

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA SIMBIÓTICA DE HÍBRIDOS
INTERESPERCÍFICOS DE *Lotus uliginosus* x *Lotus corniculatus*

por

Miguel MEDEROS DARIAS

TESIS presentada como uno de
los requisitos para obtener el
título de Ingeniero Agrónomo

MONTEVIDEO
URUGUAY
2016

Tesis aprobada por:

Director:

Dr. Jorge Monza

Ing. Agr. MSc. Mónica Rebuffo

Ing. Agr. PhD. Rafael Reyno

Fecha:

7 de noviembre de 2016

Autor:

Miguel Mederos

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todos los que colaboraron en la realización de esta Tesis.

A mi familia por estar en todo momento y apoyarme. En especial a mis dos hijos mi madre, mi esposa y mi abuelo.

A Jorge Monza por estar en cada oportunidad que lo necesite, y corregir la tesis.

A Mónica Rebuffo y Rafael Reyno, por responder a mis dudas cada vez que fue necesario, y corregir la tesis.

Pamela, por estar siempre.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VI
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1. OBJETIVO.....	2
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	3
2.1. USO DE LEGUMINOSAS E INOCULANTES EN URUGUAY.....	3
2.2. UTILIZACIÓN DE LOTUS EN EL MEJORAMIENTO DE PASTURAS.....	3
2.2.1. <u>Características productivas y botánicas de <i>L.corniculatus</i> y <i>L. uliginosus</i></u>	4
2.3. TANINOS.....	7
2.4. HÍBRIDOS DE LOTUS.....	9
2.4.1. <u>Importancia de los híbridos</u>	9
2.4.2. <u>Obtención de híbridos</u>	9
2.5. INOCULANTES RIZOBIANOS.....	10
2.6. NITRÓGENO.....	12
2.7. ESTABLECIMIENTO DE SIMBIOSIS.....	14
2.8. FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO Y DIAZOTROFOS.....	14
2.8.1. <u>Factores y procesos que afectan la nodulación</u>	16

2.9. CEPAS UTILIZADAS COMO INOCULANTES COMERCIALES...	17
2.10. HIPÓTESIS.....	18
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	19
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	19
3.1.1. <u>Material vegetal</u>	19
3.1.2. <u>Microorganismos</u>	19
3.2. CRECIMIENTO DE BACTERIAS Y PREPARACIÓN DE INÓCULOS.....	19
3.3. ESTERILIZACIÓN Y GERMINACIÓN DE SEMILLAS.....	20
3.4. CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS EN CONDICIONES CONTROLADAS.....	20
3.5. DISEÑO Y TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.....	21
3.6. ESTIMACIÓN DE LA BIOMASA PRODUCIDA.....	22
3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	22
4. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	23
5. <u>CONCLUSIONES</u>	29
6. <u>RESUMEN</u>	30
7. <u>SUMMARY</u>	31
8. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	32

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Producción estacional de <i>L. c</i> durante 4 años	4
2. Producción de forraje promedio de <i>L. corniculatus</i> en diferentes años.....	5
3. Producción de forraje en kg MS.ha ⁻¹ de tres cultivares de <i>L.corniculatus</i>	5
4. Producción de materia seca (MS) de <i>L. uliginosus</i> cv. <i>Maku</i>	6
5. Características de las cepas comerciales utilizadas.....	18
6. Composición del medio YEM.....	20
7. Composición del R y P.....	21
Figura No.	
1. Ruta de los flavonoides que conduce a proantocianidinas (AP).....	8
2.Ciclo de nitrógeno.....	13
3. Eventos involucrados en la simbiosis rizobio – leguminosa.....	15
4. Esquema de distribución de tratamientos en cámara.....	21
5. Peso seco mg/maceta de ensayo 1 corte 1.....	24
6. Peso seco mg/maceta de ensayo 1 corte 2.....	25
7. <i>L.uliginosus</i> inoculado con cepa U226 y el control sin inocular.....	27
8. Densidad y distribución de nódulos (A) y aspecto individual (B).....	28

1. INTRODUCCIÓN

La necesidad de satisfacer la demanda creciente de proteína animal tanto carne como leche para el consumo humano, nos lleva a ser eficientes en la producción animal. Entre los factores que afectan esta eficiencia se encuentra la nutrición animal. El suministro de fuentes proteicas es relativamente costoso y en tal sentido se trabaja en la búsqueda de alternativas que resulten económicas y viables.

Las leguminosas son capaces de producir altos niveles de proteína, con una tasa relativamente baja de disminución de este componente mientras que la planta avanza en su maduración (Rincón, citado por Dervin, 2015). Estas plantas tienen la habilidad de utilizar el nitrógeno atmosférico mediante el establecimiento de una relación simbiótica, o sea una relación de beneficio mutuo, con bacterias colectivamente llamadas rizobios. Estas bacterias reducen el N_2 a amonio (NH_4^+), que es asimilado por la planta. A su vez, la planta le suministra a las bacterias diferentes moléculas carbonadas derivadas de la fotosíntesis, como fuente de carbono y energía. Esto significa que la fijación biológica del nitrógeno (FBN) utiliza energía solar, una fuente inagotable de energía, y gracias a ella es posible reducir la utilización de fertilizantes.

El proceso industrial para producir fertilizantes químicos nitrogenados y su distribución, consume grandes cantidades de energía (gas natural o petróleo), recursos naturales no renovables, y además libera CO_2 , uno de los causantes del efecto invernadero.

A su vez, el uso de fertilizantes químicos nitrogenados tiene efectos nocivos sobre el ambiente a través de los nitratos (NO_3^-), que contaminan las aguas superficiales y profundas de uso humano y animal, y del óxido nitroso (NO) que contribuye con el calentamiento global (Steinfeld et al., 2007). En este sentido, la posibilidad de utilizar el N_2 atmosférico a través de la FBN contribuye a disminuir esos efectos.

Entre los microorganismos capaces de reducir N_2 se encuentran los rizobios, que son los fijadores de mayor importancia agronómica porque en simbiosis con leguminosas permiten la entrada de nitrógeno a los ecosistemas agrícolas. La cantidad de nitrógeno transferido a las plantas proveniente de la fijación simbiótica es variable, del orden de 50 a $70 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{año}^{-1}$, mientras que la cantidad de N aportada por la fijación no simbiótica y las lluvias oscila entre 10 y $20 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{año}^{-1}$ (Perdomo y Barbazán, 2008).

La introducción de leguminosas en el campo natural proporciona nitrógeno al sistema, aumentando la calidad y cantidad de gramíneas. Por esto

su utilización protege los recursos genéticos nativos y contribuye al mantenimiento sustentable de la biodiversidad (FAO, 2003).

Debido a los aportes que derivan de FBN, antes de introducir una leguminosa es aconsejable conocer que tan eficientes son los pares simbióticos de distintas asociaciones rizobio – leguminosa. En este sentido, como se desarrollaron híbridos interespecíficos de *L. uliginosus* x *L. corniculatus* y el recíproco, en esta tesis se evalúa la eficiencia simbiótica de los inoculantes comerciales actuales utilizados para inocular a los parentales.

1.1. OBJETIVO

Evaluar la eficiencia de los inoculantes rizobianos comerciales utilizados en *L. uliginosus* y *L. corniculatus* en nuevos híbridos interespecíficos entre estas especies.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. USO DE LEGUMINOSAS E INOCULANTES EN URUGUAY

Las praderas artificiales y pasturas mejoradas con leguminosas forrajeras son uno de los pilares de la agricultura y ganadería en Uruguay; que comprende unas 2.342.542 ha en 2012/13 (MGAP. DIEA, 2015). Para satisfacer la demanda creciente de proteína animal se requiere una mayor productividad ganadera, la cual está acotada por la calidad de las pasturas naturales, integradas básicamente por gramíneas estivales.

En la última década la superficie de praderas artificiales y pasturas mejoradas ha disminuido, en parte por el desplazamiento a suelos marginales de las explotaciones ganaderas y lecheras como consecuencia de la expansión del área agrícola. Esto llevó, por un lado, a la disminución del uso de inoculantes por los productores por no observar un beneficio derivado de la inoculación, y por otro a tener que evaluar inoculantes que permitan mejorar la implantación, producción y duración de la pradera en diferentes ambientes (Sanjuán y Rebuffo, 2010).

A su vez, los cambios progresivos en la estructura rural (disminución del número de predios), especialización productiva (disminución de la multiplicación de semilla propia), extensión del monocultivo de soja, entre otras, también ha contribuido a esa disminución de la superficie de praderas y pasturas mejoradas (Sanjuán y Rebuffo, 2010).

2.2. UTILIZACIÓN DE LOTUS EN EL MEJORAMIENTO DE PASTURAS

Debido a la importancia que tienen las leguminosas ya sea en el área productiva, ambiental y social, se justifica una inversión importante en el mejoramiento genético de muchas especies. En Uruguay, distintas especies del género *Lotus* se utilizan en diferentes sistemas de producción, con una superficie aproximada de 500.000 ha (MGAP. DIEA, 2011), lo que evidencia la importancia de estas leguminosas en nuestro país.

Las más de 200 especies de este género componen un conjunto heterogéneo de plantas anuales y perennes ampliamente distribuidas en el mundo (Grant, 1995), adaptadas a diversos ecosistemas. Entre las mismas se encuentran especies forrajeras de interés agronómico y otras son utilizadas en la recuperación de ambientes marginales para la agricultura.

En Uruguay se usan como leguminosas forrajeras *L. corniculatus* L., *L. uliginosus* Schkuhr (sinónimo *L. pedunculatus* Cav.) y *L. tenuis* Waldst. & Kit. Ex Willd (sinónimo *L. glaber* Mill) (perennes) y *L. subbiflorus* Lag. y *L.*

angustissimus L. (anuales), con diferentes ventajas y limitaciones, pero todas contienen taninos, que evitan el meteorismo (Min et al., 2003).

