

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**EVALUACIÓN DE RIZOBIOS PARA EL DESARROLLO DE UN
INOCULANTE EFICIENTE Y COMPETITIVO DE
*Trifolium repens***

por

Pamela GUTIÉRREZ SENA

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

MONTEVIDEO
URUGUAY
abril 2017

Tesis aprobada por el tribunal integrado por MPhil. Mónica Rebuffo, Dra. Elena Fabiano, y Dr. Juan Sanjuán, el 4 de mayo de 2017. Autora: Lic. Pamela Gutiérrez. Director Dr. Jorge Monza, Co-directora Dra. Pilar Irisarri.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por permitirme este gran paso y hacerlo posible. A toda mi familia que siempre me ha estado acompañando en este camino. A mi tutor Jorge Monza por enseñarme, por su incansable ayuda y acompañarme hasta el final. A mi cotutora Pilar Irisarri, por estar siempre dispuesta y darme una mano. A Mónica Rebuffo por toda su ayuda y disposición que ha sido indispensable para salir adelante con los análisis estadísticos. A Gerónimo Cardozo (INIA Treinta y Tres) y Rafael Reyno (INIA Tacuarembó) por los ensayos realizados en campo y por su ayuda en todo momento. A Jorge Franco por el asesoramiento en análisis estadísticos. En especial a todos los compañeros del Laboratorio de Bioquímica por su gran disposición y ayuda incondicional, Ornella Sabatini, Nicolás Novoa, Fernando Armesto, Ismael Núñez, Carolina Tartaglia, Manuel Diez, Maite Apesetche, Belén Cuadrado, Pedro Silva, Martha Sainz, Mariana Sotelo, Esteban Casaretto, Omar Borsani, Pedro Díaz, Santiago Signorelli, Cecilia González y a los compañeros del Laboratorio de Microbiología.

Agradezco a la Beca CAP y al Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) por el apoyo financiero.

TABLA DE CONTENIDO

	página
PÁGINA DE APROBACIÓN	II
AGRADECIMIENTOS	III
RESUMEN.....	VII
SUMMARY	VIII
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>.....	1
1.1. INCORPORACIÓN DEL NITRÓGENO A LOS ECOSISTEMAS.....	1
1.2. FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO.....	2
1.3. CARACTERÍSTICAS TAXONÓMICAS DE LOS RIZOBIOS.....	4
1.4. FORMACIÓN DE NÓDULOS	5
1.5. USO DE LEGUMINOSAS PARA MEJORAMIENTO DE SUELOS.....	7
1.6. ESTRATEGIAS PARA EVALUAR LA COMPETITIVIDAD	8
1.7. INTERACCIÓN DE LEGUMINOSAS CON RIZOBIOS	
INEFICIENTES O PARÁSITOS	12
1.7.1. <u>Detección de cepas ineficientes por las leguminosas.....</u>	13
1.8. NECESIDAD DE DESARROLLO DE INOCULANTES PARA	
TRÉBOL.....	17
1.9. OBJETIVOS.....	20
2. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	21
2.1. MATERIAL VEGETAL.....	21
2.1.1. <u>Desinfección y germinación de semillas.....</u>	21
2.1.2. <u>Desinfección y conservación de nódulos ...</u>.....	21
2.1.3. <u>Crecimiento de plantas en condiciones controladas.....</u>	21
2.1.4. <u>Crecimiento de plantas en campo.....</u>	22
2.2. BACTERIAS.....	23
2.2.1. <u>Rizobios</u>	23
2.2.2. <u>Escherichia coli</u>.....	25
2.2.3. <u>Crecimiento y conservación de bacterias.....</u>	26

2.2.4. <u>Aislamiento de rizobios de nódulos</u>	26
2.2.5. <u>Preparación de inóculos</u>	27
2.2.6. <u>Coinoculación</u>	27
2.2.7. <u>Recuento de rizobios sobre semillas</u>	27
2.2.8. <u>Recuento de rizobios en inoculante en turba</u>	28
2.2.9. <u>Determinación del número de rizobios en suelo</u>	28
2.2.10. <u>Eficiencia simbiótica en macetas</u>	29
2.3. EXTRACCIÓN, AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE ADN	29
2.3.1. <u>Extracción de ADN</u>	29
2.3.2. <u>Amplificación con cebadores ERIC y resolución de perfiles</u>	29
2.3.3. <u>Amplificación y secuenciación del 16S ARNr</u>	30
2.4. EVALUACIÓN DE LA COMPETITIVIDAD CON EL GEN <i>GUSA</i>	31
2.4.1. <u>Competitividad de las cepas en condiciones controladas</u>	31
2.4.1.1. Marcaje con <i>gusA</i> y actividad glucuronidasa en nódulo	31
2.4.1.2. Nodulación inducida por los clones y las cepas parentales.....	32
2.4.1.3. Preparación de inoculantes en turba	32
2.4.2. <u>Competitividad de las cepas en diferentes suelos</u>	33
2.5. MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA DE NÓDULOS	33
2.6. EVALUACIÓN DE LAS CEPAS PROMISORIAS EN CAMPO	34
2.6.1. <u>Implantación y producción de biomasa</u>	34
2.6.2. <u>Determinación del nitrógeno proveniente de la fijación</u>	34
2.6.3. <u>Ocupación de nódulos</u>	35
3. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	36
3.1. SELECCIÓN DE CEPAS EFICIENTES EN TRÉBOL BLANCO	36
3.2. MARCAJE DE CEPAS PARA EVALUAR LA COMPETITIVIDAD POR LA NODULACIÓN	37
3.3. COMPETITIVIDAD DE LAS CEPAS EN SUELOS PROBLEMA	38
3.4. COMPETITIVIDAD EN CONDICIONES DE CAMPO	46
3.4.1. <u>Experimento 1: evaluación en campo de la cepa 317</u>	47

3.4.2. <u>Experimento 2: evaluación en campo de las cepas N2, 249 y 317</u>	50
3.4.2.1. NMP de rizobios que nodulan trébol blanco en los suelos.....	51
3.4.2.2. Implantación de trébol blanco con los diferentes inoculantes...	52
3.4.2.3. Producción de biomasa y ocupación de nódulos.....	54
3.5. CARACTERIZACIÓN DE AISLAMIENTOS DE TRÉBOL	
POLIMORFO	61
3.5.1. <u>Identificación de aislamientos por perfiles ERIC</u>	61
3.5.2. <u>Eficiencia simbiótica de aislamientos de trébol polimorfo</u>	62
3.5.3. <u>Nodulación por cepas ineficientes aisladas de trébol polimorfo</u>	65
3.5.4. <u>Secuencia del 16S ARNr</u>	66
3.5.5. <u>Competitividad de la cepa P3 con cepas eficientes en trébol</u> <u>blanco</u>	68
3.5.6. <u>Anatomía de nódulos de trébol blanco inducidos por cepas</u> <u>ineficientes aisladas de trébol polimorfo</u>	70
4. <u>CONCLUSIONES</u>	73
5. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	74
6. <u>ANEXOS</u>	94
6.1. ANEXO I	94
6.1.1. <u>Medios de cultivo y protocolos experimentales</u>	94
6.2. ANEXO II	98
6.2.1. <u>Ejemplos representativos de análisis de clúster del Experimento 1</u> <u>(2014)</u>	98

RESUMEN

El trébol blanco presenta dificultades de implantación y producción en algunos suelos. Tres cepas de rizobios nativas eficientes se seleccionaron por su competitividad en 5 suelos. Las cepas seleccionadas se evaluaron en dos campos, uno en Glencoe (INIA Tacuarembó) y otro en la UEPP (Unidad Experimental de Palo a Pique, INIA Treinta y Tres). La implantación en Glencoe fue mayor cuando se inoculó con las cepas nativas N2 y 249. La producción en la UEPP fue mayor con U204 y N2, aunque U204 sólo ocupó el 30 % de los nódulos. En Glencoe la cepa 317 produjo más forraje a los 12 meses, pero todas produjeron más biomasa que el control sin inocular y con la cepa U204 que ocupó el 42 % de los nódulos. Las cepas nativas N2, 249 y 317 ocuparon entre el 47 % y el 96 % de los nódulos de estolones, por lo que fueron más persistentes en los suelos que la cepa U204. No se encontraron diferencias en la proporción de nitrógeno fijado entre los tratamientos de la UEPP y de Glencoe. Los valores obtenidos de fijación biológica de nitrógeno oscilaron entre 60 y 97 %. La competitividad estimada con las cepas marcadas con el gen *gusA*, en el conjunto de los suelos, confirmó que la cepa U204 es poco competitiva. Los aislamientos de rizobios de trébol polimorfo evidenciaron un patrón biogeográfico, dado que la mayoría de las cepas agrupan según su origen edáfico. La producción de trébol blanco inoculado con aislamientos de trébol polimorfo evidenció que aproximadamente el 50 % de las cepas establecen relaciones ineficientes o parásitas y el otro 50 % establece simbiosis de eficiencia intermedia. El inoculante comercial para tréboles fue ineficiente en trébol polimorfo. Los resultados evidenciaron una relación inversa entre el número de nódulos y la producción de biomasa de trébol polimorfo. La secuencia del gen 16S ARNr de las cepas P3 y P18 tiene 100 % de similitud con diferentes cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, entre ellas U204, 317 y N2. La estructura microscópica de los nódulos inducidos por P3 en trébol blanco mostró que estaban vacíos y los inducidos por P18 una senescencia acelerada.

Palabras clave: inoculantes, competitividad, *Rhizobium leguminosarum*

Evaluation of rhizobia for the development of an efficient and competitive inoculant of *Trifolium repens*

SUMMARY

White clover presents implantation and production problems in some soils. In this work, three efficient native rhizobia strains were selected to test their competitiveness in 5 different soils. The selected strains were evaluated in two fields, Glencoe and UEPP. In Glencoe, white clover implantation was higher when it was inoculated with N2 and 249 strains. Production in the UEPP was higher with U204 and N2, although U204 only occupied 30 % of the nodules. In Glencoe, differences in production were found at 12 months. The highest production was with strain 317, but all produced more biomass than the uninoculated control and strain U204 which occupied 42 % of the nodules. The native strains N2, 249 and 317 occupied between 47 % and 96 % of the stolon nodules, so they were more persistent in the soils than the U204 strain. No differences were found in the % of nitrogen fixed between treatments of the UEPP and Glencoe. The values of BNF ranged from 60 to 97 %. The competitiveness estimated with the strains marked with the gene *gusA*, for all the soils tested, confirmed that the U204 strain is uncompetitive. The polymorphous clover rhizobia isolates showed a biogeographic pattern, since most of the strains group according to their edaphic origin. The production of white clover inoculated with polymorphous clover isolates shows that approximately 50 % of the strains establish inefficient or parasitic relationships and the other 50 % establish symbiosis of intermediate efficiency. The commercial inoculant for clovers was inefficient in polymorphous clover. The results showed an inverse relationship between the number of nodules and the production of polymorphous clover biomass. The sequence of the 16S rRNA gene of the strains P3 and P18 has 100 % similarity with different strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* including U204, 317 and N2. The microscopic structure of the nodules induced by P3 showed that they were empty, and those induced by P18 appeared early senescence.

Key words: inoculants, competitiveness, *Rhizobium leguminosarum*

1. INTRODUCCIÓN

1.1. INCORPORACIÓN DEL NITRÓGENO A LOS ECOSISTEMAS

En las plantas la deficiencia de N provoca la aparición de clorosis y reduce su productividad y vigor (Wiedenhoeft, 2006), dado que forma parte de aminoácidos, ácidos nucleicos y clorofilas entre otras moléculas, por lo que a menudo es un nutriente limitante. Menos del 2 % del N se encuentra en el suelo como amonio, nitratos y nitritos, por lo que muchas veces es necesario emplear fertilizantes nitrogenados para aumentar la producción agrícola.

La producción de amoníaco para producir fertilizantes se realiza mediante fijación industrial por el proceso de Haber-Bosch, a través del cual se incorporan en los suelos aproximadamente 70 millones de toneladas de N/año (Rojas, 2011), lo que constituye aproximadamente el 25 % del total de N fijado anualmente (Stougaard, 2000). Este proceso requiere temperaturas del orden de 500 °C y 300 atm de presión, lo que implica el uso de instalaciones especiales y de combustibles (85 L de gas y 2 L de petróleo para obtener un kg de amoníaco) y catalizadores inorgánicos, lo que tiene un alto costo de producción.

Los fertilizantes nitrogenados son muy solubles en agua y del 100 % que se aplica al suelo solo el 50 % es aprovechado por las plantas, el resto se escurre y puede contaminar los cursos de agua. Por otra parte, en los suelos agrícolas a partir del N agregado como fertilizante se producen emisiones de gases con efecto invernadero como NO y N₂O (Iannetta *et al.*, 2016).

Como alternativa a la fijación industrial del N, se encuentra la fijación biológica del N (FBN), que mediante diferentes aproximaciones se ha demostrado que es la responsable de la incorporación de entre 50 a 400 kg de N/ha/año. Esto permite disminuir el uso de fertilizantes sintéticos como la urea, y contribuye al equilibrio ecológico de los suelos (Cayo y Rojas, 2006).

1.2. FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO

La enzima nitrogenasa es la responsable de la reducción del N₂ a NH₄⁺, que ocurre según la siguiente reacción:



Esta enzima está presente sólo en procariotas, que se encuentran en vida libre o asociados a plantas de diferentes maneras. Una de las asociaciones más estudiadas es la que ocurre entre bacterias llamadas colectivamente rizobios y raíces y/o tallos de las leguminosas. En esas plantas las bacterias inducen el desarrollo de nódulos, en los cuales se transforman en bacteroides, donde ocurre la reducción del N₂ (Hirsch *et al.*, 2001).

La nitrogenasa demanda grandes cantidades de energía y poder reductor, por lo que su síntesis y actividad se encuentran finamente reguladas (Izquierdo y Nusslein, 2006). El complejo enzimático nitrogenasa consta de dos subunidades, una molibdofero-proteína (FeMo) de 250 KDa codificada por los genes *nifD* y *nifK* y una ferroproteína (Fe) de 70 kDa formada por dos subunidades idénticas codificadas por el gen *nifH* (Zehr *et al.*, 2003). La expresión de los genes de la nitrogenasa está regulada principalmente por la presencia de NH₃ en el medio, que puede reprimir la transcripción de los genes que la codifican (Frioni, 2006).

La nitrogenasa, además de catalizar la reacción de reducción del N₂, cataliza la reducción de otras moléculas que contienen triples enlaces, como el acetileno (C₂H₂) a etileno (C₂H₄) (Yang *et al.*, 2011). Esta característica es utilizada para determinar su actividad, a través de un ensayo que se conoce como actividad reductora de acetileno (ARA). La ARA permite estimar la FBN mediante cromatografía de gases a través de la detección y cuantificación de etileno (Hardy *et al.*, 1968). La principal limitación de este ensayo reside en que es una aproximación indirecta de la capacidad de fijar N en un momento dado, y no da información sobre la capacidad de fijarlo a lo largo del tiempo de cultivo (Anderson *et al.*, 2004; Minchin *et al.*, 1983). A pesar de esto, se utiliza frecuentemente por su rapidez, sencillez y bajo costo

(Vessey, 1994), tanto en condiciones de laboratorio como de campo (Zablotowicz y Reddy, 2007) para tener una aproximación al potencial fijador, con las limitaciones mencionadas que hay que considerar.

Otra forma de estimar la FBN es mediante el uso de isótopos estables del nitrógeno (^{14}N y ^{15}N) que presentan diferencias cuantitativas en la atmósfera y diferente masa molecular y energías de activación. Esta técnica tiene como ventaja el hecho de que estos isótopos se encuentran presentes en forma natural, y su distribución y abundancia varían en plantas y suelos. La abundancia natural de ^{15}N en el aire es muy estable y constituye en éste el 0,3663 % (Mariotti, 1983), con una variación de $\pm 0,0004$ % (Axmann y Zapata, 1990).

En el ensayo de dilución isotópica de ^{15}N , las plantas fijadoras y no fijadoras son crecidas en suelos o sustratos enriquecidos con ^{15}N previo a la siembra mediante fertilización con urea, amonio o nitrato. Las bacterias fijadoras de nitrógeno diluyen el ^{15}N tomado del suelo en relación a plantas no fijadoras, debido a que la FBN utiliza el ^{14}N derivado del N atmosférico (99,6337 %). La diferencia del contenido en ^{15}N en sus tejidos se utiliza para estimar el N fijado (Unkovich y Pate, 2000). Las dificultades principales de aplicar esta metodología incluye el alto costo del fertilizante enriquecido, la pérdida de éste en el suelo en corto tiempo y su distribución no uniforme, además de la contaminación cruzada (Witty y Ritz, 1984).

Otra forma de estimar la FBN es a través de la abundancia basada en el enriquecimiento natural de ^{15}N (δ) de los suelos, en relación a su abundancia en atmósfera ($\delta^{15}\text{N}=0$ ‰) (Unkovich y Pate, 2000). En las gramíneas la composición isotópica de N depende del suelo, por lo que el $\delta^{15}\text{N}$ refleja la composición isotópica de éste, más los fraccionamientos isotópicos que ocurren en la planta. En las leguminosas noduladas la composición isotópica de N está determinada por el suelo y el aire. Si la leguminosa no fija N su composición isotópica está determinada por el valor $\delta^{15}\text{N}$ del aire (0 ‰) y los fraccionamientos isotópicos de N que ocurren a nivel de la planta. Esta situación es igual a lo que ocurre en las gramíneas, en el supuesto

que las especies en cuestión tengan un ciclo vegetativo similar y absorban N de la misma zona del suelo (Louis *et al.*, 2005).

La ventaja principal de esta aproximación es que no es necesario añadir una fuente enriquecida con ^{15}N (Unkovich y Pate, 2000) y que permite, al igual que la técnica de enriquecimiento isotópico, estimar el N incorporado durante todo el período.

Varios estudios han utilizado los métodos isotópicos para estimar la FBN en condiciones de campo con leguminosas forrajeras (Schwenke *et al.*, 1998; Unkovich *et al.*, 1998; Peoples *et al.*, 1996; Sanford *et al.*, 1995; Hogh-Jensen y Schjørring, 1994) y con la leguminosa de grano soja (Di Ciocco *et al.*, 2013; Song *et al.*, 1995), entre otras.

1.3. CARACTERÍSTICAS TAXONÓMICAS DE LOS RIZOBIOS

Los rizobios son bacilos gram negativos, heterótrofos y aerobios, móviles debido a flagelos peritricos y polares. Cuando se transforman en bacteroides adoptan una forma pleomórfica (Stanier *et al.*, 1996).

Los rizobios pertenecen a un grupo diverso de α y β proteobacteria que comprenden diferentes familias que están presentes en el entorno de 10^3 y 10^6 rizobios/g de suelo, puede representar hasta el 0,1 % de los microorganismos cultivables totales de suelo que contiene en el entorno 10^9 microorganismos/g (Thies *et al.*, 1991).

Hasta el momento se han descrito 98 especies de rizobios pertenecientes a 13 géneros (Cuadro 1). Actualmente, la taxonomía de los rizobios se basa en un enfoque polifásico que incluye características morfológicas, bioquímicas, fisiológicas, genéticas y filogenéticas, entre otras (Weir, 2016).

Cuadro 1. Taxonomía de los rizobios (Weir, 2016).

Clase	Familia	Géneros
α-proteobacteria	<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Rhizobium</i> , <i>Sinorhizobium/Ensifer</i> , <i>Shinella</i>
	<i>Bradyrhizobiaceae</i>	<i>Bradyrhizobium</i>
	<i>Hypomicrobiaceae</i>	<i>Azorhizobium</i> , <i>Devosia</i>
	<i>Phyllobacteriaceae</i>	<i>Mesorhizobium</i> , <i>Phyllobacterium</i>
	<i>Brucellaceae</i>	<i>Ochrobactrum</i>
	<i>Methylobacteriaceae</i>	<i>Methylobacterium</i> , <i>Microvirga</i>
β-proteobacteria	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Burkholderia</i> , <i>Cupriavidus</i>

1.4. FORMACIÓN DE NÓDULOS

Muchas de las especies de rizobios interactúan solo con una o pocas especies de leguminosas, mientras que otras lo hacen con un amplio rango de hospederos (Ferguson *et al.*, 2010).

Las bacterias pueden entrar a las plantas a través del daño epidérmico lo que corresponde a un modo ancestral de infección. Esta forma de ingreso se da en un número limitado de leguminosas, una de ellas el maní. La forma de infección común a la mayoría de las leguminosas ocurre a través de una interacción compleja entre la planta y la bacteria que comienza con la adhesión del rizobio a la punta del pelo radicular, induciendo la curvatura de éste. Seguidamente se genera un hilo de infección que permite colonizar a las células del parénquima cortical, lo que conduce a la formación del nódulo (Ferguson *et al.*, 2010).

Las plantas exudan flavonoides por el sistema radicular y a concentraciones del orden nM provocan quimiotaxis activa de los rizobios que se desplazan hacia la superficie radical. A concentraciones del orden μM estos flavonoides inducen la expresión de los genes responsables de la nodulación (*nod*). Estos genes codifican los factores Nod (FNs) que secretados inducen distintas respuestas en la raíz. Las plantas reconocen los FNs (lipoquitoligosacáridos) por receptores de tipo quinasas (NFRs) que se encuentran en la membrana de las células epidérmicas de la raíz (Oldroyd *et al.*, 2011). Una cascada de señalización a nivel molecular induce la expresión génica y la organogénesis del nódulo, para lo cual se activa el ciclo celular en células corticales de la raíz que comienzan a proliferar formando el primordio del nódulo (Kouchi *et al.*, 2010). Los hilos de infección, donde se reproducen los rizobios, alcanzan el primordio y en sus células los rizobios son liberados al citoplasma rodeados por la membrana peribacteroidea (MPB) formando los simbiosomas (Wang *et al.*, 2012) dentro de los cuales los rizobios se diferencian en bacteroides (Kouchi *et al.*, 2010).

La secuencia de la división celular inducida por los rizobios y la invasión celular varía en las diferentes leguminosas, y esto tiene consecuencias sobre la morfogénesis de nódulo, lo que da lugar a los nódulos determinados o indeterminados (Brewin, 1991). Los nódulos determinados se encuentran mayormente en las leguminosas tropicales, mientras que los nódulos indeterminados son característicos de legumbres templadas.

En los nódulos determinados la actividad del meristemo se restringe a las primeras etapas del desarrollo y los nódulos maduros de forma esférica, no tienen meristemo persistente. En contraste, los nódulos indeterminados tienen forma alargada y meristemo persistente en el extremo apical, incluso después de la maduración completa, como los de trébol.

En los nódulos indeterminados los hilos de infección permanecen en el nódulo y liberan de forma continua las bacterias (Kouchi *et al.*, 2010). En este tipo de nódulos en estado maduro se distingue: zona I, meristema; zona II de infección, interzona II-

III caracterizada por amiloplastos acumulados en sus células; la zona III donde los bacteroides fijan N y la zona IV senescente (Figura 1).

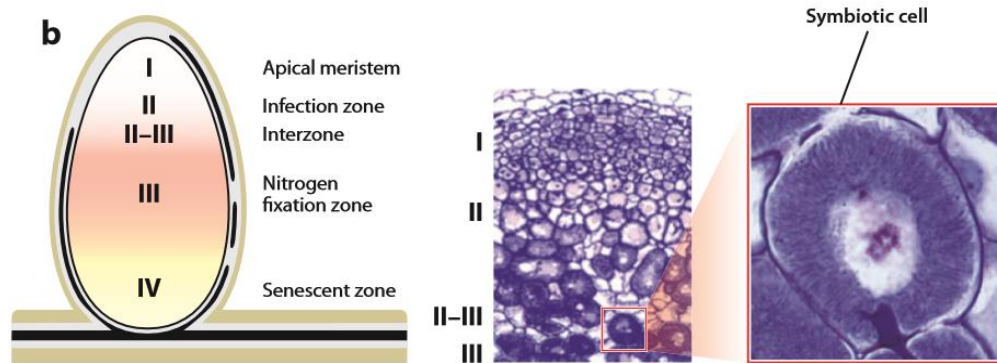


Figura 1. Estructura del nódulo indeterminado. En la zona I se encuentra el meristemo apical. Las células vegetales infectadas se diferencian a lo largo de múltiples capas de células de la zona II. En la zona III ocurre la FBN en los bacteroides. La FBN disminuye en las células viejas, que senescen y forman la zona IV. Tomado de Kondorosi *et al.* (2013).

Estudios enfocados a la evaluación de la interacción específica que se da entre las plantas y los rizobios, indican que ésta puede deberse a variaciones en los factores Nod, receptores NFRs de las plantas, exopolisacáridos (EPS), lipopolisacáridos (LPS), polisacáridos capsulares (KPS), β -glucanos cíclicos, patrones moleculares asociados a microbios/patógenos (MAMPs/PAMPs), proteínas efectoras del sistema de secreción T3SS de bacterias y de determinantes relacionados a las respuestas inmunes tanto en la leguminosa como en los simbioses (Glyan'ko *et al.*, 2015; Gourion *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2012).

