

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**DIVERSIDAD Y EFICIENCIA SIMBIÓTICA DE RIZOBIOS
NATURALIZADOS QUE NODULAN SOJA EN URUGUAY**

por

Natalia Evangelina RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ

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

MONTEVIDEO
URUGUAY
Agosto 2020

Tesis aprobada por el tribunal integrado por Dr. Eduardo Abreo, Dra. María Martha Sainz, y Dr. Gastón Azziz, el 13 de Agosto de 2020. Autor/a: Qca. Natalia Rodríguez. Director/a Dra. Margarita Sicardi, Co-director/a Dra. Andrea Rodríguez Blanco.

AGRADECIMIENTOS

Quiero comenzar agradeciéndoles a mis tutoras Andrea Rodríguez y Margarita Sicardi por guiarme durante el desarrollo de este trabajo y compartir sus conocimientos en esta área de la microbiología de la cual aprendí mucho. Sus aportes fueron fundamentales para mi desarrollo profesional y la concreción de este trabajo.

Agradezco también a mis compañeros del Laboratorio de Microbiología de Facultad de Agronomía la colaboración durante el desarrollo de mi trabajo, pero más importante aún por incluirme de una manera muy cálida y relajada en su lugar de trabajo, donde además me permitieron explorar una disciplina nueva para mí: la docencia.

Por otro lado, extiendo el agradecimiento a los integrantes del Laboratorio de Microbiología de Suelos de INIA (Las Brujas) por su invaluable colaboración en la instalación y desarrollo de los ensayos de magentas e invernáculo realizados en dicha institución.

Además, agradezco a Eduardo Abreo, Martha Sainz y Gastón Azziz por regalarme parte de su tiempo leyendo y aportando a la mejora de este manuscrito de tesis.

Asimismo, debo un agradecimiento a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación por otorgarme la Beca de Maestría (POS_NAC_2017_1_141269) gracias a la cual pude invertir estos dos años en realizar la formación de posgrado. De igual manera, agradezco a la Facultad de Agronomía de la Universidad de la República por brindarme las herramientas necesarias para efectuar mis estudios.

Finalizo con un agradecimiento especial a quienes me apoyan incondicionalmente en todo momento: mis padres, mi hermana, mi pareja y mis amigos, porque enriquecen mi vida y eso se manifiesta en mi trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

| | página |
|---|-----------|
| PÁGINA DE APROBACIÓN | II |
| AGRADECIMIENTOS | III |
| RESUMEN | VII |
| SUMMARY | VIII |
| | |
| 1. <u>INTRODUCCIÓN</u> | 1 |
| 1.1. IMPORTANCIA Y CICLO DEL NITRÓGENO | 1 |
| 1.2. FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO | 3 |
| 1.3. SIMBIOSIS RIZOBIO-LEGUMINOSA | 5 |
| 1.3.1. <u>Establecimiento de interacción simbiótica</u> | 6 |
| 1.3.2. <u>Factores que afectan la simbiosis rizobio-leguminosa</u> | 7 |
| 1.4. EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA SIMBIÓTICA | 8 |
| 1.4.1. <u>Producción de biomasa</u> | 9 |
| 1.4.2. <u>Nitrógeno en planta</u> | 10 |
| 1.4.3. <u>Métodos isotópicos (¹⁵N)</u> | 10 |
| 1.5. INOCULANTES RIZOBIANOS | 11 |
| 1.6. CULTIVO DE SOJA EN URUGUAY | 13 |
| 1.7. BRADYRHIZOBIOS | 15 |
| 1.7.1. <u>Caracterización fenotípica</u> | 15 |
| 1.7.2. <u>Caracterización genética y filogenética</u> | 15 |
| 1.8. ANTECEDENTES | 17 |
| 1.9. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 19 |
| 1.9.1. <u>Hipótesis</u> | 19 |
| 1.9.2. <u>Objetivos</u> | 19 |
| 2. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u> | 20 |
| 2.1. CEPAS DE RIZOBIOS | 20 |
| 2.1.1. <u>Cepas de rizobios comerciales</u> | 20 |
| 2.1.2. <u>Origen de colección de aislamientos naturalizados de rizobios</u> . | 20 |
| 2.1.3. <u>Conservación de rizobios y condiciones de cultivo</u> | 22 |

| | |
|--|----|
| 2.2. SELECCIÓN DE CEPAS DE RIZOBIOS NATURALIZADAS | 23 |
| 2.2.1. <u>Autenticación de los aislamientos</u> | 23 |
| 2.2.2. <u>Perfil de <i>fingerprinting</i> (PCR-BOX)</u> | 24 |
| 2.3. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LAS CEPAS | 25 |
| 2.3.1. <u>Extracción de ADN</u> | 25 |
| 2.3.2. <u>Amplificación, purificación y secuenciación de genes</u> | 25 |
| 2.3.3. <u>Análisis de secuencias</u> | 26 |
| 2.4. GENERALIDADES DE ENSAYOS EN PLANTAS | 28 |
| 2.4.1. <u>Desinfección y germinación de semillas de soja</u> | 28 |
| 2.4.2. <u>Diseño experimental</u> | 28 |
| 2.4.3. <u>Determinación de eficiencia simbiótica</u> | 29 |
| 2.4.4. <u>Análisis estadísticos</u> | 29 |
| 2.5. ENSAYO EN CONDICIONES GNOTOBIÓTICAS: MAGENTAS | 29 |
| 2.5.1. <u>Condiciones de crecimiento de plantas</u> | 29 |
| 2.5.2. <u>Determinación de eficiencia simbiótica y análisis estadísticos</u> ... | 31 |
| 2.6. ENSAYO EN CONDICIONES SEMICONTROLADAS: | |
| INVERNÁCULO | 31 |
| 2.6.1. <u>Características del suelo</u> | 31 |
| 2.6.2. <u>Condiciones de crecimiento de plantas</u> | 32 |
| 2.6.3. <u>Determinación de eficiencia simbiótica y análisis estadístico</u> | 33 |
| 3. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u> | 34 |
| 3.1. SELECCIÓN DE CEPAS NATURALIZADAS | 34 |
| 3.1.1. <u>Autenticación de aislamientos</u> | 34 |
| 3.1.2. <u>Perfil de <i>fingerprinting</i> (PCR-BOX)</u> | 34 |
| 3.2. CARACTERIZACIÓN GÉNÉTICA | 37 |
| 3.2.1. <u>Genes <i>housekeeping</i></u> | 37 |
| 3.2.2. <u>Genes simbióticos</u> | 48 |
| 3.3. EFICIENCIA SIMBIÓTICA | 52 |
| 3.3.1. <u>Ensayo en condiciones gnotobióticas: Magentas</u> | 52 |
| 3.3.2. <u>Ensayo en condiciones semicontroladas: Invernáculo</u> | 61 |
| 4. <u>CONCLUSIONES</u> | 72 |

| | |
|--|-----------|
| 5. <u>BIBLIOGRAFÍA</u> | 73 |
| 6. <u>APÉNDICE</u> | 82 |
| 6.1. NÚMERO DE ACCESO DE SECUENCIAS OBTENIDAS | 82 |
| 6.2. ÁRBOLES FILOGÉNETICOS COMPLEMENTARIOS | 85 |
| 6.3. CUADROS ADICIONALES DE EFICIENCIA SIMBIÓTICA | 85 |
| 6.3.1. <u>Análisis de correlación magentas e invernáculo</u> | 85 |
| 6.3.2. <u>Análisis de similitud (ANOSIM) magentas e invernáculo</u> | 88 |
| 7. <u>ANEXOS</u> | 89 |
| 7.1. MEDIOS DE CULTIVO | 89 |
| 7.1.1. <u>Medio Farhaeus: crecimiento de plantas</u> | 89 |
| 7.1.2. <u>Medio YMA (Yeast manitol agar) suplementado con rojo congo: aislamiento de rizobios</u> | 90 |
| 7.1.3. <u>Medio TY (Tryptone yeast extract): crecimiento de rizobios</u> | 90 |
| 7.1.4. <u>Solución nutritiva Somesagaran: nutrición de plantas de soja</u> .. | 90 |
| 7.2. NÚMEROS DE ACCESO DE SECUENCIAS | 91 |
| 7.2.1. <u>Número de acceso de secuencias de genes <i>housekeeping</i></u> | 91 |
| 7.2.2. <u>Número de accesos de secuencias de genes simbióticos</u> | 94 |
| 7.5. RIZOBIOS NATURALIZADOS DE SOJA DE SUELOS URUGUAYOS CON ALTA EFICIENCIA | 95 |

RESUMEN

La soja (*Glycine max* (L.) Merr.) establece simbiosis con rizobios que le permiten obtener nitrógeno del aire mediante la fijación biológica de N₂. En nuestro país se formulan inoculantes con dos cepas de *Bradyrhizobium elkanii* U1301 y U1302. En países limítrofes se utilizan cepas de otras especies como *B. japonicum* E109 (Argentina) y *B. diazoefficiens* SEMIA5080 (Brasil). El estudio de las poblaciones de rizobios naturalizados del suelo resulta relevante debido a que pueden competir con los inoculantes y algunas podrían presentar mejor eficiencia simbiótica. El objetivo de este trabajo fue estudiar desde el punto de vista genético y simbiótico una colección de cepas de rizobios naturalizados que nodulan soja aislados en Uruguay. De los 47 aislamientos evaluados se seleccionaron 10 cepas naturalizadas cuyo perfil de PCR-BOX presentó menos del 80% de similitud con las cepas de referencia (U1301, U1302, E109 y SEMIA5080). Mediante la técnica de *multilocus sequence analysis* (genes 16S *rRNA*, *atpD*, *gyrB* *yrpO*) se identificaron 5 cepas pertenecientes a la especie *B. elkanii* y 4 a *B. japonicum*. No se pudo identificar la especie de la cepa restante (CA2) pero se sugiere su pertenencia a la especie *B. ferriligni*. El análisis de los genes *nifH* y *nodY/K*, sugiere que las cepas U1301 y U1302 podrían haber transferido verticalmente estos genes a las cepas naturalizadas de *B. elkanii* y horizontalmente a la cepa *Bradyrhizobium* sp. CA2. El análisis multivariado de los datos de la evaluación de la eficiencia simbiótica en condiciones gnotobióticas mostró un mejor desempeño de las cepas comerciales y naturalizadas de *B. elkanii* frente a *B. japonicum*. En el ensayo de invernáculo donde se usó suelo con alta carga de rizobios, se destacaron las cepas *B. japonicum* SJ1 y *B. elkanii* CL1, cuya inoculación provocó en las plantas mayor biomasa que la mezcla U1301:U1302. Es de interés continuar caracterizando estas cepas naturalizadas, así como evaluar su comportamiento en diferentes variedades de soja y condiciones edafoclimáticas.

Palabras clave: PCR-BOX, *MLSA*, nodulación, simbiosis, inoculantes

DIVERSITY AND SYMBIOTIC EFFICIENCY OF NATIVE-NATURALIZED SOYBEAN NODULATING RHIZOBIA FROM URUGUAY

SUMMARY

Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) establishes symbiotic association with rhizobia to obtain N from air by biological nitrogen fixation. In Uruguay, inoculants are formulated with two strains, *Bradyrhizobium elkanii* U1301 and U1302. In neighbouring countries strains from other species are used, such as *B. japonicum* E109 (Argentina) and *B. diazoefficiens* SEMIA5080 (Brazil). The study of native-naturalized rhizobia populations is relevant because these strains could compete with inoculants and may present a better symbiotic efficiency. The aim of this work was to study genetically and symbiotically native-naturalized soybean nodulating rhizobia isolated from Uruguayan soils. After clustering the BOX-PCR profiles of 47 isolates, 10 native-naturalized strains were selected considering less than 80% of similarity to reference strains (U1301, U1302, E109 and SEMIA5080). Using multilocus sequence analysis technique (16S *rRNA*, *atpD*, *gyrB* and *rpoB* genes), 5 native-naturalized strains were identified as *B. elkanii* and 4 as *B. japonicum*. The other strain (CA2) could not be identified but it could belong to *B. ferriligni*. Analysis of symbiotic genes (*nodY/K* and *nifH*) suggests that strains U1301 and U1302 may transferred these genes vertically to *B. elkanii* native-naturalized strains and horizontally to strain *Bradyrhizobium* sp. CA2. Multivariate analysis of symbiotic efficiency data in axenic conditions shows a better performance of *B. elkanii* strains than *B. japonicum*. In greenhouse conditions using high rhizobia concentration soil, inoculation with strains *B. japonicum* SJ1 and *B. elkanii* CL1 produced more biomass in plants than U1301:U1302 blend. It would be interesting to continue characterizing these native-naturalized rhizobia, and also to evaluate their performance with different soybean varieties and at edaphic-climatic conditions.

Keywords: BOX-PCR fingerprinting, *MLSA*, nodulation, symbiosis, inoculants

1. INTRODUCCIÓN

1.1. IMPORTANCIA Y CICLO DEL NITRÓGENO

El nitrógeno es un elemento que constituye importantes biomoléculas como aminoácidos, ácidos nucleicos, clorofila, coenzimas, fitohormonas y metabolitos secundarios. Es el segundo nutriente más requerido por las plantas en cantidad, luego del carbono, y representa entre el 1 y el 5% del peso seco de las plantas. En las leguminosas las globulinas son las mayores reservas de proteínas y son particularmente ricas en los aminoácidos glutamina y asparagina (Hawkesford *et al.*, 2012). La concentración de proteínas en las semillas de leguminosas puede llegar a aproximadamente 50% del peso seco en el caso de la soja (*Glicine max.* (L.) Merr.) (Hawkesford *et al.*, 2012).

La disponibilidad de nitrógeno en el suelo varía sustancialmente en el tiempo y espacio, depende de las propiedades del suelo como textura, pH, humedad y actividad microbiana. El suministro de nitrógeno es determinante en el rendimiento y calidad de los cultivos. Generalmente, un suministro uniformemente alto de este nutriente suprime la ramificación de las raíces. Aunque frente a una limitación en la disponibilidad de nitrógeno, las plantas suelen responder a la restricción espacial, debido al consumo localizado en el suelo rizosférico, priorizando el desarrollo lateral de las raíces hacia zonas ricas en el nutriente (**Figura 1.1**). En condiciones de escasez temporaria de nitrógeno en la rizósfera, las plantas presentan una respuesta en dos fases. En la primera fase, la tasa de elongación de la parte aérea de las plantas se reduce sin afectar la fotosíntesis y el crecimiento de la raíz se mantiene o incluso es estimulado, lo que resulta en un menor valor del coeficiente “biomasa de la parte aérea / biomasa de la raíz”. En una segunda fase, bajo continua escasez de nitrógeno, se desencadena la degradación de ácidos nucleicos y proteínas de las hojas, lo que provoca una disminución de la capacidad fotosintética de la planta y finalmente inhibe el crecimiento de toda la planta (Hawkesford *et al.*, 2012).

La mayor reserva de nitrógeno presente en el suelo se encuentra en restos de animales, vegetales y microorganismos formando biomoléculas. Debido a que las

plantas pueden absorber nitrógeno únicamente como amonio o nitrato, la interconversión de las formas orgánicas e inorgánicas del nitrógeno, así como la variación en el estado de oxidación de este elemento resultan determinantes en la biodisponibilidad de este nutriente (Monza y Marquez, 2004).

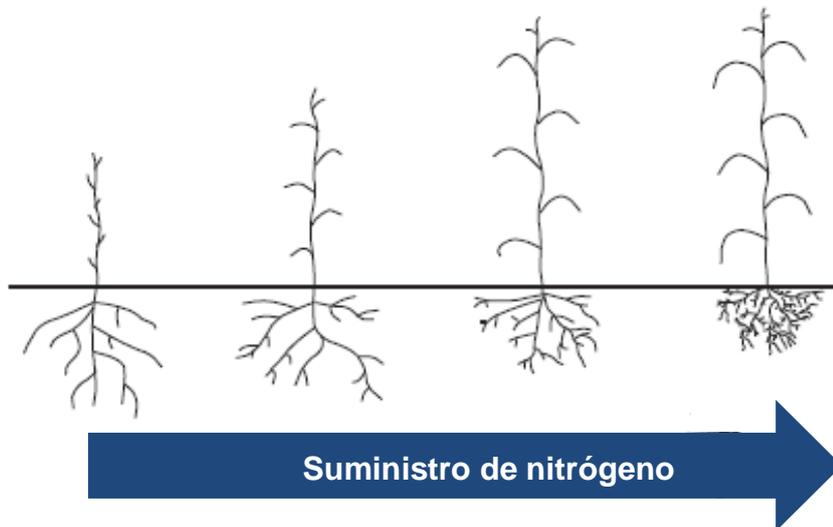


Figura 1.1: Representación esquemática del crecimiento de parte aérea vs raíces en plantas de cereales al incrementar el suministro de nitrógeno (Fuente: Hawkesford *et al.*, 2012).

El ciclo del nitrógeno (**Figura 1.2**) vincula los diferentes estados de los compuestos nitrogenados mediante los procesos que permiten sus transformaciones. Los procesos más relevantes para la nutrición vegetal son: amonificación, nitrificación, desnitrificación y fijación biológica de nitrógeno (FBN). El primero consiste en la degradación aeróbica de la materia orgánica por actividad de bacterias y hongos mediante la cual se produce amonio (NH_4^+), el cual puede ser liberado a la atmósfera como amoniaco (NH_3). La nitrificación es la oxidación del amonio a nitrito (NO_2^-) y posteriormente a nitrato (NO_3^-) realizada por bacterias y arqueas. El nitrato puede ser absorbido por las plantas, pero debido a que es altamente soluble también puede perderse del suelo mediante lixiviación. Por otro lado, en condiciones anaeróbicas algunas bacterias realizan la reducción del nitrato a formas gaseosas como dinitrógeno (N_2), óxido nítrico (NO) u óxido nitroso (N_2O), lo cual se conoce como

desnitrificación y genera pérdida de nitrógeno al suelo. Finalmente, un grupo minoritario de procariotas conocidas como diazótrofos, son capaces de realizar la FBN, o sea reducir el N_2 a NH_3 , el cual puede ser asimilado por las plantas (Stein y Klotz, 2016) .

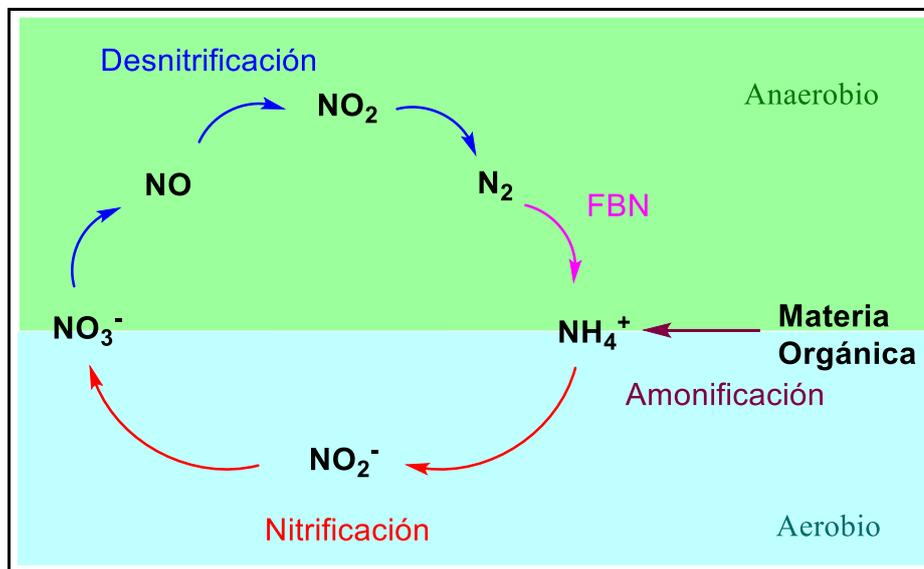
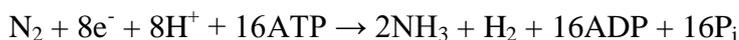


Figura 1.2: Principales procesos del ciclo biológico del nitrógeno.

1.2. FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO

La FBN es la responsable de la entrada de unas 250×10^6 toneladas anuales de nitrógeno al suelo. Siendo la atmósfera la mayor fuente de nitrógeno para los ecosistemas, de ella proviene aproximadamente un 80% (Monza y Marquez, 2004). Para el caso de la soja, en promedio el 50-60% de la demanda de nitrógeno es cubierta por la FBN (Salvagiotti *et al.*, 2008). Este proceso implica la reducción del nitrógeno atmosférico por parte de microorganismos diazótrofos para producir amoníaco mediante la siguiente reacción fuertemente endérgica:



Como se observa la reacción, este proceso demanda una alta cantidad de poder reductor y energía en forma de ATP. Los microorganismos heterótrofos pueden utilizar diferentes compuestos orgánicos como fuente de poder reductor y energía, mientras que en los fotosintéticos es el flujo electrónico entre los fotosistemas el que

reduce simultáneamente al N_2 y al CO_2 . También se requieren para síntesis de enzimas metales como magnesio, hierro y molibdeno (Weisany *et al.*, 2013).

La enzima capaz de realizar esta reducción es conocida como nitrogenasa. En la mayoría de los fijadores de nitrógeno esta enzima está formada por dos proteínas Fe-S (**Figura 1.3**): la reductasa de la dinitrogenasa, o proteína Fe (componente II) y la dinitrogenasa, o proteína Mo-Fe (componente I). El componente II es un dímero α_2 de 62 kDa codificado por el gen *nifH*. Mientras que el componente I, es un tetrámero $\alpha_2\beta_2$ de 220 kDa codificado por los genes *nifD* y *nifK*, respectivamente. Mediante la transferencia de electrones desde el piruvato, a través de los cofactores de cada subunidad, hasta la molécula de dinitrógeno, se obtiene amoníaco e hidrógeno.

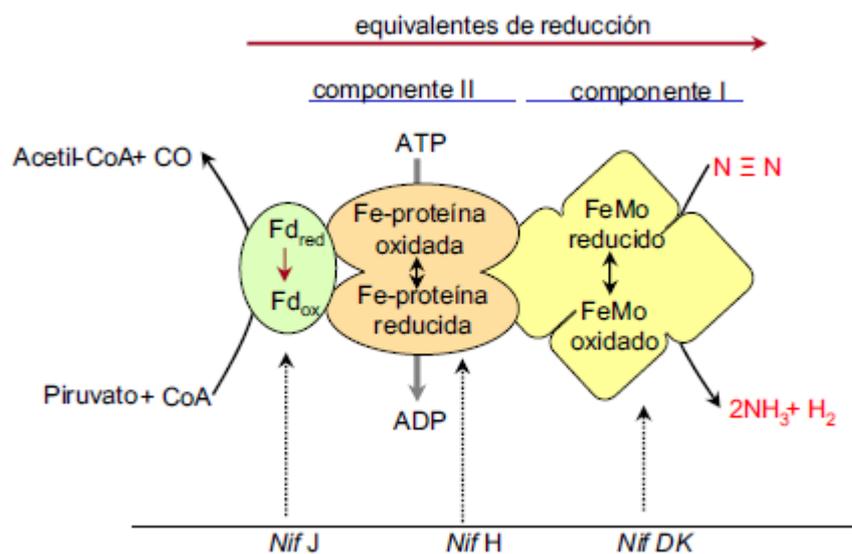


Figura 1.3: Estructura y función del complejo enzimático de la nitrogenasa. El cual consta de dos componentes: el dímero proteína Fe (codificada por el gen *nifH*) y el tetrámero Fe-Mo-Co (codificado por el gen *nifDK*), además de un transportador de electrones de ferredoxina (codificado por *nifJ*). El flujo de electrones se da desde el piruvato hacia la molécula de N_2 (Fuente: Monza y Márquez, 2004).

Una particularidad de esta enzima es que se inactiva en presencia de O_2 , por lo que los microorganismos diazótrofos así como plantas hospederas han desarrollado diferentes mecanismos de protección de la enzima frente al O_2 . Por ejemplo, las

cianobacterias que fijan nitrógeno presentan células especializadas llamadas heterocistos, las cuales desarrollaron adaptaciones estructurales y funcionales que permiten la protección de la nitrogenasa. Por otro lado, fijadores libres como *Azotobacter* spp., protegen a la nitrogenasa mediante un aumento de la tasa respiratoria, manteniendo niveles bajos de O₂. En el caso de la simbiosis rizobio-leguminosa, uno de los mecanismos que opera para disminuir la concentración de oxígeno en el nódulo es la utilización de la enzima leghemoglobina (Monza y Márquez, 2004).

Aunque la nitrogenasa Mo-Fe es la más ampliamente distribuida y estudiada, se ha reportado la existencia de otras tres nitrogenasas. Dos de ellas presentan una alta similitud estructural con la Mo-Fe, el componente II (FeS) es igual al anteriormente descrito, pero varían en el componente I para los cuales el Mo es sustituido por vanadio (V) o hierro (Fe). Estas enzimas se conocen como V-Fe nitrogenasa y Fe-Fe nitrogenasa presentes en microorganismos como *Azotobacter vinelandii* y *Anabaena variabilis*. Adicionalmente, se ha reportado una tercera nitrogenasa descrita en la bacteria termófila *Streptomyces thermoautotrophicus*, conocida como nitrogenasa St (MoFeS) que consiste en dos componentes: una proteína MoFeS y una manganeso-superoxido reductasa. La nitrogenasa St tiene interesantes particularidades como que no es capaz de reducir acetileno ni se inhibe en presencia de O₂ (Zhao *et al.*, 2006).

1.3. SIMBIOSIS RIZOBIO-LEGUMINOSA

Una amplia cantidad de especies de bacterias de los órdenes *Rhizobiales* y *Burkholderiales* denominadas rizobios establecen asociaciones simbióticas con plantas de la familia *Fabaceae* conocidas como leguminosas. En esta simbiosis se genera un nuevo órgano en la planta que es el nódulo simbiótico. La asociación simbiótica es específica y en general cada especie de leguminosa es infectada por unas pocas especies de rizobios (Wang *et al.*, 2019).

1.3.1. Establecimiento de interacción simbiótica

Los rizobios son microorganismos saprófitos que habitan el suelo en “vida libre” compitiendo con el resto de la microbiota presente. Son bacilos móviles que presentan respuestas quimiotácticas a compuestos producidos y exudados por las raíces, por ejemplo, la homoserina, la cual favorece la proliferación de rizobios en la rizosfera debido a la capacidad de estos microorganismos de metabolizar este aminoácido (Monza y Márquez, 2004).

El establecimiento de la asociación simbiótica depende del reconocimiento específico entre los rizobios y la leguminosa, mediante un diálogo molecular. En situaciones de nitrógeno limitante, las raíces de las leguminosas exudan sustancias fenólicas tipo flavonoides, incluyendo flavonas, flavonoles e isoflavonas, las cuales cumplen múltiples roles en distintas etapas del establecimiento de la simbiosis (Abdel-Lateif *et al.*, 2012). Los flavonoides actúan como quimioatrayentes, inducen quimiotaxis en rizobios con los receptores específicos (Subramanian *et al.*, 2007). Además, estos compuestos activan los genes *nod* en los rizobios, generando que las bacterias liberen lipoquitinolisacáridos (LQO) conocidos como factores Nod (D’Haeze y Holsters, 2002). Los LQO son determinantes de la especificidad, distintas cepas de rizobios produce LQO diferentes y específicos por sulfatación, acetilación, metilación, fucosilación y arabinosilación que son reconocidos por sistemas de percepción de la leguminosa hospedera (Antolín-Llovera *et al.*, 2012). Los factores Nod causan una deformación del pelo radicular, el cual atrapa a los rizobios entre las paredes celulares de la planta (Gage, 2004). Finalmente, los rizobios infectan los pelos radiculares creciendo hacia el córtex interno de las raíces, donde son rodeados por una membrana peribacteroidal de la planta (Jones *et al.* 2007, Mylona *et al.* 1995).

El nódulo es el nuevo órgano donde tiene lugar la FBN. Los nódulos presentan una región periférica con células no invadidas y una región central donde se encuentran las células invadidas por rizobios. Los rizobios dentro del nódulo sufren cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos transformándose en células pleomórficas, de forma irregular, que no se dividen llamadas bacteroides (Kereszt *et al.*, 2011).

Según la morfología y desarrollo nodular se distinguen dos tipos de nódulos: indeterminados, los cuales tienen un aspecto alargado, y determinados cuya forma es esférica.

El bacteroide necesita un suministro permanente de compuestos carbonados reducidos que aporta la planta, necesarios para generar ATP y poder reductor. El principal fotosintato involucrado en la fijación y asimilación de nitrógeno en los nódulos es la sacarosa. Debido a que la FBN es un proceso costoso energéticamente, ante niveles moderados o altos de nitrato en suelo se afectan negativamente la nodulación y la actividad nitrogenasa de los nódulos (Monza y Marquez, 2004).

Adicionalmente, la interacción genera la síntesis de leghemoglobina, una hemoproteína con alta afinidad por el oxígeno, la cual permite el suministro del O₂ necesario como aceptor terminal de electrones de la cadena respiratoria de los bacteroides, manteniendo bajas las concentraciones de este gas en el nódulo. Las condiciones microanaeróbicas en el nódulo se mantienen además por la colaboración de dos mecanismos adicionales, una barrera física que limita la difusión de gases al córtex interno y medio del nódulo, y el llamado proceso de protección respiratoria en el cual participan citocromos de alta afinidad por el O₂, los cuales consumen oxígeno sin acoplarlo a la síntesis de ATP cuando las concentraciones de O₂ se elevan (Monza y Marquez, 2004).

El nitrógeno fijado por los bacteroides egresa al espacio peribacteroidal como NH₃ donde se transforma en NH₄⁺, el cual pasa al citosol de la célula vegetal. El nitrógeno es luego asimilado por las células nodulares desde donde es exportado como amidas o ureidos, este último es el caso de la soja, a la planta a través del xilema (Monza y Márquez, 2004).

1.3.2. Factores que afectan la simbiosis rizobio-leguminosa

El éxito de la FBN en forma simbiótica puede ser limitado tanto por el ambiente como por los aspectos genéticos de los rizobios y la planta hospedera. Dentro de los factores fisicoquímicos se encuentran el pH, los suelos ácidos resultan menos favorables para la interacción debido a que la mayoría de los rizobios son muy

sensibles a la acidez y las leguminosas también son afectadas por una alta concentración de protones. Por otro lado, la simbiosis se ve afectada por temperaturas demasiado bajas o altas, las primeras retardan la infección, mientras que las segundas provocan nódulos poco eficientes. Para las leguminosas tropicales el óptimo de temperatura diurna se encuentra entre 25 y 32 °C (Thilakaranthana y Raizada, 2017).

En cuanto a la fertilidad del suelo, es importante tener en cuenta que las leguminosas noduladas presentan altos requerimientos de nutrientes tales como Ca, P, Mo, Fe, S, Cu, Mg y Co, y que una alta concentración de nitrógeno combinado inhibe la nodulación (McCoy *et al.* 2018, Broadley *et al.* 2012, Hawkesford *et al.* 2012). Por otro lado, la presencia de herbicidas, fungicidas, insecticidas y metales pesados resulta perjudicial para los rizobios, aunque su tolerancia es muy variable (Haddad *et al.* 2015, Drouin *et al.* 2010).

Como factores biológicos, además de la capacidad de fijación de nitrógeno, cabe destacar otras características de las cepas de rizobios como la adaptación a factores ambientales, movilidad, adherencia y capacidad competitiva (Lodeiro, 2015). La población de microorganismos presente en el suelo es determinante para la sobrevivencia de los rizobios como saprófitos durante la fase de vida libre. Además la presencia de fagos líticos o bacteriocinas pueden disminuir la población de rizobios del suelo (Poole *et al.*, 2018). Los rizobios agregados como inoculantes y la población de rizobios presentes en el suelo compiten por la ocupación de los nódulos en las leguminosas determinando la eficiencia de la fijación de nitrógeno (Lodeiro 2015, Brutti *et al.* 1999). El genotipo de la planta hospedadora también influye en las probabilidades de establecer la interacción simbiótica así como de obtener nitrógeno atmosférico (Hungria *et al.* 1998, Keyser y Li 1992).

1.4. EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA SIMBIÓTICA

La FBN en la interacción simbiótica se puede estimar mediante la determinación de tres parámetros: el peso seco de las plantas, la concentración de nitrógeno en la materia seca (%N) y el porcentaje de nitrógeno total de la planta que deriva de la atmósfera (%Ndfa), y su comparación respecto a un control sin inocular (Unkovich

et al., 2008). A continuación, se detallarán los métodos empleados para evaluar estas variables y su fundamentación.

1.4.1. Producción de biomasa

El crecimiento total de la planta así como el peso seco de la parte aérea son utilizados como indicadores de la eficiencia de la FBN, bajo el supuesto de que el crecimiento de la planta está limitado por la disponibilidad de nitrógeno (Unkovich y Pate, 2000). Por otro lado, se considera que el peso seco de la parte aérea es un criterio aceptable de efectividad en la FBN en sistemas libres de nitrógeno mineral (Howieson y Dilworth, 2016).

Cuando se trata de medir la biomasa en ensayos a campo, para el caso de leguminosas de grano, el peso seco de los granos es la medida más acertada para medir el rendimiento. Adicionalmente, el peso seco de la parte aérea representa el rendimiento de la planta en ensayos donde la cosecha se realiza antes de la producción de granos y por lo tanto es un indicador de la potencial productividad de las plantas. En el caso de leguminosas forrajeras la productividad se mide simplemente mediante la producción de biomasa aérea seca.

Por otro lado, la nodulación de las leguminosas es resultado de una interacción exitosa entre la planta y los rizobios, por lo cual también se relaciona con la eficiencia simbiótica. La medida más informativa para evaluar la nodulación durante la simbiosis rizobio-leguminosa es el peso seco de los nódulos. Aunque una alternativa práctica puede ser evaluar el número de nódulos o utilizar un método de puntuación basados en la cantidad y posición de los nódulos en las raíces. También se debe tener en cuenta que los nódulos efectivos presentan una coloración rosada-roja en su interior debido a la presencia de leghemoglobina, y es posible que existan nódulos que no contribuyan a la fijación de nitrógeno ocupados por cepas parásitas llamados inefectivos que son de color blanco y superficie lisa (Unkovich *et al.*, 2008).

