



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas

Área: Biología

Sub-área: Biología Celular y Molecular

Tesis de Maestría

Rizobios eficientes y parásitos que nodulan alfalfa en suelos ácidos del Uruguay

Lic. Andrés Beraís Rubio

Tutor: Dr. Jorge Monza

Co-tutor: Dr. Gastón Azziz

Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Agronomía

Universidad de la República

Montevideo, Uruguay

2023

Agradecimientos

En primer lugar, le agradezco al Dr. Jorge Monza por darme la oportunidad de realizar la Maestría en el Laboratorio de Bioquímica, por su confianza, respaldo y disponibilidad.

También le agradezco a mi co-tutor, el Dr. Gastón Azziz por las etapas del proceso que compartimos.

A la Dra. María Morel Revetría por su respaldo y enseñanzas en las primeras etapas del posgrado, y por ser una referencia siempre frente a cualquier duda, siendo fundamental para el desarrollo de mi Maestría.

Al Dr. Santiago Signorelli por orientarme desde su llegada dándome una visión diferente y aportando para generar un salto de calidad en mi trabajo.

A la Dra. Mónica Rebuffo por su apoyo estadístico en las primeras etapas del proyecto, y al Dr. Rafael Reyno de INIA por participar en las etapas de campo.

A la Dra. Carla Valeria Filippi por sus colaboraciones bioinformáticas, su gran disposición a explicar y por ser mi compañera de oficina.

Al MSc. Matías Giménez por su colaboración en el artículo publicado y por su buena voluntad para compartir conmigo su conocimiento bioinformático.

A todo el grupo del Laboratorio de Bioquímica por compartir el día a día, en particular a las Dras. Martha Sainz y Mariana Sotelo y al Dr. Omar Borsani por aconsejarme con muy buena disposición frente a los problemas experimentales que surgían a lo largo del proceso.

A Carla Silva y Jorge del Pino por ser grandes compañeros de subgrupo.

Finalmente, a mi familia y amigos/as, por su cariño, contención y apoyo que me dan fuerza para alcanzar mis objetivos.

Tabla de contenido

Resumen	6
Introducción	10
1. Dinámica del nitrógeno en los ecosistemas	10
1.1 Entrada de nitrógeno a los ecosistemas por fijación biológica	11
1.2 Salida del Nitrógeno de los ecosistemas por desnitrificación	13
2. Simbiosis rizobio leguminosa	14
2.1 Nodulación de la leguminosa por el rizobio	14
2.2 Simbiosis <i>Ensifer</i> -alfalfa	17
2.2.1 Grupo <i>Ensifer</i>	17
2.2.2 Alfalfa como leguminosa forrajera	19
3. Criterios usados para identificación y taxonomía de rizobios	20
4. Inoculantes rizobianos	21
5. Cepas parásitas tipo Oregon	25
6. Peptidasas HrrP y SapA involucradas en la ineficiencia simbiótica	26
Objetivos	29
Materiales y métodos	30
1. Material vegetal y condiciones de crecimiento	30
2. Bacterias y condiciones de crecimiento	31
3. Eficiencia simbiótica a pH 5.5	33
4. Efectividad simbiótica relativa ORY respecto a U143	33
5. Capacidad de respirar nitrato	34
6. Marcaje con el gen reportero <i>gusA</i>	34
7. Evaluación del tiempo de nodulación de transconjugantes	34
8. Actividad Gus en nódulos de alfalfa	35
9. Competitividad y producción de biomasa	35
10. Determinación de nitrógeno proveniente de la atmósfera	35
11. Extracción de ADN genómico y electroforesis en gel de agarosa	36
12. Amplificación del gen del 16S ARNr	36
13. Perfiles ERIC y BOX	37

14. Secuenciación de genomas	37
15. Análisis filogenéticos	38
16. Números de acceso de secuencias nucleotídicas	39
17. Identificación de Peptidasas M16 plasmídicas	40
18. Análisis estadísticos	41
Resultados	42
1. Eficiencia simbiótica de cepas de <i>E. meliloti</i>	42
1.1 Cepas de la colección Fagro-INIA	42
1.1.1 INIA La Estanzuela: Predio Ganadero	42
1.1.2 INIA La Estanzuela: Predio Lechero	43
1.1.3 INIA La Estanzuela: Predio Ovino	44
1.1.4 INIA La Estanzuela: Predio Semillas	45
1.1.5 Predio de Productores	46
1.2 Cepas de colecciones	48
1.2.1 Colección de la Universidad Nacional de La Plata	
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable	48
1.2.2 Colección del Departamento de Agricultura de EEUU	49
1.2.3 Colección del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca	50
2. Eficiencia simbiótica de las cepas promisorias a pH 5.5	51
3. Borrador del genoma de <i>E. meliloti</i> cepa elite U143	53
4. Competitividad y eficiencia simbiótica de la cepa ORY1	58
4.1 Identificación de cepas parásitas de alfalfa tipo Oregon	60
4.2 Secuenciación del genoma y análisis filogenético de la cepa ORY1	61
4.3 Competitividad y eficiencia simbiótica de ORY1 vs. U143	63
4.4 Identificación de dominios peptidasa M16 en la cepa ORY1	65
Discusión	69
1. Selección de cepas de <i>E. meliloti</i> por su eficiencia para su uso como inoculantes de alfalfa en suelos ácidos de la Cuenca Lechera	69

2. Borrador del genoma de la cepa elite U143 de <i>E. meliloti</i> usada en Uruguay como inoculante de alfalfa	71
3. Identificación de cepas tipo Oregon en suelos ácidos del Uruguay	75
4. Competencia de las cepas ORY1 vs. U143	77
5. Identificación de dominios peptidasa tipo M16 en la cepa ORY1	78
Conclusiones	80
Referencias	81
Anexo	101

Resumen

La alfalfa (*Medicago sativa*) es una de las principales leguminosas forrajeras cultivadas a nivel mundial. En Uruguay se la siembra extensamente en suelos ácidos de la Cuenca Lechera y se la inocula desde 1991 con la cepa U143 de *Ensifer* (syn. *Sinorhizobium*) *meliloti*, aislada de nódulos de alfalfa crecida en nuestro país.

El primer objetivo de esta tesis fue analizar la eficiencia simbiótica de cepas colectadas en suelos levemente ácidos de la Cuenca lechera que integran la colección Fagro-INIA, y cepas de las colecciones del MGAP, IIBCE y USDA. Entre las cepas que integran la colección Fagro-INIA, considerando el número de aislamientos y la cantidad de perfiles ERIC diferentes, la diversidad fue inferior a la reportada para rizobios que nodulan trébol y lotus, también aislados de suelos de Uruguay. La biomasa acumulada en dos cortes por los pares *M. sativa* cv. Chaná y las cepas de las diferentes colecciones respecto a la cepa U143, permitió identificar a las cepas CA1, L14 y S8 como promisorias a pH 6.2. A su vez, la eficiencia simbiótica de estas cepas a pH 5.5 fue la misma que la de la cepa U143 en esta condición.

El segundo objetivo de la tesis se centró en la caracterización genética de la cepa usada como inoculante comercial de alfalfa. El borrador del genoma completo de la cepa U143 evidenció que tiene un tamaño de 6,807,606 pb, dos megaplásmidos, un contenido GC de 62.14% y 6,522 secuencias codificantes de proteínas. Entre esas secuencias se identificaron genes *nap*, *nir*, *nor* y *nos*, que codifican para reductasas responsables de la respiración de NO_3^- , fenotipo confirmado en vida libre. También se identificó en su genoma el dominio de una peptidasa de la familia M16 homóloga a SapA, relacionada con la modulación de la eficiencia simbiótica. En condiciones de campo, las plantas de alfalfa inoculadas con la cepa U143 adquirieron el 60% del N a partir de la fijación biológica, un porcentaje de N dentro del rango esperado para esta simbiosis.

El tercer objetivo se centró en la búsqueda de cepas parásitas de alfalfa tipo Oregon en suelos ácidos de la Cuenca lechera, que constituyen un riesgo para la implantación y el rendimiento de las praderas de esa leguminosa. Los 5 aislamientos (ORY1 a ORY5) provenientes de nódulos de plantas de alfalfa presentaron entre 99.7 y 100% de identidad con la secuencia del gen 16S ARNr de *Rhizobium favelukesii* cepa LPU83, la cual tiene un comportamiento parásito en alfalfa. A su vez, los perfiles BOX mostraron dos patrones de bandas distintos, sugiriendo una diversidad mayor a la reportada anteriormente para cepas de esta especie. El análisis del genoma de la cepa ORY1 y las de referencia, LPU83 y Or191 evidenció que comparten alrededor del 87.5 % de sus secuencias codificantes, incluyendo los genes simbióticos. Además, el análisis filogenético de los genes simbióticos *nifH*, *nifD*, *nifK*, *nodA*, *nodB*, y *nodD* de la cepa ORY1 evidenció que agrupa con *E. meliloti*. La competitividad de la cepa ORY1 respecto al inoculante comercial de alfalfa se determinó mediante ensayos de coinoculación de semillas con ratios 99:1 y 1:99 de ORY1::*gusA*/*E. meliloti* U143. En ambos tratamientos la cepa parásita ocupó más del 50% de los nódulos, evidenciando su alta competitividad. Por otro lado, la producción de biomasa aérea en ambos tratamientos fue significativamente diferente, lo que indica que los nódulos inducidos por la cepa eficiente son esenciales para proporcionar suficiente nitrógeno para el crecimiento óptimo de la planta y apoyan la necesidad de inoculación. En la cepa ORY1 se identificaron tres genes que codifican para secuencias aminoacídicas con dominios de peptidasas M16 con homología con genes *hrrP* y *sapA* bacterianos. Los dos genes que presentan homología con el gen *hrrp* son contiguos y están situados en el plásmido accesorio, mientras que el tercero que presenta homología con el gen *sapA* está localizado en el cromosoma. Estos genes podrían estar relacionados al comportamiento parásito de la cepa ORY1.

Abstract

Alfalfa (*Medicago sativa*), one of the main cultivated forage legumes worldwide, is extensively cultivated in acidic soils of the Cuenca Lechera of Uruguay and has been inoculated since 1991 with *Ensifer* (syn. *Sinorhizobium*) *meliloti* U143 strain, isolated from alfalfa nodules. This thesis first objective was to analyze the symbiotic efficiency of collected strains from acidic soils of Cuenca Lechera, which belongs to Fagro-INIA collection, and MGAP, IIBCE, and USDA collections. In relation to Fagro-INIA collection strains, considering the isolate number and different ERIC profiles, a lower diversity was observed compared with clover and lotus-nodulating rhizobia reported from Uruguayan soils. Symbiotic pairs accumulated biomass in two cuts established by different collection strains against U143 strain allowed CA1, L14 and S8 strains identification as promising at pH 6.2. These strains efficiency at pH 5.5 did not show significant differences in biomass production compared to the U143 strain under this condition, and they are being evaluated in field conditions outside of this thesis. The thesis second objective was focused on the genetic characterization of the alfalfa commercial inoculant U143 strain. U143 strain draft genome showed that it has a length of 6,807,606 bp, two megaplasmids, a GC content of 62.14% and 6,522 protein coding sequences. Among these sequences, *nap*, *nir*, *nor*, and *nos* genes were identified, which encodes for NO₃⁻ respiration reductases and this phenotype was observed in free living conditions. An M16 peptidase family homologous domain to SapA protein was found, which is involved in the symbiotic efficiency modulation. Under field conditions, alfalfa plants inoculated with U143 strain acquired 60% of N from biological nitrogen fixation, a N percentage in the expected range for this symbiosis.

Identifying alfalfa parasitic strains (Oregon type) was the third objective in acidic soils from Cuenca Lechera, given that they constitute a potential risk for alfalfa implantation and performance. Five isolates (ORY1 to ORY5) were selected from alfalfa nodules and showed between 99.7 and 100% identity with LPU83 strain of *R. favelukesii* 16S rRNA gene sequence. In turn, two distinct band patterns were shown in BOX profiles,

suggesting greater diversity than previously reported. The genome analysis of ORY1, LPU83 and Or191 *R. favelukesii* strains showed that they share about 87.5 % of their coding sequences, including symbiotic genes. Furthermore, phylogenetic analysis of ORY1 strain symbiotic genes *nifH*, *nifD*, *nifK*, *nodA*, *nodB*, and *nodD* showed that this strain is related to *E. meliloti*. ORY1 strain competitiveness against the commercial alfalfa inoculant was determined by seed coinoculation tests with 99:1 and 1:99 ratios of ORY1::*gusA*/*E. meliloti* U143. In both treatments, the parasitic strain occupied more than 50% of the nodules, evidencing its high competitiveness. On the other hand, the biomass production in both treatments was significantly different, suggesting that efficient strain-induced nodules are essential to provide enough nitrogen for optimal plant growth. These findings support the need for alfalfa inoculation. In ORY1 strain, three genes coding M16 peptidase domain amino acid sequences with homology with *hrrP* and *sapA* bacterial genes were identified. Two genes showing homology to the *hrrp* gene were contiguous and located on the accessory plasmid, whereas the third gene showed homology with the *sapA* gene located in the chromosome. These genes could be related to ORY1 strain parasitic behavior.

Introducción

1. Dinámica del nitrógeno en los ecosistemas

El nitrógeno es uno de los macronutrientes requerido por las plantas, y constituye un factor limitante de crecimiento dado que compone aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos y clorofilas, entre otros. La deficiencia de nitrógeno puede afectar la relación de biomasa tallo-raíz, la altura de la planta, generar ramas laterales cortas, y afectar otros rasgos como el color, el área, y el número de hojas (Azimi et al., 2020).

En el suelo el nitrógeno se encuentra en dos formas mayoritarias, como nitrógeno mineral inorgánico (~ 2%) y como materia orgánica (~ 98%). Las formas inorgánicas se presentan como amoníaco (NH_3), amonio (NH_4^+), nitrito (NO_2^-), y nitrato (NO_3^-), mientras que la forma orgánica corresponde a la materia viva integrada por la microbiota del suelo, los restos de plantas y animales, y compuestos humificados. El nitrógeno orgánico no está directamente disponible para las plantas y debe ser convertido a NH_4^+ o NO_3^- , a través de un proceso, lento conocido como mineralización (Liu et al., 2014).

A su vez, el nitrógeno atmosférico (N_2) puede ser reducido a NH_4^+ mediante otro proceso conocido como fijación biológica de nitrógeno (FBN). Las relaciones entre los distintos estados de oxidación del nitrógeno, conocidas comúnmente como ciclo del nitrógeno, se representan en la Figura 1.

La producción de amoníaco para producir fertilizantes se realiza por síntesis de Haber-Bosch, un proceso industrial, en el cual se produce NH_4^+ a partir de H_2 y N_2 . Para este proceso que requiere de alta temperatura y presión, se utilizan combustibles fósiles que liberan cantidades elevadas de CO_2 a la atmósfera, las cuales contribuyen con el 1 - 2% de las emisiones globales (Liu et al., 2013). A pesar de esto, unos 80 millones de toneladas de nitrógeno obtenido por este proceso son usados anualmente para la agricultura a nivel mundial (Hawkesford, 2014). A su vez, gran parte del nitrógeno aplicado al suelo no es utilizado por los cultivos, y más del 25% del suplementado como fertilizante se pierde por diferentes procesos (Saikia et al., 2007), entre ellos la desnitrificación.

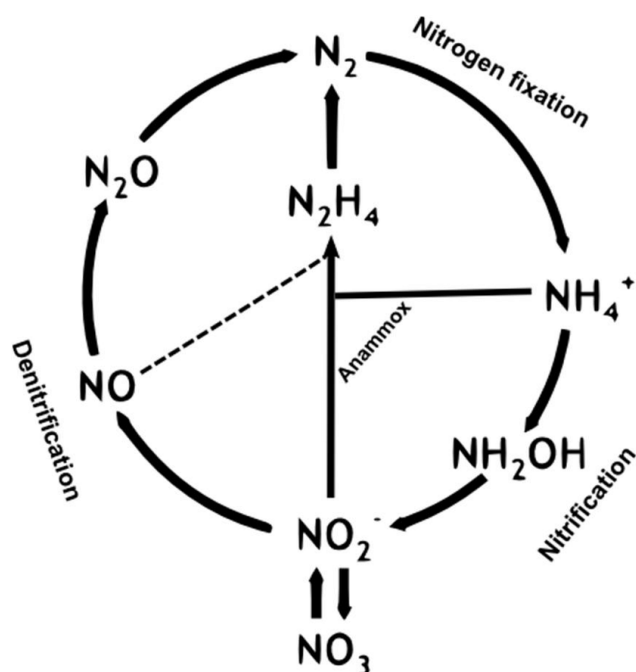


Figura 1. Ciclo del nitrógeno. El nitrógeno es reducido a amonio (NH_4^+) por el proceso conocido como fijación biológica de nitrógeno. El amonio es transformado en nitrito (NO_2^-) y este en nitrato (NO_3^-) por el proceso de nitrificación. Tanto el NO_2^- como el NO_3^- se pueden transformar en óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N_2O) y nitrógeno molecular (N_2) por el proceso denominado desnitrificación. Tomado de Jermakka et al., 2015.

1.1 Entrada de nitrógeno a los ecosistemas por fijación biológica

La FBN, en particular la realizada por bacterias endosimbióticas asociadas a leguminosas, puede proveer importantes cantidades de nitrógeno a los ecosistemas. Por esta razón, para la producción agrícola es necesario reevaluar los sistemas de cultivo que involucran leguminosas, porque contribuyen a mantener la productividad y son una alternativa frente a la aplicación de fertilizantes nitrogenados, con los efectos adversos que su uso genera (Iannetta et al., 2016).

La FBN es un proceso enzimático catalizado por la nitrogenasa, una enzima extremadamente sensible al oxígeno (Berman-Frank et al., 2005), presente solo en algunas bacterias y arqueas metanogénicas (Welte, 2018). La nitrogenasa reduce el N_2 a NH_3^+ (Figura 2) en bacterias en condiciones de vida libre y en bacterias asociadas a otros organismos. Este proceso es muy costoso energéticamente, porque consume 16 ATP para reducir el N_2 a $2NH_3$ y $2H^+$, y hasta 12 ATP adicionales para la asimilación y el transporte del NH_4^+ (Soumare et al., 2020).

La nitrogenasa, evolutivamente conservada en la mayoría de las bacterias fijadoras de nitrógeno, está formada por dos componentes: el componente I (dinitrogenasa o proteína hierro-molibdeno), un tetrámero $\alpha_2\beta_2$ codificado por los genes *nifD* y *nifK*, y el componente II (dinitrogenasa reductasa o proteína hierro) un dímero α_2 codificado por el gen *nifH* (Dai et al., 2014). La actividad de esta enzima es la responsable del ingreso de más de 120 millones de toneladas de N globales por año, de las cuales alrededor de la mitad son fijadas por cultivos agrícolas (Soumare et al., 2020).

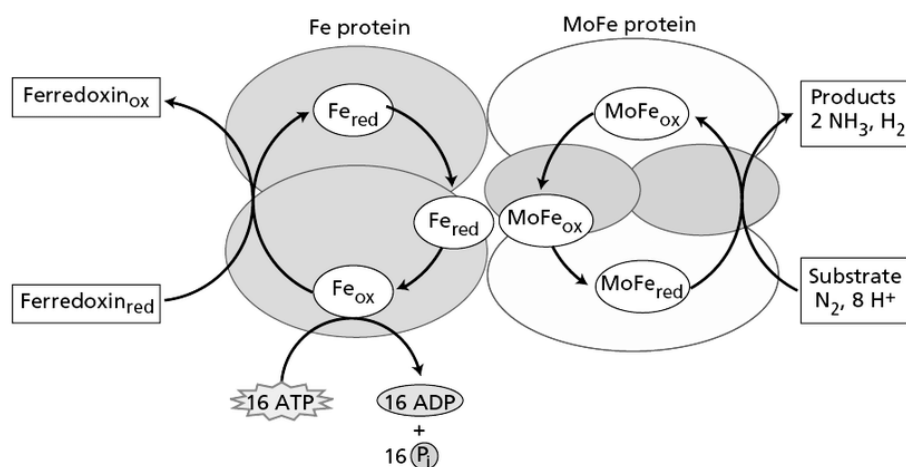


Figura 2. Representación del complejo enzimático de la nitrogenasa. La Ferredoxina reducida suministra poder reductor a la proteína hierro (Componente II), que reduce a la proteína molibdeno-hierro (Componente I). En el Componente I se encuentra el sitio catalítico donde ocurre la reducción de N_2 a $2NH_3$ y de $2H^+$ a H_2 . Tomado de Bahuguna et al., 2011.

1.2 Salida del Nitrógeno de los ecosistemas por desnitrificación

La desnitrificación es un proceso respiratorio secuencial en el que el nitrato (NO_3^-) o el nitrito (NO_2^-) son reducidos a óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N_2O) y nitrógeno molecular (N_2), según se representa en la Figura 3. En bacterias, este proceso requiere de cuatro reacciones catalizadas por enzimas codificadas por los *clusters* de genes de las nitrato reductasas periplásmicas (*nap*) o asociadas a membranas (*nar*), nitrito reductasas (*nir*), óxido nítrico reductasas (*nor*), y óxido nitroso reductasas (*nos*) (Pacheco et al., 2023).

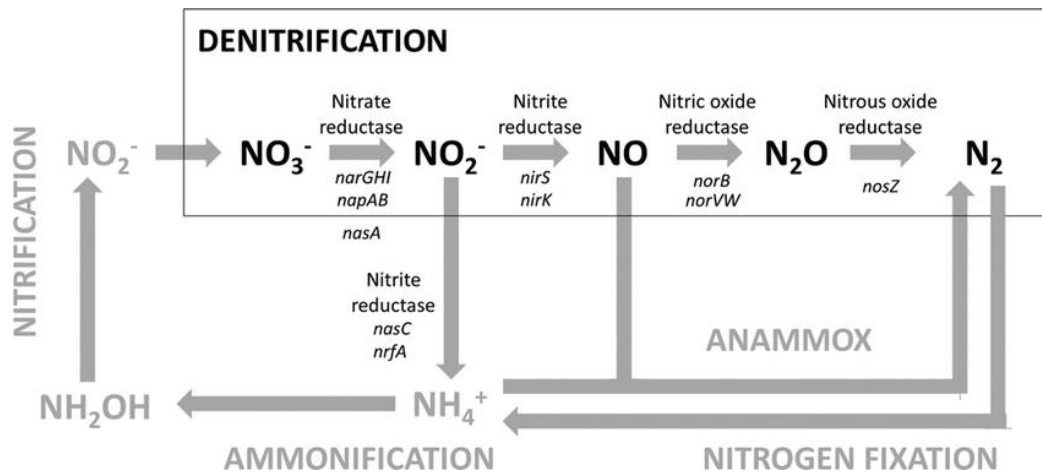


Figura 3. Respiración de nitrato. El NO_3^- puede generar N_2 mediante la participación de las enzimas nitrato reductasa, nitrito reductasa, óxido nítrico reductasa y óxido nitroso reductasa. Este proceso conocido como desnitrificación, genera como intermediario el N_2O , un gas con potente efecto invernadero. Tomado de Pope et al., 2020.

Entre los rizobios se han descrito especies de los géneros *Ensifer* y *Bradyrhizobium* (Torres et al., 2014) que presentan alguno o todos los genes necesarios para la respiración de NO_3^- , tanto en condiciones de vida libre (Bueno et al., 2015) como en nódulos (Pacheco et al., 2023). La capacidad de respirar NO_3^- en condiciones de microaerobiosis por cepas usadas como inoculantes es una característica no deseada desde el punto de vista ecológico y económico, porque el N_2O generado en el proceso es un poderoso gas de

efecto invernadero que tiene un potencial de calentamiento global 300 veces superior al del CO₂ y puede persistir en la atmósfera hasta 150 años (IPCC 2007, Torres et al., 2014). Incluso aunque la desnitrificación llegara hasta N₂, también se estaría perdiendo nitrógeno del ecosistema sin la producción de N₂O.

La agricultura y la ganadería son las principales actividades humanas que contribuyen al aumento de los niveles de N₂O en la atmósfera, mientras que la quema de combustibles fósiles y de biomasa generan un menor impacto en el medio ambiente en términos de emisiones de este gas (IPCC 2022, Pacheco et al., 2023). Por esta razón, dado que algunas cepas utilizadas como inoculantes presentan capacidad de desnitrificar, se están buscando cepas que no desnitrifiquen, sean estas mutantes naturales o generadas mediante ingeniería genética.

2. Simbiosis rizobio leguminosa

El concepto de simbiosis refiere a la capacidad de dos organismos de diferente especie de establecer una interacción que beneficia a ambos (Oldroyd et al., 2011), como ocurre entre pares específicos de rizobios y leguminosas. En esta simbiosis endocelular o endosimbiosis (Wernegreen, 2012), la planta suministra esqueletos carbonados a las bacterias y las bacterias aportan NH₃ a la planta. La simbiosis rizobio leguminosa, no solo es de las más estudiadas (Oldroyd et al., 2011) por sus derivaciones aplicadas, sino también como un ejemplo de coevolución.

2.1 Nodulación de la leguminosa por el rizobio

Las leguminosas pertenecientes al IRLC (*Inverted repeated lacking clade*, Ellis, 2008) pueden establecer asociaciones simbióticas con bacterias diazotróficas presentes en los suelos, conocidas genéricamente como rizobios. Los rizobios son bacterias Gram negativas, heterótrofas, aerobias y móviles que integran los grupos de α y β Proteobacterias. Las especies más caracterizadas y estudiadas de rizobios pertenecen a las

α -Proteobacterias, e integran mayoritariamente los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer* (*Sinorhizobium*) y *Azorhizobium* (Fabiano et al., 2023). Dentro de las α Proteobacterias, se encuentran los miembros de la familia *Rhizobiaceae*, que forman nódulos en raíces o tallos de plantas, donde son capaces de fijar nitrógeno atmosférico (Lindstorm y Mousavi, 2019).

La simbiosis entre rizobios y leguminosas comienza con una comunicación molecular entre la planta y la bacteria. La planta secreta moléculas fenólicas, predominantemente isoflavonoides y flavonoides a la rizósfera (Mus et al., 2016), y las bacterias perciben esa señal que genera la quimiotaxis y la activación del factor transcripcional *nodD*. A su vez, *nodD* activa a otros genes que participan en el proceso de nodulación, como *nodA*, *nodB* y *nodC* entre otros, principalmente responsables de la producción de lipoquitin-oligosacáridos (Moulin et al., 2004; Yang et al., 2022).

Los genes *nodABC* son considerados canónicos dado que son funcionalmente conservados en distintos rizobios, mientras que los otros genes *nod*, como en *E. meliloti* los son los genes *nodFEG*, *nodH* y *nodPQ*, son necesarios para el reconocimiento específico de la planta hospedera. A estos genes *nod* involucrados en la especificidad de la simbiosis se los considera específicos de hospedero (Debellé et al., 1996).

Los factores Nod son señales simbióticas indispensables para la interacción específica huésped-hospedero, que involucran el desarrollo de etapas del proceso de infección y organogénesis del nódulo (Oldroyd y Downie, 2008). Los factores Nod producidos por los diferentes rizobios comparten un esqueleto de N-acetilglucosamina con una cadena acilo en el extremo no reductor. Estos factores difieren en el largo de la cadena y la cantidad de insaturaciones, así como modificaciones de tipo glucosilaciones o sulfataciones que determinarán la especificidad con el hospedero (Downie, 2014). Los factores Nod son percibidos por la raíz de la planta por los receptores Nod (NFRs) tipo quinasa de dominio LysM (Mus et al., 2016). El reconocimiento de los factores Nod por las células de la epidermis radicular estimulan dos programas distintos pero relacionados que corresponden a la formación del hilo de infección y a la división celular en el córtex de la raíz que conduce a la organogénesis del nódulo (Yang et al., 2022).

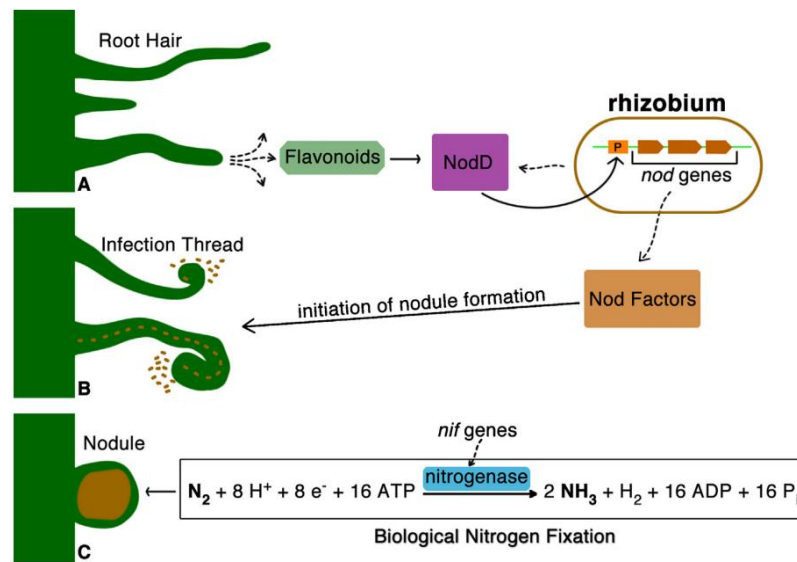


Figura 4. Quimiotaxis e inducción de nódulos en una raíz de leguminosa. **A.** Los flavonoides segregados por la planta inducen la expresión de los genes *nod* bacterianos, que producen los factores Nod. **B.** Los factores Nod promueven la iniciación de la formación del nódulo. **C.** En el nódulo maduro ocurre la fijación de nitrógeno. Tomada de Laranjo et al., 2014.

Los rizobios ingresan por la punta del pelo radicular deformado que engloba a un grupo de bacterias y da como resultado la formación del hilo de infección que libera bacterias endocitadas al citoplasma de células parenquimáticas según se representa en la Figura 4 (Ferguson et al., 2010). De esta forma las bacterias quedan rodeadas por una membrana derivada del hospedero, la membrana peribacteroidal, y se conforma lo que se conoce como simbiosoma (Udvardi y Day, 1997). En el simbiosoma las bacterias se diferencian en bacteroides mediante múltiples rondas de endoduplicación, cambian de forma, aumentan su tamaño (Kondorosi et al., 2013), y comienza la actividad de la enzima nitrogenasa para llevar a cabo la reducción de N_2 en NH_3 (Ferguson et al., 2010).

Los nódulos se pueden clasificar en dos tipos morfológicos definidos por la planta hospedera, los determinados y los indeterminados. Los nódulos indeterminados, de forma

cilíndrica o palmada presentan un meristemo apical persistente que produce continuamente células nuevas que son infectadas por bacterias. Una vez maduros, en este tipo de nódulos se han definido cuatro zonas: la zona I que corresponde al meristema, la zona II de infección, la interzona II-III con amiloplastos en sus células; la zona III donde ocurre la fijación de N₂ por los bacteroides y la zona IV senescente (Figura 5) (Ferguson et al., 2010; Yang et al., 2022). Los nódulos determinados se caracterizan por ser esféricos y carecer de meristemo persistente, además de no presentar un gradiente de desarrollo evidente. En la madurez contienen una población relativamente homogénea de bacteroides fijadores de nitrógeno, ya que la diferenciación de las células infectadas se produce sincrónicamente, seguida de la senescencia (Ferguson et al., 2010).