1.5. USO DE LEGUMINOSAS PARA MEJORAMIENTO DE SUELOS

El uso de leguminosas en pasturas y para el mejoramiento del suelo se remonta a los romanos en el año 37 a.C., señalando que "las legumbres se deben plantar en suelos ligeros, no tanto para sus propios cultivos sino para el bien que hacen a los cultivos subsiguientes" (Graham y Vance, 2003). Las leguminosas forrajeras además de su valor nutritivo, contribuyen a la sostenibilidad de la rotación, reducen la erosión,

requieren bajas aplicaciones de pesticidas y herbicidas, bajos requerimientos de fertilización, mejoran la estructura del suelo, pueden ser cultivadas en ambientes marginales y aumentan la materia orgánica incrementando la rentabilidad agrícola (Rebuffo *et al.*, 2006). Su aporte a la fertilidad de los suelos hace que sean extensamente utilizadas en programas de mejoramiento de suelos a nivel internacional.

Los tréboles son leguminosas perennes, aunque pueden comportarse como anuales, bienales o de vida corta, de ciclo invernal y su mayor producción se registra en primavera (Carámbula, 2003). Sin embargo, pueden ser utilizadas a lo largo de todo el año, ya sea alimentando a los animales a través del pastoreo o como ensilaje o forraje (Dewhurst *et al.*, 2009). Además se adaptan mejor a suelos de textura media a pesados, fértiles y húmedos, sin embargo no tolera suelos superficiales, y son sensibles a sequía (Carámbula, 2003; Langer, 1981).

Trifolium pratense (trébol rojo) y *Trifolium repens* (trébol blanco) tienen un alto contenido de proteínas, que reduce el riesgo de acidosis, y cuando se combinan con forraje como hierbas perennes o ensilado de maíz proveen una dieta adecuada para los animales (Dewhurst *et al.*, 2009). El trébol blanco es una especie estolonífera nativa de Europa, Eurasia, Oriente Medio y Norte de África, que ha sido introducida como especie cultivada en muchos países del mundo (Annicchiarico y Carelli, 2014), incluyendo Uruguay, para su uso en el mejoramiento de suelos y praderas (Rebuffo *et al.*, 2006).

1.6. ESTRATEGIAS PARA EVALUAR LA COMPETITIVIDAD

Los inoculantes rizobianos comenzaron a comercializarse en el 1930 (Datta *et al.*, 2015) y desde entonces la inoculación de distintas leguminosas en diferentes países ha mostrado en general resultados ventajosos. Sin embargo también se han comunicado situaciones en las que el inoculante no produjo respuestas beneficiosas (Schumpp y Deakin, 2010; Alves *et al.*, 2003; Denton *et al.*, 2002; López-García *et al.*, 2002; Date, 2000; Brockwell y Bottomley, 1995; Berg *et al.*, 1988).

Batista *et al.* (2015) realizaron ensayos de inoculación de trébol rojo en distintos suelos de Uruguay. Sus resultados confirman que la cepa usada como inoculante comercial U204 de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*, cepa introducida utilizada para trébol blanco y rojo, es poco competitiva y persistente en suelos con altas poblaciones de rizobios nativos que nodulan trébol rojo, resultando en una disminución de la eficacia del inoculante comercial.

Por su parte Sotelo *et al.* (2011) también denotan fracasos frecuentes de la inoculación debido al uso del inoculante comercial U510 usado para *Lotus corniculatus* en Uruguay. Sus estudios sugieren que estos problemas pueden deberse a la falta de competitividad y adaptabilidad de la cepa introducida, dado que no ocupó nódulos obtenidos de diversos campos con distintas poblaciones de rizobios.

Los inoculantes se formulan en base a rizobios seleccionados para cada especie de leguminosa, pero su performance varía según la microflora nativa de cada suelo, que frecuentemente se encuentra mejor adaptada a las condiciones bióticas y abióticas (Bashan *et al.*, 2014). Por esto, las cepas de rizobios seleccionadas para su uso como inoculantes no solo deben ser eficientes en la fijación de nitrógeno, sino también ser capaces de competir con cepas nativas (Batista *et al.*, 2015; Rodríguez Blanco *et al.*, 2010; Schumpp y Deakin, 2010; Janczarek *et al.*, 2009; Laguerre *et al.*, 2003; Brockwell y Bottomley, 1995). De esta forma es recomendable evaluar la competitividad de las cepas como un requisito para desarrollar inoculantes comerciales, para lo que es necesario identificar a las cepas con precisión mediante técnicas que permitan el análisis de una cantidad elevada de muestras.

Para evaluar la competitividad de rizobios se utilizan distintas metodologías, o combinaciones de ellas. Hasta la década de los 90' se usaron técnicas fenotípicas para reconocer a las bacterias y evaluar así su competitividad, mientras que los métodos genotípicos se usaron principalmente para análisis de diversidad y filogenia de los microorganismos. Desde que los métodos genotípicos se han vuelto más sencillos y accesibles económicamente, se han podido realizar estudios de competitividad

mediante el análisis de muchas cepas, lo que contribuye a considerar este criterio en el desarrollo de inoculantes comerciales.

Los métodos fenotípicos más usados para la identificación de rizobios son la resistencia a antibióticos (Alexandre *et al.*, 2006), análisis serológico (Thies *et al.*, 2001; Fabiano y Arias, 1991), producción de melanina (Rodríguez Blanco *et al.*, 2010) y perfil de proteínas totales (Irisarri *et al.*, 1996; Zahran *et al.*, 1994).

Por otra parte, los métodos genotípicos son más precisos que los fenotípicos para detectar e identificar microorganismos y permiten analizar con precisión un alto número de muestras en poco tiempo. Además se puede analizar la variabilidad del genoma completo de la bacteria, de plásmidos o de genes específicos.

Los métodos basados en el ADN o en la amplificación del ADN por la técnica de la PCR (*Polymerase Chain Reaction*) proporcionan lo que se considera huellas genéticas (*fingerprints*) adecuadas para la tipificación de cepas de rizobios (Castro y Ferreira, 2006). Dentro de éstos se encuentran los métodos de análisis de perfiles de restricción, en los que el ADN es digerido con enzimas de restricción y los fragmentos son separados y visualizados por electroforesis (Irisarri *et al.*, 1996). El inconveniente de esta estrategia es la dificultad que se genera para analizar estos perfiles con numerosos fragmentos. Los métodos más utilizados, que se basan en el empleo de enzimas de restricción para generar *fingerprints*, son el RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) y el ARDRA (*Amplified rDNA restriction analysis*, (Zhang *et al.*, 2016; Batista *et al.*, 2015; Grange y Hungria, 2004; Laguerre *et al.*, 2003; Laguerre *et al.*, 1996). También se han generado *fingerprints* a través del perfil plasmídico para tipificar rizobios de *Lotus corniculatus* (Monza *et al.*, 1992), *L. subbiflorus* (Irisarri *et al.*, 1996) y *Pisum sativum* (Corich *et al.*, 2001). Este método, aunque está limitado al análisis de elementos extracromosómicos, ha sido usado en el *screening* de los rizobios que contienen plásmidos, con número y tamaño variable (Corich *et al.*, 2001) cuyo ADN puede representar aproximadamente el 40 % de su genoma (Barreto *et al.*, 2012).

También se generan *fingerprints* a partir de las secuencias rep, elementos repetitivos presentes en muchas copias en el genoma bacteriano. El uso de cebadores complementarios a estas secuencias permite la amplificación de los fragmentos de ADN que se encuentran entre las secuencias rep, los productos de PCR tienen distintos tamaños lo que produce un patrón de bandas característico de cada cepa (Versalovic *et al.*, 1991; Stern *et al.*, 1984). Entre las secuencias utilizadas para identificar rizobios se encuentran los elementos REP (*Repetitive extragenic palindromic*) de 35 a 40 pb, ERIC (*Enterobacterial repetitive intergenic consensus*) de 124 a 127 pb y BOX (*Box element*) de 154 pb (Versalovic *et al.*, 1994; De Bruijn, 1992; Versalovic *et al.*, 1991). Mediante el uso de *primers* específicos REP, ERIC, BOX y GTG₅-PCR se pueden identificar cepas de rizobios (Batista *et al.*, 2015; Mauchline *et al.*, 2014; Batista *et al.*, 2013; Nangul *et al.*, 2013; Rodríguez Blanco *et al.*, 2010; Yates *et al.*, 2005; Denton *et al.*, 2002; Svenning *et al.*, 2001). Las técnicas rep-PCR tienen como ventaja el ser simples y tener un costo relativamente bajo, lo que permite evaluar un número alto de cepas.

Por otro lado, también se ha usado en la identificación de rizobios por *fingerprints* la técnica RAPD (*Randomly amplified polymorphic DNA*) (Simon y Salava, 2006; Moschetti *et al.*, 2005; Corich *et al.*, 2001), que consiste en el uso de un único oligonucleótido de 10 pb de una secuencia arbitraria para producir amplicones de tamaño y localización aleatorios y diferentes en cada genoma (Williams *et al.*, 1990).

Otra forma de evaluar la competitividad es mediante el uso de genes delatores como *gusA*, *lacZ*, GFP, *phoA*, *celB*, *luxAB*, (Wilson *et al.*, 1999; Sessitsch *et al.*, 1998). En particular el gen *gusA*, que codifica para la enzima β glucuronidasa (Jefferson *et al.*, 1987) se ha utilizado para evaluar la ocupación de nódulos (Batista *et al.*, 2015; Janczarek *et al.*, 2009; Denton *et al.*, 2003; Diouf *et al.*, 2000). Según el propósito, el gen *gusA* puede estar bajo el control de un promotor inducible, como lo es el promotor *nifH* que es activado por la proteína *nifA* (Sessitsch *et al.*, 1998), o de un promotor de expresión constitutiva (Wilson *et al.*, 1995). Los rizobios pueden ser transformados con relativa facilidad por conjugación biparental, usando como donadora a *E. coli* PCAM130 y PCAM131 (Wilson *et al.*, 1995). Los rizobios que

adquieren el trasposón se vuelven azules en presencia del sustrato de la enzima, el X-gluc (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-glucurónido). El gen *gusA* es un gen delator apropiado para estudios de competencia rizobiana porque las cepas marcadas se pueden detectar dentro de los nódulos, con la ventaja de que en general en plantas y rizobios no hay actividad GUS natural (Wilson *et al.*, 1995).

Esta estrategia es sencilla y elimina el tiempo de recolección de nódulos, aislamiento y purificación de cepas, extracción de ADN, amplificación y resolución de perfiles en geles, lo que hace posible analizar un gran número de nódulos a la vez (Sessitsch *et al.*, 1998). A pesar de las ventajas del uso de genes delatores como *gusA*, las cepas transformadas son consideradas organismos genéticamente modificados (OGM) y no pueden ser utilizadas en ensayos en condiciones de campo.

1.7. INTERACCIÓN DE LEGUMINOSAS CON RIZOBIOS INEFICIENTES O PARÁSITOS

Desde hace décadas se ha puesto en evidencia que las leguminosas pueden distinguir entre cepas efectivas e inefectivas (Jones y Hardarson, 1979). Cuando los rizobios inefectivos son detectados de alguna forma por la planta, pueden no llegar a generar la infección, que aborta durante la formación de los canales de infección, la ontogenia del nódulo, la diferenciación y maduración del bacteroide, o en la etapa de fijación de nitrógeno (Schumpp y Deakin, 2010; Gamas *et al.*, 1998; Vasse *et al.*, 1993).

Hay evidencias de que las leguminosas son noduladas preferencialmente con simbioses efectivos, lo que se ha propuesto denominar nodulación selectiva (Howieson *et al.*, 2005). Sin embargo, también se ha reportado extensamente la nodulación de leguminosas con simbioses inefectivos en condiciones de laboratorio y frecuentemente en campo (Melino *et al.*, 2012; Drew y Ballard, 2010; Reeve *et al.*, 2010a; Howieson *et al.*, 2005; Yates *et al.*, 2005; Ballard *et al.*, 2004; Yates *et al.*, 2003; Denton *et al.*, 2000; Pryor *et al.*, 1998; Sadowsky y Graham, 1998).

Yates *et al.* (2005) evaluaron varias cepas de rizobios con tréboles de distintos tipos y orígenes, y concluyeron que pocas cepas de rizobios tienen la capacidad de nodular efectivamente a tréboles anuales y perennes. La regulación genética de la compatibilidad para la FBN aún no está clara, y no se sabe por qué cepas de rizobios ineficientes infectan frecuentemente especies de trébol (Melino *et al.*, 2012). A su vez, Howieson *et al.* (2005) en condiciones de invernáculo testearon 38 cepas de rizobios obtenidas de 38 genotipos distintos de tréboles anuales y perennes y observaron que menos del 7,5 % de las simbiosis en tréboles perennes fueron efectivas, mientras que el 40 % fueron efectivas para tréboles anuales de origen mediterráneo. Estos resultados revelan la falta de simbiosis efectivas, sobre todo en tréboles perennes.

Si bien se ha comunicado en muchos trabajos la baja eficiencia de inoculantes debido a la presencia de la microflora nativa competitiva, también se ha reportado baja eficiencia debido a la presencia de cepas introducidas para diferentes especies de leguminosas. Esta situación problema surge a menudo cuando se usan tréboles perennes y anuales en la agricultura (Yates *et al.*, 2003; Dutto, 2002; Patrick y Lowther, 1995; Thornton y Davey, 1983). Particularmente en Uruguay (Dutto, 2002) ocurren problemas de este tipo cuando se siembra *Trifolium vesiculosum* (trébol vesiculoso, anual) en chacras donde previamente se sembró trébol blanco (perenne), debido a la presencia remanente de la cepa U204, inoculante comercial para trébol blanco. En este caso las plantas de trébol vesiculoso quedan de un color amarillo-rojizo y la falta de N determina la muerte de la mayoría de las plantas (Dutto, 2002).

1.7.1. Detección de cepas ineficientes por las leguminosas

Yates *et al.* (2003) describieron 4 tipos posibles de interacción entre los rizobios y las leguminosas: 1) no hay interacción simbiótica, por lo que no hay nodulación; 2) hay interacción inefectiva o de parasitismo en la cual se forman nódulos o protuberancias parecidas a nódulos que no fijan N; 3) hay una interacción parcialmente efectiva y se establece la simbiosis con fijación de N entre 20-75 % de la biomasa obtenida en

relación a un control con N y 4) hay interacción efectiva donde las plantas noduladas producen más del 75 % de la biomasa producida por un control suplementado con N.

La detección tardía de los rizobios ineficientes, indica que de algún modo éstos pueden evadir o superar las respuestas de defensa de las plantas. Los mecanismos de inmunidad de las plantas se basan en el reconocimiento de MAMPs (Patrones moleculares asociados a microbios) como lo es la flagelina 22 que activa la inmunidad de la planta y que reduce la habilidad de los rizobios para establecer la simbiosis, e interfieren con la organogénesis del nódulo (López-Gómez *et al.*, 2011). Los MAMPs también se han denominado patrones moleculares asociados a patógenos, PAMPs (Patrones moleculares asociados a patógenos). Las plantas pueden detectar proteínas secretadas por microbios conocidas como proteínas efectoras derivadas del sistema de secreción tipo III (T3SS) (Zipfel, 2014; Jones *et al.*, 2008), lo que en varias ocasiones determina el rango de hospedero (Gourion *et al.*, 2015).

Uno de los principales mecanismos de defensas de las plantas implica el ataque a las bacterias por especies reactivas del oxígeno (ROS) y eventualmente por especies reactivas del N (RNS), tanto al inicio de la infección como durante la ontogenia del nódulo. En los últimos años se ha determinado que éstas moléculas también son necesarias para una nodulación efectiva (Gourion *et al.*, 2015; Ribeiro *et al.*, 2015; Toth y Stacey, 2015; Cárdenas *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2001).

Otra forma de defensa de las plantas implica la producción de hidrolasas ácidas debido a la falla en el intercambio de metabolitos entre la planta y el rizobio con posterior acidificación del interior del bacteroide. Este mecanismo puede culminar con la muerte de simbiosomas o senescencia de nódulos. Las plantas también se defienden limitando el suplemento de carbono a los bacteroides no fijadores o a nódulos enteros, o el suplemento de O₂ al nódulo (Kiers *et al.*, 2006; Kiers *et al.*, 2003; Denison, 2000).

Las bacterias a su vez se protegen del ataque por ROS produciendo enzimas tales como superóxido dismutasa, glutatión S-transferasa y catalasa (Jamet *et al.*, 2007;

Ramu *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2001; Sigaud *et al.*, 1999). El aumento de la actividad de estas enzimas puede ser imprescindible para el establecimiento y mantenimiento de la simbiosis (Jamet *et al.*, 2007).

También se ha reportado que los EPS (exopolisacáridos) suprimen respuestas de defensas de las plantas (Aslam *et al.*, 2008), por quelar Ca^{+2} que constituye una señal celular importante para la activación de los mecanismos de inmunidad de las plantas.

Melino *et al.* (2012) demostraron que el desarrollo de nódulos subóptimos está relacionado con una senescencia temprana de bacteroides funcionales, mientras que nódulos vegetativos inefectivos están asociados a la falla en la endocitosis de bacterias desde los canales de infección. Por otro lado, el fenotipo nódulo diferenciado pero inefectivo es el resultado de una baja cantidad de bacteroides que fallaron al diferenciarse resultando en una reducción de la función nodular.

Por su parte Schumpp y Deakin (2010) sugieren que los rizobios ineficientes tienen distintos mecanismos para prolongar su persistencia dentro de los nódulos, que aún son desconocidos. La figura 2 resume distintos tipos de infección con rizobios ineficientes en relación a una simbiosis eficiente. En a), en presencia de simbiosis compatibles los nódulos desarrollan un color rojo; en la fase M0-M1 fijan altas cantidades de N durante varias semanas y en la fase M2 se produce la senescencia natural. En nódulos indeterminados la principal causa es el desbalance oxidativo, posteriormente las células indiferenciadas son liberadas a la rizósfera donde reestablecen la vida libre saprofítica, fase M3. b) En interacciones con simbiosis irregulares, con baja compatibilidad, se da una fijación de nitrógeno ineficiente, en la fase M0 se dan infecciones crónicas y las bacterias persisten dentro de los nódulos durante varios meses, eventualmente resultan en nódulos grandes y rojos o rosados. c) Ocurre una senescencia temprana que puede ser causada por estrés abiótico dificultando la fijación de nitrógeno en la fase M0-M1. Durante las fases M1 y M2 se liberan las bacterias de los nódulos del mismo modo que en la senescencia natural. d) La interacción con rizobios defectuosos genéticamente resulta en una senescencia temprana, sin fijación de N en la fase M0. Los rizobios son incapaces de establecer

una infección crónica (ej. mutantes de *BacA* de *S. meliloti*). e) En otros casos se dan interacciones que culminan en la formación de nódulos jóvenes activos en la fase M0, pero repentinamente se vuelven necróticos en la fase M1.

En los últimos años han adquirido importancia los estudios del por qué en el campo es tan frecuente la simbiosis con rizobios ineficientes. En este sentido se invierten los esfuerzos para dilucidar los mecanismos o características que les permiten a estas cepas infectar a las plantas, ser competitivas y persistir en los nódulos. Los estudios de compatibilidad y competitividad de rizobios permitirán obtener una performance mejor de los inoculantes en el campo.

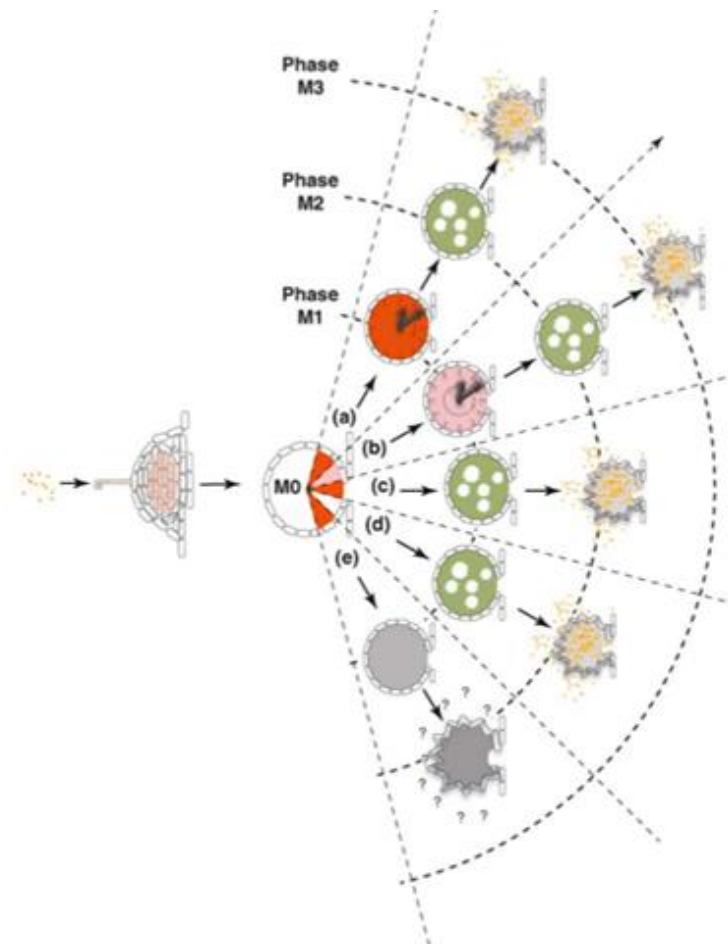


Figura 2. Tipos de infección por rizobios eficientes e ineficientes. En a) muestra la simbiosis con rizobios compatibles, la FBN es activa y perdura en el tiempo; en b) se representan interacciones con simbiotes con baja compatibilidad, la FBN es

ineficiente pero perdura en el tiempo; c) en algunos casos la FBN es activa pero se da senescencia temprana por factores externos, que dificulta la FBN; d) la interacción con rizobios ineficientes resulta en una senescencia temprana, sin FBN; e) en este caso se observa FBN activa, pero los nódulos repentinamente se vuelven necróticos. Tomado de Schumpp y Deakin (2010).

1.8. NECESIDAD DE DESARROLLO DE INOCULANTES PARA TRÉBOL

Desde 1930 a 1960 se introdujeron exitosamente especies de leguminosas en nuestro país, incluyendo *Trifolium repens* L., *Trifolium pratense* L. y *Lotus corniculatus* L. (Labandera, 2005). Actualmente estas leguminosas son las más usadas para el mejoramiento de praderas. En particular, los tréboles, tienen un destacado aporte de forraje en sistemas intensivos lecheros y ganaderos (Díaz Lago *et al.*, 1996) y se utilizan mayormente como integrantes de mezclas complejas de praderas, aunque también se realizan siembras puras consorciadas con cereales de invierno o raigrás (Ayala *et al.*, 2010). La inclusión del trébol blanco en las pasturas templadas y subtropicales, se basa principalmente en el aporte que realiza al sistema la FBN (Labandera, 2005).

En las leguminosas forrajeras existe una relación muy estrecha entre la producción de materia seca y la cantidad total de nitrógeno fijado. En nuestro país, por cada tonelada de materia seca producida por la leguminosa, se fijan aproximadamente 30 kg de nitrógeno (Labandera, 2005). A pesar de esto, el área total de mejoramientos forrajeros viene disminuyendo desde el año 2007/2008 en un 13 % hacia el año 2014/2015, alcanzando en 2014/2015 un área total estimada en 2.342.049 de ha en todo el territorio (DIEA, 2016).

Tanto el trébol blanco como el trébol rojo se inoculan desde 1962 con la misma cepa de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*, introducida de Estados Unidos, designada inicialmente como U-28 y actualmente en la colección del MGAP como U-204 (Nitragin, USA). Uruguay tiene una posición destacada en la producción y uso de

inoculantes rizobianos, sin embargo hay dos problemas actuales que deben considerarse. Uno es el abandono progresivo de la práctica de inocular, porque los agricultores no siempre visualizan el beneficio esperado de la inoculación, y el otro es el desplazamiento de explotaciones ganaderas a zonas marginales por la expansión del área agrícola (DIEA, 2010; DIEA, 2007).

Las encuestas realizadas por Acosta *et al.* (2008) en el marco del Proyecto Ampliación de la Base Genética de Leguminosas Forrajeras Naturalizadas para Sistemas Pastoriles Sustentables (FONTAGRO), han puesto en evidencia que el 52 % de los productores no inocula trébol blanco y el 22 % no inocula trébol rojo, probablemente debido a no encontrar los resultados esperados de la inoculación. En cuanto al segundo problema, actualmente en las zonas del Centro y Norte del país, la ganadería extensiva basada en la producción de carne vacuna, ovina y lana, utiliza las comunidades de pasturas naturales como la principal alimentación del ganado (Mónica Rebuffo, comunicación personal, 15 febrero 2014).

Los tréboles en Uruguay tienen problemas de implantación de mayor severidad en campos sin historia de inoculación, dada la ausencia de rizobios específicos y a la presencia de rizobios competitivos y mejor adaptados a las condiciones de crecimiento (Dutto, 2002). Rodríguez Blanco *et al.* (2010) también señalan una disminución en la producción y rendimiento del trébol luego del primer año de siembra en distintos campos del país, junto con la disminución del número de plantas por m², y un alto porcentaje de nódulos ineficientes. Para explicar este problema sugieren que la falta de competitividad de las cepas introducidas en suelos con alto número de cepas autóctonas es una de las principales causas del fracaso en la simbiosis eficiente. También se ha planteado que rizobios provenientes del trébol de campo o polimorfo (*Trifolium polymorphum*) son capaces de nodular trébol blanco formando nódulos inefectivos o parásitos (Reeve *et al.*, 2010a; Yates, 2008; Howieson *et al.*, 2005; Labandera, 2005; Yates *et al.*, 2005; Dutto, 2002; Coll y Zarza, 1992; Labandera y Vincent, 1975).