1.4.2. Nitrógeno en planta

La concentración de nitrógeno total en plantas es utilizada como medida indirecta de la FBN, ya que se asume que el nitrógeno absorbido está limitado por la concentración de este nutriente en el suelo y que la diferencia proviene de la FBN. Además, para plantas crecidas en suelos con poco nitrógeno se han encontrado correlaciones entre la concentración de nitrógeno en planta o en la parte aérea y el %Ndfa (Wolyn *et al.*, 1989). Para ensayos realizados en sustrato libre de nitrógeno se considera que el mayor aporte de N proviene de la atmósfera con un pequeño porcentaje aportado por las reservas de la semilla. Adicionalmente, la determinación del nitrógeno en planta puede ser utilizada como insumo para el cálculo de la cantidad de nitrógeno fijado durante la simbiosis.

La cantidad de nitrógeno en plantas puede ser determinada mediante el método de digestión Kjeldahl, el cual consiste en la reducción del nitrógeno mineral y orgánico a NH_4^+ en ácido sulfúrico caliente y posterior estimación mediante valoración o colorimetría. En la práctica, se suele determinar el nitrógeno únicamente en la parte aérea de las plantas debido a que es donde se encuentra la mayor parte de este nutriente y simplifica la toma de muestra. Sin embargo, hay que considerar que por ejemplo para el caso de la soja se asume que un 33% del nitrógeno total de la planta se encuentra en las raíces y nódulos, por lo cual se recomienda multiplicar el valor de nitrógeno en parte aérea por un factor de 1,5 para estimar el nitrógeno total de la planta (Unkovich *et al.*, 2008).

1.4.3. Métodos isotópicos (^{15}N)

Los métodos isotópicos son los más exactos para evaluar la FBN ya que permiten estimar la cantidad de N derivado de la atmósfera (%Ndfa). El nitrógeno posee dos isótopos estables: ^{14}N y ^{15}N , el segundo es menos abundante en la naturaleza. Se estima que el N_2 presente en la atmósfera presenta una cantidad constante de este isótopo, el cual representa un 0,3663% de los átomos de nitrógeno del aire. Las variaciones de la concentración del isótopo ^{15}N en la naturaleza se expresan como $\delta^{15}\text{N}_{\text{aire}}$ y su medición se hace relativa al valor de ^{15}N del aire. La determinación del

$\delta^{15}\text{N}_{\text{aire}}$ en una muestra de material vegetal se relaciona con la fijación de N_2 debido a que este isotopo más pesado se encuentra en menor concentración en el nitrógeno atmosférico respecto al del suelo, por lo que un menor valor de $\delta^{15}\text{N}_{\text{aire}}$ indica una mayor cantidad de nitrógeno proveniente de la atmosfera (Unkovich *et al.*, 2008).

El %Ndfa puede ser calculado mediante la técnica llamada abundancia natural del ^{15}N , en la cual se relaciona los $\delta^{15}\text{N}_{\text{aire}}$ de la leguminosa respecto al $\delta^{15}\text{N}_{\text{aire}}$ de una planta de referencia no fijadora incluida en ensayo con iguales condiciones de crecimiento que la leguminosa. Esta técnica asume que el $\delta^{15}\text{N}_{\text{aire}}$ de la planta de referencia representa la abundancia de este isótopo en el suelo y que las diferencias en el $\delta^{15}\text{N}_{\text{aire}}$ de la leguminosa respecto a la referencia se deben a la FBN. Se debe tener en cuenta además que la intervención de enzimas en los procesos biológicos como la fijación de N_2 puede presentar una mayor afinidad por un isótopo específico y ello generar una variación en la concentración de ^{15}N fijado respecto al presente en el aire. También se genera un fraccionamiento isotópico en las diferentes partes de la planta que debe tenerse en cuenta la hora de calcular el %Ndfa, para ello se utiliza un coeficiente “B” que depende de la leguminosa estudiada y mayoritariamente de los rizobios responsables de la FBN (Paufferro *et al.* 2010, Houngnandan *et al.* 2008). La fórmula que relaciona el %Ndfa utilizando las medidas de $\delta^{15}\text{N}$ es la siguiente:

$$\%Ndfa = \frac{100(\delta^{15}\text{N}_{\text{planta de referencia}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{leguminosa}})}{(\delta^{15}\text{N}_{\text{planta de referencia}} - B)}$$

Por otro lado, también basadas en la determinación del isótopo ^{15}N existen técnicas que utilizan sistemas con suelo o aire enriquecidos en este isótopo con el fin de determinar la diferencia en acumulación ^{15}N por parte de las plantas fijadoras de nitrógeno (Paufferro *et al.* 2010, Unkovich *et al.* 2008).

1.5. INOCULANTES RIZOBIANOS

La inoculación artificial, es decir, el agregado de rizobios a las semillas o suelos donde se cultivan leguminosas es una práctica muy antigua y resulta imprescindible cuando la deficiencia de nitrógeno limita la producción vegetal. Los inoculantes comerciales constan del microorganismo específico, en el caso de leguminosas se

seleccionan una o más cepas de rizobios y un soporte estéril que puede ser turba o cultivo líquido. Para que la inoculación sea exitosa se necesita que el inoculante posea la bacteria deseada en número suficiente, que el método y las condiciones de inoculación permitan la sobrevivencia de las bacterias, y que las condiciones del suelo permitan la formación de nódulos y su funcionamiento efectivo (Lodeiro 2015).

La selección de cepas de rizobios para su comercialización como inoculantes requiere varias etapas de investigación y desarrollo. La principal característica a evaluar es la eficiencia simbiótica de las cepas en sustrato estéril, lo cual permite conocer el potencial de fijación de nitrógeno de las cepas en interacción con las plantas leguminosas (Iturralde *et al.* 2019, de Paiva Barbosa *et al.* 2017, de Almeida Ribeiro *et al.* 2015). También debe ser evaluada la capacidad competitiva por la nodulación de las plantas frente a otros rizobios presentes en el suelo, lo cual puede afectar la eficacia de las cepas en suelo (Iturralde *et al.* 2019, Althabegoiti *et al.* 2008). Finalmente, se deben evaluar las cepas con mejores resultados en ensayos a campo donde se incluyen aspectos como las variables edafoclimáticas así como la compatibilidad con las prácticas agrícolas. Adicionalmente, para su producción a nivel industrial es deseable que tenga un rápido crecimiento en medios de cultivo simples, que tenga una alta estabilidad genética de modo que no sufra mutaciones frecuentes durante la conservación ni reproducción en el laboratorio y que sea compatible con los soportes utilizados en inoculantes como turba o mediolíquido (Lodeiro, 2015).

En Uruguay el registro y control de calidad de inoculantes para leguminosas es responsabilidad del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP), el cual se rige por el Decreto 546/81. En cuanto al control de calidad, este decreto establece que los inoculantes rizobianos deben ser formulados con cepas recomendadas y suministradas por el MGAP, la presentación en medio líquido deberá contener un mínimo de 1000 millones de bacterias por mL (en el caso de turba es 500 millones de bacterias vivas por gramo húmedo) y estar libre de contaminantes.

1.6. CULTIVO DE SOJA EN URUGUAY

La soja (*Glycine max* (L.) Merr.) se originó como un cultivo doméstico en China en el periodo comprendido entre 1100-700 a.c., luego se expandió a diferentes países de Asia, a Europa y finalmente a América. Actualmente es el cultivo de grano más importante y extendido del mundo. Los mayores productores de soja son: Estados Unidos, Brasil, Argentina y China. La alta demanda de este producto se debe a que es una rica fuente de proteínas para humanos y animales, también es utilizada en tintas, biodiesel y como sustituto de la leche (Hungria *et al.*, 2005).

En Sudamérica la soja es el principal cultivo de verano, muchas veces alternado con cultivos de invierno. Una de las razones, para la elección de la soja, es el mayor rendimiento obtenido en el cultivo siguiente respecto a otros cultivos de verano como el maíz, debido probablemente a la FBN que resulta en residuos con mayor nivel de nitrógeno. El sistema de siembra directa utilizado para la soja también favorece al suelo de muchas zonas de Sudamérica que son pobres en materia orgánica, presentan una estructura frágil y poca fertilidad (Hungria *et al.*, 2005).

Según datos de la Dirección de Estadísticas Agropecuarias (DIEA, 2019) la soja es el cultivo de grano con mayor área de siembra en nuestro país y representa más de la mitad del total de los cultivos cerealeros (**Figura 1.4**). En los últimos años se ha observado que el rendimiento de este cultivo presenta variaciones dependientes principalmente del clima, cuyo mínimo fue en la zafra 2017/18 debido al déficit hídrico y los valores máximos fueron alcanzados en las zafras 2016/17 y 2018/19 (**Figura 1.5**). Es uno de los productos con mayor incidencia positiva en la canasta de bienes de exportación, aunque su precio se encuentra en el nivel más bajo de los últimos 5 años (OPYPA, 2019).

La totalidad de la soja sembrada en Uruguay es inoculada. La amplia adopción de esta tecnología se basa en los beneficios ambientales y económicos de la inoculación, como la disminución en el uso de fertilizantes sintéticos, los cuales son costosos y cuyo exceso puede contaminar el agua y el aire. Los inoculantes para soja en Uruguay están formulados con dos cepas de *Bradyrhizobium elkanii*: U1301 y U1302.

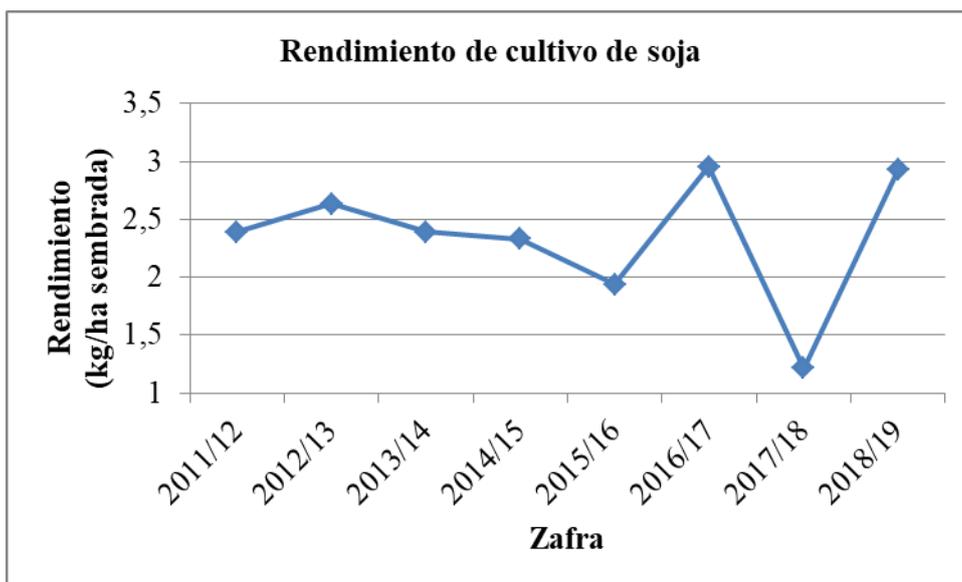


Figura 1.4: Rendimiento de cultivo de soja (kg/ ha sembrada) en Uruguay por zafra desde 2011/12 hasta 2018/19. (Fuente: DIEA, 2019).

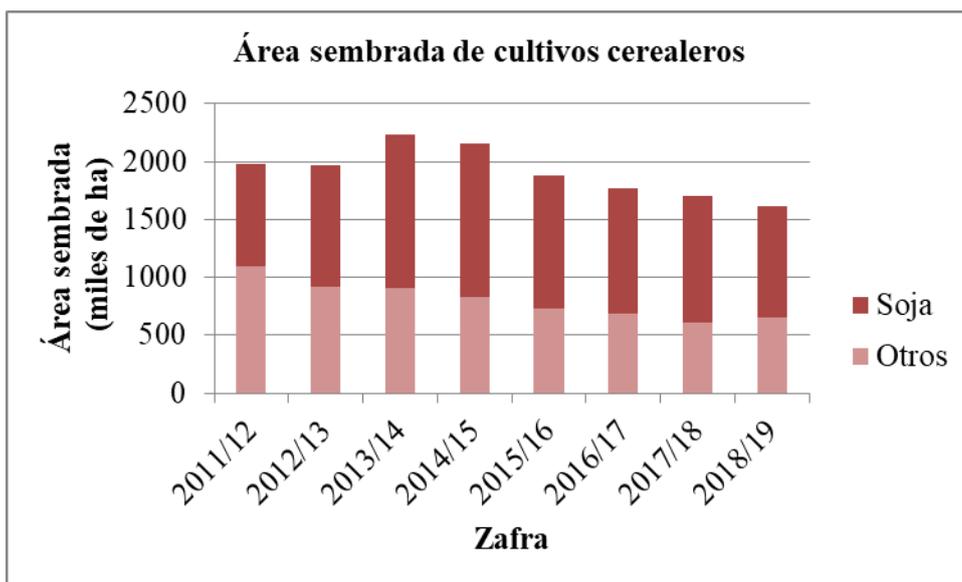


Figura 1.5: Área sembrada (miles de ha) de cultivos cerealeros en Uruguay por zafra desde 2011/12 hasta 2018/2019. En bordó oscuro se representa el área de cultivo de soja y en bordó claro el de otros cultivos cerealeros. (Fuente: OPYPA, 2019).

1.7. BRADYRIZOBIOS

1.7.1. Caracterización fenotípica

Los rizobios son Proteobacterias, Gram negativas, aeróbicos y quimioorganótrofos, capaces de fijar nitrógeno atmosférico en simbiosis con plantas leguminosas. Son fácilmente cultivables en condiciones de laboratorio, crecen en presencia de oxígeno, oxidando carbohidratos simples y aminoácidos. Generalmente, su temperatura óptima de crecimiento es de 25-30 °C y pH entre 6 y 7 (Howieson y Dilworth, 2016).

Dentro de los rizobios nos vamos a centrar en el género *Bradyrhizobium*. Los Bradyrhizobios presentan un metabolismo lento respecto a los demás rizobios, con un tiempo de generación que varía entre 8 y 18 h, su mínimo de temperatura de crecimiento se encuentra entre 10 y 15 °C, mientras que el máximo es de 33-35 °C. Morfológicamente los rizobios forman colonias blancas o cremosas y opacas cuando se las cultiva en placas conteniendo medio YMA suplementado con rojo congo, que son fácilmente diferenciables por la incapacidad de absorber este colorante. Las colonias de *Bradyrhizobium* son circulares, convexas y a veces translúcidas al comienzo, pero con la maduración se vuelven opacas y tienden a un color grisáceo. Su diámetro puede llegar los 3 mm y raramente son gomosas. Se han reportado algunas cepas de *Bradyrhizobium* que presentan dimorfismo. Las colonias de *B. japonicum* pueden alcanzar los 1-3 mm luego de 5 a 10 días y son elevadas, mientras que las de *B. elkanii* presentan forma irregular y son chatas (Howieson y Dilworth, 2016).

1.7.2. Caracterización genética y filogenética

El género *Bradyrhizobium* fue descrito por Jordan (1982) basado en su divergencia filogenética con las especies del género *Rhizobium*. Este género se compone de 50 especies descritas hasta el momento, dos de las cuales no son simbióticas (*B. betae* y *B. oligotrophicum*). Dentro del género *Bradyrhizobium* hay 7 especies reportadas como noduladoras de soja: *B. elkanii*, *B. japonicum*, *B. diazoefficiens*, *B. daqingense*, *B. liaoningense*, *B. huanghuaihaiense* y *B. ottawaense*. Las bacterias pertenecientes al género *Bradyrhizobium* tienen una única copia del gen 16S *rRNA* en el cromosoma

y los genes simbióticos están normalmente localizados en el cromosoma en islas simbióticas (Wang *et al.*, 2019).

El gen 16S *rRNA* es muy utilizado como marcador molecular para identificar taxonómicamente a los procariotas, pero debido a que es altamente conservado su resolución disminuye considerablemente a nivel de especie (Howieson y Dilworth, 2016). Se suele considerar una similitud del 92% en la secuencia del gen 16S *rRNA* para delimitar familias y de 95% para diferenciar géneros. Aunque una similitud para el gen 16S *rRNA* de entre 97-98,8% se utiliza para diferenciar especies en la mayoría de las bacterias, cepas de rizobios con muy alta similitud o incluso secuencias idénticas han sido divididas en distintas especies (Wang *et al.*, 2019). Una alternativa que aumenta la capacidad de elucidación es la aplicación de *multi locus sequence analysis (MLSA)* de genes *housekeeping*, la cual consiste en utilizar entre 2 y 6 secuencias concatenadas de estos genes. Los genes *housekeeping* están involucrados en el metabolismo celular, por lo tanto tienen una mayor tasa de evolución y se obtienen por descendencia. Esta estrategia evita los efectos generados por recombinación genética o transferencia horizontal en un gen específico (Azevedo *et al.*, 2015). Los genes *housekeeping* utilizados como marcadores taxonómicos suelen incluir: *dnaK*, *glnA*, *gyrB*, *recA*, *glnII*, *rpoB* y *atpD* (Howieson y Dilworth, 2016).

Por otro lado, los genes *nod* y *nif* responsables de codificar las proteínas involucradas en la síntesis de los LQO y en la fijación biológica de nitrógeno respectivamente, son utilizados para establecer relaciones filogenéticas en *Bradyrhizobium*. Varios trabajos establecen un origen monofilético de estos genes y otros sugieren eventos de transferencia horizontal (Delamuta *et al.* 2017, Arsesse *et al.* 2012, Menna y Hungria 2011, Lloret y Martínez-Romero 2005). El gen *nifH* codifica la proteína homodimérica de Fe (componente II o dinitrogenasa reductasa) que compone la enzima nitrogenasa (Fischer, 1994). Mutaciones en los genes *nod* así como la de los involucrados en diferentes vías metabólicas, transportadores, quimiotaxis o movilidad pueden cambiar la especificidad entre los rizobios y la planta que estos pueden nodular (Wang *et al.*, 2019). En el género *Bradyrhizobium* existe un marco de lectura abierto (MLA) posicionado entre los genes *nodD1* y *nodABC*. Debido a la

alta variedad de este MLA entre las especies de *Bradyrhizobium*, se designó como *nodK* en *B. elkanii* y *nodY* en *B. japonicum* y *B. diazoefficiens*, y se generaliza como *nodY/K*. El rol de este MLA es aún desconocido por ello es considerado como una región intergénica *nodD-nodA*, aparentemente estaría relacionado con la especificidad de la planta hospedadora (Delamuta *et al.*, 2017). Se ha reportado una similitud en la filogenia obtenida entre *nodY/K* y otros genes de nodulación como *nodA* y *nodZ*, así como con el gen involucrado en la fijación de nitrógeno *nifH* (Delamuta *et al.* 2017, Menna y Hungria 2011).

Para el estudio de la diversidad de rizobios a nivel de cepas las técnicas de rep-PCR son muy utilizadas. Consisten en la amplificación de regiones intergénicas con distinta longitud, mediante el uso de un único cebador que representa elementos de ADN repetitivos dispersos en el genoma y por lo cual hibrida en varios sitios al mismo tiempo (Tartaglia *et al.* 2019, Chibeba *et al.* 2017, Menna *et al.* 2009). Estas regiones amplificadas, al ser sometidas a electroforesis, producen perfiles de bandas que son características para cada cepa. Una de las regiones utilizadas para amplificar es la región *boxA*, técnica conocida como PCR-BOX. Esta técnica tiene capacidad de resolución a nivel de cepa además de alta reproducibilidad en los perfiles obtenidos (Binde *et al.* 2009, Menna *et al.* 2009).

1.8. ANTECEDENTES

En Uruguay, desde 1984, las cepas recomendadas por el MGAP para la formulación de los inoculantes para soja son las cepas de *Bradyrhizobium elkanii* U1301 (SEMIA587) y U1302 (SEMIA5019) (María Mayan, comunicación personal, 26 de setiembre de 2018) de origen brasilero. Varios estudios han reportado la existencia de rizobios derivados de la evolución de inoculantes comerciales (naturalizados) o previamente presentes en el suelo (nativos) los cuales compiten con los inoculantes comerciales pudiendo disminuir su eficiencia o ser posiblemente más eficientes que los inoculantes comerciales (Chibeba *et al.* 2017, de Almeida Ribeiro *et al.* 2015, Arsesse *et al.* 2012). En suelos brasileros se reportaron cepas con mayor eficiencia simbiótica que la cepa de *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA5019 recomendada por el Ministerio de Agricultura de Brasil (de Almeida Ribeiro *et al.*, 2015) y en Argentina

Iturralde *et al.* (2019) evaluaron 10 cepas naturalizadas de las cuales ninguna presentó mayor competencia que la cepa *Bradyrhizobium japonicum* E109 (SEMIA5085), utilizada en el inoculante comercial de ese país.

En nuestro país, varias instituciones vienen investigando sobre la FBN en el cultivo de soja en forma conjunta en los últimos años. Uno de los objetivos planteados es evaluar la eficiencia simbiótica y capacidad competitiva de las cepas de *B. elkanii* U1301 y U1302 recomendadas en Uruguay en comparación con las cepas de *B. diazoefficiens* SEMIA5080 y *B. japonicum* E109 utilizadas en Brasil y Argentina, respectivamente. En ese contexto se desarrolló la tesis de maestría de Lagurara (2018), en la que se determinó la persistencia, capacidad competitiva y eficiencia simbiótica de cepas de rizobios usadas en los inoculantes comerciales para soja en Uruguay, en suelos con y sin historia del cultivo. Durante ese trabajo se realizaron aislamientos de rizobios de nódulos muestreados de ensayos bajo condiciones controladas y a campo en distintas zafras y zonas del país en suelos con y sin historia del cultivo, y de tratamientos sin inocular e inoculados con 2 cepas comerciales de Uruguay (*B. elkanii* U1301 y U1302), una de Argentina (*B. japonicum* E109) y una de Brasil (*B. diazoefficiens* SEMIA5080). Los resultados obtenidos destacan la presencia y persistencia en suelos uruguayos de la cepa de *B. diazoefficiens* SEMIA5080, la cual mostró también una buena capacidad competitiva y alta eficiencia simbiótica. Por otro lado, los resultados obtenidos en condiciones controladas utilizando suelos con historia de cultivo de soja, evidenciaron la persistencia de una población de rizobios eficiente y competitiva. Adicionalmente, en ese trabajo se obtuvieron aislamientos con perfil de PCR-BOX diferente al de las cepas comerciales de referencia, lo que demuestra la presencia en los suelos de posibles cepas de rizobios nativas o naturalizadas. Esta colección de aislamientos de rizobios obtenidos por Lagurara (2018) durante su trabajo fue el objeto de estudio de esta tesis.

1.9. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1.9.1. Hipótesis

Los suelos de Uruguay presentan poblaciones de rizobios naturalizados capaces de nodular soja. Estos derivaron de las cepas de los inoculantes comerciales aplicados en las siembras anuales y presentan mayor eficiencia simbiótica que estos inoculantes.

1.9.2. Objetivos

El objetivo general de este trabajo fue evaluar la diversidad y el potencial de eficiencia simbiótica de una colección de rizobios naturalizados que nodulan soja en Uruguay.

Para cumplir con lo anterior, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- Identificar y caracterizar genéticamente aislamientos de rizobios naturalizadas que nodulan soja en suelos de Uruguay.
- Evaluar la eficiencia simbiótica de las cepas naturalizadas en comparación con las utilizadas en los inoculantes comerciales de Uruguay y la región, tanto en sustrato estéril como en suelo con alta concentración de rizobios.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. CEPAS DE RIZOBIOS

2.1.1. Cepas de rizobios comerciales

Como referencia se incluyeron en los ensayos y análisis cepas comerciales disponibles en Uruguay y la región. Las cepas de *Bradyrhizobium elkanii* U1301 (SEMIA587) y U1302 (SEMIA5019) son las recomendadas por el MGAP para la formulación de inoculantes en Uruguay. Las cepas de *Bradyrhizobium japonicum* E109 (SEMIA5085) y *Bradyrhizobium diazoefficiens* SEMIA5080 son utilizadas en Argentina y Brasil, respectivamente (Hungria *et al.*, 2005). Estas 4 cepas comerciales fueron obtenidas de la colección oficial de Uruguay que mantiene el MGAP y durante el desarrollo del trabajo serán nombradas como U1301, U1302, E109 y SEMIA5080.

2.1.2. Origen de la colección de aislamientos naturalizados de rizobios

Se trabajó con una colección de 47 aislamientos de rizobios obtenida por Lagurara (2018) conservada en una mezcla 1:1 cultivo:glicerol (50%) a -20 °C. Los rizobios fueron aislados de nódulos de plantas de soja de sitios con y sin historia de cultivo de soja situados en los departamentos de Colonia, Canelones, Cerro Largo, San José, Soriano y Treinta y Tres. Los sitios de muestreo se encuentran ubicados en el mapa de la **Figura 2.1**. Los aislamientos provienen de chacras comerciales con y sin inoculación de soja, de ensayos experimentales a campo que fueron inoculados con distintas cepas comerciales y de un ensayo de invernáculo realizado con suelo de Las Brujas, Canelones. En el **Cuadro 2.1** se incluyen para cada sitio las características del ensayo. Los aislamientos de esta colección con la que se trabajó habían presentado en un primer análisis perfiles genéticos (PCR-BOX) distintos a las cepas de referencia (Lagurara, 2018).

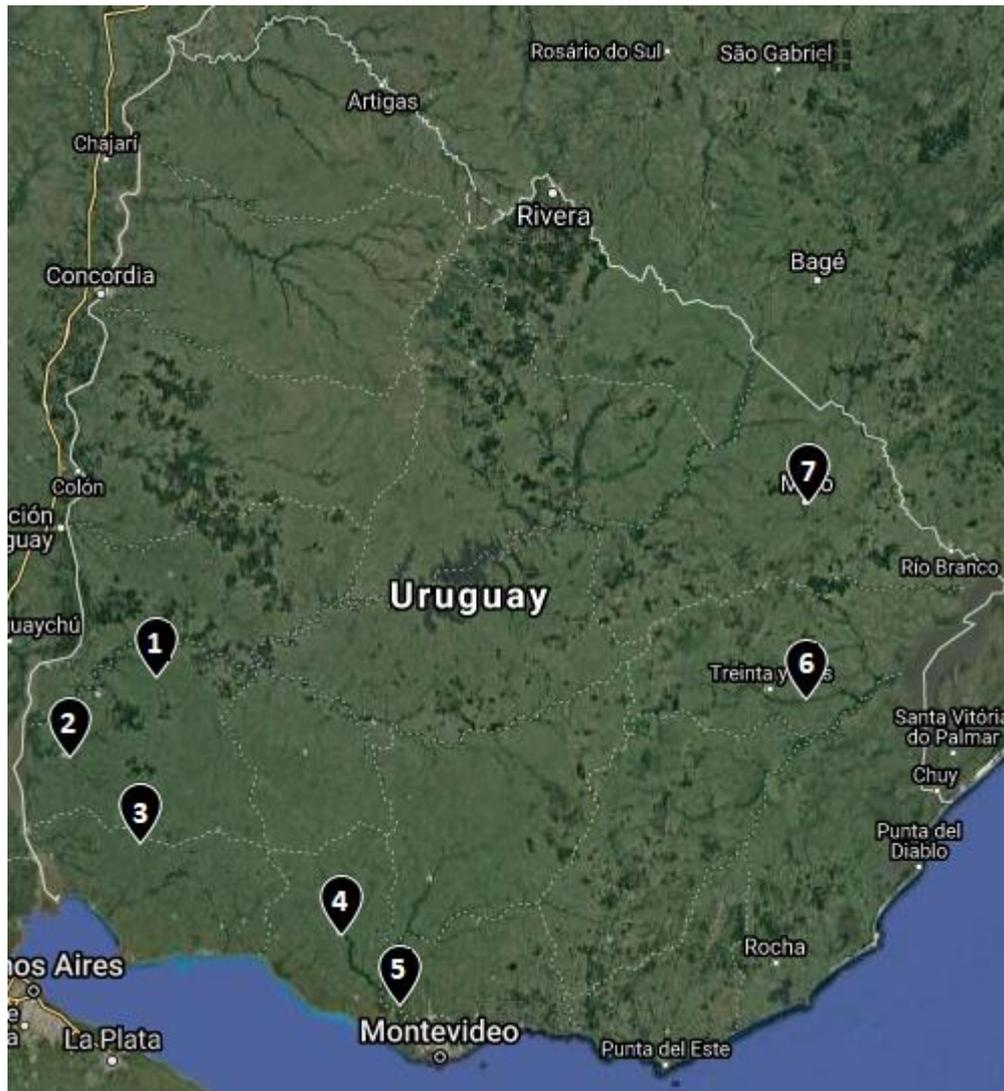


Figura 2.1: Mapa de Uruguay donde se ubican los sitios de muestreo para aislamiento de rizobios. Los números indican las siguientes localidades y departamentos: 1 (Invernada, Soriano), 2 (Dolores, Soriano), 3 (Ombúes de Lavalle, Colonia), 4 (Santa Clara, San José), 5 (Las Brujas, Canelones), 6 (Paso de la Laguna, Treinta y Tres) y 7 (Melo, Cerro Largo).

Cuadro 2.1: Ubicación y características de los sitios de origen de la colección de rizobios. Se indica el sitio, si posee o no historia de cultivo de soja, y las cepas con las que fueron inoculados o si no se inocularon los tratamientos ensayados.

| Departamento | Localidad | Historia de soja | Tratamientos |
|-----------------------|-------------------|-----------------------------|--|
| Canelones | Las Brujas | Sin y con historia de soja* | SEMIA5080 U1301 Sin inocular |
| Cerro Largo | Melo | Sin y con historia de soja | SEMIA5080 U1301+U1302 E109 Sin inocular |
| Colonia | Ombúes de Lavalle | Sin y con historia de soja | U1301+U1302 SEMIA5080 E109 Sin inocular |
| San José | Santa Clara | Con historia de soja | Sin inocular |
| Soriano | Dolores | Sin historia de soja | U1301+SEMIA5080 Sin inocular |
| Soriano | Invernada | Con historia de soja | Sin inocular |
| Treinta y Tres | Paso de la Laguna | Con historia de soja | U1301+SEMIA5080 |

(*) Ensayo realizado en macetas conteniendo suelo de este sitio.

2.1.3. Conservación de rizobios y condiciones de cultivo

Las cepas comerciales provenientes del MGAP y la colección de aislamientos de rizobios obtenida por Lagurara (2018) se encontraban conservadas a -20 °C en mezcla 1:1 cultivo:glicerol.(50%) Cada cepa fue estriada en una placa de Petri conteniendo medio YMA suplementado con rojo congo (anexo: **sección 7.1.2.**). Se incubaron las placas a 28 °C durante 5 a 10 días, y en los casos necesarios se realizaron repiques en medio YMA suplementado con rojo congo hasta obtener un cultivo puro de rizobios.

Los aislamientos puros fueron sembrados en tubos conteniendo 10 mL medio TY líquido (anexo: **sección 7.1.3.**) e incubados en agitación a 28 °C por 5 a 10 días hasta la obtención del número de células viables requerido (según ensayo).

Con la finalidad de ajustar el número de células viables en los cultivos líquidos se realizaron curvas de calibración que permiten relacionar la medida de absorbancia a 600 nm (OD) con la concentración de rizobios viables (UFC/mL). Se utilizó el método de conteo por microgota (Howieson y Dilworth, 2016); se realizaron recuentos en placas con medio YMA sembrando 25 µL de cultivo puro y de las diluciones (-1) y (-2) por duplicado de los cultivos líquidos.

2.2. SELECCIÓN DE CEPAS DE RIZOBIOS NATURALIZADAS

2.2.1. Autenticación de los aislamientos

Con la finalidad de comprobar que los aislamientos naturalizados de la colección tenían la capacidad de nodular plantas de soja se realizaron ensayos de nodulación. Se desinfectaron y germinaron las semillas de soja según la **sección 2.4.1.** Se sembró una semilla de soja pregerminada por frasco (250 mL) conteniendo medio Fahræus semi-sólido (anexo: **sección 7.1.1.**). A las 48 h de la siembra se inoculó cada plántula con 1 mL de un cultivo con 10^7 células de cada una de las cepas a estudiar. Se utilizó una única réplica por cada uno de los 47 aislamientos evaluados, y se incluyó un control negativo sin inocular. Las plantas se mantuvieron a 28 °C y fotoperiodo de 12 h luz/12 h oscuridad. Se consideraron positivos los aislamientos que presentaron al menos un nódulo en los 24 días posteriores a la siembra (Howieson y Dilworth, 2016).

Se realizó un nuevo aislamiento de rizobios desde los nódulos formados en las plantas. Los nódulos se lavaron con etanol 70% (v/v) por 1 min, luego con hipoclorito de sodio 2% (m/v) por 2 min y finalmente se realizaron 5 lavados con agua destilada estéril. Los nódulos desinfectados fueron aplastados utilizando portaobjetos estériles, y la suspensión resultante fue estriada en una placa de Petri conteniendo medio YMA suplementado con rojo congo (anexo: **sección 7.1.2.**). Se incubaron las placas a 28 °C durante 5 a 10 días, y en los casos necesarios se

realizaron repiques en placas conteniendo medio YMA suplementado con rojo congo hasta obtener un cultivo puro de rizobios. Para conservar un nuevo repique los aislamientos fueron crecidos en tubos conteniendo 5 mL de medio TY líquido y se colocaron 0,8 mL de cultivo crecido y 0,8 mL de glicerol estéril 50% (v/v) en un tubo de 2 mL y se almacenó a -20 °C.

2.2.2. Perfil de *fingerprinting* (PCR-BOX)

Para determinar el grado de similitud entre los aislamientos y las cepas de rizobios comerciales usadas en los ensayos (U1301, U1302, SEMIA5080 y E109) se analizó el perfil de PCR-BOX de 39 aislamientos autenticados reaislados de los nódulos obtenidos en la **sección 2.2.1.**

Se tomó una colonia de rizobio del cultivo puro en placa y se suspendió en 25 µL de solución de lisis (NaOH 0,05% (m/v), SDS 0,25% (m/v)). La suspensión se incubó a 95 °C durante 10 min y luego se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se agregaron 225 µL de agua bidestilada. La mezcla se centrifugó a 7580 g por 5 min. Finalmente se apartaron 60 µL del sobrenadante que se conservaron a -20 °C para utilizar en las reacciones de amplificación de PCR-BOX.