2.2 Simbiosis Ensifer - alfalfa

2.2.1. Grupo *Ensifer*

Las bacterias del género *Ensifer* (syn. *Sinorhizobium*) son α -Proteobacterias que pueden fijar nitrógeno en vida libre o asociados a raíces de leguminosas (Le Queré et al., 2017; Fagorzi et al., 2020), principalmente de los géneros *Medicago*, *Melilotus*, y *Trigonella* (Galardini et al., 2013).

Los anteriores géneros *Sinorhizobium* y *Ensifer* pasaron a integrar un solo género, *Ensifer*, basándose en la similitud de las secuencias de los genes *recA* y 16s ARNr de las cepas tipo (Willems et al., 2003; Young, 2003). Actualmente su nomenclatura está nuevamente en duda, dado que hay propuestas que recomiendan que se vuelvan a separar en dos géneros (Fagorzi et al., 2020).

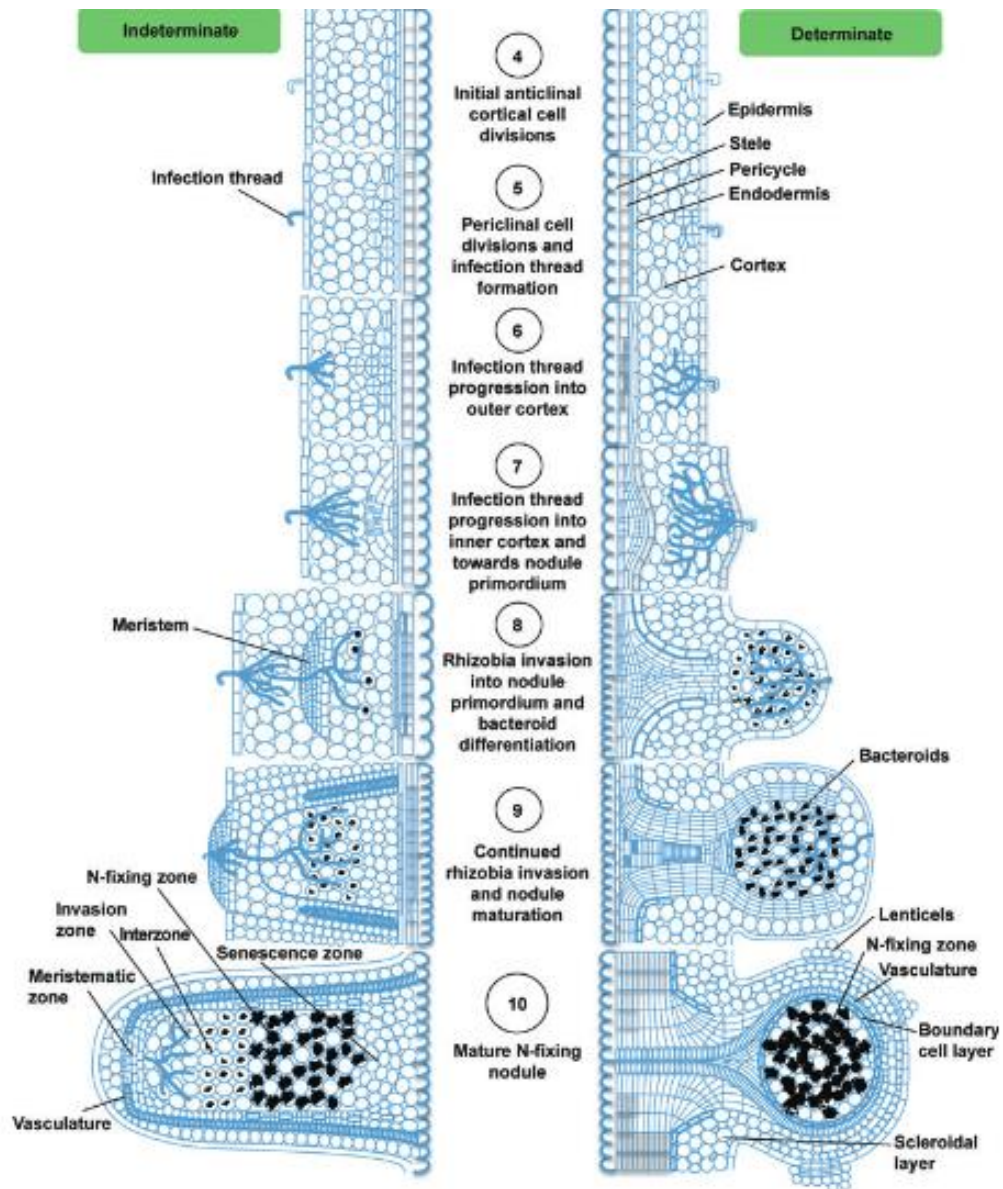


Figura 5. Esquema de la morfología de nódulos indeterminados y determinados.
Tomada de Ferguson et al., 2010.

A su vez, a partir de análisis fenotípicos, genómicos, y filogenéticos del género *Ensifer* se establecieron dos clados bien diferenciados, uno que incluye a especies no simbióticas y otro a especies simbióticas. Al clado que incluye especies no simbióticas pertenecen *E. morelense* y *E. adhaerens* (Di Cenzo et al., 2019). Al clado que incluye a las especies del género *Ensifer* simbióticas pertenecen *E. meliloti*, que se asocia a leguminosas del género *Medicago* adaptadas a suelos neutros y alcalinos, y *E. medicae* que lo hace con especies adaptadas a suelos ácidos (Garau et al., 2005; Ramírez-Bahena et al., 2015).

La genómica comparativa evidenció diferencias entre estos clados, que sugieren que la capacidad de fijar nitrógeno emergió en reiteradas ocasiones debido a eventos independientes de transferencia horizontal de genes. A su vez, la mayoría de las cepas del género que contaban con ambos grupos de genes, de nodulación *nodABC* y de fijación *nifHDK*, se encontraron en un único grupo monofilético (Fagorzi et al., 2020).

2.2.2 Alfalfa como leguminosa forrajera

Las leguminosas forrajeras son ampliamente utilizadas para el mejoramiento de praderas debido a su alto valor nutritivo. Su cultivo colabora en la alimentación animal, y generan aumento de la fertilidad de los suelos, aportan a la sostenibilidad de las rotaciones, reducen la erosión y tienen la capacidad de establecer simbiosis con microorganismos fijadores de nitrógeno (Rebuffo et al., 2006). En Uruguay, las principales leguminosas forrajeras cultivadas son la alfalfa (*M. sativa*), el trébol rojo y el trébol blanco (*Trifolium pratense* y *T. repens*), y distintas variedades de lotus (*Lotus corniculatus*, *L. uliginosus* y *L. subbiflorus*) (Fabiano et al., 2023).

La alfalfa (*M. sativa*) es una leguminosa forrajera de crecimiento perenne en clima templado y subtropical, y es el cultivo más antiguo utilizado para alimentación de ganado como forraje desde hace 3.300 años (Mielmann, 2013). Dado su alto valor nutricional (Michalczyk et al., 2019), esta leguminosa se encuentra entre las más cultivadas a nivel mundial, y Estados Unidos y Argentina son los países con mayor superficie destinada a este cultivo (Filho et al., 2023; Bouton, 2012). Por esto, la alfalfa es principalmente

utilizada como forraje, para producir heno y ensilado (Patra y Paul, 2019). Una característica interesante es la capacidad de extraer agua de capas profundas del suelo debido a su sistema radicular (Brown et al., 2003). Debido a las razones enumeradas, la alfalfa es considerada el cultivo de mayor calidad y estabilidad para la producción de forraje en comparación con el de otras leguminosas perennes (Mills et al., 2015).

En Uruguay, se cultivan 125.000 ha de alfalfa, con una siembra anual de 25.000 ha (DIEA-MGAP, 2022), que frecuentemente incluyen suelos con pH levemente ácido y altas concentraciones de Al^{+3} (Tabares da Rosa et al., 2019). Actualmente, el cultivar Chaná INIA es el más utilizado, y tanto éste como otros cultivares usados en Uruguay se inoculan según las recomendaciones del MGAP.

Dependiendo del cultivar y cepas utilizadas, la entrada de nitrógeno a los ecosistemas por la simbiosis alfalfa-rizobio puede situarse en los 210 kg de N. ha^{-1} . $año^{-1}$ (Wang et al., 2018). Sin embargo, los rendimientos pueden ser menores debido a la presencia de cepas parásitas tipo Oregon (Eardly et al., 1985), presentes principalmente en suelos ácidos. La presencia de estas cepas de *R. favelukesii* ha sido confirmada en suelos de Uruguay en el desarrollo del trabajo de esta tesis (Berais-Rubio et al., 2023).

3. Criterios usados para identificación y taxonomía de rizobios

Un método ampliamente utilizado en la identificación taxonómica de microorganismos es el análisis de la secuencia del gen 16S ARNr debido a su presencia en bacterias y arqueas (Gleaser et al., 2015). Como las secuencias de este gen son muy conservadas, pero combinan regiones variables, este marcador permite identificar microorganismos a nivel de género, pero generalmente no se logra establecer la especie (Menna et al., 2006). Por esto, tanto en la determinación de especies como en estudios filogenéticos es necesario usar otras aproximaciones. Una de ellas es la denominada *Multi Locus Sequence Analysis* (MLSA), un método genotípico de alta resolución que consiste en el análisis de secuencias, en conjunto y concatenadas, de genes que codifican para

proteínas con funciones conservadas (*housekeeping*) utilizados para estudiar filogenias y para establecer especie (Gleaser et al., 2015).

Estos genes *housekeeping*, entre los que se encuentran el *atpD* que codifica para la subunidad beta de la ATP sintasa, el *recA* que codifica para la recombinasa A, el *glnII* que codifica para la Glutamina sintetasa, y el *rpoB* que codifica para la subunidad beta de la ADN polimerasa bacteriana, entre otros, han sido analizados en *Rhizobium* sp. que nodulan trébol (Batista et al., 2015; Tartaglia et al., 2019), y en *Mesorhizobium* sp. y *Bradyrhizobium* sp. que nodulan lotus (Sotelo et al., 2011; Batista et al., 2015, Klepa et al., 2022).

Recientemente, dada la disponibilidad cada vez mayor de secuencias de genomas completos en repositorios públicos, la comparación de ellos es cada vez más factible debido al número cada vez mayor de especies y cepas de rizobios con secuencias. Este enfoque ha facilitado los análisis genómicos completos para ser usados tanto en estudios taxonómicos como evolutivos (Santamaría et al., 2017; Ormeño y Martínez-Romero, 2019). A partir de la comparación de genomas completos se han desarrollado distintas herramientas como el *Average Nucleotide Identity* (ANI, Goris et al., 2017), el *tetra correlation search* (TCS, JSpeciesWS; Ritcher et al., 2016) y el *Type Strain Genome Server* (TYGS, Meier-Kolthoff, 2019), así como la hibridación digital ADN-ADN (Klepa et al., 2022).

4. Inoculantes rizobianos

Los inoculantes rizobianos son biopreparados desarrollados industrialmente para el tratamiento de semillas que mantienen activas bacterias seleccionadas por su eficiencia para fijar nitrógeno en asociación con cultivos. El desarrollo de inoculantes rizobianos implica la selección de cepas, que deben cumplir con criterios relacionados a la eficiencia simbiótica, competitividad, persistencia, sobrevivencia, habilidad industrial e inteligencia ambiental (Xavier et al., 2004; Di Lorenzo et al., 2023).

El primer paso para la selección de cepas es su identificación (Figura 6). Para esto se utilizan técnicas basadas en la generación de *fingerprinting* mediante PCR utilizando

diferentes *primers* específicos, que generan patrones de bandas característicos. Entre ellos, se destacan por su uso frecuente los *primers* ERIC que amplifican secuencias consenso intergénicas repetitivas inicialmente identificadas en enterobacterias (Ranjbar et al., 2017), y BOX que amplifica secuencias repetitivas llamadas elementos *box* dispersos en regiones no codificantes a lo largo de los genomas bacterianos. Estos métodos tienen la ventaja de ser simples, precisos y de bajo costo (Van Belkum y Hermans, 2001).

Un paso siguiente en el desarrollo de inoculantes (Figura 6) es la evaluación de la eficiencia simbiótica de las cepas. La eficiencia simbiótica se estimada a través de la biomasa aérea de la planta producida en un corte o acumulada en distintos cortes (Irisarri et al., 2019). Inicialmente este parámetro se determina en condiciones controladas para realizar el *screening* de cepas, pero necesariamente la cepa tiene que ser probada en condiciones de campo, preferentemente en suelos con características similares a los suelos objetivo donde vaya a ser usada como inoculante. También es considerado como un parámetro de eficiencia simbiótica la cantidad de nitrógeno fijado y la cantidad de nitrógeno total de la planta (Irisarri et al., 2019).

Durante más de 70 años, el isótopo estable ^{15}N ha sido ampliamente utilizado para determinar la fijación de nitrógeno por nitrogenasas purificadas, cultivos microbianos y plantas, con el objetivo de estimar la contribución de la FBN en la nutrición vegetal (Chalk y Craswell, 2017). Actualmente, la técnica más utilizada se basa en la medición de la abundancia natural de ^{15}N , cuyo valor $\delta^{15}\text{N}$ en el aire se considera igual a 0 ‰. Para realizar esta estimación, se requiere el uso de una planta de referencia no fijadora que solo obtiene nitrógeno del *pool* del suelo, el cual está enriquecido en ^{15}N en comparación con el aire (con valores de $\delta^{15}\text{N}$ mayores a 0 ‰).

Las leguminosas en simbiosis con rizobios, además de absorber nitrógeno del suelo lo obtienen también del aire, por lo que, la estimación de la FBN se puede realizar utilizando la siguiente fórmula:

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

En esta fórmula, el valor B corresponde al fraccionamiento de nitrógeno que ocurre en la planta después de la FBN (Unkovich y Pate, 2000).

Otro aspecto al que cada vez se le presta más atención en el desarrollo de inoculantes es la capacidad de la cepa de ocupar nódulos en la leguminosa hospedadora, respecto a los rizobios presentes en el suelo (Batista et al., 2015; Gutiérrez, 2017). Así se ha planteado como parte de la estrategia de selección de inoculantes evaluar la competitividad de la cepa (Figura 6). Para esto, se usa habitualmente el marcaje de la cepa en cuestión con genes reporteros como *gusA*, que permite la identificación de los nódulos ocupados por ella mediante visualización directa (Irisarri et al., 2019).

El marcaje con el gen reportero *gusA* se realiza mediante conjugación, en la que se transfiere a la cepa de interés el gen *gusA* que codifica para la enzima β -glucuronidasa. Esta enzima convierte el ácido 5-bromo-6-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido en cloro bromo-indigo y ácido glucurónico, donde el cloro bromo-indigo dimeriza para producir la coloración azul del nódulo ocupado por la cepa marcada (Wilson et al., 1995). Como los nódulos pueden estar co-ocupados, es decir ocupados por más de una cepa (Checcucci et al., 2016), esto puede traer como consecuencia variaciones en la estimación de la ocupación, ya que es imposible con esta técnica distinguir nódulos co-ocupados de aquellos ocupados solamente por la cepa marcada.

También se puede usar para la determinación de ocupación y coocupación de nódulos el marcaje con GFP (*Green Fluorescence Protein*) o con RFP (*Red Fluorescence Protein*), pero para cualquiera de ellos se requiere el uso de microscopio de fluorescencia (Mendoza Suárez et al., 2020).

Otra característica de las cepas a ser usadas como inoculantes que puede ser considerada, es la persistencia. Esta característica hace referencia a la capacidad de la cepa de mantenerse a lo largo del tiempo en el suelo en el que se usó como inoculante, y está relacionada con la competencia saprofítica y la sobrevivencia frente a diferentes tipos de estrés biótico y abiótico a los que se encuentra expuesta (Howieson y Dilworth, 2016).

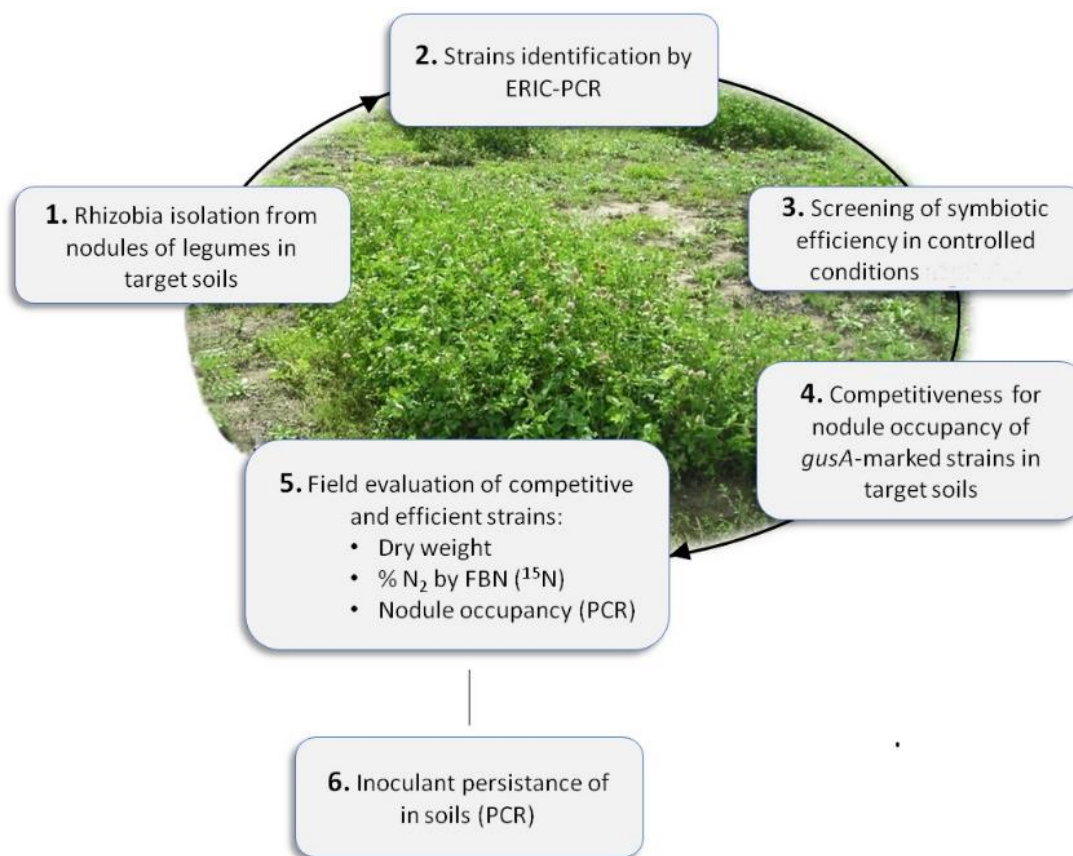


Figura 6. Resumen de una estrategia usada para la selección de inoculantes eficientes y competitivos. **1.** Aislamiento de rizobios de nódulos de plantas crecidas en suelos objetivo. **2.** Identificación de las cepas mediante *fingerprinting*. **3.** Evaluación de los aislamientos según su eficiencia simbiótica en condiciones controladas. **4.** Marcaje de la cepa para establecer su competitividad con rizobios presentes en los suelos problema. **5.** Evaluación a campo a través de la materia seca, % de nitrógeno fijado y ocupación de nódulos. **6.** Persistencia del inoculante en el suelo a lo largo del tiempo. Tomada de Fabiano et al., 2023.

Respecto a la habilidad industrial, la cepa seleccionada debe poder crecer en los sustratos usados en la fabricación de inoculantes, y lograr un crecimiento adecuado sin formar grumos en fermentadores de gran volumen. Además, en los últimos años se ha puesto atención a que las cepas usadas como inoculantes sean “inteligentes” desde el

punto de vista ambiental, y no desnitrifiquen. Si la cepa seleccionada tiene la capacidad de desnitrificar, como se ha reportado en cepas de *Ensifer* y *Bradyrhizobium* (Torres et al., 2014), su uso puede tener consecuencias económicas y ecológicas no deseadas derivadas de la pérdida de nitrógeno del suelo y la generación de gases de efecto invernadero como el N₂O, con mayor potencial de efecto invernadero que el CO₂ (Pacheco et al., 2023).

En Uruguay, los distintos cultivares de alfalfa se inocularon entre 1964 y 1990 con la cepa U45 de *E. meliloti*, aislada de *Melilotus sp.*, y posteriormente, entre 1991 y 2003, con una mezcla de las cepas U137 y U143 de *E. meliloti*, aislada de *M. sativa* cultivada en suelos de Uruguay. Desde 2004, U143 es la única cepa autorizada para emplearse en la elaboración del inoculante comercial (Altier et al., 2013), donde esta leguminosa se cultiva mayormente en suelos ácidos con un rango de pH entre 5.5 -5.7 (Tabares et al., 2019). Los cultivos de alfalfa inoculados con la cepa U143 demostraron incrementos del 50 % en la producción de biomasa (Rebuffo et al., 2000). A su vez, Racca et al. (2013) reportaron para este par simbiótico incrementos de 240 % más de biomasa en la primera cosecha, y 80% más de biomasa total; con un 70% del nitrógeno proveniente de la FBN.

5. Cepas parásitas tipo Oregón

En Estados Unidos en 1982, Eardly et al. (1985) identificaron cepas ineficientes-parásitas de alfalfa, aisladas de nódulos de esta leguminosa cultivada en suelos levemente ácidos (pH 5.5 - 5.7). Estas cepas, denominadas tipo Oregón por su origen, nodulan a *M. sativa* y a *Phaseolus vulgaris*, pero en ellos fijan menos nitrógeno que otros microsimbiontes específicos (Eardly et al., 2022). La presencia de estos rizobios parásitos, que se caracterizan por ser ácido-tolerantes (Eardly et al., 1992; Del Papa et al., 1999), ha sido confirmada en Estados Unidos y Canadá (Bromfield et al., 2010). En Argentina también se confirmó la presencia de este tipo de cepas, y describieron la nueva especie *R. favelukesii* cuya cepa tipo es LPU83 (Torres Tejerizo et al., 2016).

Estas cepas tipo Oregon, se caracterizan por su competitividad en suelos ácidos y baja eficiencia simbiótica en alfalfa (Del Papa et al., 2003; Torres Tejerizo et al., 2011;

Eardly et al., 2022), lo que constituye un riesgo potencial para la producción de esta leguminosa (Nilsson et al., 2019), incluso cuando se encuentran coexistiendo con el simbionte eficiente *E. meliloti*. En Uruguay, en suelos de la Cuenca Lechera había sido propuesta la existencia de cepas tipo Oregon (Castro-Sowinsky et al., 2002), y en esta tesis se confirmó su presencia en esos suelos ácidos (Berais-Rubio et al., 2023).

6. Peptidasas HrrP y SapA involucradas en la ineficiencia simbiótica

El mecanismo por el cual las cepas ineficientes-parásitas no fijan nitrógeno aún no está claro. En el sistema *E. meliloti* - *M. truncatula*, donde se identificaron cepas ineficientes, se planteó como una posible explicación la presencia de peptidasas rizobianas que afectaban negativamente la comunicación simbiótica (Price et al., 2015). Previamente, Crook et al. (2012) demostraron que las cepas ineficientes de *E. meliloti* tenían la capacidad de ganar compatibilidad cuando perdían un plásmido accesorio denominado plásmido HR (*Host Range*), mientras que las cepas eficientes se transformaban en ineficientes cuando adquirían ese plásmido. El plásmido HR lleva el gen *hrrP* (*host range restriction Peptidase*) que codifica para una metalopeptidasa tipo M16 capaz de hidrolizar péptidos nódulo-específicos ricos en cisteína producidos por la planta. Alrededor del 10% de los aislamientos de *Ensifer* reportados presentaban este plásmido accesorio (Price et al., 2015).

Las peptidasas que pertenecen a la familia M16 integran una de las clases de peptidasas más abundantes encontradas en eucariotas, bacterias y arqueas (Rawlings et al., 2010). Estas enzimas son dependientes de zinc, tienen un motivo HXXEH (Becker y Roth, 1992), y su función principal es la degradación de un amplio espectro de péptidos. Las peptidasas tipo M16 se agrupan en tres subfamilias: M16A, M16B y M16C de acuerdo con sus estructuras primarias, y sus estructuras cuaternarias pueden formar distintos dominios estructurales (Muruyama et al., 2011).

Los péptidos nódulo-específicos ricos en cisteína (NCRs) están involucrados en la diferenciación de los bacteroides, la cual es irreversible porque los hace incapaces de

reanudar la proliferación celular y volver al estilo de vida libre (Mergaert et al., 2006). Las leguminosas pertenecientes al IRLC poseen un gran número de genes que codifican para estos péptidos, y en *M. truncatula* se ha reportado la existencia de más de 600 de ellos (Zhou et al., 2013). Generalmente estos péptidos NCRs, compuestos por 30-50 aminoácidos de los cuales 4-6 residuos de cisteína están conservados, participan en distintas etapas del desarrollo de las células simbióticas, y presentan similitudes con defensinas catiónicas antimicrobianas (Alumni et al., 2007). Hórvath et al. (2015) reportaron que uno de estos péptidos, el NCR169, es indispensable para la diferenciación de las bacterias en bacteroides en el nódulo y que mutantes *knockout* de *M. truncatula* para NCR169 no inducían la diferenciación en bacteroides, sugiriendo que este péptido tiene una participación clave en la comunicación simbiótica.

La peptidasa HrrP reportada por Price et al. (2015) tiene la capacidad de digerir un rango de NCRs, entre los que se encuentra el péptido NCR169, cuya digestión es directamente responsable de la ineficiencia de *E. meliloti* en *M. truncatula*. Esta peptidasa es codificada en un plásmido accesorio, a diferencia de SapA, otra peptidasa M16 homodimérica reportada la cual es codificada en el cromosoma, por lo que es más conservada en rizobios. También participa en la modulación de la simbiosis en el sistema *E. meliloti* - *M. truncatula* de forma menos agresiva que lo reportado con la HrrP, aunque cuando se sobreexpresa este gen genera un decaimiento en el bienestar del hospedero, como se observa en la Figura 7 (Benedict et al., 2021).

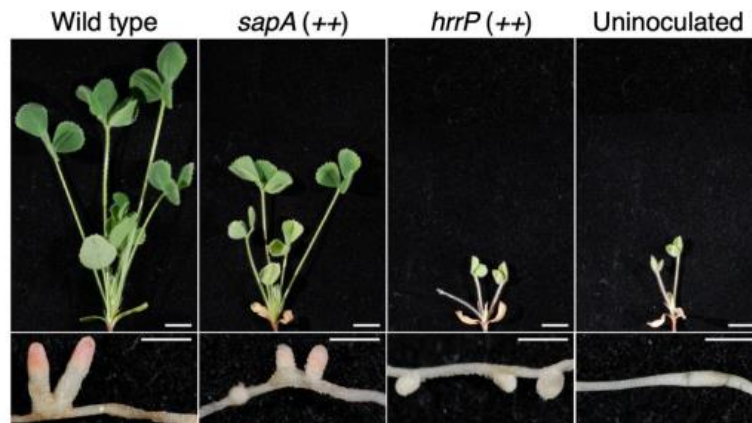


Figura 7. Efecto de la sobreexpresión de genes *hrrP* y *sapA* sobre la eficiencia simbiótica y la morfología nodular de *M. truncatula*. Los controles corresponden a la cepa salvaje (izquierda) y sin inocular (derecha). Tomada de Benedict et al., 2021.

Objetivos

Objetivo general

Partiendo de la hipótesis de que en suelos levemente ácidos de la Cuenca Lechera existen poblaciones eficientes mejor adaptadas a los suelos que el inoculante comercial, y que a su vez compiten con cepas parásitas se planteó como objetivo general de la tesis mejorar la sostenibilidad de los sistemas de producción de alfalfa. Para esto, se proponen los siguientes objetivos específicos.

Objetivos específicos

1) Caracterizar cepas de colecciones según su eficiencia simbiótica y seleccionar cepas promisorias para el desarrollo de un inoculante rizobiano de alfalfa apto para suelos ácidos.

2) Caracterizar genómicamente la cepa U143, utilizada como inoculante comercial de alfalfa.

3) Establecer la presencia de cepas parásitas tipo Oregon en suelos ácidos de la Cuenca Lechera.

4) Identificar en las cepas tipo Oregon la presencia de secuencias que codifiquen para peptidasas M16 que puedan explicar su comportamiento parásito.

Materiales y métodos

1. Material vegetal y condiciones de crecimiento

Como hospedero se usó *Medicago sativa* cv. Chaná (INIA), cuyas semillas fueron suministradas por la Ing. Mónica Rebuffo (INIA La Estanzuela) y Rafael Reyno (INIA Tacuarembó). Las semillas se esterilizaron superficialmente mediante un pasaje por alcohol 96% (v/v) durante 1 min, un lavado con agua estéril y 4 min en una solución de NaClO comercial en agua al 4% (v/v), seguido de 4 lavados con agua estéril, el último de 30 min. Luego se enjuagaron nuevamente en agua estéril y se transfirieron a placas de Petri con agar-agua 0.8% (p/v) estéril. Allí germinaron a 23 °C durante 1 día, hasta alcanzar una radícula de aproximadamente 3 mm (Irisarri et al., 2019). Las plantas crecieron en condiciones controladas a 23/20 °C (día/noche), con un fotoperíodo de 16/8 h y una densidad de flujo de fotones de 220 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Para evaluar la eficiencia simbiótica, competitividad y efectividad simbiótica relativa las plántulas se sembraron en macetas de 350 mL con arena-vermiculita (1:1) estéril. Las plantas se regaron con medio Fahraeus y agua estéril de forma alterna. El medio Fahraeus está compuesto por 0.08 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.06 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.06 g de NaCl, 0.2 g de K_2HPO_4 , 0.17 g de $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$, 0.005 g de citrato férrico, y 1 mL de solución de micronutrientes, en 1 L de agua desionizada (Vincent, 1970). Para los ensayos realizados a pH 5.5 se usó MES 10 mM, mientras que para los realizados a pH 6.2 no se usó buffer. La inoculación de las semillas se realizó como se describe en cada ensayo.

El tiempo de nodulación se evaluó en tubos con 20 mL de medio Jensen (Jensen, 1942) sin nitrógeno.

2. Bacterias y condiciones de crecimiento

Los rizobios utilizados proceden de colecciones de la Universidad de la Plata (Argentina) - Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (UNP-IIBCE), del Departamento de Agricultura de EE. UU. (USDA), y del Laboratorio de Microbiología del MGAP (Cuadro 1). Los rizobios procedentes de suelos levemente ácidos de la Cuenca Lechera del sur del Uruguay (Cuadro 2) integran la colección del Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Agronomía – INIA (Fagro-INIA), obtenidos en el marco del Proyecto FMV-135695.

Las cepas de rizobios ácido tolerantes (pH 5.2) aislados de nódulos de plantas de *M. sativa* del Uruguay (Cuadro 2) fueron obtenidos de la colección del Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Uruguay. Como referencia se utilizaron a las cepas Or191 de Oregon, USA (Eardly et al., 1985), y LPU83, de Argentina (Torres-Tejerizo et al., 2016), pertenecientes a la especie *R. favelukesii*. El inoculante comercial de alfalfa, *Ensifer meliloti* U143 (Altier et al., 2013), fue obtenido del Laboratorio de Microbiología del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca.

