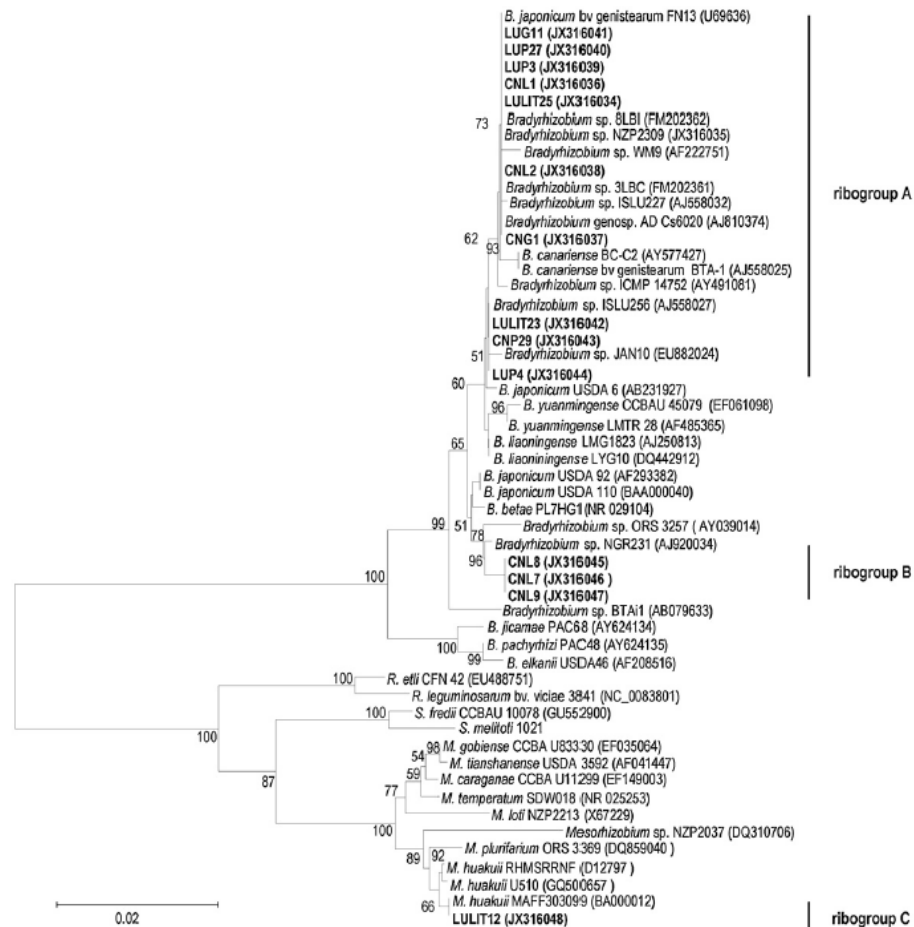


Fig. 1. Phylogeny based on 16S rRNA gene sequences. GenBank access numbers are next to the species name. Numbers above nodes are bootstrap consensus values (1000 pseudoreplicates). Sequences retrieved in this study are in bold. There was a total of 1208 positions in the final data set. Horizontal branch length is proportional to number of changes measured as number of base pair differences per site. *Burkholderia tuberum* STM678 (NR_027554) was used as outgroup but is not shown.

like salinity, pH, pollution or land use may negatively affect rhizobial genetic diversity (Kaschuk et al., 2006; Estrella et al., 2009). For instance, Estrella et al. (2009) observed that diversity of *L. tenuis* symbionts in the Salado River Basin (Argentina) was lower in the lowland alkaline and saline soils than in soils with less stressful conditions. In contrast, Sotelo et al. (2011) did not find significant differences in the diversity of *L. corniculatus* rhizobia collected from Uruguayan soils subject to contrasting water regimes.

The estimated diversity of rhizobial isolates nodulating *L. uliginosus* (68%) was higher than that reported for *L. subbiflorus* symbionts (53%) (Irisarri et al., 1996) in Uruguayan soils although the diversity were determined using other approaches (total protein profile and serological tests) and less number of isolates analyzed. Recently Lorite et al. (2012) found very low genetic diversity among isolates of *Bradyrhizobium* nodulating *L. uliginosus* in soils in Portugal with pH 6.5–5.4 and high concentrations of heavy metals (As, Hg and Pb).