2.2.1. Características productivas y botánicas de *L. corniculatus* y *L. uliginosus*

Las especies del género *Lotus* presentan una buena adaptación a suelos de fertilidad y acidez media, características comunes de suelos de Uruguay. Dentro de las especies perennes se destacan *L. corniculatus* por su tolerancia al déficit hídrico y el cultivar rizomatoso 'Grasslands Maku' (*lotus* Maku; *L. uliginosus*) por su persistencia, contenido de taninos y tolerancia al pastoreo (Reyno, 2014).

L. corniculatus presenta una raíz pivotante con numerosas ramificaciones laterales principalmente en los primeros treinta a sesenta centímetros del perfil del suelo y una corona leñosa de la cual parten numerosos tallos aéreos. Ese sistema radicular le permite explorar ventajosamente el agua y nutrientes (Seaney y Henson, 1970).

La utilización de variedades criollas en el mejoramiento genético ha permitido desarrollar el cultivar INIA Draco de *L. corniculatus*, que produce 10% más forraje que San Gabriel, la variedad tradicional (Rebuffo, 1998).

L. corniculatus, es de las especies más recomendables y utilizadas para la siembra con cultivos asociados dado su vigor inicial y recuperación luego de cosechado el cultivo. Presenta una alta producción de semillas cuyo promedio a nivel nacional es de 80 Kg·ha⁻¹ (Pritsch, 1992), sin embargo realizando manejos adecuados se pueden alcanzar rendimientos superiores a los 400 Kg·ha⁻¹ (Formoso, 1996). Como desventaja, presenta facilidad de desgrane por lo que requiere de una cosecha en tiempo y forma para obtener buenos rendimientos.

La producción y distribución estacional de pasturas puras de *L. corniculatus* en Uruguay se resumen en el cuadro 1 y la producción de forraje promedio en diferentes años en el cuadro 2.

Cuadro No. 1. Producción anual y estacional de forraje de *L. corniculatus* durante 4 años, expresado como Kg MS.ha⁻¹ y proporción estacional dentro de año.

Años	Otoño	%	Invierno	%	Primavera	%	Verano	%	Total
1	200	4.4	600	13.3	2140	47.5	1570	34.8	4510
2	1520	20.1	1140	15	3220	42.5	1700	22.4	7580
3	640	12.2	752	14.3	2810	53.4	1060	20.1	5260
4	380	9.2	470	11.3	2434	58.7	860	20.8	4140

Fuente: Díaz et al. (1996).

Cuadro No. 2. Producción de forraje promedio de *L. corniculatus* en diferentes años.

Referencia	Producción (Kg MS.ha ⁻¹)	Observaciones
Leborgne, citado por Zanoniani y Ducamp (2004).	5000	Promedio de 4 años.
Risso, citado por Zanoniani y Ducamp (2004).	5100	Promedio de 5 años (siembra en cobertura).
García, citado por Zanoniani y Ducamp (2004).	7800	Promedio de 16 años (del segundo año).
Bemhaja, citado por Zanoniani y Ducamp (2004).	4900	Promedio de 4 años (mínimo laboreo).
Rebuffo, citado por Zanoniani y Ducamp (2004).	4300	Promedio del 3er. y 4º. año (dos cultivares en dos fechas de siembra).

En Uruguay los tres cultivares de *L. corniculatus* más utilizados son Estanduela Ganador, San Gabriel y Draco. En el cuadro 3 se muestra la producción de estos cultivares durante 3 años.

Cuadro No. 3. Producción anual de forraje en kg de MS.ha⁻¹ de tres cultivares de *L. corniculatus*.

Cultivares	1 año	2 año	3 año
Estanduela Ganador	4939	8715	6999
San Gabriel	4720	8496	6682
INIA Draco	4667	9288	7658

Fuente: INIA (1999).

El cultivar Draco, de más reciente liberación por el INIA, busca aumentar la persistencia productiva en base a selección de plantas más longevas fundamentalmente resistentes a enfermedades de raíz y corona (Rebuffo, 1998).

L. uliginosus presenta diferentes hábitos de crecimiento, variable entre postrado, semipostrado, semierecto y erecto, según el origen y el momento fenológico que se considere. Poseen un sistema radicular extenso y superficial,

concentrado en los primeros centímetros del suelo formado por una corona primaria central y una raíz primaria pivotante a los que se agrega una importante red de rizomas, estolones y raíces fibrosas. Esta red entramada le otorga una muy buena habilidad colonizadora del tapiz y estabilizadora de suelos (Ayala y Carámbula, 2009).

El lotus Makú, cultivar tetraploide originario de Nueva Zelanda, es el más usado en Uruguay, aún cuando se han evaluado otros cultivares diploides (Hernández et al., 2005). Esto se debe entre otras características al valor proteico y producción de forraje, así como a las capacidad de desarrollarse en suelos ácidos y soportar anegamientos (Díaz et al., 2005).

La principal desventaja del lotus Maku es el bajo rendimiento en la producción de semilla en las condiciones ambientales del Uruguay (Hernández et al., 2005), lo que lleva al alto costo de las mismas. Por este motivo el programa de mejoramiento genético de INIA desarrolló el cultivar LE 205 de *L. uliginosus*, con mayor producción de semillas que lotus Maku. El cultivar LE 205 es tetraploide, perenne, de crecimiento prima vero-estivo-otoñal, seleccionado en INIA La Estanzuela con destino a sistemas ganaderos.

L. uliginosus ha tomado importancia en la actualidad debido a la revalorización del contenido de taninos condensados, que mejoran la protección de la proteína vegetal y por ende la producción animal. Su adaptación a condiciones de baja fertilidad y sus bajos requerimientos de manejo han permitido su destaque y promoción en nuestros sistemas de producción. Esta especie se utiliza principalmente en siembra en cobertura, aunque últimamente ha sido destacado su valor para la incorporación en pasturas mezclas en sistemas más intensivos (Carámbula et al., 1994).

En general los datos obtenidos en el país demuestran una baja producción al primer año, y un marcado aumento a partir del segundo, con una distribución de producción de forraje marcadamente en primavera – otoño. La producción de forraje del lotus Maku se resume en el cuadro 4 siendo en algunos casos superior a la mostrada por *L. corniculatus*.

Cuadro No. 4. Producción de forraje (Kg MS.ha⁻¹) de *L. uliginosus* cv. Grasslands Maku.

Referencia	Kg MS.ha ⁻¹ .año ⁻¹	Observaciones
Bemhaja, citado por Zanoniani y Ducamp (2004).	3900	Promedio de 3 años (basalto profundo).
Bemhaja, citado por Zanoniani y Ducamp (2004).	6700	Promedio de 3 suelos (siembra en cobertura).

Si bien la calidad de forraje en términos de proteína cruda y fibra es menor en *L. uliginosus* respecto a otras leguminosas, se debe tener en cuenta que su contenido de taninos condensados hacen posible ganancias de peso similares, que pasturas de mayor calidad (Montossi, 1995).

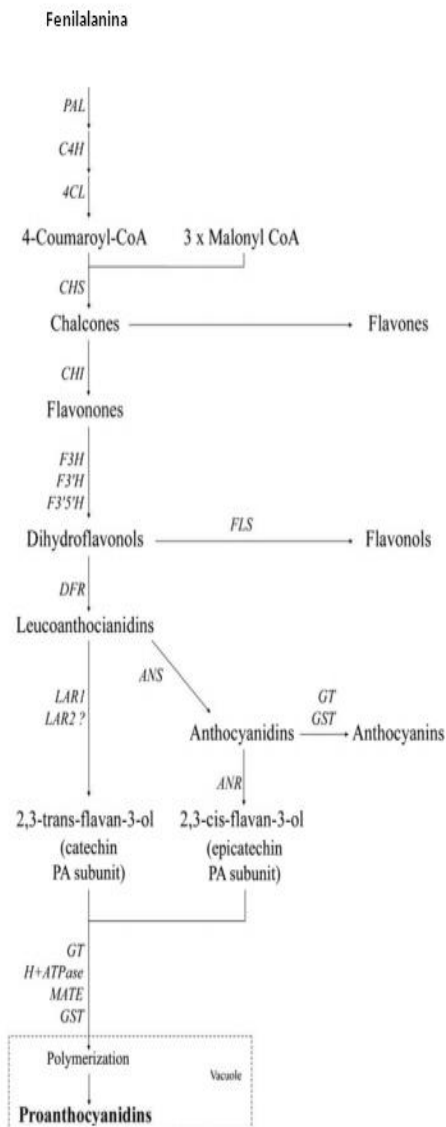
2.3 TANINOS

Los taninos son compuestos fenólicos de elevado peso molecular (500 a > 20000). En la naturaleza pueden encontrarse dos tipos: condensados e hidrolizables. Los TC (taninos condensados) son polímeros flavonoides, que pueden producir antocianidinas (Otero y Hidalgo, 2004). Los taninos se sintetizan mediante la vía de los fenilpropanoides que parte de los aminoácidos fenilalanina y tirosina (figura 1). Mediante esta vía se sintetizan diferentes tipos de taninos condensados y no condensados. Los compuestos fenólicos son difíciles de cuantificar, hay diferentes metodologías para determinarlos como la técnica de la vainillina, como equivalentes del ácido gálico o como protoantocianilinas.

En la práctica, las dietas con taninos se utilizan para prevenir la formación excesiva de espuma en los rumiantes (timpanismo). Esto se debe a que disminuye la pérdida de proteína de la ingesta en el rumen debida a la proteólisis realizada por microorganismos, lo que aumenta la cantidad de nitrógeno absorbida en el intestino delgado y disminuye la necesidad de suplementación proteica en la dieta (Taiz y Zeiger, 1998).

Una dieta con contenido medio de TC (entre el 2 y 4 % del peso seco) aumenta en la producción y calidad de la leche, la tasa de ovulación y la eficiencia de utilización del forraje (Waghorn y Shelton, 1997). Además los taninos reducen la incidencia de ectoparásitos en los ovinos (Niezen et al., 1995) y en las plantas contribuyen con la función defensiva frente a ciertos herbívoros hongos y bacterias (Taiz y Zeiger, 1998). Entre las bacterias, los rizobios son sensibles a los TC, que están relacionados con la nodulación (Pankhurst y Jones, 1979). Asimismo, los TC es probable que cumplan un rol en la modulación de los mecanismos de tolerancia a distintos estreses abióticos (Dixon y Paiva, 1995).