El ADN de los aislamientos fue amplificado mediante una reacción de PCR-BOX utilizando como cebador la secuencia de BOX A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (Versalovic *et al.*, 1994). Se utilizó una mezcla de reacción de 25 µL: 0,50 µL dNTPs (10 mM), 1,25 µL cebador (10 µM), 0,50 µL MgCl₂ (25 mM), 2,50 µL Buffer Dream Taq (ThermoScientific), 0,20 µL Dream Taq polimerasa (5 U/µL), 19,05 µL agua bidestilada y 1,00 µL lisado. La reacción se realizó en un termociclador (Gene Touch, Bioer, Hangzhou, China) con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 94 °C por 7 min; 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 52 °C por 1 min y 72 °C por 3 min; extensión final a 72 °C por 15 min.

Los amplicones fueron separados mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2% (m/v) con buffer TBE 0,5X (Tris-Ácido Bórico- EDTA), a 5 V/cm durante 3 h. Para normalizar los geles obtenidos se colocaron 3 µL de marcador de peso molecular 100 pb Plus (ThermoScientific) en el primer y último pocillo de cada

gel. Para la visualización del gel se utilizó el intercalante Good View (SBS Genetech) y posteriormente se tomaron fotos de los geles con cámara (Canon PowerShotG16) bajo luz UV.

Se realizaron los perfiles por triplicado para cada uno de los aislamientos estudiados. Para el análisis de los perfiles obtenidos se utilizó el software BioNumerics versión 7.6 (AppliedMaths). Se seleccionaron como cepas naturalizadas los aislamientos que presentaban un porcentaje de similitud menor al 80% con respecto a las cepas de referencia (U1301, U1302, SEMIA5080 y E109) aplicando el algoritmo de Jaccard.

2.3. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LAS CEPAS

2.3.1. Extracción de ADN

El ADN de las cepas comerciales de referencia y de las 10 cepas naturalizadas seleccionadas en la **sección 2.2.2.** fue extraído utilizando kit comercial GeneJET Genomic DNA Purification Kit #K0721 (Thermo Scientific) siguiendo las condiciones del proveedor. La calidad de los productos de amplificación fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa y la concentración fue medida colorimétricamente utilizando un NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific).

2.3.2. Amplificación, purificación y secuenciación de genes

Para la amplificación de los genes 16S *rRNA*, *atpD*, *gyrB*, *rpoB*, *recA*, *dnaK* y *nifH* y la región intergénica *nodD-nodA* (*nody/K*) se utilizó una mezcla de reacción de 25 μ L en agua bidestilada: 0,50 μ L dNTPs (10 mM), 0,50 μ L MgCl (25 mM), 2,50 μ L Buffer Dream Taq (ThermoScientific), 0,04 μ L Dream Taq polimerasa (5 U/ μ L), 2,00 μ L ADN y 1,00 μ L de cada cebador (10 μ M), excepto para los genes 16S *rRNA*, *nifH* y *nodyK* para los cuales se utilizaron 0,50, 1,25 y 2,50 μ L, respectivamente. La reacción se realizó en un termociclador (Gene Touch, Bioer, Hangzhou, China). En el **Cuadro 2.2** y **Cuadro 2.3** se presentan los cebadores y programas de ciclado utilizados para los genes *housekeeping* y simbióticos, respectivamente (de Almeida Ribeiro *et al.* 2015, Arseese *et al.* 2012).

Los productos de PCR de los genes 16S *rRNA*, *atpD*, *gyrB*, *rpoB* y *nifH* fueron purificados utilizando el kit comercial GeneJET PCR Purification Kit #K0701(Thermo Scientific). El producto de la amplificación de *nodY/K* fue separado de amplificaciones inespecíficas mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5% con buffer TBE 0,5X (Tris-Ácido Bórico- EDTA), a 5 V/c durante 1 h y los fragmentos de gel conteniendo el producto de amplificación fueron escindidos y purificados utilizando el kit comercial Monarch DNA Gel Extraction Kit #T1020S (Biolabs). La pureza de los productos de amplificación fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa y la concentración fue medida colorimétricamente utilizando un NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific).

Los productos de amplificación purificados se enviaron para su secuenciación a MacroGen Inc. (Seul, Corea del Sur).

No se enviaron productos de amplificación de los genes *dnaK* y *recA* debido a la baja amplificación obtenida.

2.3.3. Análisis de secuencias

Las secuencias obtenidas fueron modificadas manualmente para eliminar los extremos con baja calidad de secuenciación. Las secuencias modificadas fueron depositadas en el *GenBank*; los códigos de acceso se encuentran en el apéndice (**sección 6.1.**).

Para el análisis de las secuencias se utilizó el software MEGA-X v10, el algoritmo de *ClustalW* para el alineamiento de secuencias y el método de *Maximum likelihood* para la construcción de árboles filogenéticos. Además de las secuencias obtenidas en nuestro laboratorio, se incluyeron secuencias descargadas de la base de datos *GenBank*; los códigos de acceso de las secuencias se encuentran en el anexo (**sección 7.2.1. y sección 7.2.2.**)

Se obtuvieron alineamientos de 799, 432, 570, 422, 601 y 315 posiciones para los genes 16S *rRNA*, *atpD*, *gyrB*, *rpoB*, *nifH* y *nodY/K* respectivamente.

Cuadro 2.2: Cebadores (directo arriba y reverso abajo) y programas de ciclado utilizados para la amplificación de los genes *housekeeping*.

| Gen | Cebadores (5'→3') | Programa |
|-----------------|--|--|
| 16S rRNA | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG GGTTACCTTGTTACGACTT | 95 °C 5'; 35x(95 °C 30'', 58 °C 30'', 72 °C 40''); 72 °C 10' |
| atpD | GGCCGCATCATSAACGTSATC AGMGCCGACACTTCMGARCC | 95 °C 5'; 2x(94 °C 2', 64,5 °C 1', 72 °C 1'); 30x(94 °C 30'', 64,5 °C 1', 72 °C 1'); 72 °C 5' |
| gyrB | TTCGACCAGAAAYTCCTAYAAGG AGCTTGTCCTTSGTCTGCG | 95 °C 5'; 5x(94 °C 2', 57 °C 2', 72 °C 1'30''); 28x(94 °C 30'', 57 °C 1', 72 °C 1'30''); 72 °C 5' |
| rpoB | CCTSATCGAGGTTACAGAAGGC AGCGTGTTGCGGATATAGGCG | 95 °C 5'; 3x(94 °C 2', 58,2 °C 2', 72 °C 1'); 30x(94 °C 30'', 58,2 °C 1', 72 °C 1'); 72 °C 5' |
| recA | CAACTGCMYTGCGTATCGTCGAAGG CGGATCTGGTTGATGAAGATCACCATG | 94 °C 5'; 35x(94 °C 45'', 60 °C 1', 72 °C 1'30''); 72 °C 5' |
| dnaK | AAGGARCANCAGATCCGCATCCA TASATSGCCTSRCCRAGCTTCAT | 94 °C 5'; 35x(94 °C 1', 62 °C 1', 72 °C 40''); 72 °C 5' |

Cuadro 2.3: Cebadores (directo arriba y reverso abajo) y programas de ciclado utilizados para la amplificación de los genes simbióticos.

| Gen | Cebadores (5'→3') | Programa |
|--------------|--------------------------|---|
| <i>nifH</i> | GGNATCGGCAAGTCSACSAC | 95 °C 5'; 35x(94 °C 30'', 70,2 °C 1', 72 °C 1'); 72 °C 5' |
| | TCRAMCAGCATGTCCTCSAGCTC | |
| <i>nodYK</i> | CAGATCNAGDCCBTTGAARCGCAT | 95 °C 5'; 35x(94 °C 30'', 53 °C 30'', 72 °C 2'30''); 72 °C 5' |
| | GATTCCWWGBCCYTCVAGATC | |

2.4. GENERALIDADES DE ENSAYOS EN PLANTAS

2.4.1. Desinfección y germinación de semillas de soja

Para todos los ensayos se utilizaron semillas de soja de la variedad Nidera 5909. Las semillas se desinfectaron sumergiéndolas en etanol 70% (v/v) durante 1 min, luego en hipoclorito de sodio 2% (m/v) durante 2 min y finalmente se lavaron 3 veces con agua destilada estéril. Las semillas fueron incubadas en placas con agar-agua a 28 °C durante 48 h para su germinación. Posteriormente las semillas pregerminadas se sembraron en frascos, magentas o macetas según ensayo (**sección 2.2.1.**, **sección 2.5.1.** y **sección 2.6.2.**, respectivamente).

2.4.2. Diseño experimental

Tanto para el ensayo de magentas como de invernáculo (**sección 2.5.** y **sección 2.6.**) se definieron 15 tratamientos con 5 repeticiones cada uno. Como controles negativos no inoculados se utilizaron dos tratamientos, uno con agregado de solución con nitrógeno (CN) y otro sin agregado de nitrógeno (SN). Como controles positivos se utilizaron las cepas de referencia: un tratamiento con la mezcla U1301:U1302 (1:1), y los otros dos tratamientos con las cepas SEMIA5080 y E109 solas. Los restantes 10 tratamientos correspondieron a las cepas naturalizadas seleccionadas en la

sección 2.2.2. inoculadas individualmente (CA1, CA2, CL1, CL2, CL3, CO1, CO2, SJ1, SO1 y SO2). El diseño fue completamente al azar.

2.4.3. Determinaciones de eficiencia simbiótica

En los ensayos de magentas y de invernáculo (**sección 2.5.** y **sección 2.6.**) se realizó el conteo del número de nódulos (NN) por unidad experimental. El material vegetal fue secado en la estufa a 65 °C hasta peso constante, luego se determinó el peso seco de los nódulos (PSN), peso seco de las raíces (PSR) y peso seco de las partes aéreas (PSPA). Adicionalmente, se calculó el peso seco total (PST):

$$PST = PSN + PSR + PSPA$$

2.4.4. Análisis estadísticos

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2018). Se realizaron gráficos de cajas con los datos originales y luego se eliminaron los datos que se encontraban fuera de rango. La normalidad fue evaluada con el test de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianzas con el test de Levene. Para comparar los datos correspondientes al NN se aplicó el Modelo Lineal Generalizado Mixto (MLGM) y se compararon las medias entre tratamientos con el test de LSD-Fisher. Para las variables PSN, PSR, PSPA y PST se utilizó un análisis de varianzas (ANAVA) y se compararon las medias aplicando el test de Fisher. Adicionalmente, se evaluó la correlación entre todas las variables medidas calculando el coeficiente de Spearman. El nivel de significancia utilizado en todos los análisis estadísticos fue del 95% ($p < 0,05$).

2.5. ENSAYO EN CONDICIONES GNOTOBIÓTICAS: MAGENTAS

2.5.1. Condiciones de crecimiento de plantas

El ensayo se realizó en la estación experimental “Las Brujas” del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA, Canelones, Uruguay), en invernáculo con condiciones controladas de temperatura (28 °C) y fotoperiodo (12 h luz/12 h

oscuridad). Se utilizaron magentas (**Figura 2.2.**) conteniendo arena estéril y solución Somesagaran (anexo: **sección 7.1.4.**).

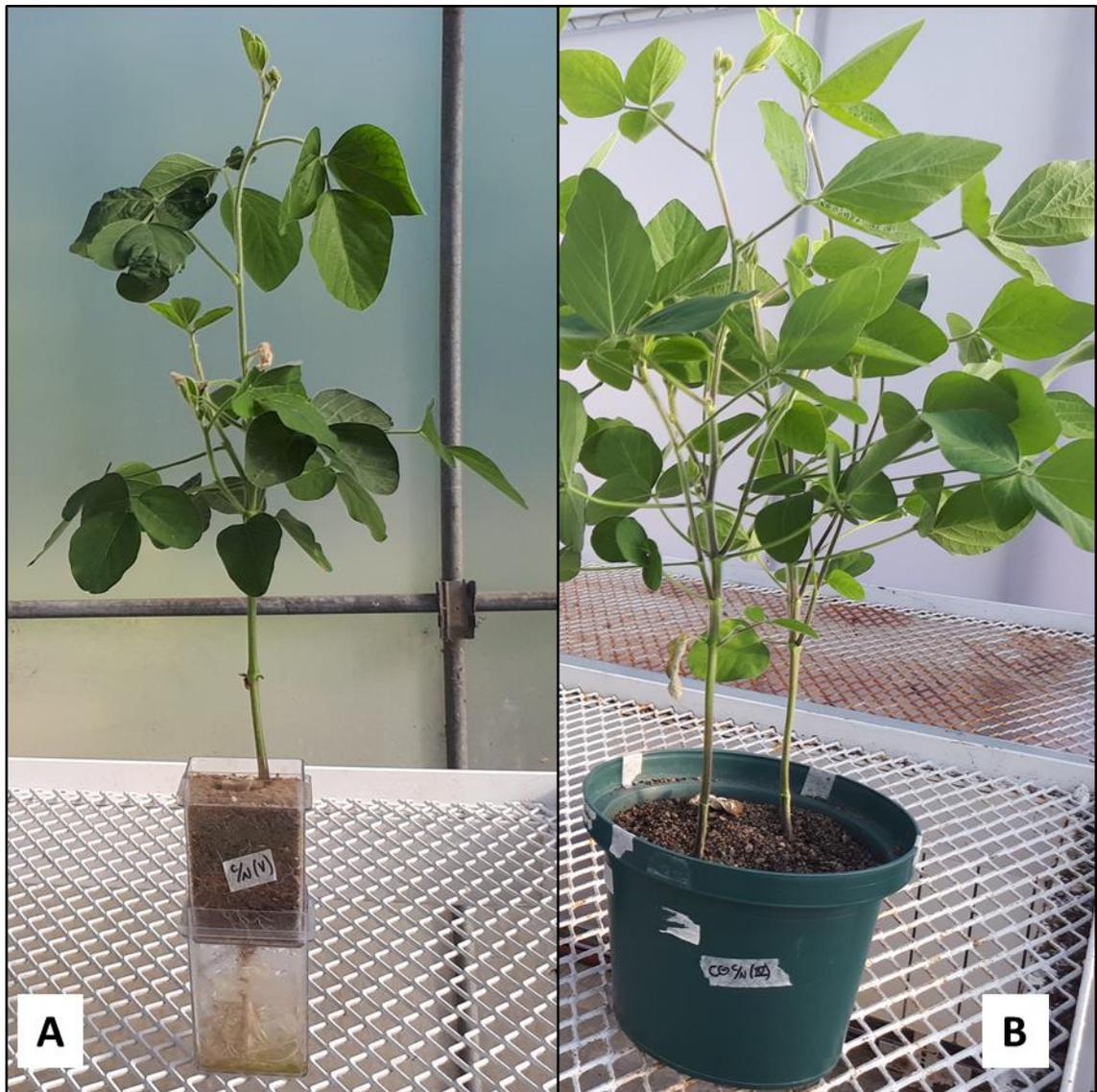


Figura 2.2.: Sistemas de crecimiento de plantas en ensayos de magentas (A) e invernáculo (B).

Las semillas de soja se desinfectaron y germinaron según la **sección 2.4.1.** Luego se sembraron 2 semillas de soja pregerminadas por magenta. A los 5 días de la siembra, se realeo a una planta por maceta y se inoculó asépticamente cada planta con 1 mL de cultivo con una concentración 10^7 UFC/mL, en el caso del tratamiento mezcla U1301:U1302 se inocularon 0,5 mL de cada cepa. El diseño experimental está

desarrollado en la **sección 2.4.2**. La solución nutritiva Somesagaran (anexo: **sección 7.1.4**) de las magentas fue remplazada a demanda. En los controles con agregado de nitrógeno se le adicionó una solución de nitrato de amonio (0,35 mM) obteniéndose una concentración en solución nutritiva con concentración de nitrógeno equivalente a 70 ppm de KNO₃. La cosecha del ensayo se realizó a los 28 días luego de la inoculación.

2.5.2. Determinación de eficiencia simbiótica y análisis estadísticos

Las variables determinadas se desarrollan en la **sección 2.4.3**. Adicionalmente, se molieron las muestras de parte aérea de cada tratamiento y se enviaron al Laboratorio de Nutrición Animal (Facultad de Agronomía, UDELAR) para determinar el nitrógeno total en parte aérea (NTPA) y porcentaje de nitrógeno (%N).

El análisis estadístico se desarrolla en la **sección 2.4.4**. Para las variables %N y NTPA se realizó el mismo análisis estadístico que para las variables PSN, PSPA y PST.

Con los datos de NN, PSN, PSPA y NTPA se realizó un análisis de componentes principales (PCA) con el fin de obtener los grados de agrupamiento y de similitud entre los tratamientos inoculados con las cepas de *B. elkanii*, *B. japonicum*, *B. diazoefficiens* y *Bradyrhizobium sp.*, mediante el programa estadístico Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2018). Como prueba a posteriori se utilizó el Análisis de Similaridad (ANOSIM) utilizando PAST 2.07 (Hammer *et al.* 2001, Clarke 1993), el cual dota de un test estadístico no paramétrico para comparar agrupaciones de las unidades.

2.6. ENSAYO EN CONDICIONES SEMICONTROLADAS: INVERNÁCULO

2.6.1. Características del suelo

Se colectó suelo del predio de INIA “Las Brujas” (Canelones, Uruguay). Las características fisicoquímicas del suelo analizadas por el laboratorio de INIA “La Estanzuela” son pH 6,2, carbono orgánico 2,87% y nitrógeno 0,26%. El suelo, extraído hasta 20 cm de profundidad, fue secado exponiéndolo al aire y luego fue tamizado (1 cm) y homogeneizado.

El suelo tenía historia de cultivo de soja inoculada en el año 2018. Para determinar el número de rizobios viables en suelo se empleó el método de número más probable (NMP) (Howieson y Dilworth, 2016). Las semillas de soja se desinfectaron y germinaron según la **sección 2.4.1**. El sistema de crecimiento de las plantas consistió en frascos (500 mL) con solución Somesagaran estéril y papel de filtro plegado como soporte para las plantas. Se inocularon las plantas con diluciones seriadas del suelo (-3), (-4) y (-5) además de un control sin inocular, con 3 réplicas cada uno. Se consideraron positivos los frascos que contenían al menos un nódulo a los 22 días luego de la inoculación (Howieson y Dilworth, 2016). Se determinó una concentración de $1,09 \times 10^7$ NMP de rizobios capaces de nodular soja / g de suelo.

2.6.2. Condiciones de crecimiento de plantas

El ensayo se realizó en la estación experimental “Las Brujas” del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA, Canelones, Uruguay), en invernáculo con condiciones controladas de temperatura (28 °C) y fotoperiodo (12 h luz/12 h oscuridad). Se utilizaron macetas de 2 Kg (**Figura 2.2**) conteniendo una mezcla (2:1) de arena estéril y suelo, respectivamente. El diseño experimental está desarrollado en la **sección 2.4.2**. Adicionalmente, se incluyeron por duplicado macetas sembradas con maíz, sorgo y tomate como plantas no fijadoras de nitrógeno para ser utilizadas en la técnica de abundancia natural de ^{15}N .

Las semillas de soja se desinfectaron y germinaron según la **sección 2.4.1**. Luego se sembraron 5 semillas de soja pregerminadas por maceta. A los 4 días de la siembra, se inoculó en el comienzo de la radícula de cada planta con 1 mL de cultivo con una concentración 10^7 UFC/mL, en el caso del tratamiento mezcla U1301:U1302 se inocularon 0,5 mL de cada cepa. A los 6 días de la inoculación, se raleó a 2 plantas por maceta.

Todas las macetas se regaron con agua corriente según las necesidades de las plantas y semanalmente con 100 mL solución Somesagaran (anexo: **sección 7.1.4.**) durante los primeros 15 días y luego se aumentó la dosis a 200 mL durante el resto del periodo. Los controles con agregado de nitrógeno fueron regados adicionalmente una

vez por semana con 100 mL de solución de nitrato de amonio (0,37 mM) durante todo el periodo. Las plantas no fijadoras de nitrógeno fueron regadas (por error experimental) con 300 mL de solución de nitrato de amonio (0,37 mM) a las tres semanas luego de la siembra, nuevamente con 150 mL a las cuatro semanas y finalmente con 300 mL a las cinco semanas. El resto del tiempo las macetas se mantuvieron hidratadas con agua dulce. La cosecha del ensayo se realizó a los 40 días luego de la inoculación, cuando las plantas de soja se encontraban en el estadio fenológico R1 (comienzo de la fase de floración).

2.6.3. Determinación de eficiencia simbiótica y análisis estadístico

Las variables determinadas se mencionan en la **sección 2.4.3**. Adicionalmente se molieron las muestras de parte aérea seca y se enviaron al *UC Davis Stable Isotope Facility* (Universidad de California, Estados Unidos de América) para determinar la diferencia de ^{15}N respecto al aire ($\delta^{15}\text{N}_{\text{aire}}$), el nitrógeno total en parte aérea (NTPA) y el porcentaje de nitrógeno (%N).

El análisis estadístico se desarrolla en la **sección 2.4.4**. Para las variables $\delta^{15}\text{N}_{\text{aire}}$, %N y NTPA se realizó el mismo análisis estadístico que para las variables PSN, PSPA y PST.

Con los datos de NN, PSN, PSPA y NTPA se realizó un análisis de componentes principales (PCA) con el fin de obtener los grados de agrupamiento y de similitud entre los tratamientos inoculados con las cepas de *B. elkanii*, *B. japonicum*, *B. diazoefficiens* y *Bradyrhizobium* sp., mediante el programa estadístico Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2018). Como prueba a posteriori se utilizó el Análisis de Similaridad (ANOSIM) utilizando PAST 2.07 (Hammer *et al.* 2001, Clarke 1993), el cual dota de un test estadístico no paramétrico para comparar agrupaciones de las unidades.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. SELECCIÓN DE CEPAS NATURALIZADAS

3.1.1. Autenticación de aislamientos

Para este trabajo se utilizaron 47 aislamientos de rizobios obtenidos desde nódulos de soja por Lagurara (2018), cuyo perfil de PCR-BOX en primera instancia fue diferente a las cepas de referencia utilizadas en los ensayos: *Bradyrhizobium elkanii* U1301, U1302, *B. diazoefficiens* SEMIA5080 y *B. japonicum* E109. De esos aislamientos, 44 formaron nódulos cuando se determinó la capacidad de nodular plantas de soja crecidas en condiciones gnotobióticas. De los nódulos obtenidos en el ensayo de nodulación, se realizaron aislamientos en medio YMA suplementado con rojo congo, obteniéndose para 39 de los aislamientos colonias con la morfología esperada para rizobios y no se observó crecimiento en los 5 restantes.

3.1.2. Perfil de fingerprinting (PCR-BOX)

Los dendrogramas construidos incluyendo triplicados de los perfiles de PCR-BOX de los 39 aislamientos autenticados permitieron evaluar la similitud entre los aislamientos y las cepas comerciales de referencia (U1301, U1302, SEMIA5080 y E109). Las repeticiones de un mismo aislamiento presentaron cierta variabilidad en el perfil de PCR-BOX. En base a la variabilidad observada se definió en 80% el límite de similitud para diferenciar cepas. Aplicando dicho criterio, 27 aislamientos presentaron igual perfil que las cepas comerciales (12 a *B. diazoefficiens* SEMIA5080, 11 a *B. japonicum* E109, dos a *B. elkanii* U1301 y dos a *B. elkanii* U1302) y se observaron 10 perfiles diferentes entre los 12 aislamientos restantes (dos perfiles presentaron dos aislamientos cada uno). Se seleccionó un aislamiento por perfil, los cuales se consideraron como “cepas naturalizadas”. Las cepas seleccionadas fueron aisladas en su mayoría de sitios con historia de soja de distintos departamentos del país. El **Cuadro 3.1** muestra el sitio, tratamiento y ensayo del cual proviene cada una de las cepas seleccionadas. Es importante destacar que la colección de aislamientos utilizada en este trabajo es un subgrupo preseleccionado de

los aislamientos obtenidos por Lagurara (2018) y por lo tanto los resultados obtenidos no representan a la totalidad de la población de rizobios naturalizados.

En la **Figura 3.1** se presentan los perfiles de PCR-BOX y el dendrograma obtenido para las 10 cepas seleccionadas además de las 4 cepas de referencia. Al considerar una similitud menor al 27%, se distinguen 4 grupos: el grupo I formado por 6 de las cepas naturalizadas (CL2, SO1, SO2, CO1, CA1 y CL1) y las cepas de referencia de *B. elkanii* U1301 y U1302; el II incluye únicamente a la cepa CA2 que presentó menor similitud por lo que no se consideró dentro del grupo I; el III formado por 3 cepas naturalizadas (CL3, CO2 y SJ1) que se agruparon con la cepa de *B. japonicum* E109 y el IV formado sólo por la cepa de *B. diazoefficiens* SEMIA5080 que no se agrupó con ninguna de las cepas naturalizadas. Al fijar el límite de similitud a 45%, se observa una alta diversidad en el grupo I que se divide en 5 subgrupos, mientras que no hay divisiones en el grupo III. Las cepas con mayor similitud entre ellas fueron CL3 y CO2 (78,6%), seguidas de CA1 y CL1 (71,4%). En cuanto a la mayor similitud con las cepas de referencia, se destacan la cepa CO1 que fue similar a las cepas U1302 (64,3%) y U1301 (47,3%), mientras que las cepas CL3 y CO3 fueron similares a la E109 (57,1%). Llama la atención que ninguna de las cepas naturalizadas presentó similitud con la cepa SEMIA 5080, a pesar de que ésta fue incluida en los ensayos de inoculación de los sitios de donde proviene la colección de cepas evaluadas (**Cuadro 2.1**), y que según mostraron los resultados obtenidos por Lagurara (2018), es competitiva y persiste en los suelos. Lo anterior puede deberse a que la sensibilidad del método de selección utilizado excluyera aislamientos similares a la cepas SEMIA5080 al considerarlos con un perfil igual a esta, posiblemente otra técnica de rep-PCR como PCR-ERIC seleccionaría otros perfiles.

Los métodos de rep-PCR, como el PCR-BOX, no son adecuados para identificar aislamientos a nivel de especie o género (Binde *et al.*, 2009), pero resultan una herramienta rápida que permite evaluar la diversidad de cepas de una población de rizobios (Menna *et al.*, 2009). Por ese motivo, en este trabajo se utilizó la técnica de PCR-BOX para caracterizar y seleccionar las cepas naturalizadas que luego se estudiaron genética y simbióticamente.

Cuadro 3.1: Origen de las 10 cepas naturalizadas seleccionadas. Se indica el sitio, la cepa con que fue inoculado el tratamiento de donde proviene o si no fue inoculado y si el sitio posee o no historia de cultivo de soja reciente.

| Cepa | Departamento | Localidad | Tratamiento | Historia de soja |
|-------------|---------------------|-------------------|--------------------|-------------------------|
| CA1 | Canelones | Las Brujas | U1301 | Sin historia |
| CA2 | Canelones | Las Brujas | Sin inocular | Con historia |
| CL1 | Cerro Largo | Melo | SEMIA5080 | Con historia |
| CL2 | Cerro Largo | Melo | U1301+U1302 | Con historia |
| CL3 | Cerro Largo | Melo | SEMIA5080 | Con historia |
| CO1 | Colonia | Ombúes de Lavalle | U1301+U1302 | Con historia |
| CO2 | Colonia | Ombúes de Lavalle | SEMIA5080 | Con historia |
| SJ1 | San José | Santa Clara | Sin inocular | Con historia |
| SO1 | Soriano | Invernada | Sin inocular | Con historia |
| SO2 | Soriano | Invernada | Sin inocular | Con historia |

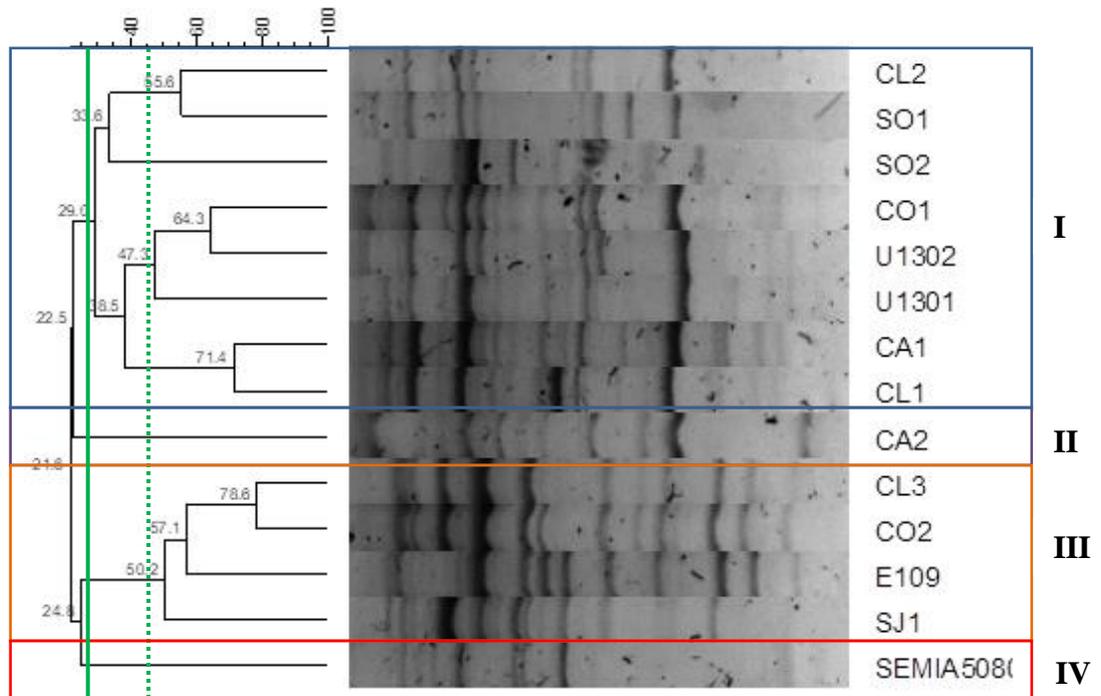


Figura 3.1: Dendrograma basado en perfiles de PCR-BOX usando el método UPGMA y el coeficiente de Jaccard de cepas de rizobios naturalizadas y cepas de referencia de *B. elkanii* (U1301 y U1302), *B. japonicum* (E109) y *B. diazoefficiens* (SEMIA5080). Las líneas entera y punteada indican el 27% y 45% de similitud fijado como límite para separar grupos y subgrupos, respectivamente. Los recuadros marcan los 4 grupos que se distinguen y el número asignado. En los nodos se muestra el porcentaje de similitud correspondiente.

3.2. CARACTERIZACIÓN GÉNÉTICA

3.2.1. Genes housekeeping

Se lograron obtener amplicones y secuencias de los genes 16S *rRNA*, *atpD*, *gyrB* y *rpoB*; mientras que de los genes *recA* y *dnaK* no se lograron obtener amplificaciones de calidad para realizar la secuenciación a pesar de que se realizaron varios ajustes en las condiciones de amplificación. Se observaron grandes diferencias relacionadas con las cepas en las cantidades de amplicón obtenidos para los genes *recA* y *dnaK* por lo cual es posible que los cebadores utilizados no lograran una correcta hibridación en todos los genomas. Para realizar los análisis filogenéticos de las secuencias de

genes *housekeeping* se incluyeron secuencias tipo de diferentes especies de *Bradyrhizobium*, también se incluyó la cepa *Bradyrhizobium* sp. UFLA06-06 reportada por de Almeida Ribero *et al.* (2015) debido a la alta similitud con secuencias de una de las cepas naturalizadas (CA2), y como grupo externo se utilizaron secuencias de *Sinorhizobium fredii* LMG 6218, reportada como noduladora de soja (Wang *et al.*, 2019).

Del árbol filogenético obtenido con las secuencias del gen 16S *rRNA* (**Figura 3.2**) se destacan dos grupos de interés: uno en el que se encuentran 6 de las cepas naturalizadas (SO1, CL2, CL1, CA2, CO1 y CA1), las cepas de referencia de *B. elkanii* (U1301 y U1302), cepas tipo de *B. elkanii*, *B. brasiliense*, *B. pachyrizi* y *B. ferriligni*; otro grupo que incluye 4 cepas naturalizadas (CO2, CL3, SO2 y SJ1) y las cepas tipo (LMG 6138) y de referencia (E109) de *B. japonicum*. El valor de *bootstrap* para el primer grupo fue de 58, mientras que para el segundo de 24. Las cepas de *B. diazoefficiens*, SEMIA5080 (referencia) y SEMIA5060 incluida en el análisis, se ubican en otra rama más alejada del árbol filogenético donde no se incluyen cepas naturalizadas. El análisis de este gen demuestra una baja capacidad de resolución a nivel de especie para el género *Bradyrhizobium* debido a la falta de discriminación entre especies, por ejemplo, cepas tipo de distintas especies: *B. elkanii*, *B. pachyrizi* y *B. brasiliense* se incluyen en un mismo grupo. Estos resultados confirman que el análisis de las secuencias del gen 16S *rRNA* no permite, como ocurre en muchos géneros, la identificación de los *Bradyrhizobios* a nivel de especie, como fue previamente reportado por otros trabajos (Delamuta *et al.* 2012, Menna *et al.* 2009). Se destaca la coherencia entre la tipología obtenida por el dendrograma de PCR-BOX y el gen 16S *rRNA*, resultado que coincide con los obtenidos por otros autores (Chibeba *et al.* 2017, Delamuta *et al.* 2017). La excepción es la cepa SO2, que presentó similitud con las cepas SO1 y CL2 en el dendrograma de PCR-BOX y sin embargo en el árbol filogenético para el gen 16S *rRNA* se ubica en el grupo de *B. japonicum* junto a las cepas CL3 y SJ1, resultados similares fueron reportados por Binde *et al.* (2009).