Las cepas de *R. favelukesii* y *E. meliloti* se crecieron en medio YEM (Vincent, 1970) a 28 °C *overnight*.

Cuadro 1. Cepas procedentes de colecciones nacionales e internacionales.

Cepa	Colección	Referencias
B399, LPU 63, LPU83, Or191	Universidad de la Plata, Argentina.	Del Papa et al., 2003, Torres Tejerizo et al., 2016, Eardly et al., 1985.
CE143, CE20, CE21, CE31, CE56, CE143	Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Uruguay.	Castro – Sowinski et al. 2002.
1952, 1955, 1956, 1957, 1958,	Departamento de Agricultura de Estados	

1959, 1960, 1961, 6701	Unidos.	
U105, U113, U117, U125, U141, U143, U144, U149	Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP), Uruguay.	Labandera et al., 1982.

Cuadro 2. Cepas obtenidas a partir de nódulos de plantas trampa de alfalfa crecidas en suelos de la Cuenca Lechera del Uruguay.

Cepa	Lugar y sitio de colecta del suelo	pH del suelo*
G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7, G8, G9, G10, ORY2, ORY5	Colonia, La Estanzuela Predio Ganadero	5.2 - 5.8
L1, L2, L3, L4, L5, L7, L8, L9, L10, L11, L12, L13, L14, ORY4	Colonia, La Estanzuela Predio Lechero	5.3 - 6.2
O1, O2, O3, O4, O5, O6, O7, O8, O9	Colonia, La Estanzuela Predio Ovino	5.5 - 5.9
S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9, S10, S11, S12, ORY1	Colonia, La Estanzuela Predio Semillas	5.3 - 6.3
CA1, CA2, CA3	Canelones, Paso del Bote	5.7 - 6.0
SJ1, SJ2, SJ3	San José, Rincón del Pino y Paso Belistiqui	5.7 - 6.0
FL1, FL2, FL3, FL4, FL5, ORY3	Florida, Colonia 33 Orientales y Puntas de Chamizo	5.5 - 6.5

*Rango de pH determinado en distintos puntos de cada sitio.

Para evaluar la competitividad de la cepa parásita ORY1, se la marcó con el gen reportero *gusA* y se obtuvo el transconjugante ORY1::*gusA*. Como donador se usó la cepa S17-1 *λpir* de *Escherichia coli* que contiene el plásmido pCAM131 con el transposón mTn5SSgusA31 (Wilson et al., 1995).

Los rizobios crecieron en medio YEM (Vincent, 1970) a 27 °C y *E. coli* en LB (Miller, 1972) con Espectinomicina (Sp) 100 µg/mL a 37 °C. Los transconjugantes ORY1::*gusA* crecieron en medio YEM Sp 100 µg/mL. Los medios se solidificaron con agar 16 g/L y cuando se usaron medios líquidos se agitaron a 120 rpm en agitador orbital. Para la preparación de los inoculantes las cepas crecieron hasta una $DO_{600} = 0.8$, se lavaron según Irisarri et al., (2019), y las semillas se inocularon a razón de 100 µl cada una. Cuando las plantas se cultivaron en tubos la inoculación fue de 100 µl por tubo

Los rizobios y el transconjugante ORY1::*gusA* se conservaron en YEM y LB agar, con Sp cuando correspondió, a 4 °C, y en los respectivos medios líquidos con glicerol 60% (v/v) a -80 °C.

3. Eficiencia simbiótica a pH 5.5

La eficiencia de las cepas de los diferentes orígenes se evaluó previo a este trabajo a pH 6.2, según consta en la colección de cepas Fagro-INIA. Las tres cepas seleccionadas como promisorias por su producción de biomasa (CA1, L14 y S8) se evaluaron a pH 5.5. Para esto se usó solución de riego Farehus pH 5.5 ajustado con *buffer* MES 10 mM. Como controles se usaron los tratamientos: inoculado con U143, sin inocular con nitrógeno (KNO_3 10 mM), y sin inocular libre de nitrógeno. Cada tratamiento incluyó 5 macetas, con 5 plantas cada una. Las semillas se inocularon como se indicó anteriormente el mismo día que se sembraron en arena-vermiculita (1:1), y la biomasa aérea se determinó como el peso seco acumulado en dos cortes, realizados a los 30 y 50 días después de la siembra. Para determinar el peso seco, el material vegetal se secó a 60 °C durante 72 h.

4. Efectividad simbiótica relativa ORY respecto a U143

Las semillas se sembraron a razón de 5 por maceta y se inocularon individualmente con las cepas ORY1 y U143. Cada tratamiento incluyó 4 réplicas. Las plantas se cosecharon a los 35 días y la efectividad simbiótica relativa (%) se estimó como peso seco de la parte

aérea producida por plantas inoculadas con la cepa ORY1, respecto a la producida por plantas inoculadas con la cepa U143.

5. Capacidad de respirar nitrato

La habilidad de la cepa U143 de *E. meliloti* de respirar NO_3^- se determinó según Bueno et al. (2009). La cepa creció en medio YEM hasta una DO_{600} aprox. de 0.8, se lavó mediante centrifugado de 20 mL que se suspendieron en 5 mL del mismo medio. Esa suspensión se usó para inocular tubos de 17 mL con tapón de rosca que contenían YEM suplementado con KNO_3 10 mM hasta una DO_{600} aprox. 0.3 - 0.5. Para crecimiento anaeróbico los tubos se llenaron hasta la mitad del cuello y permanecieron sin agitación, y el control en medio aeróbico se realizó en los mismos tubos con 3 mL de medio, en agitación orbital 120 rpm, ambos a 30 °C. La DO_{600} se leyó cada 24 h durante 7 días.

6. Marcaje con el gen reportero *gusA*

La conjugación se realizó utilizando la cepa ORY1 de *R. favelukesii* como receptor, y *E. coli* S17-1 Δpir como donador, siguiendo las indicaciones del protocolo descrito en Batista et al., (2015). La mezcla donador - receptor permaneció a 28 °C *overnight*, en placa de TY (Beringer, 1974). Los transconjugantes fueron seleccionados en placas con YEM Sp 100 $\mu\text{g/mL}$ y Nitrofurantoína (Nft) 20 $\mu\text{g/mL}$, este último antibiótico para inhibir el crecimiento de *E. coli*.

7. Evaluación del tiempo de nodulación de transconjugantes

En cada tubo con medio Jensen se sembró una semilla pregerminada que se inoculó con 100 μL de una suspensión bacteriana de transconjugantes ORY::*gusA*, con

DO₆₀₀ = 0.9 (10⁸ ufc/ mL). De cada transconjugante (ORY1::*gusA*, ORY2::*gusA*, ORY3::*gusA*) se hicieron 8 repeticiones para determinar, respecto a la cepa parental, el tiempo de aparición del primer nódulo y el número de nódulos a los 21 días. Se seleccionó el clon ORY1::*gusA* para los ensayos de competencia.

8. Actividad Gus en nódulos de alfalfa

Las raíces noduladas se lavaron con agua destilada y *buffer* bifosfato de sodio 0.1 M pH=7. Seguidamente se incubaron 16 h a 37 °C en oscuridad con una solución de SDS 1% (p/v), EDTA 0.5 M pH=8 y 1 mM 5-bromo-4-cloro-3indolil-b-D-glucuronido (X-gluc) en 50 mM de *buffer* fosfato de sodio pH=7.5 (Wilson et al., 1995). Los nódulos ocupados por ORY1::*gusA* se identificaron visualmente por tinción azul, en contraste con los que estaban infectados por cepas sin marcar por lo que permanecieron sin tinción (Irisarri et al., 2019).

9. Competitividad y producción de biomasa

Las cepas ORY1::*gusA* y U143 se crecieron en medio YEM hasta alcanzar una OD₆₀₀=0.9. Se mezclaron en relación 99:1 y 1:99 (ORY1::*gusA* y U143) a los que se llamó tratamientos 99% y 1%, respectivamente. La concentración bacteriana fue determinada de acuerdo con Riviezzi et al. (2020). Las semillas pregerminadas se sembraron a razón de 5 por maceta con arena-vermiculita (1:1), con 4 repeticiones por tratamiento. Se realizaron tres ensayos independientes y las 12 repeticiones resultantes se consideraron para el análisis estadístico. Las macetas fueron regadas con agua destilada o con medio Fahraeus pH=5.5 como se describió anteriormente.

Las plantas fueron cosechadas a los 21 días después de la inoculación y los nódulos lavados fueron teñidos como se describió en la sección 8. Para evaluar la eficiencia simbiótica se determinó la producción de biomasa como peso seco de la parte aérea, incluyendo la de los dos controles (inoculado con la cepa U143 y sin inocular).

10. Determinación de nitrógeno proveniente de la atmósfera

La fijación biológica de nitrógeno se estimó por determinación de la abundancia natural de ^{15}N de acuerdo con Unkovich et al. (2010), basado en el hecho de que la composición isotópica de N se determina [$\delta^{15}\text{N} = ((^{15}\text{N}/^{14}\text{N} \text{ muestra})/(^{15}\text{N}/^{14}\text{N} \text{ standard}) - 1) \times 1000$] (Högberg, 1997). Las semillas de *M. sativa* cv. Chaná con y sin inocular con la cepa U143 se sembraron en parcelas de 1,5 x 5 m en un suelo vertisol con pH = 5,6 (en agua) con cuatro réplicas por tratamiento. La parte aérea se cosechó 6 meses después de la siembra. El análisis isotópico fue realizado según Irisarri et al., (2019).

11. Extracción de ADN genómico y electroforesis en gel de agarosa

El ADN genómico de rizobios se extrajo según dos procedimientos:

11.1 Lisado celular (Rivas et al., 2001). Para esto, colonias frescas se suspendieron en 1 mL de NaCl 0.85 % (p/v), se centrifugó 10 min a 10.000 rpm, el *pellet* se resuspendió en 400 μL de agua destilada estéril, se llevó a 100 °C durante 10 min en *termoblock* y se enfrió a -20 °C 30 min.

11.2 DNA Extraction kit (Qiagen, Alemania). La calidad y concentración del ADN extraído se determinó con Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA), y su integridad fue visualizada se separó en geles de agarosa.

El ADN se visualizó en transiluminador UV, y se separó en geles de agarosa 1.2 % en buffer Tris-acetato-EDTA (TAE) pH=8.2 (Sambrook et al., 1989). Los geles se tiñeron con SYBR Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific, USA). Como marcador de peso molecular se utilizó el Accuruler 1kb DNA Ladder (Maestrogen Inc, Taiwan). Las electroforesis se realizaron a 100 V (10 V/cm).

12. Amplificación del gen del 16S ARNr

Se amplificó una región parcial del gen 16S ARNr con los cebadores 27f (5'-AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTCA-3') y 1525r (5'-AGGAGGTGATCCAGCC-3') según Lane (1991). Los productos amplificados por PCR se resolvieron en geles de agarosa. La purificación del producto de PCR y su secuenciación se realizó en MacroGen Inc. (Korea).

13. Perfiles ERIC y BOX

Los perfiles ERIC se generaron según De Bruijn (1992), con los cebadores:

ERIC1: 5' ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC - 3'

ERIC2: 5' - AAGTAAGTGAAGGGGTGAGCG - 3'

Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización a 95 °C 5 min y 30 ciclos de: desnaturalización 94 °C 1 min, *annealing* 52 °C 1 min, extensión 65 °C 6 min y una extensión final a 65 °C 16 min.

Los perfiles BOX se generaron con el cebador BOXA1 (Koeuth et al., 1995). Las condiciones de amplificación utilizadas fueron: 1 ciclo de 2 min a 95 °C; 30 ciclos de 45 seg a 93 °C, 1 min a 50 °C y 6 min a 65 °C; y una extensión final de 8 min a 68°C.

Los productos de PCR se resolvieron como se describió en el apartado anterior.

14. Secuenciación de genomas

La secuenciación del genoma de *R. favelukesii* ORY1 se realizó con la plataforma Illumina Technology (MacroGen Inc., Korea), con un rendimiento de 11.1 millones de *paired-ended reads* de 151 pb de largo. Los *reads* de baja calidad se filtraron con el software Trimmomatic con parámetros 2:30:10 LEADING:3TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:4 :15 MINLEN:75 (Bolger et al., 2014). Se utilizó el *software* SPAdes para llevar a cabo el ensamblaje *de novo* (Bankevich et al., 2012). La calidad del ensamblaje se evaluó con el *software* QUAST con el genoma de *R. favelukesii* LPU83 como referencia (Gurevich et al.,

2013). Los *contigs* plasmídicos se detectaron con el *software* *plasmid* (Gimenez et al., 2022), utilizando la opción - *minidist* y los plásmidos de la cepa LPU83 como base de datos de referencia. La anotación del genoma se realizó utilizando el *software* *prokka* con parámetros por defecto (Seemann, 2014). El cálculo del *Average Nucleotide Identity* (ANI) (Goris et al. 2007), de los índices de correlación de firmas de tetranucleótidos y la búsqueda de correlación tetra (TCS) se realizaron utilizando el *software* *JSpeciesWSserver* (Richter et al., 2016). Los datos de la secuencia del genoma se subieron al Type Genome Server (TYGS), para realizar un análisis taxonómico de genoma completo (Meier-Kolthoff and Göker, 2019).

La construcción de la librería y la secuenciación del genoma de la cepa U143 de *E. meliloti* se realizó con el sistema Illumina PE (2x151) en Mr. DNA (Texas,USA). La calidad de los *reads* se inspeccionó visualmente utilizando *fastQC* (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), mientras que el control de calidad y el adaptador de *trimming* se realizó utilizando el *software* *Trimmomatic* v0.39 (Bolger et al 2014). Para descartar potenciales contaminantes se utilizó BLAST (Altschul et al 1990). El ensamblaje *de novo* de los *reads* se realizó con el *software* *Unicycler* v0.4.7 (Wick et al 2017) el cual funciona como un optimizador del SPAdes (Bankevich et al 2012). Los *contigs* generados fueron sujetos al *scaffolding* con *sspace* v2.0 (Boetzer et al 2011). Después de esto, la evaluación de la completitud del ensamblaje se realizó utilizando BUSCO v5.1.2, con un dataset 'bacteria_odb10'. Las estadísticas del ensamblaje se estimaron utilizando *quast* v5.0.2 (Gurevich et al. 2013). La anotación del genoma se llevó a cabo utilizando dos softwares, *Prokka* bacterial genome annotation tool (Seemann, 2014) y *Rapid Annotation Using Subsystem Technology* (RAST) (Aziz et al., 2008; Overbeek et al., 2014). Los *scaffolds* obtenidos se compararon con los genomas de referencia de otras especies (*E. meliloti* 2011, disponible en NCBI RefSeq bajo la ID GCF_000346065.1), y el ensamblaje completo de *S. meliloti* WSM1022 (Baxter et al 2021, disponible en NCBI y ID GCA_013315775.1), en orden de clasificar los *scaffolds* como cromosómicos o plasmídicos.

15. Análisis filogenéticos

Las secuencias de los genes simbióticos *nifH*, *nifD*, *nifK*, *nodA*, *nodB* y *nodD* se extrajeron del genoma de ORY1. Se compararon las secuencias obtenidas con secuencias disponibles de cepas de referencia en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Las secuencias se alinearon con el algoritmo ClustalW para posteriormente generar los árboles filogenéticos de tipo *Maximum likelihood* (Tamura and Nei, 1993) para cada *MultiLocus Sequence Analysis* (MLSA). Los alineamientos y los árboles se construyeron con el *software* MEGA 11 (Tamura et al., 2021). El soporte estadístico para los nodos de los árboles se evaluó por análisis de Bootstrap utilizando 1000 réplicas (Felsenstein, 1985).

El análisis de relacionamiento genómico de la cepa U143 de *E. meliloti* se realizó utilizando la ANI determinada con los algoritmos BLASTn (ANIb) y MUMmer (ANIm). Los índices de correlación de tetranucleótidos (TETRA), y la búsqueda de correlación tetra (TCS) se obtuvieron con el JSpeciesWS *server* (Ritcher et al., 2015). La información de la secuencia del genoma se subió al Type Genome Server (TYGS) para realizar un análisis taxonómico basado en genomas completos (Meier-Kolthoff, 2019) donde se analizó la dDDH (*digital DNA-DNA Hybridization*).

16. Números de acceso de secuencias nucleotídicas

Los números de acceso de GenBank para las secuencias parciales del gen del ARNr 16s usadas en los análisis filogenéticos son: *R. favelukesii* ORY1 (OP294988), ORY2 (OP294989), ORY3 (OP294990), ORY4 (OP294991), ORY5 (OP294992), Or191 (EU928874.1), *Rhizobium anhuiense* PVPR1(MT476932.1), *Rhizobium indigoferae* NAC94(MK872365.1), *Bradyrhizobium yuanmingense* VAFW14 (LC585439.1), *Rhizobium croatiense* 9T (MK753104.1), *Rhizobium altiplani* BR 10423 (NR 152084.1), *Rhizobium tibeticum* CCBAU85039 (NR116254.1) and *S. meliloti* 2011 (CP004140.1).

Los números de acceso de GenBank para los genomas y las secuencias plasmídicas de donde los genes simbióticos y algunas secuencias parciales del ARNr 16S se extrajeron son: *R. favelukesii* ORY1 (JAIRAY000000000.1); LPU83 (HG916852.1) y Or191 (GCA_000419725.1); *R. tibeticum* CCBAU85039 (GCF_900108425.1); *R. altiplani* BR 10423 (GCA001542405.1); *Rhizobium grahamii* BG7 (CP043498.1); y *S. meliloti* 2011 (CP004140.1); *Rhizobium tropici* CIAT 899 (NC 020061.1); *Rhizobium esperanzae* N561 (CP013501.1); *Rhizobium phaseoli* R650 (CP013533.1); *Rhizobium gallicum* sp. R602 (CP006878.1); *Rhizobium etli* NXC12 (CP020907.1). El número de acceso para el borrador del genoma completo de *E. meliloti* U143 es PRJNA967351.

17. Identificación de Peptidasas M16 plasmídicas

La secuencia aminoacídica de la peptidasa HrrP de *E. meliloti* USDA1963 se obtuvo de la base de datos de proteínas de referencia del NCBI y fue utilizada para detectar sus dominios con el servidor Pfam (Bateman et al., 2004). Los modelos ocultos de Markov (HMM) de las peptidasas M16 (PF00675) y M16_C (PF05193) se descargaron de dicho servidor. Para evaluar la presencia de potenciales peptidasas en los plásmidos obtenidos del género *Rhizobium*, se descargaron 461 plásmidos de la base de datos PLSDB (V. 2021_06_23_v2) (Galata et al., 2019). Todas las proteínas codificadas se predijeron utilizando el *software* prokka.

El *software* HMMER 3.0 se usó para buscar dominios de tipo peptidasa M16 utilizando la opción -cut_ga como umbral de filtrado (Eddy, 2011). Todas las proteínas predichas agruparon con un 98% de identidad mediante el *software* CD-HIT para reducir la redundancia de secuencias (Fu et al., 2012). Las peptidasas M16 predichas en *R. favelukesii* se agregaron al análisis filogenético. Las secuencias (disponibles en: <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.21641816.v1>) se alinearon usando el algoritmo MUSCLE, a través del paquete msa de R (Bodenhofer et al., 2015). Los árboles filogenéticos se computaron con el algoritmo *neighbor-joining* y el paquete ape de R (Paradis et al., 2004), y ejecutados con ggtree (Yu et al., 2017). La organización de los

dominios de cada secuencia se obtuvo manualmente de la base de datos Pfam y agregadas al análisis.

Para el análisis de la presencia de peptidasas M16 en el genoma de *E. meliloti* U143 se analizó el proteoma predicho con Interproscan v5.0 (Jones et al., 2014), y las secuencias que contenían dominios PFAM peptidasa M16 (PF00675) y peptidasa M16_C (PF05193) se identificaron como proteínas putativas HrrP y SapA.

18. Análisis estadísticos

El análisis estadístico del ensayo de Eficiencia simbiótica se realizó con el programa Infostat (Di Rienzo et al., 2014), con el que se realizó un ANOVA seguido de un análisis LSD Fisher para comparar las medias con un $p < 0.05$, utilizando los parámetros Gamma log NULL, y un análisis de contrastes de todas las cepas con el inoculante comercial (U143) a un nivel de $p < 0.001$.

Los ensayos de Efectividad relativa, de Competitividad y de Producción de biomasa se analizaron con el test ANOVA realizado con el *software* R para identificar la significancia estadística. Para comparar por pares y determinar los p -valores se realizó un post hoc test (Tukey's test).

Resultados

1. Eficiencia simbiótica de cepas de *E. meliloti*

En este capítulo se comunican los resultados del análisis estadístico de la eficiencia simbiótica de las cepas que integran las colecciones Fagro – INIA, UNP-IIBCE, MGAP y USDA. Los datos provienen de una evaluación en condiciones controladas en la que se consideró la biomasa aérea acumulada en dos cortes. Los resultados se analizaron separadamente por colección, y en el caso de la colección Fagro-INIA se hizo por sitio de colecta.

1.1 Cepas de la colección Fagro-INIA

Las 55 cepas que integran la colección Fagro-INIA proceden de 219 aislamientos de nódulos voluminosos y rojos, situados mayormente en raíces principales de plantas de alfalfa colectadas en suelos de la Cuenca Lechera.

1.1.1 INIA La Estanzuela: Predio Ganadero

De los 23 aislamientos de rizobios obtenidos de nódulos de plantas colectadas en el predio Ganadero de La Estanzuela, 12 generaron diferente perfil ERIC, las 10 cepas que lograron reinfectar a la planta hospedadora se identificaron como G1 a G10. La eficiencia simbiótica de la cepa G9 y U143, el inoculante comercial, fue la misma. Las otras 9 cepas presentaron eficiencia simbiótica significativamente inferior a estas (Cuadro 3).

Cuadro 3. Peso seco de la parte aérea acumulado en dos cortes. Los cortes se realizaron a los 30 y 50 días después de la inoculación. Se incluyeron dos controles sin inocular, uno regado con N (N) y otro regado sin N (SI) en la solución de riego. Los resultados corresponden a la media $\pm$ desvío estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas según LSD Fisher con $p < 0.05$. El análisis de contrastes se realizó comparando la biomasa inducida por cada cepa respecto a la inducida por el inoculante comercial, U143. *ns* diferencias no significativas, *** diferencias significativas a nivel de $p < 0.001$.

Tratamiento	mg/planta
N	285 $\pm$ 127 a
U143	97 $\pm$ 43 ab
G9	88 $\pm$ 44 ab ns
G7	42 $\pm$ 19 bc ***
G4	33 $\pm$ 15 bc ***
G3	30 $\pm$ 13 bc ***
G8	19 $\pm$ 8 c ***
G6	18 $\pm$ 8 c ***
G2	18 $\pm$ 8 c ***
G10	17 $\pm$ 8 c ***
G5	17 $\pm$ 8 c ***
G1	14 $\pm$ 6 c ***
SI	4 $\pm$ 2 c

1.1.2 INIA La Estanzuela: Predio Lechero

De los 53 aislamientos de rizobios obtenidos de nódulos de plantas colectadas en el predio Lechero de La Estanzuela, 14 generaron diferente perfil ERIC, y las cepas se identificaron como L1 a L13, se eliminó un aislamiento por no reinfectar a la planta hospedera.

La eficiencia simbiótica de las cepas L13, L14, L4, L12, L5 y U143, el inoculante comercial, no se diferenciaron estadísticamente. Las otras 8 cepas tuvieron una eficiencia simbiótica significativamente inferior a estas (Cuadro 4).

Cuadro 4. Peso seco de la parte aérea acumulado en dos cortes. Los cortes se realizaron a los 30 y 50 días después de la inoculación. Se incluyeron dos controles sin inocular, uno regado con N (N) y otro regado sin N (SI) en la solución de riego. Los resultados corresponden a la media $\pm$ desvío estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas según LSD Fisher con $p < 0.05$. El análisis de contrastes se realizó comparando la biomasa inducida por cada cepa respecto a la inducida por el inoculante comercial, U143. *ns* corresponde a diferencias no significativas, *, ** y *** corresponden a diferencias significativas a nivel de $p < 0.05$, $p < 0.01$ y $p < 0.001$, respectivamente.

Tratamiento	mg/planta
N	181 $\pm$ 81 a
L13	112 $\pm$ 50 ab ns
L14	112 $\pm$ 50 ab ns
L4	105 $\pm$ 47 abc ns
L12	89 $\pm$ 40 abcd ns
L5	87 $\pm$ 39 abcd ns
U143	64 $\pm$ 29 abcd
L8	49 $\pm$ 22 bcde ns
L1	42 $\pm$ 21 bcde ns
L7	42 $\pm$ 21 bcde ns
L2	40 $\pm$ 18 bcde ns
L11	31 $\pm$ 14 cde *
L9	28 $\pm$ 12 de **
L3	17 $\pm$ 8 e ***
L10	17 $\pm$ 8 e ***
SI	2 $\pm$ 1 f

1.1.3 INIA La Estanzuela: Predio Ovino

De los 32 aislamientos de rizobios obtenidos de nódulos de plantas colectadas en el predio Ovino de La Estanzuela, 9 exhibieron perfil ERIC diferente, y las cepas se identificaron como O1 a O9.

La eficiencia simbiótica de las cepas O3, O4, O7, O8 y U143, esta última el inoculante comercial, no se diferenciaron estadísticamente. Las otras 5 cepas presentaron una eficiencia simbiótica significativamente inferior a estas (Cuadro 5).

Cuadro 5. Peso seco de la parte aérea acumulado en dos cortes. Los cortes se realizaron a los 30 y 50 días después de la inoculación. Se incluyeron dos controles sin inocular, uno regado con N (N) y otro regado sin N (SI) en la solución de riego. Los resultados corresponden a la media $\pm$ desvío estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas según LSD Fisher con $p < 0.05$. El análisis de contrastes se realizó comparando la biomasa inducida por cada cepa respecto a la inducida por el inoculante comercial, U143. *ns* corresponde a diferencias no significativas, mientras que * y *** corresponden a diferencias significativas a nivel de $p < 0.05$ y $p < 0.001$, respectivamente.

Tratamiento	mg/planta
N	397 $\pm$ 178 a
U143	110 $\pm$ 49 a
O3	201 $\pm$ 90 a ns
O4	191 $\pm$ 86 a ns
O7	168 $\pm$ 75 a ns
O8	159 $\pm$ 71 a ns
O2	124 $\pm$ 55 ab *
O6	38 $\pm$ 17 bc ***
O1	33 $\pm$ 15 c ***
O5	31 $\pm$ 14 c ***
O9	27 $\pm$ 12 c ***
SI	1 $\pm$ 0.6 d

1.1.4 INIA La Estanzuela: Predio Semillas

De los 50 aislamientos de rizobios obtenidos de nódulos de plantas colectadas en el predio Semillas de La Estanzuela, 12 exhibieron perfil ERIC diferente y se identificaron como S1 a S12.

La eficiencia simbiótica de las cepas S8, S6, S9, S3, S11, S7 y U143, esta última el inoculante comercial, no presentó diferencias significativas. Las otras 6 cepas presentaron una eficiencia simbiótica significativamente inferior a estas (Cuadro 6).

Cuadro 6. Peso seco de la parte aérea acumulado en dos cortes. Los cortes se realizaron a los 30 y 50 días después de la inoculación. Se incluyeron dos controles sin inocular, uno regado con N (N) y otro regado sin N (SI) en la solución de riego. Los resultados corresponden a la media $\pm$ desvío estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas según LSD Fisher con $p < 0.05$. El análisis de contrastes se realizó comparando la biomasa inducida por cada cepa respecto a la inducida por el inoculante comercial, U143. *ns* corresponde a diferencias no significativas, mientras que *** corresponde a diferencias significativas a nivel de $p < 0.001$, respectivamente.

Tratamiento	mg/planta
N	440 $\pm$ 197 a
S8	324 $\pm$ 145 a ns
S3	261 $\pm$ 117 a ns
S9	242 $\pm$ 108 a ns
U143	217 $\pm$ 97 a
S6	155 $\pm$ 69 abc ns
S11	152 $\pm$ 68 abc ns
S7	130 $\pm$ 58 abc ns
S2	66 $\pm$ 30 bcd ***
S5	50 $\pm$ 22 cd ***
S4	36 $\pm$ 16 d ***
S12	21 $\pm$ 9 d ***
S1	19 $\pm$ 9 d ***
S10	18 $\pm$ 9 d ***
SI	4 $\pm$ 2 e

1.1.5 Predios de Productores

De tres predios de productores, situados cada uno en Canelones (CA), Florida (FL) y San José (SJ) se realizaron 61 aislamientos de rizobios a partir de nódulos. De los 14 aislamientos del predio CA, 3 presentaron perfil ERIC diferente y se identificaron como

CA1 a CA3; de los 32 aislamientos del predio FL, 5 presentaron perfil ERIC diferente y se identificaron como FL1 a FL5; y de los 15 aislamientos del predio SJ, 3 presentaron perfil ERIC diferente y se identificaron como SJ1 a SJ3.

La eficiencia simbiótica de las cepas CA1 y FL2 fue significativamente mayor que la del inoculante comercial, cepa U143, mientras que la eficiencia de las otras 8 cepas no pudo diferenciarse de este. Por otra parte, una cepa presentó eficiencia simbiótica significativamente inferior a todas (Cuadro 7).

Cuadro 7. Peso seco de la parte aérea acumulado en dos cortes. Los cortes se realizaron a los 30 y 50 días después de la inoculación. Se incluyeron dos controles sin inocular, uno regado con N (N) y otro regado sin N (SI) en la solución de riego. Los resultados corresponden a la media $\pm$ desvío estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas según LSD Fisher con $p < 0.05$. El análisis de contrastes se realizó comparando la biomasa inducida por cada cepa respecto a la inducida por el inoculante comercial, U143. *ns* corresponde a diferencias no significativas, mientras que *, ** y *** corresponden a diferencias significativas a nivel de $p < 0.05$, $p < 0.01$ y $p < 0.001$, respectivamente.

Tratamiento	mg/planta
N	305 $\pm$ 136 a
CA1	240 $\pm$ 104 a **
FL2	232 $\pm$ 104 a *
FL3	226 $\pm$ 101 a ns
SJO1	207 $\pm$ 93 a ns
CA2	180 $\pm$ 80 a ns
U143	178 $\pm$ 79 a
CA3	170 $\pm$ 76 a ns
FL1	164 $\pm$ 73 a ns
FL5	154 $\pm$ 69 a ns
SJO2	146 $\pm$ 65 a ns
SJO3	142 $\pm$ 64 a ns
FL4	119 $\pm$ 53 a ***
SI	11 $\pm$ 5 b

1.2. Cepas de colecciones

1.2.1 Colección de la Universidad Nacional de La Plata - Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

El Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP) y el Departamento de Bioquímica y Genómica Microbiana del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) cuentan con una colección de cepas de rizobios aisladas de suelos de Argentina y Uruguay.