Sin embargo, concentraciones altas de TC en forraje, mayores al 4% del peso seco, reducen la palatabilidad, la digestibilidad y la producción de carne de los rumiantes (Min et al., 2003).



En cursiva se representan las abreviaturas de los nombres de las enzimas.

Figura 1. Vía de los flavonoides. Por esta vía se producen diferentes compuestos fenólicos como las flavonas, dihidroflavonas, flavonoles, antocianinas y proantocianidinas.

Fuente: modificado de Escaray et al. (2014).

2.4 HÍBRIDOS DE LOTUS

2.4.1 Importancia de los híbridos

L. corniculatus y *L. uliginosus* con diferentes estrategias de crecimiento y desarrollo a nivel del sistema radicular y de la parte aérea, son leguminosas con alto valor agronómico que se incorporan para mejorar las pasturas.

L. uliginosus es una forrajera con características de manejo que difiere poco de las requeridas por *L. corniculatus*, a excepción de su rebrote que es menos eficiente. No obstante, la elevada capacidad colonizadora de *L. uliginosus* a través de su habilidad de propagación vegetativa, contrasta con *L. corniculatus* cuya multiplicación depende de la semillazón (Carámbula et al., 1994).

Un objetivo del mejoramiento de *L. corniculatus* es la búsqueda de materiales de hábito semipostrado, de coronas grandes y presencia de rizomas, y para *L. uliginosus* una mayor producción de semilla. Un biotipo con ambas características permitiría contar con plantas de mayor persistencia y tolerancia al pastoreo.

2.4.2. Obtención de híbridos

Con el objetivo de combinar características y generar variabilidad genética en especies cultivadas del género *Lotus*, Castillo et al. (2012) realizaron cruza interespecíficas entre *L. uliginosus* (4n) y *L. corniculatus* (4n). De este modo se obtuvieron híbridos G1 (*L. uliginosus* cv. LE 205 x *L. corniculatus* cv. Draco) y G5 (*L. corniculatus* cv. Draco x *L. uliginosus* cv. LE 205), cuya eficiencia simbiótica con los rizobios utilizados como inoculantes comerciales de los parentales se evalúan en esta tesis.

Para los híbridos G1 se partió de 44 progenies de semilla F2 provenientes del cruzamiento de *L. uliginosus* x *L. corniculatus*. Para el híbrido G5 se partió de 24 progenies del cruzamiento recíproco. La generación de los híbridos y policruza posterior de genotipos F1 para generar la semilla F2 ha sido descrito por Castillo et al. (2012).

Los híbridos interespecíficos pueden recombinar mecanismos adaptativos presentes en las especies parentales y generar una fuente de material sobre el cual luego operan los procesos de selección (Grant, citado por Castillo et al., 2012).

Debido a la existencia de barreras reproductivas que mantienen el aislamiento entre especies, los híbridos obtenidos por Castillo et al. (2012) se obtuvieron mediante rescate de embriones, para lo que fue necesario el cultivo

in vitro de embriones hasta estados que permitieron la obtención de plantas. Estos autores realizaron la confirmación de los híbridos por citometría de flujo y marcadores moleculares.

2.5. INOCULANTES RIZOBIANOS

Dentro de las prácticas agrícolas sustentables, la de mayor éxito ha sido la FBN a través del desarrollo de inoculantes para leguminosas a base de cepas de rizobios seleccionadas por su especificidad, infectividad y efectividad (Toresani et al., 2007). La inoculación es una técnica que permite incorporar bacterias fijadoras de nitrógeno a las semillas o al suelo artificialmente (Hardanson et al., 1989).

Entre los años 1960 y 1970 en Uruguay se realizó un programa de selección de cepas de rizobios para ser usadas como inoculantes de leguminosas forrajeras y en la década del '80 se generalizó el uso de turba estéril como soporte en la formulación de los inoculantes, con mejoras en la calidad de los mismos. A esto se le suman políticas aplicadas por más de 40 años (Labandera, 2007), que hacen que el Uruguay sea un referente a nivel mundial en relación a la producción y uso de inoculantes rizobianos (Date, 2000).

Actualmente se busca garantizar la calidad de los inoculantes comerciales y se llevan adelante investigaciones relacionadas a la selección de cepas para leguminosas forrajeras, así como también nuevas tecnologías de inoculación, control de calidad y actualización del marco legal para el comercio de inoculantes.

Si bien en nuestro país no hay leguminosas nativas del género *Lotus* sp., existen poblaciones de rizobios que los nodulan en la mayoría de nuestros suelos con eficiencias variables. Estos rizobios, a los que se denominan genéricamente nativos, probablemente son naturalizados (Batista, 2013) y deriven de los introducidos hace más de 40 años. A su vez, dada su adaptación y persistencia a las condiciones edafoclimáticas locales, estas cepas pueden ser fuente para la selección de nuevos inoculantes (Batista, 2013) y también explicar por qué un porcentaje cercano al 50% de los productores abandonen la práctica de inocular al ver que las leguminosas se nodulan en ausencia de inoculante (Sanjuán y Rebuffo, 2010). El abandono de la práctica de inocular constituye un problema, porque en muchos casos la baja población de rizobios específicos o la presencia de cepas poco eficientes en el suelo pueden tener consecuencias negativas sobre la producción de la pradera.

En el género *Lotus* se han podido distinguir dos grupos según el rizobio que los nodula: *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* (Brockwell et al., 1994), que generalmente se encuentran en baja cantidad en los suelos, por lo que compiten poco con las cepas introducidas (Gwynne y Beckett, 1980). Estos grupos simbióticos tienen relaciones de incompatibilidad entre ellos, y las bacterias de un grupo pueden producir nódulos de tipo inefectivo o parásito en el otro grupo. De esta forma, si la especie de lotus sembrada no pertenece al mismo grupo simbiótico que la población de rizobio predominante en el suelo, puede provocar un establecimiento defectuoso o pérdida de rendimiento (Gwynne y Beckett, 1980).

L. corniculatus se ha utilizado en Uruguay desde los años 60 en diferentes sistemas de rotaciones. Por este motivo, en esos suelos como se dijo, suele haber cantidad y diversidad de cepas nativas – naturalizadas más o menos efectivas para este huésped (Sotelo et al., 2011). Estas cepas a las que nos referiremos genéricamente como nativas de aquí en adelante están presentes incluso en chacras sin historia de cultivo. Generalmente *L. corniculatus* presenta nódulos ocupados por *Mesorhizobium* sp., con mucha variabilidad en la eficiencia simbiótica (Baraibar et al. 1999, Sotelo et al. 2011). Sin embargo algunas cepas de *Mesorhizobium*, tienen amplio rango de hospedero y pueden formar nódulos fijadores de nitrógeno en la mayoría de las especies del género *Lotus* (Barrientos et al., 2002), entre ellas *L. uliginosus* (Batista et al., 2013).

La cepa U226 (U510), utilizada como inoculante comercial de *L. corniculatus* y de *L. tenuis* es eficiente en estas especies. Esto que es ventajoso para futuras siembras de estas especies, es una dificultad cuando se pretende sembrar posteriormente otras especies del género *Lotus* que son no compatibles simbióticamente con los rizobios presentes en el suelo. Esto sucede con *L. subbiflorus* cv. Rincón o lotus Maku. En estas especies, la cepa comercial de *L. corniculatus* es competitiva pero parásita, por lo que para una buena implantación de lotus Rincón y de lotus Maku es necesario inocular con el inoculante específico (Dutto, 2002).

Estas relaciones no implican renunciar a la siembra de *L. uliginosus* en potreros con antecedentes de *L. corniculatus*, dado que la competencia entre cepas muestran que a concentración baja de la cepa efectiva frente a la inefectiva, la planta puede establecer una simbiosis de tipo eficiente con la primera. Esto evidencia la necesidad de inocular con el inoculante específico para lograr una concentración mínima adecuada de rizobio por semilla que haga posible una efectiva nodulación y establecimiento (Labandera et al., 2005).

Un hecho interesante, es que ocurren eventos de transferencia horizontal de genes entre especies nativas de rizobios e inoculantes introducidos, lo cual marca una 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).

2.6. NITRÓGENO

El N es uno de los elementos más comunes del planeta y limita la producción de los cultivos en mayor medida. Esto es debido a que la molécula de N_2 ($N \equiv N$) es inerte, con una gran estabilidad por su triple enlace (Perdomo y Barbazán, 2008).

En forma natural, el nitrógeno del aire puede llegar a la planta a través de dos mecanismos principales: transferido por las bacterias, que previamente lo han reducido a amonio por el proceso de fijación simbiótica, o asimbióticamente, siendo el principal mecanismo el de fijación simbiótica (Perdomo y Barbazán, 2008).

En la naturaleza existen dos fuentes principales de reserva de nitrógeno para las plantas. La mayor es la atmósfera, que tiene 78% de N_2 aunque también existen otras formas gaseosas cuantitativamente de menor importancia. La otra reserva importante de nitrógeno es la materia orgánica del suelo (Perdomo y Barbazán, 2008).

Los cambios en el contenido de nitrógeno del suelo al cambiar el manejo de una situación determinada, ocurren porque cambia el balance de mecanismos de pérdida y ganancia de nitrógeno del suelo, siendo uno de los principales mecanismos de ganancia la FBN. Este proceso tiene gran importancia en la producción agropecuaria, donde se realizan rotaciones de cultivos con praderas mezclas de leguminosas y gramíneas, estas praderas generalmente permanecen en producción por tres o cuatro años. Gran parte del nitrógeno que utiliza la pradera mezcla es obtenido de la fijación simbiótica llevado a cabo por los rizobios en los nódulos de las raíces de leguminosas como alfalfa, tréboles y lotus (Perdomo y Barbazán, 2008).

En Uruguay, la cantidad de nitrógeno que pueden fijar las pasturas mezclas en su segundo año de producción puede ser hasta $300 \text{ kg. ha}^{-1} \cdot \text{año}^{-1}$ (Mallarino et al., 1990). En una rotación de cultivos y pasturas, el nitrógeno fijado por las leguminosas puede ser utilizado luego por los cultivos siguientes.