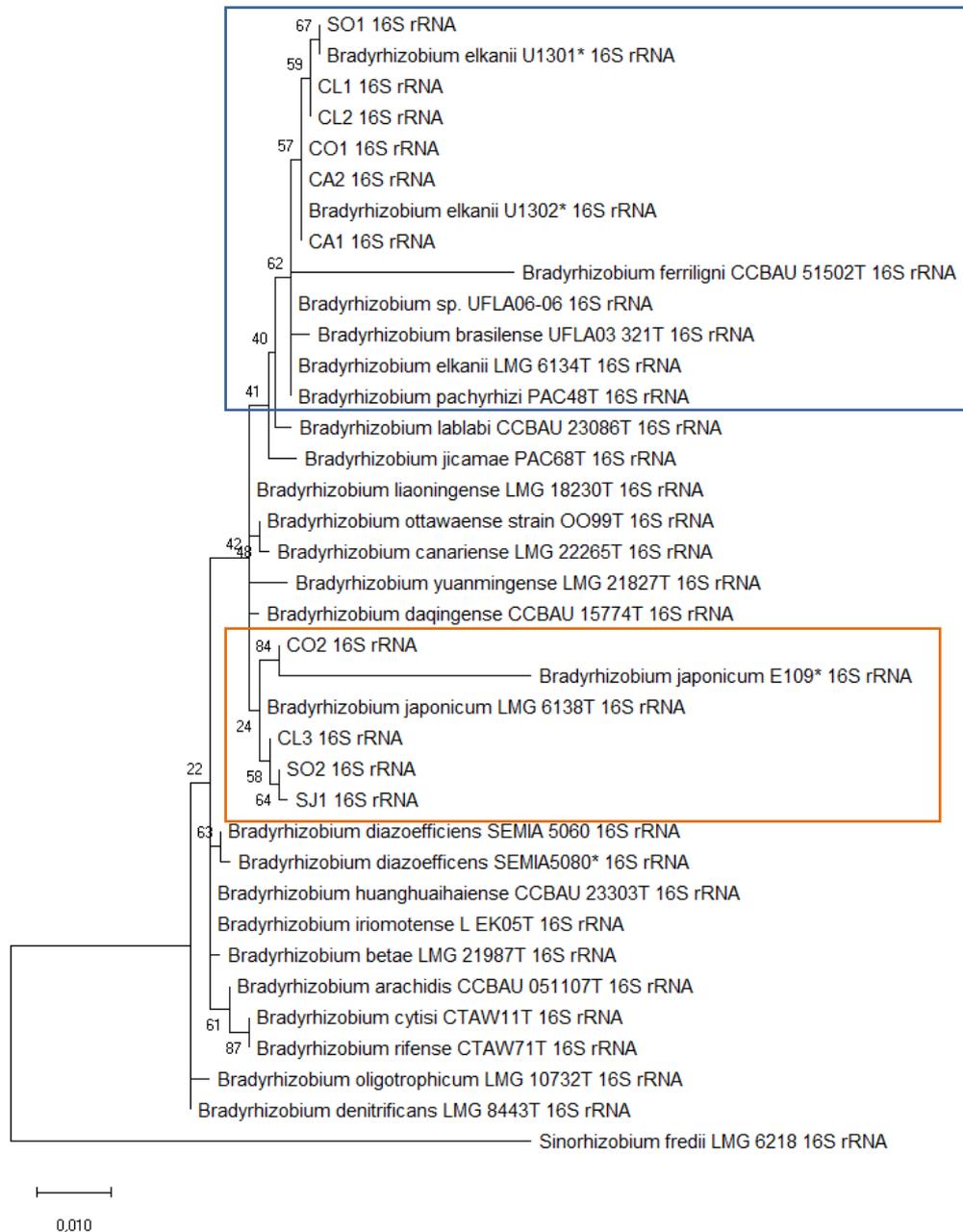


Figura 3.2: Árbol filogenético *Maximum likelihood* construido a partir de secuencias parciales del gen 16S *rRNA* de cepas de rizobios naturalizadas, cepas tipo de varias especies de *Bradyrhizobium*, *Bradyrhizobium* sp. UFLA06-06, cepas de referencia usadas en este trabajo (marcadas con *) y grupo externo (*Sinorhizobium fredii* LMG 6218). Los recuadros marcan los grupos que incluyen las cepas de rizobios naturalizadas. Se muestran los valores de *bootstrap* en los nodos correspondientes.

Para profundizar el estudio de las relaciones filogenéticas de las cepas naturalizadas y las de referencia se analizaron otros genes *housekeeping*. En primer lugar, se analizarán los resultados de los árboles filogenéticos de estos genes individualmente. La **Figura 3.3** muestra el árbol obtenido utilizando secuencias del gen *rpoB*, la topología observada fue similar a la del 16S *rRNA*, distinguiéndose los mismos dos grupos donde se ubicaron las cepas naturalizadas. Los resultados obtenidos del análisis filogenético con las secuencias del gen *gyrB* (**Figura 3.4**) mostraron mayor discriminación de especies, presentándose un grupo que incluye cepas tipo y de referencia de *B. elkanii* y 5 de las cepas naturalizadas (CL1, CA1, CL2, CO1 y SO1) y otro con cepas tipo y de referencia de *B. japonicum* donde se ubican 4 cepas naturalizadas (CO2, SJ1, CL3 y SO2). Se destaca además que la cepa naturalizada CA2, se ubicó separada en otra rama en la cual forma un grupo con la cepa *Bradyrhizobium* sp. UFLA06-06 y la cepa tipo de *B. ferriligni*. Las cepas naturalizadas que agrupan con *B. elkanii* y las que lo hacen con *B. japonicum* en el árbol filogenético del *gyrB* se agruparon de forma similar en el árbol filogenético del gen *atpD* (**Figura 3.5**). El grupo formado por las cepas CA2 y *Bradyrhizobium* sp. UFLA06-06 presenta mayor valor de *bootstrap* en árbol del gen *atpD*, es importante aclarar que no se encuentran disponibles en bases de datos secuencias del gen *atpD* de cepas de *B. ferriligni* por lo que no se pudo incluir en el análisis secuencias de esta especie. Esto hubiese aportado información valiosa ya que la cepa *Bradyrhizobium* sp. UFLA06-06 se encuentra filogenéticamente relacionada a esta especie según en el análisis del gen *gyrB* (**Figura 3.4**).

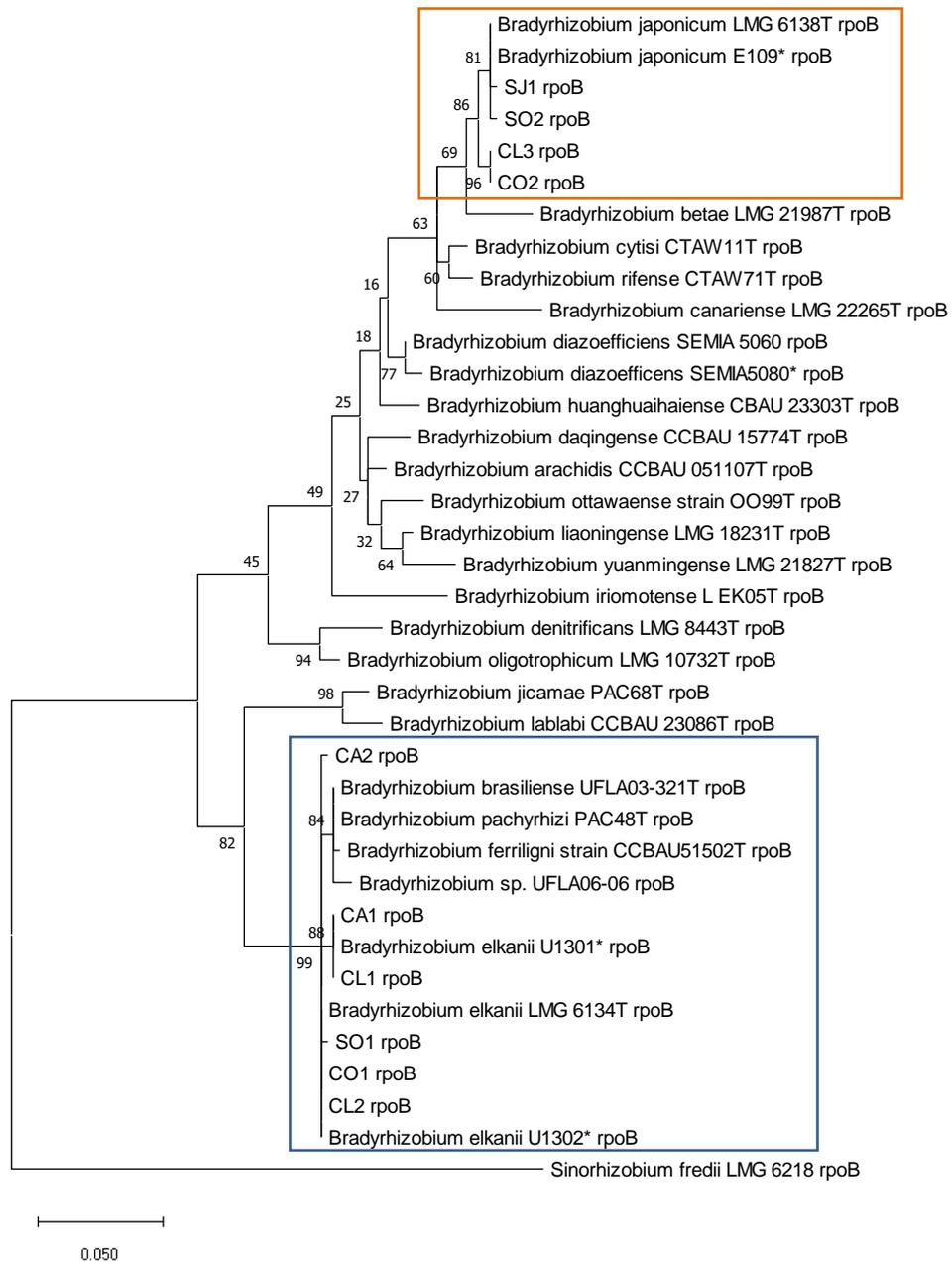


Figura 3.3: Árbol filogenético *Maximum likelihood* construido a partir de secuencias del gen *rpoB* de cepas de rizobios naturalizadas, cepas tipo de especies de *Bradyrhizobium*, *Bradyrhizobium* sp. UFLA06-06, cepas de referencia (marcadas con *) y grupo externo (*Sinorhizobium fredii* LMG 6218). Los recuadros marcan los grupos que incluyen las cepas de rizobios naturalizadas. Se muestran los valores de *bootstrap* en los nodos correspondientes.

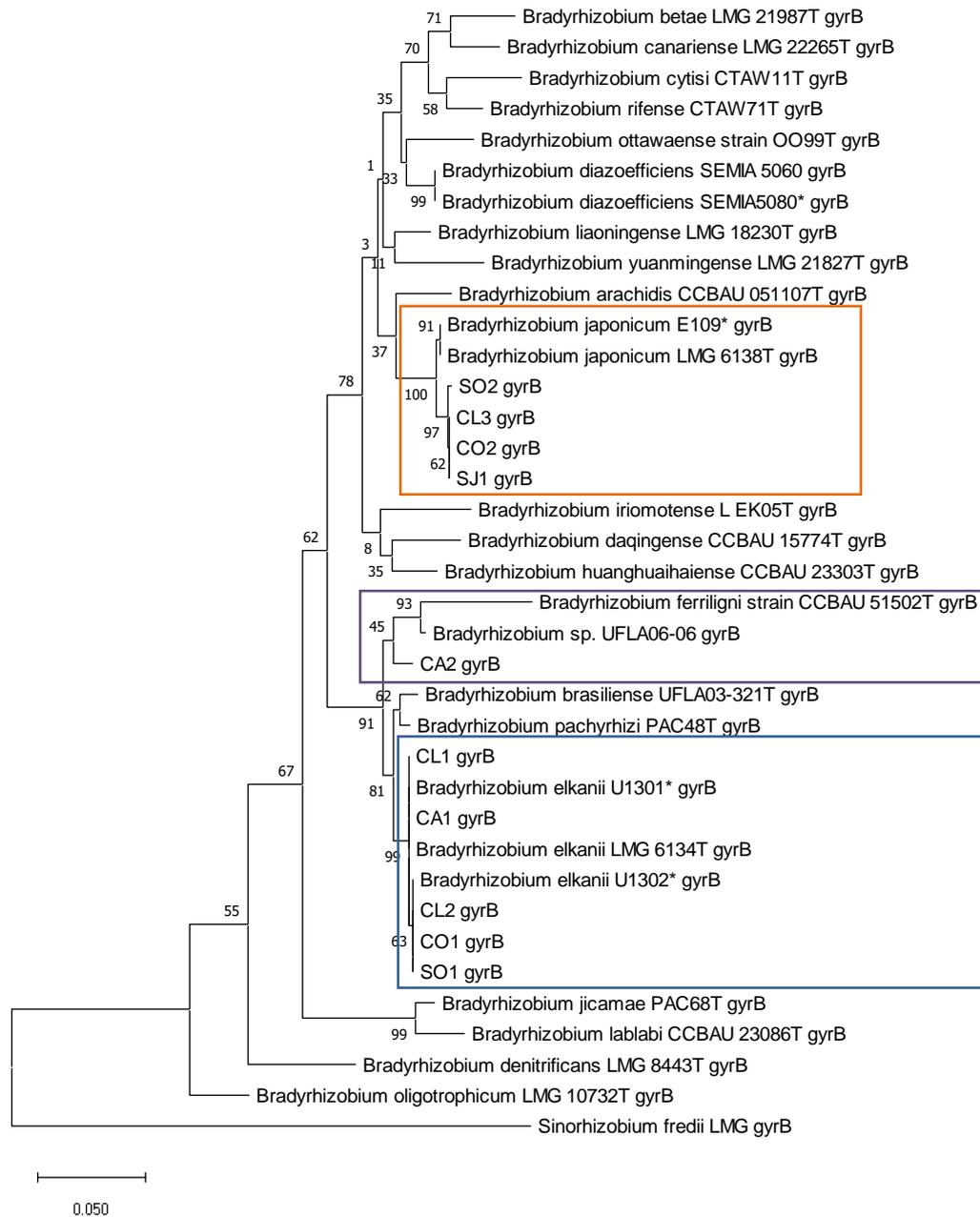


Figura 3.4: Árbol filogenético *Maximum likelihood* construido basado en secuencias del gen *gyrB* de cepas naturalizadas, cepas tipo de especies de *Bradyrhizobium*, grupo externo (*Sinorhizobium fredii* LMG 6218), *Bradyrhizobium* sp. UFLA06-06 y cepas de referencia (marcadas con *). Los recuadros marcan los grupos que incluyen las cepas de rizobios naturalizadas. Se muestran los valores de *bootstrap* en los nodos correspondientes.

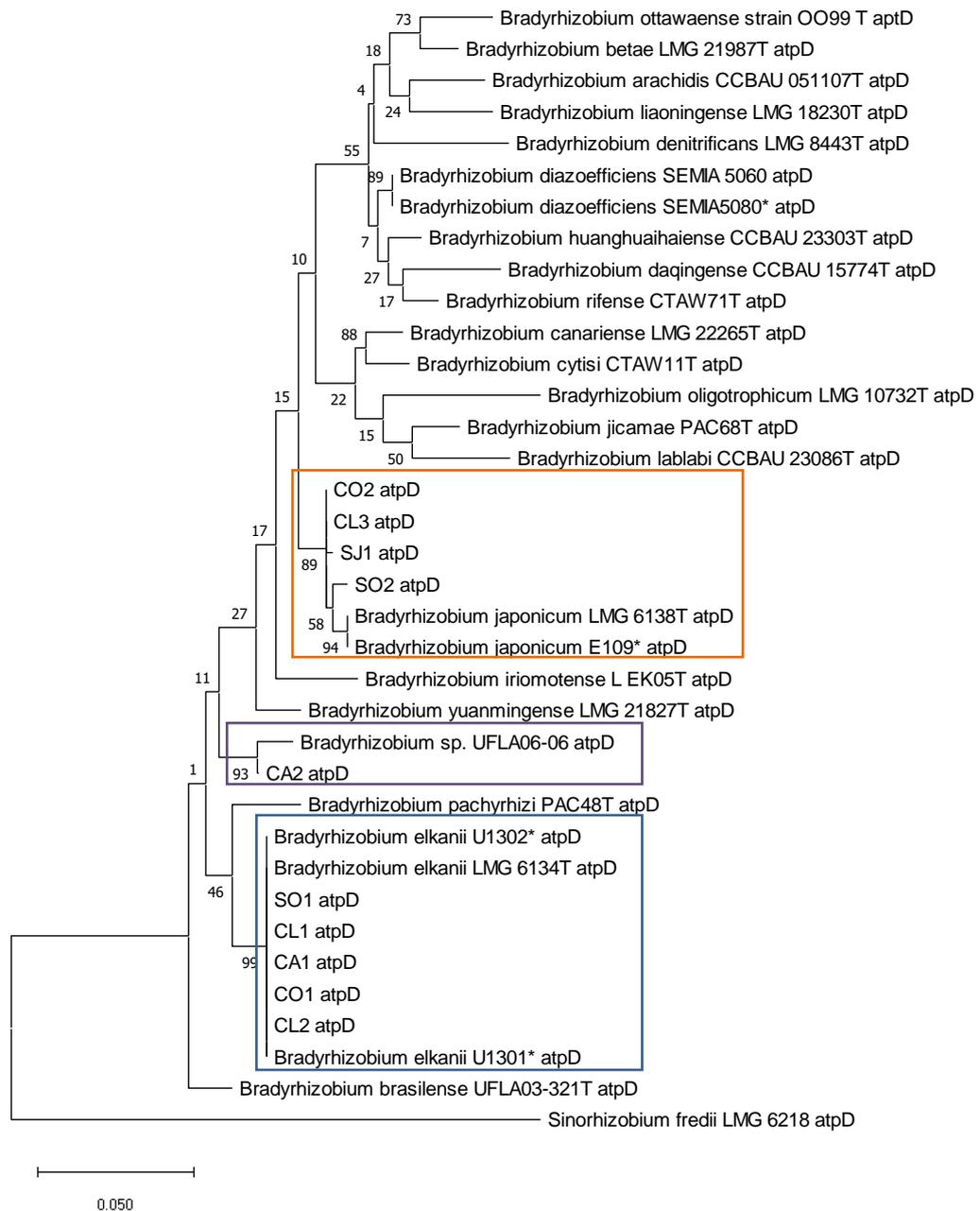


Figura 3.5: Árbol filogenético *Maximum likelihood* construido basado en secuencias del gen *atpD* de cepas naturalizadas, cepas tipo de especies de *Bradyrhizobium*, grupo externo (*Sinorhizobium fredii* LMG 6218), *Bradyrhizobium* sp. UFLA06-06 y cepas de referencia (marcadas con *). Los recuadros marcan los grupos que incluyen las cepas de rizobios naturalizadas. Se muestran los valores de *bootstrap* en los nodos correspondientes.

Al analizar los árboles obtenidos para cada uno de los genes *housekeeping* por separado, se destaca que presentan topologías similares, aunque los genes *atpD* y *gyrB* resultaron más sensibles que los genes *rpoB* y 16S *rRNA*, resultado que concuerda con los obtenidos por de Almeida Ribeiro *et al.* (2015). Para mejorar el análisis filogenético de las cepas se realizó la concatenación de genes *housekeeping* aplicando la técnica conocida como *multilocus sequence analysis (MLSA)*. Muchos trabajos aplican esta metodología y varían en el número e identidad de los genes utilizados, dentro de los que se incluyen 16S *rRNA*, *recA*, *glnII*, *rpoB*, *dnaK* y *gyrB* (Chibeba *et al.* 2017, Delamuta *et al.* 2017, de Almeida Ribero *et al.* 2015, Arsesse *et al.* 2012). Azevedo *et al.* (2015) proponen que para la técnica de *MLSA* se utilicen entre 2 y 6 genes. En este trabajo se concatenaron las secuencias de los genes 16S *rRNA*, *gyrB*, *rpoB* y *atpD* de las cepas tipo, de referencia y naturalizadas lo que resultó en un alineamiento de 2251 posiciones. El árbol filogenético obtenido de los genes concatenados (**Figura 3.6**) presentó una topología similar al obtenido para el gen *atpD*, aunque se resaltan valores de *bootstrap* considerablemente mayores lo cual aporta robustez al análisis y origina resultados más confiables.

Con el fin de profundizar la caracterización de la cepa CA2, se aplicó la técnica de *MLSA* con las secuencias disponibles en *GenBank* de una mayor cantidad de genes (16S *rRNA*, *gyrB*, *rpoB*, *dnaK* y *recA*) de las cepas *Bradyrhizobium* sp. UFLA06-06, cercana a la cepa CA2, y la cepa tipo *B. ferriligni* CCBAU51502. En el árbol obtenido (apéndice: **Figura 6.1**) se observa que ambas cepas forman un grupo claramente diferenciado de las demás especies de *Bradyrhizobium*.

Por lo tanto, *MLSA* resultó una metodología más robusta que el análisis de genes únicos, la cual permitió la identificación de la especie de la mayoría de los aislamientos. Los resultados obtenidos indican que 5 de las cepas naturalizadas (CL1, CA1, CO1, CL2 y SO1) pertenecen a la especie *B. elkanii*, 4 cepas (CL3, CO2, SJ1 y SO2) pertenecen a la especie *B. japonicum* y la cepa CA2 si bien no pudo ser identificada a nivel de especie se sugiere que pueda pertenecer a la especie *B. ferriligni* debido a que la cepa tipo de esta especie es la más cercana. Para aumentar la confiabilidad en la asignación de especies para las cepas naturalizadas, se

recomienda la amplificación, secuenciación y análisis de genes *housekeeping* adicionales a los realizados en este trabajo, por ejemplo, *recA*, *dnaK* o *glnII*. Se ensayó la amplificación de los genes *recA* y *dnaK* aunque no se encontraron las condiciones necesarias para obtener una cantidad suficiente de producto de todas las cepas para estos genes, es posible que los cebadores utilizados no logran una hibridación suficientemente buena.

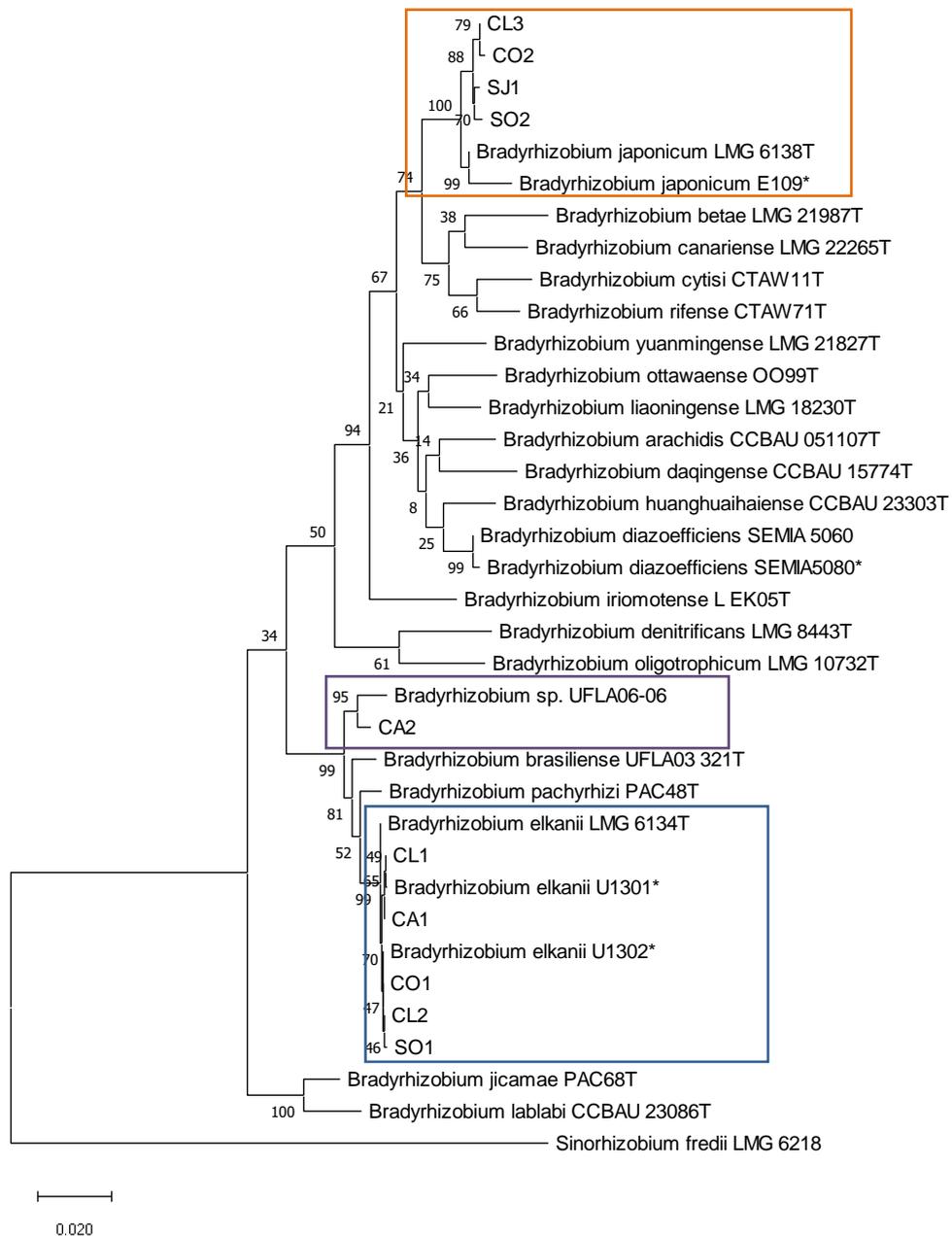


Figura 3.6: Árbol filogenético *Maximum likelihood* construido con secuencias concatenadas de los genes 16S *rRNA*, *gyrB*, *rpoB* y *atpD* de cepas naturalizadas, cepas tipo de especies de *Bradyrhizobium*, grupo externo (*Sinorhizobium fredii* LMG 6218), *Bradyrhizobium* sp. UFLA06-06 y cepas de referencia (marcadas con *). Los recuadros marcan los grupos que incluyen las cepas de rizobios naturalizadas. Se muestran los valores de *bootstrap* en los nodos correspondientes.

La bibliografía presenta numerosos estudios sobre identificación de rizobios noduladores de soja en una amplia variedad de suelos en países como Australia y Sudáfrica (Helene *et al.*, 2020), Argentina (Iturralde *et al.*, 2019), Mozambique (Chibeba *et al.*, 2017), Japón y Filipinas (Tabing Mason *et al.*, 2017), Brasil (de Almeida Ribero *et al.*, 2015) y Etiópia (Arsese *et al.*, 2012) los cuales reportan principalmente cepas de las especies *B. elkanii* y *B. japonicum*, las dos especies más utilizadas en la formulación de inoculantes, aunque también se reportan cepas de *B. diazoefficiens*, *Rhizobium radiobacter* y *Bradyrhizobium* sp.. Debido a que en Uruguay los inoculantes comerciales se formulan con cepas de *B. elkanii* era esperable, que la mayoría de las cepas naturalizadas fueran variantes de éstas y pertenecieran a esta especie. Por otro lado, los resultados mostraron que 4 cepas naturalizadas pertenecen a la especie *B. japonicum* y tres de ellas se asemejaron por su perfil de PCR-BOX a la cepa E109 de *B. japonicum* utilizada en Argentina. Dos de éstas cepas fueron aisladas de ensayos de inoculación donde uno de los tratamientos inoculados incluía a la cepa E109 por lo que es posible que estas cepas se originaran de una contaminación de los tratamientos. Sin embargo, las otras dos cepas naturalizadas fueron aisladas de sitios con historia de soja donde no se incluyeron tratamientos inoculados, por lo que las cepas tendrían su origen en inoculaciones anteriores. Aunque no tenemos conocimiento de la aplicación de inoculantes comerciales formulados con cepas de *B. japonicum* en nuestro país, no se descarta la posibilidad de que se hayan utilizado inoculantes provenientes de Argentina o semillas contaminadas con rizobios de dicho país, siendo esa la razón más factible de explicar la presencia de cepas naturalizadas de esta especie en suelos uruguayos. Como ya se mencionó anteriormente, a pesar de que Lagurara (2018) comprobó la presencia de la cepa *B. diazoefficiens* SEMIA5080 en los sitios de donde provienen los aislamientos utilizados en este trabajo, ninguna de las cepas naturalizadas pertenece a esta especie posiblemente debido al método de selección de cepas naturalizadas.

Se destaca la presencia de una cepa (CA2) de *Bradyrhizobium* cuya especie no pudo ser identificada, pero se sugiere que es diferente a las especies utilizadas en los

inoculantes comerciales de la región. Stepkowski *et al.* (2005) plantean tres posibles hipótesis para explicar el origen de cepas en los suelos diferentes a los inoculantes comerciales aplicados: que fueran introducidas accidentalmente al suelo por semillas contaminadas o mediante inoculación utilizando suelos de otra zona, la adquisición de genes simbióticos por parte de cepas nativas mediante transferencia horizontal de genes, o la presencia de rizobios nativos capaces de nodular una leguminosa de otra especie. Cualquiera de estas hipótesis es válida para explicar nuestros resultados. Según las relaciones filogenéticas encontradas en nuestro trabajo, la cepa CA2 es cercana a la cepa *Bradyrhizobium* sp. UFLA06-06 la cual fue aislada de nódulos de una planta de soja obtenidos de un ensayo utilizando suelo del sudeste de Brasil por de Almeida Ribero *et al.* (2015). A su vez, la cepa UFLA06-06 es similar a la cepa de *Bradyrhizobium ferriligni* CCBAU51502^T aislada de nódulos de *Erythriphleum fordii* y reportada como cepa tipo de esta especie por Yao *et al.* (2015). Aunque la especie de *Bradyrhizobium ferriligni* no está reportada como noduladora de soja hasta el momento, se sabe que *Glycine max* (L.) Merr. es una planta promiscua y por lo tanto puede nodular con una gran variedad de especies por lo que es altamente probable que pueda hacerlo también con cepas de esta especie (Wang *et al.*, 2019).

3.2.2. Genes simbióticos

Para evaluar las relaciones filogenéticas de las cepas naturalizadas a nivel simbiótico y estudiar el posible origen de la capacidad de fijar N₂ y nodular soja, se amplificaron y secuenciaron el gen *nifH* que codifica el componente II de la nitrogenasa, y la región intergénica *nodD-nodA* conocida como *nodY/K* probablemente relacionada con la síntesis de factores Nod. El análisis filogenético de los genes *nifH* y *nodY/K* incluyó además de las cepas de referencia y naturalizadas, otras secuencias publicadas de varias cepas y especies de *Bradyrhizobium*.

En el árbol obtenido para el gen *nifH* (**Figura 3.7**) se observa que las cepas de *B. elkanii* secuenciadas en nuestro trabajo (U1301, U1302, SO1, CL2, CO1, CA1 y CL1) forman un grupo en el que se incluyen otras cepas reportadas de esta especie y también la cepa CA2 de *Bradyrhizobium* sp.. Si bien la cepa CA2 resultó cercana a

B. elkanii en el análisis de genes *housekeeping* no pertenece a esta especie. Por otro lado, la cepa de referencia de *B. ferriligni*, especie a la que posiblemente pertenece la cepa CA2, se diferencia de esta y de las cepas de *B. elkanii* en el árbol del gen *nifH*. La secuencia del gen *nifH* de la cepa de *Bradyrhizobium* sp. UFLA06-06 no se incluyó en este análisis debido a que el número de nucleótidos que alineaban con ella era bajo (253); sin embargo, se incorporó en el árbol complementario presentado en el apéndice (**Figura 6.2**) en el que se observa que ambas cepas CA2 y UFLA06-06 aisladas de nódulos de soja agrupan con las demás cepas naturalizadas identificadas como *B. elkanii*. Además, es interesante notar que cepas reportadas de *B. elkanii* (SEMIA 6077 y SBR7A) se distribuyen en otras ramas del árbol. Por otro lado, las demás cepas de *B. japonicum* secuenciadas en este trabajo (E109, CL3, SO2, CO2 y SJ1) y la cepa de *B. diazoefficiens* SEMIA5080 formaron un único grupo junto con otras secuencias disponibles de cepas de *B. japonicum*. Se destaca que no existen diferencias entre las cepas naturalizadas y de referencia pertenecientes a un mismo grupo. Un resultado similar se obtuvo para el árbol de la región intergénica *nodD-nodA*, gen *nodY/K* (**Figura 3.8**), donde se observan dos grupos uno: integrado por las cepas de *B. elkanii* y otro por cepas de *B. japonicum* y *B. diazoefficiens*. No se logró una secuencia de buena calidad para la cepa CL3 por lo que no se incluyó en el análisis. El resultado observado para *nodY/K* presenta más variabilidad entre las cepas en el grupo de *B. japonicum* respecto al obtenido para el *nifH* y la diferencia entre los grupos de las especies *B. elkanii*, incluida *Bradyrhizobium* sp. CA2, y *B. japonicum* es considerablemente mayor, lo cual resulta interesante en la evaluación de la diversidad de poblaciones de rizobios noduladores de soja (Delamuta *et al.* 2017, Arsesse *et al.* 2012). Al igual que en el árbol construido con las secuencias del gen *nifH*, también se observa una cepa de *B. elkanii* (SBR7A) que no se incluye en el grupo formado por las demás cepas de esta especie.