3.3. RFLP analysis of 16S rRNA genes

A 16S rRNA gene fragment of ca. 1400 bp was PCR amplified from 75 isolates representative of the different groups with distinct ERIC fingerprints. This size is expected for 16S rRNA genes for most members of the *Rhizobiaceae* (Laguerre et al., 1994). Three different ribogroups (A, B and C) were distinguished after RFLP analysis using endonucleases *Hinf*I and *Msp*I. Ribogroup A included most (71) isolates and the commercial strain NZP2309. Ribogroup B (CNL7, CNL8 and CNL9) comprised three isolates from a non-inoculated field in La Magnolia. One isolate from Litoral was assigned to ribogroup C (LULIT12). This distribution was similar to results reported by Lorite et al. (2012) among *L. uliginosus* isolates in Portugal, where two ribogroups were identified with one ribogroup consisting of almost all isolates including *Bradyrhizobium* sp. strain NZP2309, whereas the second ribogroup included only two isolates. As shown below, the dominant ribogroups in Uruguay and Portugal represent closely related bacteria belonging to *B. japonicum* species, which suggests

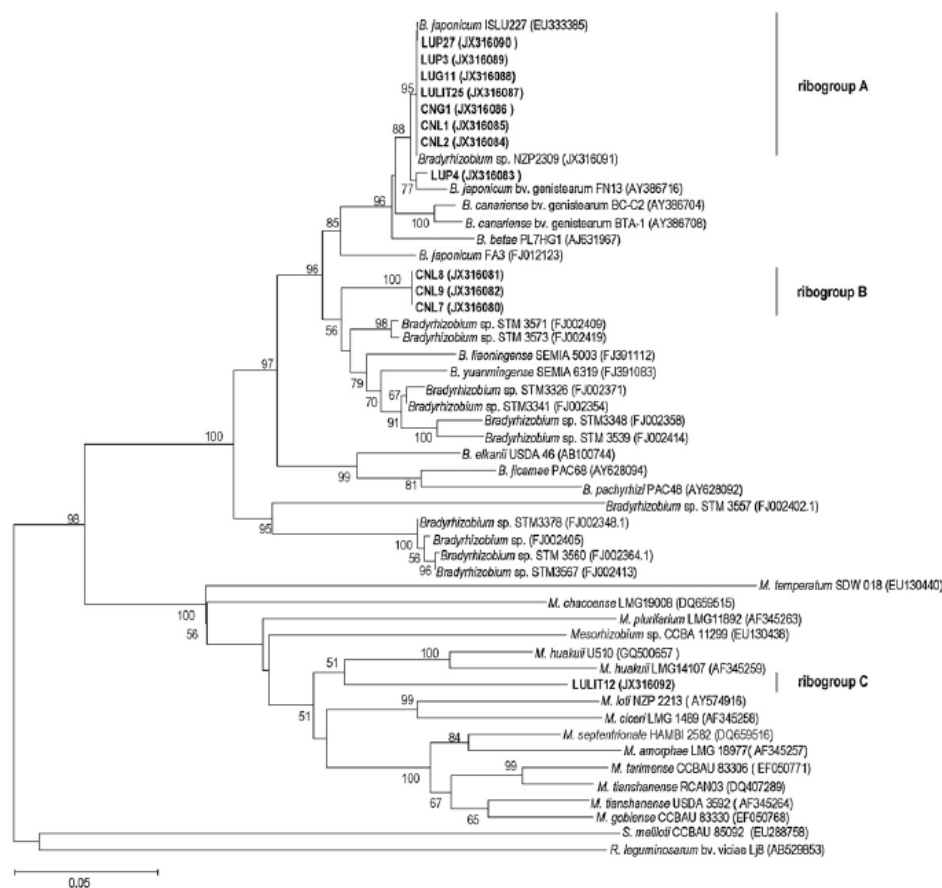


Fig. 2. Phylogeny estimated based on intergenic spacer 16S–23S (ITS) sequences. Genbank access numbers are next to the species name. Numbers above nodes are bootstrap consensus values (1000 pseudoreplicates). Sequences retrieved in this study are in bold. Horizontal branch length is proportional to number of changes measured as number of base pair differences per site. *Burkholderia* sp. (FJ981712) was used as outgroup but is not shown.

that these rhizobia are widely distributed in unrelated geographical areas.

3.4. Phylogenetic relationships

3.4.1. 16S rRNA gene analysis

Isolates from ribogroups A and B clustered with *Bradyrhizobium* (Fig. 1). Bootstrap values at the species level were generally low. Isolates from ribogroup A (CNL2, LUP3, LUP27, LUG11, LULIT25, CNG1, CNL1) and *L. uliginosus* NZP2309 had sequences identical to that of *Bradyrhizobium* Cs6020 (Lafay and Burdon, 2006) and *B. japonicum* strains 8LBI and 3LBC from Portugal (Lorite et al., 2012). On the other hand, isolates LULIT23, LUP4 and CNP29, also from ribogroup A, had identical 16S rRNA sequences that were slightly divergent (0.17%) from those of the above subgroup (Fig. 1). Isolates CNL9, CNL8 and CNL7 (ribogroup B) shared identical 16S rRNA sequences and were associated with *Bradyrhizobium* sp. NGR231 (Fig. 1), a strain isolated from the non-legume *Parasponia* in Papua New Guinea (Trinick, 1980).