El nitrógeno presente en el suelo bajo formas orgánicas tampoco está disponible como tal para las plantas, sino que para ser absorbido tiene que pasar a formas inorgánicas. El nitrógeno inorgánico representa un 2% del

nitrógeno total del suelo, donde se encuentra como nitrato (NO_3^-), amonio (NH_4^+) y nitrito (NO_2^-). Estas formas inorgánicas son transitorias en el suelo, determinadas por las reacciones de oxidación y de reducción (figura 2), por lo cual sus cantidades son extremadamente variables y oscila entre pocos gramos hasta más de 100 kg. ha^{-1} de nitrógeno (Perdomo y Barbazán, 2008).

El N_2 debe ser reducido a NH_4 para poder ser utilizado por las plantas, dicha reducción es realizada por un grupo pequeño de procariotas, llamado diazotrofos, ha este proceso se le llama fijación biológica de nitrógeno (FBN).

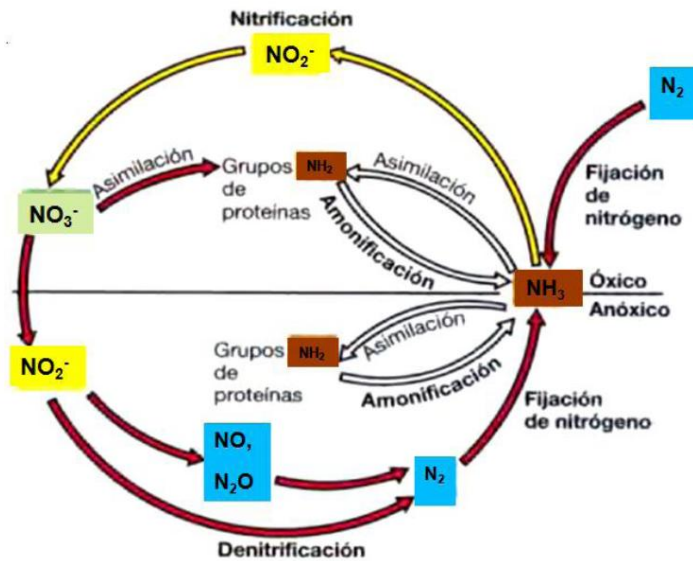


Figura 2. Ciclo del nitrógeno. Las reacciones de oxidación están representadas por las flechas amarillas y las de reducción con flechas rojas. La fijación biológica de nitrógeno permite su incorporación a los ecosistemas, mientras que la desnitrificación su salida bajo la forma de N_2 , N_2O o NO . Fuente: tomado de Madigan et al. (2004).

La capacidad de desnitrificar es infrecuente entre los rizobios, y solo algunas cepas del *Bradyrhizobium* pueden realizarla. La vía completa, consiste en la acción secuencial de las enzimas nitrato reductasa, nitrito reductasa, óxido nitrito reductasa y óxido nitroso reductasa (Monza et al., 2006).

2.7. ESTABLECIMIENTO DE SIMBIOSIS

La importancia de la FBN radica en que es responsable de la entrada a los ecosistemas terrestres de unas 250×10^6 toneladas de nitrógeno anuales, aporte esencial para la alimentación humana y animal (Monza y Palacios, 2004).

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. 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 expresión de los genes *nod* permite la producción de factores NOD específicos que pueden inducir la formación del nódulo (Skorupska et al., 2010). En la figura 3 se resume el proceso. El factor NOD induce la curvatura del pelo radical, por donde los rizobios penetran a la planta por 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 y el primordio se transforma en nódulo maduro, donde los bacteroides producen NH_3 a partir de N_2 (Maj et al., 2009).

Los bacteroides no tienen capacidad de división, cuando la planta muere los rizobios que están en los cordones de infección quedan libres en el suelo y pueden infectar otras raíces (Monza y Palacios, 2004).

2.8. FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO Y DIAZOTROFOS

La FBN es un proceso natural que contribuye con el 80% de la cantidad de nitrógeno fijado en la naturaleza, anualmente unas 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.

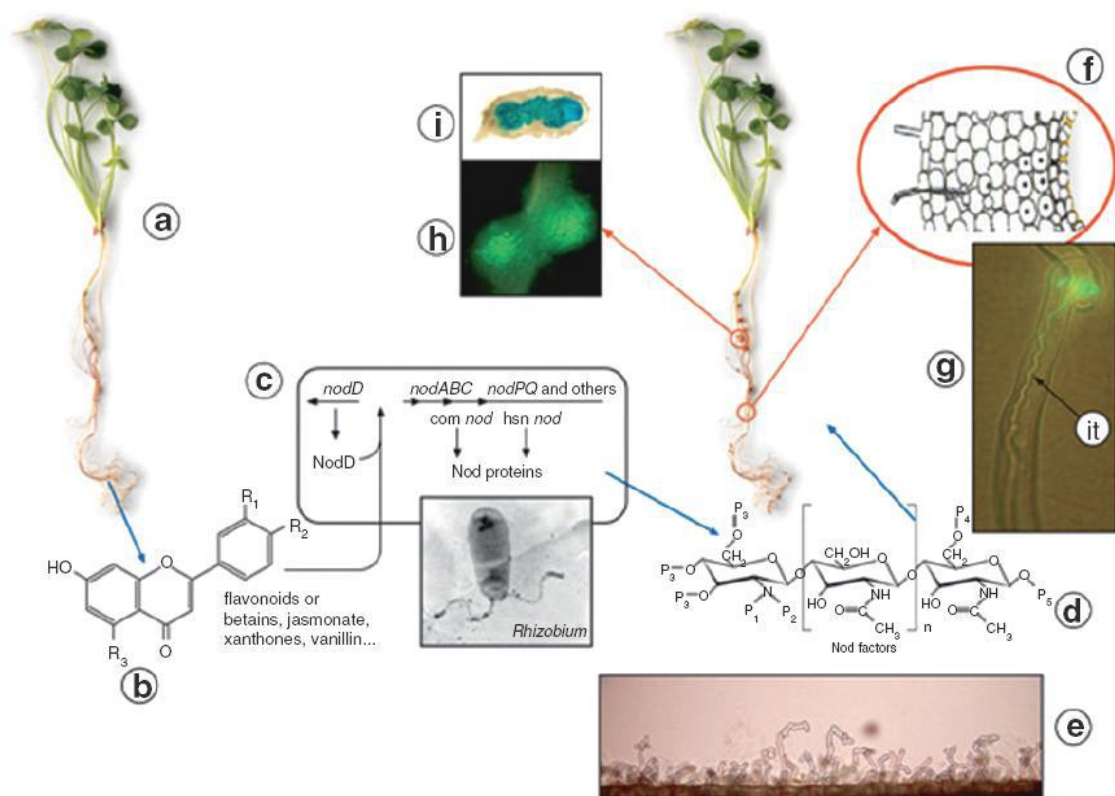


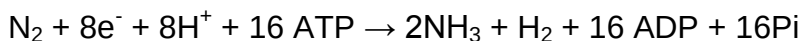
Figura 3. Eventos involucrados en la simbiosis rizobio - leguminosa. Las raíces de las leguminosas (a) exudan compuestos flavonoides (b) que son percibidos por los rizobios (c) y activan los genes *nod*. La expresión de estos genes produce los factores NOD (d) que intervienen en el curvamiento del pelo 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) (Fuente: tomado y modificado de Skorupska et al., 2010).

Los diazotrofos tienen distintas formas de vida, una que se conoce como vida libre en suelos y aguas y otra denominada simbiótica, que corresponda en general a las asociaciones a plantas.

Este grupo de procariotas tiene en común el complejo enzimático nitrogenasa compuesto básicamente por dos proteínas, la Fe-S (dinitrogenasa reductasa) codificada por el gen *nifH* y la Mo-Fe (dinitrogenasa) codificada por los genes *nifD*, *nifK*. Los requisitos de esta enzima son ATP y poder reductor (NAD(P)H o ferredoxina), que en las leguminosas genera el bacteroide a partir de la fuente carbonada suministrada por la planta, principalmente como malato

y succinato. El NH_4^+ producido se exporta a la planta a través de la membrana peribacteroidal y es asimilado en el citosol vegetal (Monza y Palacios, 2004).

El proceso de FBN implica un elevado costo de energía, debido a la estabilidad dada por el triple enlace de la molécula N_2 , dicha reacción estequiométrica se presenta a continuación (Taiz y Zeiger, 2010).



La enzima nitrogenasa es inactivada en presencia de O_2 , sin embargo los microorganismos han desarrollado diferentes estrategias de protección (Sanjuan y Olivares, 1991).

Los bacteroides requieren de O_2 para la generación de ATP, en tanto que la FBN es un proceso esencialmente anaerobio. Esta aparente paradoja se resuelve en la simbiosis de las especies de rizobios con las leguminosas a través de una regulación del flujo de O_2 mediante diferentes estrategias bioquímicas y fisiológicas generadas por la planta y la bacteria, que permiten mantener la condición microaerofílica que garantice la actividad nitrogenasa (Urzúa y Baca, 2001).

2.8.1. Factores y procesos que afectan la nodulación

La alta demanda de fotosintatos en los periodos de fijación de nitrógeno activa, puede ser muy elevada, siendo un alto porcentaje de los carbohidratos netos totales asimilados por la planta. Por esto los factores que afectan la tasa de fotosíntesis o la distribución de fotosintatos en la planta afectan significativamente la fijación de nitrógeno. Dichos factores pueden ser, biológicos, ambientales o nutricionales. Los factores biológicos de mayor importancia son los genéticos, los ambientales y nutricionales, generalmente afectan la fijación de nitrógeno debido a la variación de fotosintatos, pero algunos factores ambientales pueden afectar directamente la FBN (Havelka et al., 1982).