De 8 cepas evaluadas, las 5 cepas de la colección del IIBCE (CE143, CE56, CE21A, CE20 y CE31A) presentaron perfiles ERIC diferentes, mientras que las 2 cepas de la UNLP (B399 y LPU63) no pudieron distinguirse entre sí.

La eficiencia simbiótica de las cepas B399 y CE143 fue la misma que la de la cepa U143, el inoculante comercial, mientras que las otras 5 cepas presentaron una eficiencia simbiótica significativamente inferior (Cuadro 8). Si bien las cepas B399 y LPU63 presentaron idénticos perfiles ERIC, produjeron diferente cantidad de biomasa.

Cuadro 8. Peso seco de la parte aérea acumulado en dos cortes. Los cortes se realizaron a los 30 y 50 días después de la inoculación. Se incluyeron dos controles sin inocular, uno regado con N (N) y otro regado sin N (SI) en la solución de riego. Los resultados corresponden a la media $\pm$ desvío estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas según LSD Fisher con $p < 0.05$. El análisis de contrastes se realizó comparando la biomasa inducida por cada cepa respecto a la inducida por el inoculante

comercial, U143. *ns* corresponde a diferencias no significativas, * y ** corresponden a diferencias significativas a nivel de $p<0.05$ y $p<0.01$ respectivamente.

Tratamiento	mg/planta
N	332 ±149 a
U143	261 ±117 a
B399	246 ±110 a ns
CE 143	206 ±92 a ns
CE 31 A	184 ±82 a *
CE 20	184 ±82 a *
LPU 63	176 ±79 a *
CE 21 A	168 ±75 a **
CE 56	162 ±73 a **
SI	5 ± 3 b

1.2.2 Colección del Departamento de Agricultura de Estados Unidos

De las 9 cepas de rizobios de la colección del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (1956, 1960, 1952, 1957, 1958, 1961, 1955, 6701 y 1959), 7 se identificaron por los perfiles ERIC diferentes. Las cepas 1952 y 1957 y las cepas 1955 y 1960, presentaron el mismo perfil con este marcador molecular.

La eficiencia simbiótica de las cepas 1956, 1960, 1952 y 1957 fue la misma que la del inoculante comercial, cepa U143. Las otras 5 cepas presentaron una eficiencia simbiótica significativamente inferior (Cuadro 9).

Cuadro 9. Peso seco de la parte aérea acumulado en dos cortes. Los cortes se realizaron a los 30 y 50 días después de la inoculación. Se incluyeron dos controles sin inocular, uno regado con N (N) y otro regado sin N (SI) en la solución de riego. Los resultados corresponden a la media ± desvío estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas según LSD Fisher con $p<0.05$. El análisis de contrastes se realizó comparando la biomasa inducida por cada cepa respecto a la inducida por el inoculante comercial, U143. *ns* corresponde a diferencias no significativas, mientras que * y ** corresponden a diferencias significativas a nivel de $p<0.01$ y $p<0.001$, respectivamente.

Tratamiento	mg/planta
N	150 ±75 a
U143	141 ±70 a
1956	129 ±58 a ns
1960	119 ±53 ab ns
1952	111 ±50 ab ns
1957	83 ±37 ab ns
1958	52 ±23 ab **
1961	45 ±20 ab ***
1955	33 ±15 b ***
6701	9 ±4 c ***
1959	8 ±4 c ***
SI	3 ±1 c

1.2.3 Colección del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca

De la colección del MGAP se evaluaron 15 cepas, 14 provenientes de colecciones internacionales, y a la cepa U143 aislada de un suelo de Uruguay la cual es usada como inoculante comercial. Todas las cepas presentaron un perfil ERIC único.

La eficiencia simbiótica de 12 de las 15 cepas fue la misma que la lograda con la cepa U143, mientras que la de las otras 3 cepas fue significativamente inferior (Cuadro 10).

Cuadro 10. Peso seco de la parte aérea acumulado en dos cortes. Los cortes se realizaron a los 30 y 50 días después de la inoculación. Se incluyeron dos controles sin inocular, uno regado con N (N) y otro regado sin N (SI) en la solución de riego. Los resultados corresponden a la media ± desvío estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas según LSD Fisher con $p < 0.05$. El análisis de contrastes se realizó comparando la biomasa inducida por cada cepa respecto a la inducida por el inoculante comercial, U143. *ns* corresponde a diferencias no significativas, mientras que * corresponde a diferencias significativas a nivel de $p < 0.05$.

Tratamiento	mg/planta
N	374 ±167 a
U136	349 ±156 a ns
U139	322 ±144 a ns
U130	306 ±137 a ns
U116	286 ±128 a ns
U122	283 ±126 a ns
U143	267 ±119 a
U125	257 ±115 a ns
U105	257 ±115 a ns
U144	256 ±115 a ns
U113	192 ±86 a ns
U141	141 ±63 a *
U117	134 ±60 a *
U149	128 ±57 a *
SI	14 ±8 b

2. Eficiencia simbiótica de las cepas promisorias a pH 5.5

Entre las 26 cepas de la colección Fagro-INIA con eficiencia simbiótica igual o superior a la cepa usada como inoculante a pH 6.2, se evaluaron 5 de esas cepas a pH 5.5, un pH de suelo moderadamente ácido. De estas 5 cepas, las 3 consideradas "promisorias" fueron L14 (predio Lechero), y S8 (predio Semillas), colectadas en la Estación Experimental INIA La Estanzuela y la cepa CA1 colectada en Canelones. El perfil ERIC diferente de las 3 cepas de distinta procedencia se confirmó (Figura 8).

Estas cepas produjeron, respecto al inoculante comercial, la misma biomasa aérea acumulada en dos cortes.

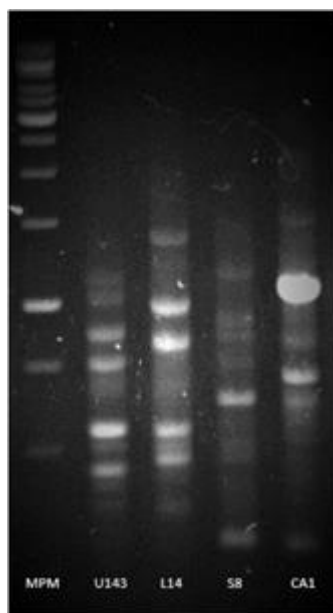


Figura 8. Perfiles ERIC de las cepas promisorias a ser evaluadas a pH 5.5. En los carriles se observa el MPM (Marcador de peso molecular), el inoculante comercial U143, y las 3 cepas promisorias L14, S8 y CA1.

Cuadro 11. Peso seco de la parte aérea acumulado en dos cortes de plantas crecidas a pH 5.5. Los cortes se realizaron a los 30 y 50 días después de la inoculación. Se incluyeron dos controles sin inocular, uno regado con N (N) y otro regado sin N (Si) en la solución de riego. Los resultados corresponden a la media $\pm$ desvío estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas según LSD Fisher con $p < 0.05$. El análisis de contrastes se realizó comparando la biomasa inducida por cada cepa respecto a la inducida por el inoculante comercial, U143. *ns* corresponde a diferencias no significativas.

Tratamiento	mg/planta
N	114 $\pm$ 51 a
L14	106 $\pm$ 48 a ns
CA1	90 $\pm$ 40 a ns
U143	90 $\pm$ 40 a
S8	88 $\pm$ 39 a ns
Si	10 $\pm$ 5 b

3. Borrador del genoma de *E. meliloti* cepa elite U143

La secuenciación del genoma de *E. meliloti* cepa U143 realizada con el Sistema Illumina, tuvo un rendimiento total de 13,347,362 *paired-end reads*. Después de la revisión de calidad y un *read trimming*, un total de 11,039,276 *paired-end reads* mostraron una calidad general de Phred > 30 y un largo de lecturas > 80 bp, y se conservaron para su posterior análisis. El ensamblaje *de novo* y posterior *scaffolding* rindió un total de 135 *contigs* mayores a 500 pares de bases, con una cobertura total de 6,807,606 bp, y un contenido de GC de 62.4% (Figura 9).

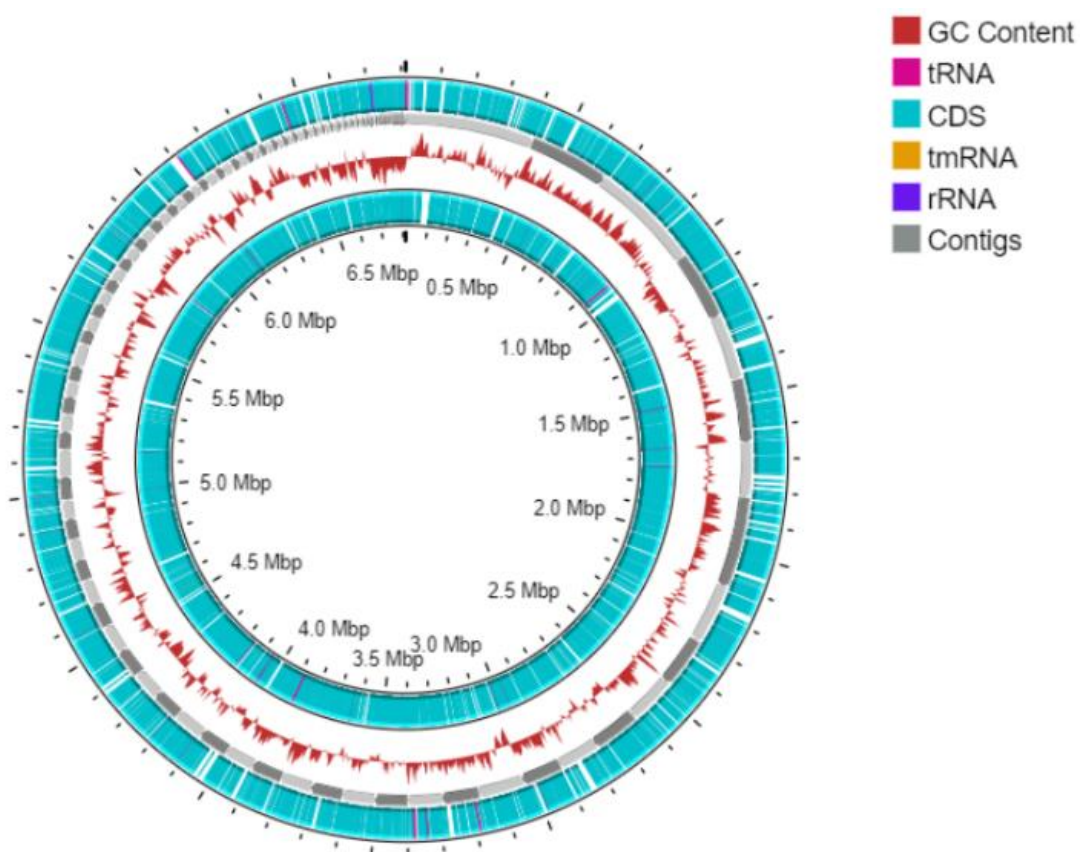


Figura 9. Genoma bacteriano circular en el que se representan las secuencias codificantes (CDS), ARNt, ARNr, Contigs, ARNmt, y el contenido GC. El mapa se generó usando el *software online* Proksee.

Cuando se comparó el genoma obtenido de la cepa U143 con otros genomas de *E. meliloti*, 113 de 135 *scaffolds* que correspondían a 6,544,863 bp fueron consistentemente clasificados como pertenecientes al cromosoma (3,692,970 bp), al plásmido pA (1,239,845 bp) y al plásmido pB (1,612,048 bp). De los 124 genes ortólogos de copia simple identificados, 123 (99.2%) fueron completos y de copia única en el genoma, mientras que 1 (0.8%) estaba duplicado. No se recuperaron fragmentos perdidos o faltantes en BUSCO. Las estadísticas del ensamblaje fueron L50: 18, N50: 105,034 bp, y N's per-100 kbp: 40.51. La anotación del genoma utilizando el *software* Prokka rindió 6,522 secuencias codificantes.

La anotación del genoma utilizando RAST evidenció que el subsistema más abundante es el de aminoácidos y derivados, seguido de carbohidratos (Figura 10). Entre las secuencias codificantes relacionadas al metabolismo del nitrógeno, la cepa U143 presenta los *clusters* de la nitrato reductasa desnitrificante que da comienzo a la vía de desnitrificación en el espacio periplásmico (*nap*), de la reducción de nitrito a óxido nítrico (*nir*), de la reducción de óxido nítrico a óxido nitroso (*nor*) y de la transformación de óxido nitroso a nitrógeno (*nos*). La cepa U143, que presenta todos los genes de la vía de desnitrificación (Figura 11A), fue capaz de crecer en condiciones anóxicas respirando nitrato según se observa en la Figura 11B.

Por otro lado, a partir de la anotación de las proteínas predichas en el genoma con Interproscan v5.0, se identificó una secuencia codificante para una peptidasa de la familia M16 en el cromosoma bacteriano, la cual, con una cobertura de 100% presentó una identidad de secuencia de 99.77% con la proteína SapA reportada en *E. meliloti* 1021.

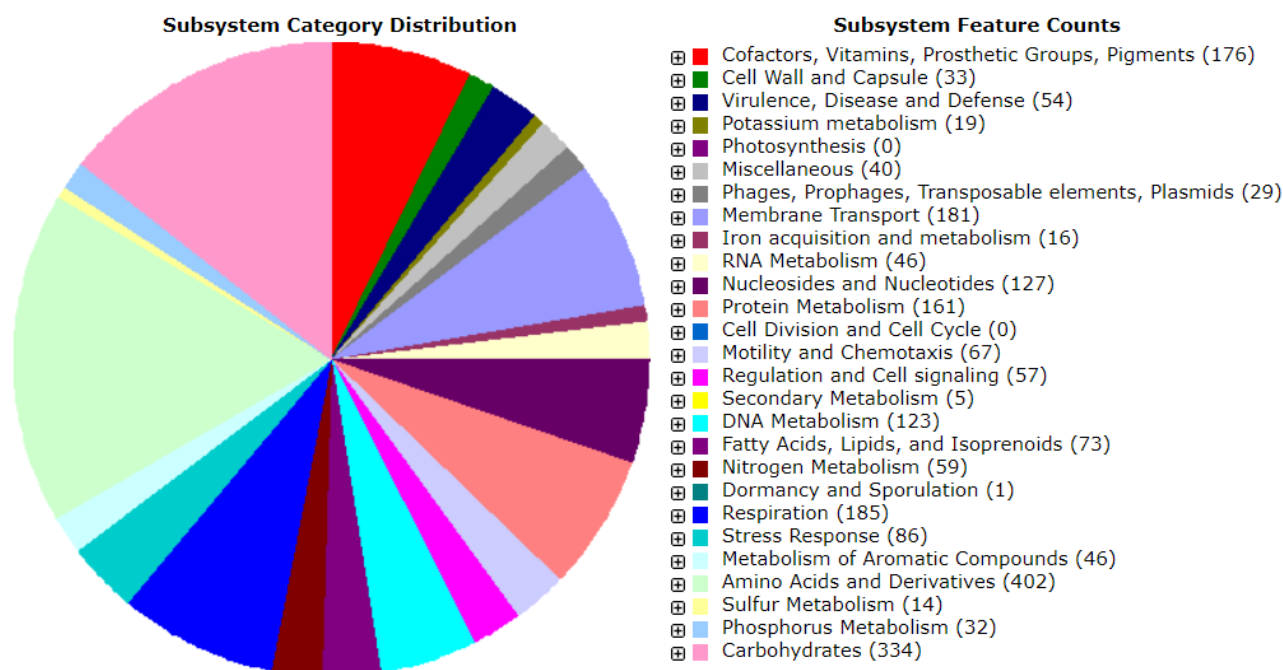


Figura 10. Representación del genoma bacteriano según la distribución por categorías de subsistemas de las secuencias codificantes (CDS) de la cepa U143 generado con el *pipeline* de RASTk. El número de CDS en cada subsistema figura entre paréntesis.

El árbol filogenético construido a partir de la secuencia del 16S ARNr (Figura 12) de la cepa U143 y secuencias de ese gen correspondientes a otras especies del género *Ensifer* disponibles en esta base de datos, evidencia que esta cepa agrupa junto a *E. meliloti* 2011, cepa tipo.

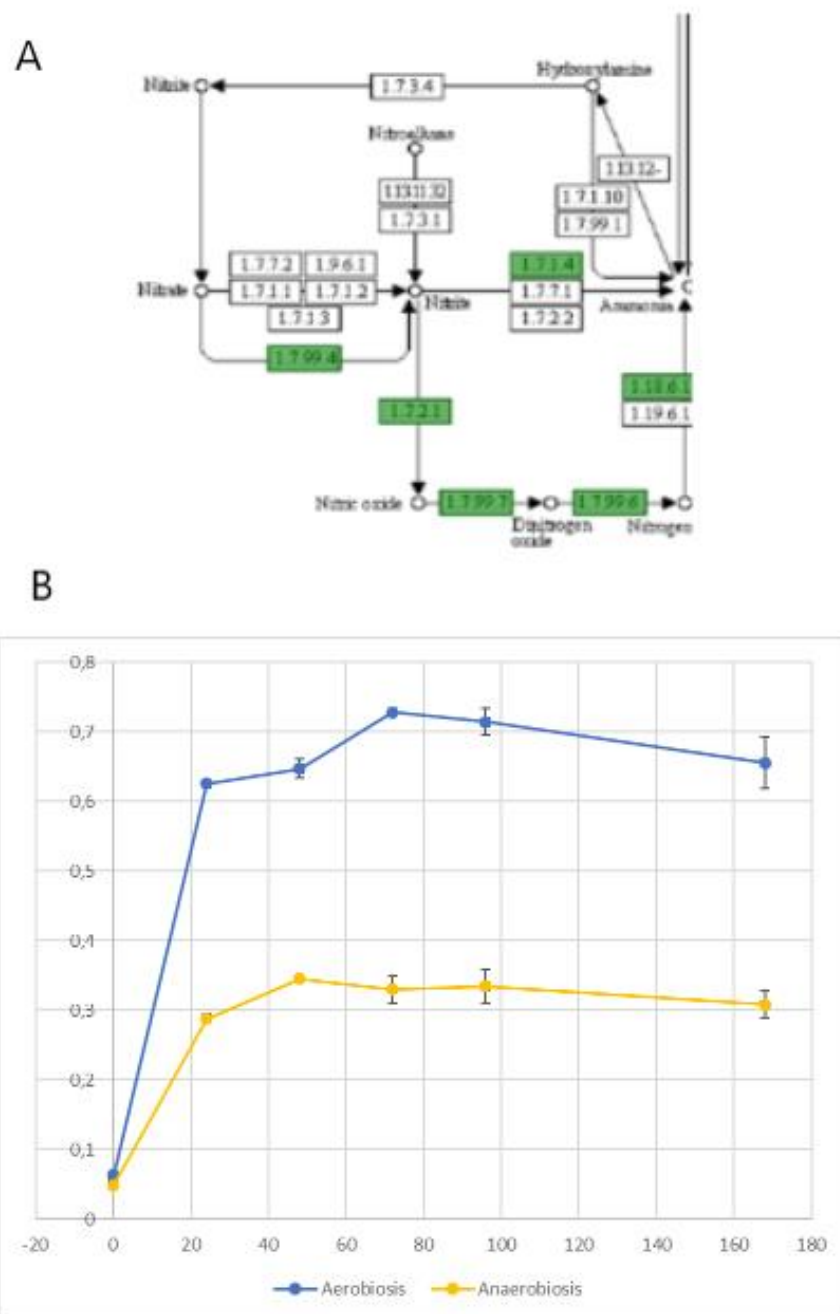


Figura 11. Respiración de nitrato por la cepa U143. **A.** Genes involucrados en la respiración de nitrato identificados en el genoma de la cepa U143 (color verde). **B.** Crecimiento de la cepa U143 en condiciones anóxicas respecto al control en aerobiosis (DO₆₀₀ vs hrs).

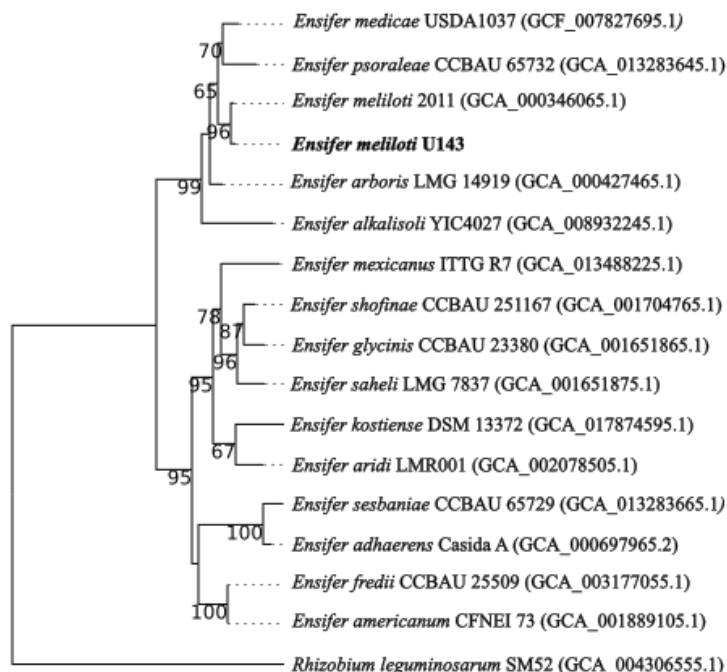


Figura 12. Árbol filogenético inferido por alineamiento de secuencias del gen 16S ARNr bajo el modelo GTR+GAMMA y enraizado por *midpoint-rooting* utilizando el servidor GGDCweb (Meier-Kolthoff et al., 2013). Las ramas están escaladas en términos del número esperado de sustituciones por sitio. En las ramas figuran los valores cuando estos superan el 60 %.

La similitud entre el genoma de *E. meliloti* U143 y *E. medicae* USDA1037 fue de 86.6% y 88.3% para ANIb y ANIm, respectivamente, mientras que entre U143 y *E. meliloti* 2011 fue 98.3% para ANIb, 98.8% para ANIm, y 89.8% dDDH (formula d4 estimada con TYGS). Además, U143 presentó *z-scores* > 0.99977 con *E. meliloti* 2011 en TCS y *tetra-nucleotide signature*, indicando que pertenece a la especie *E. meliloti*. El análisis filogenético a nivel de genomas de *E. meliloti* U143, *E. meliloti* 2011, y otras cepas pertenecientes al género *Ensifer* spp. demostró que U143 agrupa en un *cluster* junto con la cepa tipo *E. meliloti* 2011, y de acuerdo con el análisis TYGS, esta pertenece a la especie *E. meliloti* (Figura 13A).

El MLSA de las secuencias de los genes simbióticos *nodA* y *nifH* concatenados evidenció que las cepas pertenecientes a *E. meliloti* agruparon separadas a la de *E. medicae* (Figura 14), y en el mismo superclado que *R. favelukesii*.

Se compararon los genomas completos de *E. meliloti* 2011, U143 y *E. medicae* USDA1037, y se identificaron cerca del 85% de secuencias homólogas comunes para las tres cepas, mientras que la cepa 2011 presentó un 12% más de secuencias en común con U143 que con la cepa USDA1037 de *E. medicae* (Figura 13B).

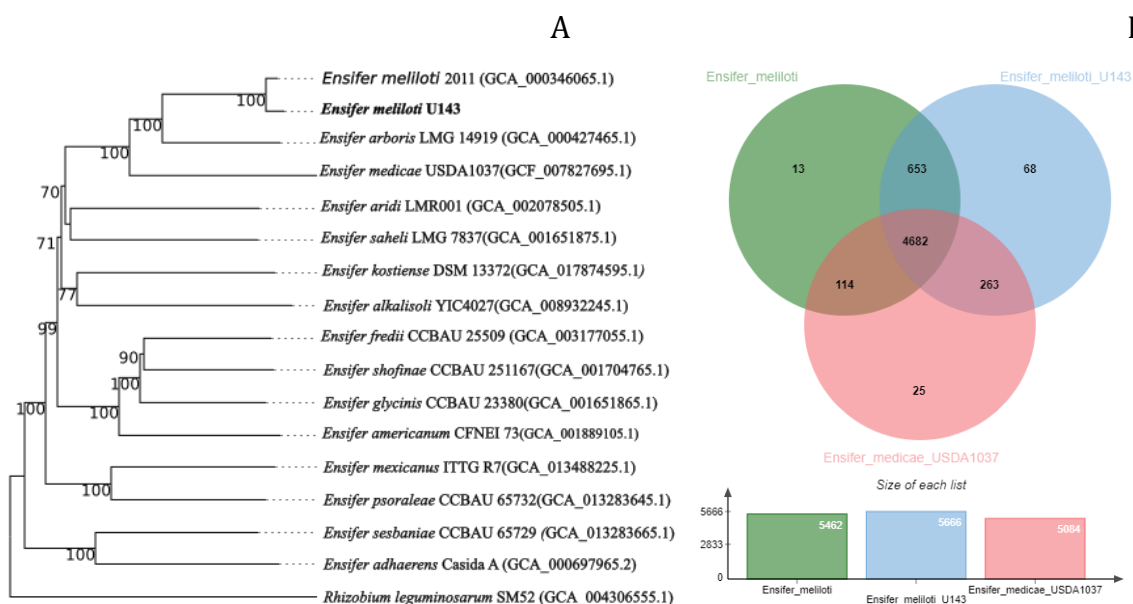


Figura 13. Análisis filogenético y diagrama de Venn con genes homólogos de cepas del género *Ensifer* spp. **A.** Análisis filogenético inferido del Genome Blast Distance Phylogeny (GBDP) con las distancias calculadas por TYGS (<https://tygs.dsmz.de/>). El largo de las ramas se escala en términos de distancia GBDP. Los números sobre las ramas son valores de soporte de pseudo-*bootstrap* > 60% para 100 réplicas, con un promedio de soporte de ramas de 63.6%. Los números de acceso del NCBI se muestran entre paréntesis. En negrita se indica a la cepa U143. **B.** Diagrama de Venn con genes homólogos de *E. meliloti* 2011, *E. meliloti* U143 y *E. medicae* USDA1037. Las regiones superpuestas representan genes homólogos compartidos por 2 o 3 cepas.

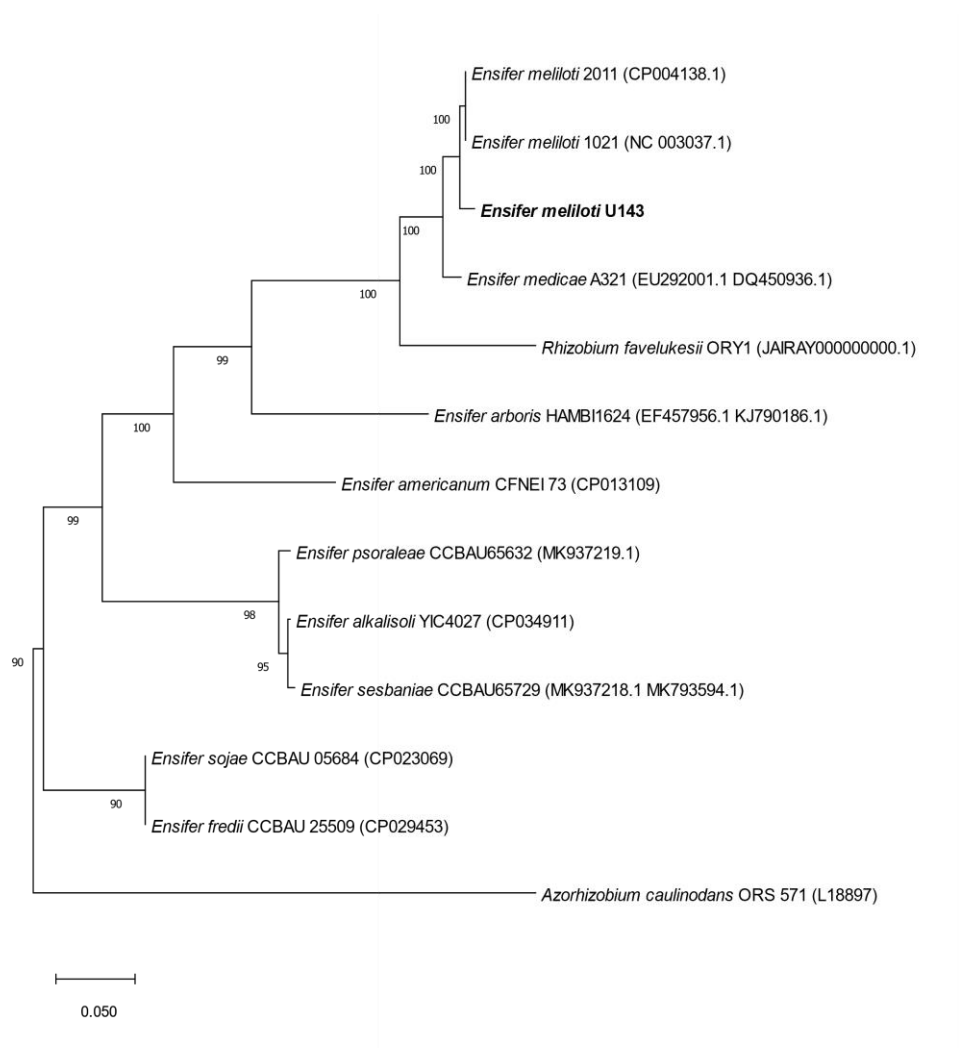


Figura 14. MLSA de genes simbióticos *nodA* y *nifH* de especies del género *Ensifer*. El árbol de máxima similitud fue inferido a partir del alineamiento de secuencias parciales de los genes *nodA* (387 nt) y *nifH* (317 nt). En negrita se indica la cepa U143 aislada en Uruguay, utilizada como inoculante comercial. Se indican sobre las ramas los valores de Bootstrap mayores o iguales a 50 (basados en 1000 réplicas).

La cepa elite U143 se ha utilizado como inoculante comercial de alfalfa durante más de 30 años debido a su buen desempeño en campo. En alfalfa inoculada con la cepa U143 en campo, el 60% del N de la planta, estimado por la abundancia natural de ^{15}N , fue adquirido por fijación biológica.

4. Competitividad y eficiencia simbiótica de la cepa ORY1

4.1 Identificación de cepas parásitas de alfalfa tipo Oregon

Para identificar la presencia de cepas parásitas de tipo Oregon en suelos de la Cuenca Lechera se partió de 5 aislamientos de la colección Fagro-INIA con eficiencia simbiótica significativamente inferior al inoculante comercial a un nivel de $p < 0.001$, y similar al control sin inocular. Estos aislamientos de suelos con pH ácido (Cuadro 12) se colectaron en La Estanzuela (ORY1, ORY2, ORY4 y ORY5) y en un predio de productores (ORY3). Los resultados que figuran en este punto dieron lugar a artículo que se anexa al final de la tesis (Anexo).

Las secuencias parciales del gen 16S ARNr de los aislamientos ORY1 a ORY5, presentaron un porcentaje de similitud entre 99.7 y 100% con la secuencia parcial del gen 16S ARNr de la cepa tipo LPU83 de *R. favelukesii* (Cuadro 12).

Cuadro 12. Aislamientos de suelos ácidos de la Cuenca Lechera. % 16S ARNr corresponde al % de identidad con la secuencia parcial del gen 16S del ARNr de *R. favelukesii*.