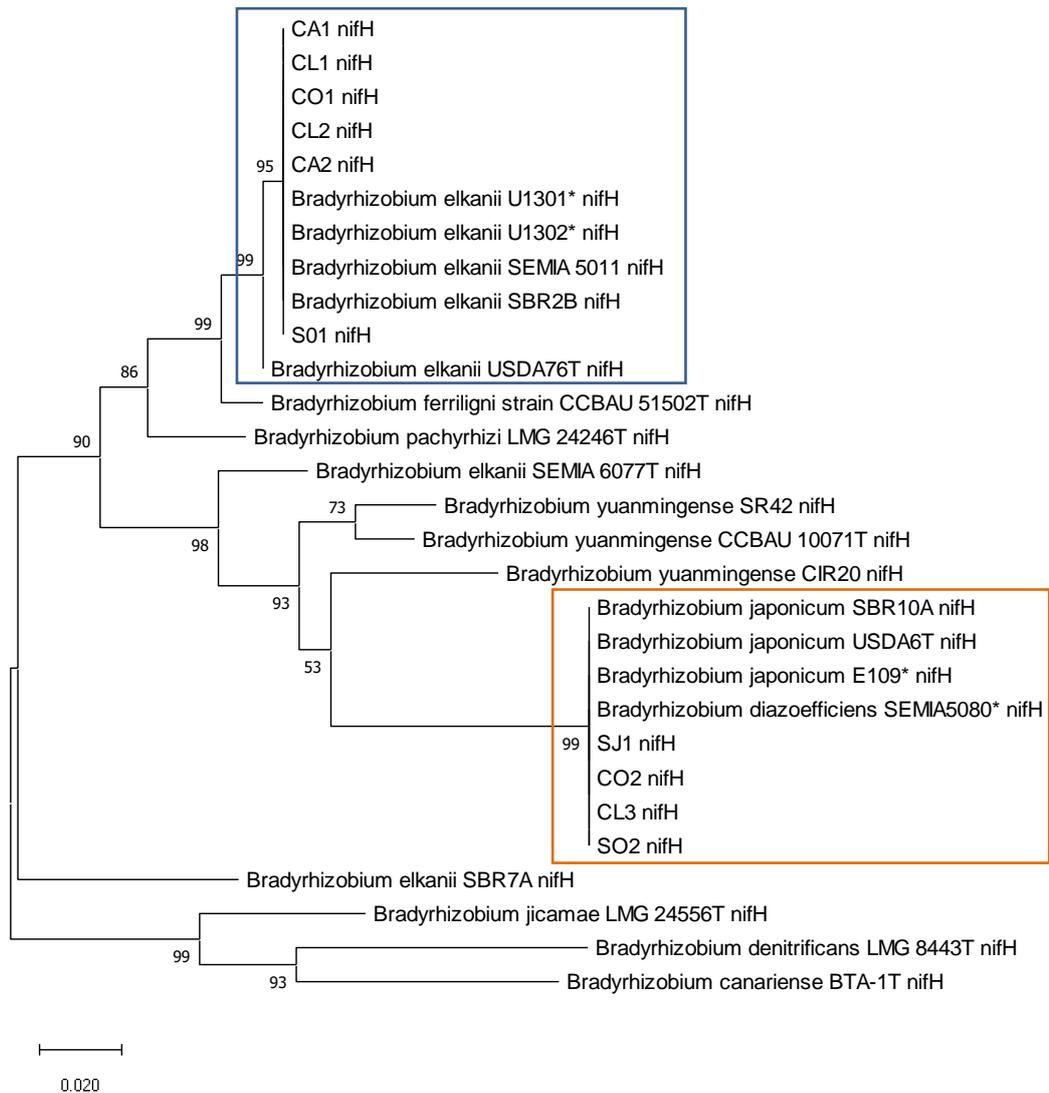


Figura 3.7: Árbol filogenético de *Maximum likelihood* de gen *nifH* de cepas naturalizadas, cepas *Bradyrhizobium* disponibles en *GenBank*, y cepas de referencia (marcadas con *). Los recuadros marcan los grupos que incluyen las cepas de rizobios naturalizadas. Se muestran los valores de *bootstrap* en los nodos correspondientes.

Los genes involucrados en la fijación de nitrógeno (*nif*) han coevolucionado con los genes de nodulación de plantas leguminosas (*nod*) (Lloret y Martínez-Romero, 2005). Varios estudios han reportado una filogenia similar para los genes *nifH*, *nifD*, *nodA*, *nodC*, *nodD* y/o *nodY/K* (Tartaglia *et al.* 2019, Delamuta *et al.* 2017, Tabin Mason *et al.* 2017, Arses *et al.* 2012). Nuestros resultados coinciden con los

reportados por estos estudios, los arboles de los genes *nifH* y *nodY/K* son similares para las cepas estudiadas observándose dos grupos, uno con cepas de *B. elkanii* y otro que incluye cepas de *B. japonicum* y *B. diazoefficiens*.

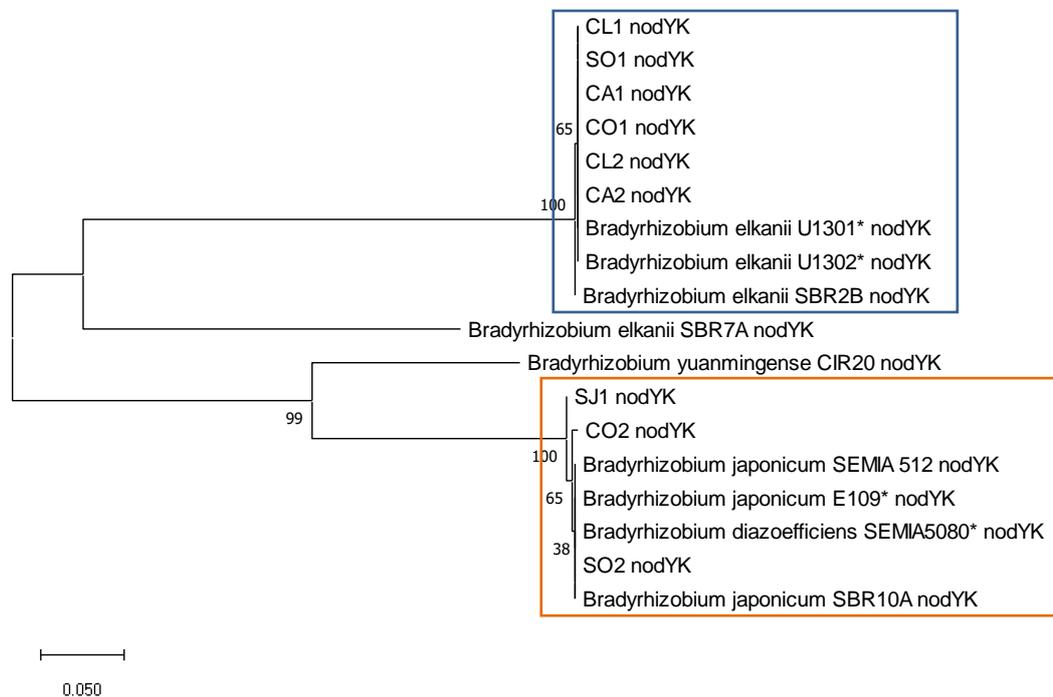


Figura 3.8: Árbol filogenético de *Maximum likelihood* de región intergénica *nodD-nodA* (*nodY/K*) de cepas naturalizadas, cepas *Bradyrhizobium* disponibles en *GenBank*, y cepas de referencia (marcadas con *). Los recuadros marcan los grupos que incluyen las cepas de rizobios naturalizadas. Se muestran los valores de *bootstrap* en los nodos correspondientes. No se obtuvo una secuencia de calidad suficiente para el gen *nodY/K* de la cepa CL3 por lo que no se incluyó en el análisis.

Los genes de fijación y nodulación conocidos como genes simbióticos se encuentran en islas simbióticas las cuales están presentes en plásmidos o en el cromosoma, este último es el caso para el género *Bradyrhizobium* (Kaneko *et al.*, 2011). Se ha encontrado que estas islas simbióticas tienen una alta cantidad de inserciones y son afectadas por una alta tasa de transferencia horizontal de genes. Por otro lado, varios trabajos proponen un origen monofilético de los genes simbióticos en el género *Bradyrhizobium* (Arsese *et al.* 2012, Menna y Hungria 2011). En nuestro caso

particular, se obtuvo una concordancia entre la filogenia obtenida para los genes concatenados y para los genes simbióticos para las cepas de las especies *B. elkanii* y *B. japonicum*, lo que sugiere que en las cepas naturalizadas estudiadas en este trabajo los genes simbióticos derivaron de los ancestros pertenecientes a estas especies. Los resultados sugieren firmemente que las cepas naturalizadas de la especie *B. elkanii* provienen directamente de las cepas utilizadas en inoculantes comerciales de Uruguay (U1301 y U1302), mientras que para las pertenecientes a *B. japonicum* podrían haber evolucionado de la cepa E109 u otras cepas de esta especie, y tienen una mayor tasa de mutación. Adicionalmente, se observan secuencias de cepas identificadas como *B. elkanii* (SEMIA6077 y SBR7A) aisladas de nódulos de soja reportadas por otros autores no incluidas en nuestro grupo las cuales posiblemente hayan adquirido sus genes simbióticos de otras especies de rizobios.

Por otro lado, los genes simbióticos de la cepa *Bradyrhizobium sp.* CA2 agrupan con las pertenecientes a la especie *B. elkanii*. Esta cepa en los genes 16S *rRNA*, *rpoB* y *gyrB* es cercana a la cepa de *B. ferriligni* CCBAU 5102 cuya secuencia de gen *nifH* no se encuentra dentro del grupo de *B. elkanii* y la cual no fue aislada de nódulos de soja. Debido a lo anteriormente descrito se plantea la hipótesis de una posible transferencia horizontal de genes simbióticos desde cepas de la especie *B. elkanii* noduladoras de soja hacia la cepa de *B. ferriligni* presente en el suelo.

3.3. EFICIENCIA SIMBIÓTICA

3.3.1. Ensayo en condiciones gnotobióticas: Magentas

Como primera fase se realizó un ensayo de crecimiento de plantas de soja (variedad Nidera 5909) en condiciones controladas utilizando como sustrato arena estéril en el cual las 14 cepas inoculadas en cada tratamiento son el factor diferencial. Las plantas se mantuvieron en las condiciones óptimas (temperatura, luz/oscuridad y disponibilidad de nutrientes) para desarrollar su potencial de fijación de nitrógeno. Los resultados obtenidos al medir los parámetros de nodulación y biomasa de este ensayo se presentan en el **Cuadro 3.2**. Los tratamientos inoculados con las cepas de *B. elkanii* y la cepa *Bradyrhizobium sp.* CA2 presentaron valores significativamente

mayores en el número de nódulos (NN) respecto a los de las cepas de *B. japonicum* y *B. diazoefficiens*. El PSN de los tratamientos inoculados con las cepas de *B. elkanii* resultó estadísticamente mayor o igual a las cepas *B. japonicum* y *B. diazoefficiens*. Los mayores valores para ambos parámetros de nodulación se obtuvieron con la inoculación de la mezcla de cepas comerciales de Uruguay U1301:U1302; siendo las cepas CL2 y CA1 de *B. elkanii* estadísticamente iguales a ella en el caso del NN y para el PSN igual a los obtenidos por 5 cepas naturalizadas (CL2, SO1, CA1, CA2, CL1). Por otro lado, el NN fue significativamente superior en todos los tratamientos inoculados respecto a los controles sin inocular, un resultado similar se observa para el PSN, excepto por la cepa SO2 que presentó una biomasa nodular muy baja que resultó estadísticamente igual al control sin nitrógeno (SN), el cual debido a una contaminación presentó algunos nódulos.

Cuando analizamos los parámetros de biomasa: peso seco de la parte aérea (PSPA), peso seco de la raíz (PSR) y peso seco total (PST), el valor estadísticamente superior corresponde al CN en todos los parámetros. Al igual que en los parámetros de nodulación, entre los tratamientos inoculados los mayores valores de PSPA, PSR y PST correspondieron al tratamiento inoculado con la mezcla comercial de Uruguay U1301:U1302 el cual resultó estadísticamente igual a 4 cepas naturalizadas de *B. elkanii* (CA1, SO1, CL1 y CL2) para PSPA, y a las cepas CL1, CL2, CA1 y CO1 para PST. Contrariamente, las restantes 6 cepas naturalizadas (*B. elkanii* CO1, *Bradyrhizobium* sp. CA2, y *B. japonicum* CL3, SJ1, CO2, SO2) y 2 cepas de inoculantes comerciales utilizados en la región (E109 y SEMIA5080) presentan valores de PSPA estadísticamente igual a SN. Es importante recordar que el tratamiento SN a pesar de estar nodulado, presentó bajo NN y PSN, y menos de la mitad de PSPA que el tratamiento inoculado con la mezcla U1301:U1302. Por lo tanto, los tratamientos inoculados que fueron iguales al control SN, si bien no podemos decir que son cepas ineficientes, podemos afirmar que presentaron la menor eficiencia simbiótica. Los resultados para el PST fueron similares, las cepas naturalizadas de *B. japonicum* y la cepa CA2 presentaron valores iguales al control SN. Se observó una estratificación de los valores de los parámetros de biomasa por especie de rizobio inoculada, con tendencia a mayores valores en los tratamientos

inoculados con cepas de *B. elkanii* respecto a *B. japonicum* y *B. diazoefficiens* aunque no existan diferencias significativas entre la mayoría de los tratamientos. Además, el tratamiento inoculado con la cepa CA2 de *Bradryrhizobium* sp. mostró valores de estos parámetros que se asemejan a las cepas de *B. elkanii*.

También se determinaron el porcentaje de nitrógeno en la parte aérea (%N) y el nitrógeno total en parte aérea (NTPA), cuyos resultados se muestran en el **Cuadro 3.3**. La mayoría de los tratamientos no presentaron diferencias significativas con el CN, excepto por SN y los inoculados con las cepas *B. diazoefficiens* SEMIA5080 y *B. japonicum* (CO2 y SO2). Al analizar los datos de NTPA se observa que el CN presentó un valor significativamente superior a los demás tratamientos, seguido por el grupo de tratamientos inoculados con las cepas de *B. elkanii*: mezcla U1301:U1302, CL2, CA1, CL1 y SO1. Contrariamente, las cepas naturalizadas de *B. japonicum* CL3, CO2, SO2 y las 2 cepas de inoculantes comerciales utilizados en la región (E109 y SEMIA5080) presentan valores de NTPA estadísticamente igual a SN. Nuevamente, se observa una tendencia de las cepas de *B. elkanii* a tener valores superiores que las cepas de *B. japonicum* para el caso del NTPA.

El coeficiente de Spearman calculado entre las variables: NN, PSN, PSPA, PSR, PST, %N y NTPA (apéndice: **Cuadro 6.3**) mostró que casi todas las variables tuvieron una alta correlación con las demás ($p < 0,05$), excepto por el PSN con PSR ($p = 0,10$) y PSR con %N ($p = 0,06$). Iturralde *et al.* (2019) encontraron al igual que nosotros correlaciones entre PSN y PSPA, PSN y %N, pero no entre PSN y PSR, y también obtuvieron una correlación entre %N y PSR mientras que nosotros no tuvimos una correlación significativa ($p = 0,06$) entre estos parámetros.

Cuadro 3.2: Número de nódulos (NN), peso seco de los nódulos (PSN), peso seco de la raíz (PSR), peso seco de la parte aérea (PSPA) y peso seco total (PST) de plantas de soja crecidas en condiciones gnotobióticas (Magentas) inoculadas con cepas de rizobios naturalizadas y de referencia y controles sin inocular, cosechadas a los 28 días.

| Tratamiento | NN | PSN(g) | PSR(g) | PSPA(g) | PST(g) |
|------------------------------------|------------------|----------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| SN | 13 ^a | 0,03 ^a | 0,48 ^{abc} | 0,85 ^a | 1,42 ^a |
| CN | 0 | - | 1,52 ^d | 4,32 ^f | 5,84 ^f |
| <i>B. elkanii</i> U1301:U1302 | 94 ^f | 0,26 ^h | 0,60 ^{bc} | 1,73 ^{de} | 2,74 ^e |
| <i>B. elkanii</i> SO1* | 79 ^e | 0,22 ^{gh} | 0,54 ^{abc} | 1,3 ^{bcd} | 2,06 ^{bcd} |
| <i>B. elkanii</i> CL1* | 71 ^{da} | 0,21 ^{fgh} | 0,65 ^c | 1,57 ^{cda} | 2,46 ^{de} |
| <i>B. elkanii</i> CA1* | 81 ^{ef} | 0,20 ^{efgh} | 0,52 ^{abc} | 1,77 ^e | 2,49 ^{de} |
| <i>B. elkanii</i> CO1* | 67 ^d | 0,18 ^{dafg} | 0,50 ^{abc} | 1,24 ^{abc} | 2,11 ^{cda} |
| <i>B. elkanii</i> CL2* | 82 ^{ef} | 0,25 ^{gh} | 0,53 ^{abc} | 1,38 ^{bcda} | 2,11 ^{bcda} |
| <i>Bradyrhizobium</i> sp. CA2* | 72 ^{da} | 0,21 ^{efgh} | 0,37 ^a | 1,16 ^{abc} | 1,86 ^{abc} |
| <i>B. japonicum</i> E109 | 52 ^c | 0,12 ^{bc} | 0,56 ^{bc} | 0,99 ^{ab} | 1,69 ^{abc} |
| <i>B. japonicum</i> CL3* | 32 ^b | 0,14 ^{bcda} | 0,38 ^a | 1,08 ^{ab} | 1,60 ^{abc} |
| <i>B. japonicum</i> CO2* | 38 ^b | 0,10 ^{bc} | 0,44 ^{ab} | 1,05 ^{ab} | 1,60 ^{abc} |
| <i>B. japonicum</i> SJI* | 54 ^c | 0,16 ^{cdef} | 0,39 ^a | 1,05 ^{ab} | 1,58 ^{abc} |
| <i>B. japonicum</i> SO2* | 34 ^b | 0,09 ^{ab} | 0,39 ^a | 0,90 ^a | 1,38 ^a |
| <i>B. diazoefficiens</i> SEMIA5080 | 51 ^c | 0,13 ^{bcd} | 0,43 ^{ab} | 0,91 ^a | 1,47 ^{ab} |

Los valores representan la media (n=5). Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas (LSD-Fisher $p < 0,05$). Los tratamientos incluyen: control sin inocular y sin nitrógeno (SN); control con nitrógeno (CN); cepas de referencia: *B. elkanii* U1301:U1302, *B. japonicum* E109 y *B. diazoefficiens* SEMIA5080 y cepas naturalizadas (*).

Cuadro 3.3: Porcentaje de nitrógeno en parte aérea (%N) y nitrógeno total en parte aérea (NTPA), de plantas de soja crecidas en condiciones gnotobióticas (Magentas) inoculadas con cepas de rizobios naturalizadas y de referencia y controles sin inocular, cosechadas a los 28 días.

| Tratamiento | %N | NTPA(mg) |
|------------------------------------|---------------------|----------------------|
| SN | 1,15 ^a | 101 ^a |
| CN | 2,59 ^d | 1485 ^h |
| <i>B. elkanii</i> U1301:U1302 | 2,45 ^{cd} | 449 ^g |
| <i>B. elkanii</i> SO1* | 2,48 ^d | 338 ^{defg} |
| <i>B. elkanii</i> CL1* | 2,18 ^{bcd} | 360 ^{efg} |
| <i>B. elkanii</i> CA1* | 2,32 ^{cd} | 394 ^{fg} |
| <i>B. elkanii</i> CO1* | 2,47 ^d | 305 ^{cdef} |
| <i>B. elkanii</i> CL2* | 2,51 ^d | 402 ^{fg} |
| <i>Bradyrhizobium</i> sp. CA2* | 2,37 ^{cd} | 304 ^{cdef} |
| <i>B. japonicum</i> E109 | 2,21 ^{bcd} | 204 ^{abc} |
| <i>B. japonicum</i> CL3* | 1,98 ^{bcd} | 214 ^{abcd} |
| <i>B. japonicum</i> CO2* | 1,42 ^{ab} | 159 ^{ab} |
| <i>B. japonicum</i> SJ1* | 2,37 ^{cd} | 252 ^{bceda} |
| <i>B. japonicum</i> SO2* | 1,07 ^a | 100 ^a |
| <i>B. diazoefficiens</i> SEMIA5080 | 1,70 ^{abc} | 155 ^{ab} |

Los valores representan la media (n=5). Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas (LSD-Fisher $p < 0,05$). Los tratamientos incluyen: control sin inocular y sin nitrógeno (SN); control con nitrógeno (CN); cepas de referencia: *B. elkanii* U1301:U1302, *B. japonicum* E109 y *B. diazoefficiens* SEMIA5080 y cepas naturalizadas (*).

Con el fin de simplificar la interpretación de los resultados del conjunto de las variables más relevantes, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) con los parámetros: NN, PSN, PSA y NTPA (**Figura 3.9**). El componente principal 1 (CP1) explica un 92,5% de la variabilidad. El PCA muestra una clara diferencia entre

los tratamientos inoculados con cepas de *B. elkanii*, y los inoculados con cepas de *B. japonicum* debido a que los puntos correspondientes a los tratamientos inoculados con las cepas de *B. elkanii* se ubican a la derecha respecto al CP1 y presentaron valores superiores para estas variables que los inoculados con las cepas de *B. japonicum*, que se ubican a la izquierda respecto al CP1. Los tratamientos correspondientes a las cepas *Bradyrhizobium* sp. CA2 y *B. diazoefficiens* SEMIA5080 se encuentran cercanos a las especies *B. elkanii* y *B. japonicum*, respectivamente. Adicionalmente, los resultados del test de ANOSIM (apéndice: **Cuadro 6.5**) mostraron una diferencia significativa entre el grupo formado por los tratamientos inoculados con cepas de *B. elkanii* y el de *B. japonicum*, además que se observa que *B. japonicum* y *B. diazoefficiens* no difieren entre sí, al igual que tampoco lo hacen *Bradyrhizobium* sp. CA2 con *B. elkanii*.

Los resultados obtenidos en este trabajo destacan la mayor eficiencia simbiótica medida en condiciones gnotobióticas de las cepas de *B. elkanii* U1301:U1302 usadas en los inoculantes comerciales de Uruguay en comparación con las cepas *B. japonicum* E109 usada en Argentina y la cepa *B. diazoefficiens* SEMIA5080 usada en Brasil. Varios trabajos reportan la evaluación de la eficiencia simbiótica de cepas comerciales en ensayos con condiciones similares a las nuestras utilizando sustrato estéril, siendo sorprendente la variabilidad de resultados obtenidos. de Paiva Barbosa *et al.* (2017) reportaron mayor NN y PSPA en plantas inoculadas con las cepas comerciales de *B. elkanii* U1301 y U1302 que en las inoculadas con las cepas *B. japonicum* SEMIA5079 y *B. diazoefficiens* SEMIA5080, además el tratamiento inoculado con la cepa de *B. diazoefficiens* resultó significativamente menor que las demás para los parámetros PSN y PST. Lo cual concuerda con los resultados que obtuvieron Okito *et al.* (2004): valores significativamente superiores de PSN para la cepa *B. elkanii* U1302 frente a *B. diazoefficiens* SEMIA5080. Los resultados de eficiencia simbiótica de cepas comerciales reportadas en estos trabajos son coincidentes con los obtenidos en el nuestro en el sentido que las cepas de *B. elkanii* U1301 y U1302 presentaron mayores valores de NN, PSN y PSPA que la cepa *B. diazoefficiens* SEMIA5080.

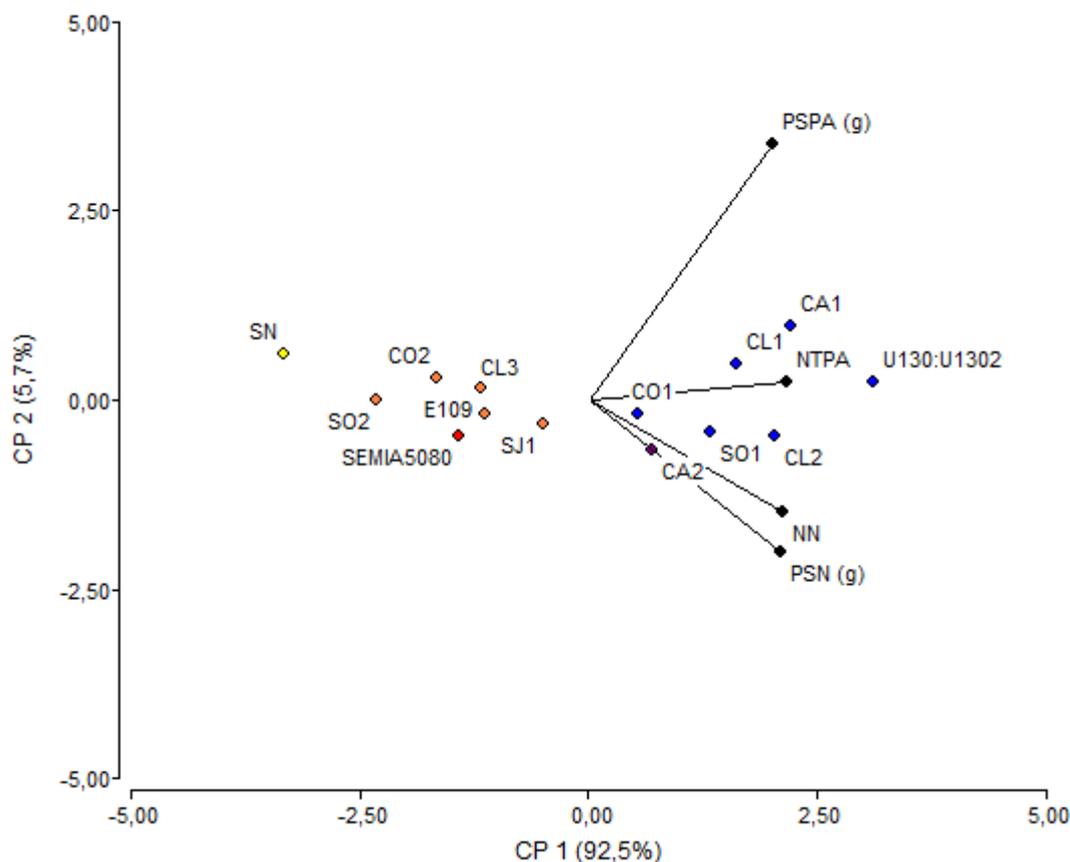


Figura 3.9: *Biplot* del análisis de componentes principales (PCA) de los datos obtenidos del ensayo en condiciones gnotobióticas (Magentas). Los puntos amarillos corresponden a los tratamientos control (SN y CN), los puntos azules a cepas de *B. elkanii* (U1301:U1302, CA1, CL1, CL2, SO1, CO1), los puntos naranjas a *B. japonicum* (E109, CL3, CO2, SO2 y SJ1), el punto rojo a *B. diazoefficiens* SEMIA5080 y el punto violeta a *Bradryrhizobium sp* CA2. Se muestran los autovectores de las variables número de nódulos (NN), peso seco de los nódulos (PSN), peso seco de parte aérea (PSPA) y nitrógeno total en parte aérea (NTPA).

Lagurara (2018) realizó dos ensayos en condiciones axénicas utilizando el mismo protocolo que nosotros, cuyos resultados difieren de los nuestros, en el primero no se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento inoculado con la mezcla de *B. elkanii* U1301:U1302, la cepa de *B. japonicum* E109 y la cepa de *B. diazoefficiens* SEMIA5080, mientras que en el segundo la cepa SEMIA5080 presentó un PSPA significativamente mayor que la mezcla. Lo anterior concuerda con los resultados

reportados por Chibeba *et al.* (2017), donde la cepa de *B. diazoefficiens* SEMIA 5080 presentó mayor biomasa aérea comparado con las cepas comerciales de *B. japonicum* SEMIA5079 y *B. elkanii* U1301 y U1302. Por otro lado, Ferreira y Hungria (2002) no encontraron diferencias significativas en NN, PSPA y NTPA al evaluar las cepas *B. japonicum* SEMIA5079, *B. elkanii* U1302 y *B. diazoefficiens* SEMIA5080.

El ensayo en condiciones gnotobióticas es una herramienta rápida y práctica que permite evaluar y comparar la eficiencia simbiótica de un alto número de cepas simultáneamente y permite a los rizobios expresar su mayor potencial de fijación de N₂ debido a que las plantas crecen en condiciones donde el nitrógeno es la principal limitante en su desarrollo. Sin embargo, dada la alta variabilidad de los resultados reportados en la bibliografía utilizando las mismas cepas en condiciones ambientales similares a las del presente trabajo, e incluso entre el presente trabajo y el de Lagurara (2018) en los que se utilizó el mismo protocolo, se deben considerar los resultados dependientes de las variables que afectan el sistema. Las diferencias encontradas en los resultados podrían ser explicadas por factores como por ejemplo que se utilizaron diferentes variedades de soja o cambios en la eficiencia simbiótica de la cepa. Chibeba *et al.* (2017) encontraron diferencias significativas en varios parámetros de eficiencia simbiótica al evaluar distintas variedades utilizando una misma cepa. Además, Ribeiro Torres y Kaschuk (2012) reportaron la generación de variantes de cepas de *B. japonicum* en condiciones axénicas con eficiencia simbiótica diferente a la cepa progenitora. Otra posible explicación podría ser diferencias en el diseño del ensayo como la cantidad de días de crecimiento de las plantas o la concentración de rizobios aplicada en los inóculos.

Los resultados del presente trabajo reafirman la importancia de evaluar cepas naturalizadas debido a su potencial simbiótico ya que se demostró un buen desempeño simbiótico de varias de las cepas naturalizadas de *B. elkanii* (SO1, CL1, CA1 y CL2), cuyos parámetros de nodulación, biomasa y contenido de nitrógeno fueron estadísticamente iguales a la mezcla de cepas utilizadas en los inoculantes comerciales de Uruguay: *B. elkanii* U1301:U1301. En este sentido, varios trabajos reportan la evaluación en condiciones axénicas de cepas naturalizadas aisladas de

nódulos de soja o de colecciones de rizobios adaptadas al suelo, dentro de las cuales predominan las pertenecientes a las especies *B. elkanii*, *B. japonicum* y *B. diazoefficiens*. Algunas de ellas presentaron destacable capacidad de nodulación y/o producción de biomasa. Chibeba *et al.* (2017) evaluaron cepas comerciales (*B. elkanii* U1301 y U1302, *B. japonicum* SEMIA5079 y *B. diazoefficiens* SEMIA5080) y cepas naturalizadas de Mozambique (tres *B. elkanii*, dos *B. japonicum* y una *B. diazoefficiens*), obteniendo un mayor PSN para dos cepas de *B. elkanii* y una de *B. japonicum* que las cepas comerciales, y se destacaron una cepa de *B. elkanii* y las de *B. japonicum* que obtuvieron mayor PSPA que cepas comerciales de *B. elkanii* pero igual a las de *B. diazoefficiens* y *B. japonicum*. De forma similar, el trabajo realizado por Iturralde *et al.* (2019) evaluó el efecto de la inoculación de tres cepas naturalizadas de las especies *B. japonicum* y dos *B. elkanii* aisladas de suelos de Argentina y de la cepa comercial *B. japonicum* E109, en sus resultados se destaca una cepa naturalizada de *B. japonicum* por obtener el mayor NN que las demás cepas incluida E109, otra cepa de *B. japonicum* presentó el mayor valor de PSPA pero no fue estadísticamente diferente a la mayoría de las cepas y en cuanto al %N se destacan dos cepas de *B. japonicum* y la comercial E109 por su valor significativamente superior. Por otro lado, Ferreira y Hungria (2002) estudiaron una gran cantidad de cepas aisladas de suelos brasileros, dentro de las cuales caracterizaron genéticamente a 8 cepas (4 *B. japonicum* y 4 *B. elkanii*); los resultados que obtuvieron muestran una alta homogeneidad en los parámetros de eficiencia simbiótica (NN, PSN, PSPA y NTPA) de las cepas caracterizadas sin observar diferencias significativas entre ellas ni con las cepas comerciales (*B. elkanii* U1301 y U1302, *B. japonicum* SEMIA5079 y *B. diazoefficiens* SEMIA5080).

Otra observación interesante de nuestro trabajo, es la diferenciación entre especies, donde las cepas de *B. elkanii* se desempeñaron mejor que las de *B. japonicum*. Resultado que es contrario a lo reportado por Hungria *et al.* (1998) quienes evaluaron cepas de rizobios comerciales y adaptadas a suelos brasileros, 5 pertenecientes a *B. japonicum* y 15 de *B. elkanii*, y sugieren que las cepas de *B. japonicum* tienen una mayor capacidad de fijar nitrógeno en soja que las pertenecientes a la especie *B.*

elkanii. Al respecto, es relevante resaltar que la alta semejanza encontrada en la eficiencia simbiótica de cepas de la misma especie en el presente trabajo, reafirma la idea de que las cepas naturalizadas derivan de las cepas de inoculantes comerciales aplicados, especialmente en el caso de *B. elkanii* recomendados en Uruguay para las cuales las secuencias de genes evaluados presentaron mayor similitud entre cepas. Ribeiro Torres y Kaschuk (2012) observaron que la mayoría de las variantes de una cepa de rizobios tienen un comportamiento simbiótico en condiciones axénicas similar a la cepa progenitora. Adicionalmente, la clara diferenciación entre las secuencias de los genes simbióticos entre el grupo de cepas de *B. japonicum* y *B. elkanii* también es apoyada por un comportamiento similar en condiciones gnotobióticas. En este sentido, se destaca que la cepa *Bradyrhizobium* sp. CA2 y *B. diazoefficiens* SEMIA5080 se agruparon tanto en los árboles de los genes simbióticos como en el PCA con las especies *B. elkanii* y *B. japonicum*, respectivamente.

3.3.2. Ensayo en condiciones semicontroladas: Invernáculo

Para aumentar la complejidad del sistema y evaluar entre otras cosas la capacidad de competencia de las cepas frente a la microbiota del suelo y la adaptación a las propiedades fisicoquímicas, se realizó un ensayo en invernáculo utilizando como sustrato un suelo con alta carga de rizobios ($1,09 \times 10^7$ NMP de rizobios capaces de nodular soja/g de suelo) y historia reciente de cultivo de soja mezclado con arena estéril (1:2), y plantas de soja de la variedad Nidera 5909.

Los resultados de nodulación y biomasa obtenidos en estas condiciones se presentan en el **Cuadro 3.4**. Los resultados obtenidos mostraron una gran variabilidad entre tratamientos tanto en el número de nódulos (NN) como en el peso seco de los nódulos (PSN). Se destacan los tratamientos inoculados con U1301:U1302, SJ1 y CO2 por su alto NN, y en el caso del PSN los mayores valores correspondieron a SJ1, CO2 y SO2. Es interesante resaltar que las cepas SJ1, CO2 y SO2 pertenecen a la especie *B. japonicum*, lo que resulta contrario al comportamiento de las cepas de esta especie en el ensayo de magentas. Otro resultado no esperado fue los altos valores obtenidos para el control con nitrógeno (CN) que se ubicó dentro de los mayores valores de nodulación, a pesar de que una alta concentración de nitrógeno

en el suelo debería inhibir la nodulación (McCoy *et al.*, 2018). En este sentido, nos planteamos la hipótesis de que la dosis de nitrógeno fue demasiado baja y favoreció la nodulación. Por otro lado, el control sin nitrógeno (SN) presentó valores de PSN que no fueron significativamente diferentes a algunos tratamientos inoculados, lo que demuestra la capacidad de nodulación de la población de rizobios presente en el suelo.