The only isolate in ribogroup C, LULIT12, clustered within genus *Mesorhizobium* and was closely related to *M. huakuii* which includes strain U510. Strain NZP2037, which has a broad host range (Saeki and Kouchi, 2000) was also placed in this cluster. Strain NZP2037

efficiently nodulates *L. uliginosus*, *L. corniculatus*, *L. tenuis* and *L. subbiflorus* (Gonnet and Díaz, 2000) (Fig. 1) and was previously used as a commercial inoculant for *L. corniculatus* and *L. uliginosus* in Uruguay in the 1980s; however its use was not continued because it shows moderate to low nitrogen-fixing efficiencies in both hosts (Irisarri et al., 1996).

3.4.2. ITS sequence analysis

The 16S–23S internal transcribed spacer (ITS) has been used for determining relationships among closely related *Bradyrhizobium* strains that are difficult to distinguish using the 16S rRNA gene (Willems et al., 2001a).

The ITS sequences of isolates belonging to ribogroup A: CNL2, LUP3, LUP27, LUG11, LULIT25, CNG1, CNL1 and inoculant strain NZP2309 were identical to that of *B. japonicum* ISLU227 (Fig. 2), whereas LUP4 was slightly different and clustered with *Bradyrhizobium* sp. *bv. genisteorum* FN13. Isolates of ribogroup B, CNL7, CNL8, CNL9 were identical among them and distinct from those of other bradyrhizobia (Fig. 2). As with 16S rRNA gene phylogeny, ITS sequences of the LULIT12 isolate had high similarity with *Mesorhizobium*, and in particular with *M. huakuii* LMG14107 as well as strain U510.

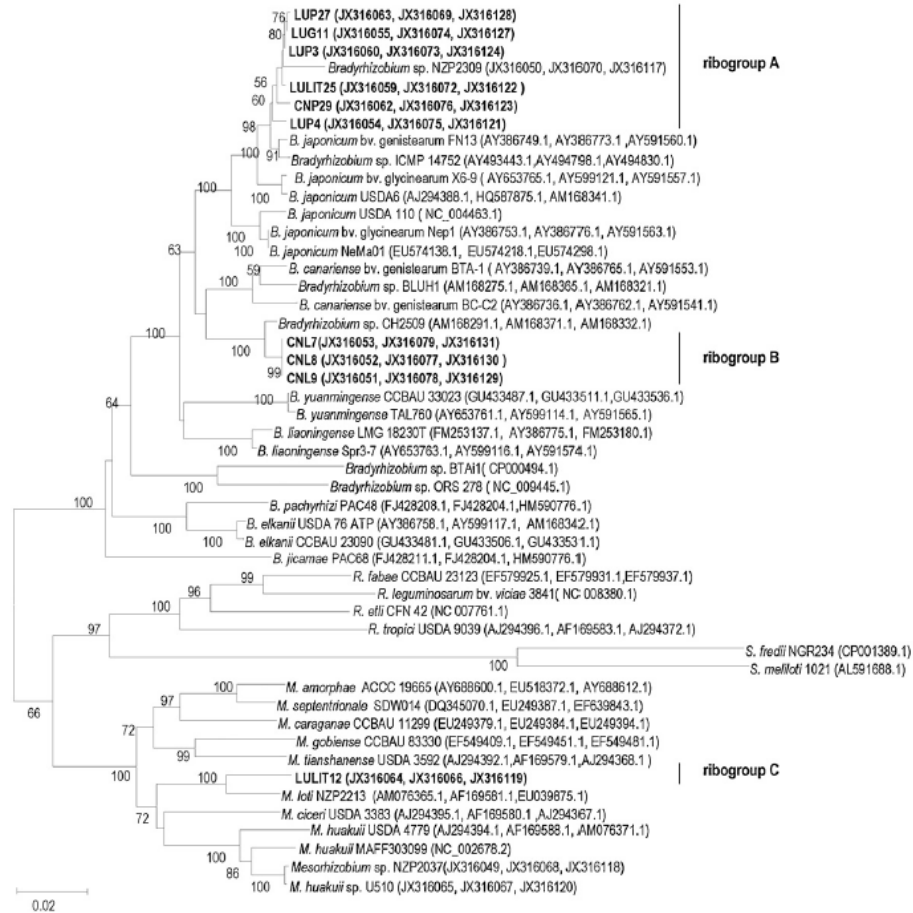


Fig. 3. Phylogeny based on the concatenation of *atpD*, *recA* and *glnII* gene sequences. Genbank access numbers are next to the species name. Numbers above nodes are bootstrap consensus values (1000 pseudoreplicates). Sequences retrieved in this study are in bold. There were a total of 199 positions in the final data set. Horizontal branch length is proportional to number of changes measured as number of base pair differences per site. *Burkholderia cenocepacia* bpoe721 (FJ666042.1) was used as outgroup but is not shown.