La FBN en leguminosas está fuertemente relacionada con el estado fisiológico de la planta huésped. La diversidad de los resultados de eficiencia simbiótica en diferentes condiciones ambientales descritos en la literatura (Aranjuelo et al., Gálvez et al., Purcell et al., Schulze, Serraj, citados por Aranjuelo et al., 2014) pone de manifiesto la complejidad de los nódulos. Los principales procesos que limitan el funcionamiento del nódulo son la disponibilidad de fuentes de carbono, acumulación de compuestos nitrogenados, permeabilidad de O_2 y la acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Aranjuelo et al., 2014).

También afectan el funcionamiento del nódulo la temperatura, contenido de agua, acidez, salinidad, concentración de nitrógeno combinado y déficit de fósforo, entre otros. Si bien en esta tesis se eliminan estos efectos para evaluar específicamente la cepa dada, se deberán realizar ensayos posteriores a nivel de campo.

2.9. CEPAS UTILIZADAS COMO INOCULANTES COMERCIALES

Clásicamente los inoculantes comerciales se desarrollaron a partir de cepas eficientes, es decir que en simbiosis con la leguminosa indujeran la mayor cantidad de biomasa, y que además fueran persistentes. El criterio de competitividad, si bien se sabía que era necesario el monitoreo en campo de la ocupación, no fue posible hasta hace unos 15 años. De esta forma, los inoculantes comerciales que se utilizan en Uruguay fueron desarrollados básicamente por su eficiencia.

El criterio de persistencia es discutible en algunos casos, y si bien en general es deseable que el rizobio utilizado como inoculante permanezca en el suelo en vida libre o en otra leguminosa cuando la planta huésped no está presente, no en todos los casos es deseable. En el caso de la cepa comercial de *L. corniculatus*, que es “parásita” en lotus Rincón y lotus Maku no constituye la persistencia una característica deseable. De todas formas en esa situación la inoculación con la cepa específica levanta este inconveniente (Dutto, 2002).

Una característica sin duda deseable de los inoculantes es que sean competitivos, de manera que si hay rizobios nativos en el suelo, la cepa utilizada como inoculante ocupe mayormente los nódulos. Muchas veces las cepas nativas o naturalizadas, bien adaptadas a las condiciones locales pero no necesariamente eficientes, son más competitivas que el inoculante comercial.¹

En las simbiosis eficientes se pueden observar nódulos poco numerosos, rosados, ubicados principalmente en la raíz primaria junto al cuello y de mayor tamaño que los que ocupan las raíces secundarias. Los nódulos presentes en grandes cantidades, de color blanco – verdoso, de tamaño pequeño y ubicados en todas las raíces por lo general son ineficientes.²

Existen otras características externas de las plantas que reflejan si la simbiosis se da eficientemente, como el buen desarrollo, vigorosidad y color verde típico. Dichas características fueron consideradas en el trabajo de tesis para poder estimar la eficiencia simbiótica de los híbridos y especies parentales inoculadas con las cepas utilizadas como inoculantes.

¹ Monza, J. 2016. Com. personal.

² Monza, J. 2015. Com. personal.

2.10. HIPÓTESIS

Las cepas de *Mesorhizobium* y *Bradyrhizobium* utilizadas como inoculantes comerciales para los parentales *L. uliginosus* y *L. corniculatus* pueden no tener la misma eficiencia simbiótica en los híbridos debido a diferente concentración de taninos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1. Material vegetal

Se utilizó *L. uliginosus* (4x) LE 205, *L. corniculatus* (4x) Draco y a los híbridos G1 y G5 obtenidos respectivamente de los cruzamientos de *L. uliginosus* x *L. corniculatus* y *L. corniculatus* x *L. uliginosus*. Las semillas fueron suministradas por la Ing. Agr. Mónica Rebuffo, INIA La Estanzuela (Colonia, Uruguay).

3.1.2. Microorganismos

Como inóculo se utilizó *Mesorhizobium* sp. cepa U226, inoculante comercial para *L. corniculatus* y *L. tenuis* y *Bradyrhizobium* sp. cepa U526, inoculante comercial para *L. uliginosus*. Las características de las cepas de rizobio se resumen en el cuadro 5.

Cuadro No. 5. Características de las cepas comerciales utilizadas Uruguay.

Designaciones de las cepas.	Origen	Plantas huésped
U226 (U510)	Australia	<i>L. corniculatus</i> <i>L. tenuis</i>
U526 (NZP2309)	Nueva Zelanda	<i>L. uliginosus</i>

Fuente: MGAP (2008).

3.2. CRECIMIENTO DE BACTERIAS Y PREPARACION DE INOCULOS

Los rizobios crecieron a 27°C en medio YEM (Yeast - Extract - Manitol, Vicent, 1970) líquido o solidificado con agar 1.5% (p/v) cuya composición se detalla en el cuadro 6. Para el crecimiento en medio líquido se utilizó agitación orbital a 180 rpm.

Los inóculos se crecieron en medio líquido hasta una DO_{600} entre 0.8 y 0.9, que corresponde aproximadamente a 10^8 UFC mL⁻¹, y se centrifugaron 30 mL a 6.000 rpm por 5 min. Las bacterias se lavaron con agua estéril y se re-suspendieron en 30 mL de agua estéril. Con 250 µL de esa suspensión se inocularon las plantas, a razón de 8 por maceta al momento de la siembra.

Cuadro No. 6. Composición del medio YEM.

Compuesto	Cantidad
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g
NaCl	0.1 g
Manitol	10 g
Extracto de levadura	1.0 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 L
pH	6.8 - 7.2

Fuente: Vincent (1970).

3.3. ESTERILIZACIÓN Y GERMINACIÓN DE SEMILLAS

Las semillas se escarificaron manualmente con lija de arena y se esterilizaron superficialmente mediante tratamiento con etanol 96 GL durante 1 min agitando manualmente, un lavado con agua estéril, NaClO 40 % (v/v) 2 min agitando manualmente y al menos cuatro enjuagues sucesivos con agua estéril.

Las semillas permanecieron en agua estéril al menos durante 1 h para que liberen taninos y germinaron en agar - agua 1% (p/v) estéril, a 27°C, hasta la emergencia de de 1 - 3 mm de radícula. En ese estado se sembraron a razón de 8 por maceta y después de 10 días se ralearon para dejar 4 plantas en cada una.

3.4. CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS EN CONDICIONES CONTROLADAS

Una vez germinadas las semillas se sembraron en macetas con arena y vermiculita lavadas con agua corriente durante 30 min. Las mezclas de 350 mL se llenaron con la arena: vermiculita en relación 1:1 y se esterilizaron en autoclave 120°C durante 20 min.

Las plantas permanecieron en cámara de crecimiento con una intensidad lumínica de 200 $\mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, fotoperiodo 16/8 h (luz/oscuridad), 25/18°C de temperatura y 50 - 60 % de humedad relativa.

Al momento de la siembra se regó con KNO₃ 2 mM y luego con agua estéril hasta el primer corte (45 días). A partir del primer corte se regó con agua estéril y se alternó con riegos con medio Rigaud y Puppo sin nitrógeno (Cuadro 7).

Cuadro No. 7. Composición del Medio Rigaud y Puppo.

Macroelementos	mg/L
KH_2PO_4	200
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	200
KCL	200
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	120
Na_2FeEDTA	25
$\text{Na}_2\text{MO}_4 : 2\text{H}_2\text{O}$	4
pH	6.8 - 7.2
Microelementos	mg/L
EDTA-Fe	25
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,11
H_3BO_3	2,85
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,2
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,55
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	3,07

Fuente: Rigaud y Puppo (1975).

3.5. DISEÑO Y TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Con cada uno de los cuatro genotipos vegetales ensayados (*L. uliginosus* LE 205, *L. corniculatus* Draco y los híbridos G1 y G5) se realizaron tres tratamientos, con cinco repeticiones cada uno, correspondientes a: inoculación con U226, con U526 y sin inocular (control).

Cada tratamiento tuvo 5 repeticiones, considerando como unidad experimental a la maceta. De esta forma se trabajó con 60 macetas con 4 plantas cada una. La distribución de los tratamientos se muestra en la figura 4.

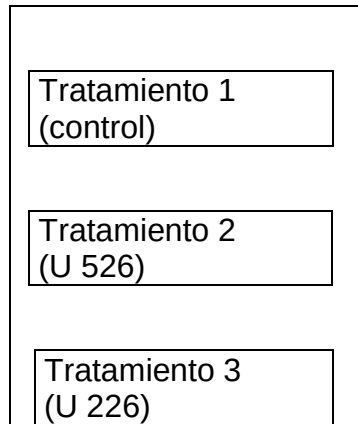


Figura 4. Esquema de distribución de tratamientos en cámara. Las macetas se rotaron para mitigar efectos de luz pero se mantuvo la ubicación de cada tratamiento para evitar contaminación.

3.6. ESTIMACIÓN DE LA BIOMASA PRODUCIDA

La biomasa de las plantas se determinó en dos cortes, a los 45 y 75 días después de la siembra. En cada corte la determinación de la biomasa se realizó sobre las mismas plantas y se expresó como peso seco de la parte aérea a partir de lo cortado a nivel del primer nudo. El peso seco se determinó en plantas secadas en estufa a 65°C durante 48 h.

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los tratamientos con las diferentes cepas fueron aplicados bajo un diseño completamente al azar con 5 repeticiones por tratamiento. Cada maceta corresponde a una repetición y en cada una de ellas había 4 plantas. La variable analizada fue la producción de biomasa aérea por planta promedio por maceta y se realizaron dos cortes a lo largo del ensayo.

La variable peso seco de la parte aérea se analizó a través del análisis de varianza (ANOVA). El modelo utilizado para dicho análisis es un modelo lineal general y mixto, el programa que se utilizó es InfoStat.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La generación de híbridos interespecíficos de *L. uliginosus* x *L. corniculatus* (híbrido G1) y el recíproco (híbrido G5), hizo necesario evaluar la eficiencia simbiótica de los inoculantes comerciales utilizados en los parentales. *L. uliginosus* se inocula con la cepa U526, un *Bradyrhizobium* sp. y *L. corniculatus* con la cepa U226 (U510), un *Mesorhizobium* sp., (Brockwell et al., 1994) que ha sido reasignado como *Mesorhizobium huakuii* (Batista et al., 2013). La evaluación de la eficiencia simbiótica de ambos híbridos y los parentales se realizó en condiciones controladas y se estimó como el peso seco de la biomasa aérea en dos cortes, a los 45 días después de la siembra (primer corte) y 30 días después del primero (segundo corte).