Los parámetros de biomasa también mostraron variabilidad entre las cepas de la especie *B. elkanii* y *B. japonicum*. En el caso de peso seco de la parte aérea (PSPA) se destacan la cepa SJ1 de *B. japonicum* y la CL1 de *B. elkanii* con valores significativamente superiores a la mezcla de inoculantes comerciales de Uruguay, U1301:U1302, e iguales al control CN. También es interesante resaltar que la mayoría de los tratamientos inoculados, excepto el de la cepa *B. japonicum* SJ1, tienen valores de PSPA estadísticamente iguales al control SN, lo que demuestra la elevada eficiencia simbiótica de la población de rizobios presente en el suelo. Por otro lado, se observa una relativa homogeneidad en los valores de peso seco de raíz (PSR), no existiendo diferencias significativas entre los tratamientos con excepción de los tratamientos inoculados con las cepas CA1, E109 y SO1 tuvieron valores significativamente menores al de la mezcla U1301:U1302. En cuanto al peso seco total (PST), todos los tratamientos resultaron estadísticamente iguales a la mezcla de cepas comerciales U1301:U1302, este tratamiento junto a dos cepas naturalizadas de *B. elkanii*, la cepa de *Bradyrhizobium* sp CA2 y tres de las cepas de *B. japonicum* fueron estadísticamente igual al CN.

Cuadro 3.4: Número de nódulos (NN), peso seco de los nódulos (PSN), peso seco de la raíz (PSR), peso seco de la parte aérea (PSPA) y peso seco total (PST), de plantas de soja crecidas en suelo:arena (1:2) inoculadas con cepas de rizobios naturalizadas y de referencia y control sin inocular, cosechadas a los 40 días.

| Tratamiento | NN | PSN(g) | PSR(g) | PSPA(g) | PST(g) |
|------------------------------------|-------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| SN | 97 ^a | 0,51 ^{abc} | 4,69 ^{bcd} | 12,76 ^{abcd} | 17,22 ^{abc} |
| CN | 168 ^g | 0,80 ^h | 5,16 ^{cd} | 13,23 ^{cde} | 19,53 ^d |
| <i>B. elkanii</i> U1301:U1302 | 173 ^g | 0,67 ^{def} | 5,11 ^{cd} | 12,32 ^{abc} | 18,20 ^{abcd} |
| <i>B. elkanii</i> SO1* | 147 ^{ef} | 0,68 ^{defg} | 3,79 ^a | 11,85 ^{ab} | 16,33 ^a |
| <i>B. elkanii</i> CL1* | 91 ^a | 0,58 ^{bcd} | 4,51 ^{abcd} | 14,06 ^{de} | 19,12 ^{cd} |
| <i>B. elkanii</i> CA1* | 116 ^c | 0,50 ^{ab} | 4,03 ^{ab} | 12,40 ^{abc} | 16,74 ^{ab} |
| <i>B. elkanii</i> CO1* | 114 ^{bc} | 0,61 ^{cde} | 4,59 ^{abcd} | 12,71 ^{abcd} | 17,73 ^{abcd} |
| <i>B. elkanii</i> CL2* | 125 ^{cd} | 0,44 ^a | 4,41 ^{abcd} | 12,55 ^{abc} | 17,48 ^{abc} |
| <i>Bradyrhizobium</i> sp. CA2* | 124 ^{cd} | 0,60 ^{cd} | 5,27 ^d | 12,03 ^{abc} | 17,89 ^{abcd} |
| <i>B. japonicum</i> E109 | 120 ^c | 0,55 ^{bc} | 3,80 ^{ab} | 12,72 ^{abcd} | 16,75 ^{ab} |
| <i>B. japonicum</i> CL3* | 136 ^{de} | 0,71 ^{efg} | 4,18 ^{abc} | 12,66 ^{abcd} | 17,55 ^{abc} |
| <i>B. japonicum</i> CO2* | 162 ^{ef} | 0,76 ^{fgh} | 4,19 ^{abc} | 12,76 ^{abcd} | 18,34 ^{bcd} |
| <i>B. japonicum</i> SJI* | 163 ^{ef} | 0,80 ^h | 4,53 ^{abcd} | 14,31 ^e | 18,99 ^{cd} |
| <i>B. japonicum</i> SO2* | 144 ^e | 0,79 ^{gh} | 4,37 ^{abc} | 13,09 ^{bcd} | 18,21 ^{bcd} |
| <i>B. diazoefficiens</i> SEMIA5080 | 102 ^{ab} | 0,53 ^{abc} | 4,44 ^{abcd} | 11,60 ^a | 16,61 ^{ab} |

Los valores representan la media (n=5). Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas (LSD-Fisher p<0,05). Los tratamientos incluyen: control sin inocular y sin nitrógeno (SN); control con nitrógeno (CN); cepas de referencia: *B. elkanii* U1301:U1302, *B. japonicum* E109 y *B. diazoefficiens* SEMIA5080 y cepas naturalizadas (*).

Adicionalmente se midieron parámetros relacionados con el contenido de nitrógeno que incluyen la diferencia de ¹⁵N respecto del aire ($\delta^{15}\text{N}_{\text{aire}}$), el porcentaje de nitrógeno en parte aérea (%N) y el nitrógeno total en parte aérea (NTPA) y los resultados obtenidos se presentan en el **Cuadro 3.5**. Es importante aclarar que

debido a un error durante el desarrollo del ensayo se regaron las plantas no fijadoras con nitrógeno, lo que nos impidió utilizarlas como referencia para el cálculo del porcentaje de nitrógeno derivado de la atmósfera (%Ndfa) (Unkovich *et al.*, 2008). Adicionalmente, el método para calcular el %Ndfa requiere el dato de un coeficiente “B” el cual depende entre otras cosas de los rizobios que ocupan los nódulos y realizan la FBN, ese dato no pudo ser determinado debido a que el suelo utilizado en este ensayo posee una población de rizobios desconocida (Pauffero *et al.*, 2010). Por lo anteriormente expresado, se usó el valor de $\delta^{15}\text{N}_{\text{aire}}$ como estimador de la eficiencia simbiótica ya que un valor más negativo se relaciona con una mayor cantidad de nitrógeno proveniente de la atmósfera. Los tratamientos con valores de $\delta^{15}\text{N}_{\text{aire}}$ menos negativos fueron los controles sin inocular lo que sugiere una mayor adquisición de nitrógeno del suelo. El tratamiento CN presentó elevada nodulación y $\delta^{15}\text{N}_{\text{aire}}$ por lo que este resultado indica que si bien el N no inhibió la nodulación estaría inhibiendo en parte la fijación, lo que explicaría que en este tratamiento el nitrógeno provenga en menor proporción del aire que en los tratamientos inoculados. A su vez, los tratamientos inoculados que mostraron mayor proporción de N adquirido del aire que los controles fueron: U1301:U1302, las cepas naturalizadas CL1, CA1 y CL2 de *B. elkanii*, la cepa *Bradyrhizobium* sp. CA2 y la cepa *B. japonicum* SJ1; lo que indicaría una alta eficiencia simbiótica en estas cepas. Todos los tratamientos inoculados con las cepas comerciales (mezcla U1301:U1302, E109 y SEMIA5080) presentaron valores altos de %N, mientras que los inoculados con las cepas de *B. japonicum* SJ1 y *B. elkanii* CL1 se encuentran dentro de los valores más bajos, significativamente menores a los de U1301:U1302. Este resultado contrasta con el valor significativamente superior obtenido en el PSPA y sugiere la posibilidad de que el nitrógeno no sea el factor determinante en el aumento del PSPA para estos tratamientos. Los tratamientos inoculados con las cepas comerciales de *B. japonicum* E109 seguido de la mezcla de *B. elkanii* U1301:U1302 mostraron los valores más altos para NTPA, que a su vez fueron similares al CN. Se destaca que los tratamientos inoculados con las cepas naturalizadas SO2, CO2, SJ1 y CL2, la mayoría de *B. japonicum*, fueron estadísticamente similares a el inoculado con E109

aunque sin diferenciarse del tratamiento SN. Nuevamente, el tratamiento inoculado con la cepa *B. elkanii* CL1, a pesar de su alto PSPA, tiene un valor bajo de NTPA.

Se evaluó además la correlación entre todas las variables determinadas en este ensayo en invernáculo utilizando el coeficiente de Spearman (apéndice: **Cuadro 6.4**). Las correlaciones encontradas con un $p < 0,05$ que no son combinaciones lineales de otras variables fueron con los parámetros de nodulación: PSN y NN, PSN y PSPA, NN y PST, PSN y PST, NN y NTPA, además de correlaciones entre: %N y PSPA, %N y PST, %N y NTPA. En resumen, se destaca una alta correlación entre NN y PSN con parámetros de biomasa y del %N con el PSPA y PST. Por el contrario, el $\delta^{15}\text{N}_{\text{aire}}$ no correlacionó con ninguna de las otras variables, esto puede deberse a que exista una selección diferencial de ^{15}N por parte de nitrogenasas de distintas cepas de rizobios, lo cual interfiera en su capacidad de estimador de FBN (Pauffero *et al.*, 2010).

Cuadro 3.5: Diferencia de ^{15}N respecto al aire ($\delta^{15}\text{N}_{\text{aire}}$), porcentaje de nitrógeno en parte aérea (%N) y nitrógeno total en parte aérea (NTPA), de plantas de soja crecidas en invernáculo con suelo:arena (1:2) inoculadas con cepas de rizobios naturalizadas y de referencia y control sin inocular, cosechadas a los 40 días.

| Tratamiento | $\delta^{15}\text{N}_{\text{aire}}(\text{‰})$ | %N | NTPA(mg) |
|------------------------------------|---|----------------------|----------------------|
| SN | -1,46 ^{de} | 2,35 ^{abcd} | 2863 ^{abc} |
| CN | -1,37 ^a | 2,43 ^{bcd} | 3193 ^{bcd} |
| <i>B. elkanii</i> U1301:U1302 | -1,60 ^{abc} | 2,62 ^{cd} | 3226 ^{cd} |
| <i>B. elkanii</i> SO1* | -1,57 ^{abcd} | 2,51 ^{bcd} | 2900 ^{abc} |
| <i>B. elkanii</i> CL1* | -1,59 ^{abc} | 2,05 ^a | 2833 ^{ab} |
| <i>B. elkanii</i> CA1* | -1,58 ^{abc} | 2,25 ^{ab} | 2830 ^{ab} |
| <i>B. elkanii</i> CO1* | -1,51 ^{bcd} | 2,45 ^{bcd} | 2895 ^{abc} |
| <i>B. elkanii</i> CL2* | -1,60 ^{ab} | 2,34 ^{bcd} | 2971 ^{abcd} |
| <i>Bradyrhizobium</i> sp. CA2* | -1,63 ^a | 2,22 ^{ab} | 2666 ^a |
| <i>B. japonicum</i> E109 | -1,48 ^{cd} | 2,50 ^{bcd} | 3335 ^d |
| <i>B. japonicum</i> CL3* | -1,50 ^{bcd} | 2,40 ^{bcd} | 2899 ^{abc} |
| <i>B. japonicum</i> CO2* | -1,51 ^{bcd} | 2,33 ^{abc} | 3121 ^{bcd} |
| <i>B. japonicum</i> SJ1* | -1,59 ^{abc} | 2,28 ^{ab} | 3103 ^{bcd} |
| <i>B. japonicum</i> SO2* | -1,52 ^{abcd} | 2,34 ^{abc} | 3183 ^{bcd} |
| <i>B. diazoefficiens</i> SEMIA5080 | -1,52 ^{abcd} | 2,66 ^d | 2971 ^{abcd} |

Los valores representan la media (n=5). Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas (LSD-Fisher $p < 0,05$). Los tratamientos incluyen: control sin inocular y sin nitrógeno (SN); control con nitrógeno (CN); cepas de referencia: *B. elkanii* U1301:U1302, *B. japonicum* E109 y *B. diazoefficiens* SEMIA5080 y cepas naturalizadas (*).

Al igual que para el ensayo de magentas, se realizó un PCA con las variables NN, PSN, PSPA y NTPA (**Figura 3.10**). El PCA representa un 81,5% de la variabilidad, valor que fue menor al del ensayo de magentas; este resultado era esperable debido a la mayor complejidad del sistema. El CP1 representa el 58,5% de la variabilidad. Se

observa una tendencia a que los tratamientos inoculados con las cepas de la especie *B. elkanii* se ubiquen a la izquierda del CP1 y los de las cepas de *B. japonicum* a la derecha aunque el análisis estadístico de las variables por separado (**Cuadros 3.4 y 3.5**) no muestre una diferenciación por especies. Se observaron algunas excepciones como por ejemplo la mezcla de *B. elkanii* U1301:U1302 que se ubicó a la derecha. La tendencia en las variables representadas en este caso es inversa a la obtenida utilizando sustrato estéril ya que las cepas de *B. japonicum* tienden a valores más altos de NN, PSN, PSPA y NTPA que las correspondientes a *B. elkanii*. Al igual que en el ensayo de magentas, el tratamiento inoculado con la cepa *Bradyrhizobium* sp. CA2 se ubicó cercana a la mayoría de los inoculados con cepas de *B. elkanii*. Además, en las condiciones de invernáculo, a diferencia del ensayo en magentas, el tratamiento inoculado con la cepa *B. diazoefficiens* SEMIA5080 tuvo un comportamiento cercano a la mayoría de los tratamientos inoculados con las cepas de *B. elkanii*.

El resultado del test de ANOSIM (apéndice: **Cuadro 6.6**) apoya esta diferenciación entre especies ya que mostró una diferencia significativa entre los grupos formados por las cepas de la especie *B. japonicum* con las cepas de la especie de *B. elkanii*. A su vez, *B. diazoefficiens* SEMIA5080 se diferencia de *B. japonicum* pero no del grupo *B. elkanii*, el mismo resultado se obtuvo para la cepa *Bradyrhizobium* sp. CA2.

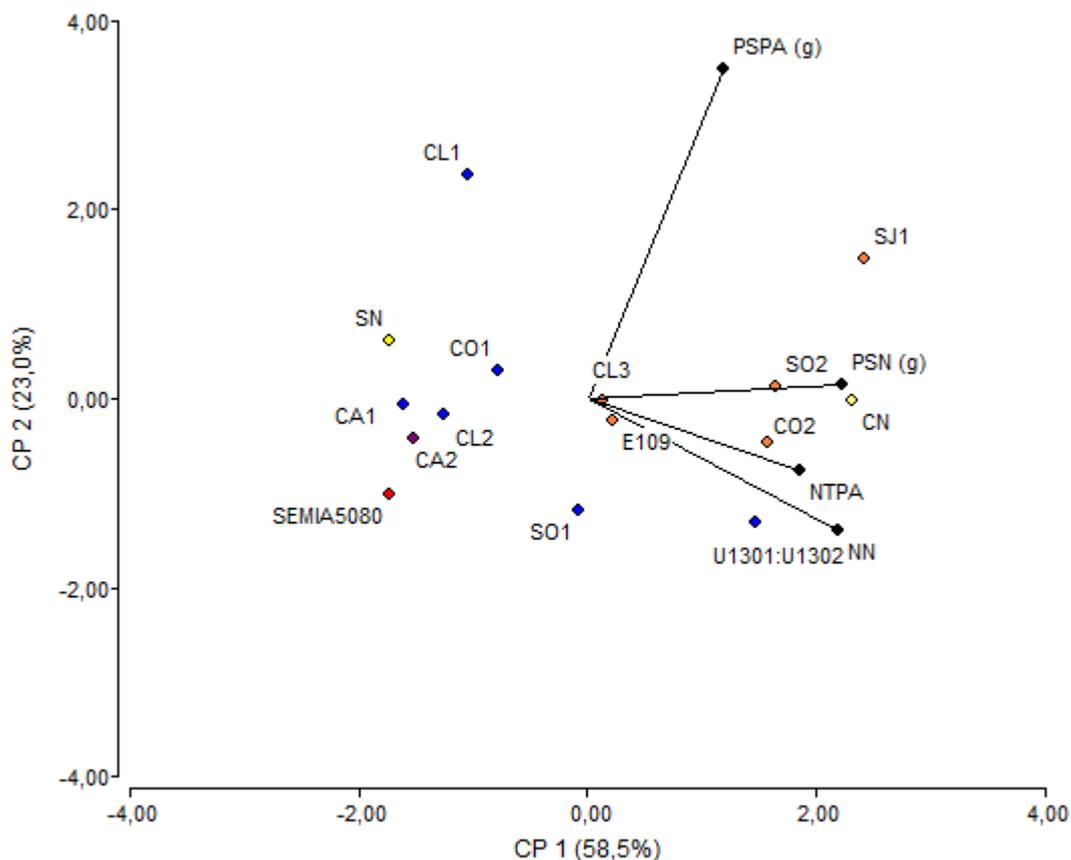


Figura 3.10: *Biplot* del análisis de componentes principales (PCA) de los datos obtenidos del ensayo en invernáculo (suelo:arena). Los puntos amarillos corresponden a los tratamientos control (SN y CN), los puntos azules a cepas de *B. elkanii* (U1301:U1302, CA1, CL1, CL2, SO1, CO1), los puntos naranjas a *B. japonicum* (E109, CL3, CO2, SO2 y SJ1), el punto rojo a *B. diazoefficiens* SEMIA5080 y el punto violeta a *Bradryrhizobium sp* CA2. Se muestran los autovectores de las variables número de nódulos (NN), peso seco de los nódulos (PSN), peso seco de parte aérea (PSPA) y nitrógeno total en parte aérea (NTPA).

En este trabajo se evaluó la eficiencia simbiótica de cepas comerciales y naturalizadas de rizobios que nodulan soja en condiciones semicontroladas (invernáculo) usando un suelo con una población de rizobios elevada. Las cepas comerciales incluidas en este trabajo son cepas de élite con probada eficiencia simbiótica bajo diferentes condiciones. En las condiciones evaluadas en este trabajo

los resultados mostraron mayor número y masa nodular en las plantas inoculadas con la mezcla de *B. elkanii* U1301:U1302 frente a las cepas *B. japonicum* E109 y *B. diazoefficiens* SEMIA5080, pero no se encontraron diferencias significativas para otros parámetros de eficiencia simbiótica como el PSPA, el $\delta^{15}\text{N}$, el %N ni el NTPA. Nuestros resultados tienen algunas coincidencias con los reportados en la bibliografía, aunque es importante tener en cuenta que, dada la complejidad de las variables que afectan la eficiencia simbiótica de los rizobios en suelo, la utilización de datos de bibliografía debe ser únicamente orientativa sin posibilidad de hacer comparaciones absolutas. En este sentido, se puede citar el trabajo de Guimarães *et al.* (2008) quienes realizaron un ensayo en macetas para comparar la eficiencia simbiótica en suelo con baja carga de rizobios y encontraron una biomasa nodular significativamente superior para las cepas de *B. elkanii* U1301 y U1302, sin embargo, fue mayor la biomasa aérea para las cepas de *B. japonicum* 5079 y *B. diazoefficiens* SEMIA5080. Resultados similares encontraron Okito *et al.* (2004) en macetas con suelo sin inoculación previa de soja, quienes reportaron una biomasa nodular significativamente mayor para *B. elkanii* U1302 frente a *B. diazoefficiens* SEMIA5080, sin diferencias significativas en los demás parámetros de biomasa, sin embargo, los resultados mostraron una relación inversa entre estas cepas para el caso de NTPA. Por otro lado, Lagurara (2018) realizó un ensayo en condiciones similares a las nuestras con suelo del mismo sitio con alta carga de rizobios, en el cual no encontró diferencias significativas entre los parámetros de biomasa y nodulación para las cepas comerciales de mezcla de *B. elkanii* U1301:U1302, *B. diazoefficiens* SEMIA5080 y *B. japonicum* E109.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que varios suelos de Uruguay estudiados presentan cepas naturalizadas con similar o mayor eficiencia simbiótica que las cepas *B. elkanii* U1301 y U1302, usadas en los inoculantes comerciales desde 1984. En general, las cepas naturalizadas de *B. elkanii* y la cepa CA2 de *Bradyrhizobium* sp. cuyos genes simbióticos están relacionados a los de las cepas *B. elkanii* U1301 y U1302 presentaron comportamiento simbiótico similar a éstas cepas. Para el caso de las cepas naturalizadas de *B. elkanii* podría tratarse de variantes de

estas cepas que se adaptaron a las condiciones del suelo y mantuvieron la eficiencia simbiótica y para el caso de la cepa CA2 se trataría de una bacteria de otra especie de *Bradyrhizobium* que adquirió los genes simbióticos de las cepas comerciales U1301:U1302 y por lo tanto presenta similar eficiencia simbiótica. Es necesario profundizar en la investigación para confirmar el origen de estas cepas.

Por otro lado, la evaluación de manera individual de varias cepas naturalizadas de las especies *B. elkanii* y *B. japonicum* nos permitió comparar el comportamiento simbiótico entre especies y encontrar una tendencia de las cepas de *B. japonicum* a presentar una mejor eficiencia simbiótica en suelo con alta carga de rizobios. Este resultado concuerda con lo reportado por Hungria *et al.* (1998) quienes evaluaron una amplia variedad de cepas comerciales y naturalizadas de *B. elkanii* y *B. japonicum* inoculadas solas o de a pares en suelo con baja carga de rizobios, y observaron que *B. japonicum* mostró una mayor capacidad de fijar nitrógeno (rendimiento y nitrógeno total en grano) y eficiencia de nodulación (NN y PSN) que *B. elkanii*. Sin embargo, el comportamiento por especie encontrado en condiciones gnotobióticas es inverso, en este caso las cepas de *B. elkanii* fueron más eficientes. Esto puede deberse a una mayor adaptación al ambiente o capacidad competitiva de las cepas de *B. japonicum* en suelo. Aunque, deberían repetirse ambos ensayos con el objetivo de verificar los resultados obtenidos en este trabajo.

Debido a que la capacidad de promoción de crecimiento vegetal de una cepa está asociada a su capacidad competitiva y a la adaptación al ambiente, es necesario avanzar en la selección de cepas de rizobios adaptadas a las condiciones edafoclimáticas de nuestro país que sean más eficientes y competentes que las cepas de élite introducidas, con el fin de aumentar el rendimiento del cultivo de soja en Uruguay. En este sentido, los resultados obtenidos son promisorios ya que de comprobarse en ensayos a campo de distintos suelos la elevada eficiencia simbiótica, las cepas naturalizadas *B. japonicum* SJ1 y *B. elkanii* CL1 podrían reemplazar a la mezcla de cepas recomendada actualmente para la formulación de inoculantes en Uruguay. Cabe destacar que en el trabajo de Lagurara (2018) se reportan varios aislamientos con perfil igual a la cepa naturalizada *B. japonicum* SJ1 obtenidos de

distintos nódulos de plantas de soja de la localidad de Santa Clara, departamento de San José, lo que indicaría que en esas condiciones esta cepa mostró capacidad competitiva ocupando varios nódulos en las plantas de soja. Uno de los principales factores que explica las diferencias en la eficiencia simbiótica en suelo es la capacidad competitiva de las cepas (Hungria *et al.*, 1998); está previsto continuar el trabajo y determinar el porcentaje de ocupación de los nódulos por parte de la cepa inoculada en cada uno de los tratamientos del ensayo de invernáculo.

En el caso de la cepa *B. japonicum* SJ1 los resultados de la biomasa nodular, el PSPA y el NTPA sugieren una alta eficiencia simbiótica. Sin embargo, la inoculación con la cepa de *B. elkanii* CL1 provocó mayor biomasa aérea que la mezcla del inoculante comercial de Uruguay, aunque el contenido de N y parámetros de nodulación fueron considerablemente bajos. Estos resultados indicarían que en el caso de la cepa CL1 no es la fijación de nitrógeno el proceso que explica el mayor desarrollo vegetal, sino que podría tratarse de otros mecanismos. Varios trabajos reportan a los rizobios como promotores de crecimiento vegetal tanto en leguminosas como en no leguminosas (Granada *et al.* 2014, Boiero *et al.* 2007, Gray y Smith 2005). Los mecanismos de promoción detectados incluyen producción de fitohormonas (ácido indol acético, citoquinas, etileno, ácido abscísico, etc), solubilización de fosfato, control biológico de patógenos y producción de sideróforos (Vargas *et al.* 2017, Bhattacharyya y Jha 2012). Consideramos que la profundización en el estudio de los mecanismos de promoción de crecimiento vegetal adicionales a la fijación de nitrógeno podría complementar y permitir explicar los resultados obtenidos para algunas cepas naturalizadas. Por lo cual, recomendamos que estos mecanismos de promoción crecimiento vegetal deberían ser tenidos en cuenta para el desarrollo de inoculantes, con el fin de seleccionar aquellos que aporten de forma múltiple a la nutrición y protección de los cultivos.

4. CONCLUSIONES

Se identificaron 10 perfiles de PCR-BOX que fueron diferentes a los de las cepas de los inoculantes comerciales *Bradyrhizobium elkanii* U1301 y U1302 *B. japonicum* E109 y *B. diazoefficiens* SEMIA5080. Se seleccionó un aislamiento perteneciente a cada uno de los 10 perfiles como cepas naturalizadas. Se observó además una amplia diversidad entre estos perfiles cuya similitud varió entre 22% y 78%.

Mediante la técnica de *multilocus sequence analysis (MLSA)* se identificaron 5 de las cepas naturalizadas como pertenecientes a la especie *B. elkanii* y 4 a *B. japonicum*. No se pudo identificar la especie de la cepa restante (CA2) pero se sugiere su pertenencia a la especie *B. ferriligni*. El análisis de los genes simbióticos *nifH* y *nodY/K* sugiere un origen monofilético para el caso de *B. elkanii* y *B. japonicum*; mientras que para la cepa *Bradyrhizobium* sp. CA2 podrían haberse obtenido por transferencia horizontal desde las cepas *B. elkanii* U1301 o U1302.

La eficiencia simbiótica de cepas naturalizadas y comerciales evaluada en sustrato estéril mostró mayor capacidad de nodulación y producción de biomasa por parte de las cepas de la especie *B. elkanii* frente a las demás especies evaluadas. En estas condiciones, 4 de las cepas de *B. elkanii* tuvieron un desempeño similar a la mezcla U1301:U1302 utilizada en los inoculantes de nuestro país.

En el ensayo de eficiencia simbiótica en invernáculo usando suelo con alta carga de rizobios, se destacaron las cepas *B. japonicum* SJ1 y *B. elkanii* CL1 cuya inoculación provocó en las plantas mayor biomasa que la mezcla U1301:U1302, a pesar de un bajo porcentaje de nitrógeno. Por otra parte, en estas condiciones los parámetros estudiados mostraron una mayor variabilidad entre las especies, aunque el análisis multivariado mostró una tendencia a mejor desempeño de las cepas de la especie *B. japonicum* frente a las de *B. elkanii*.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Lateif K, Bogusz D, Hocher V. 2012. The role of flavonoids in the establishment of plant roots endosymbioses with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia and *Frankia* bacteria. *Plant Signaling & Behavior*. 7 (6): 636-641. doi: 10.4161/psb.20039.
- Althabegoiti MJ, López-García SL, Piccinetti C, Mongiardini, Pérez-Giménez J, Quelas JI, Peticari, A, Lodeiro AR. 2008. Strain selection for improvement of *Bradyrhizobium japonicum* competitiveness for nodulation of soybean. *FEMS Microbiology Letters*. 282: 115-123. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01114.x.
- Antolín-Llovera M, Ried MK, Binder A, Parniske M. 2012. Receptor Kinase Signaling Pathways in Plant-Microbe Interactions. *Annual Review of Phytopathology*. 50: 451-473. doi: 10.1146/annurev-phyto-081211-173002.
- Arsese AA, Räsänen LA, Aseffa F, Hailemariam A, Lindström K. 2012. Phylogenetically diverse groups of *Bradyrhizobium* isolated from nodules of *Crotalaria* spp., *Indigofera* Spp., *Erythrina brucei* and *Glycine max* growing in Ethiopia. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 65 (2): 595-609. doi: 10.1016/j.ympev.2012.07.008.
- Azevedo H, Lopes FM, Silla PR, Hungria M. 2015. A database for taxonomic and phylogenetic identification of the genus *Bradyrhizobium* using multilocus sequence analysis. *BMC Genomics*. 16 (5): S10. doi: 10.1186/1471-2164-16-S5-S10.
- Bhattacharyya PN, Jha DK. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emerge in agriculture. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 28: 1327-1350. doi: 10.1007/s11274-011-0979-9.
- Binde DR, Menna P, Villamil Bangel E, Gomes Barcellos F, Hungria M. 2009. rep-PCR fingerprinting and taxonomy based on the sequencing of the 16S *rRNA* gene of 54 elite commercial rhizobial strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 83: 897-908. doi: 10.1007/s00253-009-1927-6.

- Boiero L, Perring D, Masciarelli O, Penna C, Cassán F, Luna V. 2007. Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 74: 874-880. doi: 10.1007/s00253-006-0731-9.
- Broadley M, Brown P, Cakmak I, Rengel Z, Zhao F. 2012. Functions of Nutrients: Micronutrients. En: Marschner (Ed.). *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Oxford: Academic Press (Elsevier). 191–248. doi: 10.1016/B978-0-12-384905-2.00007-8.
- Brutti L, Piantanida N, Ljunggren H, Berggren I, Martensson A. 1999. Competition between strains of *Bradyrhizobium japonicum* for nodulation of soybeans in Argentine arable soils. *Applied Soil Ecology*. 12 (1): 1-6.
- Chibeba AM, Kyei-Boahen S, Guimarães MF, Nogueira MA, Hungria M. 2017. Isolation, characterization and selection of indigenous *Bradyrhizobium* strains with outstanding symbiotic performance to increase soybean yields in Mozambique. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 246: 291-305. doi: 10.1016/j.agee.2017.06.017.
- Clarke KR. 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Austral Ecology*. 18(1):117-143. doi: 10.1111/j.1442-9993.1993.tb00438.x
- de Almeida Ribeiro PR, dos Santos JV, Martins da Costa E, Lebbe L, Silva Assis E, Oliveira Louzada M, Azarias Guimarães A, Willems A, de Souza Moreira FM . 2015. Symbiotic efficiency and genetic diversity of soybean bradyrhizobia in Brazilian soils. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 212: 85 – 93. doi: 10.1016/j.agee.2015.06.017.
- de Paiva Barbosa L, Freitas Costa P, Almeida Ribeiro PR, Rufini M, Guimarães AA, de Souza Moreira FM. 2017. Symbiotic Efficiency and Genotypic Characterization of Variants of *Bradyrhizobium* spp. In *Commercial Inoculants for Soybeans*. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 41. doi: 10.1590/18069657rbcS20160572.
- Delamuta JRM, Menna P, Ribeiro RA, Hungria MA. 2017. Phylogenies of symbiotic genes of *Bradyrhizobium* symbionts of legumes of economic and

- environmental importance in Brazil support the definition of the new symbiovars pachyrhizi and sojae. *Systematic and Applied Microbiology*. 40 (5): 254-265. doi: 10.1016/j.syapm.2017.04.005.
- Delamuta JRM, Ribeiro RA, Menna P, Villamil Bangel E, Hungria M. 2012. Multilocus sequence analysis (MLSA) of *Bradyrhizobium* strains: Revealing high diversity of tropical diazotrophic symbiotic bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*. 43 (2): 698-710. doi: 10.1590/S1517-83822012000200035.
- DIEA (Dirección de Estadísticas Agropecuarias). 2019. Producción Vegetal: Cultivos cerealeros e industriales. [En línea]. En: Anuario estadístico agropecuario 2019. Montevideo: MGAP (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca). Consultado 27 Febrero 2020. Disponible en: <https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2019/Anuario2019.pdf>
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat versión 2018. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Consultado 25 Junio 2020. Disponible en: <http://www.infostat.com.ar>
- Drouin P, Sellami M, Prévost D, Fortin J, Antoun H. 2010. Tolerance to agricultural pesticides of strains belonging to four genera of *Rhizobiaceae*. *Journal of Environmental Science and Health Part B*. 45 (8): 757-765. doi: 10.1080/03601234.2010.515168.
- D'Haese W, Holsters M. 2002. Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology*. 12 (6): 79-105. doi: 10.1093/glycob/12.6.79R.
- Ferreira MC, Hungria M. 2002. Recovery of soybean inoculant strains from uncropped soils in Brazil. *Field Crops Research*. 79 (2-3): 139-152. doi: 10.1016/S0378-4290(02)00119-3.
- Fischer HM. 1994. Genetic Regulation of Nitrogen Fixation in Rhizobia. *Microbiological Reviews*. 58(3): 352-386.
- Frioni, L. 2005. Microbiología: básica, ambiental y agrícola. Montevideo: Universidad de la República-Facultad de Agronomía.