3.4.3. Analysis of *atpD*, *recA* and *glnII* genes

Phylogenetic trees were constructed for individual gene sequences (Figs. S2–S4) as well as for the concatenated assembly of the three genes (Fig. 3). The results with the concatenated sequences were generally congruent with those of the individual genes but generated more robust and confident groupings. As expected, the tree obtained from the concatenation of *atpD*, *recA* and *glnII* genes resulted in stronger nodes with higher bootstrap values (Fig. 3). The phylogenies were also consistent with 16S rRNA gene and ITS sequences.

The great majority of isolates (ribogroup A) clustered with *B. japonicum*, and had a close relationship with *B. japonicum* bv. *genistearum* strains FN13 and ICMP 14,752. This result is consistent with the phylogeny of Portuguese *L. uliginosus* isolates reported by Lorite et al. (2012), who also found that these rhizobia were phylogenetically related to *B. japonicum* bv. *genistearum* strains. Our results suggest, however, that some *L. uliginosus* rhizobia isolates from Uruguay could represent a novel species of *Bradyrhizobium*. Isolates CNL7, CNL8 and CNL9 did not show a clear affiliation with

any of the species so far described for this genus. The isolates were closely related to *Bradyrhizobium* sp. CH2509, a strain originally isolated from a nodule of *Lupinus albus* in Rio Grande do Sul, a Brazilian state bordering Uruguay (Stepkowski et al., 2007). The Uruguayan and Brazilian isolates formed a distinct robust clade, clearly separated from other clades within *Bradyrhizobium*. As discussed below, these bacteria could represent a new *Bradyrhizobium* species and a native group of rhizobia that have *L. uliginosus* as one of their legume hosts.

On the other hand, strain LULIT12, the only representative in ribogroup C, was clearly affiliated with *Mesorhizobium* and closely related to type strain *M. loti* N2P2213 (Fig. 3). This result differs from that found for 16S rRNA gene and ITS sequence. This discrepancy must be considered with caution due to low bootstrap values obtained for the internal nodes of the *Mesorhizobium* genus in the 16S and ITS trees. If these associations were corroborated, they may be due to the mosaic nature of bacterial genomes. Horizontal transfer of housekeeping genes, despite its low rate, could be responsible for the lack of agreement among phylogenies from different genes.