Cepa	Lugar y sitio de colecta	pH del suelo	% 16S ARNr
ORY1	Colonia, La Estanzuela Predio Semillas	5,74	100
ORY2	Colonia, La Estanzuela, Predio Ganadero	5,48	99,9
ORY3	Productores, Florida	5,83	99,7
ORY4	Colonia, La Estanzuela, Predio Lechero	5,68	100
ORY5	Colonia, La Estanzuela, Predio Ganadero	5,48	100

Para establecer la diversidad de estos aislamientos de *M. sativa* con baja eficiencia simbiótica se generaron los respectivos perfiles BOX. Los perfiles BOX de los 5 aislamientos y el de las cepas LPU83 de Argentina y Or191 de EE.UU. de *R. favelukesii* evidenciaron que ORY1 y ORY5 presentan el mismo perfil que las cepas de procedencia extranjera. Por otra parte, ORY2, ORY3 y ORY4 presentaron el mismo perfil entre ellas,

pero distinto al de las cepas LPU83 y Or191 (Figura 15A). De aquí en adelante, los distintos estudios se realizaron en la cepa ORY1.

El análisis filogenético basado en la secuencia parcial del 16S ARNr, que incluyó a la cepa ORY1 de *R. favelukesii* y a otras especies de rizobios, evidenció que esta cepa pertenece al mismo grupo que *R. favelukesii* y *R. tibeticum* (Figura 15B).

El comportamiento parásito de ORY1 se confirmó por la producción de peso seco de la parte aérea en presencia únicamente de esta cepa como inoculante. Este parámetro fue únicamente un 15% del obtenido por la cepa U143 de *E. meliloti*, el inoculante comercial de alfalfa, evidenciando así una muy baja efectividad simbiótica relativa a la cepa U143.

4.2 Secuenciación del genoma y análisis filogenético de la cepa ORY1

El análisis del borrador del genoma de la cepa ORY1 reveló que el genoma tiene un tamaño de 7.44 Mb, con un contenido GC de 59.7%; conteniendo 7,509 secuencias codificantes y 51 genes de ARN. Se identificaron 5 replicones correspondientes al cromosoma y 4 plásmidos. El análisis de los plásmidos reveló que 151 contigs tuvieron una cobertura del 96% de la longitud total de los plásmidos de *R. favelukesii* LPU83. Esto representó una longitud total de 3.25 Mb que codifica 3,349 ORFs. Basado en TCS o tetra-nucleotide signature, solo *R. favelukesii* y *R. tibeticum* se consideraron relacionados estrechamente, con *z-scores* > 0.999. A partir de valores ANI > 96% las especies de *R. favelukesii* y *R. tibeticum* agruparon de forma muy cercana con ORY1, pero al presentar valores ANI > 99% se pudo asignar a la cepa ORY1 como miembro de la especie *R. favelukesii*. De acuerdo con el análisis TYGS, ORY1 pertenece a *R. favelukesii*. El análisis filogenético de las cepas ORY1, LPU83 y Or191 de *R. favelukesii* demostró que agrupan juntas entre sí y separadas de *R. tibeticum* cuando se analiza a nivel de genoma completo (Figura 16A). Además, *R. favelukesii* y *R. tibeticum* también agruparon separadas de *R. grahamii* y *R. altiplani* (Figura 16A).

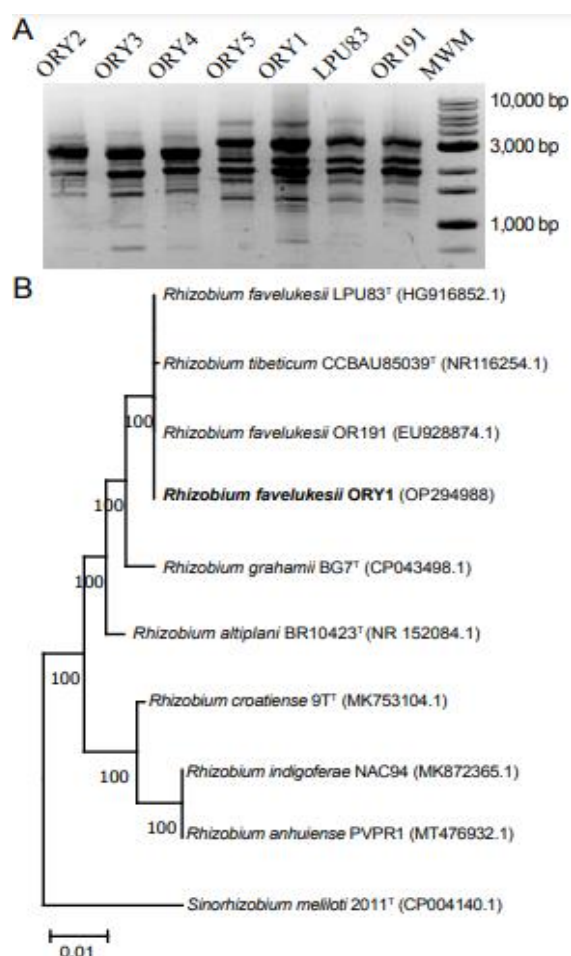


Figura 15. Diversidad y relaciones filogenéticas de cepas de *R. favelukesii*. **A.** Perfiles BOX de aislamientos de suelos ácidos de Uruguay (ORY1, ORY2, ORY3, ORY4 y ORY5) y de cepas de referencia colectadas en Argentina (LPU83) y Or191 (EE.UU). MWM Marcador de peso molecular. **B.** *Maximum Likelihood* basado en alineamiento de 1,342 nt del gen 16S ARNr. En negrita se indica la cepa aislada de suelo uruguayo. El genoma de las otras cepas fue obtenido del NCBI. La ^T indica las cepas Tipo. Los valores de *Bootstrap* calculados para 1000 réplicas están indicados. Barra: sustitución de 1 nucleótido cada 100.

A su vez, las tres cepas de *R. favelukesii* no agruparon con *R. tibeticum* cuando se realizó un MLSA de los genes simbióticos *nifD*, *nifK*, *nifH*, *nodA*, *nodB*, y *nodD* pero pertenecen al mismo superclado que la cepa 2011 de *E. meliloti* (Figura 16B). Para comprender mejor la similitud entre las tres cepas de *R. favelukesii*, Or191, LPU83 y ORY1, se analizaron los genes homólogos que comparten entre sí. El diagrama de Venn mostró

que la mayoría de las secuencias codificantes son comunes para las tres cepas (alrededor del 87.5% respecto a ORY1), también que Or191 tiene más genes en común con ORY1 que con LPU83, y que alrededor del 2.7% de los genes son únicos de ORY1 (Figura 16C).

4.3 Competitividad y eficiencia simbiótica de ORY1 vs. U143

Para evaluar la competitividad de la cepa ORY1 respecto a la cepa U143, se usó la cepa marcada ORY1::*gusA*. Para confirmar que la inserción del gen *gusA* no afectó la competitividad ni la producción de biomasa, se comparó la ocupación de nódulos de ORY1::*gusA* con la de la cepa parental ORY1. Entre estas cepas, no se observaron diferencias en términos de tiempo de aparición del primer nódulo (8 días) ni en la cantidad de nódulos por planta a los 21 días post inoculación. Tampoco se observaron diferencias en la producción de biomasa de la parte aérea.

Para evaluar la competitividad y la producción de biomasa se realizaron dos tratamientos, los cuales consistieron en inocular a las plantas con diferentes proporciones de ORY1::*gusA* y el inoculante comercial *E. meliloti* U143. Un tratamiento consistió en inocular plántulas con una relación 99:1 de ORY1::*gusA* respecto a U143 (tratamiento 99%). El otro tratamiento consistió en inocular a las plántulas con una relación 1:99 ORY1::*gusA*/U143 (tratamiento 1%). La ocupación de nódulos por la cepa ORY1::*gusA* en el tratamiento 99% fue mayor a la del tratamiento 1% (Figura 17A). Es llamativo que en el tratamiento 1%, el porcentaje de nódulos ocupados por la cepa parásita marcada fue superior al 50% de ocupación de nódulos, lo que evidencia su alta competitividad. A pesar de que ORY1::*gusA* ocupó más del 50% de los nódulos en ambos tratamientos, se observó una diferencia clara en términos de producción de biomasa entre los mismos (Figura 17B).

De hecho, la producción de biomasa en el tratamiento 99% no se diferenció estadísticamente del control sin inocular, mientras que la producción de biomasa en el tratamiento 1% no se diferenció estadísticamente del control inoculado únicamente con el inoculante comercial U143 (Figura 17B).

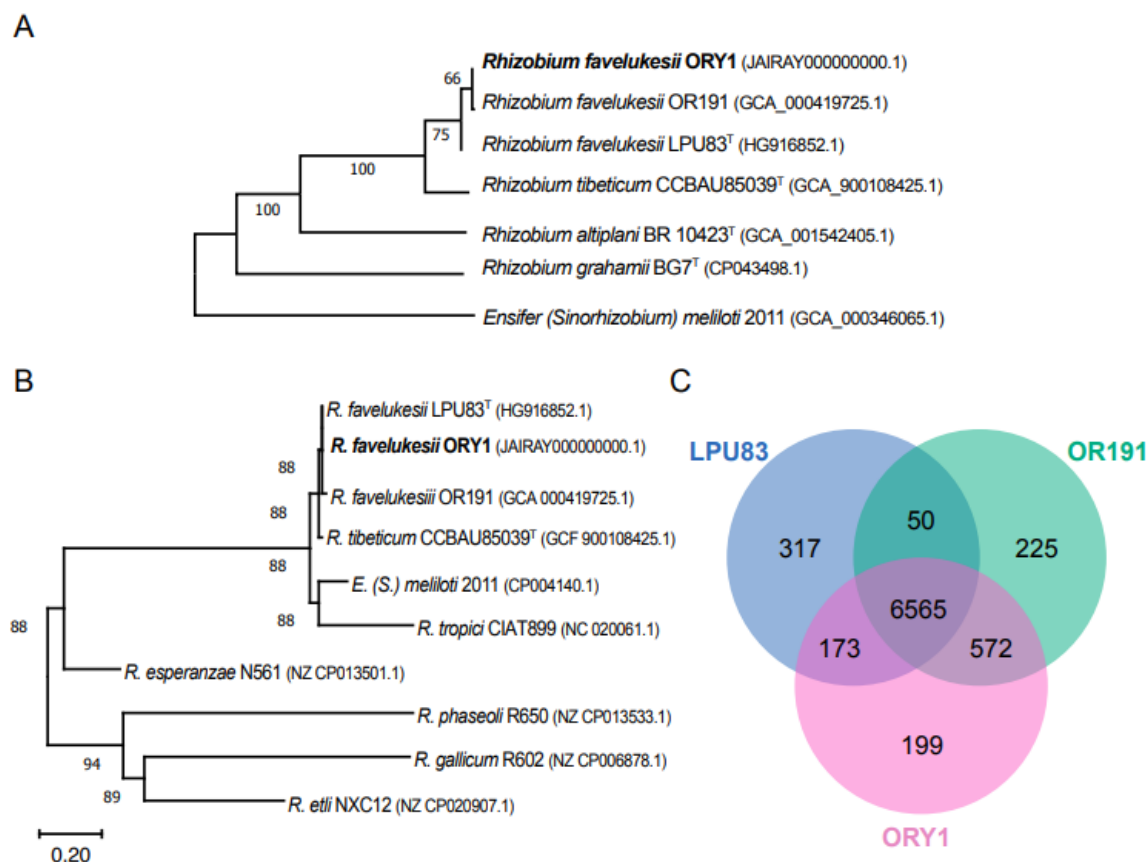


Figura 16. Análisis filogenéticos y diagrama de Venn de genes homólogos de las tres cepas de *R. favelukesii*. **A.** Árbol inferido de Genome Blast Distance Phylogeny (GBDP) con distancias calculadas a partir de secuencias de genomas con el *software* TYGS (<https://tygs.dsmz.de/>). El largo de las ramas está escalado en términos de distancia de GBDP. El número sobre las ramas corresponde a los valores de soporte de pseudo-*bootstrap* > 60% de GBDP a partir de 100 réplicas, con un soporte promedio de 83.8%. **B.** MLSA de los genes simbióticos *nifD*, *nifK*, *nifH*, *nodA*, *nodB* y *nodD* de diferentes especies rizobianas. **C.** Diagrama de Venn de genes homólogos en 3 cepas de *R. favelukesii*. Las regiones superpuestas representan genes homólogos comunes compartidos por los pangenomas.

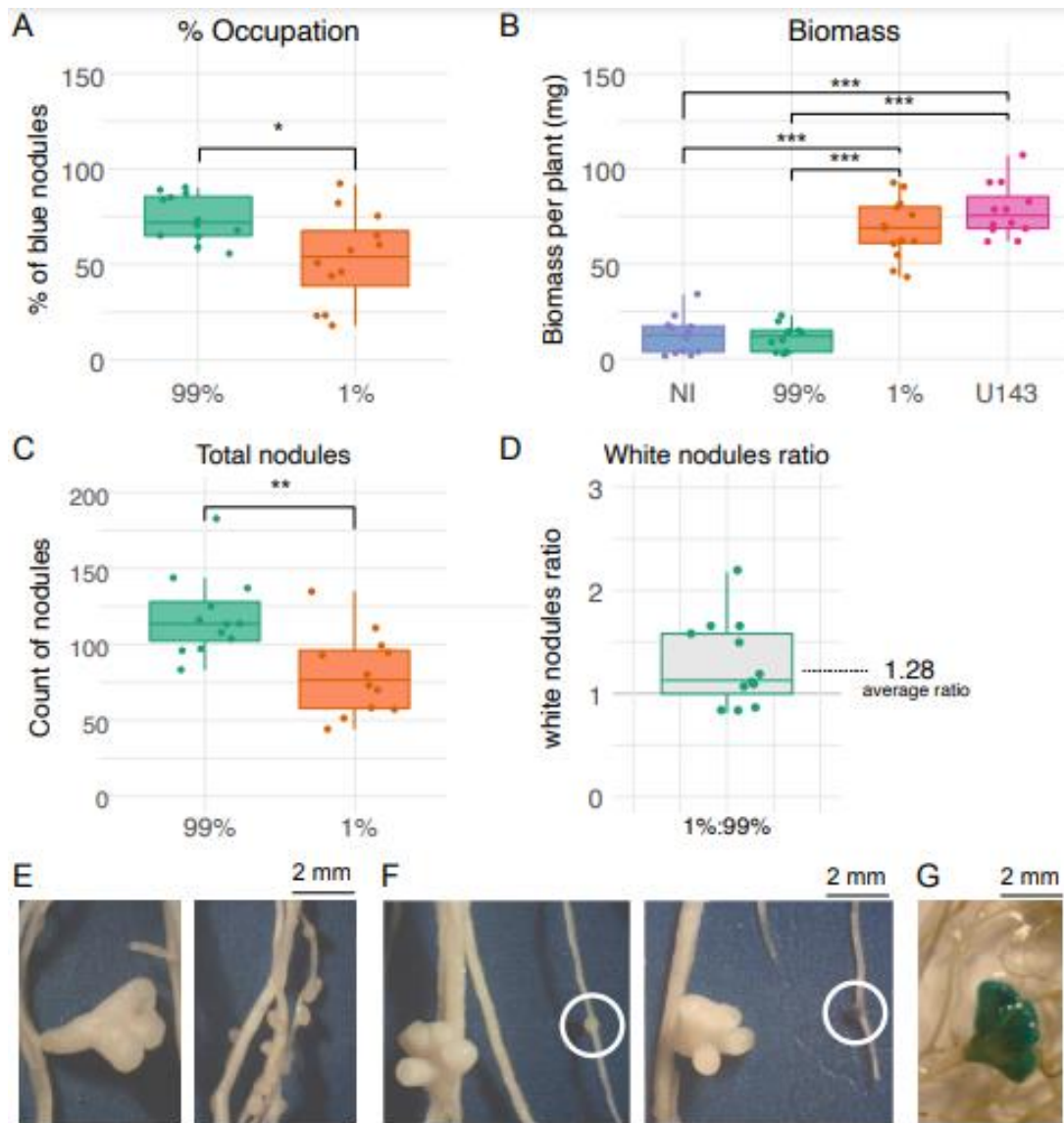
Por otro lado, en el tratamiento 99% el número total de nódulos por planta fue significativamente mayor (Figura 17C), mientras que el número de nódulos sin teñir en el tratamiento 1% fue significativamente mayor (Figura 17D).

La morfología de los nódulos inducida por ambas cepas fue diferente (Figura 17E). Se observó que ORY1::*gusA* indujo el desarrollo de un número mayor de nódulos pequeños y esféricos, a diferencia de U143 que indujo menor número de nódulos, de forma alargada y de aspecto típicamente indeterminado (Figura 17F). Excepcionalmente se observaron algunos nódulos que presentaron la misma morfología que la inducida por la cepa U143, pero que se tiñeron de azul (Figura 17G). Este hecho se puede atribuir a la coocupación de nódulos por ambas cepas, dado que nunca se observó este resultado en plantas que fueron únicamente inoculadas con ORY1::*gusA*.

4.4 Identificación de dominios peptidasa M16 en la cepa ORY1

Dado que los genes bacterianos *hrrP* y *sapA* codifican para peptidasas de tipo M16 que han sido relacionadas a rizobios con poca eficiencia simbiótica, se buscaron genes que codifiquen peptidasas M16 en el genoma de ORY1. En el genoma de esta cepa, mediante un análisis bioinformático utilizando modelos ocultos de Markov junto con la base de datos proteica Pfam, se identificaron tres genes que codifican secuencias aminoacídicas con dominios de metalopeptidasas de zinc tipo M16. Dos de estos genes que codifican para 448 y 532 aminoácidos, resultaron ser contiguos y estar localizados en un plásmido accesorio. El análisis mediante Protein BLAST permitió evidenciar que estas secuencias presentaron una identidad de 22.78 y 26.55% y una cobertura del 50 y 63% respectivamente con la peptidasa HrrP de *E. meliloti* USDA1963 (Cuadro 13). Esta proteína es una metalopeptidasa de zinc tipo M16 homodimérica involucrada en la digestión de péptidos NCR.

En el cromosoma de la cepa ORY1 se identificó una secuencia de 432 aminoácidos que tiene un 82.78% de identidad de secuencia y un 98% de cobertura con respecto a la peptidasa SapA de *E. meliloti* 1021 (CAC45492.2). Esta proteína pertenece a la subfamilia de peptidasas M16B, la cual es conservada y está presente en diferentes rizobios.



99% y 1% coinoculaciones con ratio 1:99 y 99:1 (ORY1::gusA:U143). NI, control sin inocular; U143, inoculante comercial.

Figura 17. Competitividad, producción de biomasa y morfología de nódulos en plantas inoculadas con cepas parásita y eficiente. **A.** Porcentaje de ocupación de nódulos de la cepa ORY1::gusA. **B.** Producción de biomasa aérea. **C.** Número de nódulos totales. **D.** Ratio de nódulos blancos respecto a totales. **E.** Aspecto de nódulos ocupados por la cepa eficiente y ineficiente (izquierda y derecha, respectivamente). **F.** Nódulo antes y después de la tinción con Gus. **G.** Nódulo teñido con una morfología tipo U143. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

En la búsqueda de genes que codifican para dominios peptidasa M16 en rizobios, se analizaron 462 plásmidos disponibles en la base de datos PLSDB. En esa base, solo se identificaron 30 genes que codifican para este tipo de dominios proteicos, y algunos de ellos correspondieron a los mismos replicones. También se identificaron genes que codifican para dominios M16 en plásmidos de rizobios de diferentes especies como *R. leguminosarum*, *R. etli*, *R. favleukesii* y *R. gallicum* (Figura 18). Adicionalmente, los *clusters* de secuencias encontrados en el árbol (Figura 18), no evidenciaron una distribución por especie.

Para entender los patrones de homología remotos en estos genes se analizó la arquitectura de los dominios de peptidasas codificados en los plásmidos de rizobios. Esto permitió evidenciar que hay distintas organizaciones de dominios, pero con un número limitado de dominios proteicos, específicamente M16 (PF00675) y M16_C (PF05193). La combinación de un dominio peptidasa M16 con un M16C es la arquitectura mayormente observada en estas proteínas, donde al menos un gen de las 5 especies de rizobios representadas presenta esta organización de dominios.

Cuadro 13. Análisis BLAST de los dominios M16 identificados en ORY1 versus las secuencias de referencia. E-value corresponde al número esperado de *hits* de calidad similar (*score*) que podría ser encontrado por casualidad.

ID	Localización	Dominio M16	Cobertura	Identidad	E-value
07295*	Plasmídica	M16C	50%	22.78%	8e-05
07296*	Plasmídica	M16-M16C	63%	26.55%	3e-15
02082**	Cromosómica	M16B	98%	82.78%	0.0

*secuencias blasteadas contra la secuencia aminoacídica del gen *hrrP* de referencia de *E. meliloti* USDA1963 (AJT61688.1). **secuencia blasteada contra la secuencia aminoacídica del gen *sapA* de referencia de *E. meliloti* 1021 (CAC45492.2).

En la Figura 18 se muestra el árbol filogenético construido con secuencias de peptidasas M16 codificadas en plásmidos de distintas especies de rizobios, en el que se

usó como referencia una proteína no caracterizada disponible en UniProt (número de acceso W2S8M8) con estructura predicha por AlphaFold. Como referencia de una proteína funcional caracterizada se incluyó la de HrrP de *E. meliloti* USDA 1963, la cual resultó presentar una arquitectura de dominios similar, presentando un dominio peptidasa M16_C extra, como el que presenta la proteína de referencia depositada en UniProt con el número de acceso W9RIX3.

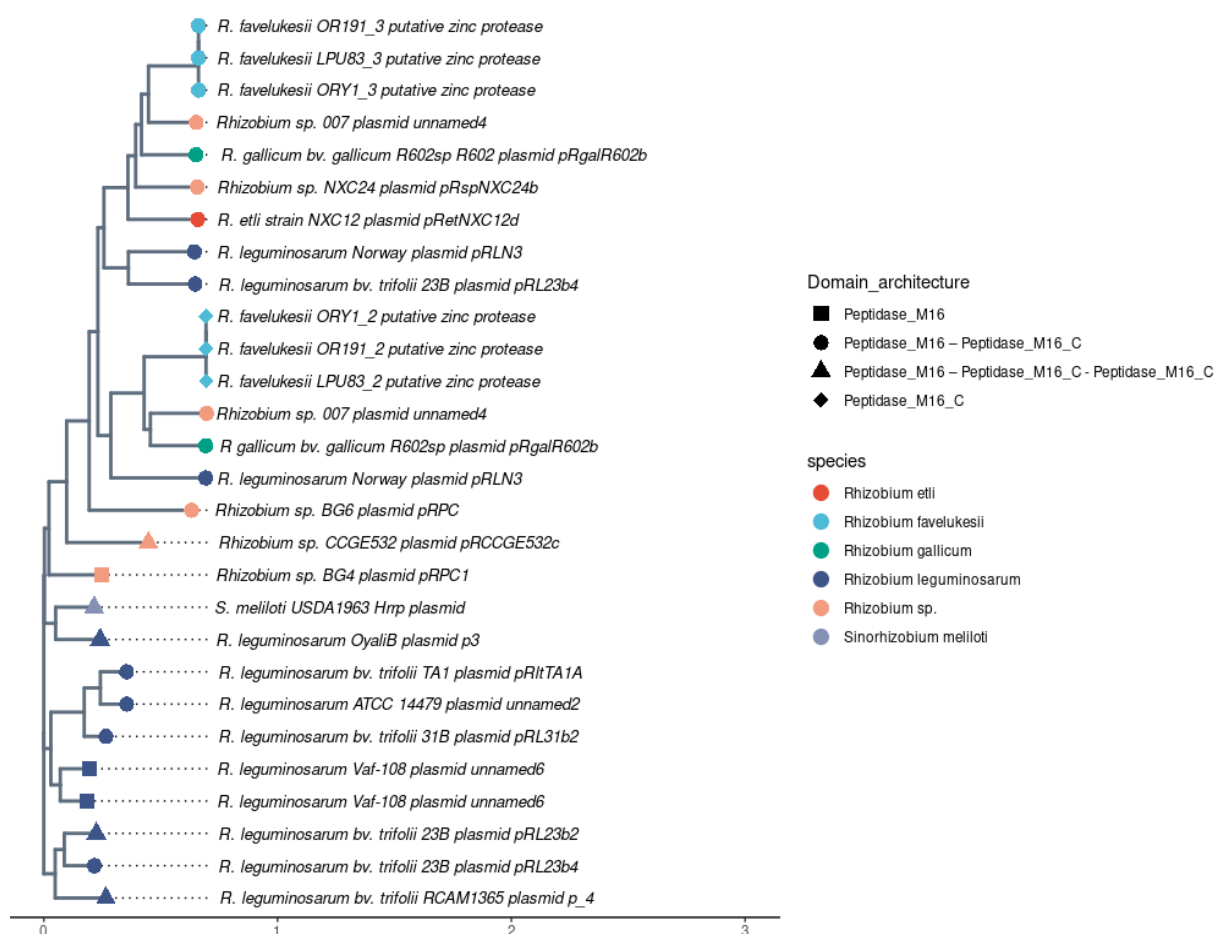


Figura 18. Árbol filogenético de secuencias de peptidasas M16 codificadas en plásmidos de distintas especies de rizobios. Los árboles filogenéticos fueron computados con el algoritmo *Neighbor-joining*. Los colores de las puntas indican las cepas de rizobios. Las formas de las puntas indican distintas arquitecturas de dominio, las cuales fueron buscadas manualmente en el servidor Pfam para cada secuencia de peptidasa.

Discusión

1. Selección de cepas de *E. meliloti* promisorias por su eficiencia para su uso como inoculantes de alfalfa en suelos ácidos

En Uruguay, como consecuencia del incremento del área usada para la agricultura ocurrido en los últimos 20 años, los cultivos forrajeros se han desplazado hacia suelos con menor potencial productivo (Fabiano et al., 2023). Debido a esto, es de interés contar con cepas de rizobios eficientes, que permitan desarrollar inoculantes aptos para estos nuevos ambientes (Sotelo et al. 2011) dado que las leguminosas forrajeras son clave en la alimentación sostenible del ganado, en un contexto de demanda creciente de productos pecuarios (FAO, 2011, Michalk et al., 2019).

Debido a esto, en el marco de un proyecto Fagro-INIA se evaluó en condiciones controladas la eficiencia simbiótica, como peso seco acumulado de la parte aérea en dos cortes, de pares simbióticos establecidos entre alfalfa cultivar Chaná y 83 cepas de *E. meliloti*. De esas cepas, 55 procedían de nódulos de plantas obtenidas en 5 sitios en la Cuenca lechera, y 28 de diferentes colecciones. Las 55 cepas que integran la colección Fagro-INIA se identificaron según su perfil ERIC entre 219 aislamientos de nódulos de alfalfa. Esto permitió estimar una diversidad del orden del 25%, inferior a la reportada en suelos de Uruguay para cepas de *Mesorhizobium sp.* que nodulan *L. corniculatus* situada en 65% (Sotelo et al., 2011), cepas de *Bradyrhizobium sp.* que nodulan *Lotus uliginosus* situada en 49% (Batista et al., 2015) y cepas de *Rhizobium sp.* que nodulan *T. repens* y *T. pratense* situada en 48% (Gutiérrez, 2017). Es más, la diversidad estimada de las cepas de alfalfa podría ser aún menor dado que los perfiles se compararon dentro de cada sitio de colecta, pero no entre los distintos sitios, de manera que puede haber perfiles repetidos. De todas formas, no fue un objetivo de esta tesis establecer la diversidad de rizobios en los suelos ácidos, sino realizar un primer *screening* de cepas eficientes.

En suelos con pH extremos, generalmente ocurre una disminución de la diversidad de rizobios (Del Papa et al., 2003). De todas formas, los aislamientos de suelos de la Cuenca Lechera provienen de suelos con pH levemente ácidos (Morón and Baethgen, 1996) entre 5.5 y 7. Así, la menor diversidad de cepas de alfalfa respecto a la reportada para trébol y lotus en Uruguay podría deberse al pH del suelo, pero también estar relacionada a otros parámetros (Delić et al., 2016). De cualquier forma, tanto en Argentina como en Uruguay, para el desarrollo de inoculantes de alfalfa la búsqueda se ha centrado en cepas aptas para suelos ácidos, dado que en extensas zonas donde se cultiva esta leguminosa los suelos presentan dicha característica (Racca et al., 2013). Por esto, las cepas de *E. meliloti* que integran la colección Fagro-INIA proceden de la zona denominada Cuenca Lechera, donde ocurren problemas de implantación y producción de la pradera si no se inocula.

Cuando se analizó la eficiencia simbiótica de las cepas procedentes de cada sitio de colecta, ninguna de las 44 cepas aisladas en la Estanzuela superó a la del inoculante comercial, y el 44 % no se pudo distinguir significativamente de este según la producción de biomasa (Cuadros 3, 4, 5 y 6). Sin embargo, en el sitio Productores, que incluye una amplia zona de los departamentos de Canelones, Florida y San José, 2 cepas superaron el rendimiento del inoculante comercial, y del total de cepas de ese sitio, el 73% no logró diferenciarse de este (Cuadro 7). Un porcentaje algo inferior de cepas eficientes aisladas de nódulos de alfalfa de suelos de Serbia fue reportado por Delic et al., (2010), donde se propone que estas puedan ser usadas para la selección de inoculantes para esta leguminosa.

También es interesante el hecho que un 55% de las cepas de la colección Fagro-INIA presentan una eficiencia simbiótica igual o mayor a la del inoculante comercial. Hay que tener en cuenta, que estas cepas se aislaron de nódulos de aspecto “eficiente”, que según Perticari et al. (2006) son aquellos de aspecto ramificado, situados mayormente en raíces principales y de color rosado. Sin embargo, para las cepas aisladas de lotus y trébol no consta que siempre se usara ese criterio.

Entre los aislamientos de nódulos de lotus y trébol, crecidos en diferentes suelos de Uruguay, también se encontró un porcentaje interesante de cepas de rizobios nativos – naturalizados tan eficientes o más que los respectivos inoculantes comerciales. En tréboles, el porcentaje de cepas tan o más eficientes que el inoculante comercial fue de 78% en *T. pratense* (Batista, 2013) y 83% en *T. repens* (Gutiérrez, 2017). Por otro lado, entre los rizobios aislados de diferentes especies de *Lotus* también se observó un porcentaje de cepas tan o más eficientes que el inoculante comercial. Así, en los aislamientos de *L. uliginosus* este porcentaje se situó en 50% (Camargo, 2012), en los de *L. corniculatus* en 80% (Sotelo et al., 2011) y en los de *L. angustissimus* en 60% (Di Lorenzo et al., 2023).