El trébol polimorfo se encuentra presente en una extensa área que abarca Uruguay, el extremo sur de Brasil, parte de Argentina y Chile. Es una planta perenne, rastrera y estolonífera con raíces fusiformes. Produce flores aéreas rosadas y subterráneas de características muy diferentes. Se encuentra ampliamente distribuido en Uruguay, en una gran variedad de suelos y posiciones topográficas (Coll y Zarza, 1992). Presenta gran adaptabilidad y plasticidad a diferentes condiciones de suelos, fértiles y secos, profundos, pobres y blanquecinos, impermeables, escasos en materia orgánica, arcillosos, arenosos, y en un rango de pH que varía entre 4,5 a 7,0 (Speroni e Izaguirre, 2003). La fecundación cruzada ha dado origen a una gran variación en las diversas características de la planta que contribuyen a la adaptación de la especie en los diversos ambientes (Coll y Zarza, 1992).

Otros autores también han indicado la ineficiencia de rizobios provenientes de trébol polimorfo en otras especies de tréboles como en *T. subterraneum*, *T. purpureum* y *T. glanduliferum* (Melino *et al.*, 2012; Reeve *et al.*, 2010a, Labandera y Vincent, 1975). Estas cepas con mayor competitividad respecto al inoculante comercial, podrían ser responsables de los problemas de implantación y baja producción de trébol blanco en algunos suelos de Uruguay. Sin embargo es muy escasa la información sobre esta problemática, lo que hace necesario profundizar en este tipo de interacción y evaluar cepas nativas para el desarrollo de un inoculante rizobiano que, además de eficiente sea competitivo en trébol blanco, adecuado para los nuevos suelos donde se siembran praderas con esta leguminosa.

1.9. OBJETIVOS

Objetivo general

Seleccionar cepas nativas por su eficiencia y competitividad para desarrollar un inoculante rizobiano para trébol blanco.

Objetivos específicos

1. Comprobar si la inoculación con cepas más competitivas mejora la implantación y la producción de biomasa en suelos problemáticos.
2. Proponer una estrategia general para evaluar cepas a efectos de desarrollar inoculantes rizobianos.
3. Conocer la competitividad y el grado de eficiencia o parasitismo que establecen aislamientos nativos de *T. polymorphum* en *T. repens*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MATERIAL VEGETAL

Como hospederos se utilizaron *Trifolium repens* L. (trébol blanco) ‘Estanzuela Zapicán’ y *Trifolium polymorphum* (trébol polimorfo). Las semillas, suministradas por Mónica Rebuffo (INIA La Estanzuela) y Rafael Reyno (INIA Tacuarembó), y se conservaron a 4 °C. Como especie de referencia para determinar la abundancia isotópica de ¹⁵N se utilizó *Lolium multiflorum* (raigrás anual).

2.1.1. Desinfección y germinación de semillas

Las semillas se desinfectaron superficialmente según Batista (2013), consistente en pasaje por etanol 96 % 1 min, dos lavados con agua destilada estéril, NaClO 20 % (comercial puro) 4 min y 5 lavados sucesivos con agua destilada estéril, en la que quedaron al menos 3 h antes de ser sembradas en agar - agua 0,8 %. Cuando la raíz emergió 1 - 2 mm las semillas germinadas se transfirieron a macetas o tubos.

2.1.2. Desinfección y conservación de nódulos

Los nódulos se desinfectaron superficialmente mediante lavado abundante con agua, 1 min en etanol 70 % v/v, enjuague con agua estéril y 3 min en una solución de NaClO al 4 % v/v, seguida de enjuagues con agua estéril. Los nódulos se conservaron en glicerol 20 % en una solución de NaCl 0,85 %, a -20 °C.

2.1.3. Crecimiento de plantas en condiciones controladas

Las plantas crecieron en cámara de crecimiento con una intensidad lumínica de 200 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, con un fotoperiodo de 16/8 h (luz/oscuridad) a 22/20 °C (día/noche).

Las plantas crecidas en macetas con arena:vermiculita (1:1) estéril se regaron alternando agua y medio Hornum (Handberg y Stougaard, 1992) sin nitrógeno (Anexo I). Cuando crecieron en tubos estos contenían 15 mL de medio Jensen sin nitrógeno (Anexo I). El crecimiento en los diferentes suelos se realizó en cilindros de PVC de 14 cm de alto por 7,5 cm de diámetro, que se regaron con agua. Los suelos

definidos, con y sin historia de inoculación, fueron: Basalto, Areniscas, Brunosoles del Noreste, Cristalino del Centro y Lomadas del Este (Cuadro 2).

Cuadro 2. Características de los suelos usados para determinar competitividad de cepas marcadas, en cilindros PVC.

Tipo de suelo	Región de muestreo
Lomadas del Este- Argisol Subéutrico	Unidad Experimental de Palo a Pique, UEPP (INIA Treinta y Tres) 33°15'S, 54°28'O
Basalto- Vertisol Háptico (Grumosoles)	Unidad Experimental Glencoe (Paysandú, INIA Tacuarembó) 32°01'S, 57°09'O
Cristalino Central- Brunosol Subéutrico	Secretariado Uruguayo de la Lana (Florida) 33°51'S, 55°35'O
Areniscas- Luvisol Ócrico	Unidad Experimental La Magnolia (Tacuarembó, INIA Tacuarembó) 31°41'S, 55°48'O
Brunosoles del Noreste- Brunosol Dístrico Lúvico	Santa Clotilde (Tacuarembó, INIA Tacuarembó) 31°49'S, 55°36'O

2.1.4. Crecimiento de plantas en campo

Los ensayos se realizaron en Treinta y Tres, en la Unidad Experimental Palo a Pique (UEPP) de INIA Treinta y Tres, en parcelas de 3 x 2 m, con una distancia entre parcelas de 0,6 m, y en Paysandú en la Estación de Glencoe de INIA Tacuarembó, en parcelas de 4 x 2 m con una distancia entre parcelas de 1 m. En el cuadro 3 se resumen características del suelo y tipo de siembra en la UEPP y Glencoe. Los ensayos se realizaron con un Diseño en bloques completamente al azar (DBCA).

Cuadro 3. Características del suelo y tipo de siembra en la UEPP y Glencoe.

	UEPP	GLENCOE
SUELO	Argisol Subéutrico Melánico Abrúptico. CONEAT 10,7	Vertisol Háptico (Grumosoles). CONEAT 12,21
USO DEL SUELO	Campo natural sin historia de inoculación	Campo natural con historia de inoculación
Corg/Ntotal/pH	1,9 % / 0,3 % / 5,9	3,9 % / 0,45 % / 5,7
MÉTODO DE SIEMBRA	Cobertura	Siembra directa
DENSIDAD DE SIEMBRA	5 kg/ha escarificación ligera	5 kg/ha escarificación ligera
FERTILIZACIÓN	80 u P ₂ O ₅ (209 g/par 0-21- 23-0)	80 u P ₂ O ₅ (105 g/par 0-21- 23-0)

2.2. BACTERIAS

2.2.1. Rizobios

Se utilizaron las cepas N2, N5, 249 y 317 de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* aisladas de *T. pratense* (FONTAGRO FTG-787/2005-2010) seleccionadas de un total de 18 aislamientos y las cepas 1 al 43 aisladas de *T. polymorphum*. Como referencia se utilizó la cepa U204, el inoculante comercial para tréboles (Cuadro 4).

Cuadro 4. Características de las cepas de rizobios utilizadas y clones marcados con el gen delator *gusA*.

Cepas	Características
249	Aislado de <i>T. pratense</i> . Colonia. Suelo sin historia de inoculación. Obtenida en marco del proyecto FONTAGRO FTG-787/2005-2010.
249 <i>gusA</i>	Clon 249.1 derivado de la cepa 249 con inserción <i>gusA</i> . En esta tesis.
N2	Aislado de <i>T. pratense</i> . San José (34°26'S, 56°81'O). Pradera de primer año en suelo sin historia de pradera. Denominación original de la cepa P89/6/N2 (Hernández, 2011).
N2 <i>gusA</i>	Clon N2.10 derivado de la cepa N2 con inserción de <i>gusA</i> . En esta tesis.
N5	Aislado de <i>T. pratense</i> . Colonia (34°23'S, 57°49'O). Pradera engramillada de 4 años. Denominación original de la cepa P96/9/N5 (Hernández, 2011).
N5 <i>gusA</i>	Clon N5.4 derivado de la cepa N5 con inserción de <i>gusA</i> . En esta tesis.
317	Aislado de <i>T. pratense</i> . Cangué, Paysandú: 32°34'S, 58°40'O en un predio sin historia de inoculación (Batista, 2013).
317 <i>gusA</i>	Clon derivado de la cepa 317 con inserción de <i>gusA</i> . Obtenido por Batista <i>et al.</i> (2015).
U204	<i>R. leguminosarum</i> bv <i>trifolii</i> Nitragin USA. Inoculante comercial para <i>T. repens</i> y <i>T. pratense</i> en Uruguay (Punschke, 2010). Utilizada desde 1962 como inoculante, denominada originalmente U-28 en la colección del MGAP (Labandera y Mayans, 2006) de ahora en adelante U204.
U204 <i>gusA</i>	Clon derivado de la cepa U204 con inserción de <i>gusA</i> . Obtenido por Batista <i>et al.</i> (2015).
1 al 15	Aislados de <i>T. polymorphum</i> . Glencoe, Paysandú, INIA

	Tacuarembó: 32°01'S, 57°09'O. Tipo de suelo Basalto. Sin historia de pradera. En esta tesis.
16 al 19	Aislados de <i>T. polymorphum</i> . INIA La Magnolia, Tacuarembó: 31°41'S, 55°48'O. Tipo de suelo Areniscas. Sin historia de pradera. En esta tesis.
20 al 37	Aislados de <i>T. polymorphum</i> . UEPP, INIA Treinta y Tres: 33°15'S, 54°28'O. Tipo de suelo Lomadas del este. Sin historia de pradera. En esta tesis.
38 al 41	Aislados de <i>T. polymorphum</i> . Cuchilla de los Ladrones, Treinta y Tres (33°0'S, 54°36'O). Tipo de suelo Lomadas del este. Sin historia de pradera. En esta tesis.
42 y 43	Aislados de <i>T. polymorphum</i> . Lavalleja (34°17'S, 55°16'O). Tipo de suelo: Lomadas del este. Sin historia de pradera. En esta tesis.
256, 262, 267, 297, 311, 750, 756, 763, 772, 776, 1056, 1082, P89N6, P9615N4	Aislamientos de <i>T. pratense</i> . Proyecto FONTAGRO FTG-787/2005-2010.

2.2.2. Escherichia coli

Como donadora se utilizó *E. coli* cepa S17-1λ-pir, que contiene el plásmido pCAM131, con el gen *gusA* bajo el control de un promotor inducible *PnifH* y gen de resistencia a antibióticos Estreptomina y Espectinomicina (Sm/Sp), según se resume en la figura 3 (Wilson *et al.*, 1995).

producto del macerado y se sembró por estría en placa con medio YEM. Por sucesivos repiques se obtuvieron rizobios puros.

2.2.5. Preparación de inóculos

Para los ensayos en laboratorio los rizobios crecieron en medio YEM hasta una DO_{600} de 0,8 que corresponde a 1×10^9 ufc/mL. Los cultivos se centrifugaron a 6.000 rpm 2 min y se suspendieron en agua estéril. Con la suspensión se inocularon las plantas en tubos o macetas según se indica en cada apartado.

Para producir el inoculante en turba en laboratorio se inyectaron 100 mL del cultivo por bolsa de 200 g de turba estéril y se homogeneizó manualmente. En los ensayos en campo se utilizó el inoculante producido por las empresas (CALISTER S.A. y Lage S.A.).

2.2.6. Coinoculación

La coinoculación se realizó con las cepas 317 y U204 marcadas con *gusA* (clones 317.1 y U204.1) y la cepa P3 aislada de trébol polimorfo. Los cultivos centrifugados se suspendieron en agua destilada estéril y se ajustó la DO_{600} . Las plantas, una por tubo, se inocularon a razón de 200 μ L con: 317.1 - P3 en relación 1:1, 317.1 - P3 en relación 1:2, U204.1 - P3 en relación 1:1, U204.1 - P3 en relación 1:2.

De cada tratamiento se hicieron 8 repeticiones. Para analizar los resultados se trabajó con la proporción de nódulos azules respecto al total de nódulos, usando como variable de respuesta el número de nódulos azules y covariable el número de nódulos totales mediante un modelo lineal generalizado mixto, con distribución binomial, función de enlace *logit*.

2.2.7. Recuento de rizobios sobre semilla

El número de rizobios viables sobre semilla se hizo por recuento en placa según el protocolo utilizado por el MGAP (2013). Se colocaron 90 semillas inoculadas en 90 mL de solución de NaCl 0,85 % y 360 μ L de dispersante Tween 80 y se agitaron

durante 15 min periódicamente en vórtex. De la suspensión se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-6} en solución de NaCl 0,85 % estéril y se sembraron por triplicado 100 μ L de cada dilución en placas con medio YEM - Vn, por extensión en superficie. Las placas se incubaron durante 7 días y se utilizaron para el conteo aquellas que presentaron entre 30 y 300 colonias. Se promediaron los resultados de las tres repeticiones.

2.2.8. Recuento de rizobios en inoculante en turba

Para determinar el número de rizobios en turba se siguió el procedimiento recomendado por el Laboratorio de Microbiología del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca del Uruguay (Labandera y Mayans, 2006). Se homogeneizó el contenido de la bolsa, se sanitizó con alcohol el lugar donde se cortó para extraer 10 g del inoculante, que se suspendió en 90 mL de solución de NaCl 0,85 % estéril. La mezcla se agitó durante 15 min y se realizaron diluciones seriadas hasta la 10^{-7} . Las diluciones 10^{-5} 10^{-6} y 10^{-7} se sembraron por triplicado y por extensión en medio YEM. El recuento de colonias se realizó a los 3 días, y se verificó a los 5 días. El conteo se realizó en placas que presentaron entre 30 y 300 colonias, promediando los resultados entre las repeticiones.

2.2.9. Determinación del número de rizobios en suelo

El número de rizobios que nodulan trébol en los diferentes suelos se determinó según el método del número más probable (NMP), según Frioni (2006) con modificaciones. Para ésto, 10 g de suelo se colocaron en un matraz con 90 mL de una solución consistente de las sales del medio YEM pero sin manitol ni extracto de levadura, y 0,01 % de Tween 80. Se agitó vigorosamente con vórtex y se hicieron diluciones seriadas hasta la 10^{-4} en 9 mL de solución de NaCl 0,85 %, agitando en cada paso. Se inoculó con 200 μ L de cada dilución por cuadruplicado cada semilla germinada, al día siguiente de sembrada en tubo con medio Jensen. De cada dilución se hicieron cuatro repeticiones. Las plantas se cosecharon 4 semanas después de la inoculación y se contabilizaron los tubos positivos y negativos. Para obtener el NMP se usó la tabla de Fisher y Yates (1963).

2.2.10. Eficiencia simbiótica en macetas

Las plantas crecieron en macetas y se realizaron dos cortes, a los 30 y 60 días para determinar la biomasa de la parte aérea. Las muestras se secaron en estufa a 60 °C durante 72 h. Los resultados se analizaron con el programa Infostat, mediante un Modelo lineal general y mixto, y se compararon las medias con LSD Fisher con $p < 0,05$.

2.3. EXTRACCIÓN, AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE ADN

2.3.1. Extracción de ADN

Las células se lisaron según Rivas *et al.* (2001). Se centrifugó 1 mL de cultivo a 13.000 rpm 2 min y el precipitado se suspendió en 100 µL de NaOH 0,05 M y se incubó 4 min a 100 °C y 2 min en hielo. Se agregaron 500 µL de agua MiliQ estéril y se centrifugó a 13.000 rpm durante 2 min. Se recogieron 100 µL del sobrenadante que se conservó a -20 °C.

2.3.2. Amplificación con cebadores ERIC y resolución de perfiles

El ADN se amplificó por PCR con 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 se llevó a cabo en un volumen final de 25 µL compuesto por: 2,5 µL de buffer NH₄SO₄ (10X), 2 µL de MgCl₂ (25 mM), 0,5 µL de dNTPs (10 mM), 2 µL del cebador ERIC1 y ERIC2 (25 µM), 0,4 µL de Taq ADN polimerasa y 5 µL de ADN genómico. El programa utilizado fue: 1 ciclo de 5 min a 95 °C, 30 ciclos de 1 min a 54 °C, 6 min a 65 °C y una fase final de elongación de 16 min a 65 °C.

Los productos de amplificación se separaron por electroforesis en geles de agarosa 1 % (p/v) con buffer TAE 1X y 3 µL GoodView o SyBrSafe en 100 mL (Anexo I). En

cada pocillo se sembraron 5 µL compuestos por 4 µL del producto de amplificación y 1 µL de buffer de carga o 5µL de marcador de peso molecular (GeneRuler 1 Kb Plus ADN Ladder, Fermentas). La electroforesis se llevó a cabo a 100 volts (10 vol/cm) durante 1 h. El gel se visualizó en transiluminador UV.

Los perfiles ERIC se analizaron con el software GelCompar versión 6.2 (Applied Maths NV). La diversidad de perfiles de cepas aisladas de nódulos se realizó mediante el análisis de conglomerados (análisis de cluster). Se utilizó el coeficiente de Dice para calcular la similitud genética y se agruparon mediante el método UPGMA. Se tomaron en cuenta las bandas con tamaños entre 250 y 1200 pb, de buena intensidad y definición, y se consideraron iguales los perfiles con al menos 60 % de similitud. Para el análisis de 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).

La ocupación de nódulos en los ensayos de campo se analizó mediante un modelo lineal generalizado mixto, usando como variable de respuesta nódulos ocupados y como covariable nódulos totales. Para evaluar los datos se usó una distribución binomial, con función *logit*.

2.3.3. Amplificación y secuenciación del 16S ARNr

La amplificación del gen 16S ARNr se realizó según Herrera-Cervera *et al.* (1999). Para esto se usaron los cebadores:

27f 5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3' y

1525r 5' AAGGAGGTGATCCAGCC 3'.

El volumen final fue de 25 µL: 2,5 µL de buffer NH₄SO₄ (10 X), 1,5 µL de MgCl₂ (25 µM), 0,4 µL de dNTPs (10 mM), 0,5 µL de cada cebador 27f (10 µM) y del 1525r (10 µM), 0,2 µL de Taq ADN polimerasa, y 5 µL de ADN genómico. El programa de amplificación fue: 1 ciclo de 3 min a 94 °C; 35 ciclos de 18 s a 94 °C, 1 min a 58 °C, 1 min a 72 °C; y un ciclo final de 10 min a 72 °C.

Los productos de amplificación se separaron en geles de agarosa según se describe en el apartado anterior. El ADN se extrajo con *QIAquick Gel Extraction* kit de *Quiagen*. El análisis de las secuencias hechas en Macrogen (Korea) se hizo usando la base de datos de *GenBank* NCBI, *Center for Biotechnology Information*.

2.4. EVALUACIÓN DE LA COMPETITIVIDAD CON EL GEN *GUSA*

2.4.1. Competitividad de las cepas en condiciones controladas

2.4.1.1. Marcaje con *gusA* y actividad glucuronidasa en nódulos

Previo a la conjugación las cepas de rizobio receptoras (N2, N5 y 249) se evaluaron en relación a su resistencia natural al antibiótico de selección (Sm) en medio YEM. Para la conjugación las cepas de rizobio crecieron durante 24 h en placa con medio TY y el donador *E. coli* pCAM131 durante 8 h en placa con LB Sm. Las conjugaciones se realizaron mezclando una ansada del donador y una del receptor en medio TY sin antibiótico, y se incubaron a 28 °C durante 12 h (Batista *et al.*, 2015).

Una ansada de cada conjugación se suspendió en agua estéril y se realizaron diluciones 0, -1 y -2 que se sembraron en placas con YEM Sm y Nf. De cada conjugación se tomaron 10 transconjugantes (de ahora en adelante clones) que se repicaron sucesivas veces para su purificación en placas con YEM Sm y Nf. Para probar la ausencia de *E. coli* después de los repiques los clones se sembraron en LB sin antibiótico y se incubaron a 37 °C durante 24 h.

Para determinar la expresión del gen *gusA*, las raíces noduladas se lavaron con H₂O destilada y se colocaron en tubos con 5 mL de solución de buffer fosfato (Na₂HPO₄/NaH₂PO₄) con X-gluc (disuelto en DMF) 1 mM y SDS 1 % y se incubaron 12 h a 37 °C.

2.4.1.2. Nodulación inducida por los clones y las cepas parentales

Las cepas parentales y los clones crecieron en los medios correspondientes y con 100 μ L de cada suspensión se inocularon las semillas germinadas, sembradas a razón de una por tubo con medio Jensen, por cuadruplicado.

Las plantas se mantuvieron 30 días en cámara de crecimiento y los nódulos se contaron entre los 6 y 30 días luego de la inoculación. Para el análisis estadístico se utilizó el programa Infostat, y se realizó una regresión lineal usando variables *dummy*.

2.4.1.3. Preparación de inoculantes en turba

Para evaluar la competitividad de las cepas se utilizaron diferentes suelos (Cuadro 2) extraídos sin perturbar con cilindros de PVC. Las cepas U204, N2, N5, 249 y los clones derivados de estas N2.10, N5.4, 249.1 y U204.1 crecieron en medio YEM y se inyectaron 100 mL de cultivo a bolsas con 200 g de turba estéril que se incubaron 7 días a temperatura ambiente.

La inoculación con los clones y las cepas parentales se realizó con la cantidad de inóculo recomendada para campo (200 g de inóculo/25 kg de semilla). Para esto, se preparó una solución A de adherente:agua (1,5:1), una solución B de inoculante:solución A (1:2,7) y una mezcla C de semillas:solución C (31:1).

Para 50 g de semilla se usaron:

Solución A: 25 mL de adherente + 16,5 mL de agua = 41,5 mL.

Solución B: 9,2 g de inoculante + 25 mL de sol A = 32 mL sol 2.

Solución C: 1,6 mL de sol B + 50 g de semilla.

Las semillas inoculadas se dejaron secar 30 min en condiciones ambiente y se sembraron en los cilindros con suelo a razón de 8 semillas por cilindro, que se ralearon a 4 a los 20 días.

2.4.2. Competitividad de las cepas en diferentes suelos

Las semillas inoculadas con los clones N2.10, N5.4, 249.1 y U204.1 se sembraron en cilindros con los suelos definidos (Cuadro 2). La unidad experimental fue el cilindro, con 4 semillas cada uno y se realizaron 5 repeticiones para cada cepa en cada tipo de suelo y de uso de tierra. La ocupación de los nódulos se determinó 65 días después de la siembra. Para analizar los resultados se utilizó un Modelo lineal generalizado mixto, usando la distribución binomial, con la función de enlace *logit*. Como variable de respuesta se usó el número de nódulos azules, y como covariable el número de nódulos totales. La cepa se definió como anidada dentro del ensayo y así se eliminó el efecto del ensayo en la comparación entre las cepas.

2.5. MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA DE NÓDULOS

Se obtuvieron nódulos inducidos por las cepas U204, P3 y P18 en plantas de trébol blanco crecidas en tubos con medio Jensen durante 30 días. Los nódulos se fijaron en formaldehído 4 % en buffer fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) 50 mM, pH 8, se deshidrataron en series crecientes de etanol al 50 %, 70 %, 85 %, 95 % y 100 % durante 1 h en cada solución. Posteriormente los nódulos se sumergieron en alcohol butílico terciario (ABT) para remover el solvente de deshidratación. La primera vez permanecieron 8 h y la segunda vez 2 h, renovando el ABT. La última transferencia se realizó a una solución de ABT:aceite de parafina (1:1) durante 1 h. Las muestras se sumergieron en parafina durante 8 h en estufa a 60 °C, se repitió la inclusión renovando la parafina una vez más y se armaron los cubos de parafina. Los cortes de 5 μm se realizaron con micrótomo. Los cortes fueron depositados sobre portaobjetos que contenían una gota de adhesivo de Haupt (Anexo I) y cantidad suficiente de formol 3 %. Los portaobjetos con la muestra se colocaron sobre una placa a 30-35 °C el tiempo suficiente para que se estiren los cortes, se secaron durante 24 h y se removió la parafina sumergiendo los portaobjetos dos veces en xilol durante 15 min. Para la tinción los portaobjetos se sumergieron en una solución con azul de toluidina 1 % p/v en agua y se lavaron con agua destilada (Robledo *et al.*, 2011). Una vez

secos, los portaobjetos se visualizaron mediante microscopía óptica y se tomaron fotos utilizando el software DinoCapture 2.0.

2.6. EVALUACIÓN DE LAS CEPAS PROMISORIAS EN CAMPO

Se realizaron dos ensayos en campo, en el ensayo 1 se evaluó a la cepa 317 en la UEPP y en el ensayo 2 se evaluaron las cepas N2, 249 y 317 en la UEPP y en Glencoe.