Cuando los parentales *L. uliginosus* y *L. corniculatus* y los híbridos G1 y G5 se inocularon con la cepa U526, la biomasa aérea producida en el primer corte fue la misma en los cuatro genotipos (figura 5). Sin embargo, cuando *L. corniculatus* y el híbrido G5 se inocularon con la cepa U226 produjeron más biomasa que *L. uliginosus* y que el híbrido G1, que produjeron igual a los respectivos controles sin inocular (figura 4). Los controles sin inocular de todos los genotipos no se diferenciaron en la producción de biomasa.

En el segundo corte (figura 6), realizado 30 días después del primero, el par simbiótico establecido entre la cepa U526 con *L. uliginosus* fue el que produjo más biomasa aérea respecto a las simbiosis establecidas con *L. corniculatus* y los híbridos G1 y G5. Por su parte, la cepa U226 estableció simbiosis más eficientes en *L. corniculatus* y en el híbrido G5 que en *L. uliginosus* y el híbrido G1, que produjeron la misma biomasa que el tratamiento sin inocular.

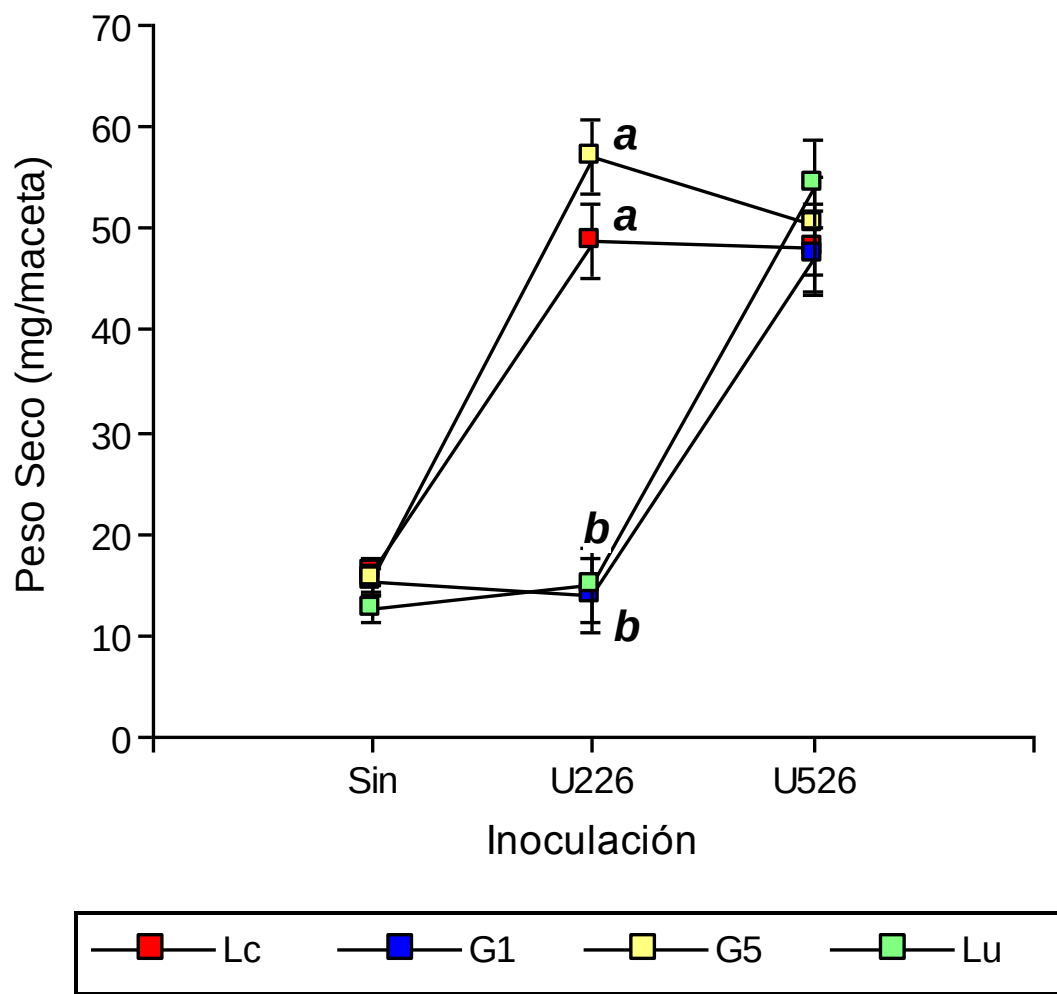


Figura 5. Biomasa de los híbridos y los parentales en el primer corte. Los híbridos G1 (madre *L. uliginosus*) y G5 (madre *L. corniculatus*) y los parentales *L. uliginosus* y *L. corniculatus*, se inocularon con las cepas U526 y U226 (U510), inoculantes comerciales para *L. uliginosus* y *L. corniculatus* respectivamente. Como controles se utilizaron los cuatro genotipos sin inocular. Las barras verticales representan el desvío estándar y las letras iguales corresponden a medias que no son significativamente diferentes ($p>0,005$).

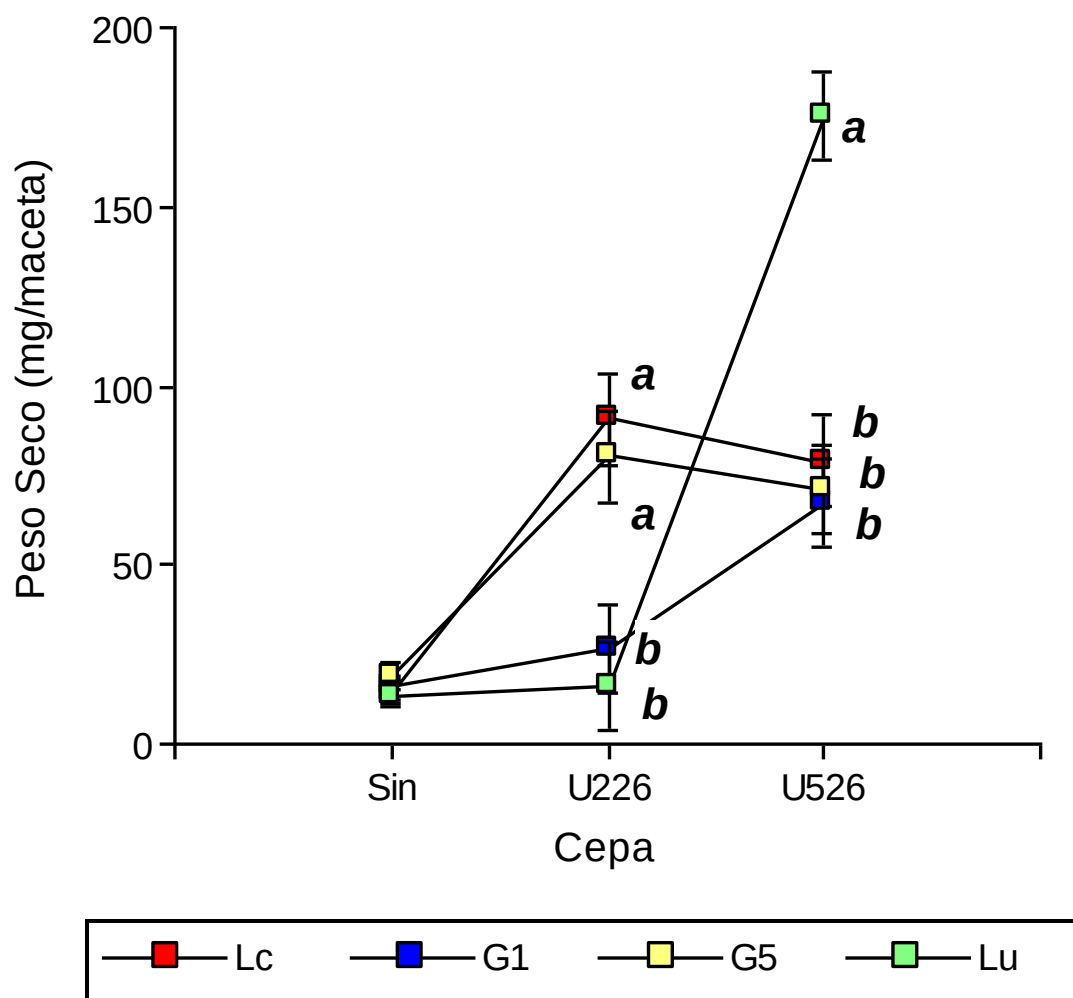


Figura 6. Biomasa de los híbridos y los parentales en el segundo corte. Los híbridos G1 (madre *L. uliginosus*) y G5 (madre *L. corniculatus*) y los parentales *L. uliginosus* y *L. corniculatus*, se inocularon con las cepas U526 y U226, inoculantes comerciales para *L. uliginosus* y *L. corniculatus* respectivamente. Como controles se utilizaron los cuatro genotipos sin inocular. Las barras verticales representan el desvío estándar y las letras iguales corresponden a medias que no son significativamente diferentes ($p>0,005$).

Los resultados obtenidos en los dos cortes, en las condiciones de ensayo definidas, evidencian que el híbrido G1 establece simbiosis más eficientes con la cepa U526 que con la cepa U226. La cepa U526 es el inoculante comercial para *L. uliginosus*, genotipo utilizado como madre en este

híbrido.³ Por otra parte, el híbrido G5, de madre *L. corniculatus*, establece simbiosis más eficientes con la cepa U226, el inoculante comercial utilizado en esa leguminosa.

De esta forma, el híbrido G5 tuvo la misma eficiencia simbiótica que la madre con ambos inoculantes, en los dos cortes, mientras que el híbrido G1 se comportó como la madre en el primer corte con ambas cepas, pero en el segundo corte *L. uliginosus* inoculado con la cepa U526 produjo más biomasa que los híbridos y *L. corniculatus*.