La colección UNLP-IIBCE se generó en el marco de un proyecto en el que participaron diferentes instituciones (Castro-Sowinski et al 2002). Dos cepas de esta colección, B399 aislada en Argentina (UNLP) y la cepa CE143 aislada en Uruguay (IIBCE), exhibieron el mismo rendimiento que el inoculante comercial, cepa U143 (Cuadro 8). En el cultivar Chaná, en condiciones controladas, la cepa B399 del INTA, ampliamente utilizada como inoculante comercial de alfalfa en Argentina (de Benedetto et al., 2017) fue tan eficiente como la cepa U143 (Cuadro 8). Por otra parte, la cepa LPU63 ácido tolerante aislada de suelos de Argentina, competitiva y eficiente a pH 5.6 (Segundo et al., 1999), no logró igualar la eficiencia simbiótica de la cepa U143 a pH 6.2 (Cuadro 8). De todas formas, es una cepa eficiente en pH ácido (Segundo et al., 1999), mientras que la eficiencia simbiótica de la cepa U143 disminuye en ese pH (Cuadro 11).

Con las cepas procedentes de las colecciones MGAP y USDA, la situación fue diferente en el sentido que, si bien fueron seleccionadas por su eficiencia simbiótica para integrar estas colecciones, se observó una diversidad de rendimientos, y solo algunas cepas igualaron la eficiencia de la cepa U143 (Cuadros 9 y 10). Probablemente estas diferencias sean consecuencia de que dichas cepas fueron seleccionadas como eficientes en otros cultivares de alfalfa y/o en otras condiciones de crecimiento.

Respecto a los aislamientos de la colección Fagro-INIA que produjeron la misma biomasa que el control sin inocular, a pesar de provenir de nódulos de aspecto “eficiente”,

una posible explicación podría ser que hubieran sido obtenidos de nódulos coocupados, y en el proceso de purificación se seleccionaron colonias de las cepas ineficientes que no se pudieron distinguir por su aspecto. La coocupación de nódulos de alfalfa ha sido descrita por diferentes autores (Checcucci et al., 2016; Mendoza-Suarez et al., 2020; Berais-Rubio et al., 2023).

La biomasa producida por los pares simbióticos evaluados en distintos ensayos tuvo una alta variabilidad. Esta variabilidad es llamativa debido a que los ensayos se hicieron en condiciones controladas, pero la cámara utilizada no tiene un control preciso de temperatura ambiente y no regula la humedad relativa. Adicionalmente, la fuente de luz usada fue con lámparas de luz incandescente, que puede haber tenido variaciones en su emisión en un período de tiempo superior al año durante el que se hicieron las evaluaciones, según consta en la colección. Por estas razones para analizar los resultados de eficiencia simbiótica se resolvió utilizar el método de contraste respecto al inoculante comercial U143 dentro de cada ensayo. Con esta metodología se identificaron 27 cepas de la Cuenca lechera promisorias, por su eficiencia igual (25 cepas) o mayor (2 cepas) que la cepa U143 usada como inoculante comercial. Entre esas cepas promisorias se seleccionaron las cepas L14, CA1 y S8 para evaluar su eficiencia simbiótica a pH 5.5. A ese pH, estas cepas indujeron la misma producción de biomasa que la cepa U143 de *E. meliloti* y el control regado con N, razón por la cual fueron consideradas promisorias para su evaluación en campo (Cuadro 11), ensayo que se realiza actualmente en la Estación Experimental de INIA Tacuarembó (Rafael Reyno com. pers.).

Respecto al origen de estas cepas promisorias, los resultados sugieren que podrían derivar genéticamente de las cepas eficientes usadas como inoculantes, y que la transferencia lateral de genes entre rizobios juega un papel fundamental en la estructuración de las poblaciones (Laguerre et al., 2001). Estas nuevas cepas pueden tener diferente eficiencia simbiótica y capacidad de ocupar nódulos que el inoculante (Perticari et al.; 2006), como también ha sido observado en poblaciones de rizobios que nodulan trébol (Tartaglia et al., 2019), *L. corniculatus* (Sotelo et al., 2011) y *L. uliginosus* (Batista et al., 2013).

Cuando la concentración de rizobios es menor a 300 rizobios por gramo de suelo es esperable una respuesta a la inoculación, mientras que la misma puede pasar inadvertida cuando la concentración es mayor a 1000 rizobios por gramo de suelo (Herridge, 2008). Por esto, la alta respuesta a la inoculación obtenida en suelos del Uruguay sugiere una baja prevalencia de cepas eficientes, o bien la presencia de poblaciones de cepas ineficientes (Castro-Sowinski et al., 2002; Racca et al., 2013). La presencia de cepas eficientes, como las identificadas en esta tesis en suelos de la Cuenca Lechera, en Argentina (Segundo et al., 1999), Polonia (Kozaczuk et al. 2014), Reino Unido (Roberts et al., 2017) y Brasil (Xavier et al., 2005) hace que nos preguntemos si es necesario inocular alfalfa. Estos autores coinciden en que la inoculación de alfalfa con cepas eficientes es necesaria porque mejora la producción de las praderas, dado que las poblaciones locales no siempre logran establecer simbiosis eficientes. En Uruguay cuando la alfalfa no es inoculada, se generan situaciones de bajo rendimiento que pueden derivar en la pérdida de la pradera (Rebuffo, 2000).

2. Borrador del genoma de la cepa elite U143 de *E. meliloti* usada en Uruguay como inoculante de alfalfa

La cepa U143 es utilizada en Uruguay como inoculante comercial de los diferentes cultivares de alfalfa. Se ha reportado que esta cepa es responsable de mejoras del 240% en la producción de biomasa en la primera cosecha y más de 80% en el primer año de pastura, con una ocupación de 60-70% de los nódulos, y un 70% de N proveniente del aire (Racca et al., 2013). También se ha demostrado que las plantas de alfalfa inoculadas con el inoculante comercial en las condiciones de los suelos del Uruguay pueden producir un 50% más de biomasa total cuando se compara con plantas de alfalfa sin inocular (Rebuffo et al., 2000). Lo mismo ha sido observado en Serbia por Delic et. al (2016). Debido a esto, la cepa U143 considerada “elite”, se utiliza como inoculante comercial desde 1991 primero en mezcla con la cepa U137, y desde 2004 como única cepa (Altier et al., 2013; Fabiano et al., 2023). El análisis del borrador del genoma de esta cepa confirmó que

pertenece a la especie *E. meliloti* a partir de los resultados obtenidos por ANI y TYGS. Esta cepa tiene un genoma 6,807,606 pb con un total de 5.666 genes homólogos identificados, algo mayor que lo observado en *E. medicae* USDA1037 (5.084) y en *E. meliloti* 2011 (5.462) (Figura 13B). El borrador del genoma de esta cepa también contribuye a aumentar la cantidad de especies disponibles para ser analizadas a través de filogenomas (Fagorzi et al., 2020).

Cuando se analizó la filogenia establecida tanto a partir de la secuencia del gen 16S ARNr como a partir del genoma completo, se evidenció que la cepa U143 agrupó junto con la cepa de referencia *E. meliloti* 2011, separada de la cepa USDA1037 de *E. medicae* que nodula a *M. sativa*, *M. truncatula*, *M. orbicularis*, *M. polymorpha* y *M. rugosa* (Wang et al., 2020; Rome et al., 1996). Cuando se analizaron los genes simbióticos *nifH* y *nodA* concatenados también se observó que las secuencias de las cepas 2011 y 1021 *E. meliloti* son idénticas, y que la cepa U143 agrupó fuertemente junto a estas.

Los resultados de la comparación de los genomas y de los genes simbióticos evidenciaron que la cepa U143, adaptada a las condiciones edafoclimáticas del Uruguay y utilizada durante más de 30 años como inoculante comercial, está relacionada a la cepa de referencia de *E. meliloti* 2011, una cepa resistente a estreptomicina derivada de la cepa SU 47 (Sallet et al., 2013; Meade et al., 1982).

A su vez, tanto *E. medicae* A321 como la cepa de referencia de *E. meliloti* y la cepa U143 forman un superclado con la cepa parásita de alfalfa *R. favelukesii* ORY1, la cual también nodula a *M. sativa*, y no están relacionadas con las otras especies del género *Ensifer* que establecen simbiosis con diferentes leguminosas.

En cuanto a los subsistemas generados a partir de la anotación del genoma, la cepa U143 tiene la vía completa de desnitrificación que incluye los *clusters nap*, *nir*, *nor* y *nos* que permiten respirar el nitrato, tal como está descrito para *E. meliloti*. Los rizobios que presentan esta vía de desnitrificación pertenecen principalmente a los géneros *Bradyrhizobium* y *Ensifer* (Torres et al., 2014). La desnitrificación puede ocurrir en estos rizobios tanto cuando se encuentran en vida libre en condiciones microaeróbicas, como en células nodulares donde la concentración de oxígeno es baja para permitir la actividad

nitrogenasa (Pacheco et al., 2023). La capacidad de respirar nitrato, es decir de desnitrificar, si bien le permite a la bacteria el crecimiento en condiciones microaeróbicas, presenta desventajas económicas derivadas de la pérdida de N de los suelos, y ecológicas debido a la emisión de N_2O , un gas con potente efecto invernadero mayor que el dióxido de carbono (Pacheco et al., 2023).

La presencia de la vía de desnitrificación en inoculantes comerciales es una característica no deseada, por lo que se está considerando necesaria la producción de “inoculantes inteligentes”, basados en cepas que además de eficientes, competitivas y persistentes no respiren nitrato, para evitar las pérdidas de N de los ecosistemas y la emisión de gases de efecto invernadero. Una de las estrategias de selección de cepas para el desarrollo de este tipo de inoculantes es la búsqueda de mutantes espontáneos *nap⁻* que no desnitrifiquen.

En *E. meliloti* se han identificado los genes *hrrP* y *sapA* que codifican metalopeptidasas de la familia M16 que modulan la eficiencia simbiótica (Price et al., 2015; Benedict et al., 2021). En el 10% de las cepas de *E. meliloti* se ha identificado en un plásmido accesorio el gen *hrrP* (Benedict et al., 2021), el cual no fue identificado en el genoma de la cepa U143. Sin embargo, en esta cepa se encontró una secuencia homóloga a la de la peptidasa SapA cromosómica reportada en *E. meliloti* 1021, la cual no tiene efectos tan severos como la proteína HrrP sobre la simbiosis, aunque cuando se sobreexpresa si puede afectar negativamente a la simbiosis (Benedict et al., 2021; Price et al., 2015). Esta secuencia cromosómica es conservada en diferentes grupos de rizobios que nodulan distintas leguminosas, con un efecto variable sobre la simbiosis (Berais-Rubio et al., 2023; Morel-Revetria et al., 2023).

3. Identificación de cepas tipo Oregon en suelos ácidos del Uruguay

Las cepas parásitas tipo Oregon constituyen un problema para la implantación y producción de pasturas de alfalfa (Torres-Tejerizo et al., 2011). Estos rizobios han sido identificados en EE.UU., Canadá (Eardly et al., 1985; Bromfield et al., 2010) y Argentina,

donde fue descrita la nueva especie *R. favelukesii* (Torres-Tejerizo et al., 2016). Castro-Sowinski et al., (2002) propusieron la presencia de rizobios tipo Oregon en suelos del Uruguay, pero su existencia no había sido confirmada. En esta tesis se confirmó que las cepas tipo Oregon están presentes según el análisis de la secuencia del genoma completo de ORY1, uno de los cinco aislamientos obtenidos en suelos ácidos de Uruguay, donde hay problemas de rendimiento de alfalfa (Figura 16A). La cepa ORY5 presentó el mismo perfil BOX que ORY1, y un porcentaje de 16S ARNr 100% por lo que también pertenece a la especie *R. favelukesii*, sin embargo, las cepas ORY2, ORY3 y ORY4 presentaron alta homología, pero un perfil diferente, por lo que no se puede confirmar que pertenezcan a esta especie.

M. sativa puede ser nodulada por *R. favelukesii* la cual tiene un comportamiento parásito, y por *R. tibeticum* (Stajkovic-SrbinoVIC et al., 2012; Hou et al., 2009), la cual tiene múltiples hospederos como *Trigonella archiducis-nicolai*, *Medicago lupulina*, *Phaseolous vulgaris*, entre otros (Abd-Alla et al., 2014; Torres Tejerizo et al., 2017). En este sentido, en el análisis filogenómico se demostró que las cepas de *R. favelukesii* (ORY1, Or191, y LPU83) agruparon juntas, separadas de *R. tibeticum* CCBAU85039 (Figura 16A). Además, la comparación de genomas basado en genes en común reveló que la cepa ORY1 tiene mayor similitud a la cepa Or191 aislada de EE.UU., que la cepa LPU83 aislada de Argentina (Figura 16C). Solo el 2.7% de los genes de ORY1 son específicos de esta cepa, en la cual se encontraron mayoritariamente genes no caracterizados y no se identificó ningún gen simbiótico entre ellos.

Los resultados sugieren una mayor diversidad de cepas tipo Oregon a la reportada en suelos argentinos. Entre las 5 cepas analizadas aisladas de suelos ácidos del Uruguay, 2 presentaron el mismo perfil BOX que las cepas LPU83 y Or191, colectadas en Argentina y EEUU, respectivamente, mientras que las otras 3 cepas exhibieron un perfil diferente a estas. A diferencia del resultado obtenido, en suelos ácidos de Argentina se identificaron 12 aislamientos que presentaron el mismo perfil ERIC que la cepa Or191 de EE.UU. (Wegener et al., 2001). Esta baja diversidad genética es diferente a lo que generalmente se reporta para rizobios con una amplia distribución geográfica (Martínez-Romero y

Caballero-Mellado, 1996), y a lo que se observa en rizobios que nodulan trébol (Irisarri et al., 2019, Tartaglia et al., 2019) y lotus (Sotelo et al., 2011, Batista et al., 2013), aislados de suelos del Uruguay. De todas formas, los 12 aislamientos realizados por Wegener et al. (2001) fueron seleccionados de una colección inicial de 465 aislamientos de suelos de Argentina, con pH entre 5.5 y 6.2, cultivados a pH 5.0 (Del Papa et al., 1999). Esto significa que los 12 aislamientos con perfiles ERIC idénticos fueron seleccionados por su tolerancia a bajo pH, y generalmente las condiciones ambientales extremas reducen la diversidad genética. En este sentido hay que considerar que el pH de los suelos de Uruguay de donde las cepas fueron aisladas es levemente ácido (pH 5.4 – 5.8), lo que podría explicar la mayor diversidad genética observada en nuestra colección.

4. Competencia de las cepas ORY1 vs. U143

La alta competitividad de la cepa parásita ORY1 se evidenció por la ocupación de nódulos en el tratamiento 1% (Figura 17A). Es interesante el hecho de que, la producción de biomasa fue alta y no se diferenció estadísticamente de la producida por U143 inoculada sola (Figura 17B), incluso a pesar de que más del 50% de los nódulos estaban ocupados por la cepa parásita ORY1. Estos resultados sugieren que en plantas inoculadas con la cepa U143, si la relación 1:99 (rizobios parásitos:eficientes) representa la situación de abundancia relativa en el suelo, a los 21 días después de la siembra los rizobios parásitos no interfieren con la producción de biomasa. En ese momento es presumible que la cepa utilizada como inoculante comercial esté en mayor concentración que los rizobios parásitos. Por otro lado, los resultados sugieren que, si la carga de inoculante comercial es muy baja, o si la concentración de rizobios parásitos es muy alta, puede haber consecuencias severas en la producción de biomasa (Figura 17B).

En primera instancia, parece contraintuitivo el hecho de que se observe una alta producción de biomasa cuando la ocupación de nódulos por la cepa parásita es mayor a 50%. Esto en parte puede ser explicado porque el tratamiento 1% tiene aproximadamente un 30% más de nódulos no teñidos (eficientes) que el tratamiento 99% (Figura 17D). También se debe destacar que cepas que cuentan con el plásmido HR suelen inducir una

mayor producción de nódulos que las cepas eficientes, aunque los nódulos resultantes sean menos beneficiosos para el hospedero (Crook et al., 2012). Esto es coherente con los resultados obtenidos, en los que se observó un número mayor de nódulos totales en el tratamiento 99% con mayor concentración de la cepa ORY1 (Figura 17C). De todas maneras, los nódulos producidos por la cepa parásita no fueron eficientes para la planta como los inducidos por la cepa comercial, los cuales mostraron mayor tamaño, al igual que lo reportado por Crook et al. (2012). Por esto, si se considera que solo los nódulos no teñidos fijan activamente nitrógeno, no es sorprendente que el tratamiento 1% haya producido mayor cantidad de biomasa que el tratamiento 99%.

Otro factor a tener en cuenta cuando se analiza la producción de biomasa, incluso cuando la ocupación de nódulos por ORY1 es alta (tratamiento 99%), es la posibilidad de que existan nódulos coocupados por cepas eficientes e ineficientes, como han reportado Checcucci et al. (2016) en el sistema *M. sativa*- *E. meliloti*. Por esto, se cree que muchos de los nódulos azules también podrían estar ocupados por la cepa eficiente, lo cual contribuiría a la fijación de nitrógeno. De hecho, se observaron algunos nódulos bien desarrollados que se encontraban ocupados por la cepa parásita (Figura 17G), sugiriendo fuertemente la posibilidad de coocupación. Estas consideraciones evidencian la importancia de no evaluar solamente la competitividad como porcentaje de nódulos ocupados (Irisarri et al., 2019), sino en términos de nódulos totales, bien desarrollados, no desarrollados y coocupados, para entender mejor las consecuencias que esto tiene a nivel de la planta.

5. Identificación de dominios peptidasa tipo M16 en la cepa ORY1

Uno de los plásmidos identificados en el genoma de ORY1 codifica dos peptidasas contiguas de tipo M16, altamente conservadas en los genomas de las 3 cepas disponibles de *R. favelukesii*. El análisis filogenético de peptidasas putativas M16 identificadas en plásmidos del género *Rhizobium*, evidenció que las peptidasas de *R. favelukesii* no agrupan según la especie en el árbol filogenético (Figura 18), de forma similar a lo que ocurre con estas peptidasas en cepas del género *Ensifer*. Esto ha sido propuesto como

resultado de eventos de transferencia lateral que juegan un papel importante en los caminos evolutivos de estas peptidasas plasmídicas (Price et al., 2015).

Las peptidasas plasmídicas M16 han sido estudiadas en *E. meliloti*, y podrían estar vinculadas a restricciones funcionales del hospedero (Price et al., 2015). Las dos peptidasas M16 codificadas en el plásmido de *R. favelukesii* son adyacentes y ambas presentan la misma arquitectura de dominios que la HrrP de *E. meliloti*, donde una secuencia codifica para dominios M16-M16C, y la siguiente secuencia codifica para otro dominio M16C. Dada la proximidad de los genes que codifican para la peptidasa putativa HrrP, se propone que la secuencia que codifica para esta proteína podría ser consecuencia de un evento de fisión génica, ya que esto se ha reportado en un conjunto de bacterias Gram + y Gram – (Pasek et al., 2006). Adicionalmente, estas proteínas podrían estar implicadas en un mecanismo similar de restricción del hospedero, como el descrito en *E. meliloti* (Price et al., 2015).

Las peptidasas HrrP y SapA son capaces de digerir péptidos NCR producidos por el hospedero, principalmente el NCR169, el cual es indispensable para la diferenciación de los bacteroides. Estos péptidos son necesarios para el correcto establecimiento de la simbiosis entre *E. meliloti* y *M. sativa* (Horváth et al., 2015; Price et al., 2015; Benedict et al., 2021). La HrrP plasmídica degrada péptidos NCR, atribuyéndole al rizobio un mecanismo activo de control del hospedero (Pan y Wang, 2017; Benedict et al., 2021), y su expresión está generalmente asociada con un comportamiento parásito (Price et al., 2015). La presencia de genes putativos *hrrP* y *sapA* en las cepas ORY1, Or191 y LPU83 de *R. favelukesii* podrían explicar parcialmente el comportamiento parásito evidenciado por el atípico aspecto globular de sus nódulos, la hipernodulación y baja eficiencia simbiótica.

De esta forma, todo indica que las consecuencias negativas sobre la implantación y producción de las praderas de alfalfa debidas a cepas parásitas tipo Oregon presentes en suelos de la Cuenca Lechera pueden ser superadas con el uso del inoculante rizobiano adecuado.

Conclusiones

La menor diversidad de cepas de rizobios que nodulan alfalfa respecto a las aisladas de otras leguminosas forrajeras puede deberse a los suelos levemente ácidos de donde fueron aisladas y/o al criterio usado para la selección de nódulos.

Como se ha observado en rizobios aislados de otras leguminosas forrajeras, un alto porcentaje de las cepas de *E. meliloti* colectadas en la Cuenca Lechera exhibieron una eficiencia simbiótica igual o mayor a la del inoculante comercial. Esto puede ser consecuencia de que una vez introducida la leguminosa y su inoculante, se generan poblaciones naturalizadas igualmente eficientes que este.

La cepa utilizada como inoculante comercial en Uruguay pertenece a la especie *E. meliloti*, porque tanto genes cromosómicos como plasmídicos la agrupan fuertemente junto a la cepa de referencia *E. meliloti* 2011.

Al igual que otras cepas de *E. meliloti*, la cepa U143 es capaz de respirar nitrato en vida libre, por lo que sería interesante la búsqueda de mutantes espontáneos *nap⁻* para evitar las desventajas ecológicas y económicas que presenta la capacidad de desnitrificar de los inoculantes comerciales.

En Uruguay, la alfalfa se siembra principalmente en suelos ácidos, en los que se confirmó la presencia de cepas parásitas tipo Oregon, cuyos perfiles BOX permiten suponer que la diversidad de estas cepas es mayor a la reportada previamente.

La cepa ORY1 es significativamente más competitiva que la cepa U143, y en las primeras etapas del desarrollo de la planta la pérdida de biomasa no es significativa en la relación ensayada en el tratamiento 1%. Esto respalda la necesidad de inocular alfalfa, sobre todo en áreas donde pueda haber presencia de cepas tipo Oregon.

El comportamiento parásito de las cepas tipo Oregon, asociado a la baja eficiencia simbiótica, hipernodulación y aspecto globular de nódulos, podría deberse a la presencia de genes *hrrP* y *sapA*, descritos por primera vez en *R. favelukesii* en esta tesis, lo que sería interesante confirmar.

Referencias

Abd-Alla, M. H., Issa, A. A., and Ohyama, T. 2014. "Impact of harsh environmental conditions on nodule formation and dinitrogen fixation of legumes," in *Advances in biology and ecology of nitrogen fixation*, (London: IntechOpen) vol. 9., 1.

Altier N., Beyhaut E., Pérez C. 2013. Root Nodule in Rhizosphere Bacteria for Forage Legume Growth Promotion and Disease Management. In: Maheshwari DK, Saraf M, Aeron A, editors. *Bacteria in agrobiolgy: Crop productivity*. Berlin: Springer Verlag;. p. 167–84.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. doi:10.1016/s0022-2836(05)80360-2

Alunni, B., Kevei, Z., Redondo-Nieto, M., Kondorosi, A., Mergaert, P., & Kondorosi, E. 2007. Genomic organization and evolutionary insights on GRP and NCR genes, two large nodule-specific gene families in *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(9), 1138-1148.

Azimi, S., Kaur, T., & Gandhi, T. K. 2020. A deep learning approach to measure stress level in plants due to Nitrogen deficiency. *Measurement*, 108650. doi:10.1016/j.measurement.2020.108650

Aziz, R.K.; Bartels, D.; Best, A.A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R.A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E.M., Kubal, M. 2008. The RAST server: Rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genom.*, 9, 75. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>

Bahuguna, R. N., Pal, M., Singh, M. P., Khetarpal, S., & Pandey, R. 2011. Physiology of nitrogen fixation in legumes under elevated CO₂. *Climate change: impacts and adaptations in crop plants. Today and tomorrow, New Delhi*, 213-228.

Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., et al. 2012. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 19 (5), 455–477. doi: 10.1089/ cmb.2012.0021

Bateman, A., Coin, L., Durbin, R., Finn, R. D., Hollich, V., Griffiths-Jones, S., et al. 2004. The pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* 32 (suppl_1), D138–D141. doi: 10.1093/nar/gkh121

Bates B.C., Kundzewicz Z.W., Wu S., Palutikof J.P. 2008. Climate Change and Water. Technical Paper of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Geneva, Switzerland: IPCC Secretariat; 210.

Batista L., Irisarri P., Rebuffo M., Cuitiño M.J., Sanjuán J., Monza J. 2015. Nodulation competitiveness as a requisite for improved rhizobial inoculants of *Trifolium pratense*. *Biol Fertil Soils* 51:11-20.

Batista, L., Tomasco, I., Lorite, M. J., Sanjuán, J., and Monza, J. 2013. Diversity and phylogeny of rhizobial strains isolated from *Lotus uliginosus* grown in Uruguayan soils. *Appl. Soil. Ecol.* 66, 19–28. doi: 10.1016/j.apsoil.2013.01.009

Baxter, L., Proyash R., Picot E., Watts J., Jones A., Wilkinson H., Schäfer P., Gifford M., Lagunas B. 2021. Comparative Genomics across Three Ensifer Species Using a New Complete Genome Sequence of the Medicago Symbiont *Sinorhizobium* (Ensifer) *meliloti* WSM1022. *Microorganisms* 9, no. 12: 2428. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122428>

Becker, A. B. & Roth, R. A. 1992. An unusual active site identified in a family of zinc metalloproteases. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 89, 3835–3839.

Benedict, A. B., Ghosh, P., Scott, S. M., and Griffiths, J. S. 2021. A conserved rhizobial peptidase that interacts with host-derived symbiotic peptides. *Sci. Rep.* 11 (1), 1–10. doi: 10.1038/s41598-021-91394-x

Berais-Rubio A., Morel Revetria M., Giménez M., Signorelli, S., Monza, J. 2023. Competitiveness and symbiotic efficiency in alfalfa of *Rhizobium favelukesii* ORY1 strain in which homologous genes of peptidases HrrP and SapA that negatively affect symbiosis were identified. *Front. Agron.* 4:1092169. doi: 10.3389/fagro.2022.1092169

Beringer, J. E. 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Gen. Microbiol.* 84, 188–198. doi: 10.1099/00221287-84-1-188

Berman-Frank, I.; Chen, Y.B.; Gerchman, Y.; Dismukes, G.C.; Falkowski, P.G. 2005. Inhibition of nitrogenase by oxygen in marine cyanobacteria controls the global nitrogen and oxygen cycles. *Biogeosci. Discuss.*, 2, 261–273.

Bodenhofer, U., Bonatesta, E., Horejs-Kainrath, C., and Hochreiter, S. 2015. Msa: An r package for multiple sequence alignment. *Bioinformatics* 31 (24), 3997– 3999. doi: 10.1093/bioinformatics/btv494.

Boetzer, M., Henkel, C. V., Jansen, H. J., Butler, D., & Pirovano, W. 2010. Scaffolding pre-assembled contigs using SSPACE. *Bioinformatics*, 27(4), 578–579. doi:10.1093/bioinformatics/btq683

Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170 bootstrap. *evolution* 39 (4), 783–791. doi: 10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x

Bouton, J. H. 2012. An overview of the role of lucerne (*Medicago sativa* L.) in pastoral agriculture. *Crop and Pasture Science*, 63(9), 734. doi:10.1071/cp12127

Bromfield, E. S. P., Tambong, J. T., Cloutier, S., Laguerre, G., Prevost, D., Laguerre, G. 2010. Ensifer, *Phyllobacterium* and *Rhizobium* species occupy nodules of *Medicago sativa* (alfalfa) and *Melilotus alba* (sweet clover) grown at a Canadian site without a history of cultivation. *Microbiology*. 156 (pt.2), 505–520. doi: 10.1099/mic.0.034058-0

Brown, H. E., Moot, D. J., & Pollock, K. M. 2003. Long term growth rates and water extraction patterns of dryland chicory, lucerne and red clover. Legumes for dryland pastures. New Zealand Grassland Association, Research Practice Series, 11, 91–99

Bueno, E., Richardson, D.J., Bedmar, E.J., & Delgado, M.J. 2009. Expression of *Bradyrhizobium japonicum* cbb3 terminal oxidase under denitrifying conditions is subjected to redox control. FEMS Microbiology Letters, 298(1), 20-28. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01711.x>

Castro-Sowinski S., Carrera I., Catalán A.I., Coll J., Martínez G. 2002. Occurrence, diversity and effectiveness of mid-acid tolerant alfalfa nodulating rhizobia in Uruguay. Symbiosis.;32:105– 18.

Chalk, P. M., & Craswell, E. T. 2017. An overview of the role and significance of 15N methodologies in quantifying biological N₂ fixation (BNF) and BNF dynamics in agro-ecosystems. Symbiosis, 75(1), 1–16. doi:10.1007/s13199-017-0526-z

Checucci, A., Azzarello, E., Bazzicalupo, M., Galardini, M., Lagomarsino, A., Mancuso, S., ... & Mengoni, A. 2016. Mixed nodule infection in *Sinorhizobium meliloti*–*Medicago sativa* symbiosis suggest the presence of cheating behavior. *Frontiers in Plant Science*, 7, 835.

Crook, M. B., Lindsay, D. P., Biggs, M. B., Bentley, J. S., Price, J. C., Clement, S. C., et al. 2012. Rhizobial plasmids that cause impaired symbiotic nitrogen fixation and enhanced host invasion. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 25 (8), 1026–1033. doi: 10.1094/MPMI-02-12-0052-R

Dai, Z.; Guo, X.; Yin, H.; Liang, Y.; Cong, J.; Liu, X. 2014. Identification of Nitrogen-Fixing Genes and Gene Clusters from Metagenomic Library of Acid Mine Drainage. *PLoS ONE*, 9, e87976.

De Benedetto J.P., García R., Peticari A. 2017. Efecto de la inoculación con diferentes cepas *Ensifer meliloti* sobre el rendimiento de forraje de Alfalfa. *Agrotecnica*.;25:8906.

De Bruijn, F. 1992. Use of Repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 58 (7): 2180 - 2187.

Debellé, F., Plazenet, C., Roche, P., Pujol, C., Savagnac, A., Rosenberg, C., ... & Dénarié, J. 1996. The NodA proteins of *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium tropici* specify the N-acylation of Nod factors by different fatty acids. *Molecular microbiology*, 22(2), 303-314.

Del Papa FM, Pistorio M, Balagué L, Draghi W, Wegener C, Peticari A, Niehaus K, Lagares A. 2003. A microcosm study on the influence of pH and the host-plant on the soil persistence of two alfalfa-nodulating rhizobia with different saprophytic and symbiotic characteristics. *Biol Fertil Soils*.;39(2):112–6.

Del Papa, M. F., Balague, L. J., Castro-Sowinski, S. C., Wegener, C., Segundo, E., Abarca, F. M., et al. 1999. Isolation and characterization of alfalfa-nodulating rhizobia present in acidic soils of central Argentina and Uruguay. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (4), 1420–1427. doi: 10.1128/AEM.65.4.1420-1427.1999

Delić D., Stajković O., Kuzmanović Đ., Rasulić N., Mićanović D., Radović J. & Tomić Z. 2010. Nitrogen fixation of *Sinorhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis: a five-year field trial. *Biotechnol. Anim. Husb.* 26: 601-609

Delić, D., Stajković-Srbinić, O., & Knežević-Vukčević, J. 2016. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) and *Sinorhizobium meliloti*: prospects of using rhizobial inoculants in Serbia. *Botanica Serbica*, 40(1).

Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M., Laura G., Margot T., Robledo C. 2014. InfoStat [Internet]. Version. Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Agropecuarias; 2014 [cited 2019 Set 26]. Available from: <http://www.infostat.com.ar>.

diCenzo, G. C., Zamani, M., Checcucci, A., Fondi, M., Griffitts, J. S., Finan, T. M., & Mengoni, A. 2019. Multidisciplinary approaches for studying rhizobium–legume symbioses. *Canadian Journal of Microbiology*, 65(1), 1-33.

DIEA-MGAP. 2022. Anuario Estadístico Agropecuario 2022. Montevideo: MGAP-DIEA. Consultedabr.2023. Availablein https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2022/O_MGAP_Anuario_estad%C3%ADstico_%202022-DIGITAL.pdf

Downie, J.A. 2014. Legume nodulation. *Curr. Biol.*, 24, R184–R190 e1002195. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002195

Eardly B.D., David B. 1985. Characterization of Rhizobia from Ineffective Alfalfa Nodules: Ability to Nodulate Bean Plants [*Phaseolus vulgaris* (L.) Savi.] *T. Appl Enviroment Microbiol.*;50(6):1422–7.

Eardly, B. D., Young, J. P., & Selander, R. K. 1992. Phylogenetic position of *Rhizobium* sp. strain Or191, a symbiont of both *Medicago sativa* and *Phaseolus vulgaris*, based on partial sequences of the 16S rRNA and *nifH* genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(6), 1809-1815.

Eddy, S. R. 2011. Accelerated profile HMM searches. *PloS Comput. Biol.* 7 (10), F., Niehaus, K. 2016. *Rhizobium favelukesii* sp. nov., isolated from the root nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Int. J. @ System. Evolut. Microbiol.* 66 (11), 4451–4457. doi: 10.1099/ijsem.0.001373 T

Ellis, T. H. N. (2008, June). Gene Discovery and Marker Development in Crop Legumes. In *Biological Nitrogen Fixation: Towards Poverty Alleviation through Sustainable Agriculture: Proceedings of the 15th International Nitrogen Fixation Congress and the 12th*

International Conference of the African Association for Biological Nitrogen Fixation (pp. 3-7). Dordrecht: Springer Netherlands.

Fagorzi, C., Ilie, A., Decorosi, F., Cangioli, L., Viti, C., Mengoni, A., & DiCenzo, G. C. 2020. Symbiotic and nonsymbiotic members of the genus *Ensifer* (syn. *Sinorhizobium*) are separated into two clades based on comparative genomics and high-throughput phenotyping. *Genome Biology and Evolution*, 12(12), 2521-2534. <https://doi.org/10.1093/gbe/evaa221>

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *evolution* 39 (4), 783–791. doi: 10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x

Ferguson, B. J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M.-H., Lin, Y.-H., Reid, D. E., & Gresshoff, P. M. 2010. *Molecular Analysis of Legume Nodule Development and Autoregulation. Journal of Integrative Plant Biology*, 52(1), 61–76. doi:10.1111/j.1744-7909.2010.00899.x

Filho, C. C. F., Andrade, M. H. M. L., Nunes, J. A. R., Jarquin, D. H., & Rios, E. F. 2023. Genomic prediction for complex traits across multiples harvests in alfalfa (*Medicago sativa* L.) is enhanced by enviromics. *The Plant Genome*, e20306.

Fu, L., Niu, B., Zhu, Z., Wu, S., and Li, W. 2012. CD-HIT: Accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics* 28, 3150–3152. doi:10.1093/bioinformatics/bts565

Galardini, M., Pini, F., Bazzicalupo, M., Biondi, E. G., & Mengoni, A. 2013. Replicon-dependent bacterial genome evolution: the case of *Sinorhizobium meliloti*. *Genome biology and evolution*, 5(3), 542-558. <https://doi.org/10.1093/gbe/evt027>

Galata, V., Fehlmann, T., Backes, C., and Keller, A. 2019. PLSDb: A resource of complete bacterial plasmids. *Nucleic Acids Res.* 47 (D1), D195–D202. doi: 10.1093/nar/gky1050

Garau, G., Reeve, W., Brau, L. 2005. The Symbiotic Requirements of Different Medicago Spp. Suggest the Evolution of Sinorhizobium Meliloti and S. Medicae with Hosts Differentially Adapted to Soil pH. Plant Soil 276, 263–277 <https://doi.org/10.1007/s11104-005-0374-0>

Giménez, M., Ferrés, I., and Iraola, G. 2022. Improved detection and classification of plasmids from circularized and fragmented assemblies. bioRxiv. doi: 10.1101/2022.08.04.502827

Glaeser, S. P., & Kämpfer, P. 2015. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. *Systematic and applied microbiology*, 38(4), 237-245.

Goris, J., Konstantinidis, K. T., Klappenbach, J. A., Coenye, T., Vandamme, P., Tiedje, J. M. 2007. DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(1), 81-91.

Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. 2013. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, 29(8), 1072–1075. doi:10.1093/bioinformatics/btt086

Gutiérrez Sena, P. 2017. Evaluación de rizobios para el desarrollo de un inoculante eficiente y competitivo de Trifolium repens. Tesis Magister en Ciencias Agrarias, Fagro, Montevideo.

Hawkesford, M. J. 2014. Reducing the reliance on nitrogen fertilizer for wheat production. *Journal of Cereal Science*, 59(3), 276–283. doi:10.1016/j.jcs.2013.12.001

Högberg, P. 1997. Tansley review no. 95 15N natural abundance in soil–plant systems. *The New Phytologist*, 137(2), 179-203. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1997.00808.x>

Horváth, B., Domonkosa, Á., Keresztb, A., Szucs, A., Ábrahám, E., Ayaydinc, F., et al. 2015. Loss of the nodule-specific cysteine rich peptide, NCR169 abolishes symbiotic nitrogen fixation in the medicago truncatula dnf7 mutant. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 112, 15232–15237. doi: 10.1073/pnas.1500777112

Hou, B. C., Wang, E. T., Li, Y.Jr., Jia, R. Z., Chen, W. F., Gao, Y., et al. 2009. Rhizobium tibeticum sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from Trigonella archiducis -nicolai (Širj.) vassilcz. Int. J. systematic evolutionary Microbiol. 59 (12), 3051–3057. doi: 10.1099/ijs.0.009647-0

Howieson, J. G., & Dilworth, M. J. 2016. *Working with rhizobia*. Canberra: Australian centre for international agricultural research.

Iannetta, P. P. M., Young, M., Bachinger, J., Bergkvist, G., Doltra, J., Lopez-Bellido, R. J., ... Begg, G. S. 2016. *A Comparative Nitrogen Balance and Productivity Analysis of Legume and Non-legume Supported Cropping Systems: The Potential Role of Biological Nitrogen Fixation*. *Frontiers in Plant Science*, 7. doi:10.3389/fpls.2016.01700

IPCC. 2022. Summary for policymakers. In: Shukla PR, Skea J, Slade R, Al Khourdajie A, van Diemen R, McCollum D, Pathak M, Some S, Vyas P, Fradera R, Belkacemi R, Hasija A, Lisboa G, Luz S, Malley J (eds) *Climate change 2022: mitigation of climate change*. contribution of working group iii to the sixth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Cambridge University Press, Cambridge and New York. <https://doi.org/10.1017/9781009157926.001>

Irisarri P., Cardozo G., Tartaglia C., Reyno R. 2019. Selection of Competitive and Efficient Rhizobia Strains for White Clover. *Front Microbiol* [Internet]. [cited 2019 Set 25];10:768. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.00768>.

Jensen, H. L. 1942. Nitrogen fixation in leguminous plants. i. general characters of nodule-bacteria isolated from species of medicago and 95 Trifolium in Australia. Proc. Linn. Soc. New South Wales 66, 98–108.

Jermakka, J., Wendling, L., Sohlberg, E., Heinonen, H., Merta, E., Laine-Ylijoki, J., Kaartinen, T., & Mroueh, U-M. (2015). *Nitrogen compounds at mines and quarries: Sources, behaviour and removal from mine and quarry waters - Literature study*. VTT Technical Research Centre of Finland. VTT Technology No. 226 <https://publications.vtt.fi/pdf/technology/2015/T226.pdf>

Jones, P., Binns, D., Chang, H.-Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., Hunter, S. 2014. InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, 30(9), 1236–1240. doi:10.1093/bioinformatics/btu031

Klepa, M. S., Helene, L. C. F., O' Hara, G., & Hungria, M. 2022. *Bradyrhizobium cenepequi* sp. nov., *Bradyrhizobium semiaridum* sp. nov., *Bradyrhizobium hereditatis* sp. nov. and *Bradyrhizobium australafricanum* sp. nov., symbionts of different leguminous plants of Western Australia and South Africa and definition of three novel symbiovars. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 72(7), 005446.

Koeuth, T., Versalovic, J., and Lupski, J. R. 1995. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. *Genome Res.* 5 (4), 408–418. doi: 10.1101/gr.5.4.408.html

Kondorosi E., Mergaert P., Kereszt A. 2013. A paradigm for endosymbiotic life: cell differentiation of *Rhizobium* bacteria provoked by host plant factors. *Annu Rev Microbiol* 67:611–628.

Labandera C, Baraibar C, Milian A. 1982. Tecnología de *Rhizobium*. In: *Trabajos Técnicos: Anuario 1982*. Montevideo: MAP;. p. 11–7.

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

Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics; Stackebrandt, E., Goodfellow, M., Eds.; John Wiley and Sons: New York, NY, USA,.

Laranjo, M., Alexandre, A., & Oliveira, S. 2014. Legume growth-promoting rhizobia: An overview on the *Mesorhizobium* genus. Microbiological Research, 169(1), 2–17. doi:10.1016/j.micres.2013.09.012

Le Quéré, A., Tak, N., Gehlot, H. S., Lavire, C., Meyer, T., Chapulliot, D., & Munive, J. A. 2017. Genomic characterization of *Ensifer aridi*, a proposed new species of nitrogen-fixing rhizobium recovered from Asian, African and American deserts. BMC genomics, 18(1), 1-24. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3447-y>

Lindström, K., & Mousavi, S. A. 2019. Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia. Microbial Biotechnology, 13(5), 1314–1335. doi:10.1111/1751-7915.13517

Liu, C.W.; Sung, Y.; Chen, B.C. 2014. Effects of Nitrogen Fertilizers on the Growth and Nitrate Content of Lettuce (*Lactuca sativa* L.). Int. J. Environ. Res. Public Health, 11, 4427–4440.

Liu, H. (2013). Ammonia synthesis catalysts: innovation and practice. World Scientific.

Martinez-Romero, E., and Caballero-Mellado, J. 1996. Rhizobium phylogenies and bacterial genetic diversity. Crit. Rev. Plant Sci. 15 (2), 113–140. doi: 10.1080/07352689.1996.10393183

Maruyama, Y., Chuma, A., Mikami, B., Hashimoto, W., & Murata, K. 2011. Heterosubunit Composition and Crystal Structures of a Novel Bacterial M16B Metallopeptidase. Journal of Molecular Biology, 407(1), 180–192. doi:10.1016/j.jmb.2011.01.038

Meade, H.M., Long, S.R., Ruvkun, G.B., Brown, S.E. and Ausubel, F.M. 1982, Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis, *J. Bacteriol.*, 149, 114–22.

Meier-Kolthoff, J.P.; Göker, M. 2019. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nat. Commun.*, 10, 2182. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10210-3>

Mendoza-Suárez, M. A., Geddes, B. A., Sánchez-Cañizares, C., Ramírez-González, R. H., Kirchhelle, C., Jorin, B., & Poole, P. S. 2020. Optimizing Rhizobium-legume symbioses by simultaneous measurement of rhizobial competitiveness and N₂ fixation in nodules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201921225. doi:10.1073/pnas.1921225117

Menna, P., Hungria, M., Barcellos, F. G., Bangel, E. V., Hess, P. N., & Martínez-Romero, E. 2006. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. *Systematic and Applied Microbiology*, 29(4), 315–332. doi:10.1016/j.syapm.2005.12.002

Mergaert, P., Uchiumi, T., Alunni, B., Evanno, G., Cheron, A., Catrice, O., ... & Kondorosi, E. 2006. Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the Rhizobium–legume symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(13), 5230-5235.

Michalczyk, M., Fiutak, G., & Tarko, T. 2019. Effect of hot water treatment of seeds on quality indicators of alfalfa sprouts. *LWT*, 113, 108270. doi:10.1016/j.lwt.2019.108270

Michalk, D. L., Kemp, D. R., Badgery, W. B., Wu, J., Zhang, Y., & Thomassin, P. J. 2019. Sustainability and future food security—A global perspective for livestock production. *Land Degradation & Development*, 30(5), 561-573.

Mielmann, A. 2013. *The utilisation of lucerne (Medicago sativa): a review. British Food Journal*, 115(4), 590–600. doi:10.1108/00070701311317865

Miller, J. H. 1972. Experiments in molecular genetics (New York: Cold Spring Harbor Laboratory), 466.

Mills, A., Lucas, R., & Moot, D. 2015. 'MaxClover' grazing experiment: I. annual yields, botanical composition and growth rates of six dryland pastures over nine years. *Grass and Forage Science*, 70, 557–570

Morón A., Baethgen, W. 1996. Relevamiento de la fertilidad de los suelos bajo producción lechera. INIA Serie Técnica 73. Montevideo, Uruguay. p16

Moulin, L., Béna, G., Boivin-Masson, C., & Stępkowski, T. 2004. *Phylogenetic analyses of symbiotic nodulation genes support vertical and lateral gene co-transfer within the Bradyrhizobium genus. Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30(3), 720–732. doi:10.1016/s1055-7903(03)00255-0

Mus, F., Crook, M. B., Garcia, K., Garcia Costas, A., Geddes, B. A., Kouri, E. D., ... Peters, J. W. 2016. *Symbiotic Nitrogen Fixation and the Challenges to Its Extension to Nonlegumes. Applied and Environmental Microbiology*, 82(13), 3698–3710. doi:10.1128/aem.01055-16

Oldroyd, G. E. D., Murray, J. D., Poole, P. S., & Downie, J. A. 2011. The Rules of Engagement in the Legume-Rhizobial Symbiosis. *Annual Review of Genetics*, 45(1), 119–144. doi:10.1146/annurev-genet-110410-132549 3

Oldroyd, G. E., & Downie, J. A. 2008. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 519-546.

Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G. D., Olsen, G. J., Davis, J. J., Disz, T., Stevens, R. 2014. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic acids research*, 42(D1), D206-D214. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1226>

Pacheco, P. J., Bedmar, E. J., Mesa, S., Tortosa, G., & Delgado, M. J. 2023. *Ensifer meliloti* denitrification is involved in infection effectiveness and N₂O emissions from alfalfa root nodules. *Plant and Soil*, 1-16.

Pan, H., and Wang, D. 2017. Nodule cysteine-rich peptides maintain a working balance during nitrogen-fixing symbiosis. *Nat. Plants* 3 (5), 1–6. doi: 10.1038/nplants.2017.48

Paradis, E., Claude, J., and Strimmer, K. 2004. APE: Analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics* 20 (2), 289–290. doi: 10.1093/bioinformatics/btg412

Pasek, S., Risler, J. L., and Brézellec, P. 2006. Gene fusion/fission is a major contributor to evolution of multi-domain bacterial proteins. *Bioinformatics* 22 (12), 1418–1423. doi: 10.1093/bioinformatics/btl135

Patra, P.S., Paul, T. 2019. Lucerne (Alfalfa). In: "Forage Crops of the World", Md. Hedayetullah and P. Zaman (Eds.), pp. 231-243. Volume I: Major Forage Crops. The 1st edition, CRC Press, Apple. Academic Press, Inc.

Perticari, A. 2006. Pasturas de alfalfa: importancia de una adecuada inoculación. In 2do Congreso Nacional de Conservación y Uso de Forrajes (pp. 1-5).

Pope, J., Wolkersdorfer, C., Sartz, L., Weber, A., & Wolkersdorfer, K. International Mine Water Association Congress New Zealand 2020.

Price, P. A., Tanner, H. R., Dillon, B. A., Shabab, M., Walker, G. C., and Griffiths, J. S. 2015. Rhizobial peptidase HrrP cleaves host-encoded signaling peptides and mediates symbiotic compatibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 15244–15249. doi: 10.1073/pnas.1417797112

Racca R.W., Campillo R. y Labandera C. 2007. Contribución a una producción sostenible de alfalfa mediante el manejo de microorganismos rizosféricos en Argentina,

Chile y Uruguay. Proyecto FTG-13/2001 Convenio FTG/RF-01-03-RGInforme Técnico Final. 43 p.

Ramírez-Bahena, M. H., Vargas, M., Martín, M., Tejedor, C., Velázquez, E., & Peix, Á. 2015. Alfalfa microsymbionts from different ITS and nodC lineages of *Ensifer meliloti* and *Ensifer medicae* symbiovar *meliloti* establish efficient symbiosis with alfalfa in Spanish acid soils. *Applied microbiology and biotechnology*, 99, 4855-4865. 10.1007/s00253-014-6347-6

Ranjbar, R., Tabatabaee, A., Behzadi, P., & Kheiri, R. 2017. Enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction (ERIC-PCR) genotyping of *Escherichia coli* strains isolated from different animal stool specimens. *Iranian journal of pathology*, 12(1), 25.

Rawlings, N. D. 2010. Peptidase inhibitors in the MEROPS database. *Biochimie*, 92(11), 1463-1483.

Rebuffo M, Bemhaja M, Risso D. 2006. Utilization of forage legumes in pastoral systems: state of art in Uruguay. *Lotus Newsletter*, 3:22–33.

Revetria, M.A.M.; Berais-Rubio, A.; Giménez, M.; Sanjuán, J.; Signorelli, S.; Monza, J. 2023. Competitiveness and Phylogenetic Relationship of Rhizobial Strains with Different Symbiotic Efficiency in *Trifolium repens*: Conversion of Parasitic into Non-Parasitic Rhizobia by Natural Symbiotic Gene Transfer. *Biology*, 12, 243. <https://doi.org/10.3390/biology12020243>

Richter, M.; Rosselló-Móra, R.; Oliver Glöckner, F.O.; Peplies, J. 2016. JSpeciesWS: A web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics*, 32, 929–931. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv681>

Rivas R, Velázquez E, Valverde A, Mateos PF, Martínez-Molina E. 2001. A two primers random amplified polymorphic DNA procedure to obtain polymerase chain reaction fingerprints of bacterial species. *Electrophoresis* 22(2): 1086- 1089.

Riviezzi, B., Cagide, C., Pereira, A., Herrmann, C., Lombide, R., Lage, M., et al. 2020. Improved nodulation and seed yield of soybean (*Glycine max*) with a new isoflavone-based inoculant of *Bradyrhizobium elkanii*. *Rhizosphere* 15, 100219. doi: 10.1016/j.rhisph.2020.100219

Roberts, R., Jackson, R. W., Mauchline, T. H., Hirsch, P. R., Shaw, L. J., Döring, T. F., & Jones, H. E. 2017. Is there sufficient Ensifer and *Rhizobium* species diversity in UK farmland soils to support red clover (*Trifolium pratense*), white clover (*T. repens*), lucerne (*Medicago sativa*) and black medic (*M. lupulina*)? *Applied Soil Ecology*, 120, 35–43. doi:10.1016/j.apsoil.2017.06.030

Rome, S., Fernandez, M. P., Brunel, B., Normand, P., & Cleyet-Marel, J.-C. 1996. *Sinorhizobium medicae* sp. nov., Isolated from Annual *Medicago* spp. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46(4), 972–980. doi:10.1099/00207713-46-4-972

Saikia, S.P.; Jain, V. 2007. Biological nitrogen fixation with non-legumes: An achievable target or a dogma. *Curr. Sci.*, 92, 317–322.

Sallet, E., Roux, B., Sauviac, L., Jardinaud, M. F. O., Carrere, S. É. B. A. S. T. I. E. N., Faraut, T., ... & Schiex, T. 2013. Next-generation annotation of prokaryotic genomes with EuGene-P: application to *Sinorhizobium meliloti* 2011. *DNA research*, 20(4), 339-354.

Sambrook, J., Fritsch, E. R., & Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Santamaría, R. I., Bustos, P., Pérez-Carrascal, O. M., Miranda-Sánchez, F., Vinuesa, P., Martínez-Flores, I., ... González, V. 2017. Complete Genome Sequences of Eight *Rhizobium* Symbionts Associated with Common Bean (*Phaseolus vulgaris*). *Genome Announcements*, 5(30). doi:10.1128/genomea.00645-17

Seemann, T. 2014. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30 (14), 2068–2069. doi: 10.1093/bioinformatics/btu153

Segundo E., Martinez-Abarca, F., Dillewijn, P.V., Fernández-López, M., Lagares, A., Martinez Drets, G., Niehaus, K., Pühler, A., Toro, N. 1999. Characterisation of symbiotically efficient alfalfa-nodulating rhizobia isolated from acid soils of Argentina and Uruguay. *FEMS Microbiol Ecol* 28:169-76

Sotelo, M., Irisarri, P., Lorite, M., Casaretto, E., Rebuffo, M., Sanjuán, J., et al. 2011. Diversity of rhizobia nodulating *Lotus corniculatus* grown in northern and southern regions of Uruguay. *Appl. Soil Ecol.* 49, 197–207. doi: 10.1016/j.apsoil.2011.05.005

Soumare, A., Diedhiou, A. G., Thuita, M., Hafidi, M., Ouhdouch, Y., Gopalakrishnan, S., & Kouisni, L. 2020. *Exploiting Biological Nitrogen Fixation: A Route Towards a Sustainable Agriculture*. *Plants*, 9(8), 1011. doi:10.3390/plants9081011

Stajković-Srbinić, O., De Meyer, S.E., Miličić, B. et al. 2012. Genetic diversity of rhizobia associated with alfalfa in Serbian soils. *Biol Fertil Soils* 48, 531–545. <https://doi.org/10.1007/s00374-011-0646-1>

Tamura, K., and Nei, M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10 (3), 512–526. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023

Tamura, K., Stecher, G., and Kumar, S. 2021. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Mol. Biol. Evol.* 38 (7), 3022–3027. doi: 10.1093/molbev/msab120

Tartaglia, C., Azziz, G., Lorite, M.J., Sanjuán, J., Monza, J. 2019. Phylogenetic relationships among introduced and autochthonous rhizobia nodulating *Trifolium* spp. in Uruguayan soils. *Appl Soil Ecol* 139:40-6

Torres Tejerizo, G. T., Del Papa, M. F., Draghi, W., Lozano, M., Giusti, M. de los Á., Martini, C., et al. 2011. First genomic analysis of the broad-host-range *Rhizobium* sp. LPU83 strain, a member of the low-genetic diversity Oregon-like rhizobium sp. group. *J. @ Biotechnol.* 155 (1), 3–10. doi: 10.1016/j.jbiotec.2011.01.011

Torres Tejerizo, G. T., Wibberg, D., Winkler, A., Ormeño-Orrillo, E., Martínez-Romero, E., Niehaus, K., et al. 2017. Genome sequence of the symbiotic type strain *Rhizobium tibeticum* CCBAU85039T. *Genome Announcements* 5 (4), e01513–e01516. doi: 10.1128/genomeA.01513-16

Torres Tejerizo, G., Rogel, M. A., Ormeño-Orrillo, E., Althabegoiti, M. J., Nilsson, J. Torres, M. J., Rubia, M. I., de la Peña, T. C., Pueyo, J. J., Bedmar, E. J., & Delgado, M. J. 2014. Genetic basis for denitrification in *Ensifer meliloti*. *Bmc Microbiology*, 14(1), 1-10.

Unkovich, M. J., & Pate, J. S. 2000. An appraisal of recent field measurements of symbiotic N₂ fixation by annual legumes. *Field Crops Research*, 65(2-3), 211-228.

Unkovich, M. J., Baldock, J., & Peoples, M. B. 2010. Prospects and problems of simple linear models for estimating symbiotic N₂ fixation by crop and pasture legumes. *Plant and Soil*, 329, 75-89. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0136-5>

van Belkum, A., & Hermans, P. W. 2001. BOX PCR fingerprinting for molecular typing of *Streptococcus pneumoniae*. *Antibiotic Resistance: Methods and Protocols*, 159-168.

Vincent J. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. IBP Handbook 15. Oxford. Blackwell Scientific Publications. 6 p.

Wang, X. L., Cui, W. J., Feng, X. Y., Zhong, Z. M., Li, Y., Chen, W. X., ... Tian, C. F. 2018. Rhizobia inhabiting nodules and rhizosphere soils of alfalfa: A strong selection of facultative microsymbionts. *Soil Biology and Biochemistry*, 116, 340–350. doi:10.1016/j.soilbio.2017.10.033

Wang, X., Ding, T., Li, Y., Guo, Y., Li, Y., & Duan, T. 2020. Dual inoculation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) with *Funnelliformis mosseae* and *Sinorhizobium medicae* can reduce *Fusarium* wilt. *Journal of Applied Microbiology*. doi:10.1111/jam.14645

Wegener, C., Schröder, S., Kapp, D., Pühler, A., Segundo López, E., Martínez-Abarca, F., et al. 2001. A population of twelve acid tolerant alfalfa nodulating *Rhizobium*

strains isolated from different sites in Argentina exhibit the same molecular characteristics as the *Rhizobium* sp. strain Or191. *Symbiosis* 30, 141–162

Welte, C.U. 2018. Revival of Archaeal Methane Microbiology. *mSystems*, 3, e00181-17

Wernegreen, J. J. 2012. *Endosymbiosis*. *Current Biology*, 22(14), R555–R561. doi:10.1016/j.cub.2012.06.010

Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L., & Holt, K. E. 2017. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLOS Computational Biology*, 13(6), e1005595. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005595

Willems, A., Fernandez-Lopez, M., Munoz-Adelantado, E., Goris, J., De Vos, P., Martínez-Romero, E., ... & Gillis, M. (2003). Description of new Ensifer strains from nodules and proposal to transfer *Ensifer adhaerens* Casida 1982 to *Sinorhizobium* as *Sinorhizobium adhaerens* comb. nov. Request for an opinion. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(4), 1207-1217.

Wilson, K. J., Sessitsch, A., Corbo, J. C., Giller, K. E., Akkermans, A. D., & Jefferson, R. A. 1995. -Glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other Gram-negative bacteria. *Microbiology*, 141(7), 1691-1705.

Xavier, D. F., Gomes, F. T., Lédo, F. J. D. S., & Pereira, A. V. 2005. Efficiency of rhizobia inoculants on nodulation of alfalfa in a " cerrado" soil. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 34, 781-785.

Xavier, I. J., Holloway, G., & Leggett, M. 2004. Development of rhizobial inoculant formulations. *Crop Management*, 3(1), 1-6.

Young, J.M. 2003. The genus name *Ensifer* Casida 1982 takes priority over *Sinorhizobium* Chen et al. 1988, and *Sinorhizobium morelense* Wang et al. 2002 is a later synonym of *Ensifer adhaerens* Casida 1982. Is the combination '*Sinorhizobium adhaerens*'

(Casida 1982) Willems et al. 2003 legitimate? Request for an opinion. *Int J Syst Evol Microbiol.* 53:2107–2110.

Yu, G., Smith, D. K., Zhu, H., Guan, Y., and Lam, T. T. Y. 2017. Ggtree: an r package for visualization and annotation of phylogenetic trees with their covariates and other associated data. *Methods Ecol. Evol.* 8 (1), 28–36. doi: 10.1111/2041-210X.12628

Zhou, P., Silverstein, K. A., Gao, L., Walton, J. D., Nallu, S., Guhlin, J., & Young, N. D. 2013. Detecting small plant peptides using SPADA (small peptide alignment discovery application). *BMC bioinformatics*, 14, 1-16.

Anexo

Artículo publicado en la revista Frontiers in Agronomy

Competitiveness and symbiotic efficiency in alfalfa of *Rhizobium favelukesii* ORY1 strain in which homologous genes of peptidases HrrP and SapA that negatively affect symbiosis were identified



OPEN ACCESS

EDITED BY
Basharat Ali,
Khwaja Fareed University of
Engineering and Information
Technology (KFUEIT), Pakistan

REVIEWED BY
Shahbaz Atta Tung,
Pir Mehr Ali Shah Arid Agriculture
University, Pakistan
Ling Xu,
Zhejiang Sci-Tech University, China

*CORRESPONDENCE
Jorge Monza
✉ jmonza@fagro.edu.uy

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to
Plant-Soil Interactions,
a section of the journal
Frontiers in Agronomy

RECEIVED 07 November 2022

ACCEPTED 02 December 2022

PUBLISHED 04 January 2023

CITATION
Berais-Rubio A, Morel Revetria MA,
Giménez M, Signorelli S and Monza J
(2023) Competitiveness and symbiotic
efficiency in alfalfa of *Rhizobium*
favelukesii ORY1 strain in which
homologous genes of peptidases HrrP
and SapA that negatively affect
symbiosis were identified.
Front. Agron. 4:1092169.
doi: 10.3389/fagro.2022.1092169

COPYRIGHT
© 2023 Berais-Rubio, Morel Revetria,
Giménez, Signorelli and Monza. This is
an open-access article distributed under
the terms of the [Creative Commons
Attribution License \(CC BY\)](#). The use,
distribution or reproduction in other
forums is permitted, provided the
original author(s) and the copyright
owner(s) are credited and that the
original publication in this journal is
cited, in accordance with accepted
academic practice. No use,
distribution or reproduction is
permitted which does not comply with
these terms.

Competitiveness and symbiotic efficiency in alfalfa of *Rhizobium favelukesii* ORY1 strain in which homologous genes of peptidases HrrP and SapA that negatively affect symbiosis were identified

Andrés Berais-Rubio ¹, María A. Morel Revetria ^{1,2,3},
Matías Giménez ^{3,4}, Santiago Signorelli ^{1,5}
and Jorge Monza ^{1*}

¹Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, ²Laboratorio de Microbiología de Suelos, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, ³Laboratorio Microbiología Molecular, Departamento Bioquímica y Genómica Microbianas (BIOGEM), Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), Montevideo, Uruguay, ⁴Laboratorio de Genómica Microbiana, Instituto Pasteur, Montevideo, Uruguay, ⁵Plant Energy Biology, School of Molecular Science, The University of Western Australia, Crawley, WA, Australia

In acid soils, *Rhizobium favelukesii* strains, known as Oregon-like strains, are a potential risk for alfalfa production given their parasitic behaviour. In this study, we isolated five parasitic strains (ORY1 to ORY5) from alfalfa nodules grown in Uruguayan acid soils, with a 99.7% and a 100% 16S rRNA gene sequence identity to *R. favelukesii* type strain of LUP83. The BOX profiles of the five isolates showed two different patterns, suggesting some diversity among these acid-tolerant isolates. The genome sequence analysis of *R. favelukesii* strains ORY1, LPU83, and Or191 showed that they have around 87.5% of common coding genes, including the symbiotic genes. Moreover, the phylogenetic analysis of ORY1 symbiotic genes *nifH*, *nifD*, *nifK*, *nodA*, *nodB*, and *nodD* were related to the symbiotic genes of *E. meliloti*. We tested ORY1 competitiveness by inoculating seeds with 99:1 and 1:99 ratios of ORY1::*gusA*/*E. meliloti* U143. In both treatments, ORY1::*gusA* occupied more than 50% of nodules, evidencing its high competitiveness. However, the aerial biomass in these treatments was remarkably different, suggesting that the nodules induced by the efficient strain are essential to provide enough N for

optimal plant growth. These findings support the need of inoculating in areas where inefficient strains are likely to be present. Finally, we found three genes that encode amino acid sequences for domains of M16 peptidases (with homology to bacterial *hrrP* and *sapA* genes), two of them were contiguous and located in an accessory plasmid, whereas the other one was a chromosomal gene. These genes are likely to be involved in the parasitic behaviour of ORY1 strain.