2.6.1. Implantación y producción de biomasa

La implantación se estimó como el número de plantas por m² según el procedimiento usado por INIA Tacuarembó e INIA Treinta y Tres. El material vegetal se secó en estufa a 65 °C durante 3 días con aire forzado y la producción de biomasa se estimó como peso seco de la parte aérea al primer corte, y a partir del primer corte hasta el último se analizó la biomasa acumulada, es decir: biomasa de primer corte, biomasa del corte 1 + corte 2, biomasa del corte 1 + corte 2 + corte 3, biomasa del corte 1 + corte 2 + corte 3 + corte 4.

La implantación y la biomasa se analizaron mediante un modelo lineal general y mixto, con corrección de la heterocedasticidad de varianzas. En el análisis de implantación se analizó el número de plantas por m² de cada área muestreada anidado dentro de la repetición, y se partitionaron los datos por momento del conteo.

2.6.2. Determinación del nitrógeno proveniente de la fijación

A los 7 meses de la siembra se obtuvieron muestras de parte aérea de plantas de cada tratamiento para analizar las composiciones isotópicas de nitrógeno. Las muestras se secaron hasta peso constante a 60 °C durante 72 h. El material vegetal se molió con un molino rotatorio (SampleTekModel 200 Vial Rotator, Lincoln, Nebraska) hasta lograr un polvo fino (típicamente una consistencia aproximada a la del polvo de talco) que es la necesaria para el análisis ¹⁵N mediante espectrometría de masas. El porcentaje de N fijado se calculó con la fórmula:

$$\text{FBN (\%)} = \frac{\delta^{15}\text{N}_{\text{gramínea}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{leguminosa}}}{\delta^{15}\text{N}_{\text{gramínea}} - b} \times 100$$

En la fórmula, b es el valor de $\delta^{15}\text{N}$ en la leguminosa cuando su única fuente de N es el aire, que se determina en plantas inoculadas crecidas en medios sin N.

Los resultados se analizaron usando una comparación de medias con test de Tukey con $p < 0,05$.

2.6.3. Ocupación de nódulos

De cada parcela se cosecharon 15 plantas al azar en los meses especificados en de cada experimento y se tomaron muestras de nódulos de raíz principal (hasta 5 cm por debajo de la corona), raíces secundaria y raíces de estolones (Figura 4). De cada zona de la raíz y por tratamiento y sitio se analizaron 40 nódulos.

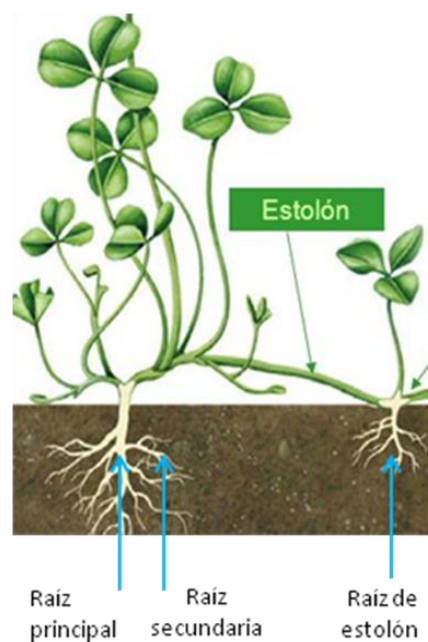


Figura 4. Zonas de la raíz definidas para muestrear nódulos. En el esquema se indica la raíz principal, secundaria y las raíces adventicias de los estolones.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. SELECCIÓN DE CEPAS EFICIENTES EN TRÉBOL BLANCO

Se partió de una colección de 80 cepas de rizobios nativos – naturalizados que nodulan trébol rojo, y de ellas, las 18 más eficientes en esa leguminosa se evaluaron en trébol blanco. La biomasa acumulada en dos cortes, a los 30 y 60 días después de la inoculación (Figura 5) evidenció que 14 de las cepas tuvieron la misma eficiencia simbiótica que la cepa U204, el inoculante comercial usado para tréboles en Uruguay. Entre estas cepas se encuentra la 317, que fue evaluada en trébol rojo (Batista, 2013), en el que tuvo igual o mayor eficiencia que el inoculante comercial.

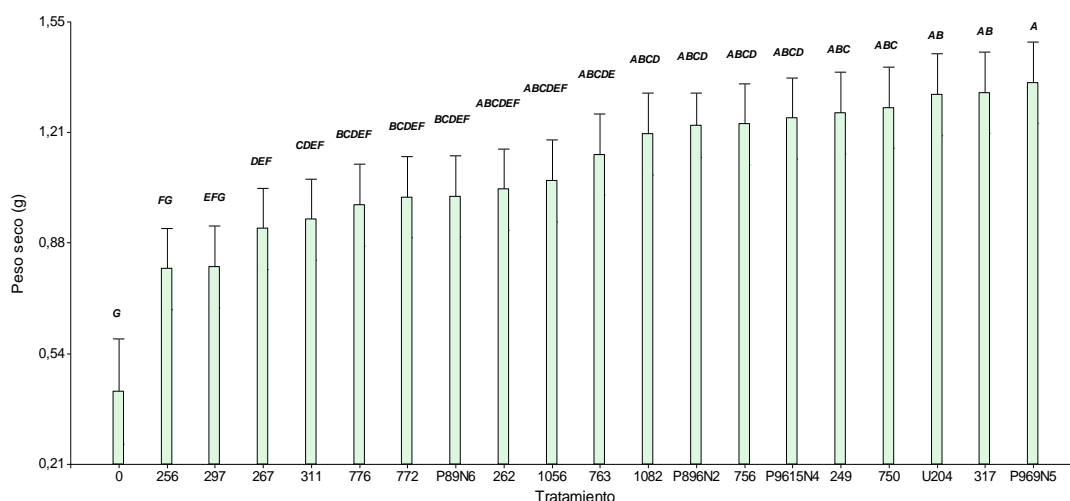


Figura 5. Eficiencia simbiótica en trébol blanco. Se evaluó la eficiencia simbiótica de 18 cepas promisorias respecto al inoculante comercial (U204) en macetas con arena vermiculita, 0 corresponde al control sin inocular. Se representa la media del peso seco aéreo acumulado en dos cortes (30 y 60 días luego de la inoculación) de 5 repeticiones por tratamiento. Los datos se analizaron mediante un modelo lineal general mixto, letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos mediante LSD Fisher con $p < 0,05$.

En ensayos independientes en condiciones controladas realizados por Batista *et al.* (2015), la cepa 317 indujo en trébol rojo mayor peso seco de la parte aérea que el inoculante comercial. Sin embargo cuando la cepa 317 se usó en ensayos en campo,

la producción de forraje no se diferenció estadísticamente en los dos cortes respecto al tratamiento inoculado con la cepa U204 y sin inocular. El aumento de cinco veces la dosis del inoculante 317 tampoco llevó a diferencias en la producción de forraje (Batista *et al.*, 2015).

De las 14 cepas que en simbiosis con trébol blanco produjeron igual biomasa que U204. Seleccionamos a la 249, P969N5 (N5 de ahora en adelante) y P896N2 (N2 de ahora en adelante) para evaluar su competitividad, una característica que es deseable en los inoculantes comerciales.

3.2. MARCAJE DE CEPAS PARA EVALUAR LA COMPETITIVIDAD POR LA NODULACIÓN

Las cepas 249, N2 y N5 seleccionadas por su eficiencia simbiótica, se marcaron con el gen *gusA* para evaluar su competitividad en trébol blanco en diferentes suelos. De cada conjugación se seleccionaron 3 clones y se evaluó si la inserción del transposón afectó la tasa de nodulación de los transconjugantes respecto a la cepa parental.

Los 9 clones evaluados respecto a sus parentales no presentaron diferencia en el tiempo de aparición del primer nódulo, entre 7 y 10 días después de la inoculación, ni en el número total de nódulos inducidos (datos no mostrados). Tampoco hubo diferencias significativas en la tasa de nodulación entre las cepas parentales y cada uno de sus respectivos clones (Cuadro 5), lo que indica que la inserción del transposón no afectó la nodulación. Los clones seleccionados se denominaron N2::*gusA*, N5::*gusA* y 249::*gusA*. La tasa de nodulación del clon 317.1 utilizado en esta tesis, había sido evaluada anteriormente por Batista *et al.* (2015).

Cuadro 5. Tasa de nodulación de los clones respecto a sus parentales. En negrita las cepas parentales y sin negrita los clones. β corresponde al valor de la pendiente de la regresión lineal del número de nódulos en función del tiempo (30 días). Medias con letras diferentes indican diferencias significativas según DGC ($p < 0,05$).

Cepa/clon	β
N2	0,18 A
N2.1	0,20 A
N2.9	0,22 A
N2.10	0,18 A
N5	0,23 A
N5.3	0,20 A
N5.4	0,22 A
N5.8	0,19 A
249	0,18 A
249.1	0,20 A
249.9	0,23 A
249.10	0,17 A

3.3. COMPETITIVIDAD DE LAS CEPAS EN SUELOS PROBLEMA

Para determinar la competitividad de las cepas candidatas se usaron los clones N2.10, N5.4 y 249.10 en suelos en los que se siembra comúnmente trébol blanco, con diferentes condiciones edáficas y uso, es decir con historia de trébol blanco (CH) y sin historia de trébol blanco (SH). Las semillas se inocularon según las recomendaciones del fabricante, con inoculantes en turba producidos con las cepas marcadas. La cantidad de rizobios en los inoculantes fue mayor a la exigida por el MGAP ($2,0 \times 10^9$ ufc por gramo de turba). Las semillas se sembraron en cilindros con los suelos colectados con mínima perturbación y crecieron en condiciones controladas (Figura 6). A los 65 días se levantó el ensayo para analizar la ocupación de los nódulos mediante la actividad X-gluc.

Antes de sembrar las semillas se determinó el NMP de rizobios capaces de nodular trébol blanco en cada suelo (Cuadro 6). El número de rizobios obtenido en los suelos analizados osciló entre 1 a 350 rizobios por gramo de suelo. En suelo CH de lomadas

de la UEPP el número de rizobios fue 22 veces mayor que en suelo SH, y presentaron respectivamente 350 y 16 rizobios/g de suelo. En los otros suelos evaluados, vertisoles de Glencoe, brunosoles del SUL y Santa Clotilde, y areniscas de La Magnolia, no hubo diferencias significativas en el número de rizobios según la historia de trébol blanco (Cuadro 6). El número de rizobios en los suelos CH y SH de Glencoe y de Santa Clotilde varió entre 43 y 90 rizobios/g de suelo. Tampoco hubo diferencia debidas a la historia de cultivo en la cantidad de rizobios, entre 6 y 9 rizobios/g de suelo, en los suelos de Glencoe y los del SUL. En los suelos del SUL se encontró un menor número de rizobios que en suelo CH de la UEPP y que en suelo CH de Santa Clotilde. Los suelos de La Magnolia y del SUL presentaron los valores más bajos de rizobios, entre 1 y 9 rizobios/g de suelo.



Figura 6. Competitividad en diferentes suelos. Los suelos con distinta geología CH y SH se colectaron con mínima perturbación en cilindros de PVC. La foto está tomada a los 65 días de la siembra, momento previo al levantamiento del ensayo.

Cuadro 6. NMP de rizobios que nodulan trébol blanco en distintos suelos. CH con historia de trébol blanco, SH sin historia de trébol banco. Letras diferentes indican diferencias significativas según Tukey con $p < 0,05$.

SUELO	NMP/g suelo
Lomadas del Este (UEPP), CH	$3,5 \times 10^2$ A
Lomadas del Este (UEPP), SH	$1,6 \times 10^1$ D
Basalto (Glencoe), CH	$7,0 \times 10^1$ BC
Basalto (Glencoe), SH	$4,3 \times 10^1$ BCD
Cristalino Central (SUL), CH	8,5 CD
Cristalino Central (SUL), SH	6,0 CD
Brunosoles del Noreste (NE), CH	$9,0 \times 10^1$ B
Brunosoles del Noreste (NE), SH	$6,3 \times 10^1$ BCD
Areniscas (ARE), CH	1,3 D
Areniscas (ARE), SH	0,5 D

En suelo SH de la UEPP y CH de Glencoe el número de rizobios que nodulan trébol blanco fue bajo (Cuadro 6) y a los 30 días las plantas presentaron síntomas de clorosis por falta de N, poco crecimiento, y nódulos pequeños y blancos similares a los controles sin inocular (Figura 7).



Figura 7. Plantas noduladas por cepas de suelos de la UEPP y de Glencoe. A. Plantas en los tubos inoculadas con diluciones -1 a -4 de suelo CH de Glencoe. B y C. Plantas de 30 días inoculadas respectivamente con diluciones de suelo SH de la UEPP y CH de Glencoe.

Para evaluar la ocupación de los nódulos por los clones marcados con el gen delator *gusA*, se contó el número de nódulos azules y totales. La figura 8 muestra un ejemplo de nódulos ocupados con cepas marcadas en suelo SH de la UEPP. Como se observa en la figura N5::*gusA* ocupó la totalidad de los nódulos mientras que U204::*gusA* no ocupó ninguno.

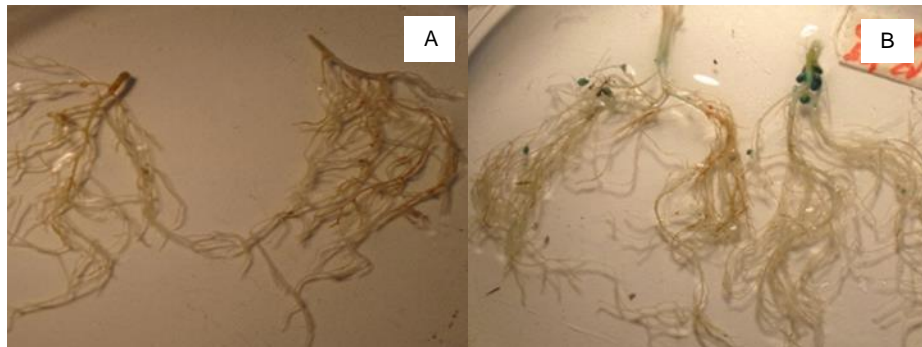


Figura 8. Ocupación de nódulos por cepas con diferente competitividad. Los nódulos provienen de plantas inoculadas con U204::*gusA* (A) y N5::*gusA* (B), sembradas en el suelo SH de la UEPP.

Se analizó el conjunto de nódulos ocupados por los inoculantes en suelos con diferente origen edáfico (Cuadro 7), con diferente historia (Cuadro 8) y por cada cepa en cada suelo (Cuadro 9), y de esta forma se presentan los resultados, porque no se encontró interacción entre las cepas con las demás variables (CH, SH y tipo de suelo), mientras que hubo interacción significativa entre el origen edáfico y la historia de inoculación.

En el cuadro 7 se observa que la ocupación por las cepas marcadas usadas como inoculantes fue diferente en cada suelo, y que la mayor cantidad de nódulos ocupados fue en suelo de areniscas de La Magnolia (70 %). En el suelo de lomadas de la UEPP y brunosoles de Santa Clotilde el conjunto de los inoculantes ocuparon casi el doble de nódulos (40 %) respecto a los vertisoles de Glencoe y brunosoles del SUL (23 - 26 %). Los resultados sugieren que el origen del suelo incide en la

ocupación de nódulos por los inoculantes, aunque se debe tener en cuenta la interacción con la historia de inoculación.

Cuadro 7. Ocupación de nódulos para el conjunto de inoculantes en distintos suelos. Letras diferentes indican diferencias significativas entre medias (Tukey con $p < 0,05$).

Suelo	Proporción de nódulos ocupados por inoculantes
La Magnolia	$0,70 \pm 0,06$ A
UEPP	$0,40 \pm 0,03$ B
Santa Clotilde	$0,40 \pm 0,05$ B
SUL	$0,26 \pm 0,05$ C
Glencoe	$0,23 \pm 0,04$ C

En el cuadro 8 se muestra la ocupación de nódulos por los inoculantes en suelos SH y CH. En suelos SH de inoculación las cepas ocuparon más del doble de nódulos que en suelos CH, 56 y 25 % respectivamente.

La ocupación de nódulos por las cepas promisorias N2, N5 y 249 respecto al inoculante comercial fue mayor, entre 52 - 63 % vs 6 % respectivamente (Cuadro 9). Dado que las cepas N2 y 249 fueron las más competitivas, se seleccionaron para evaluarlas en ensayos en campo.

Cuadro 8. Ocupación de nódulos para el conjunto de los inoculantes en suelos CH y SH de inoculación. Letras diferentes indican diferencias significativas según Tukey $p < 0,05$.

Historia de inoculación de trébol blanco	Proporción de nódulos ocupados por inoculantes
Sin historia (SH)	0,56 ± 0,03 A
Con historia (CH)	0,25 ± 0,03 B

Cuadro 9. Ocupación de nódulos por cepas usadas como inoculantes en el conjunto de los diferentes suelos. Letras diferentes indican diferencias significativas según Tukey $p < 0,05$.

Cepa	Proporción de nódulos ocupados por el inoculante
N5	0,52 ± 0,05 A
U204	0,06 ± 0,02 B
249	0,60 ± 0,04 A
N2	0,63 ± 0,04 A

Las diferencias observadas en el NMP entre los suelos SH y CH de lomadas de la UEPP pueden deberse a una larga historia de mejoramiento con trébol blanco (Jaurena *et al.*, 2016). Sin embargo, un período de 21 años de mejoramiento en vertisoles de Glencoe (Rafael Reyno, comunicación personal, 9 de Marzo de 2017) no se acompañó de diferencias en la cantidad de rizobios que nodulan trébol blanco en suelos CH y SH. El suelo de La Magnolia fue considerado CH porque se sembró

trébol blanco un año, hace 15 años (Rafael Reyno, comunicación personal, 9 de Marzo de 2017). Este suelo de areniscas no presentó diferencia con el número de rizobios del suelo SH. Tampoco se encontraron diferencias en el NMP entre los suelos SH y CH en los brunosoles de Santa Clotilde y del SUL, que fueron mejorados con trébol blanco inoculado con U204 durante los últimos 10 años (Rafael Reyno, comunicación personal, 9 de Marzo de 2017) y 17 años respectivamente (Gerónimo Cardozo, comunicación personal, 7 de Marzo de 2017).

El bajo número de rizobios y la alta ocupación por los inoculantes en suelos ácidos de areniscas de La Magnolia, evidencia la mayor competitividad de los inoculantes frente a las cepas nativas, aunque probablemente la eficacia de los inoculantes también se deba a la baja presencia de rizobios nativos. Sin embargo, a pesar de que el número de rizobios en los suelos CH y SH de Glencoe y del SUL era bajo, la ocupación de nódulos por las cepas también fue baja. Los rizobios presentes en estos suelos pueden ser más competitivos que los inoculantes, o bien características como el pH, contenido de N y presencia de otros microorganismos antagonistas (Diouf *et al.*, 2000) en los suelos podrían ser la causa de que los inoculantes no prosperen. Estos suelos en los que los inoculantes presentaron inconvenientes en la nodulación, fueron definidos previamente como problemáticos para la implantación y producción de mejoramientos de trébol blanco (Mónica Rebuffo, comunicación personal, 3 de junio de 2013).

Batista *et al.* (2015) analizaron el NMP de rizobios para trébol rojo en tres suelos. En La Estanzuela, con 47 años de historia de inoculación de trébol determinaron $5,1 \times 10^4$ rizobios/g de suelo y proponen que la historia de inoculación condujo al establecimiento de poblaciones naturalizadas más adaptadas y competitivas que el inoculante comercial, que ocuparon una alta proporción de nódulos. Otros suelos SH evaluados por Batista *et al.* (2015) fueron vertisoles de Tambores y lomadas de UEPP, en los que midieron por g de suelo $3,2 \times 10^1$ y $1,9 \times 10^4$ rizobios que nodulan trébol rojo respectivamente. Estas cepas, probablemente nativas, pueden provenir de trébol polimorfo, un trébol que está presente en esos suelos. En Tambores y en la UEPP las cepas 317 y U204 fueron más competitivas que los rizobios nativos,

ocupando más de un 88 % de los nódulos, a diferencia de lo evaluado en La Estanzuela. A pesar de que en la UEPP se cuantificó una población de rizobios de igual magnitud que en La Estanzuela, los nódulos formados fueron ineficientes, de tamaño pequeño y color verde, y las plantas presentaron síntomas de deficiencia de N, color amarillento y poco crecimiento. Los mismos síntomas fueron identificados en esta tesis con plantas de trébol blanco sembradas en los suelos SH de la UEPP y en suelos CH de Glencoe (Figura 7). En lomadas de la UEPP esto puede deberse a la presencia de trébol polimorfo, mientras que en Glencoe debería realizarse una evaluación más detallada, dado que el suelo ha sido mejorado durante varios años y no hay trébol polimorfo en campos CH (Rafael Reyno comunicación personal, 9 de Marzo de 2017), lo que no quiere decir que no haya rizobios provenientes de ese trébol. De todos modos en campo natural de Glencoe existe trébol polimorfo y la cantidad de rizobios proveniente de esta especie alcanza valores de $3,3 \times 10^4$ /g de suelo y son capaces de nodular ineficientemente a trébol blanco (Yates *et al.*, 2005). En nuestro caso, en suelo SH de Glencoe determinamos $4,3 \times 10^1$ rizobios/g de suelo, pero el suelo evaluado por Yates *et al.* (2005) tenía pH de 4,8 y en nuestro caso 5,7. Por lo general los rizobios no persisten en suelos ácidos (Martyniuk y Oron, 2008). Es posible que el trébol polimorfo que se encuentra adaptado a las condiciones ácidas de nuestros suelos, esté nodulado por rizobios adaptados a tales condiciones.

Por otro lado Martyniuk y Oron (2008), a partir de 46 suelos de campo natural en Polonia determinaron en 31 de ellos un alto número de *R. leguminosarum* bv *trifolii*, (10^2 y 10^5 rizobios/g de suelo), en 8 suelos valores bajos (17 y 58 rizobios/g de suelo), en 3 suelos muy bajos (6 y 7 rizobios/g de suelo) y en 4 suelos no encontraron rizobios. En La Magnolia, Glencoe y el SUL la cantidad de rizobios que nodulan trébol blanco es baja, entre 1 y 70 rizobios/g de suelo (Cuadro 6), en Santa Clotilde la cantidad de rizobios también fue baja, entre 63 y 90 rizobios/g de suelo y solo en el suelo CH de la UEPP los valores se asemejaron a los obtenidos por Martyniuk y Oron (2008) en los 31 suelos.

La cantidad de rizobios presentes en suelo de la UEPP SH fue 1000 veces menor que la determinada por Batista *et al.* (2015) para rizobios que nodulan trébol rojo en el

mismo suelo y 100 veces menor a la comunicada por Wielbo *et al.* (2010) también en trébol rojo, que reportaron $4,2 \times 10^3$ rizobios/g suelo en Polonia. En trébol blanco Pryor y Crush (2006) obtuvieron $3,2 \times 10^5$ rizobios/g de suelo CH en Nueva Zelanda. Las diferencias pueden deberse a condiciones del suelo, pero además a las especies de trébol utilizadas (Sprent, 2007) y a la metodología usada para determinarlos, por ejemplo si las muestras se tomaron en periodos del año muy diferentes (invierno o verano) las poblaciones de bacterias pueden variar mucho.

En cuanto a la forma de estimar el tamaño de las poblaciones de rizobios presentes en los suelos MacDonald *et al.* (2011) determinaron por NMP y por qPCR la cantidad de rizobios capaces de nodular trébol blanco. Los autores concluyen que con el qPCR la cantidad de rizobios es mayor que cuando usa el NMP. Esto podría suceder con las estimaciones de rizobios obtenidas en esta tesis, pero de todas formas nuestros resultados son comparables entre sí y con los de otros que usaron el NMP como forma de estimar la cantidad de rizobios, más allá de las limitaciones que esta estrategia tiene.

3.4. COMPETITIVIDAD EN CONDICIONES DE CAMPO

Para evaluar la eficiencia simbiótica y la competitividad de las cepas en condiciones de campo, se instalaron ensayos en lomadas de la UEPP y en vertisoles de Glencoe y se utilizaron como inoculantes a las cepas promisorias, al inoculante comercial, y se incluyó un control sin inocular. Antes de instalar los ensayos se determinó el NMP de rizobios capaces de nodular trébol blanco y el número de rizobios en los inoculantes en base turba utilizados en los ensayos.

En cada tratamiento se determinó la implantación, como el número de plantas por m^2 , la producción de materia seca aérea, el nitrógeno fijado a través de la abundancia isotópica del ^{15}N y la ocupación de los nódulos por identificación de perfiles ERIC generados por PCR.

3.4.1. Experimento 1: evaluación en campo de la cepa 317

En la colección de cepas del Laboratorio de Bioquímica de Facultad de Agronomía se cuenta con una cepa promisoría 317 (Batista *et al.*, 2015; Batista, 2013). Se valuó a la cepa 317 en trébol blanco en la UEPP en un campo SH en un ensayo con el diseño que se muestra en el cuadro 10.

Cuadro 10. Esquema de instalación del experimento1. El diseño fue un DBCA y la unidad experimental fue la parcela.

Bloque	Parcela 1	Parcela 2	Parcela 3
1	317	SI	U204
2	U204	317	SI
3	U204	SI	317
4	SI	U204	317

El NMP de rizobios previo a la siembra fue de 6×10^1 /g de suelo, valor que está en el mismo orden de magnitud que el obtenido para el ensayo de cilindros con suelo (Cuadro 6), en suelos SH de inoculación.