El establecimiento de la simbiosis rizobio - leguminosa y su eficiencia está determinada por el intercambio de señales entre ambas partes (Skorupska et al., 2010). En muchas situaciones la simbiosis entre una cepa y distintos hospederos muestra diferentes grados de eficiencia y capacidad de nodular (Dutto, 2002). Cuando se siembra lotus Rincón en campos con historia de *L. corniculatus*, se induce una relación ineficiente-parásita, con formación de seudonódulos en las raíces del primero. Estas estructuras son similares a los nódulos, de color rojo intenso, pero sus células no están ocupadas por bacteroides.⁴ Es probable que la producción de antocianinas por la planta, que le dan ese color rojo intenso a los seudonódulos, determine la muerte de las bacterias.

Los taninos son polifenoles que tienen diferentes funciones en las plantas, una de ellas es la de defensa frente a bacterias y hongos (Taiz y Zeiger, 1998). El hecho que la cepa U226 establezca simbiosis poco eficientes en *L. uliginosus* y con el híbrido G1 puede deberse a que tanto el parental como el híbrido tienen mayor concentración de compuestos fenólicos totales que *L. corniculatus*, la leguminosa que se inocula con esta cepa. El contenido total de polifenoles en *L. corniculatus* es del orden de 20% menor que la cantidad de estos compuestos en *L. uliginosus*.⁴ Por otra parte en el híbrido G5 la concentración de polifenoles es algo menor al híbrido G1³, lo que explicaría que este híbrido establezca una simbiosis más eficiente que G1 con la cepa U226 (figura 5).

La cepa U526 es un *Bradyrhizobium* sp. utilizado como inoculante comercial para *L. uliginosus* (Brockwell et al., 1994), leguminosa con mayor concentración de taninos que *L. corniculatus* (Otero y Hidalgo 2004, Varón et al. 2015). El hecho que la cepa U226 establezca simbiosis poco eficientes en *L. uliginosus* (figura 6) y con el híbrido G1 (madre *L. uliginosus*) puede ser consecuencia de la mayor concentración de compuestos fenólicos en estos genotipos respecto a *L. corniculatus*.

³ Castillo, A. 2016. Com. personal.

⁴ Monza, J. 2016. Com. personal.



Figura 7. *L. uliginosus* inoculado con la cepa U226 (U510) y el control sin inocular.

Los taninos condensados, además de ser una defensa de la planta frente a diferentes parásitos y de los animales que las ingieren para controlar parásitos gastrointestinales y meteorismo, también participan en la defensa frente a bacterias (Taiz y Zeiger, 1998). Por este motivo la concentración y tipo de taninos podrían afectar el establecimiento de simbiosis eficientes o la nodulación de las leguminosas.

La concentración de taninos en *L. uliginosus* se sitúa entre 6 y 7 % de la materia seca (Otero y Hidalgo, 2004) mientras que en *L. corniculatus* entre 0.25 y 2% (Varón et al., 2015). La concentración de taninos, determinada por la técnica de vainillina (Reyno, 2014) y equivalencia de ácido gálico³ en el cultivar de *L. uliginosus* utilizado en la generación de los híbridos G1 y G5 es mayor que en el cultivar de *L. corniculatus* utilizado para la generación de los mismos híbridos.

Los híbridos G1 y G5 se están evaluando en condiciones de campo en INIA La Estanzuela y Glencoe. Estos híbridos, que corresponden a la F3, fueron inoculados con *Bradyrhizobium* sp. U526 y mostraron una nodulación abundante (figura 8 A) con nódulos de color rosado que evidencian su estado funcional (figura 8 B). Estos nódulos pueden tener un doble origen, inoculante comercial o cepas nativas-naturalizadas presentes en esos suelos.



Figura 8. Nodulación de híbridos en campo. (A) Densidad y distribución de nódulos. (B) aspecto de un nódulo, en el que se observa la coloración de la leghemoglobina (Fuente: fotografía tomada por Reyno en 2016).

5. CONCLUSIONES

La cepa de *Bradyrhizobium* sp. U526 es eficiente en los híbridos G1 y G5, mientras que la cepa *Mesorhizobium huakuii* U226 (U510) es eficiente en el híbrido G5 pero no en el híbrido G1.

La menor eficiencia simbiótica del híbrido G1 con la cepa U226 (U510) puede deberse a la diferente concentración de taninos, mayor en *L. uliginosus* (madre del híbrido G1).

6. RESUMEN

La generación de híbridos interespecíficos de *Lotus uliginosus* x *L. corniculatus* (híbrido G1) y el recíproco (híbrido G5), hizo necesario evaluar la eficiencia simbiótica de los inoculantes comerciales utilizados en los parentales. *L. uliginosus* se inocula con la cepa U526 de, *Bradyrhizobium* sp. y *L. corniculatus* con la cepa U226 (U510) de, *Mesorhizobium* sp. La evaluación de la eficiencia simbiótica de los híbridos y los parentales se realizó en condiciones controladas y se estimó como el peso seco de la biomasa aérea en dos cortes, realizados a los 45 días después de la siembra (primer corte) y 30 días después del primero (segundo corte). Con cada uno de los cuatro genotipos ensayados (*L. uliginosus* LE 205, *L. corniculatus* INIA Draco y los híbridos G1 y G5) se realizaron tres tratamientos (inoculación con U226 (U510), inoculación con U526 y control sin inocular), con cinco repeticiones cada uno. El híbrido G5 se comportó igual a la madre con ambos inoculantes en ambos cortes, mientras que el híbrido G1 se comportó como la madre en el primer corte con las dos cepas, pero en el segundo corte *L. uliginosus* inoculado con la cepa U526 produjo más biomasa que los híbridos y que *L. corniculatus*. La nodulación con U226 (U510) fue ineficiente en *L. uliginosus* y G1; es probable que la cepa U226 que nodula eficientemente a *L. corniculatus* forme simbiosis ineficientes con *L. uliginosus* y el híbrido G1, cuya madre es *L. uliginosus*, debido a la mayor concentración de compuestos polifenólicos en estas leguminosas.

Palabras clave: Híbridos interespecíficos; *Mesorhizobium*; *Bradyrhizobium*.

7. SUMMARY

The generation of interspecific hybrids *L. uliginosus* x *L. corniculatus* (hybrid G1) and the reciprocal (hybrid G5), made necessary to evaluate the symbiotic efficiency of commercial inoculants used in parental materials. *L. uliginosus* is inoculated with the strain U526 of *Bradyrhizobium* sp. and *L. corniculatus* with strain U226 (U510) of, *Mesorhizobium* sp. The assessment of the symbiotic efficiency of hybrids and parental was performed under controlled conditions and was estimated as the dry weight of the aboveground biomass in two cuts, made 45 days after sowing (first cut) and 30 days after first (second cut). Three treatments (inoculation with U226 (U510), inoculation with U526 and uninoculated control) were performed for each of the four tested genotypes (*L. uliginosus* LE 205, *L. corniculatus* INIA Draco and hybrid G1 and G5), with five replicates each. The G5 hybrid behaved like the mother with both inoculants in both cuts, while the hybrid G1 behaved like the mother in the first cut with the two strains, but in the second cut *L. uliginosus* inoculated with the strain U526 produced more biomass than the hybrids and *L. corniculatus*. The nodulation with U226 was inefficient for *L. uliginosus* and G1; it is likely that the strain U226 that efficiently nodulates *L. corniculatus* forms inefficient symbiosis with *L. uliginosus* and hybrid G1, whose mother is *L. uliginosus*, due to the higher concentration of polyphenol compounds in these legumes.

Keywords: Interspecific hybrids; *Mesorhizobium*; *Bradyrhizobium*.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Aranjuelo, I.; Molero, G.; Arresse-Igor, C. 2014. Nodule performance within a changin environmental context. *Journal of Plant Physiology*. 171 (12): 1076-1090.
2. Ayala, W.; Carámbula, M. 2009. El valor agronómico del género *Lotus*. Montevideo, INIA. 424 p.
3. Baraibar, A.; Frioni, L.; Guedes, M.; Ljunggjen, H. 1999. Symbiotic efectiveness and ecological characterization of indigenous *Rhizobium loti* population in Uruguay. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*. 34:1001-1017.
4. Barrientos, L.; Higuera, M.; 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 (Chile)*. 62:226-236.
5. Batista, L. 2013. Prospección y caracterización de rizobios para el desarrollo de inoculantes para trébol y lotus. Tesis Magister. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía 115 p.
6. Briskin, D.P.; Bloom, A. 2010. Assimilation of mineral nutrients. In: Taiz, L.; Zeiger, E. eds. *Plant physiology*. 15th. ed. Sunderland, Massachusetts, Sinauer. cap. 12, pp. 354-358.
7. Brockwell, J.; Hebb, D.; Kelman, W. 1994. Simbio Taxonomy of *Lotus* Species and symbiotically related plants and of their root nodule bacteria. In: International Lotus Symposium (1st., 1994, Columbia, MO). *Proceedings*. Columbia, University of Missouri- Columbia. pp. 30-35.
8. Carámbula, M.; Ayala, W.; Carriquiry, E. 1994. *Lotus pedunculatus*, adelantos de una leguminosa que promete. Montevideo, INIA. 14 p. (Serie Técnica no. 45).