- Gage DJ. 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68 (2): 280-300. doi: 10.1128/MMBR.68.2.280-300.2004.
- Granada CE, Arruda L, Lisboa BB, Passaglia LMP, Vargas LK. 2014. Diversity of native rhizobia isolated in south Brazil and their growth promotion effect on white clover (*Trifolium repens*) and rice (*Oryza sativa*) plants. *Biology and Fertility of Soils*. 50: 123-132. doi: 10.1007/s00374-013-0840-4.
- Gray EJ, Smith DL. 2005. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signalling processes. *Soil Biology & Biochemistry*. 37: 395-412. doi: 10.1016/j.soilbio.2004.08.030.
- Guimarães AP, de Moiras RF, Urquiaga S, Boddey RM, Rodrigues Alves BJ. 2008. *Bradyrhizobium* strain and the ¹⁵N natural abundance quantification of biological N₂ fixation in soybean. *Scientia Agricola (Piracicaba, Braz.)*. 65 (5): 516-524. doi: 10.1590/S0103-90162008000500011.
- Haddad SA, Tabatabai MA, Abdel-Moneim AMA, Loynachan TE. 2015. Inhibition of Nodulation and Nitrogen Nutrition of Leguminous Crops by Selected Heavy Metals. *Air, Soil and Water Research*. 8 (1). doi: 10.1177/ASWR.S21098.
- Hammer O, Harper D, Ryan P. 2001. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica*. 4 (1): 9.
- Hawkesford M, Horst W, Kichey T, Lambers H, Schjoerring J, Skrumsager M, White P. 2012. Functions of Macronutrients. En: Marschner (Ed.). *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Oxford: Academic Press (Elsevier). 135 – 189. doi: 10.1016/C2009-0-63043-9.
- Helene LCF, O'Hara G, Hungria M. 2020. Characterization of *Bradyrhizobium* strains indigenous to Western Australia and South Africa indicates remarkable genetic diversity and reveals putative new species. *Systematic and Applied Microbiology*. 43: 126053. doi: 10.1016/j.syapm.2020.126053.
- Houngnandan P, Yemadje RGH, Oikeh SO, Djidohokpin CF, Boeckx P, Van Cleemput O. 2008. Improved estimation of biological nitrogen fixation of

- soybean cultivars (*Glycine max* L. Merrill) using 15N natural abundance technique. *Biology and Fertility of Soils*. 45 (2): 175-183. doi: 10.1007/s00374-008-0311-5.
- Howieson JG, Dilworth MJ (Eds.). 2016. Working with rhizobia. Canberra: ACIAR (Australian Center for International Agricultural Research).
- Hungria M, Franchini JC, Campo RJ, Graham PH. 2005. The importance of Nitrogen Fixation to Soybean Cropping in South America. En: Werner D, Newton WE. (Eds.). *Nitrogen Fixation in Agriculture Forestry, Ecology, and the Environment*. Dordrecht : Springer. 25 – 42.
- Hungria M, Boddey LH, Santos MA, Vargas MAT. 1998. Nitrogen fixation capacity and nodule occupancy by *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* strains. *Biology and Fertility of Soils*. 27: 393-399. doi: 10.1007/s003740050449.
- Iturralde ET, Covelli JM, Alvarez F, Pérez-Giménez J, Arrese-Igor C, Lodeiro AR. 2019. Soybean-Nodulating Strains With Low Intrinsic Competitiveness for Nodulation, Good Symbiotic Performance, and Stress-Tolerance Isolated From Soybean-Cropped Soils in Argentina. *Frontiers in Microbiology*. doi: 10.3389/fmicb.2019.01061.
- Jones KM, Kobayashi H, Davies BW, Taga ME, Walker G. 2007. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nature Reviews Microbiology*. 5 (8): 619-633. doi: 10.1038/nrmicro1705.
- Jordan DC. 1982. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov. a Genus of Slow-Growing, Root Nodule Bacteria from Leguminous Plants. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 32(1): 136 – 139.
- Kaneko T, Maita H, Hirakawa H, Uchiike N, Minamisawa K, Watanabe A, Sato S. 2011. Complete Genome Sequence of the Soybean Symbiont *Bradyrhizobium japonicum* Strain USDA6^T. *Genes*. 2: 763 – 787. doi: 10.3390/genes2040763.
- Kereszt A, Mergaert P, Kondorosi E. 2011. Bacteroid Development in Legume Nodules: Evolution of Mutual Benefit or of Sacrificial Victims?. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 24 (11): 1300-1309. doi: 10.1094/MPMI-06-11-0152.

- Keyser HH, Li F. 1992. Potential for increasing biological nitrogen fixation in soybean. *Plant and Soil*. 141: 119 – 135.
- Lagurara PF. 2018. Eficiencia simbiótica y capacidad competitiva de cepas de rizobios que nodulan soja en suelos con y sin historia del cultivo. Tesis Mag. Cs. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 117 p.
- Lloret L, Martínez-Romero E. 2005. Evolución y filogenia de *Rhizobium*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 47 (1-2): 43-60.
- Lodeiro AR. 2015. Interrogantes en la tecnología de la inoculación de semillas de soja con *Bradyrhizobium* spp. *Revista Argentina de Microbiología*. 47 (3): 261-273. doi: 10.1016/j.ram.2015.06.006.
- Madigan MT, Martinko JM, Stahl DA, Clark DP. 2012. *Brock Biology of Microorganisms*. San Francisco: Benjamin Cummings (Pearson).
- McCoy JM, Kaur G, Golden BR, Orlowski JM, Cook DR, Bond JA, Cox MS. 2018. Nitrogen Fertilization of Soybean Affects Root Growth and Nodulation on Two Soil Types in Mississippi. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 49(2): 181-187. doi: 10.1080/00103624.2017.1421649.
- Menna P, Hungria M. 2011. Phylogeny of nodulation and nitrogen-fixation genes in *Bradyrhizobium*: supporting evidence for the theory of monophyletic origin, and spread and maintenance by both horizontal and vertical transfer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 61 (12): 3052-3067. doi: 10.1099/ijs.0.028803-0.
- Menna P, Alves Pereira A., Villamil Bangel E, Hungria M. 2009. rep-PCR of tropical rhizobia for strain fingerprinting, biodiversity appraisal and as a taxonomic and phylogenetic tool. *Symbiosis*, 48: 120– 130. doi: 10.1007/BF03179991.
- Monza J, Márquez A (Eds.). 2004. *El metabolismo del nitrógeno en las plantas*. Córdoba : Almuzara.
- Mylona P, Pawlowski K, Bisseling T. 1995. Symbiotic nitrogen fixation. *The Plant Cell*. 7 (7): 869-885. doi: 10.1105/tpc.7.7.869.

- Okito A, Alves BRJ, Urquiaga S, Boddey RM. 2004. Isotopic fractionation during N₂ fixation by four tropical legumes. *Soil Biology & Biochemistry*. 36: 1179-1190. doi: 10.1016/j.soilbio.2004.03.004.
- OPYPA (Oficina de Programación y Política Agropecuaria). 2019. Análisis sectorial y cadenas productivas. [En línea]. En: Anuario 2019. Montevideo: MGAP (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca). Consultado 27 Febrero 2020. Disponible en: <https://descargas.mgap.gub.uy/OPYPA/Anuarios/Anuario%202019/ORIGINAL%202019%20OPYPA%20INTERACTIVO%20agregado%2018-12-21019.pdf>
- Pauffero N, Guimarães AP, Jantalia CP, Urquiaga S, Alves BJR, Boddey RM. 2010. ¹⁵N natural abundance of biologically fixed N₂ in soybean is controlled more by the *Bradyrhizobium* strain than by the variety of the host plant. *Soil Biology & Biochemistry*. 42: 1694-1700. doi: 10.1016/j.soilbio.2010.05.032.
- Poole P, Ramachandran V, Terpolilli J. 2018. Rhizobia: from saprophytes to endosymbionts. *Nature Reviews Microbiology*. 16: 291-303. doi: 10.1038/nrmicro.2017.171
- Ribeiro Torres A, Kaschuk G. 2012. Genetic variability in *Bradyrhizobium japonicum* strains nodulating soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 28: 1831-1835. doi: 10.1007/s11274-011-0964-3.
- Salviaggiotti F, Cassman KG, Specht JE, Walters DT, Weiss A, Dobermann A. 2008. Nitrogen uptake, fixation and response to fertilizer N in soybeans: a review. *Field Crops Research*, 108 (1): 1-13. doi: 10.1016/j.fcr.2008.03.001.
- Stein LY, Klotz MG. 2016. The Nitrogen Cycle. *Current Biology*. 26 (3): R94-R98. doi: 10.1016/j.cub.2015.12.02.
- Stepkowski T, Moulin L, Krzyzanska A, McInnes A, Law IJ, Howieson J. 2005. European Origin of *Bradyrhizobium* Populations Infecting Lupins and Serradella in Soils of Western Australia and South Africa. *Applied and Environmental Microbiology*. 71 (11): 7041-7052. doi: 10.1128/AEM.71.11.7041-7052.2005.

- Subramanian S, Stacey G, Yu O. 2007. Distinct, crucial roles of flavonoids during legume nodulation. *Trends in Plant Science*. 12 (7): 282-285. doi: 10.1016/j.tplants.2007.06.006.
- Tabing Mason ML, Matsuura S, Domingo AL, Yamamoto A, Shiro S, Sameshima-Saito R, Saeki Y. 2017. Genetic diversity of indigenous soybean-nodulating *Bradyrhizobium elkanii* from southern Japan and Nueva Ecija, Philippines. *Plant Soil*. 417: 349-362. doi: 10.1007/s11104-017-3263-4.
- Tartaglia C, Azziz G, Lorite MJ, Sanjuán H, Monza J. 2019. Phylogenetic relationships among introduced and autochthonous rhizobia nodulating *Trifolium* spp. in Uruguayan soils. *Applied Soil Ecology*. 139: 40-46. doi: 10.1016/j.apsoil.2019.03.014.
- Thilakaranthana MS, Raizada MN. 2017. A meta-analysis of the effectiveness of diverse rhizobia inoculants on soybean traits under field conditions. *Soil, Biology & Biochemistry*. 105: 177-196. doi: 10.1016/j.soilbio.2016.11.022.
- Unkovich MJ, Pate JS. 2000. An appraisal of recent field measurements of symbiotic N₂ fixation by annual legumes. *Field Crops Research*. 65 (2-3): 211-228. doi: 10.1016/S0378-4290(99)00088-X.
- Unkovich M, Herridge D, Peoples M, Cadish G, Boddey B, Giller K, Alves B, Chalk P. 2008. Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems. Canberra: ACIAR (Australian Center for International Agricultural Research).
- Uruguay. Presidencia de la República. 1981. Decreto N° 546/81. [En línea]. Consultado 26 de Febrero 2020. Disponible en: <https://www.mgap.gub.uy/dgsainoculantesweb/PublicTempStorage/DECRET O%205469342200.pdf>
- Vargas LK, Gazolla Volpiano C, Lisboa BB, Giongo A. 2017. Potential of Rhizobia as Plant Growth-Promoting. En: Zaidi A, Saghir Khan M, Musarrat J. (Eds.). *Microbes for Legume Improvement*. Cham: Springer. doi: 10.1007/978-3-319-59174-2.

- Versalovic J, Schneider M, de Bruijn FJ, Lupski JR. 1994. Genomic fingerprint of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*. 5: 25-40.
- Wang T, Chen WF, Tian CF, Young JPW, Chen WX. 2019. *Ecology and Evolution of Rhizobia*. Singapore: Springer.
- Weisany W, Raei Y, Allahvedipoor KH. 2013. Role of Some Mineral Nutrients in Biological Nitrogen Fixation. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Science*. 2 (4): 77-84.
- Wolyn DJ, Attewell J, Ludden PW, Bliss FA. 1989. Indirect measures of N₂ fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under field conditions: The role of lateral root nodules. *Plant and Soil*. 113: 181-187. doi: 10.1007/BF02280179.
- Yao Y, Sui XH, Zhang XX, Wang ET, Chen WX. 2015. *Bradyrhizobium erythrophlei* sp. nov. and *Bradyrhizobium ferriligni* sp. nov., isolated from effective nodules of *Erythrophleum fordii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 65: 1831-1837. doi: 10.1099/ijs.0.000183.
- Zhao Y, Bian SM, Zhou H, Huang JF. 2006. Diversity of Nitrogenase Systems in Diazotrophs. *Journal of Integrative Plant Biology*. 48: 745-755. doi: 10.1111/j.1744-7909.2006.00271.x.

6. APÉNDICE

6.1. NÚMERO DE ACCESO DE SECUENCIAS OBTENIDAS

Cuadro 6.1. Números de acceso de secuencias de genes *housekeeping* obtenidas para cepas comerciales y naturalizadas.

| Cepa | 16S <i>rRNA</i> | <i>rpoB</i> | <i>gyrB</i> | <i>atpD</i> |
|-----------|-----------------|-------------|-------------|-------------|
| U1301 | MT859686 | MT904337 | MT904323 | MT904351 |
| U1302 | MT859687 | MT904338 | MT904324 | MT904352 |
| SEMIA5080 | MT859682 | MT904333 | MT904319 | MT904347 |
| E109 | MT859681 | MT904332 | MT904318 | MT904346 |
| CA1 | MT859674 | MT904325 | MT904311 | MT904339 |
| CA2 | MT859675 | MT904326 | MT904312 | MT904340 |
| CL1 | MT859676 | MT904327 | MT904313 | MT904341 |
| CL2 | MT859677 | MT904328 | MT904314 | MT904342 |
| CL3 | MT859678 | MT904329 | MT904315 | MT904343 |
| CO1 | MT859679 | MT904330 | MT904316 | MT904344 |
| CO2 | MT859680 | MT904331 | MT904317 | MT904345 |
| SJ1 | MT859683 | MT904334 | MT904320 | MT904348 |
| SO1 | MT859684 | MT904335 | MT904321 | MT904349 |
| SO2 | MT859685 | MT904336 | MT904322 | MT904350 |

Cuadro 6.2. Números de acceso de secuencias de genes simbióticos obtenidas para cepas comerciales y naturalizadas.

| Cepa | <i>nifH</i> | <i>nodY/K</i> |
|-----------|-------------|---------------|
| U1301 | MT904365 | MT904378 |
| U1302 | MT904366 | MT904379 |
| SEMIA5080 | MT904361 | MT904374 |
| E109 | MT904360 | MT904373 |
| CA1 | MT904353 | MT904367 |
| CA2 | MT904354 | MT904368 |
| CL1 | MT904355 | MT904369 |
| CL2 | MT904356 | MT904370 |
| CL3 | MT904357 | - |
| CO1 | MT904358 | MT904371 |
| CO2 | MT904359 | MT904372 |
| SJ1 | MT904362 | MT904375 |
| SO1 | MT904363 | MT904376 |
| SO2 | MT904364 | MT904377 |

6.2. ÁRBOLES FILOGENÉTICOS COMPLEMENTARIOS

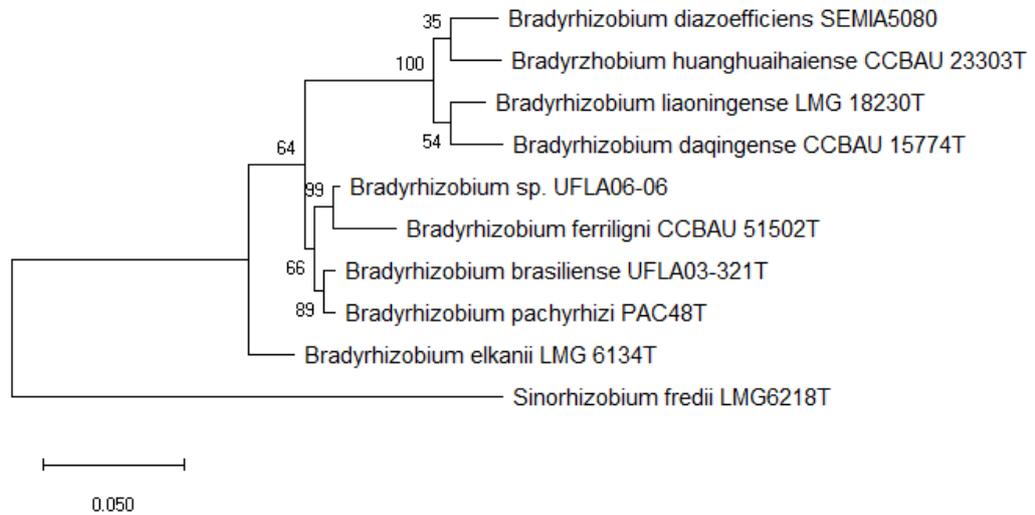


Figura 6.1: Árbol filogenético *Maximum likelihood* construido en base a secuencias concatenadas de los genes 16S *rRNA*, *gyrB*, *rpoB* *dnaK* y *recA* de la cepa de *Bradyrhizobium* sp. UFLA06-06, cepas tipo de especies de *Bradyrhizobium* y grupo externo (*Sinorhizobium fredii* LMG 6218). Se muestran los valores de *bootstrap* en los nodos correspondientes.

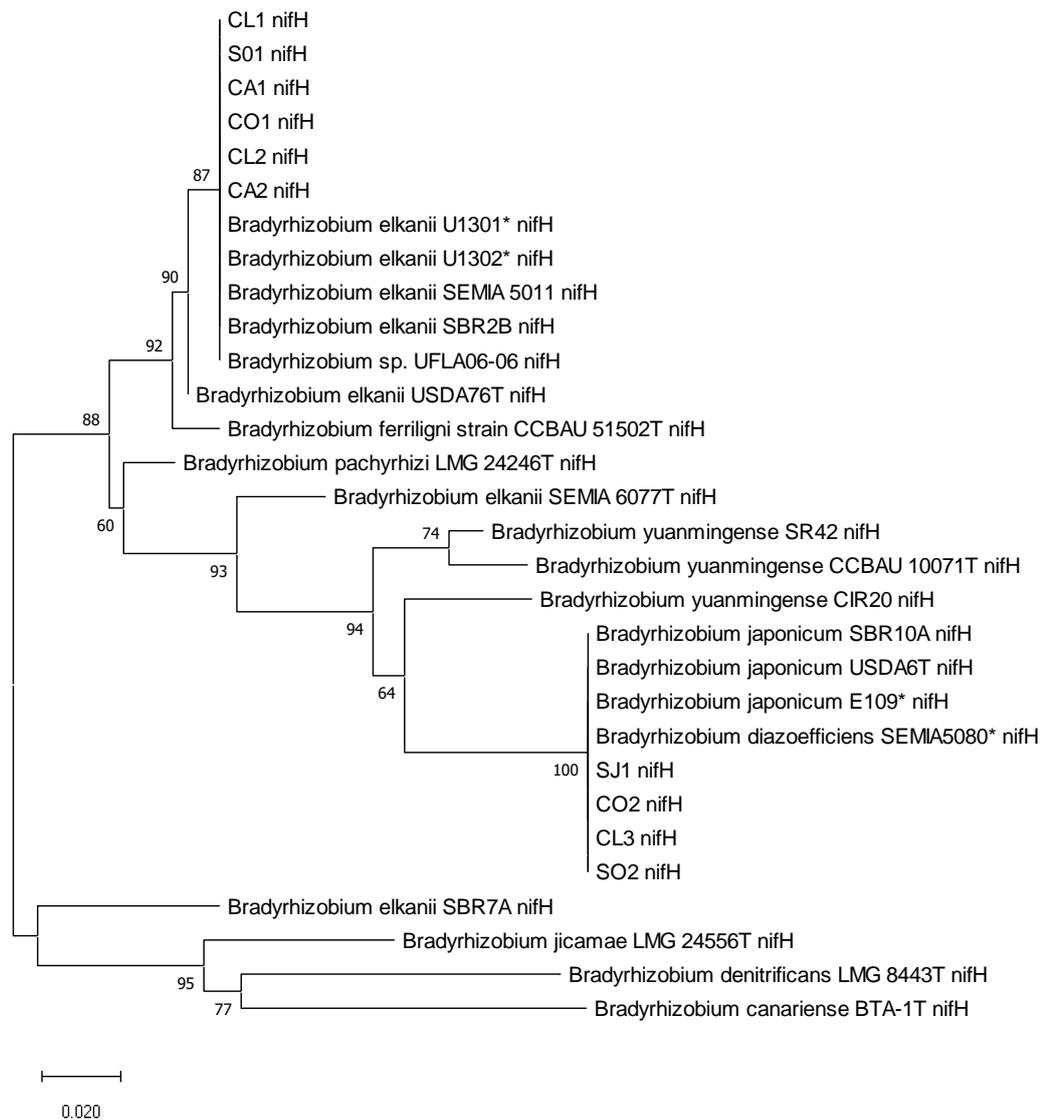


Figura 6.2: Árbol filogenético *Maximum likelihood* construido en base a secuencias del gen *nifH* de cepas naturalizadas, cepas *Bradyrhizobium* disponibles en genBank incluye la cepa *Bradyrhizobium sp.* UFLA06-06, y cepas de referencia (marcadas con *). Se muestran los valores de *bootstrap* en los nodos correspondientes.

6.3. CUADROS ADICIONALES DE EFICIENCIA SIMBIÓTICA

6.3.1. Análisis de correlación magentas e invernáculo

Cuadro 6.3: Correlación de Spearman entre los parámetros determinados para el ensayo en condiciones gnotobióticas (Magentas): número de nódulos (NN), peso seco de los nódulos (PSN), peso seco de parte aérea (PSPA), peso seco de raíz (PSR), porcentaje de nitrógeno en parte aérea (%) y nitrógeno total en parte aérea (NTPA).

| Probabilidad Coeficientes | NN | PSN | PSPA | PSR | PST | %N | NTPA |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| NN | 1,00 | 0,00 | 0,00 | 0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| PSN | 0,89* | 1,00 | 0,00 | 0,10 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| PSPA | 0,84* | 0,62* | 1,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| PSR | 0,33* | 0,20 | 0,50* | 1,00 | 0,00 | 0,06 | 0,00 |
| PST | 0,79* | 0,63* | 0,94* | 0,72* | 1,00 | 0,00 | 0,00 |
| %N | 0,74* | 0,54* | 0,73* | 0,23 | 0,63* | 1,00 | 0,00 |
| NTPA | 0,91* | 0,69* | 0,92* | 0,37* | 0,86* | 0,89* | 1,00 |

Se muestran con fondo verde los coeficientes de Spearman, en amarillo la probabilidad. (*) indica valores estadísticamente significativos ($p < 0,05$).

Cuadro 6.4: Correlación de Spearman entre los parámetros determinados para el ensayo de invernáculo: número de nódulos (NN), peso seco de los nódulos (PSN), peso seco de parte aérea (PSPA), peso seco de raíz (PSR), diferencia de ^{15}N respecto al aire ($\delta^{15}\text{N}_{\text{aire}}$), porcentaje de nitrógeno en parte aérea (%N) y nitrógeno total en parte aérea (NTP).

| | NN | PSN | PSPA | PSR | PST | $\delta^{15}\text{N}_{\text{aire}}$ | %N | NT PA |
|-------------------------------------|-------|-------|--------|-------|--------|-------------------------------------|-------|-------|
| NN | 1,00 | 0,00 | 0,12 | 0,13 | 0,00 | 0,78 | 0,63 | 0,02 |
| PSN | 0,76* | 1,00 | 0,00 | 0,13 | 0,00 | 0,32 | 0,74 | 0,06 |
| PSPA | 0,19 | 0,43* | 1,00 | 0,06 | 0,00 | 0,91 | 0,00 | 0,02 |
| PSR | 0,19 | 0,20 | 0,24 | 1,00 | 0,00 | 0,57 | 0,58 | 0,84 |
| PST | 0,42* | 0,53* | 0,83* | 0,58* | 1,00 | 0,96 | 0,00 | 0,13 |
| $\delta^{15}\text{N}_{\text{aire}}$ | 0,04 | 0,14 | 0,01 | -0,08 | 0,01 | 1,00 | 0,23 | 0,11 |
| %N | 0,06 | 0,04 | -0,44* | -0,07 | -0,44* | 0,16 | 1,00 | 0,00 |
| NTPA | 0,28* | 0,25 | 0,28* | -0,03 | 0,19 | 0,21 | 0,54* | 1,00 |

Se muestran con fondo verde los coeficientes de Spearman, en amarillo la probabilidad. (*) indica valores estadísticamente significativos ($p < 0,05$).

6.3.2. Análisis de Similitud (ANOSIM) magentas e invernáculo

Cuadro 6.5: Análisis de Similitud (ANOSIM) por especie para ensayo de magentas considerando los siguientes parámetros: número de nódulos (NN), peso seco de los nódulos (PSN), peso seco de parte aérea (PSPA) y nitrógeno total en parte aérea (NTP).

| | <i>B. elkanii</i> | <i>B. diazoefficiens</i> | <i>B. japonicum</i> | <i>Bradyrhizobium</i> sp. CA2 |
|----------------------------------|-------------------|--------------------------|---------------------|----------------------------------|
| <i>B. elkanii</i> | | 0,0179* | 0,0001* | 0,4843 |
| <i>B. diazoefficiens</i> | 0,0179* | | 0,5146 | 0,3155 |
| <i>B. japonicum</i> | 0,0001* | 0,5146 | | 0,0596* |
| <i>Bradyrhizobium</i> sp. CA2 | 0,4843 | 0,3155 | 0,0596* | |

(*) Valores significativos ($p < 0,05$)

Cuadro 6.6: Análisis de Similitud (ANOSIM) por especie para ensayo de invernáculo considerando los siguientes parámetros: número de nódulos (NN), peso seco de los nódulos (PSN), peso seco de parte aérea (PSPA) y nitrógeno total en parte aérea (NTP).

| | <i>B. elkanii</i> | <i>B. diazoefficiens</i> | <i>B. japonicum</i> | <i>Bradyrhizobium</i> sp. CA2 |
|----------------------------------|-------------------|--------------------------|---------------------|----------------------------------|
| <i>B. elkanii</i> | | 0,5288 | 0,0122* | 0,5162 |
| <i>B. diazoefficiens</i> | 0,5288 | | 0,0016* | 0,2562 |
| <i>B. japonicum</i> | 0,0122* | 0,0016* | | 0,004* |
| <i>Bradyrhizobium</i> sp. CA2 | 0,5162 | 0,2562 | 0,004* | |

(*) Valores significativos ($p < 0,05$)

7. ANEXO

7.1. MEDIOS DE CULTIVO

7.1.1. Medio Fahræus : crecimiento de plantas

| Compuesto | Concentración (g/L) | Cantidad (mL) |
|---|---------------------|---------------|
| Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O | 15,0 | 10 |
| FeCitrato | 0,5 | 10 |
| CaCl ₂ | 10,0 | 10 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 12,0 | 10 |
| K ₂ HPO ₄ | 10,0 | 10 |
| Agar | 7,0 | 10 |
| Sol. de Micronutrientes* | - | 1 |
| Agua destilada | - | 39 |
| pH=7,5 | | |

| <u>*Sol. de Micronutrientes</u> | |
|---|----------|
| Compuesto | Cantidad |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0,040 g |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 0,012 g |
| H ₃ BO ₃ | 0,140 g |
| Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 0,100 g |
| MnSO ₄ ·H ₂ O | 0,150 g |
| Agua destilada | 100 mL |

7.1.2. Medio YMA (Yeast manitol agar) suplementado con rojo congo:
aislamiento de rizobios

| Compuesto | Cantidad |
|--------------------------------------|----------|
| K ₂ HPO ₄ | 0,5 g |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0,2 g |
| NaCl | 0,1 g |
| Manitol | 10,0 g |
| Extracto de levadura | 0,4 g |
| Agar | 18 g |
| Solución Rojo Congo* | 10 mL |
| Agua destilada | 990 mL |
| pH = 6-8 | |

* Solución de Rojo Congo: 0,25 g/ 100 mL

7.1.3. Medio TY (Tryptone yeast extract): crecimiento de rizobios

| Compuesto | Cantidad |
|--------------------------------------|----------|
| Triptona | 5,0 g |
| Extracto de levadura | 3,0 g |
| CaCl ₂ ·6H ₂ O | 1,3 g |
| Agua destilada | 1000 mL |
| pH = 6,8-7,0 | |

7.1.4. Solución nutritiva Somasegaran: nutrición de plantas de Soja

| Compuesto | Cantidad (L) |
|------------------------|--------------|
| Solución concentrada * | 0,5 |
| Agua destilada | 9,5 |
| pH = 6,6-6,8 | |

| * <u>Solución concentrada</u> | | |
|---------------------------------------|---------------------|--------------|
| Compuesto | Concentración (g/L) | Cantidad (L) |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 294,100 | 0,1 |
| K ₂ HPO ₄ | 136,100 | 0,1 |
| FeEDTA | 4,470 | 0,1 |
| FeCitrato | 6,700 | 0,1 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 123,300 | 0,1 |
| K ₂ SO ₄ | 87,000 | 0,1 |
| MnSO ₄ ·H ₂ O | 0,338 | 0,1 |
| H ₃ BO ₃ | 0,247 | 0,1 |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 0,288 | 0,1 |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0,100 | 0,1 |
| CoSO ₄ ·7H ₂ O | 0,056 | 0,1 |
| NaMoO ₄ ·7H ₂ O | 0,048 | 0,1 |
| Agua destilada | - | 8,8 |

7.2. NÚMEROS DE ACCESO DE SECUENCIAS

7.2.1. Números de acceso de secuencias de genes *housekeeping*

| Organismo | <i>16S rRNA</i> | <i>atpD</i> | <i>gyrB</i> | <i>rpoB</i> |
|---|-----------------|-------------|-------------|-------------|
| <i>Bradyrhizobium iriomotense</i> L EK05T | AB300992 | AB300994 | AB300997 | HQ587646 |
| <i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> LMG21827T | AF193818 | FM253140 | FM253226 | FM253269 |
| <i>Bradyrhizobium liaoningense</i> LMG 18230T | AF208513 | AY386752 | FM253223 | FM253267 |
| <i>Bradyrhizobium elkanii</i> LMG 6134T | AF362942 | AM418752 | AM418800 | AM295348 |

| Organismo | 16S rRNA | atpD | gyrB | rpoB |
|--|-----------------|-------------|-------------|-------------|
| <i>Bradyrhizobium betae</i> LMG 21987T | AY372184 | FM253129 | AB353735 | FM253260 |
| <i>Bradyrhizobium canariense</i> LMG 22265T | AY577427 | FM253135 | FM253220 | FM253263 |
| <i>Bradyrhizobium jicamae</i> PAC68T | AY624134 | FJ428211 | HQ873309 | HQ587647 |
| <i>Bradyrhizobium pachyrizi</i> PAC48T | AY624135 | FJ428208 | HQ873310 | HQ587648 |
| <i>Bradyrhizobium cytisi</i> CTAW11T | EU561065 | GU001613 | JN186292 | JN186288 |
| <i>Bradyrhizobium rifense</i> CTAW71T | EU561074 | GU001617 | KC569466 | KC569468 |
| <i>Bradyrhizobium lablabi</i> CCBAU 23086T | GU433448 | GU433473 | JX437670 | JX437677 |
| <i>Bradyrhizobium arachidis</i> CCBAU 051107T | HM107167 | HM107217 | JX437675 | JX437682 |
| <i>Bradyrhizobium daqingense</i> CCBAU 15774T | HQ231274 | HQ231289 | JX437669 | JX437676 |
| <i>Bradyrhizobium huanghuaihaiense</i> CCBAU 23303T | HQ231463 | HQ231682 | JX437672 | JX437679 |
| <i>Bradyrhizobium oligotrophicum</i> LMG 10732T | JQ619230 | JQ619232 | KC569467 | KC569469 |
| <i>Bradyrhizobium japonicum</i> LMG 6138T | X66024 | AM418753 | AM418801 | AM295349 |

| Organismo | 16S rRNA | atpD | gyrB | rpoB |
|---|-----------------|-------------|-------------|-------------|
| <i>Bradyrhizobium denitrificans</i> LMG 8443T | X66025 | FM253153 | AB070583 | FM253282 |
| <i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> SEMIA 5060 | FJ390921 | JX867237 | JX867245 | JX867242 |
| <i>Bradyrhizobium brasiliense</i> UFLA03_321T | KF311068 | KF452730 | KF452827 | KF452879 |
| <i>Bradyrhizobium ottawaense</i> OO99T | JN186270 | HQ455212 | HQ873179 | HQ587518 |
| <i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 76T | - | - | AB070584 | - |
| <i>Bradyrhizobium pachyrizi</i> PAC51 | - | FJ428209 | - | - |
| <i>Bradyrhizobium pachyrizi</i> LMG 24246T | - | - | HQ873310 | - |
| <i>Sinorhizobium fredii</i> LMG 6218 | AM181740 | AM418762 | AM418810 | AM295359 |

7.2.2. Números de acceso de secuencias de genes simbióticos

| Organismo | <i>nodYK</i> | <i>nifH</i> |
|---|---------------------|--------------------|
| <i>Bradyrhizobium elkanii</i> SBR2B | JQ810175 | JQ810120 |
| <i>Bradyrhizobium elkanii</i> SBR7A | JQ810179 | JQ810124 |
| <i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> CIR20 | JQ810137 | JQ810081 |
| <i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> SEMIA 5080 | HQ259448 | - |
| <i>Bradyrhizobium japonicum</i> SBR10A | JQ810184 | JQ810129 |
| <i>Bradyrhizobium japonicum</i> SEMIA 512 | HQ259444 | - |
| <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA6T | - | HM041726 |
| <i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> CCBAU 10071T | - | EU818927 |
| <i>Bradyrhizobium elkanii</i> SEMIA 6077T | - | HQ259558 |
| <i>Bradyrhizobium pachyrizi</i> LMG 24246T | - | HM047124 |
| <i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA76T | - | AB094963 |
| <i>Bradyrhizobium elkanii</i> SEMIA 5011 | - | HQ259551 |
| <i>Bradyrhizobium jicamae</i> LMG 24556T | - | HM047127 |
| <i>Bradyrhizobium denitrificans</i> LMG 8443T | - | HM047125 |
| <i>Bradyrhizobium canariense</i> BTA-1T | - | EU818926 |

7.5. RIZOBIOS NATURALIZADOS DE SOJA DE SUELOS URUGUAYOS CON ALTA EFICIENCIA SIMBIÓTICA

Soybean naturalized rhizobia strains from Uruguayan soil with high symbiotic efficiency

Rodriguez Rodriguez, N^{1*}; Rodriguez-Blanco, A¹; Sicardi, M².

¹Universidad de la República, Facultad de Agronomía, Departamento de Biología Vegetal, Montevideo, Uruguay.

²Universidad de la República, Facultad de Ciencias, Centro de Investigaciones Nucleares, Montevideo, Uruguay.

Resumen

La soja (*Glycine max* (L.) Merr.) es el cultivo con mayor área de siembra en Uruguay, resultando relevante la identificación y el estudio de los rizobios que incrementen sus beneficios económicos y ambientales. Está reportada la existencia de cepas de rizobios naturalizados que nodulan soja en diferentes países del mundo que compiten con los inoculantes comerciales aplicados e incluso algunas de ellas presentan una mayor eficiencia simbiótica. Por lo cual, el objetivo de este trabajo fue la identificación de cepas de rizobios naturalizados que nodulan soja aislados de suelos uruguayos y la evaluación de su eficiencia simbiótica. Se seleccionaron 10 cepas naturalizadas aisladas de diferentes sitios del país mediante perfil de PCR-BOX. Para evaluar la eficiencia simbiótica se realizó un ensayo en condiciones controladas usando un suelo con alta concentración de rizobios, incluyendo controles sin inocular, y tratamientos inoculados con cepas de referencia utilizadas en Uruguay y países limítrofes. Se evaluó el número de nódulos, peso seco de los nódulos, peso seco de raíces (PSR), peso seco de partes aéreas (PSPA) y la relación PSPA/PSR. La mayoría de las cepas evaluadas mostraron una eficiencia simbiótica similar a la mezcla de cepas usadas en los inoculantes de Uruguay, destacándose 2 cepas que generaron una mayor biomasa aérea de las plantas de soja ($p < 0,05$) y una de ellas

mayor biomasa nodular en las condiciones estudiadas. Resulta de interés continuar evaluando el comportamiento simbiótico de estas cepas en distintas variedades de soja y suelos debido a que ambos factores podrían afectar su desempeño.