Los inoculantes en turba usados para inocular las semillas se prepararon con las cepas 317 y U204. El número de rizobios en turba para ambas fue mayor al mínimo requerido por MGAP (2×10^9 rizobios/g de turba).

A los 30, 60 y 90 días luego de la siembra se contó el número de plantas por m² (Cuadro 11) y a los 7 meses se determinó la ocupación de nódulos de raíces principales, raíces secundarias y de raíces de estolones. Se analizaron 10 nódulos de cada tipo de raíz para cada tratamiento y repetición. Con los aislamientos obtenidos se generaron 362 perfiles ERIC (Cuadro 12).

A los 30 días el número de plantas por m² fue igual entre los tratamientos y mayor a la cantidad establecida en los otros dos tiempos de conteo (Cuadro 11). A los 60 y 90 días hubo mayor número de plantas en los tratamientos con la cepa 317 y U204 respecto al control ($p < 0,05$), sin diferencias significativas entre ellos (Cuadro 11). A los 90 días el número de plantas en las parcelas inoculadas fue unas 3 veces mayor que en las parcelas sin inocular. Los resultados de implantación a los 60 y 90 días se aproximan más al número de plantas que logran establecerse, menor al número registrado en el primer conteo. Los resultados evidencian que la inoculación mejora la implantación de trébol y también la necesidad de inocular en este suelo.

Cuadro 11. Implantación a los 30, 60 y 90 días luego de la siembra. SI, tratamiento control sin inocular. Letras diferentes indican diferencias significativas entre medias según DGC con $p < 0,05$.

Momento de conteo (días)	Tratamiento	N° plantas/m²
30	SI	191 ± 44 A
	317	205 ± 16 A
	U204	216 ± 15 A
60	SI	101 ± 17 B
	317	157 ± 17 A
	U204	154 ± 17 A
90	SI	25 ± 3 B
	317	83 ± 6 A
	U204	99 ± 9 A

Cuadro 12. Ocupación de nódulos por las cepas 317 y U204. Después de 7 meses de la siembra se aislaron rizobios de nódulos de raíces principales, secundarias y de estolones. El ADN se amplificó con cebadores ERIC y los perfiles se analizaron con el *software* GelCompar 6.2. SI, tratamiento control sin inocular. Letras diferentes indican diferencias significativas según DGC con $p < 0,05$.

Tratamiento	Tipo de raíz	Proporción de ocupación de nódulos	
U204	Principal	0,98 A	
	Secundaria	0,95 A	
	De estolón	0,12 B	
317	Principal	1,00 A	
	Secundaria	1,00 A	
	De estolón	0,96 A	
SI	Principal	0,25 (317)	0,05 (U204)
	Secundaria	0,24 (317)	0,07 (U204)

Los resultados de la ocupación de nódulos se obtuvo del análisis de 40 nódulos de cada tipo de raíz (principal, secundaria y de estolón), provenientes de 40 a 60 plantas de cada tratamiento (Anexo II). El número de aislamientos analizados en esta tesis, 1200, fue mayor a los analizados por Batista (2013), Howieson *et al.* (2005) y Yates *et al.* (2003), que también evaluaron la ocupación de nódulos en campo mediante rep-PCR. De esta forma, consideramos la solidez de estos resultados, dada la cantidad de nódulos analizados de cada tratamiento y el número de plantas de las que provienen.

A 7 meses después de la siembra, las cepas 317 y U204 usadas como inoculantes, ocuparon más del 95 % de los nódulos de raíz principal y secundaria, sin diferencias significativas entre ellas. Estos resultados indican que las cepas tienen igual

competitividad en este suelo SH de la UEPP. Cuando Batista *et al.* (2015) analizaron el total de nódulos ocupados de las raíces principales y secundarias por ERIC PCR, la cepa 317 estuvo presente en el 88 % de los nódulos y la cepa U204 en el 98 %, también sin diferencias significativas. Batista *et al.* (2015) en este suelo SH de la UEPP, con las mismas cepas marcadas que utilizamos en esta tesis, obtuvieron un resultado similar en trébol rojo, crecido durante 45 días en cilindros de suelos.

Cuando se analizó la ocupación de nódulos de los estolones (Cuadro 12) se observó que la misma fue significativamente mayor con la cepa 317 (96 %) respecto a la cepa U204 (12 %). Este resultado sugiere que la cepa 317 será más hábil para persistir en este suelo de lomadas respecto a la cepa U204, que hizo posible la ocupación de nódulos que se formaron probablemente al 4to ó 5to mes después de la siembra. Estos nódulos aportarán N a las plantas que broten de los estolones en el segundo año del mejoramiento. El resultado de ocupación de nódulos de estolones de trébol blanco no había sido comunicado hasta ahora, al menos en nuestro medio.

Los resultados evidencian que la inoculación de trébol blanco con cepas eficientes como 317 y U204 mejora su implantación en lomadas del Este. La ocupación de nódulos de raíces principales y secundarias por estas cepas indica por qué compiten igual en este suelo SH y con bajo número de rizobios capaces de nodular trébol blanco. Por otro lado la ocupación de nódulos de raíces de estolones por la cepa nativa 317 evidencia la mayor persistencia de ésta respecto al inoculante comercial, dado que ocupó la mayoría de los nódulos de estolones. Si bien el resultado de nodulación de estolones permite plantear que la cepa 317 tiene mayor persistencia que U204, para determinar esta característica es necesario realizar ensayos en campo en diferentes suelos y tiempos, dirigidos a responder esa pregunta.

3.4.2. Experimento 2: evaluación en campo de las cepas N2, 249 y 317

En el experimento 2 se evaluó la performance de las cepas N2 y 249, seleccionadas por su competitividad usando al delator *gusA*, y se incluyó a la cepa 317. Los ensayos se instalaron en lomadas de la UEPP sobre campo natural y en vertisoles de Glencoe en campo con historia de trébol blanco. En ambos sitios se sembraron 4

repeticiones de cada tratamiento, definidos como inoculación con las cepas experimentales N2, 249 y 317, con el inoculante comercial U204 y control sin inocular (Cuadro 13). Al momento de la inoculación de las semillas los inoculantes de las tres cepas tenían un número de rizobios en turba mayor al requerido por MGAP (2×10^9 rizobios/g de turba).

Cuadro 13. Esquema de instalación del experimento 2. El ensayo se realizó en la UEPP y en Glencoe. Los tratamientos fueron: inoculación con 317, N2, 249 y el inoculante comercial (U204) y un control sin inocular (SI). El diseño fue un DBCA y la unidad experimental fue la parcela.

Bloque	Parcela 1	Parcela 2	Parcela 3	Parcela 4	Parcela 5
1	249	317	SI	U204	N2
2	N2	U204	249	317	SI
3	U204	249	SI	317	N2
4	SI	N2	U204	317	249

3.4.2.1. NMP de rizobios que nodulan trébol blanco en los suelos

Previo a la instalación de cada ensayo se determinó el NMP de rizobios capaces de nodular trébol blanco. En suelo CH de Glencoe y con un contenido de 3,9 % de C orgánico, el NMP fue de 5×10^1 rizobios/g en suelo, el mismo que el obtenido en muestras de los cilindros con ese suelo, 12 meses antes. En la UEPP SH y con un contenido de 1,9 % de C orgánico, el NMP fue 3×10^1 rizobios/g en suelo, similar al obtenido con muestras del mismo suelo en el ensayo de cilindros. La cantidad de rizobios en suelo en muestras de campo y en muestras de suelo del ensayo en cilindros, confirman que hay una baja población de rizobios en Glencoe con historia de inoculación de trébol blanco de 20 años, y también pone en evidencia la baja persistencia de la cepa del inoculante comercial, U204, en este suelo.

De todas formas, si bien la cantidad de rizobios en ese suelo es baja, las poblaciones nativas serían competitivas ya que ocuparon más de un 70 % de los nódulos (Cuadro 7). Batista *et al.* (2015) obtuvieron valores similares de rizobios que nodulan trébol rojo en Tambores, un predio cercano a Glencoe, situado también sobre vertisoles háplicos de Basalto, pero SH. A diferencia de lo ocurrido en Glencoe, la población de rizobios nativos de Tambores no fue competitiva en trébol rojo con las cepas usadas como inoculantes, U204 y 317.

3.4.2.2. Implantación de trébol blanco con los diferentes inoculantes

La implantación en la UEPP se determinó a través de conteos de plantas a los 30 y a los 60 días después de la siembra, en 2 cuadros por parcelas y por tratamiento. En Glencoe se realizaron conteos a los 30 y a los 60 días en 8 cuadros por parcela y por tratamiento.

En la UEPP no hubo diferencia en la implantación entre los tratamientos inoculados, ni entre ellos y el tratamiento control, a los 30 días y a los 60 días después de la siembra (Cuadro 14). Sin embargo, el valor absoluto del número de plantas por m² fue casi el doble en los tratamientos inoculados con las cepas 317 y U204 respecto al control sin inocular.

En Glencoe hubo diferencia en la implantación entre los tratamientos. A los 30 días, en los tratamientos con las cepas U204, 249 y N2, el número de plantas por m² fue aproximadamente el doble que el de las parcelas sin inocular e inoculadas con la cepa 317 (Cuadro 15). A los 60 días las parcelas correspondientes a los tratamientos con las cepas N2 y 249 presentaron casi el doble de número de plantas por m², con diferencias significativas en la implantación respecto a los tratamientos con las cepas 317, U204 y sin inocular (Cuadro 15). En este suelo la implantación no fue mayor cuando se inoculó con las cepas 317 y U204, presentando valores similares a las parcelas sin inocular.

Cuadro 14. Implantación de trébol blanco en la UEPP. El conteo de plantas por m² se realizó a los 30 y 60 días después de la siembra. SI, tratamiento control sin inocular. Letras diferentes indican diferencias significativas entre medias dentro de cada momento de conteo según DGC con p<0,05.

Momento del conteo (días)	Tratamiento	N° plantas/m ²
30	U204	95 ± 17 A
	317	108 ± 17 A
	249	79 ± 17 A
	N2	76 ± 17 A
	SI	72 ± 17 A
60	U204	131 ± 30 A
	317	163 ± 30 A
	N2	103 ± 30 A
	249	84 ± 30 A
	SI	82 ± 30 A

Cuadro 15. Implantación de trébol blanco en Glencoe. El conteo de plantas por m² se realizó a los 30 y 60 días después de la siembra. SI, tratamiento control sin inocular. Letras diferentes indican diferencias significativas entre medias dentro de cada momento de conteo según DGC con p<0,05.

Momento del conteo (días)	Tratamiento	N° plantas/m ²
30	U204	140 ± 21 A
	317	91 ± 16 B
	249	189 ± 28 A
	N2	139 ± 21 A
	SI	76 ± 15 B
60	U204	89 ± 15 B
	317	89 ± 14 B
	249	160 ± 23 A
	N2	148 ± 21 A
	SI	78 ± 14 B

3.4.2.3. Producción de biomasa y ocupación de nódulos

La producción de biomasa en la UEPP se determinó en dos cortes, a los 6 y a los 7 meses, y en Glencoe en cuatro cortes realizados a los 6, 7, 10, 12 meses. La producción se analizó como biomasa acumulada en cada fecha y la FBN se determinó por abundancia isotópica de ^{15}N a los 7 meses. Para analizar la ocupación de nódulos, 7 meses después de sembrados los ensayos se aislaron rizobios de 10 nódulos de raíces principales, 10 nódulos de raíces secundarias y 10 nódulos de raíces de estolones, por cada repetición. Los perfiles ERIC de los 1.200 aislamientos se analizaron con el programa GelCompar, y los resultados de ocupación por el inoculante utilizado en cada caso o por las cepas del suelo se analizaron con un modelo lineal generalizado mixto, usando como variable de respuesta los nódulos ocupados por cada cepa y como covariable los nódulos totales (Cuadros 16, 17 y 18).

La producción de biomasa se analizó en primera instancia usando como covariable el número de plantas, pero no fue significativo el uso de la implantación como covariable. Esto indica que si hay un aumento o disminución significativa de la biomasa, ese efecto no se deberá a las diferencias producidas en la implantación.

En los cuadros 16 y 17 se presentan los resultados de la producción de biomasa, el N proveniente de la FBN y la ocupación de nódulos por cada cepa en la UEPP y en Glencoe respectivamente.

La producción de biomasa acumulada en la UEPP tuvo diferencias entre los tratamientos de inoculación con las diferentes cepas. A los 7 meses de la siembra la biomasa acumulada fue mayor en los tratamientos con las cepas N2 y U204. Sin embargo, la FBN estimada como abundancia natural del ^{15}N en hoja, fue la similar en todos los tratamientos. Los rizobios además de aportar N pueden tener otros efectos promotores de crecimiento vegetal como producir fitohormonas y/o solubilizar fosfato (Datta *et al.*, 2015) que podrían explicar estos resultados.

Los valores de abundancia isotópica encontrada en otras simbiosis rizobio – leguminosa utilizando la misma metodología por Broos *et al.* (2004), fueron en

general menores que la nuestras. Los valores de % de FBN obtenidos en la UEPP presentaron poca variación y fueron altos, entre 94 a 97 % (Cuadro 16). Por su parte Eriksen y Høgh-Jensen (1998) usaron la misma metodología en trébol blanco y observaron mayores variaciones en las parcelas, entre 64 y 92 % de FBN y mayor variación aún en parcelas pastoreadas, entre 12 y 96 % de FBN. Por otro lado Broos *et al.* (2004), establecieron una correlación positiva entre el NMP y el % de FBN, e indican que los valores entre 10^1 y 10^3 rizobios/g de suelo presentaron en promedio 66 % de FBN. En la UEPP con 3×10^1 rizobios/g de suelo el % de FBN fue 98 % (Cuadro 16). Es posible que las diferencias en el % FBN entre los tratamientos se observen en un mayor tiempo de crecimiento de trébol, o bien en otros órganos de la planta, dado que nosotros determinamos sólo en hoja. Varin *et al.* (2010) determinaron que el contenido de N total en diferentes órganos de la planta que fue, en mg/g de muestra, 37 en nódulos, 32 en estolones, 20 en hojas y 17 en raíces.

Respecto a la ocupación de nódulos en la UEPP, la cepa U204 ocupó un 30 % de los nódulos (Cuadro 16), lo que demuestra una vez más que la cepa usada como inoculante comercial es poco competitiva. Las cepas nativas promisorias ocuparon más del doble que la cepa comercial, la cepa N2 ocupó el 77 % de los nódulos, la 317 el 63 % y la 249 el 60 %, sin diferencias entre ellas. La producción de biomasa y la ocupación de nódulos por la cepa N2 indican que además de eficiente es competitiva. La cepa 317 ocupó alto porcentaje de nódulos pero la producción de biomasa en este ensayo, a los 7 meses fue menor al resto de los tratamientos. Sin embargo, al año fue junto con N2 los tratamientos que produjeron más biomasa (Gerónimo Cardozo, comunicación personal 12 de diciembre de 2016).

Cuadro 16. Evaluación de inoculantes en suelo de la UEPP. 1er corte y 2do corte corresponden a la biomasa acumulada a los 6 y 7 meses respectivamente después de la siembra. SI, tratamiento control sin inocular. La biomasa se expresa como materia seca. Letras diferentes indican diferencias significativas según DGC con $p < 0,05$.

Cepa	1er corte (kg MS/ha)	2do corte (kg MS/ha)	% de FBN	Ocupación de nódulos
U204	760 ± 187 A	1361 ± 77 A	94,54 ± 1,87 A	0,30 ± 0,07 B
317	295 ± 62 B	587 ± 49 C	97,40 ± 1,87 A	0,63 ± 0,08 A
249	362 ± 77 B	725 ± 53 B	96,72 ± 1,87 A	0,60 ± 0,08 A
N2	769 ± 190 A	1632 ± 119 A	94,54 ± 1,87 A	0,77 ± 0,07 A
SI	547 ± 126 A	970 ± 57 B	95,50 ± 1,87 A	

Los perfiles ERIC de los aislamientos mostraron una diversidad similar en parcelas sin inocular en la UEPP y en Glencoe de 2,5 y 2,1 respectivamente. Resultados similares fueron obtenidos por Batista (2013) en trébol rojo en suelos SH (H=2,6) y CH (H=2,2-2,4). No hubo contaminación del control sin inocular con los inoculantes ensayados, ni entre las parcelas inoculadas.

Las cepas nativas tienen un potencial fijador que puede explicar por qué en algunos casos la producción de praderas no inoculadas, o en las que falló la aplicación del inoculante como por ejemplo períodos secos pos-siembra, se logra una producción de biomasa aceptable. De todas formas los rizobios nativos presentes en este suelo son más competitivos que el inoculante comercial pero menos que las cepas promisorias N2, 317 y 249. En general, las cepas nativas suelen estar adaptadas a las condiciones bióticas y abióticas prevalentes respecto a las cepas introducidas (Batista *et al.*, 2015).

En suelo CH de Glencoe solo se determinaron diferencias en el primer corte a los 6 meses de la siembra, cuando los tratamientos con las cepas N2 y 317 produjeron

más biomasa (Cuadro 17). A los 7 meses la biomasa acumulada no presentó diferencias, pero N2 y 317 produjeron 1,6 veces más biomasa que los tratamientos sin inocular e inoculadas con U204. El % de FBN fue en general menor que en la UEPP y sin diferencia entre los tratamientos.

Cuadro 17. Evaluación de inoculantes en suelo de Glencoe. 1er corte y 2do corte corresponden a la biomasa acumulada a los 6 y 7 meses respectivamente después de la siembra. SI, tratamiento control sin inocular. La biomasa se expresa como materia seca. Letras diferentes indican diferencias significativas según DGC con $p < 0,05$.

Cepa	1er corte (kg/ha)	2do corte (kg/ha)	% de FBN	Ocupación de nódulos
U204	106 ± 35 B	662 ± 133 A	60,63 ± 10,10 A	0,42 ± 0,08 B
317	260 ± 35 A	1044 ± 133 A	70,48 ± 10,10 A	0,51 ± 0,08 AB
249	116 ± 35 B	838 ± 133 A	84,37 ± 10,10 A	0,73 ± 0,07 A
N2	222 ± 35 A	1060 ± 313 A	78,98 ± 10,10 A	0,69 ± 0,08 AB
SI	108 ± 35 B	648 ± 313 A	62,56 ± 10,10 A	

La ocupación de nódulos por el inoculante comercial a los 7 meses en suelo de Glencoe fue el 42 %. La cepa 249 ocupó el mayor número de nódulos y con diferencias respecto al inoculante comercial, 73 % de los nódulos, pero sin diferencias significativas con las cepas N2 y 317, que ocuparon el 69 % y 51 % de los nódulos respectivamente (Cuadro 17). No hubo contaminación del control con los inoculantes ensayados, ni entre las parcelas inoculadas.

Tanto en Glencoe como en la UEPP el inoculante comercial presentó la menor competitividad entre los inoculantes evaluados. Estos resultados coinciden con los obtenidos en los mismos suelos y con los mismos clones marcados con el gen *gusA* (Cuadro 9). Por su parte Batista *et al.* (2015) también determinaron una baja

ocupación por U204::*gusA* en suelo CH de La Estanzuela, 26 % de los nódulos, pero alta ocupación, 98 %, en suelos SH de Tambores y de la UEPP.

Por otro lado se pudo observar que las raíces principales y secundarias presentan una diversidad de perfiles similares a U204, con patrones que difieren en pocas bandas, lo que permite sugerir que se trata de cepas naturalizadas derivadas del inoculante comercial. Este sitio ha sido inoculado durante 20 años con la cepa U204.

Los perfiles ERIC obtenidos en Glencoe en raíz principal y secundaria difieren de los obtenidos en nódulos de raíces de estolones, que además presentaron un perfil predominante diferente al resto, inclusive a los de la UEPP. Además, las cepas nativas - naturalizadas son más competitivas que U204, igualmente competitivas que 317, y menos competitivas que las cepas 249 y N2 (Cuadro 17).

La ocupación de nódulos por las cepas, según el tipo de raíz, se estimó como la proporción de perfiles iguales al inoculante usado en relación al número total de nódulos (Cuadro 18). Se observó que en las raíces principales, secundarias y de estolón, la cepa U204 ocupó menor número de nódulos, excepto en la raíz principal de las plantas de Glencoe, donde no se obtuvieron diferencias entre los tratamientos. En general la cepa más competitiva por tipo y zona de raíz y por sitio edáfico fue la cepa N2.

En la UEPP en el Experimento 1 la cepa 317 fue más persistente que el inoculante comercial dado que ocupó el 96 % de los nódulos de raíces de estolones, mientras que la cepa U204 ocupó un 12 %. Sin embargo en el Experimento 2, la cepa 317 disminuyó la ocupación al 47 % de los nódulos y la cepa U204 se mantuvo en valores bajos (9 % de nódulos) en la raíces de estolones.

Cuadro 18. Ocupación de nódulos en raíces y de estolón en la UEPP y en Glencoe. Letras diferentes indican diferencias significativas según DGC con $p < 0,05$ dentro de cada tipo de raíz y a su vez dentro de cada sitio y.

Sitio	Raíz	Cepa	Proporción de nódulos ocupados
Glencoe	Principal	N2	0,80 ± 0,07 A
		249	0,78 ± 0,07 A
		317	0,60 ± 0,08 A
		U204	0,58 ± 0,08 A
	Secundaria	N2	0,84 ± 0,08 A
		249	0,68 ± 0,07 AB
		317	0,42 ± 0,09 B
		U204	0,53 ± 0,08 B
	Estolón	N2	0,51 ± 0,09 A
		249	0,77 ± 0,07 A
		317	0,73 ± 0,13 A
		U204	0,13 ± 0,05 B
UEPP	Principal	N2	0,91 ± 0,04 A
		249	0,39 ± 0,08 B
		317	0,87 ± 0,05 A
		U204	0,61 ± 0,08 B
	Secundaria	N2	0,73 ± 0,07 A
		249	0,71 ± 0,09 A
		317	0,58 ± 0,08 A
		U204	0,17 ± 0,06 B
	Estolón	N2	0,68 ± 0,08 AB
		249	0,79 ± 0,08 A
		317	0,47 ± 0,08 B
		U204	0,09 ± 0,04 C

En el cuadro 19 se presentan los resultados de la producción de biomasa a los 12 meses en Glencoe. Las cepas nativas promisorias produjeron mayor biomasa que el inoculante comercial, que produjo menos forraje que el control sin inocular. La cepa 317 produjo la mayor cantidad de biomasa, seguida por N2 y por 249, diferentes entre sí. Estas cepas fueron más persistentes que la cepa U204, lo que podría estar relacionado con la mayor producción de biomasa por las plantas generadas a partir de estolones con nódulos inducidos por ellas.

Cuadro 19. Producción biomasa acumulada en Glencoe. 4to corte corresponde a la biomasa acumulada a los 12 meses. SI, tratamiento control sin inocular. La biomasa se expresa como materia seca. Letras diferentes indican diferencias significativas según DGC con $p < 0,05$.

Tratamiento	4to corte (kg/ha)
U204	735 ± 238 E
317	2061 ± 133 A
249	1651 ± 138 C
N2	1847 ± 135 B
SI	1304 ± 153 D

Denton *et al.* (2003), observaron que el inoculante para *T. alexandrinum* usado en Australia, formó nódulos principalmente en los primeros 5 cm de las raíces, y muy pocos nódulos en zonas más alejadas. Los autores proponen que si las cepas usadas como inoculantes se restringen a los primeros centímetros de las raíces, la FBN en el campo puede ser significativamente reducida cuando los nódulos formados en las secciones inferiores están ocupados por cepas con baja eficiencia simbiótica.

3.5. CARACTERIZACIÓN DE AISLAMIENTOS DE TRÉBOL POLIMORFO

3.5.1. Identificación de aislamientos por perfiles ERIC

Se obtuvieron 43 aislamientos de rizobios de nódulos de trébol polimorfo colectados en suelos SH de Glencoe (Tacuarembó), La Magnolia (Tacuarembó), Cuchilla de los Ladrones (Treinta y Tres), UEPP (Treinta y Tres) y Arequita (Lavalleja). Los aislamientos se realizaron a partir de 2-3 nódulos por planta tomados de diferentes zonas de la raíz. Se generaron perfiles ERIC y se evaluaron mediante análisis de conglomerados, lo que permitió distinguir 14 tipos diferentes, designados P1, P2, P3, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P18 y P21 (Figura 9).