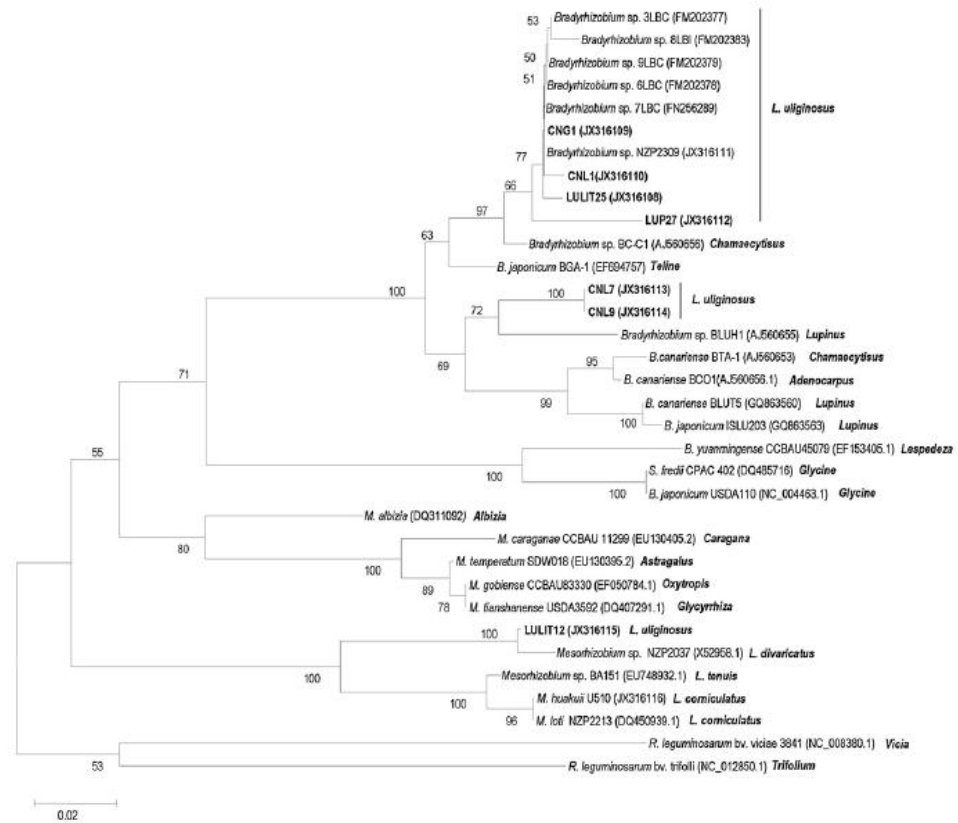


Fig. 4. Phylogeny based on *nodC* gene sequences. Genbank access numbers are next to the species name. Numbers above nodes are bootstrap consensus values (1000 pseudoreplicates). Sequences retrieved in this study are in bold. There was a total of 199 positions in the final data set. Horizontal branch length is proportional to number of changes measured as number of base pair differences per site. *Burkholderia tuberum* DUS833 (EF566977.1) was used as outgroup but is not shown.

As further discussed below, although isolated from *L. uliginosus*, LULIT12 may represent a unique broad host range mesorhizobia in Uruguayan soils.

3.4.4. Analysis of *nodC* and *nifH* genes

The phylogeny of *nodC* gene shows that ribogroup A isolates (CNG1, CNL1, LULIT25, LUP27) clustered with strain NZP2309 and Portuguese *L. uliginosus* rhizobia (3LBC, 8LBI, 9LBC, 6LBC, 7LBC) described by Lorite et al. (2012) (Fig. 4). Bradyrhizobia nodulating genistoid legumes and classified as *bv. genistearum* were also in the same cluster. Within this cluster, but forming a distinct clade were *nodC* sequences from isolates CNL7 and CNL9 (ribogroup B), which were closely related to *Bradyrhizobium* sp. BLUH1, a strain that nodulates *Lupinus* spp. (Fig. 4).

The *nodC* sequence of LULIT12, single isolate of ribogroup C, clustered with *Mesorhizobium* sp. NZP2037. This result was in agreement with inoculation tests (Table 2; see below) showing that isolate LULIT12 shares host range with NZP2037.

Regarding *nifH* (Fig. 5) and consistent with *nodC* phylogeny, ribogroup A strains clustered with *L. uliginosus* Portuguese isolates, strain NZP2309 and other *B. japonicum* *bv. genistearum* strains. In contrast, isolates from ribogroup B were clearly distinct from other bradyrhizobia, but were related to *B. canariense* BTA-1. The *nifH* sequence in isolate LULIT12, ribogroup C, had high similarity with that of strain NZP2037, consistent with *nodC* gene phylogeny.

Table 2

Host range of *L. uliginosus* nodule isolates. Representative isolates were inoculated on each of the legume hosts as indicated. The commercial strain NZP2309 and the broad-host-range mesorhizobia NZP2037 were used as references. Lu, *Lotus uliginosus*; Lc, *Lotus corniculatus*; Lt, *Lotus tenuis*; Ls, *Lotus subbiflorus*; Lj, *L. japonicus*; Sj, *Spartium junceum*.

Ribogroup	Isolate or strains	Symbiotic phenotype					
		Lu	Ls	Lc	Lt	Lj	Sj
A	CNP29	Fix*	Fix*	Nod-	Fix*	Fix*	Fix*
	LULIT25	Fix*	Fix*	Fix*	Fix*	Fix-	Fix*
	CNG1	Fix*	Fix*	Nod-	Fix-	Fix-	Fix*
	LUG11	Fix*	Fix*	Fix*	Nod-	Fix-	Nod-
B	CNL7	Fix*	Fix*	Fix*	Fix*	Fix*	Fix*
	CNL8	Fix*	Fix*	Fix*	Fix*	Fix*	Fix*
	CNL9	Fix*	Fix*	Fix*	Fix*	Fix*	Fix*
C	LULIT12	Fix*	Fix*	Fix*	Fix*	Fix*	Fix*
A	NZP2309	Fix*	Fix*	Fix*	Fix*	Fix-	Fix*
C	NZP2037	Fix*	Fix*	Fix*	Fix*	Fix*	-

Fix* are isolates forming efficient symbiosis; Fix+ are partially effective or moderate nitrogen-fixers; Fix- are isolates able to nodulate but ineffective; and Nod- are non-nodulating, - not tested.