9. Castillo, A.; Rebuffo, M.; Dalla Rizza, M.; Folle, G.; Santiñaque, F.; Borsani, O.; Monza, J. 2012. Generation and characterization of interespecific hybrids of *Lotus uliginosus* x *Lotus corniculatus*. Crop Science. 52:1572-1582
10. Castillo, A. 2012. Generación de híbridos interespecíficos de *L. uliginosus* x *L. corniculatus* y evaluación de la respuesta a déficit hídrico. Tesis Doctorado. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 119 p.
11. Date, R. 2000. Inoculated legumes in cropping systems of the tropics. Field Crops Research. 65: 123-136.
12. Dervin, D. 2015 Importancia de las leguminosas en la alimentación de rumiantes. (en línea). s.n.t. s.p. Consultado 10 jul. 2016. Disponible en <http://www.engormix.com/MA-ganaderia-leche/articulos/importancia-leguminosas-alimentacion-rumiantes-t7547/p0.htm>
13. Díaz, L.; García, J.; Rebuffo, M. 1996. Crecimiento de leguminosas en la Estanzuela. Montevideo, INIA. 12 p. (Serie Técnica no. 71).
14. Díaz, P.; Borsani, O.; Monza, J. 2005. *Lotus japonicus* related species and their agronomy importance. In: Márquez, A. ed. Lotus handbook. Dordrecht, Springer-Verlag. pp. 25-37.
15. Di Rienzo, J. A.; Casanoves, F.; Balzarini, M. G.; Gonzalez, L.; Tablada, M.; Robledo, C. W. 2016. InfoStat versión 2016. Córdoba, Universidad Nacional de Córdoba. FCA. Grupo InfoStat. s.p. Consultado 9 oct. 2016. Disponible en <http://www.infostat.com.ar>
16. Dixon, R.; Paiva, N. L. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. The Plant Cell. 7:1085-1097.
17. Dutto, P. 2002. Recomendaciones para situaciones con problema en la inoculación de leguminosas. Revista del Plan Agropecuario. no.102: 54-57.
18. Escaray, F.; Passeri, V.; Babuin, M.; Marco, F.; Carrasco, P.; Damiani, F.; Pieckenstein, F.; Paolocci, F.; Ruiz, O. 2014. *Lotus tenuis* x *L. corniculatus* interspecific hybridization as a means to breed bloat-safe pastures and gain insight into the genetic control of

proanthocyanidin biosynthesis in legumes. (en línea). BMC Plant Biology. 14: 3-18 Consultado 7 oct. 2016. Disponible en <http://bmcplantbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2229-14-40>

- 19.FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). 2003. Perfiles por país del recurso pastura/forraje. Roma. 31 p.
- 20.Formoso, F. 1996. Bases morfológicas y fisiológicas del manejo de pasturas. In: Risso, D. F.; Berretta, E. J.; Morón, A. eds. Producción y manejo de pasturas. Montevideo, INIA. pp. 1-19 (Serie Técnica no. 80).
- 21.Grant, W. 1995. A chromosome atlas and interespecific-intergeneric index for *Lotus* and *tetragonobulus* (Fabacea). Journal of Botany. Canadian. 37:1787-1809.
- 22.Gwynne, D.; Beckett, R. 1980. The response of *Lotus uliginosus* L. grown on hill soils to inoculation with *Rhizobium*. Grass and Forage. 35:213-217.
- 23.Hardanson, G.; Golbs, M.; Danso, S. 1989. Nitrogen fixation in soybean (*Glycine max* L. Merrill) as affected by nodulation patterns. Soil Biology Biochemistry. 21:783-787.
- 24.Havelka, U.; Boyle, M.; Hardy, R. 1982. Biological nitrogen fixation. In: Stevenson, F. ed. Nitrogen in agricultural soils. Madison, WI, ASA/CSSA/SSSA. pp. 365-422 (Agronomy monograph no. 22)
- 25.Hernández, S.; Rebuffo, M.; Labandera, C. 2005. Evaluación de la interacción genotipo ambiente en *Lotus uliginosus* en cilindro de suelos. Lotus Newsletter. 35:120-130.
- 26.INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, UY). 1999. Resultados experimentales de evaluación de cultivares; especies forrajeras. Parte II, bianuales y perennes. Montevideo. 62 p.
- 27.Labandera, C.; Jaurena, M.; Biassini, G.; Maio, V. 2005. Inoculación de *Lotus Makú*. Revista del Plan Agropecuario. no. 157:44-46.

28. _____. 2007. Actividades en fijación biológica de nitrógeno: situación actual y perspectivas en Uruguay. In: Izaguirre-Mayoral, M.; Labandera, C.; Sanjuán, J. eds. Biofertilizantes en Iberoamericana una visión técnica, científica y empresarial. Montevideo, Uruguay, Lage y Cía. pp. 1-4.
29. Laguerre, G.; Nour, SM.; 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.
30. Madigan, M.; Martiko, J.; Parker, J. 2004. Brock; biología de los microorganismos. 10^a ed. Madrid, Prentice-Hall. pp. 675-677.
31. 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.
32. Mallarino, A.; Wedin, W.; Goyenola, R.; Perdomo, C.; West, C. 1990. Legume species and proportion effects on symbiotic dinitrogen fixation legume-grass mixtures. Agronomy Journal. 82:785-790.
33. MGAP (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, UY). 2008. Colección nacional de cepas *Rhizobium* spp. Montevideo. s.p.
34. _____. DIEA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección de Investigaciones Estadísticas Agropecuarias, UY). 2015a. Anuario estadístico agropecuario uruguayo. 18^a ed. Montevideo. 215 p.
35. _____. _____. 2015b. Censo 2011; producción vegetal en el agro uruguayo. Montevideo. 146 p.
36. Min, B.; Barry, T.; Attwood, G.; McNabb, W. 2003. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages; a review. Animal Feed Science and Technology. 106 (1-4): 3-19.
37. Montossi, F. 1995. El valor nutricional de los taninos condensados en el género *Lotus*. In: Risso, D. F.; Berretta, E. J.; Morón, A. eds.

Producción y manejo de pasturas. Montevideo, INIA. pp. 107-111 (Serie Técnica no. 80).

38. Monza J.; Palacios J. 2004. Fijación biológica de nitrógeno en la simbiosis rizobio-leguminosa. In: Monza, J.; Márquez, A. eds. El metabolismo del nitrógeno en las plantas. Córdoba, Almuzara estudios. pp. 15-38.
39. _____.; Irrisarri, P.; Diaz, P. 2006. Denitrification ability of rhizobial strains isolated from *Lotus sp.* Antonie Van Leeuwenhoek. 89:479-484.
40. Niezen, J.; Waghorn, T.; Charleston, W.; Waghorn, G. 1995. Growth and gastrointestinal nematode parasitism in lambs grazing either lucerne (*Medicago Sativa*) or sulla (*Hedysarum Coronarium*) which contains condensed tannins. Journal of Agricultural Science. 125 (2): 281-289.
41. Otero, M.; Hidalgo, L. 2004. Taninos condensados en especies forrajeras de clima templado; efectos sobre la productividad de rumiantes afectados por parasitosis gastrointestinales. Livestock Research for Rural Development. 16 (2): s.p.
42. Pankhurst, C.; Jones, W. 1979. Effectiveness of Lotus root nodules. Journal of Experimental Botany. 30 (119): 1095-1107.
43. Perdomo, C.; Barbazán, M. 2008. Nitrógeno. Montevideo, Facultad de Agronomía. 70 p.
44. Pritsch, O. 1992. Comportamiento varietal en producción de semillas de algunas forrajeras. Revista del Plan Agropecuario. no. 58:15-21.
45. Rebuffo, M. 1998. *Lotus corniculatus* INIA Draco; característica agronómicas. In: Curso de Actualización (1998, Soriano). Avances en pasturas sembradas. Montevideo, Facultad de Agronomía. s.p.
46. Reyno, R. 2014. Nuevos enfoques del mejoramiento genético en especies del género *Lotus*. Montevideo, INIA. pp. 15-16.
47. Rigaud J.; Puppo A. 1975. Indole-3-acetic catabolism by soybean bacteroids. Journal of General Microbiology. 88: 223-228.

48. Sanjuán, J.; Olivares, J. 1991. Regulacion de la fijación biológica de nitrógeno. In: Olivares, J.; Barea, J. eds. Fijación y movilización biológica de nutrientes. Madrid, CSIC. pp. 19-29.
49. _____; Rebuffo, M. eds. 2010. LOTASSA; bridging genomics and pastures in the XXI century. Montevideo, IICA. PROCISUR. cap. 6, pp. 55-59.
50. Seane, R.; Henson, P. 1970. Birdsfoot trefoil. *Advances in Agronomy*. 22:119-157.
51. Skorupska, A.; Wielbo, J.; Kidaj, D.; Marek-Kozaczuk, M. 2010. Enhancing Rhizobium legume symbiosis using signaling factors. In: Khan, M. S.; Zaidi, A.; Musarrat, J. eds. Microbes for legume improvement. New York, Springer-Verlag. cap. 2, pp. 27-43.
52. 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.
53. Steinfeld, H.; Gerber, P.; Wassenaar, T.; Castel, V.; Rosales, M.; Haan, C. 2007. Livestock's long shadow environmental issues and options. (en línea). In: Methane to Markets Partnership Expo (2007, Beijing). Presentations. Rome, FAO. AGA. pp. 1-27. Consultado 1 ago. 2016. Disponible en https://www.globalmethane.org/expo-docs/china07/postexpo/ag_gerber.pdf
54. Taiz, L.; Zeiger, E. 1998. Plant physiology. 2nd. ed. Sunderland, Massachusetts, Sinauer. pp. 365-367.
55. 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.
56. Toresani, S.; Bodrero, M.; Enrico, J. 2007. Comportamientos de inoculantes para soja en la zona sur de la provincia de Santa Fe. *Revista de investigaciones de Facultad de Ciencias Agrarias*. 11:35:44.

57. Urzúa, L.; Baca, B. 2001. Mecanismos de protección de la nitrogenasa a la inactivación por oxígeno. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 43:37-49.
58. Varón, L.; Moreno, J.; Forero, S. 2015. Comportamiento agronómico, nutricional y contenidos de taninos de la leguminosa *Lotus corniculatus* como efecto de la fertilidad del suelo. *Revista Ciencia Animal*. 9:189-208.
59. Vincent, J. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. Oxford, Blackwell. pp. 6-7 (IBP Handbook no. 15).
60. Waghorn, C.; Shelton, I. 1997. Effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* on the nutritive value of pasture for sheep. *Journal of Agricultural Science (Cambridge)*. 128:365-372.
61. Zanoniani, R.; Ducamp, F. 2004. Leguminosas forrajeras del género *Lotus* en Uruguay. Facultad de Agronomía (Montevideo). Nota técnica no. 25. pp. 5-11.