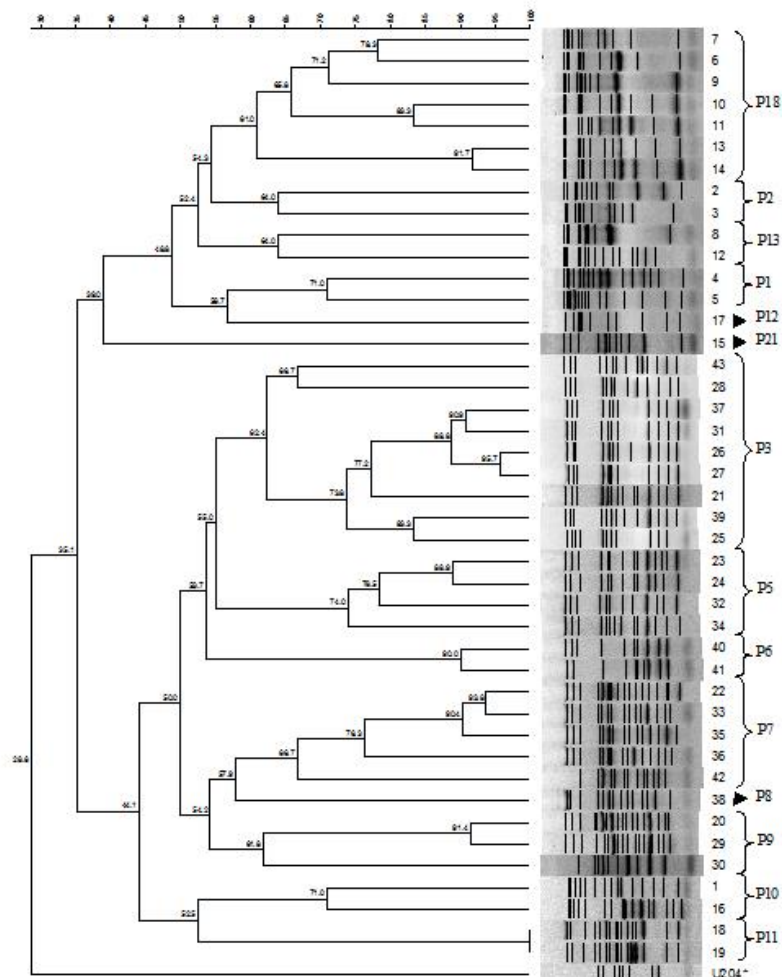


Figura 9. Dendrograma con perfiles ERIC de aislamientos de trébol polimorfo y la cepa U204. Se consideran iguales a los perfiles con al menos el 60 % de bandas.

3.5.2. Eficiencia simbiótica de aislamientos de trébol polimorfo

Se evaluó la eficiencia simbiótica en trébol blanco de las 14 cepas diferentes, estimada como biomasa producida en condiciones controladas. Un grupo de cepas (P1, P2, P12, P13 y P21) estableció simbiosis eficientes, que produjeron más materia seca que el control sin inocular pero menos que U204 (Figura 10). Otro grupo de cepas (P3, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11 y P18) estableció simbiosis ineficientes que produjeron la misma cantidad de materia seca que el control sin inocular (Figura 10).

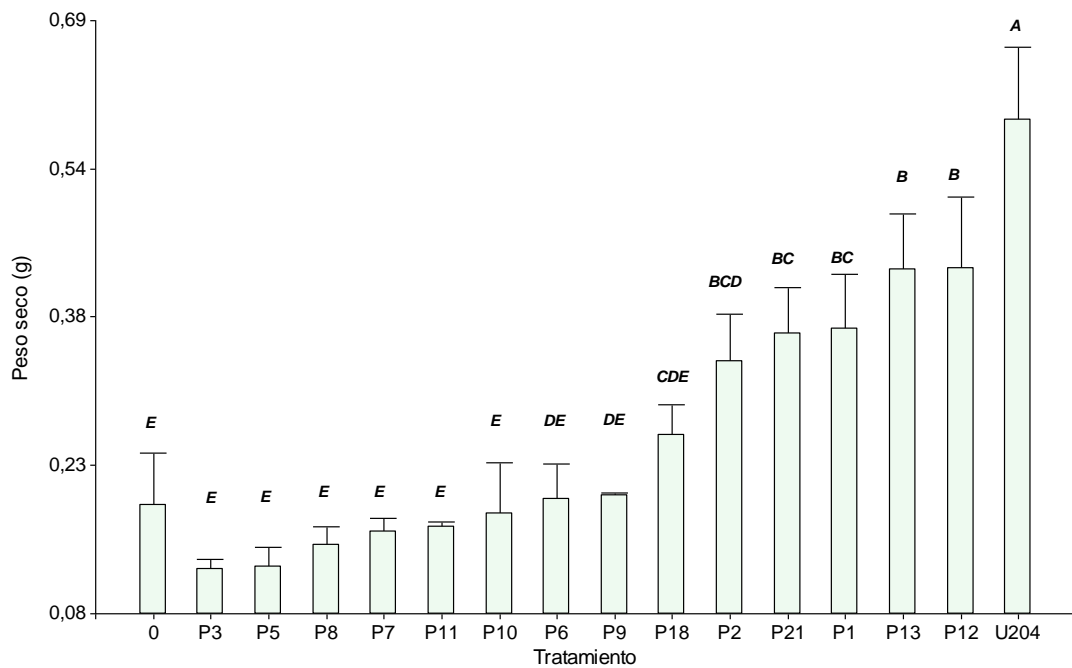


Figura 10. Eficiencia de cepas de trébol polimorfo en trébol blanco. Se incluyó un control inoculado con la cepa U204, inoculante comercial para tréboles y un control sin inocular (0). Letras diferentes indican diferencias significativas según Tukey con $p < 0,05$.

A los 30 días de instalado el ensayo las plantas inoculadas con cepas ineficientes presentaban síntomas de clorosis, lo que determinó que se levantara el ensayo en un tiempo menor al previsto. Las cepas que provienen de suelo de origen edáfico Lomadas del Este de la zona sur del país, presente en la UEPP, en Cuchilla de los

Ladrones y en Arequita, fueron todas ineficientes. A su vez como se observa en la figura 9, estas cepas con una exigencia de similitud del 50 % se ubican en un mismo grupo. Las cepas P10 y P11 que incluyen una cepa proveniente de Glencoe y tres de La Magnolia, también fueron ineficientes y agruparon entre ellas con una exigencia del 50%. Con la misma exigencia, la cepa P18 proveniente de Glencoe agrupó con las cepas P2 y P13 también aisladas de suelo de Glencoe, las cepas P2 y P13 fueron más eficientes que el control sin inocular, y la cepa P18 tiende a producir más biomasa pero sin diferencias con el control sin inocular. La cepa P12 proveniente de La Magnolia y las cepas P1 y P21 de suelo de Glencoe, agrupan juntas y su eficiencia fue mayor al control sin inocular pero menor que U204.

Las cepas aisladas de trébol polimorfo revelan un patrón biogeográfico, tal como observó Zhang *et al.* (2016) en aislamientos de rizobios de trébol blanco de distintos suelos de China. La transferencia lateral de genes simbióticos es una fuente de variación importante en la evolución de los rizobios, que permite la formación de nuevas especies. Probablemente las condiciones bióticas y abióticas de cada sitio en particular, ejerzan una presión de selección sobre los rizobios promoviendo su variación genética y adaptación al medio.

Los resultados de producción de biomasa de los aislamientos de trébol polimorfo en trébol blanco ponen en evidencia que no todas las cepas aisladas de trébol polimorfo establecen relaciones totalmente ineficientes o parásitas en trébol blanco. Por otra parte hay que considerar que el ensayo se realizó en arena:vermiculita, con pH de 6,8 y en un pH ácido, similar al de algunos suelos donde crece naturalmente trébol polimorfo podría favorecer la ocupación por los rizobios de ese trébol al estar mejor adaptados a los suelos ácidos.

El pH del suelo es el mayor determinante del número de poblaciones de *R. meliloti* (Brockwell *et al.*, 1991). En suelo con pH 7,0 la cantidad de rizobios determinada por NMP por éstos autores fue de $8,9 \times 10^4$ /g. Pero cuando el pH fue menor a 6,0 la población disminuyó a 37 rizobios/g de suelo, y en dos suelos con pH 5,4 y 5,5 no se

detectó *R. meliloti*. En el suelo de la UEPP el pH es 5,9 y el de Glencoe 5,7, lo que puede explicar el bajo número de rizobios que nodulan trébol determinados en ellos.

Para evaluar la eficiencia simbiótica de cepas aisladas de trébol polimorfo en ese mismo trébol, se utilizó a las cepas P3 y P18 ineficientes en trébol blanco. Se incluyó un control sin inocular y otro inoculado con la cepa U204. En plantas crecidas 60 días se determinó la producción de la biomasa aérea y biomasa total, sumando el peso seco de las raíces dado que trébol polimorfo acumula buena parte de la biomasa en el sistema radicular. La cepa P18 fue la que tuvo mayor eficiencia simbiótica en trébol polimorfo, tanto en producción de biomasa aérea como de la planta total (Figura 11). El inoculante comercial U204 y la cepa P3 produjeron igual biomasa aérea y total que el control sin inocular.

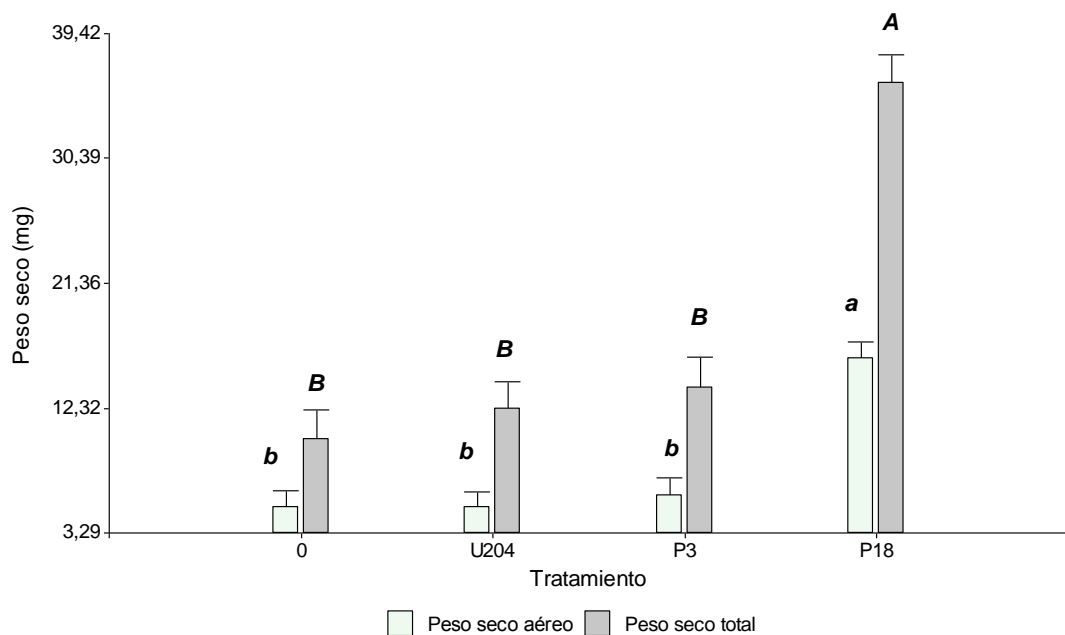


Figura 11. Eficiencia simbiótica en trébol polimorfo. Las cepas P3 y P18 fueron aisladas de trébol polimorfo y la cepa U204 es el inoculante comercial para trébol blanco. 0, corresponde al control sin inocular. Barras en verde claro corresponden al peso seco aéreo y en gris al peso seco total. Letras diferentes indican diferencias significativas para medias de peso seco aéreo (minúsculas) y total (mayúsculas) según Tukey con $p < 0,05$.

3.5.3. Nodulación por cepas ineficientes aisladas de trébol polimorfo

El número de nódulos totales inducidos en trébol polimorfo por las cepas P3, P18 y U204 usada como referencia, se muestran en el cuadro 20. La cepa P3 produjo la mayor cantidad de nódulos (17 nódulos), diferente significativamente al número de nódulos inducidos por la cepa P18 y U204 (11 y 13 nódulos, respectivamente).

Cuadro 20. Nodulación en trébol polimorfo por cepas ineficientes y eficientes en trébol blanco. El ensayo se realizó con 5 macetas por tratamiento, con 5 plantas cada una. Letras diferentes indican diferencias significativas según DGC con $p < 0,05$.

Cepa	Nódulos totales
P18	11 ± 1,3 B
U204	13 ± 1,3 B
P3	17 ± 1,4 A

La cepa P3 fue ineficiente en trébol polimorfo, con la menor producción de biomasa aérea y total, pero indujo el mayor número de nódulos. La cepa P18 fue más eficiente en la producción de biomasa aérea, y la que produjo menos nódulos. Esto sugiere una relación inversa entre el número de nódulos y la producción de biomasa de trébol polimorfo. Resultados similares fueron obtenidos por Melino *et al.* (2012) cuando evaluaron la cepa WSM2304 aislada de trébol polimorfo en *T. subterraneum* y *T. purpureum*. La cepa WSM2304 produjo menos biomasa y el doble de nódulos que una cepa eficiente WSM1325, y llegaron a la conclusión de que es Fix^- en especies diferentes al trébol polimorfo.

Por otra parte, las cepas ineficientes en trébol blanco P3 y P18 se evaluaron respecto a parámetros de nodulación en ese trébol, como la tasa de nodulación, la media del

tiempo de aparición del primer nódulo para cada cepa y el número de nódulos totales promedio por planta (Cuadro 21).

La cepa P3 indujo la formación de nódulos 2 días antes que la cepa U204 (Cuadro 21). La tasa de nodulación de esta cepa fue más alta (0,35 nódulos/día) que la de las cepas U204 y P18 (entre 0,17 y 0,18 nódulos/día, respectivamente). El número total de nódulos en raíces de plantas inoculadas con la cepa P3 fue 6 veces mayor que el inducido por la cepa U204 y unas 3 veces mayor que cuando se inoculó con la cepa P18. Los nódulos inducidos por la cepa P3 tenían color blanco, tamaño pequeño y forma esférica, mientras que los inducidos por las cepas P18 y U204 eran de color marrón y rojo respectivamente, ambos de forma alargada.

Cuadro 21. Nodulación de trébol blanco por cepas aisladas de trébol polimorfo. β corresponde al valor de la pendiente del número de nódulos en función del tiempo en días. 1er Nod, el valor corresponde a la media del tiempo en que apareció el primer nódulo. Nódulos totales corresponde a la media del número de nódulos por planta a los 30 días. Letras diferentes indican diferencias significativas en cada variable según DGC con $p < 0,05$.

CEPA	β	1er Nod en días	Nódulos totales
U204	0,18 B	10 \pm 0,69 A	3 \pm 0,24 B
P18	0,17 B	11 \pm 0,43 A	6 \pm 1,43 B
P3	0,35 A	8 \pm 0,52 B	20 \pm 3,0 A

3.5.4. Secuencia del 16S ARNr

La secuencia del gen 16S ARNr de las cepas P3 y P18 mostró que pertenecen a la especie *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Estas cepas presentan 100 % de similitud con la secuencia de ese gen de las cepas U204, 317, N2 y WSM2304, aislada de trébol polimorfo de Glencoe (Reeve *et al.*, 2010a), y 99 % de similitud con

secuencia de la cepa 249. En la figura 12 se muestra el dendrograma construido con la comparación de secuencias de ese gen entre las cepas analizadas.

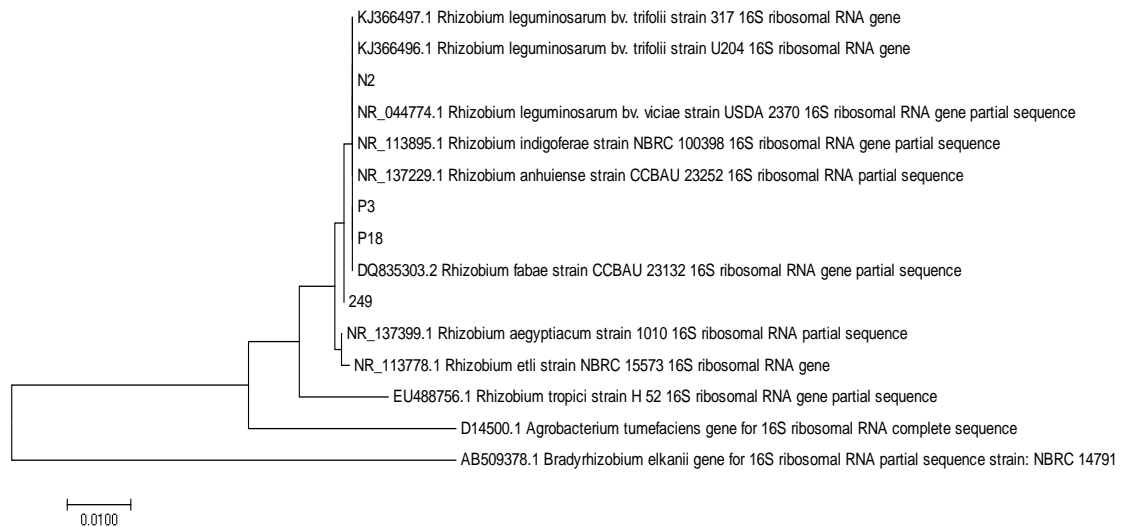


Figura 12. Relaciones filogenéticas basadas en la secuencia del 16S ARNr. Las cepas P3 y P18 son aislamientos de trébol polimorfo, 249, 317 y N2 son aislamientos de trébol rojo y la cepa U204 usada como inoculante comercial, (USA) aislada de trébol rojo. El árbol fue construido usando el método de Neighbor Joining, con el programa MEGA 7.

La cepa WSM2304 es competitiva en trébol polimorfo (Reeve *et al.*, 2010a) y la secuencia del genoma completo se encuentra disponible en NCBI. Cuando compararon el tamaño del genoma de esa cepa con el de la cepa WSM1325 (inoculante comercial para tréboles anuales en Australia), determinaron diferencias en el número de pb y en el número de plásmidos. A pesar de esto la secuencia del gen 16S ARNr es igual. Además, a diferencia de WSM1325, la cepa WSM2304 nodula especies anuales de tréboles como *T. subterraneum* y *T. glanduliferum* pero no fija nitrógeno en ellos, y en tréboles perennes de origen norteamericano y mediterráneo, como el trébol blanco, la nodulación por esta cepa es variable pero siempre es Fix^- (Reeve *et al.*, 2010a; Reeve *et al.*, 2010b). Las relaciones

filogenéticas establecidas con genes simbióticos como *nifH* y los del operón *nodABC* distan muchas veces de las establecidas con los genes cromosomales, principalmente debido a la transferencia horizontal de genes (Laguerre *et al.*, 2001).

3.5.5. Competitividad de la cepa P3 con cepas eficientes en trébol blanco

La coinoculación permite evaluar la competitividad de los rizobios por una leguminosa (Schweiger *et al.*, 2000), para lo que es necesario identificar las cepas, y el uso *gusA* facilita este tipo de estudio (Batista *et al.*, 2015).

Entre las cepas ineficientes – parásitas en trébol blanco aisladas de trébol polimorfo se identificaron 14 cepas (Figura 9), y 5 agrupamientos con una exigencia de 50% de similitud. Con la cepa que produjo menos biomasa en trébol blanco, P3, se realizó un ensayo de coinoculación a efectos de estimar su competitividad con dos cepas eficientes en trébol blanco, para lo que se utilizaron los clones U204::*gusA* y 317::*gusA*. Las plantas en tubos con medio Jensen se inocularon con un inóculo generado con igual cantidad de cada cepa, crecidas entre 2,6 y 4,0 x 10⁷ ufc/mL. La relación entre la cantidad de nódulos azules respecto al total de nódulos se hizo en plantas crecidas 30 días después de la inoculación. En la figura 13 se muestra la proporción de ocupación de nódulos por las cepas eficientes marcadas, en presencia de la cepa P3 ineficiente – parásita en trébol blanco.

Cuando se inoculó con las cepas 317 y P3 en relación 1:1 y 1:2 la cepa 317 ocupó el 100 % de los nódulos. Cuando se inoculó con las cepas U204 y P3 en relación 1:1 la cepa U204 ocupó el 72 % de los nódulos, mientras que cuando se inoculó con una relación 1:2 la cepa U204 ocupó 60 % de los nódulos, en ambos casos con diferencias significativas. Sin embargo no fue significativa la interacción entre la cepa y las proporciones utilizadas (usando una proporción cepa eficiente:cepa ineficiente de 1:1 y 1:2). Este resultado evidencia la mayor competitividad de la cepa 317 respecto al inoculante comercial, si bien no es generalizable al resto de los aislamientos de trébol polimorfo. De todas formas la competitividad de las cepas varía dependiendo de las cepas presentes en el suelo y este ensayo se realizó en condiciones controladas.

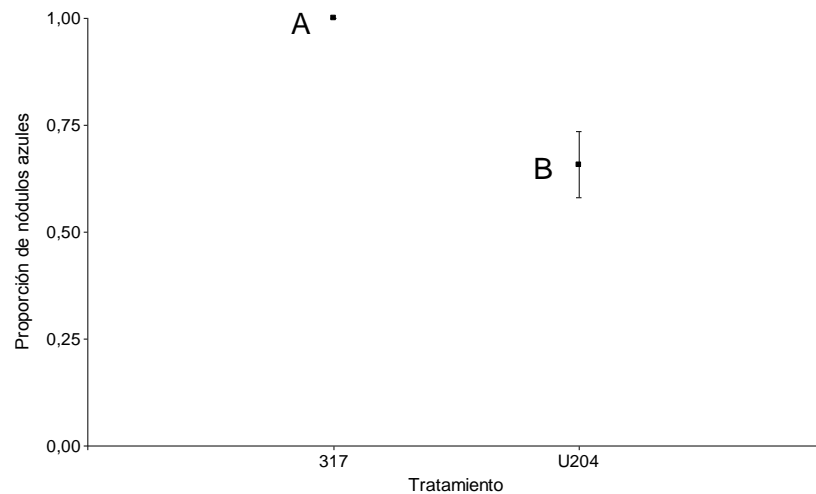


Figura 13. Competitividad de cepas eficientes e ineficientes trébol blanco. Las plantas se coinocularon con P3 y U204::*gusA* y P3 y 317::*gusA*. Nódulos azules corresponden a los ocupados por los clones (*gusA*). Se muestra la proporción de nódulos ocupados por los inoculantes marcados. Letras diferentes indican diferencias significativas según DGC con $p < 0,05$.

En nuestro medio se ha generalizado el término de cepas parásitas para trébol blanco, y se ha planteado que cepas nativas que nodulan trébol polimorfo pueden ser las responsables de la baja producción de praderas o de dificultades en su implantación (Yates *et al.*, 2005; Dutto, 2002; Labandera y Vincent, 1975). Sin embargo no se han realizado trabajos dirigidos a esclarecer esta situación. En este trabajo se generó información puntual sobre la cantidad de cepas que nodulan trébol polimorfo en Glencoe, donde Yates *et al.* (2005) determinaron $3,3 \times 10^4$ rizobios/g de suelo y se caracterizó la WSM2304 proveniente de trébol polimorfo de Glencoe cuyo genoma se encuentra secuenciado (Reeve *et al.*, 2010a).

Nuestros resultados provienen de un ensayo en condiciones controladas y hay factores que pueden hacer variar la competitividad de las cepas en campo, como el pH y otras características del suelo y clima.

Rodríguez Blanco *et al.* (2010) evaluaron la habilidad competitiva del inoculante comercial U204 en relación a cepas nativas aisladas de *T. pratense* de nuestro país. Los ensayos de coinoculación y de eficiencia simbiótica en trébol blanco y rojo,

determinaron que una de las cepas fue ineficiente y no competitiva (T70), mientras que las cepas eficientes (U204 y T26) ocuparon una alta proporción de nódulos. Estos resultados apoyan la hipótesis de 'nodulación selectiva' propuesta por Howieson y Ballard (2004). También Pryor y Lowther (2004) determinaron que el 50 % de la población de rizobios que pueden nodular trébol blanco son ineficientes, y que esta leguminosa presenta una nodulación selectiva con los microsimbiontes eficientes, que ocupan entre el 95 y el 100 % de los nódulos. Yates (2008) también observó que la nodulación selectiva ocurre hasta que la cepa eficiente es superada por una cepa ineficiente en el orden de 1000 veces, y probablemente otras características de las cepas y del suelo interfieran en la simbiosis con cepas eficientes. Sin embargo, Howieson *et al.* (2005) explican la baja ocupación de nódulos en tréboles perennes (7,5 %) debido al bajo número de eficientes en la población del suelo.

Denton *et al.* (2003) con el fin de identificar la ocupación de nódulos de *T. alexandrinum* crecidos en suelos de Australia, coinocularon con el inoculante comercial y determinaron que no fue competitivo frente a cepas naturalizadas. También Wielbo *et al.* (2010) determinaron que en campo, las simbiosis en trébol rojo establecidas por cepas menos eficientes eran las más frecuentes, mientras que las más eficientes eran poco frecuentes (2,5 %).

3.5.6. Anatomía de nódulos de trébol blanco inducidos por cepas ineficientes aisladas de trébol polimorfo

La observación de raíces de trébol blanco de plantas de campo evidencia diversidad en el tamaño, forma, color y cantidad de nódulos presentes en ellas. Lo mismo ocurre con los nódulos de plantas inoculadas con cepas ineficientes o parásitas, como los inducidos por la cepa P3 en trébol blanco.

El análisis de la estructura microscópica de nódulos inducidos por la cepa U204 mostró tres zonas definidas (Figura 14, A1 – A3) la zona I que corresponde al meristemo apical, la zona II de infección y la zona III donde ocurre la FBN en la que se observan células llenas de bacteroides y gránulos de almidón (A3).