3.5. Host range

The symbiotic ability of the 111 isolates was tested in the original host *L. uliginosus* as well as *L. corniculatus*. All isolates formed

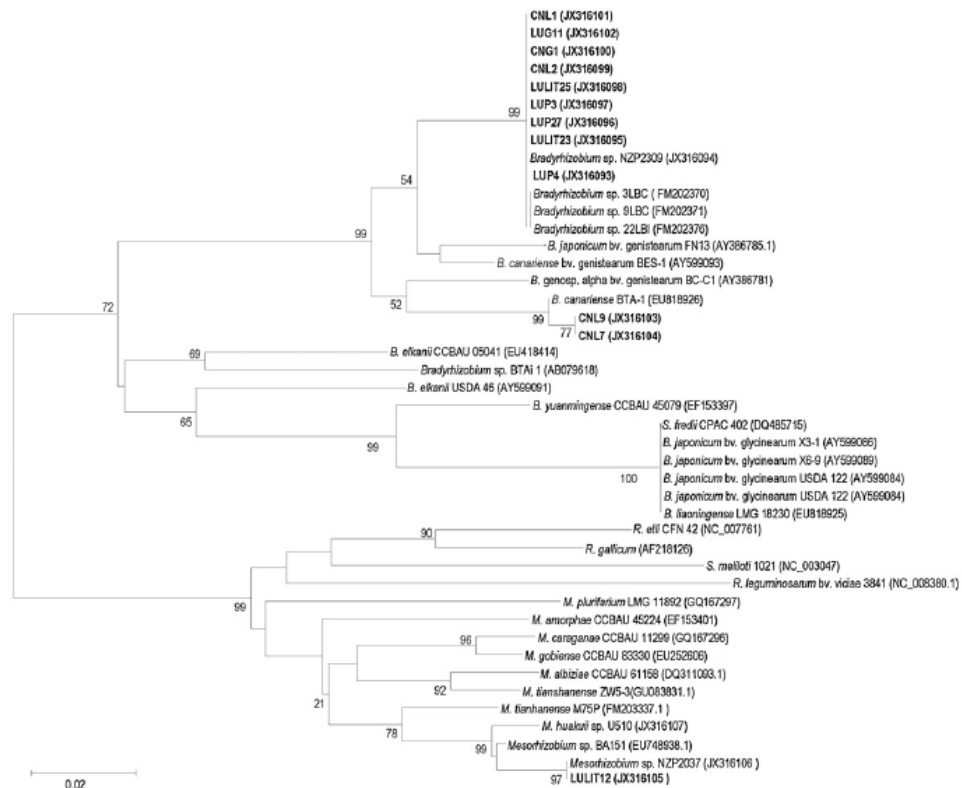


Fig. 5. Phylogeny based on *nifH* gene sequences. Genbank access numbers are next to the species name. Numbers above nodes are bootstrap consensus values (1000 pseudoreplicates). Sequences retrieved in this study are in bold. There were a total of 197 positions in the final data set. Horizontal branch length is proportional to number of changes measured as number of base pair differences per site. *Burkholderia* sp. STM678 (AJ302315.1) was used as outgroup but is not shown.

Fix⁺ nodules in *L. uliginosus* whereas seven isolates from ribogroup A (LULIT23, LULIT25, LUG11, LUP27, CNL1, CNL2 and LUP4), three isolates from ribogroup B (CNL7, CNL8, CNL9) and the single isolate from ribogroup C (LULIT12) induced Fix⁺ nodules on *L. corniculatus*. The occurrence of the first nodule (14 days after inoculation) was the same for all isolates including strain NZP2309 on *L. uliginosus*, but nodulation on *L. corniculatus* plants only occurred at 22 days after inoculation (data not shown).

Four isolates from ribogroup A (CNP29, LULIT25, CNG1, LUG11), strain NZP2309 and all isolates of ribogroup B and C were host-range tested in other *Lotus* species as well as non *Lotus* legumes (Table 2). As expected, all efficiently nodulated *L. subbiflorus* with the first nodule evident 15 days after inoculation. It was reported that this species and *L. uliginosus* can share the same symbiotic rhizobia (Irisarri et al., 1996). LUG11 was the only isolate that did not nodulate either *S. junceum* or *L. tenuis*. Isolates LULIT25, CNG1, LUG11 and strain NZP2309 showed a Fix⁻ phenotype in *L. japonicum* although the time of occurrence of the first nodule was 25 days after inoculation. Isolate CNG1 was also unable to fix nitrogen in association with *L. tenuis* (Table 2). Nodules appeared 15 days after inoculation on *L. tenuis* plants using isolates CNP29 and LULIT25. Nodules were seen at 20 days after inoculation of *S. junceum* when isolates CNG1, LULIT25, CNP29 or strain NZP2309 were used.

These results are supported by phylogenetic inferences that relate isolates from ribogroup A with species of bradyrhizobia nodulating genistoid legumes like *Spartium*. On the other hand, the host range test showed that isolate LULIT12 could nodulate the four species of lotus tested (*L. uliginosus*, *L. subbiflorus*, *L. tenuis*,

L. corniculatus) further supporting these phylogenetic inferences. None of these bacteria induced nodules in *L. gibertiana* or *L. bracteolaris* var. *leptophyllus* (data not shown).