Palabras clave: proteobacteria, adaptación, competencia

Abstract

Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) is the crop with the widest sowed area in Uruguay, therefore is relevant to identify and study rhizobia in order to increase economic and environmental benefits. It has been reported soybean nodulating naturalized rhizobia from different countries around the world which could compete with commercial inoculants applied and what is more, some of them have had higher symbiotic efficiency. Taking that into account, the aim of this work was to identify soybean nodulating naturalized rhizobia isolated from Uruguayan soils, and to evaluate their symbiotic efficiency compared to commercial inoculants. Ten indigenous strains isolated from different sites of Uruguay were selected by their PCR-BOX profile and their symbiotic efficiency in a high rhizobia concentration soil was evaluated. A greenhouse trial using high rhizobia concentration soil was performed, including non-inoculated controls and treatments inoculated with commercial inoculants from Uruguay and neighbouring countries. Nodule number, nodules dry weight, root dry weight (RDW), shoot dry weight (SDW) and the relation SDW/RDW were evaluated. Most of the evaluated strains had similar symbiotic efficiency to a blend of commercial strains used in Uruguay. There were two outstanding naturalized strains that showed a higher soybean shoot biomass ($p < 0.05$) in studied conditions.

Keywords: proteobacteria, adaptation, competition

1. Introducción

La soja (*Glycine max* L. Merr) es el principal cultivo de grano en Uruguay, y existe una tendencia al aumento del área de siembra ⁽¹⁾. Como la mayoría de las leguminosas, la soja establece una relación simbiótica con rizobios mediante la cual realiza la fijación biológica de nitrógeno (FBN) ⁽²⁾. Debido a que la FBN aporta beneficios económicos y ambientales, la práctica de inocular semillas de soja con rizobios capaces de nodularla, es realizada por todos los productores de nuestro país con una mezcla de dos cepas de *Bradyrhizobium elkanii*, U1301 y U1302, de origen brasilero. Se ha reportado además la presencia en suelos uruguayos de cepas de rizobios utilizados en inoculantes comerciales de la región, una cepa brasilera de *Bradyrhizobium diazoefficiens* SEMIA5080 y una cepa argentina de *Bradyrhizobium japonicum* E109 ⁽³⁾.

La bibliografía reporta variación fenotípica y genética en las cepas de rizobios por multiplicación frecuente en el laboratorio o en suelos de Francia ⁽⁴⁾⁽⁵⁾. Debido a la persistencia de los rizobios en el suelo y la probabilidad de alteración genética de las cepas inoculadas originalmente, pueden desarrollarse nuevas cepas “naturalizadas” con una mejor adaptación al ambiente y cambios en sus características simbióticas. También se han reportado cepas de rizobios nativas con alta eficiencia simbiótica en cultivos de Soja, presentes originalmente en suelos de Mozambique y Brasil ⁽⁶⁾⁽⁷⁾. Esta población de rizobios compite con los inoculantes aplicados y en algunos casos disminuye la eficiencia de los mismos, según fue reportado por Hungria *et al.* (1998) ⁽⁸⁾ en Brasil. El estudio de los rizobios presentes en los suelos de Uruguay resulta relevante debido a que los mismos son una fuente de cepas potencialmente más competentes y eficientes que los inoculantes utilizados actualmente.

El objetivo del presente trabajo fue identificar cepas naturalizadas presentes en suelos de Uruguay capaces de nodular soja, y evaluar su eficiencia simbiótica en suelos con alta carga de rizobios mediante la comparación con controles sin inocular y con cepas de referencia.

2. Materiales y métodos

2.1 Selección de cepas

2.1.1 Origen de rizobios

Se aislaron rizobios presentes en suelos con y sin historia de cultivo de soja situados en los departamentos de Colonia (-34; -58), Canelones (-37; -56), Cerro Largo (-32; -54), San José (-34; -58) y Soriano (-33, -58). Los sitios de muestreo se encuentran ubicados en el mapa del material suplementario (**Figura S1**).

Se analizaron 55 aislamientos de rizobios que en análisis de PCR-BOX de trabajos anteriores presentaron un perfil diferente al de las cepas de referencia utilizadas (U1301, U1302, SEMIA5080 y E109) ⁽³⁾.

2.1.2 Prueba de nodulación.

Las semillas de soja se desinfectaron sumergiéndolas en etanol (70%) durante 1 min, luego en hipoclorito de sodio (2%) durante 2 min y finalmente se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril. Las semillas desinfectadas fueron incubadas en medio agar-agua a 28 °C durante 48 hs para su germinación. Se sembró una semilla de soja pregerminada por frasco conteniendo medio Farehus semi-sólido. A las 48 hs de la siembra se inoculó cada planta con 1 mL de cultivo de los rizobios a estudiar.

Se utilizó una réplica por cada uno de los 47 aislamientos evaluados, y se incluyó un control negativo sin inocular. Se consideraron como positivos los aislamientos que presentaron al menos un nódulo en los 24 días posteriores a la siembra.

2.1.3 Aislamiento de rizobios

El aislamiento de rizobios se realizó desde nódulos de plantas de soja utilizadas en el ensayo de nodulación. Para la desinfección de los nódulos se los lavo con etanol (70%) por 1 min, luego con hipoclorito de sodio (2%) por 2 min y finalmente se realizaron 5 lavados con agua destilada estéril. Los nódulos desinfectados fueron aplastados utilizando portaobjetos estériles, y la suspensión resultante fue estriada en una placa de Petri conteniendo medio EMA ⁽⁹⁾.

Se incubaron las placas a 28 °C durante 5 a 10 días, y en los casos necesarios se realizaron repiques en medio EMA hasta obtener un cultivo puro de bacterias. Los aislamientos puros fueron sembrados en medio TY líquido e incubadas con agitación a 28 °C por 3 a 10 días ⁽⁹⁾. En un tubo Eppendorf se colocaron 0,8 mL de cultivo crecido y 0,8 mL de glicerol (50%) estéril. La mezcla se almacenó a -20 °C para conservar la colección de aislamientos.

2.1.4 Lisados de ADN

Utilizando técnica aséptica, se picó una colonia del cultivo puro en placa y se suspendió en 25 µL de solución de lisis (NaOH 0,05%, SDS 0,25%). La suspensión se calentó a 95 °C durante 10 min y luego se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se agregaron 225 µL de agua bidestilada. La mezcla se centrifugó a 12000 rpm por 5 min. Finalmente se apartaron 60 µL del sobrenadante para utilizar en amplificación de PCR-BOX. Los lisados se conservaron a -20 °C.

2.1.5. PCR-BOX fingerprinting

El ADN de los aislamientos fue amplificado utilizando una reacción de PCR-BOX utilizando como cebador la secuencia de BOX A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'). Se utilizó una mezcla de reacción de 25 µL: 0,50 µL dNTPs (10 mM), 0,50 µL MgCl (0,5 mM), 2,50 µL Buffer Dream Taq (ThermoScientific), 0,25 µL Dream Taq polimerasa (1 U/µL), 17,05 µL agua bidestilada y 3,00 µL lisado.

La reacción se realizó en un termociclador (Gene Touch, Bioer, Hangzhou, China) con el siguiente programa: un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C por 7 min; 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 52 °C por 1 min y 72 °C por 3 min; un ciclo de extensión final a 72 °C por 15 min.

Los amplicones fueron separados mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2% con buffer TBE 0,5X (Tris-Ácido Bórico- EDTA), a 5 V/cm durante 3 hs. Para normalizar los geles obtenidos se colocó un 3 µL de marcador de peso molecular 100 pb Plus (ThermoScientific) en el primer y último pocillo de cada gel.

Para la visualización del gel se utilizó el intercalante Good View (SBS Genetech) y posteriormente se tomaron fotos de los geles en cámara con luz UV.

Se realizaron los perfiles por triplicado para cada uno de los aislamientos estudiados. Para el análisis de los perfiles obtenidos se utilizó el software BioNumerics versión 7.6 (AppliedMaths). Se seleccionaron como cepas naturalizadas a los aislamientos que presentaban un porcentaje de similitud menor al 80% con respecto a las cepas de referencia (U1301, U1302, SEMIA5080 y E109) aplicando el algoritmo de Jaccard.

2.2 Eficiencia simbiótica

2.2.1 Diseño experimental y condiciones de crecimiento de plantas

El ensayo se realizó en la estación experimental “Las Brujas” del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA, Canelones, Uruguay), en invernáculo con condiciones controladas de temperatura (28 °C) y fotoperiodo (12 hs día/ 12 hs noche). Se utilizaron macetas conteniendo 2 Kg de una mezcla (2:1) de arena estéril y suelo tamizado con historia de cultivo de soja. La unidad experimental fue de dos plantas por maceta. Se definieron 15 tratamientos con 5 repeticiones para cada uno. Los tratamientos utilizados consistieron en macetas no inoculadas (S/N), macetas no inoculadas suplementadas con solución nitrogenada (C/N), inoculación con una mezcla (1:1) de las cepas U1301 y U1302 (R01+R02), inoculación con la cepa SEMIA5080 (R03), inoculación con la cepa E109 (R04) y diez tratamientos en los que se inoculó cada una de las cepas naturalizadas por separado (E01, E02, E03, E04, E05, E06, J01, J02, J03 y J04).

Las semillas de soja se desinfectaron sumergiéndolas en etanol (70%) durante 1 min, luego en hipoclorito de sodio (2%) durante 2 min y finalmente se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril. Las mismas fueron incubadas en medio agar-agua a 28 °C durante 48 hs para su germinación. Se sembraron 5 semillas de soja pregerminadas por maceta. A los 4 días de la siembra, se inoculó cada planta con 1 mL de cultivo con una concentración 1×10^7 UFC/mL. A los 6 días de la inoculación se raleó a 2 plantas por maceta.

Todas las macetas fueron regadas semanalmente con 100 mL solución Somesagaran durante los primeros 15 días y luego se aumentó la dosis a 200 mL durante el resto del periodo ⁽¹⁰⁾. El tratamiento C/N fue regado una vez por semana con 100 mL de solución de nitrato de amonio 30 ppm durante todo el periodo. El resto del tiempo las macetas se mantuvieron hidratadas con agua dulce. La cosecha del ensayo se realizó a los 40 días luego de la inoculación, cuando las plantas comenzaban la fase de floración.

Evaluación de nodulación y producción de biomasa vegetal. Se realizó el conteo de número de nódulos (NN) por unidad experimental. El material vegetal fue secado en estufa a 65 °C hasta peso constante, luego se determinó el peso seco de los nódulos (PSN), peso seco de las raíces (PSR) y peso seco de las partes aéreas (PSPA). Adicionalmente se calculó el peso seco total (PST) y el coeficiente de la relación entre peso seco de las partes aéreas y peso seco de las raíces (RPAR).

$$\text{PST} = \text{PSN} + \text{PSR} + \text{PSPA}$$

$$\text{RPAR} = \text{PSPA} / \text{PSR}$$

2.2.2 Análisis estadísticos

El análisis estadístico se realizó utilizando el software Infostat ⁽¹¹⁾. Se realizaron gráficos de cajas con los datos originales y luego se eliminaron los datos que se encontraban fuera de rango en los mismos. La normalidad fue evaluada con el test de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianzas con el test de Levene, utilizando un $p < 0,05$ para ambos. Para comparar los datos correspondientes al NN se utilizó el Modelo Lineal Generalizado Mixto (MLGM) y se compararon las medias entre tratamientos con el test de LSD-Fisher ($p < 0,05$). Para las variables PSN, PSR, PSPA, PST y RPAR se aplicó un análisis de varianzas (ANAVA) y se compararon las medias aplicando el test de Fisher ($p < 0,05$).

3. Resultados

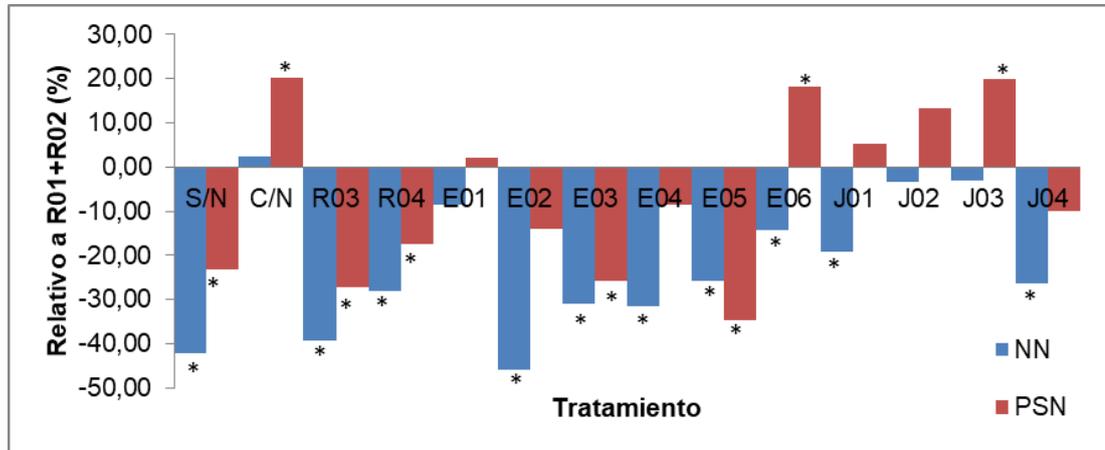
3.1 Selección de cepas naturalizadas

De los 47 aislamientos de rizobios analizados 3 tuvieron resultado negativo en la prueba de nodulación. Para 5 de los aislamientos no se detectó crecimiento de colonias con aspecto de rizobios en medio EMA desde nódulos obtenidos de la prueba de nodulación. Un total de 39 aislamientos fueron analizados por triplicado mediante la técnica de PCR-BOX para seleccionar las cepas naturalizadas. Se seleccionaron 10 aislamientos cuyo perfil resultó ser considerablemente diferente a las cepas de referencia. El dendrograma con los perfiles de PCR-BOX seleccionados y las cepas de referencia se muestra en material suplementario (**Figura S2**). En el mismo se observan 2 grupos definidos por las cepas de referencia, un grupo que contiene las cepas de *B. elkanii* (U1301 y U1302) utilizadas en las formulaciones comerciales de Uruguay donde se encuentran 6 de las cepas naturalizadas seleccionadas que fueron denominadas E01, E02, E03, E04, E05 y E06. En el otro grupo se encuentran las cepas de *B. diazoefficiens* (SEMIA5080) y *B. japonicum* (E109), e incluye 4 cepas naturalizadas nombradas como J01, J02, J03 y J04.

3.2 Eficiencia simbiótica de las cepas naturalizadas

Los resultados obtenidos para los parámetros de nodulación se ilustran en la **Figura 1**. Los mismos se expresan como porcentaje relativo al tratamiento de referencia, la mezcla de las cepas comerciales de Uruguay: R01+R02. Las medias obtenidas para el tratamiento R01+R02 fueron NN = 168 y PSN = 0,67 g. Excepto por el tratamiento C/N, se observa que los demás presentaron NN menor al tratamiento de referencia, 10 de los cuales fueron significativamente diferentes al mismo. Se destacan los tratamientos de S/N y E02 por su menor NN. En cuanto al PSN, 8 de los 14 tratamientos resultaron significativamente diferentes a la referencia: 5 con un valor menor, dentro de los que se encuentra el control sin nitrógeno (S/N) y los tratamientos con cepas comerciales de la región (R03 y R04), y 3 con un valor mayor dentro de los cuales está el control con nitrógeno (C/N).

Figura 1: Número de nódulos (NN) y peso seco de los nódulos (PSN) para cada tratamiento, expresado en porcentaje relativo al tratamiento de referencia R01+R02.

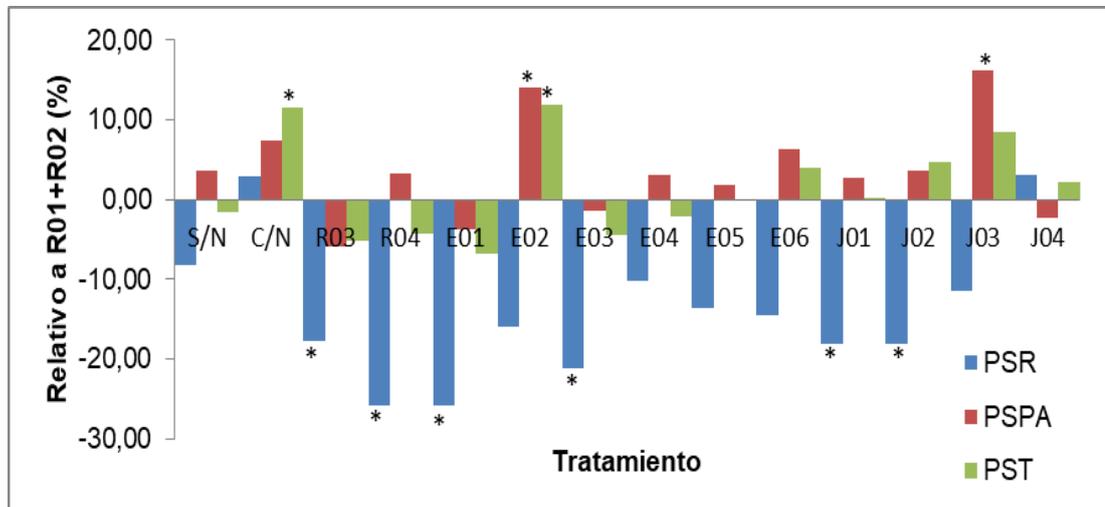


Los valores representan la media (n=5) *Valor significativamente diferente al tratamiento de referencia (R01+R02) ($p < 0,05$).

Los parámetros PSR, PSPA y PST, correspondientes a biomasa de las plantas, se ilustran en la **Figura 2** expresados como porcentaje relativo al tratamiento R01+R02. Para el tratamiento R01+R02 las medias obtenidas fueron PSR = 5,11 g y PSPA = 12,32 g. Excepto para 2 tratamientos (C/N y J04), los valores de PSR fueron inferiores al tratamiento R01+R02, de los cuales para 6 se obtuvieron valores significativamente diferentes. Al considerar el PSPA la tendencia se revierte, 10 de los 14 tratamientos presentan mayor porcentaje que el tratamiento de referencia R01+R02, dentro de los cuales 2 son significativamente diferentes: E02 (14%) y J03 (16%). No se identificó una tendencia para el PST: de los tratamientos ensayados, 6 presentaron un valor inferior al R01+R02, para E05 y J01 se obtuvo una media igual al R01+R02 y los 6 restantes fueron superiores dentro de los cuales 2 resultaron significativamente diferentes (C/N y E02).

Los resultados obtenidos para el parámetro RPAR se muestran en el gráfico de la **Figura 3**. En este gráfico se destaca con color rojo el tratamiento R01+R02 utilizado como referencia con una media de 2,32. Se observa que los demás tratamientos tienen valores iguales o superiores al de referencia, 8 de los cuales son significativamente diferentes.

Figura 2: Peso seco de las raíces (PSR), peso seco de las partes aéreas (PSPA) y peso seco total (PST) para cada tratamiento expresado en porcentaje relativo al tratamiento de referencia R01+R02.

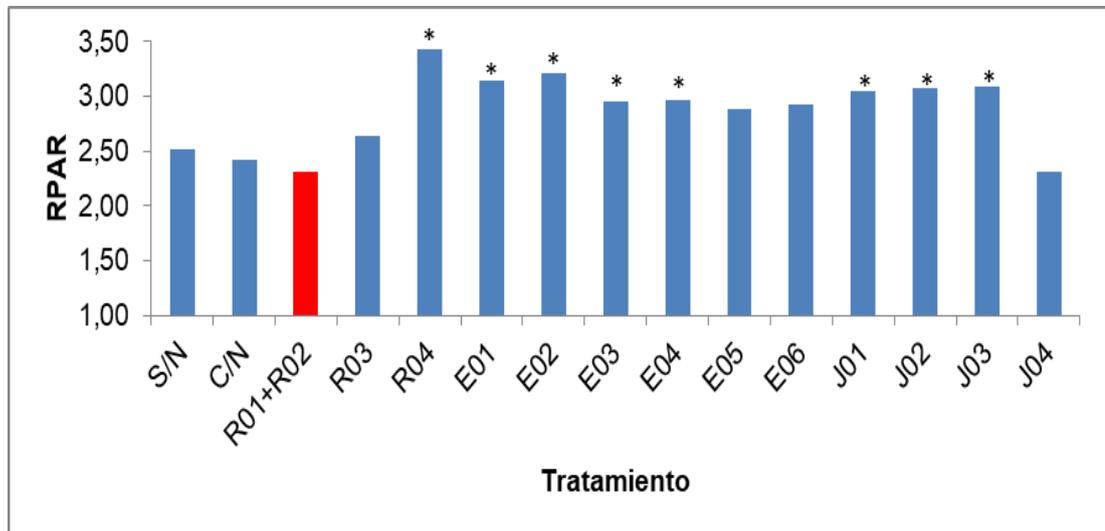


Los valores representan la media (n=5) *Valor significativamente diferente al tratamiento de referencia (R01+R02) ($p < 0,05$).

4. Discusión

La diversidad de rizobios obtenida es similar a la del trabajo realizado en Argentina por Iturralde *et al.* (2019)⁽¹²⁾, aunque es menor a la obtenida por de Almeida Ribeiro *et al.* (2015)⁽⁷⁾ en Brasil y Chibeba *et al.* (2017)⁽⁶⁾ en Mozambique. Las distintas condiciones edafoclimáticas de los sitios muestreados en estos experimentos podrían explicar las diferencias en las diversidades obtenidas, debido a que los factores ambientales son clave para la variabilidad genética de las bacterias. Aunque el PCR-BOX no es una técnica confiable para identificación a nivel de especie o género, sí es robusta para estudiar a nivel de cepa⁽¹³⁾. Basándonos en la alta similitud de los perfiles obtenidos respecto a los utilizados como referencia podemos suponer que las cepas seleccionadas pertenecen a las especies *B. elkanii*, *B. japonicum* y *B. diazoefficiens*. Los estudios realizados por Iturralde *et al.* (2019)⁽¹²⁾, Chibeba *et al.* (2017)⁽⁶⁾ y de Almeida Ribeiro *et al.* (2015)⁽⁷⁾ apoyan estos resultados, debido a que en sus trabajos se encontraron mayoritariamente cepas pertenecientes a estas tres especies. Es necesaria una caracterización genética más profunda de las cepas

Figura 3. Relación entre peso seco de las partes aéreas y peso seco de la raíz (RPAR) para cada tratamiento. El tratamiento de referencia R01+R02 está indicado con color rojo.



Los valores representan la media (n=5) *Valor significativamente diferente al tratamiento de referencia (R01+R02) ($p < 0,05$).

encontradas para lograr su identificación genética. Una posible estrategia de identificación de rizobios es la amplificación de genes como el 16S y genes housekeeping que están reportados en varios estudios de *Bradyrhizobium* alrededor del mundo ⁽⁶⁾⁽⁷⁾⁽¹⁴⁾.

Los altos valores de nodulación de los controles sin inocular confirmaron una alta concentración de rizobios que nodulan soja en el suelo utilizado. A pesar de que varios estudios reportan una disminución de la nodulación en presencia de nitrógeno, estos no se condicen con los resultados obtenidos en nuestro trabajo donde este tratamiento obtuvo el mayor valor de NN y PSN ⁽¹⁵⁾. Esto podría explicarse por una posible subdosificación del nitrógeno aplicado, o porque la aplicación comenzó luego de establecerse la relación simbiótica. Las diferencias encontradas en algunos tratamientos entre el NN y el PSN es coherente con la hipótesis planteada por de que la planta restringe el número de nódulos cuando estos están altamente activos, para balancear la relación entre recursos aportados y nitrógeno obtenido ⁽¹⁶⁾.

Dado que el cultivo en este ensayo no llegó hasta la fase de producción de granos, el estimador más cercano del rendimiento del cultivo es el PSPA, utilizado como estimador de la eficiencia simbiótica en varios trabajos similares ⁽⁶⁾⁽⁷⁾⁽¹²⁾. Según los resultados obtenidos la mayoría de los tratamientos no tendrían diferencias significativas respecto a la mezcla de cepas comerciales utilizadas actualmente en Uruguay. Incluso el control sin inocular fue estadísticamente igual a la mayoría de los tratamientos inoculados, resultado que es concordante con lo reportado por Lagurara (2018) ⁽³⁾ y que cuestiona la eficiencia de estos inoculantes en suelos con alta carga de rizobios. Sin embargo, dos de las cepas naturalizadas presentan una eficiencia simbiótica superior. Estas dos nuevas cepas E02 y J03 presentan potencial de aumentar el rendimiento del cultivo de soja. Los estudios realizados por Iturralde *et al.* (2019) ⁽¹²⁾, Chibeba *et al.* (2017) ⁽⁶⁾ y de Almeida Ribeiro *et al.* (2015) ⁽⁷⁾ reportan cepas naturalizadas con mayor eficiencia simbiótica pero en ensayos con inoculaciones puras sin rizobios en suelo que compitan. La bibliografía no reporta ensayos en condiciones similares a las utilizadas en nuestro trabajo. Por otro lado, la relación entre el peso seco de las partes aéreas y las raíces es un indicador de como la planta distribuye su biomasa de acuerdo a la disponibilidad de nutrientes. Este parámetro fue sugerido por Iturralde *et al.* (2019) ⁽¹²⁾ como un indicador de la eficiencia simbiótica de las cepas. Basándonos en este parámetro encontramos varias cepas tanto del grupo de *B. elkanii* como de las similares a *B. japonicum* y *B. diazoefficiens* con posibilidad de mejorar la eficiencia simbiótica del cultivo. Para un mejor estudio de las cepas es importante evaluar su comportamiento frente a distintas variedades de soja y en distintos suelos debido a que ambos factores podrían afectar su desempeño.

5. Conclusiones

El presente trabajo confirmó la presencia de rizobios naturalizados que nodulan soja en Uruguay y se realizó una primera aproximación hacia su identificación. Se destacan 2 cepas (E02 y J03) con potencial de mejorar el rendimiento de soja en suelos uruguayos. Los resultados obtenidos en el control sin inocular crecido en suelo con alta carga de rizobios, muestran la persistencia de una población de

rizobios con alta eficiencia simbiótica. Se plantea evaluar la capacidad competitiva de estas cepas naturalizadas en presencia de la población del suelo.

Agradecimientos

Las autoras agradecen a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación por el apoyo financiero para la realización de este trabajo. Se extiende el agradecimiento al personal del laboratorio de Microbiología de Suelos de INIA (La Brujas) por su colaboración durante el desarrollo del experimento en su invernáculo.

Declaración de contribución de autores

NR: Ejecutó los experimentos y trabajo experimental, realizó los análisis estadísticos y redactó el manuscrito del artículo, AR y MS: Diseñaron los experimentos y colaboraron en la discusión de los resultados.

Referencias

1. MGAP (2019) 'Encuesta Agrícola "Invierno 2019"'. Disponible en: http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/publicacion_inv2019_0.pdf (Verificado 15 Agosto 2019)
2. Monza J, Márquez A (Coord) (2004) 'El metabolismo del Nitrógeno en plantas (Almuzara: Córdoba)
3. Lagurara P (2018) 'Eficiencia simbiótica y capacidad competitiva de cepas de rizobios que nodulan soja en suelos con y sin historia del cultivo.' Tesis de Maestría, Universidad de la República, Uruguay
4. Flores M, Gonzalez V, Pardo MA, Leija A, Martínez E, Romero D, Pinero D, Davila G, Palacios R (1988) Genomic instability in *Rhizobium phaseoli*. *Journal of Bacteriology* 170, 1191-1196.
5. Brunel B, Boeufgras, JM, Bernillon, D, Bardin R (1990) Phenotypic drift in *Bradyrhizobium japonicum* populations after introduction into soils as established by numerical analysis. *Microbial Ecology* 19, 163-170.
6. Chibeba A, Kyei-Boahen S, Guimares MF, Nogueira M, Hungria M (2017)

Isolation, characterization and selection of indigenous *Bradyrhizobium* strains with outstanding symbiotic performance to increase soybean yields in Mozambique. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 246, 291-305.

7. de Almeida Ribeiro P, dos Santos J, da Costa E, Lebbe L, Assis E, Louzada M, Guimaraes A, Willems A, de Souza F (2015) Symbiotic efficiency and genetic diversity of soybean *Bradyrhizobium* in Brazilian soils. *Agriculture, Ecosystem & Environment* 212, 85-93.

8. Hungria M, Boddey LH, Santos MA, Vargar MAT (1998) Nitrogen fixation capacity and nodule occupancy by *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* strains. *Biology and Fertility of Soils* 27, 393-399.

9. Howieson JG, Dilworth MJ (Eds) (2016). 'Working with rhizobia' (ACIAR: Canberra).

10. Somasegaran P, Hoben HJ (1994). 'Handbook for rhizobia: methods in legume-Rhizobium technology.' (Springer Verlag: New York).

11. Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW InfoStat versión 2018. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>

12. Iturralde E, Covelli J, Alvarez F, Pérez-Giménez J, Arrese-Igor C, Lodeiro A (2019) Soybean-nodulating strains with low intrinsic competitiveness for nodulation, good symbiotic performance and stress-tolerance isolated from Soybean-cropped soils in Argentina. *Frontiers in Microbiology* 10, 1061.

13. Menna P, Pereira AA, Bangel EV, Hungria, M (2009) rep-PCR of tropical rhizobia for strain fingerprinting, biodiversity appraisal and as a taxonomic and phylogenetic tool. *Symbiosis* 48, 120–130.

14. Tabing Mason ML, Matsuura S, Domingo A, Yamamoto A, Shiro S, Sameshima-Saito R, Saeki Y (2017) Genetic diversity of indigenous soybean-nodulating *Bradyrhizobium elkanii* from southern Japan and Nueva Ecija, Philippines. *Plant Soil* 417, 349-362.

15. Hungria M, Franchini JC, Campo RJ, Crispino CC, Moraes JZ, Sibaldelli RNR, Arihara J (2006) Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: Contributions of biological N₂ fixation and N fertilizer to grain yield. *Canadian Journal of Plant Science* 86,

927–939.

16. Nishida H, Suzaki T (2018) Two negative regulatory systems of root nodule symbiosis - how are symbiotic benefits and costs balanced? *Plant Cell Physiology* 59, 1733–1738.

Material suplementario

Figura S1. Ubicación de los sitios de cultivo de soja donde se aislaron los rizobios naturalizados. Con el símbolo  se indica la ubicación de los sitios: Cerro Largo (1), Soriano (2), Colonia (3), San José (4) y Canelones (5).

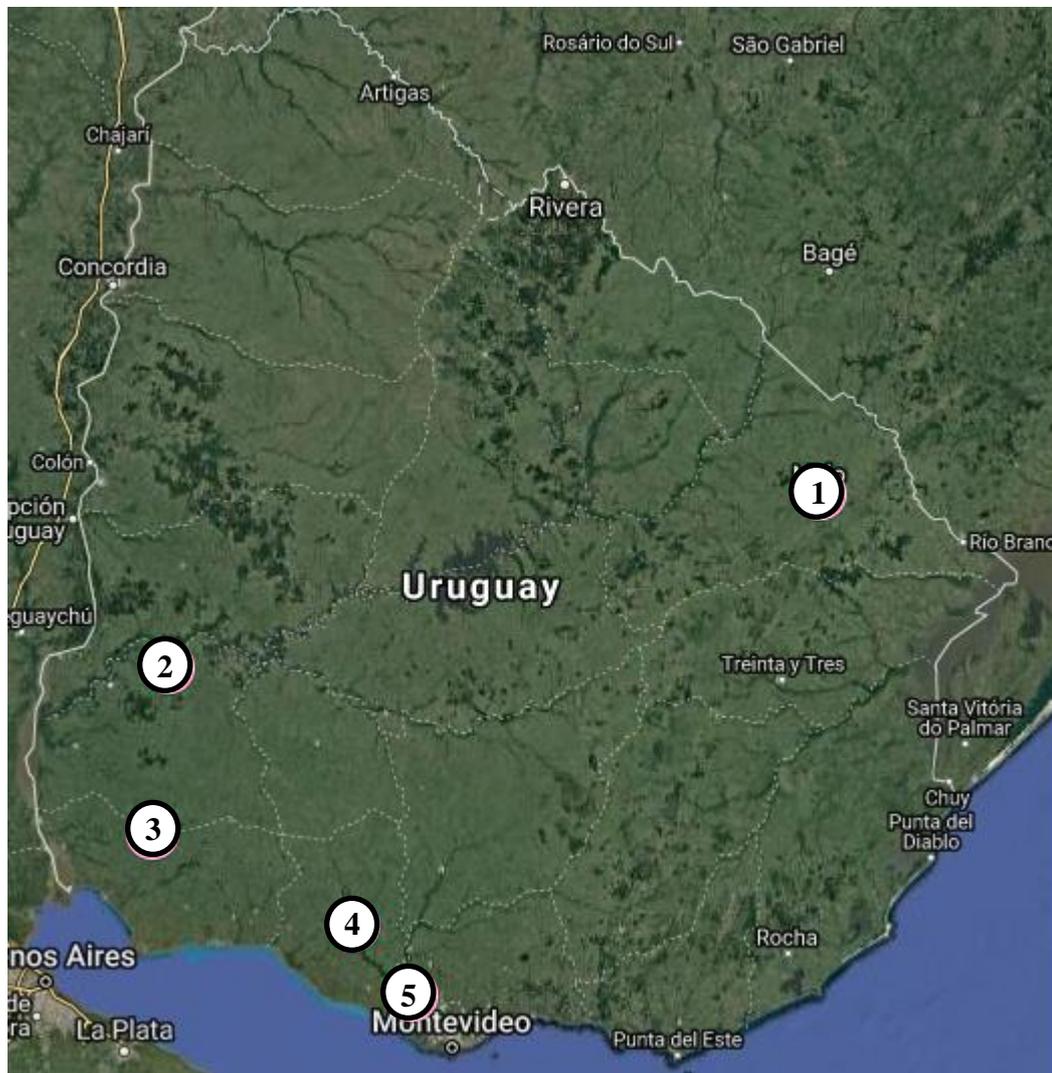


Figura S2. Dendrograma de perfiles de PCR-BOX. Los perfiles de referencia son R01 (U1301), R02 (U1302), R03 (SEMIA5080) y R04 (E109). Los demás perfiles corresponden a aislamientos seleccionados como cepas naturalizadas.