Los nódulos inducidos por la cepa P3, tenían color blanco y eran de tamaño pequeño. El análisis microscópico (Figura 14, B1 – B3) permitió observar nódulos deformes, que se encuentran vacíos y en los que no se distinguen las zonas de diferenciación. Melino *et al.* (2012), observaron este fenotipo cuando inocularon con una cepa de *R. leguminosarum* bv *trifolii* a *T. subterraneum*, y con dos cepas de *R. leguminosarum* bv *trifolii* a trébol polimorfo, designando al fenotipo nodular generado como nódulos vegetativos inefectivos. Xiao *et al.* (2014) observaron un fenotipo similar usando el mutante *nf-ya1-1* que forma nódulos que carecen de meristemo o son deficientes en la formación del mismo en plantas de *Medicago truncatula*. El mutante produjo un primordio de nódulo pequeño, con células sin bacteroides.

Los nódulos inducidos por la cepa P18 eran de tamaño similar a los formados por U204, pero a diferencia de éstos la zona senescente era extensa, lo que permite inferir que luego de los 30 días probablemente no sean funcionales y presenten senescencia total (Figura 14, C1 – C3). Una senescencia anticipada observó Melino *et al.* (2012) cuando inoculó *T. subterraneum* y *T. purpureum* con dos cepas de *R. leguminosarum trifolii*. Esta nodulación, a la que denominan sub-óptima, fija N. Los autores indican que los nódulos sub-óptimos son producto de una senescencia temprana de bacteroides funcionales que pueden deberse a respuestas de estrés y de defensas de las plantas, mientras que los nódulos vegetativos inefectivos se asocian con la falla en la endocitosis de la bacteria desde los hilos de infección a las células corticales de las plantas (Melino *et al.*, 2012). Los problemas en los hilos de infección pueden deberse a la cantidad de EPS producidos por los rizobios (Skorupska *et al.*, 1995) o bien por el tipo de EPS producido (Broughton *et al.*, 2006).

Es necesario realizar ensayos dirigidos a evaluar la competitividad si las cepas de trébol polimorfo en condiciones en los suelos donde surgen problemas, son la causa de los problemas de implantación y producción de trébol blanco. La cepa ineficiente P3 es menos competitiva que la cepa U204 en las condiciones evaluadas, pero se deben realizar ensayos en las condiciones reales y con más cepas ineficientes – parásitas para ver su competitividad. Además estos ensayos deben prolongarse más

tiempo, porque los efectos negativos debidos a senescencia temprana se pueden observar en tiempos mayores a los ensayados.

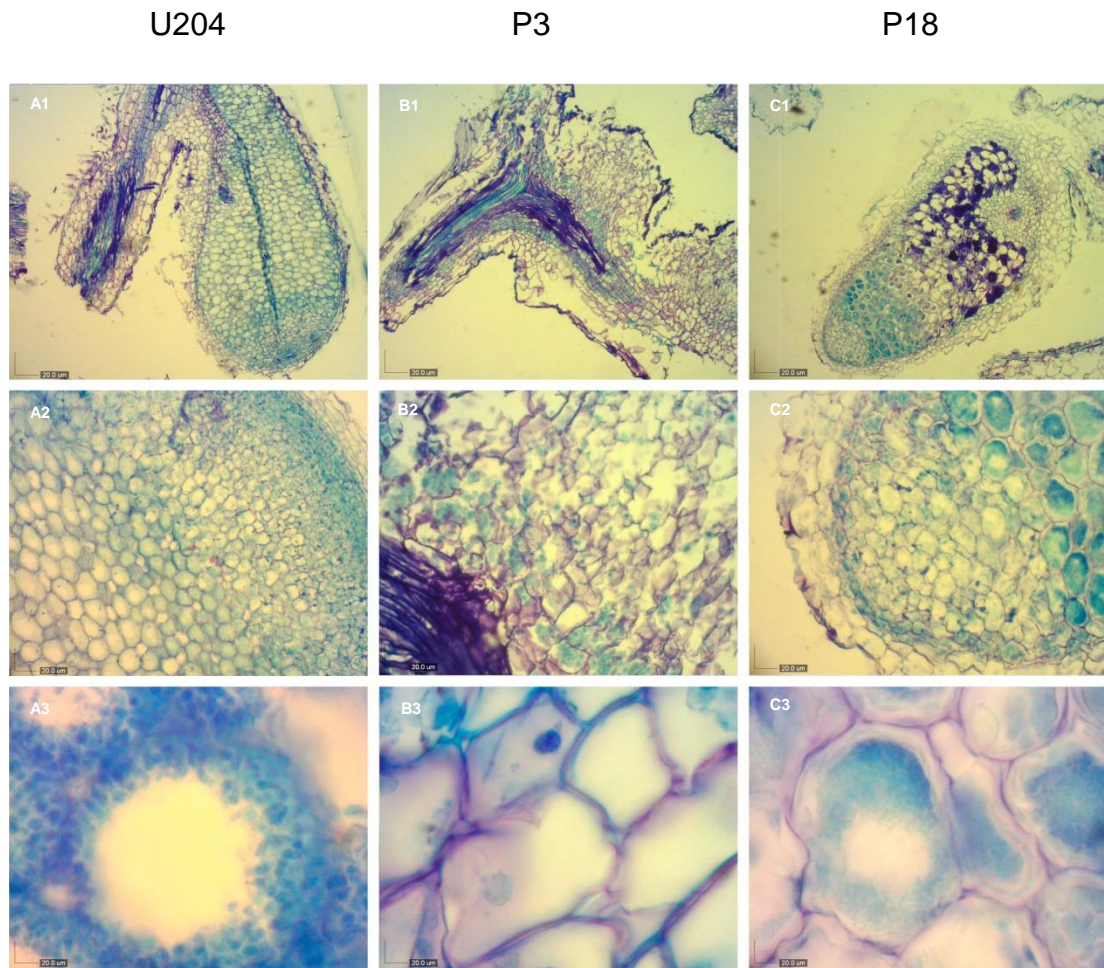


Figura 14. Microscopía de nódulos de trébol blanco ocupados por cepas con diferente eficiencia simbiótica. Cepas P3 y P18 (ineficientes en trébol blanco), y U204 inoculante comercial. Los nódulos se obtuvieron de plantas de 30 días. Los cortes longitudinales de 5 µm de espesor se tiñeron con azul de toluidina. A. Nódulos inducidos por la cepa U204, B. por la cepa P3 y C. por la cepa P18. 1, 2 y 3, captura fotográfica de los cortes utilizando un aumento de 4X, 20X y 100X respectivamente. A2 corresponde a un aumento de 10X. Las imágenes fueron obtenidas con el programa DinoCapture 2.0.

4. CONCLUSIONES

La estrategia propuesta para seleccionar cepas competitivas y evaluarlas en campo es adecuada para desarrollar inoculantes competitivos y eficientes. Esta metodología permite obtener resultados confiables porque relaciona, la implantación, la biomasa producida, el nitrógeno fijado y el porcentaje de ocupación de nódulos por el inoculante.

La mayor competitividad de las cepas N2 y 317 se relacionó con la mayor producción de biomasa en campo de Glencoe, un suelo con historia de inoculación de trébol blanco. El inoculante comercial usado presenta baja competitividad en los suelos problema, lo que hace necesario incorporar la característica de competitividad en las cepas a ser usadas como inoculantes para tréboles.

Se debe reconsiderar la explicación a los problemas de implantación y baja producción de biomasa de trébol blanco a la presencia de cepas de trébol polimorfo (parásitas) debido a que algunas cepas indujeron simbiosis de eficiencia intermedia.

La estructura microscópica de los nódulos inducidos por las cepas ineficientes (P3 y P18) difiere de la estructura de los nódulos inducidos la cepa eficiente (U204). La cepa ineficiente P3 muestra nódulos vacíos y la cepa P18 una senescencia acelerada, lo que demuestra que la nodulación con estas cepas probablemente afecte negativamente al desarrollo de trébol blanco.

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. En: Fontagro 787/05 Ampliación de la base genética de leguminosas forrajeras naturalizadas para sistemas pastoriles sustentables. Montevideo, Uruguay. Procisur (Ed.). Informes Técnicos: Anual II, 72-78.
- 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.
- Alves BJ, Boddey RM, Urquiaga S. 2003. The success of BNF in soybean in Brazil. Plant and soil, 252(1): 1-9.
- Anderson MD, Ruess RW, Uliassi DD, Mitchell JS. 2004. Estimating N₂ fixation in two species of *Alnus* in interior Alaska using acetylene reduction and ¹⁵N₂ uptake. Ecoscience, 11(1): 102-112.
- Annicchiarico P, Carelli M. 2014. Origin of Ladino white clover as inferred from patterns of molecular and morphophysiological diversity. Crop Science, 54(6): 2696-2706.
- Aslam SN, Newman MA, Erbs G, Morrissey KL, Chinchilla D, Boller T, Tandrup Jensen T, De Castro C, Ierano T, Molinaro A, Jackson RW, Knight MR, Cooper RM. 2008. Bacterial polysaccharides suppress induced innate immunity by calcium chelation. Current Biology, 18: 1078-1083.
- Ayala W, Bemhaja M, Cotro B, do Canto J, García J, Olmos F, Real D, Rebuffo M, Reyno R, Rossi C, Silva J. 2010. Forrajeras - Catálogo de Cultivares 2010.

- Cultivos Forrajeros. Montevideo, Uruguay. INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria) (Ed.). 131 p.
- Axmann H, Zapata F. 1990. Stable and radioactive isotopes. En: Use of nuclear techniques in studies of soil- plant relationships. International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria. Hardarson G (Ed.). Training Course Series, 2: 9-23.
- Ballard RA, Charman N, McInnes A, Davidson JA. 2004. Size, symbiotic effectiveness and genetic diversity of field pea rhizobia (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*) populations in South Australian soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(8): 1347-1355.
- Barreto EF, Stralio R, Baldani JJ. 2012. Curing of a non-symbiotic plasmid of the *Rhizobium tropici* strain CIAT 899 affected nodule occupancy and competitiveness of the bacteria in symbiosis with common beans. *European Journal of Soil Biology*, 50: 91-96.
- Bashan Y, de-Bashan LE, Prabhu SR, Hernandez JP. 2014. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant and Soil*, 378(1-2): 1-33.
- Batista L, Irisarri P, Rebuffo M, Coitiño MJ, Sanjuán J, Monza J. 2015. Nodulation competitiveness as a requisite for improved rhizobial inoculants of *Trifolium pratense*. *Biology and Fertility of Soils*, 51(1):11-20.
- Batista L. 2013. Prospección y caracterización de rizobios para el desarrollo de inoculantes para trébol y lotus. Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 28-86.
- 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*, 66: 19-28.
- Berg RK, Loynachan TE, Zablotowicz RM, Lieberman MT. 1988. Nodule

- occupancy by introduced *Bradyrhizobium japonicum* in Iowa soils. *Agronomy Journal*, 80(6): 876-881.
- Brewin NJ. 1991. Development of the legume root nodule. *Annual Review of Cell Biology*, 7(1): 191-226.
- Brockwell J, Bottomley P. 1995. Recent advances in inoculant technology and prospects for the future. *Soil Biology and Biochemistry*, 27(4): 683-697.
- Brockwell J, Pilka A, Holliday RA. 1991. Soil pH is a major determinant of the numbers of naturally occurring *Rhizobium meliloti* in non-cultivated soils in central New South Wales. *Animal Production Science*, 31(2): 211-219.
- Broos K, Uyttendaele M, Mertens J, Smolders E. 2004. A survey of symbiotic nitrogen fixation by white clover grown on metal contaminated soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(4): 633-640.
- Broughton WJ, Hanin M, Relić B, Kopcińska J, Golinowski W, Şimşek Ş, Ojanen-Reuhs T, Reuhs B, Marie C, Kobayashi H, Bordogna B, Le Quéré A, Jabbouri S, Fellay R, Perret X, Deakin WJ. 2006. Flavonoid-inducible modifications to rhamnan O antigens are necessary for *Rhizobium* sp. strain NGR234-legume symbioses. *Journal of Bacteriology*, 188(10): 3654-3663.
- Carámbula M. 2003. Pasturas y forrajes. Potenciales y alternativas para producir forraje. Buenos Aires: Hemisferio Sur. 357 p.
- Cárdenas L, Martínez A, Sánchez F, Quinto C. 2008. Fast, transient and specific intracellular ROS changes in living root hair cells responding to Nod factors (NFs). *The Plant Journal*, 56(5): 802-813.
- 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.

- Cayo P, Rojas F. 2006. Efecto de la inoculación de dos cepas de *Rhizobium* sp en relación a la nodulación del cultivo de pallar (*Phaseolus lunatus* L.) abonado con humus de lombriz en la zona media del valle de Ica. Tesis Ing. Agr. Ica, Perú. Facultad de Ciencias Agropecuarias. 91.
- Coll J, Zarza A. 1992. Leguminosas nativas promisoras: trébol polimorfo y babosita. Boletín de Divulgación, Montevideo, Uruguay, INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria) (Ed.), 22: 7-13.
- 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.
- Date RA. 2000. Inoculated legumes in cropping systems of the tropics. Field Crops Research, 65(2): 123-136.
- Datta A, Singh RK, Kumar S, Kumar S. 2015. An effective and beneficial plant growth promoting soil bacterium “*Rhizobium*”: a review. Annals of Plant Sciences, 4(1): 933-942.
- 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.
- Denison RF. 2000. Legume sanctions and the evolution of symbiotic cooperation by rhizobia. The American Naturalist, 156(6): 567-576.
- 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.
- Denton MD, Coventry DR, Bellotti WD, Howieson JG. 2000. Distribution, abundance and symbiotic effectiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* from alkaline pasture soils in South Australia. *Animal Production Science*, 40(1): 25-35.
- Dewhurst RJ, Delaby L, Moloney A, Boland T, Lewis E. 2009. Nutritive value of forage legumes used for grazing and silage. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 167-187.
- Díaz Lago J, García J, Rebuffo M. 1996. Crecimiento de leguminosas en La Estanzuela. Colonia, Uruguay. INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria) (Ed.). Serie Técnica No. 71: 12.
- Di Ciocco C, Coviella C, Penón E, Díaz-Zorita M, López S. 2013. Short communication. Biological fixation of nitrogen and N balance in soybean crops in the pampas region. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 6(1): 114-119.
- DIEA (Dirección Nacional de Estadísticas Agropecuarias). 2016. Anuario Estadístico Agropecuario 2016 [En línea]. Montevideo: MGAP (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca). Consultado 3 febrero 2017. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/unidad-ejecutora/oficina-de-programacion-y-politicas-agropecuarias/publicaciones/anuarios-diea/anuario2016>.
- DIEA (Dirección Nacional de Estadísticas Agropecuarias). 2010. Anuario Estadístico Agropecuario 2010 [En línea]. Montevideo: MGAP (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca). Consultado 22 enero 2017. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/unidad-ejecutora/oficina-de-programacion-y-politicas-agropecuarias/publicaciones/anuarios-diea/anuario2010>.

políticas-agropecuarias/publicaciones/anuarios-diea/anuario-2010.

- DIEA (Dirección Nacional de Estadísticas Agropecuarias). 2007. Anuario Estadístico Agropecuario 2007 [En línea]. Montevideo: MGAP (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca). Consultado 20 enero 2017. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/unidad-ejecutora/oficina-de-programacion-y-politicas-agropecuarias/publicaciones/anuarios-diea/anuario-2007>.
- Diouf A, Spencer MM, Gueye M. 2000. Use of the *gusA* gene marker in a competition study of the *Rhizobium* strains nodulating the common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Senegal soils. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(4): 337-340.
- Drew EA, Ballard RA. 2010. Improving N₂ fixation from the plant down: Compatibility of *Trifolium subterraneum* L. cultivars with soil rhizobia can influence symbiotic performance. *Plant and Soil*, 327(1-2): 261-277.
- Dutto P. 2002. Recomendaciones para situaciones con problemas: Inoculación de Leguminosas. En: Dutto P (Ed.). *Pasturas*. Montevideo, Uruguay. Instituto Plan Agropecuario. *Revista del Plan Agropecuario*, 102: 54-57.
- Eriksen J, Høgh-Jensen H. 1998. Variations in the natural abundance of ¹⁵N in ryegrass/white clover shoot material as influenced by cattle grazing. *Plant and Soil*, 205(1): 67-76.
- Fabiano E, Arias A. 1991. Competition between a native isolate of *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* and two commercial inoculant strains for nodulation of clover. *Plant and Soil*, 137(2): 293-296.
- Ferguson B J, Indrasumunar A, Hayashi S, Lin MH, Lin YH, Reid DE, Gresshoff PM. 2010. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(1): 61-76.
- Fisher RA, Yates F. 1963. *Statistical tables for biological, agricultural and medical*

- research. En: Oliver and Boyd (Eds.). London, England: Hafner Press. 81.
- Froni L. 2006. Fijación biológica del nitrógeno. En: Universidad de la República (Ed.) Microbiología básica, ambiental y agrícola. Montevideo: Facultad de Agronomía: 191-210.
- Gamas P, de Billy F, Truchet G. 1998. Symbiosis-specific expression of two *Medicago truncatula* nodulin genes, MtN1 and MtN13, encoding products homologous to plant defense proteins. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11(5): 393-403.
- Glyan'ko AK. 2015. Signaling systems of rhizobia (*Rhizobiaceae*) and leguminous plants (*Fabaceae*) upon the formation of a legume-rhizobium symbiosis (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 51(5): 494-504.
- Gourion B, Berrabah F, Ratet P, Stacey G. 2015. *Rhizobium*-legume symbioses: the crucial role of plant immunity. *Trends in Plant Science*, 20(3): 186-194.
- Graham PH, Vance CP. 2003. Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiology*, 131(3): 872-877.
- Grange L, Hungria M. 2004. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(9): 1389-1398.
- 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.
- Hernández L. 2011. Identificación y selección de cepas nativas de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*. Tesis de grado, Montevideo, Facultad de Ciencias, 76.

- 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 Microbiology Ecology*, 30: 87-97.
- Hirsch AM, Lum MR, Downie JA. 2001. What makes the rhizobia-legume symbiosis so special?. *Plant Physiology*, 127(4): 1484-1492.
- Hogh-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.
- Howieson JG, Dilworth MJ. 2016. Working with rhizobia. Australian Centre for International Agricultural Research. 50-54.
- Howieson JG, Yates RJ, O'Hara GW, Ryder M, Real D. 2005. The interactions of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* in nodulation of annual and perennial *Trifolium* spp. from diverse centres of origin. *Animal Production Science*, 45(3): 199-207.
- Howieson J, Ballard R. 2004. Optimising the legume symbiosis in stressful and competitive environments within southern Australia-some contemporary thoughts. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(8): 1261-1273.
- Iannetta PP, Young M, Bachinger J, Bergkvist G, Doltra J, Lopez-Bellido RJ, Walker RL. 2016. A comparative nitrogen balance and productivity analysis of legume and non-legume supported cropping systems: the potential role of biological nitrogen fixation. *Frontiers in Plant Science*, 7.
- 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.

- Izquierdo JA, Nusslein K. 2006. Distribution of extensive *nifH* gene diversity across physical soil microenvironments. *Microbial Ecology*, 51(4): 441-452.
- Jamet A, Mandon K, Puppo A, Hérouart D. 2007. H₂O₂ is required for optimal establishment of the *Medicago sativa/Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *Journal of Bacteriology*, 189(23): 8741-8745.
- Janczarek M, Jaroszuk-Ścisiel J, Skorupska A. 2009. Multiple copies of *rosR* and *pssA* genes enhance exopolysaccharide production, symbiotic competitiveness and clover nodulation in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 96(4): 471-486.
- Jaurena M, Lezama F, Salvo L, Cardozo G, Ayala W, Terra J, Nabinger C. 2016. The Dilemma of Improving Native Grasslands by Overseeding Legumes: Production Intensification or Diversity Conservation. *Rangeland Ecology and Management*, 69:35-42.
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW. 1987. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal*, 6(13): 3901.
- Jones KM, Sharopova N, Lohar DP, Zhang JQ, VandenBosch KA, Walker GC. 2008. Differential response of the plant *Medicago truncatula* to its symbiont *Sinorhizobium meliloti* or an exopolysaccharide-deficient mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(2): 704-709.
- Jones DG, Hardarson G. 1979. Variation within and between white clover varieties in their preference for strains of *Rhizobium trifolii*. *Annals of Applied Biology*, 92(2): 221-228.
- Kiers ET, Rousseau RA, Denison RF. 2006. Measured sanctions: legume hosts detect quantitative variation in rhizobium cooperation and punish accordingly. *Evolutionary Ecology Research*, 8(6): 1077-1086.

- Kiers ET, Rousseau RA, West SA, Denison RF. 2003. Host sanctions and the legume–rhizobium mutualism. *Nature*, 425(6953): 78-81.
- Kondorosi E, Mergaert P, Kereszt A. 2013. A paradigm for endosymbiotic life: cell differentiation of *Rhizobium* bacteria provoked by host plant factors. *Annual Review of Microbiology*, 67: 611-628.
- Kouchi H, Imaizumi-Anraku H, Hayashi M, Hakoyama T, Nakagawa T, Umehara Y, Kawaguchi M. 2010. How many peas in a pod? Legume genes responsible for mutualistic symbioses underground. *Plant and Cell Physiology*, 51(9): 1381-1397.
- 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. 2005. Actividades en fijación biológica de nitrógeno departamento de microbiología de suelos situación actual y perspectivas. *Agrociencia Uruguay*, 9(1-2): 299-303.
- Labandera CA, Vincent JM. 1975. Competition between an introduced strain and native Uruguayan strains of *Rhizobium trifolii*. *Plant and Soil*, 42(2): 327-347.
- Laguerre G, Louvrier P, Allard MR, Amarger N. 2003. Compatibility of rhizobial genotypes within natural populations of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* for nodulation of host legumes. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4): 2276-2283.
- 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(4): 981-993.

Laguerre G, Mavingui P, Allard MR, Charnay MP, Louvrier P, Mazurier SI, Rigotter-Gois L, Amarger N. 1996. Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. Applied and Environmental Microbiology, 62(6): 2029-2036.

Langer R. 1981. Las pasturas y sus plantas. Montevideo, Uruguay. Hemisferio Sur (Ed.), 514 p.

López- García SL, Vázquez TE, Favelukes G, Lodeiro AR. 2002. Rhizobial position as a main determinant in the problem of competition for nodulation in soybean. Environmental microbiology, 4(4): 216-224.

López-Gómez M, Sandal N, Stougaard J, Boller T. 2011. Interplay of flg22-induced defence responses and nodulation in *Lotus japonicus*. Journal of Experimental Botany, 291.

Louis S, Silvera K, Andrade JL, Dawson TE. 2005. El uso de isótopos estables en biología tropical. Interciencia, 30(9): 536-542.

MacDonald CA, Clark IM, Hirsch PR, Zhao FJ, McGrath SP. 2011. Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Rhizobium leguminosarum* bacteria and discrimination between different biovars in zinc-contaminated soil. Applied and Environmental Microbiology, 77(13): 4626-4633.

Mariotti A. 1983. Atmospheric nitrogen is a reliable standard for natural ¹⁵N abundance measurements. Nature, (303): 685-687.

Martyniuk S, Oron, J. 2008. Populations of rhizobia in some Polish soils not planted with legumes. Ekologija, 54: 165-168.

- Mauchline TH, Hayat R, Roberts R, Powers SJ, Hirsch PR. 2014. Assessment of core and accessory genetic variation in *Rhizobium leguminosarum* symbiovar *trifolii* strains from diverse locations and host plants using PCR- based methods. *Letters in Applied Microbiology*, 59(2): 238-246.
- Melino VJ, Drew EA, Ballard RA, Reeve WG, Thomson G, White RG, O'Hara GW. 2012. Identifying abnormalities in symbiotic development between *Trifolium* spp. and *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* leading to sub-optimal and ineffective nodule phenotypes. *Annals of Botany*, 110(8): 1559-1572.
- MGAP (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca). 2013. Dirección General de Servicios Agrícolas [En línea]. En: Sistema de control de calidad de inoculantes: Protocolo de registro de semilla Pre-inoculada. Montevideo. Consultado 15 abril 2014. Disponible en: <https://www.mgap.gub.uy/dgsainoculantesweb/PublicTempStorage/protocolo%20registro%20pre-inoculados216115.pdf>.
- Minchin FR, Witty JF, Sheehy JE, Müller M. 1983. A major error in the acetylene reduction assay: decreases in nodular nitrogenase activity under assay conditions. *Journal of Experimental Botany*, 34(5): 641-649.
- 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.
- Moschetti G, Peluso A, Protopapa A, Anastasio M, Pepe O, Defez R. 2005. Use of nodulation pattern, stress tolerance, *nodC* gene amplification, RAPD-PCR and RFLP-16S rDNA analysis to discriminate genotypes of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *Systematic and Applied Microbiology*, 28(7): 619-631.
- Nangul A, Moot DJ, Brown D, Ridgway HJ. 2013. Nodule occupancy by *Rhizobium leguminosarum* strain WSM1325 following inoculation of four annual

- Trifolium* species in Canterbury, New Zealand. New Zealand Journal of Agricultural Research, 56(3): 215-223.
- Oldroyd GE, Murray JD, Poole PS, Downie JA. 2011. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. Annual Review of Genetics, 45: 119-144.
- Patrick HN, Lowther WL. 1995. Influence of the number of rhizobia on the nodulation and establishment of *Trifolium ambiguum*. Soil Biology and Biochemistry, 27(4-5): 717-720.
- Penna C, Massa R, Olivieri F, Gutkind G, Cassán F. 2011. A simple method to evaluate the number of bradyrhizobia on soybean seeds and its implication on inoculant quality control. AMB Express, 1(1): 21.
- Peoples MB, Palmer B, Lilley DM, Duc LM, Herridge DF. 1996. Application of N-15 and xylem ureide methods for assessing N₂ fixation of three shrub legumes periodically pruned for forage. Plant and Soil, 182: 125-137.
- Pryor HN, Crush JR. 2006. Elevated populations of effective rhizobia in the rhizoplane of white clover growing in pasture. New Zealand Journal of Agricultural Research, 49(1): 85-87.
- Pryor HN, Lowther WL. 2004. Caucasian clover rhizobia are not a threat to nitrogen fixation by white clover. Proceedings New Zealand Grassland Association, 66: 285-289.
- Pryor HN, Lowther WL, McIntyre HJ, Ronson CW. 1998. An inoculant *Rhizobium* strain for improved establishment and growth of hexaploid Caucasian clover (*Trifolium ambiguum*). New Zealand Journal of Agricultural Research, 41(2): 179-189.
- Punschke K. 2010. Colección Nacional de cepas de *Rhizobium* spp. [En línea]. Departamento de Microbiología de Suelos, Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Montevideo, Uruguay, 18 p. Consultado 10 abril 2014.