The genetic diversity of the Uruguayan populations of *L. uliginosus* rhizobia examined here was considerably higher, compared with another study (Lorite et al., 2012), as shown by ERIC fingerprinting and phylogenetic analyses. It is worth noting that none of our isolates were identical to the commercial strain U526 (NZP2309), which has been used as an inoculant for decades in Uruguay, although a few isolates showed ERIC fingerprints related to U526. In addition, most isolates included in ribogroup A have very close phylogenetic affinity with strain U526 and other *B. japonicum* symbionts of *L. uliginosus*, as deduced from housekeeping and symbiotic gene phylogenies. Considering that *L. uliginosus* is not native to Uruguay and the extensive use of U526 as an inoculant, our results suggests that at least some ribogroup A isolates might have derived from U526 after release. We can speculate another possibility, involving that ribogroup A strains may have been unconsciously introduced into Uruguay, for instance as *L. uliginosus* seed contaminants. The presence of ribogroup A strains in soils with no history of inoculation would support this possibility. Another, perhaps more speculative possibility is that ribogroup A isolates might be derived from native strains, which could have acquired enhanced symbiotic performance after receiving symbiotic regions from the inoculant U526 by horizontal transfer events. Sequence analysis of relevant genomic regions in U526 and representative ribogroup A isolates should provide useful information for distinguishing amongst such possibilities.

In addition we found three bradyrhizobial isolates (CNL7, CNL8 and CNL9) which were clearly distinct from the majority of isolates and reference strains. These isolates were from soils having no previous history of inoculation. Phylogenetic analysis showed that these isolates were distinct from previously described *Bradyrhizobium* species, but were very closely related to a strain (CH2509) isolated from *L. albenscens* in southern Brazil. Although isolates CNL7, CNL8 and CNL9 did not nodulate the two *Lupinus* species tested in this study, their close phylogenetic relationship to the above Brazilian strain together with the fact that they were isolated from soils with no history of inoculation, suggest that these isolates may be native to regional soils. One possibility is that they can efficiently nodulate *Lotus* but may have other legume(s) as primary host. As such, it might be worthwhile to search for native rhizobia that could serve as effective *Lotus* inoculants and that would be well adapted to the soil and climatic conditions of the region.

Isolate LULIT12 also appeared to be a broad host-range strain related to *Mesorhizobium*, although its clustering with a particular species was unclear. The *nifH* and *nodC* genes of isolate LULIT12, however, were highly similar to those of strain NZP2037 (U261), which could suggest horizontal transfer from this non-native commercial inoculant as indicated above. Thus, isolate LULIT12 may represent a native bacterium that might have acquired symbiotic regions or genes from strain NZP2037. The host range of isolate LULIT12 was also similar to that of strain NZP2037 providing further support for horizontal transmission of symbiotic genetic information. More detailed studies will be necessary, however, to assess the origin and to characterize the symbiotic abilities of this isolate, particularly nitrogen fixing efficiency and nodulation competitiveness with *Lotus* used for improvement of Uruguayan pastures.

This work has for the first time explored the genetic diversity of rhizobia nodulating *L. uliginosus* in a South American country like Uruguay, where *L. uliginosus* was introduced several decades ago and is commonly inoculated with a commercial strain brought from New Zealand. Our results indicate that despite its wide utilization, the commercial strain NZP2039 does not survive very well in the Uruguayan soils, and strongly support the notion that Uruguayan soils contain native and/or naturalized *L. uliginosus* symbionts, likely well adapted to the local conditions which can be the source for development of improved inoculants.

Acknowledgements

Authors wish to thank Ing. Agr. Carlos Labandera, Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca in Uruguay for providing the isolates used in this study. We also thank PEDECIBA (Uruguay), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC, Spain) and Comisión Sectorial de Investigación Científica (UdelaR Uruguay). *Funding*: LOTASSA Project (European Union) and Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII).

The authors dedicated this work to Dra. Gloria Martínez Drets for her contribution to rhizobiology (1931–2012).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.01.009>.

References

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

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

Chahboune, R., Carro, L., Peix, A., Barrijal, S., Velázquez, E., Bedmar, E.J., 2011. *Bradyrhizobium cytisi* sp. nov., isolated from effective nodules of *Cytisus villosus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 2922–2927.

Chang, Y.L., Wang, J.Y., Wang, E.T., Liu, H.C., Sui, X.H., Chen, W.X., 2011. *Bradyrhizobium lablabi* sp. nov., isolated from effective nodules of *Lablab purpureus* and *Arachis hypogaea*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 2496–2502.

Christensen, P., Kuhnert, H., Olsen, J.E., Bisgaard, M., 2004. Comparative phylogenies of the housekeeping genes *atpD*, *infB* and *rpoB* and the 16S rRNA gene within the *Pasteurellaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 1601–1609.

de Bruijn, F., 1992. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2180–2187.