Disponible en: <https://www.mgap.gub.uy/dgsainoculantesweb/inicioweb.aspx>

- Ramu SK, Peng HM, Cook DR. 2002. Nod factor induction of reactive oxygen species production is correlated with expression of the early nodulin gene *rip1* in *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(6): 522-528.
- Rebuffo M, Bemhaja M, Risso D. 2006. Utilization of forage legumes in pastoral systems: state of art in Uruguay. *Lotus Newsletter*, 3: 22-33.
- Reeve W, O'Hara G, Chain P, Ardley J, Bräu L, Nandesena K, Copeland A. 2010a. Complete genome sequence of *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* strain WSM2304, an effective microsymbiont of the South American clover *Trifolium polymorphum*. *Standards in Genomic Sciences*, 2(1): 66.
- Reeve W, O'Hara G, Chain P, Ardley J, Bräu L, Nandesena K, Tiwari R, Copeland A, Nolan M, Han C, Brettin T, Land M, Ovchinikova G, Ivanova N, Mavromatis K, Markowitz V, Kyrpides N, Melino V, Denton M, Yates R, Howieson J. 2010b. Complete genome sequence of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain WSM1325, an effective microsymbiont of annual Mediterranean clovers. *Stand andars in Genomic Science*, 2(3): 347-356.
- Ribeiro CW, Alloing G, Mandon K, Frendo P. 2015. Redox regulation of differentiation in symbiotic nitrogen fixation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1850(8): 1469-1478.
- 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.
- Robledo M, Jiménez-Zurdo JI, Soto MJ, Velázquez E, Dazzo F, Martínez-Molina E, Mateos PF. 2011. Development of functional symbiotic white clover root

hairs and nodules requires tightly regulated production of rhizobial cellulase CelC2. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(7): 798-807.

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.

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.

Sanford P, Pate JS, Unkovich MJ, Thompson AN. 1995. Nitrogen fixation in grazed and ungrazed subterranean clover pasture in south-west Australia assessed by the ¹⁵N natural abundance technique. *Crop and Pasture Science*, 46(7): 1427-1443.

Santos R, Hérouart D, Sigaud S, Touati D, Puppo A. 2001. Oxidative burst in alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14(1): 86-89.

Schumpp O, Deakin WJ. 2010. How inefficient rhizobia prolong their existence within nodules. *Trends in Plant Science*, 15(4): 189-195.

Schwenke GD, Peoples MB, Turner GL, Herridge DF. 1998. Does nitrogen fixation of commercial, dryland chickpea and faba bean crops in north-west New South Wales maintain or enhance soil nitrogen? *Animal Production Science*, 38(1):61-70.

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.

Shannon CE, Weaver W, 1949. *The Mathematical Theory Of Communication*. The University of Illinois Press, Urbana, pp. 177.

Sigaud S, Becquet V, Frendo P, Puppo A, Hérouart D. 1999. Differential regulation

of two divergent *Sinorhizobium meliloti* genes for HPII-like catalases during free-living growth and protective role of both catalases during symbiosis. *Journal of Bacteriology*, 18: 2634-2639.

Simon T, Salava J. 2006. New *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* isolates: Evaluation of competitiveness for clover nodule occupancy. *Plant soil and Environment*, 52(10): 441.

Skorupska A, Białek U, Urbanik-Sypniewska T, van Lammeren A. 1995. Two types of nodules induced on *Trifolium pratense* by mutants of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* deficient in exopolysaccharide production. *Journal of Plant Physiology*, 147(1): 93-100.

Song L, Carroll BJ, Gresshoff PM, Herridge DF. 1995. Field assessment of supernodulating genotypes of soybean for yield, N₂ fixation and benefit to subsequent crops. *Soil Biology and Biochemistry*, 27(4-5): 563-569.

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.

Speroni G, Izaguirre P. 2003. Características biológicas de la leguminosa nativa promisorio forrajera *Trifolium polymorphum* Poir. (*Fabaceae*, *Faboideae*). *Agrociencia Uruguay*, 7(1): 68-76.

Sprent JI. 2007. Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. *New Phytologist*, 174(1): 11-25.

Stanier RY, Ingraham JL, Wheelis ML, Painter PR. 1996. Relaciones entre estructura y función en las células procarióticas. En: Stanier, Ingraham, Wheelis, Painter (Eds.). *Microbiología*. Barcelona: Editorial Reverté S.A. 155-175.

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.

- Stougaard J. 2000. Regulators and regulation of legume root nodule development. *Plant Physiology*, 124(2): 531-540.
- 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.
- 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 J, 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.
- Thies J, Singleton P, Bohlool B. 1991. Influence of size of indigenous rhizobial population on establishment and symbiotic performance of rhizobia in field legumes. *Applied and Symbiotic Microorganisms* 57: 19-28.
- Thornton FC, Davey CB. 1983. Response of the clover-*Rhizobium* symbiosis to soil acidity and *Rhizobium* strain. *Agronomy Journal*, 75(3): 557-560.
- Toth K, Stacey G. 2015. Does plant immunity play a critical role during initiation of the legume-*rhizobium* symbiosis?. *Frontiers in Plant Science*, 6: 401.
- Unkovich MJ, Pate JS. 2000. An appraisal of recent field measurements of symbiotic N₂ fixation by annual legumes. *Field Crops Research*, 65(2): 211-228.
- Unkovich MJ, Jamieson N, Monaghan R, Barraclough D. 1998. Nitrogen mineralisation and plant nitrogen acquisition in a nitrogen-limited calcareous grassland. *Environmental and Experimental Botany*, 40(3): 209-219.

- Varin S, Cliquet JB, Personeni E, Avice JC, Lemauiel-Lavenant S. 2010. How does sulphur availability modify N acquisition of white clover (*Trifolium repens* L.)?. *Journal of Experimental Botany*, 61(1): 225-234.
- Vasse J, Billy F, Truchet G. 1993. Abortion of infection during the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiotic interaction is accompanied by a hypersensitive reaction. *The Plant Journal*, 4(3): 555-566.
- Versalovic J, Schneider M, De Bruijn FJ, Lupski JR. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 5(1): 25-40.
- 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.
- Vessey JK. 1994. Measurement of nitrogenase activity in legume root nodules: in defense of the acetylene reduction assay. *Plant and Soil*, 158(2): 151-162.
- Vincent J. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. IBP Handbook 15. Oxford. Blackwell Scientific Publications. 6 p.
- Wang D, Yang S, Tang F, Zhu H. 2012. Symbiosis specificity in the legume–rhizobial mutualism. *Cellular Microbiology*, 14(3): 334-342.
- Weir BS. 2016. The current taxonomy of rhizobia. NZ Rhizobia website. Consultado 20 enero 2017. Disponible en: <https://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia>. Actualizado en: Enero, 2016.
- Wiedenhoeft AC. 2006. Plant Nutrition. En: W.G. Hapkins (Eds.), Chelsea House Publications, New York NY, 21 p.
- Wielbo J, Marek-Kozaczuk M, Mazur A, Kubik-Komar A, Skorupska A. 2010. Genetic and metabolic divergence within a *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* population recovered from clover nodules. *Applied and Environmental*

- Microbiology, 76(14): 4593-4600.
- Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18(22): 6531-6535.
- Wilson K, Parra A, Botero L. 1999. Application of the GUS marker gene technique to high-throughput screening of rhizobial competition. *Canadian Journal of Microbiology*, 45(8): 678-685.
- 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.
- Witty JF, Ritz K. 1984. Slow-release ^{15}N fertilizer formulations to measure N_2 -fixation by isotope dilution. *Soil Biology and Biochemistry*, 16(6): 657-661.
- Xiao TT, Schilderink S, Moling S, Deinum EE, Kondorosi E, Franssen H, Kulikova O, Niebel A, Bisseling, T. 2014. Fate map of *Medicago truncatula* root nodules. *Development*, 141(18): 3517-3528.
- Yang ZY, Dean D, Seefeldt LC. 2011. Molybdenum nitrogenase catalyzes the reduction and coupling of CO to form hydrocarbons. *The Journal of Biological Chemistry*, 286: 19417-19421.
- Yates RJ. 2008. Symbiotic interactions of geographically diverse annual and perennial *Trifolium* spp. with *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Tesis de Doctorado. Perth, Australia. Murdoch University. 1-152.
- Yates RJ, Howieson JG, Real D, Reeve WG, Vivas-Marfisi A, O'Hara GW. 2005. Evidence of selection for effective nodulation in the *Trifolium* spp. symbiosis with *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Animal Production Science*, 45(3): 189-198.
- Yates RJ, di Mattia E, O'Hara GW, Real D, Howieson JG. 2003. The role of

Rhizobium leguminosarum bv. *trifolii* in extending (or restricting) the adaptation of *Trifolium* spp. in natural and managed ecosystems. En S. J. Bennett (Ed.), *New Perennial Legumes for Sustainable Agriculture*. Perth: University of Western Australia Press, 116-130.

Zablotowicz RM, Reddy, KN. 2007. Nitrogenase activity, nitrogen content, and yield responses to glyphosate in glyphosate-resistant soybean. *Crop Protection*, 26(3): 370-376.

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.

Zehr JP, Jenkins BD, Short SM, Steward GF. 2003. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environment Microbiology*, 5: 539-554.

Zhang JJ, Jing XY, de Lajudie P, Ma C, He PX, Singh RP, Wang ET. 2016. Association of white clover (*Trifolium repens* L.) with rhizobia of sv. *trifolii* belonging to three genomic species in alkaline soils in North and East China. *Plant and Soil*, 407(1-2): 417-427.

Zipfel C. 2014. Plant pattern-recognition receptors. *Trends in Immunology*, 35(7): 345-351.

6. ANEXOS

6.1. ANEXO I

6.1.1. Medios de cultivo y protocolos experimentales

Medio Jensen (Jensen, 1942)

Reactivos	Cantidad
CaHPO ₄	1 g
K ₂ HPO ₄	0,2 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,2 g
Fe ₃ Cl	0,1 g
Agar	8 g
H ₂ O destilada	1 L
Ph	6,8 - 7,2

Medio extracto de levadura manitol -YEM (Howieson y Dilworth, 2016), con modificaciones.

Reactivos	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
Agar	15 g
H ₂ O destilada	1 L
pH	6,8 - 7,2

El medio original contiene 0,4 g de extracto de levadura que se aumentó a 1 g lo que proporcionó un mejor crecimiento de los rizobios. Para medio sólido, se agregó 5 mL de rojo Congo 0,25 % en agua destilada.

Medio Luria-Bertani - LB (Miller, 1972)

Reactivos	Cantidad
NaCl	5 g
Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
H ₂ O destilada	1 L
Agar	15 g
Ph	6,8 - 7,0

Medio Hornum sin Nitrógeno (Handberg y Stougaard, 1992)

Solución de micronutrientes 100X 1L	
Reactivos	Cantidad
MnSO ₄	0,120 g
H ₃ BO ₃	0,120 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,040 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,040 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,008 g
Solución de macronutrientes 100X 1L	
MgSO ₄ .7H ₂ O	30 g
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	10 g
CaCl ₂ .6H ₂ O	30 g
FeEDTA	2,0 g
KCl	59,6 g

Medio extracto de levadura triptona -TY (Beringer, 1974)

Reactivo	Cantidad
Triptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,9 g
H ₂ O destilada	1 L
Agar	15 g
pH	6,8 - 7,0

Buffer Tris Acetato -TAE (50X)

Reactivo	Cantidad
Tris	121,1 g
EDTA	9,3 g
Ácido acético glacial	28,6 mL
H ₂ O destilada	500 mL
PH	8,2

Gel de agarosa 1 %

100 mL de Buffer TAE (1X, 20 mL 50X en 1 L de agua)

1 g de agarosa

Fundir en microondas y agregar 5 µL de GOODVIEW/SybrSafe

Buffer de carga para electroforesis

Reactivos	Cantidad
BFB - azul de bromofenol	0,25 %

Xc – xilencianol	0,25 %
Glicerol	50 %
H ₂ O MiliQ	completar 1 mL

Adhesivo de Haupt para microscopía de nódulos

Reactivos	Cantidad
Gelatina	1 g
Fenol	2 g
Glicerol	15 mL
H ₂ O MiliQ	completar 100 mL

La gelatina se disuelve previamente en H₂O destilada a 30-35 °C.

6.2. ANEXO II

6.2.1. Ejemplos representativos de análisis de clúster del Experimento 1 (2014)

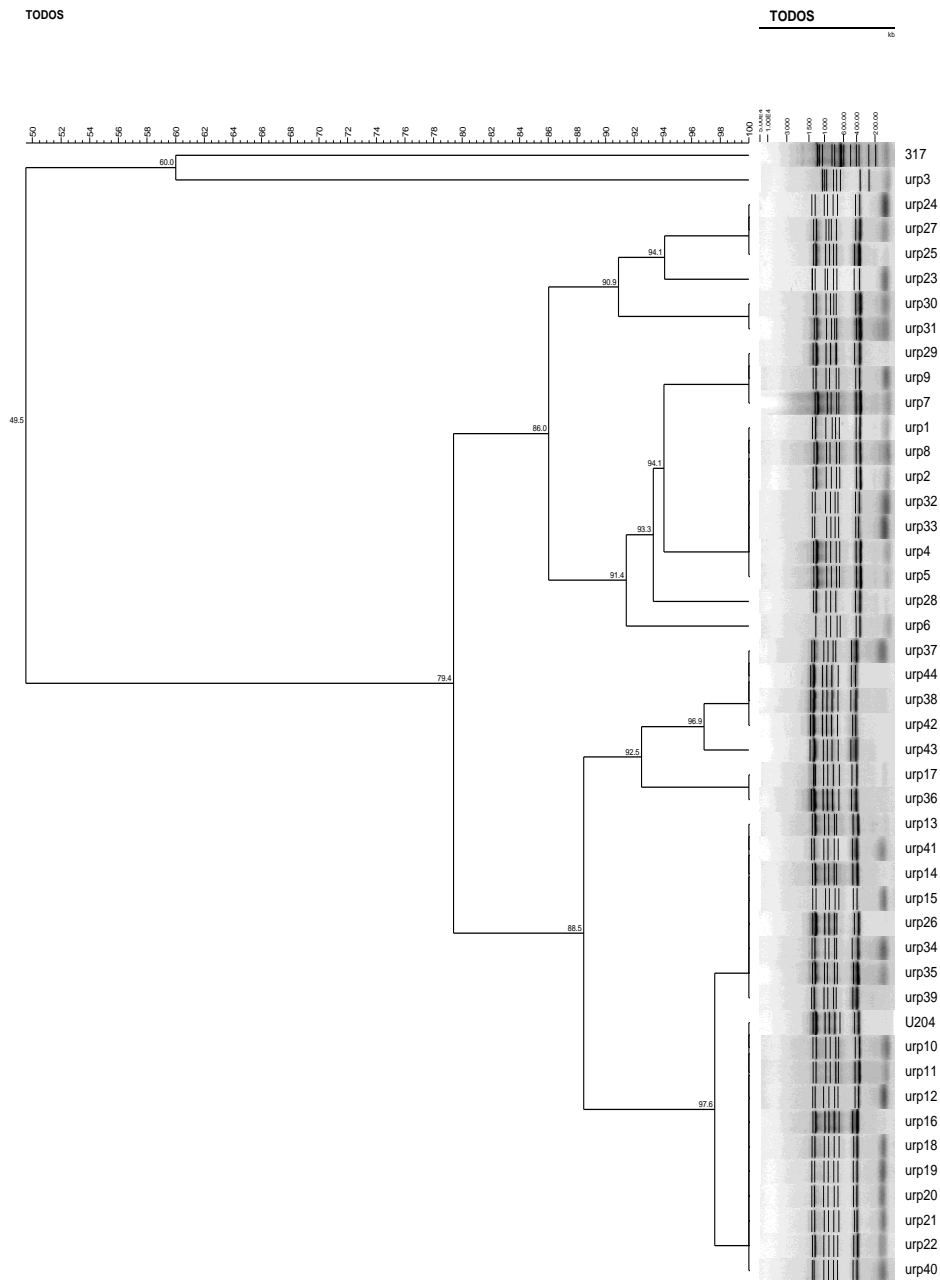


Figura 15A. Análisis de clúster de los perfiles ERIC de nódulos de raíces principales. Semillas inoculadas con la cepa U204. Se consideran iguales perfiles con más del 70% de similitud según Dice.

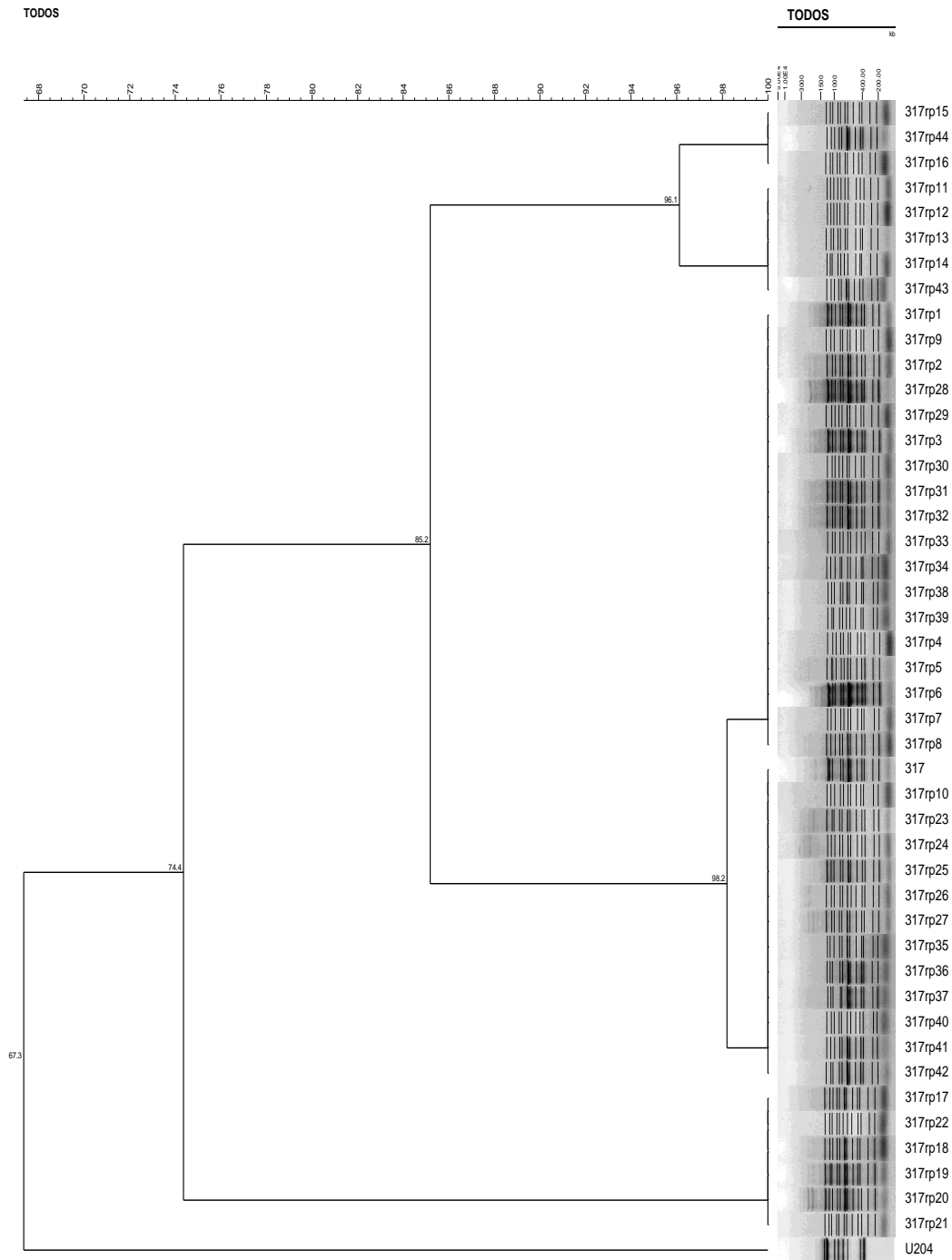


Figura 15B. Análisis de clúster de los perfiles ERIC de nódulos de raíces principales. Semillas inoculadas con la cepa 317. Se consideran iguales perfiles con más del 70% de similitud según Dice.

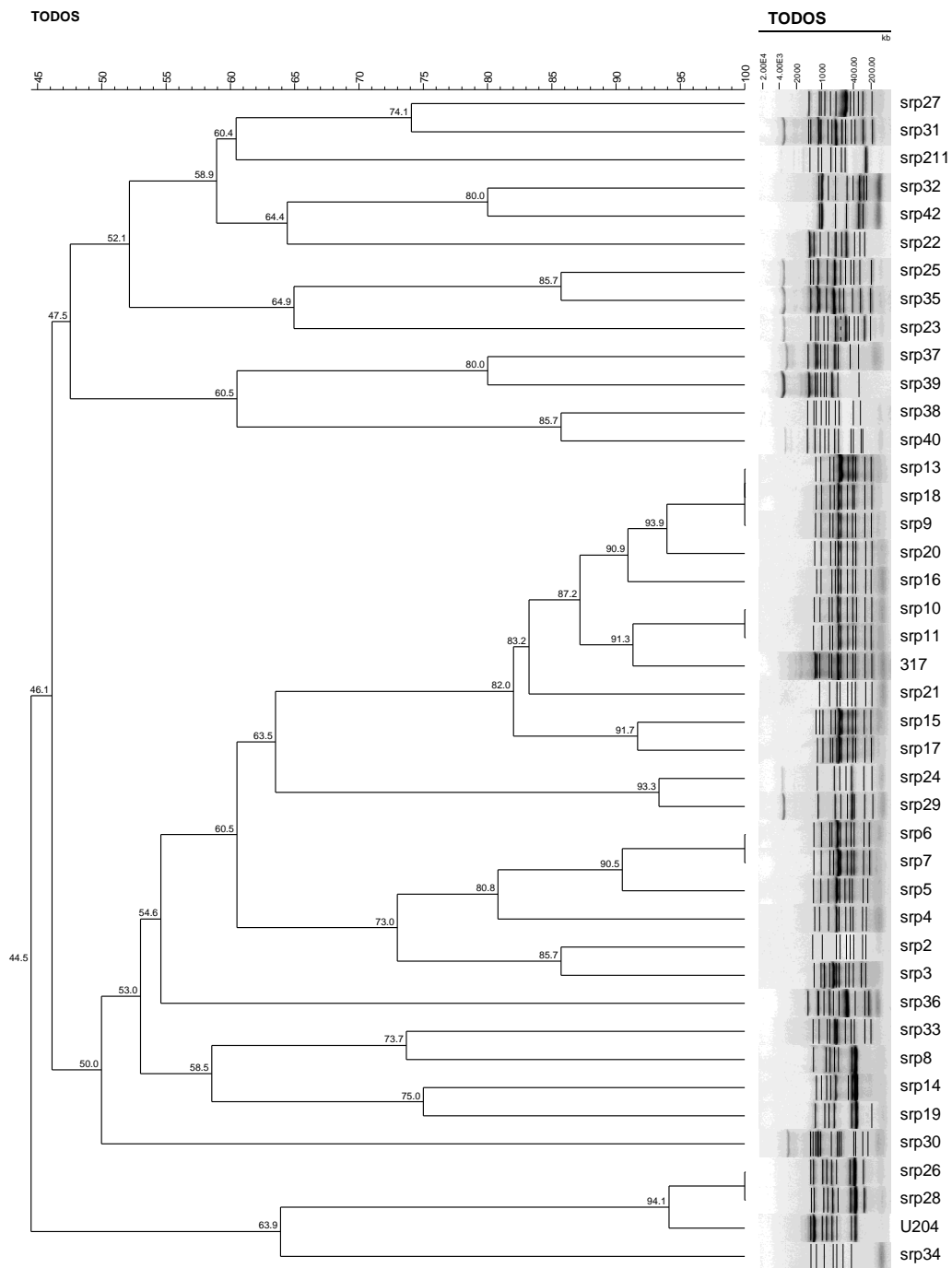


Figura 15C. Análisis de clúster de los perfiles ERIC de nódulos de raíces principales. Semillas sin inocular. Se consideran iguales perfiles con más del 70% de similitud según Dice.