Díaz, P., Borsani, O., Monza, J., 2005a. *Lotus japonicus* related species and their agronomic importance. In: Márquez, A.J. (Ed.), *Lotus Handbook*. Springer-Verlag, Dordrecht, pp. 25–37.

Díaz, P., Monza, J., Márquez, A., 2005b. Drought and saline stress. In: Márquez, A. (Ed.), *Lotus japonicus Handbook*. Springer, Dordrecht, pp. 39–50.

Estrella, M.J., Muñoz, S., Soto, M.J., Ruiz, O., Sanjuán, J., 2009. Genetic diversity and host range of rhizobia nodulating *Lotus tenuis* in typical soils of the Salado River Basin (Argentina). *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 1088–1098.

Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783–791.

Galli-Terasawa, L.V., Glienke-Blanco, C., Hungria, M., 2003. Diversity of soybean rhizobial population adapted to a Cerrados soil. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19, 933–939.

Gaunt, M.W., Turner, S.L., Rigottier-Gois, L., Lloyd-Macgilps, S.A., Young, J.P.W., 2001. Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 2037–2048.

Gevers, D., Cohan, F.M., Lawrence, J.G., Spratt, B.G., Coenye, T., Feil, E.J., Stackebrandt, E., Van de Peer, Y.V., Vandamme, P., Thompson, F.L., Swings, J., 2005. Re-evaluating prokaryotic species. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 733–739.

Gonnet, S., Díaz, P., 2000. Glutamine synthetase and glutamate synthase activities in relation to nitrogen fixation in *Lotus* spp. *Braz. J. Plant Physiol.* 12, 195–202.

Herrera-Cervera, J.A., Caballero-Mellado, J., Laguerre, G., Tichy, H.V., Requena, N., Amarger, N., Martínez-Romero, E., Olivares, J., Sanjuán, J., 1999. At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 30, 87–97.

Irisarri, P., Milnitsky, F., Monza, J., Bedmar, E., 1996. Characterization of rhizobia *Lotus subbiflorus* from Uruguayan soils. *Plant Soil* 180, 39–47.

Islam, M.S., Kawasaki, H., Muramatsu, Y., Nakagawa, Y., Seki, T., 2008. *Bradyrhizobium iriomotense* sp. nov., isolated from a tumor-like root of the legume *Entada kosunensis* from Iriomote island in Japan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72, 1416–1429.

Jensen, H.L., 1942. Nitrogen fixation in leguminous plants I. General characters of nodule-bacteria isolated from species of *Medicago* and *Trifolium* in Australia. *Proc. Linn. Soc. N.S.W.* 66, 98–108.

Jordan, D.C., 1982. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32, 136–139.

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

Kuykendall, L.D., Saxena, B., Devine, T.E., Udell, S.E., 1992. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan, 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* 38, 501–505.

Laguerre, G., Allard, M., Revoy, F., Amarger, N., 1994. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 56–63.

Laguerre, G., Nour, S.M., Macheret, V., Sanjuán, J., Drouin, P., Amarger, N., 2001. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology* 147, 981–993.

Lafay, B., Burdon, J.J., 2006. Molecular diversity of rhizobia nodulating the invasive legume *Cytisus scoparius* in Australia. *J. Appl. Microbiol.* 100, 1228–1238.

Leon-Barrios, M., Lorite, M.J., Donate-Correa, J., Sanjuán, J., 2009. *Ensifer meliloti* bv. lacerottense establishes nitrogen-fixing symbiosis with *Lotus* endemic to the Canary Islands and shows distinctive symbiotic genotypes and host range. *Syst. Appl. Microbiol.* 32, 413–420.

Lorite, M., Videira e Castro, I., Muñoz, S., Sanjuán, J., 2012. Phylogenetic relationship of *Lotus uliginosus* symbionts with bradyrhizobia nodulating genistoid legumes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 79, 454–474.

Merabet, C., Martens, M., Mahdhi, M., Zakhia, F., Sy, A., Le Roux, C., Domergue, O., Coopman, R., Bekki, A., Mars, M., Willems, A., de Lajudie, P., 2010. Multilocus sequence analysis of root nodule isolates from *Lotus arabicus* (Senegal), *Lotus creticus*, *Argyrobium uniflorum* and *Medicago sativa* (Tunisia) and description of *Ensifer numidicus* sp. nov., and *Ensifer garamanticus* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 664–674.

Minamisawa, K., Isawa, T., Nakatsuka, Y., Ichikawa, N., 1998. New *Bradyrhizobium japonicum* strains that possess high copy numbers of the repeated sequence RSA. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1845–1851.

Normand, P., Ponsonnet, C., Nesme, X., Neyra, M., Simonet, P., 1996. ITS analysis of prokaryotes. *Molecular Microbial Ecology Manual* 3.4.5, vols. 1–12. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