KEYWORDS

rhizobia, Oregon-like strain, competitiveness, alfalfa, M16 peptidases

Introduction

Failures in alfalfa (*Medicago sativa*) production have been attributed to soil acid pH, aluminium toxicity (Bouton, 2012; Jaiswal et al., 2018; Shi et al., 2022) and the presence of parasite rhizobia strains that inefficiently nodulate alfalfa (Torres Tejerizo et al., 2011; Eardly et al., 2022). These parasite strains, known as Oregon-like, have tolerance to acidic conditions, a host broad range (Eardly et al., 1992; Del Papa et al., 1999), and its presence has also been confirmed in USA and Canada (Bromfield et al., 2010). Likewise, Oregon strain LPU83 has been isolated from alfalfa root nodules in Argentina and was assigned to the novel species *Rhizobium favelukesii* (Torres Tejerizo et al., 2016). Oregon strains are competitive for the nodulation of alfalfa in acid soils and have low symbiotic efficiency in this legume (Del Papa et al., 2003; Torres Tejerizo et al., 2011; Eardly et al., 2022). For this reason, it is important to know the presence of this type of strain in places where alfalfa is grown, as well as their competitiveness respect to the inoculant used or native efficient strains present in the soil.

Furthermore, the underlying mechanism explaining the lack of nitrogen fixation in the presence of either parasite or inefficient strains remains largely unexplored. However, in the *Ensifer meliloti* -*Medicago truncatula* symbiosis, where *E. meliloti* inefficient strains were identified, the mechanism by which inefficiency was achieved was explained by the presence of rhizobium peptidases that negatively affect the symbiotic communication (Price et al., 2015). In particular, Crook et al. (2012) demonstrated that the inefficient *E. meliloti* strains were able to gain compatibility when they lose the Host Range (HR) accessory plasmid. In turn, efficient strains became inefficient when they acquired the HR plasmid. Around 10% of *Ensifer* sp. isolates were estimated to carry on this accessory plasmid a gene, named *host range restriction peptidase* (*hrrP*), coding for a M16 metallopeptidase that hydrolyses plant produced nodule rich cysteine (NCR) peptides. In *M. truncatula*, around 600 NCR peptides were found (Zhou et al., 2013). One of these peptides,

NCR169, has been proven to be necessary for bacteroids differentiation in the nodule. *M. truncatula* KO-mutants for the NCR169 peptide, *dnf7*, are unable to induce bacteroid development, suggesting that the NCR169 peptide plays a role in the symbiotic communication (Horváth et al., 2015). Likewise, *sapA* (symbiotic-associated peptidase), a chromosomal gene of *E. meliloti* was shown to encode a HrrP-like M16 peptidase that modulates symbiosis in a similar way (Benedict et al., 2021). Here, we reported the presence of these genes in Oregon-type strains, which could contribute to the understanding of their poor symbiotic efficiency.

In Uruguayan soils, a competitive and ineffective rhizobium strain that nodulates alfalfa was identified and suggested to be an Oregon-like strain, yet not confirmed (Castro-Sowinsky et al., 2002). These parasite strains constitute a potential risk for alfalfa implantations (Nilsson et al., 2019), even when they are coexisting with the efficient symbiote *E. meliloti*. Therefore, in this study, we characterized alfalfa inefficient rhizobia strains isolated from plants grown in acid soils, aiming to confirm the presence of Oregon-like strains in Uruguay; evaluated the competitiveness of these strains; and the presence of M16-like peptidases to identify putative mechanisms that could explain the parasite behaviour.

Materials and methods

Bacteria and growth conditions

Acid-tolerant (pH 5.2) rhizobia strains isolated from nodules of *Medicago sativa* grown in acid soils in Uruguay (Table 1), were obtained from the rhizobia collection of the laboratory of Biochemistry at the School of Agronomy, Universidad de la República, Uruguay. Or191 from Oregon, USA (Eardly and David, 1985) and LPU83 from Argentina (Torres Tejerizo et al., 2016) were used as reference strains of *Rhizobium favelukesii*. *Ensifer meliloti* U143 (=MCH3) strain, the

TABLE 1 Location and pH of soils from where *M. sativa* inefficient rhizobia strains were isolated.

Strains	Location	Soil pH
ORY1	Colonia	5.74
ORY2	Colonia	5.48
ORY3	Florida	5.83
ORY4	Colonia	5.68
ORY5	Colonia	5.48

inoculant for alfalfa in Uruguay (Altier et al., 2013) was supplied by Microbiology Laboratory (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca). Rhizobia and *E. meliloti* were grown at 28°C in YEM (Vincent, 1970). *Escherichia coli* strain S17-1 λ pir containing the plasmid pCAM131 with the transposon mTn5SSgusA31 (Wilson et al., 1995) grown at 37°C in LB (Miller, 1972) supplemented with Spectinomycin (Sp) 100 μ g/mL and Streptomycin (St) 50 μ g/mL. In liquid media the cultures were shaken at 120 rpm. Rhizobia and *E. coli* strains are stored at 4°C in YEM agar or LB agar Sp 100 μ g/mL, respectively.

Plants and growth conditions

Medicago sativa cv. Chaná seeds were superficially sterilized according to (Irisarri et al., 2019). Plants grew in control condition at 23/20°C (day/night), with a 16/8 h photoperiod and 220 μ E.m⁻².s⁻¹ photosynthetic photon flux density.

Time nodulation assay was performed in tubes with 20 mL Jensen medium (Jensen, 1942) N-free. Competitiveness, symbiotic efficiency and relative symbiotic effectiveness assays were performed in 350 mL pots with sterile vermiculite - sand (1:1), watered alternatively with distilled water and with Fahraeus medium (Vincent, 1970). Distilled water pH and Fahraeus medium were adjusted to 5.5 with MES 10 mM. Inoculation was carried out as described below in each assay.

Tagging rhizobia ORY1 strain with *gusA* gene

The conjugation was carried out using the rhizobium strain ORY1 as receptor and *E. coli* strain S17-1 λ -pir containing pCAM131 that carries transposon mTn5SSgusA31 as donor, generally following the procedure used by Irisarri et al. (2019). The mixture remained at 28°C overnight in plate with TY (Beringer, 1974). Transconjugants were selected in plate with YEM Sp 100 μ g/mL and Nitrofurantoin (Ntf) 20 μ g/mL to inhibit *E. coli* growth.

Transconjugants time nodulation assay

Time nodulation assay of three transconjugants respect to the parental strain was evaluated according to time of appearance of the first nodule and total nodules at 21 days. The pre-germinated seeds, sown at a rate of one per tube with Jensen medium and 8 repetitions per treatment, were inoculated with 100 μ L of a bacterial suspension with OD₆₂₀ = 0.9 (10⁸ ufc/mL). The ORY1::*gusA* clone was selected for the competition assay.

GUS activity in alfalfa nodules

Nodulated roots were washed with distilled water and with 0.1 M phosphate buffer pH=7, incubated 16 h at 37°C in darkness in solution type containing 1% SDS, EDTA 0.5 M pH 8 and 1 mM 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronide (X-gluc) in 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.5 (Wilson et al., 1995). Nodules occupied by ORY1::*gusA* were visually identified by blue staining, in contrast to those infected by non-tagged strains which remained unstained (Irisarri et al., 2019).

Competitiveness and biomass production assay

Competitiveness of U143 and ORY1::*gusA* strains was carried out in pots with sand-vermiculite (1:1), with 5 plants per pot, and 4 replicates per treatment. Three assays with a n = 4 were conducted and the 12 resulting replicates were pooled for the statistical analysis. Pots were rinsed with water or Fahraeus medium at pH 5.5, as indicated above. Strains grew in YEM medium up to an OD₆₂₀ = 0.9. Competitiveness experiments included ORY1::*gusA* and U143 in a 99:1 and 1:99 ratio (named treatment 99% and 1% respectively). Bacterial concentration was determined according to Riviezi et al. (2020). Plants were harvested 21 days after inoculation and washed root nodules were stained as described above. To assess symbiotic efficiency, biomass production was determined as shoot dry weight at 60°C for 72 h, including two controls: U143 strain and uninoculated treatment.

Relative symbiotic effectiveness assay

Seeds were sown at the rate of 5 per pots and inoculated with ORY1 and U143 strains as described previously, and harvested 35 days after inoculation. Each treatment included 5 replicates. Relative symbiotic effectiveness (%) is based on ORY1 parasitic strain shoot dry weight production relative to effective U143 strain.

Genomic DNA extraction

Genomic DNA extraction from different rhizobial strains were extracted with DNA Extraction kit (Qiagen, Alemania). DNA quality and concentration were determined with *Nanodrop 2000* (Thermo Scientific, USA), and its integrity was visualized in agarose gel 1.2%.

16S rRNA gene amplification

16S rRNA partial gene was amplified using the primers 27f and 1525r and conditions described by Lane (1991). PCR products were run at 100 V in Tris-acetate buffer pH 8.2 and visualized in 1.2% agarose gel stained with SYBR Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific, USA). Accuruler 1 kb DNA Ladder (Maestrogen Inc, Taiwan) was used as molecular weight marker. Sequencing was performed in Macrogen Inc. (Korea).

BOX genomic fingerprinting

Total genomic DNA was amplified with BOXA1 primer (Koeuth et al., 1995). Amplification condition used was 1 cycle of 2 min at 95°C, 30 cycles of 45 seg at 93°C, 1 min at 50°C and 6 min at 65°C, and a final extension of 8 min at 68°C. PCR products were visualized as described previously.

Genome sequencing

Genomic sequencing was obtained using Illumina Technology (Macrogen, Korea) yielding 11.1 million paired-end reads with a length of 151 bp. Low quality reads were filtered out using Trimmomatic software with parameters 2:30:10 LEADING:3 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:4:15 MINLEN:75 (Bolger et al., 2014). SPAdes software was used to perform a *de novo* assembly using the remaining paired reads (Bankevich et al., 2012). The quality of the assembly was assessed with QUAST software using LPU83 genome as reference (Gurevich et al., 2013). Plasmid contigs were detected using plaSquid software (Giménez et al., 2022) with the option –minidist and using LPU83 plasmids as reference database. Genomic annotation of all the analysed genomes was done using prokka software with default parameters (Seemann, 2014).

The calculation of the Average Nucleotide Index (ANI), correlation indexes of tetra-nucleotide signatures, and tetra correlation search (TCS) were performed using the JSpeciesWSserver (Richter et al., 2016). The genome sequence data were uploaded to the Type Genome Server (TYGS), for a whole genome-based taxonomic analysis (Meier-Kolthoff and Göker, 2019).

Phylogenetic analysis

Symbiotic gene *nifH*, *nifD*, *nifK*, *nodA*, *nodB* and *nodD*, sequences were extracted from the ORY1 genome. The obtained sequences were compared with reference strains sequences available in public National Center for Biotechnology Information (NCBI) database. Sequences were aligned with the ClustalW algorithm and Maximum likelihood phylogenomic tree (Tamura and Nei, 1993) were constructed for each multilocus sequence analysis (MLSA). Alignments and trees were constructed with MEGA 11 software (Tamura et al., 2021). Statistical support for tree nodes was evaluated by bootstrap analyses using 1000 replicates (Felsenstein, 1985).

Nucleotide sequence accession numbers

The GenBank accession numbers for 16S rRNA sequences used in phylogenetic analysis are: *Rhizobium favelukesii* ORY1 (OP294988), ORY2 (OP294989), ORY3 (OP294990), ORY4 (OP294991), ORY5 (OP294992), Or191 (EU928874.1), *Rhizobium anhuiense* VVPR1 (MT476932.1), *Rhizobium indigoferae* NAC94 (MK872365.1), *Bradyrhizobium yuanmingense* VAFW14 (LC585439.1), *Rhizobium croatiense* 9T (MK753104.1), *Rhizobium altiplani* BR 10423 (NR 152084.1), *Rhizobium tibeticum* CCBAU85039 (NR116254.1) and *Sinorhizobium meliloti* 2011 (CP004140.1).

The GenBank accession numbers for genomes and plasmids from which the symbiotic genes and some partial 16S sequences were extracted are indicated in brackets: *Rhizobium favelukesii* ORY1 (JAIAY000000000.1); LPU83 (HG916852.1) and Or191 (GCA_000419725.1); *Rhizobium tibeticum* CCBAU85039 (GCF_900108425.1); *Rhizobium altiplani* BR 10423 (GCA001542405.1); *Rhizobium grahamii* BG7 (CP043498.1); and *Sinorhizobium meliloti* 2011 (CP004140.1); *Rhizobium tropici* CIAT 899 (NC 020061.1); *Rhizobium esperanzae* N561 (CP013501.1); *Rhizobium phaseoli* R650 (CP013533.1); *Rhizobium gallicum* sp. R602 (CP006878.1); *Rhizobium etli* NXC12 (CP020907.1).

Rhizobium plasmidic peptidase analysis

Ensifer meliloti USDA1963 peptidase HrrP was retrieved from NCBI reference proteins database and used to detect its domains in Pfam web server (Bateman et al., 2004). Hidden Markov models from M16 Peptidase (PF00675) and M16_C Peptidase (PF05193) were downloaded from Pfam database. To understand the presence of potential peptidases in plasmids obtained from rhizobium genus, 461 plasmids were downloaded from PLSDB database (V. 2021_06_23_v2) (Galata et al., 2019). All encoded proteins were predicted using prokka software.

HMMER 3.0 software was used to scan for M16 peptidase domains using the option *-cut_ga* as filtering threshold (Eddy, 2011). All predicted proteins were clustered to 98% of identity, using CD-HIT software, to reduce sequence redundancy (Fu et al., 2012). *R. favelukesii* predicted M16 peptidases were added to the phylogenetic analysis. Sequences (available at: <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.21641816.v1>) were aligned using muscle algorithm through msa R package (Bodenhofer et al., 2015). Phylogenetic trees were computed using neighbor-joining algorithm with ape R package (Paradis et al., 2004) and drawn using ggtree (Yu et al., 2017). Domain organization of each sequence was manually obtained from Pfam database search and added to the analysis.

Statistical analysis

ANOVA was performed in R software to identify statistical significance and a *post hoc* test (Tukey's test) was used for pairwise comparison to determine the *P*-values.

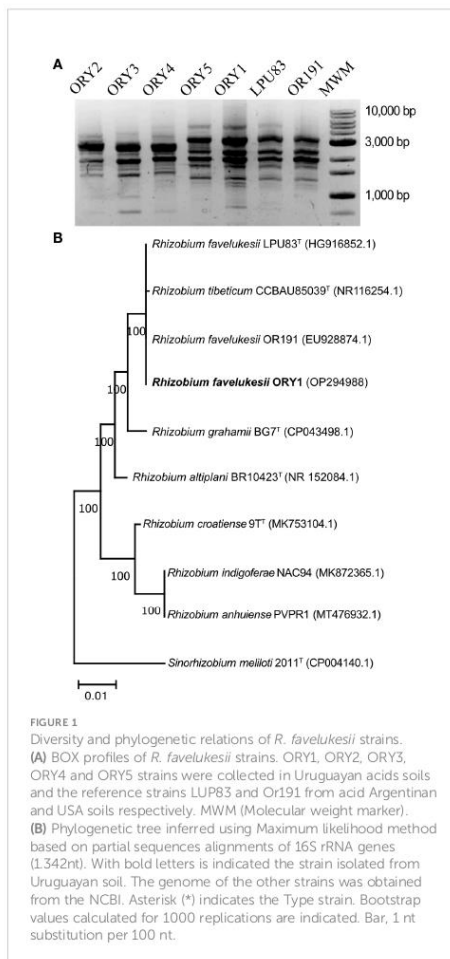
Results

ORY1 alfalfa-parasite rhizobia strain is a *Rhizobium favelukesii*

To characterize the *M. sativa*-parasite rhizobia ORY1, ORY2, ORY3, ORY4, and ORY5 strains, isolated from Uruguayan acidic soils, we analysed BOX profile, the 16S rRNA sequences, and Relative symbiotic effectiveness.

BOX profiles for the five autochthonous isolates and the Argentinian and USA *R. favelukesii* strains showed that ORY1 and ORY5 strains had the same profile as the foreign strains, whereas ORY2, ORY3, and ORY4 strains had the same profile, but different to the foreign strains (Figure 1A).

The partial 16S rRNA sequence gene of ORY1, ORY4 and ORY5 were 100% identical to the *R. favelukesii* strains, LPU83 and Or191, isolated from Argentinian and USA acid soils respectively. ORY2 and ORY3 strains showed respectively a 99.9% and 99.7% identity to ORY1, LPU83, and Or191. Next, we performed a phylogenetic analysis of the different strains isolated from Uruguayan soils (ORY) among other related species. All ORY strains clustered together with *R. favelukesii* LPU83 and Or191 strains, and closely related to *R. tibeticum* (Figure 1B). Hereafter, ORY1 strain was used as the strain of study for all further assays. The parasitic behaviour of ORY1 was confirmed by shoot dry weight production in presence of this strain as the sole inoculant. This parameter was only 15% of such obtained with the commercial inoculant strain U143, evidencing a very low symbiotic efficiency.



Genome sequencing and phylogenetic analysis of the ORY1 strain

The analysis of the draft genome of *R. favelukesii* ORY1 strain revealed that this genome is 7.44 Mb in size; has 59.7% GC content; containing 7,509 coding and 51 RNA genes. Five replicons were identified corresponding to the chromosome and four plasmids. The analysis of plasmids revealed that 151 contigs covered 96% of the total length of *Rhizobium favelukesii* LPU83 plasmids. This represents a total length of 3.25 Mb which encode 3,349 ORFs. Based on TCS or tetra-nucleotide signature, only *R. favelukesii* and *R. tibeticum* were found closely related

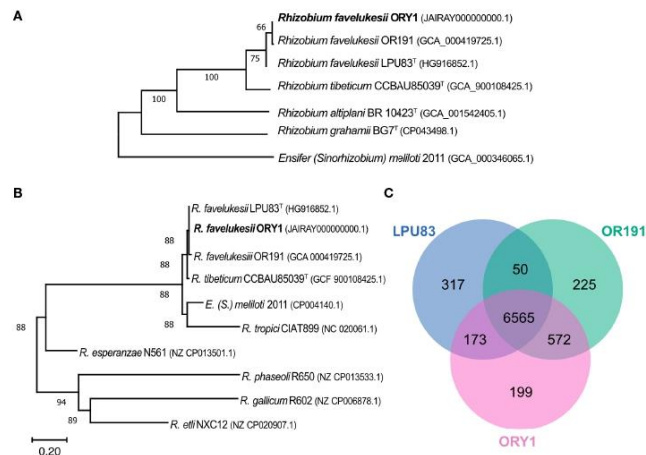


FIGURE 2

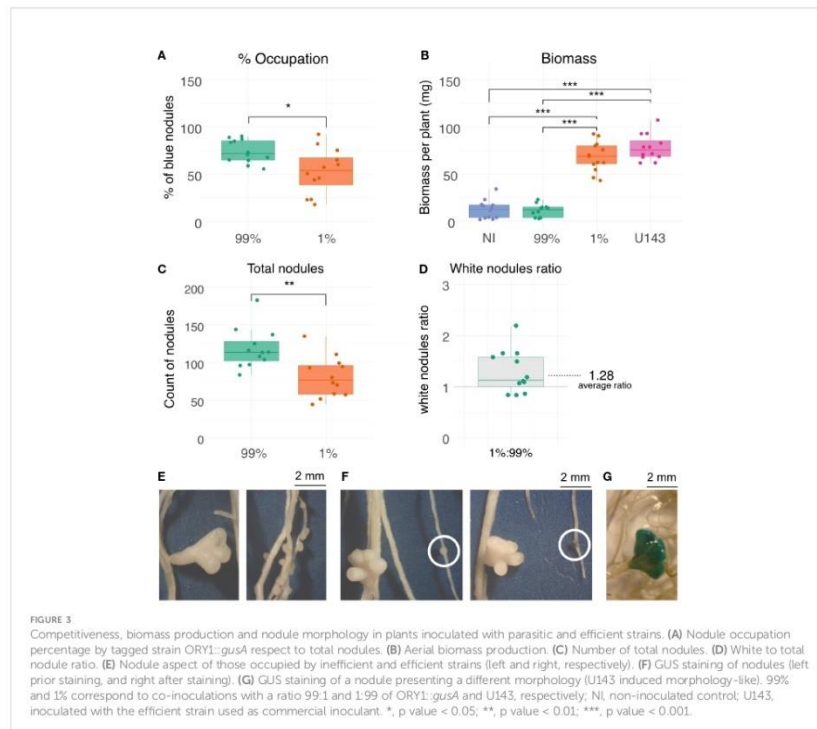
Phylogenetic analysis and Venn diagram of homologous genes in three *R. favelukesii* strains. (A) Tree inferred from Genome Blast Distance Phylogeny (GBDP) distances calculated from genome sequences with TYGS (<https://tygs.dsmz.de/>). The branch lengths are scaled in terms of GBDP distance. The numbers above branches are GBDP pseudo-bootstrap support values > 60% from 100 replications, with an average branch support of 83.8%. The tree was rooted at the midpoint. (B) MLSA of symbiotic genes *nifD*, *nifK*, *nifH*, *nodA*, *nodB*, and *nodD* of different rhizobia species. (C) Venn diagram of homologous genes in three *R. favelukesii* strains. Overlapped regions represent common homologous genes shared between pan-genomes.

with z-scores > 0.999. ANI values of > 96% consistently group genomes from strains of *R. tibeticum* and *R. favelukesii* together with ORY1, but ANI values of > 99% identify ORY1 as *R. favelukesii*. According to TYGS analysis ORY1 belongs to *R. favelukesii*. The phylogenetic analysis of *R. favelukesii* ORY1, Or191, and LPU83 strains showed that they clustered together, separated from *R. tibeticum*, when using the complete genomes (Figure 2A). In addition, *R. favelukesii* and *R. tibeticum* also grouped separated from *R. grahamii* and *R. altiplani* (Figure 2A). Likewise, *R. favelukesii* strains does not group with *R. tibeticum* when a MLSA of symbiotic genes, *nifD*, *nifK*, *nifH*, *nodA*, *nodB*, and *nodD*, was considered. In addition, these concatenated genes are related to *E. meliloti* symbiotic genes (Figure 2B). To better understand the similitude between the three *R. favelukesii* strains, ORY1, Or191, and LPU83, we analyse the overlap between the three complete genomes by identifying the homologous genes. We observed that most of the coding genes are common to all strains (around 87.5%, relative to ORY1), Or191 had a greater overlap with ORY1 than LPU83, and around 2.7% coding genes were unique for ORY1 (Figure 2C).

Competitiveness and symbiotic efficiency of ORY1 in presence of the efficient U143 strain

To evaluate the competitiveness of ORY1 strain we tagged ORY1 with the reporter gene, *gusA*. To confirm that the *gusA* insertion did not affect competitiveness and shoot biomass production, we compared the performance of ORY1::gusA strain for these parameters, to the parental strain ORY1. No differences were observed between these strains in terms of time to observe the first nodule (8 days), number of nodules per plant at 21 days, and shoot biomass.

Two treatments were used to test competitiveness and biomass production, consisting of mixes of ORY1 and the commercial inoculant, *E. meliloti* U143. One treatment consisted of a 99:1 ratio (ORY1::gusA/U143, hereafter 99% parasite strain treatment), whereas the other treatment was a 1:99 ratio (ORY1::gusA/U143, hereafter 1% parasite strain treatment). Nodule occupation by ORY1::gusA strain in 99% treatment was greater than in 1% treatment (Figure 3A). It is worth noting that even in 1%



treatment, the percentage of occupied nodule exceeded the 50% of total nodules, evidencing the great competitiveness of this strain. Despite of the fairly similar occupation of both treatments, a remarkable difference was observed in terms of biomass production between 99% and 1% treatments (Figure 3B). In fact, the biomass production in 99% treatment was very low and not statistically different to the one obtained in the non-inoculated control, whereas the biomass production in the 1% treatment was not statistically different to the one obtained with U143 strain (Figure 3B). Regardless the percentage of parasite occupied nodules, the total number of nodules was much greater in the 99% treatment (Figure 3C). Despite of the greater number of nodules in the 99% treatment, the number of white nodules was significantly greater in the 1% treatment (Figure 3D).

Nodule morphology induced by ORY1::gusA and U143 strains was different (Figure 3E). We observed that ORY1::gusA induces the development of a great number small

spherical nodules unlike U143, which induces a small number of larger undetermined nodules (Figure 3F). Exceptionally, a few U143-occupied-like nodules were occupied by ORY1::gusA (Figure 3G), a phenomena that we attribute to co-occupation of these strains, given that we never observed this morphology when plants are solely inoculated with ORY1::gusA.

Identification of M16 peptidase domains in ORY1 strain

Given that the bacterium genes *hrrP* and *sapA* encode for M16 peptidases that have been related to rhizobia with low symbiotic efficiency, we sought for genes coding M16 peptidase in the ORY1 genome. Bioinformatic analysis of protein domains using HMMER software, together with Pfam proteins database allowed us to evidence in ORY1 genome the presence of three genes encoding

aminoacidic sequences for M16 zinc metallopeptidase domains. Two of these genes are contiguous gene located on an accessory plasmid, and the other is a chromosomal gene.

We performed a NCBI protein BLAST search and found that the 448 (ID 07295) and 532 (ID 07296) aminoacidic contiguous sequences encoded on the accessory plasmid of ORY1 strain showed an identity of 22.78 and 26.55%, and a coverage of 50 and 63%, respectively, to the HrrP peptidase of *E. meliloti* USDA1963 (Table 2). This protein is an homodimeric M16 zinc metallopeptidase involved in the cleavage of NCR peptides. In the chromosome of ORY1 strain, we identified a DNA sequence coding a 432 aminoacid sequence presenting an 82.78% of identity and 98% of coverage to SapA peptidase from *E. meliloti* 1021 strain (CAC45492.2). This *E. meliloti*

SapA is a member of a conserved M16B subfamily peptidase present in many different rhizobia.

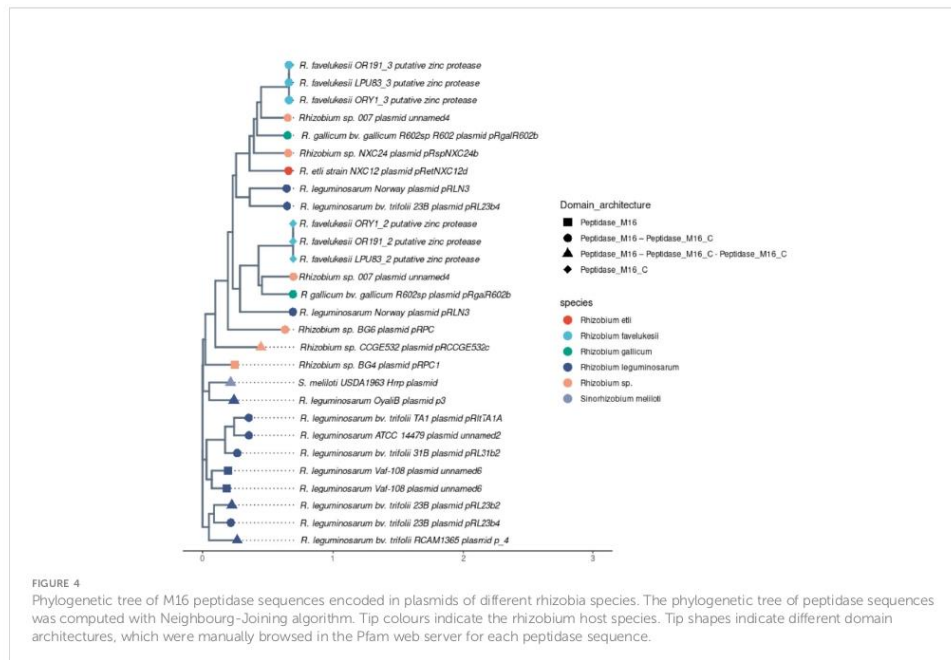
To assess the presence of M16 genes in rhizobia, we analyzed 461 plasmids available at PLSDb database. Only 30 genes encoding this type of protein domains were found, and a few of them corresponded to the same replicons. M16 domain-encoding genes were found in rhizobia plasmids of different species such as *R. leguminosarum*, *R. etli*, *R. favleukesii* and *R. gallicum* (Figure 4). Additionally, clusters of sequences found in this phylogenetic tree do not show a species-based distribution.

To understand remote homology patterns in these genes we further analyzed domain architecture of the encoded peptidases in rhizobium plasmids (Figure 4). We observed that there are different domain organizations but with a limited number of

TABLE 2 Blast analysis of M16 domains identified in ORY1 against reference sequences. E-value corresponds the number of expected hits of similar quality (score) that could be found just by chance.

ID	Gene Location	M16 Domain	Query cover	Identity	E-value
07295*	Plasmid	M16C	50%	22.78%	8e-05
07296*	Plasmid	M16-M16C	63%	26.55%	3e-15
02082**	Chromosome	M16B	98%	82.78%	0.0

*sequences blasted against reference *hrrP* aminoacidic sequence of *E. meliloti* USDA1963 (AJT61688.1). **sequence blasted against reference *sapA* aminoacidic sequence of *E. meliloti* 1021 (CAC45492.2).



protein domains; specifically M16 (PF00675) and M16_C (PF05193). Peptidase M16 followed by Peptidase M16_C is the domain architecture most present in these proteins, at least one gene for the 5 rhizobia species represented in the tree have this domain organization. A reference of an uncharacterized protein having this domain is deposited in UniProt under accession number W2S8M8 with its predicted AlphaFold structure. As a functionally characterized protein we included HrrP of *E. meliloti* USDA 1963, which resulted in a similar domain architecture only having an extra Peptidase M16_C domain. A reference protein having these domains is also deposited in UniProt under accession W9RIX3.

Discussion

Phylogeny and diversity of Oregon strains isolated in Uruguayan acid soils

Alfalfa parasitic Oregon-like rhizobia are a problem for the implantation and production grasslands of this legume (Torres Tejerizo et al., 2011). These rhizobia had been identified in USA, Canada (Eardly et al., 1985; Bromfield et al., 2010) and in Argentina, where the novel species *R. favelukesii* was described (Torres Tejerizo et al., 2016). Castro-Sowinsky et al. (2002) purposed the presence of Oregon-like rhizobia in Uruguayan soils. However, the presence of this rhizobium in Uruguayan soils had not been confirmed before. In this study, based on the whole genome sequencing analysis of five isolates obtained from Uruguayan acid soils, where there are yield problems in alfalfa production, we confirmed the presence of Oregon strains (Figure 2A).

R. favelukesii and *R. tibeticum* can nodulate *M. sativa* (Hou et al., 2009), but *R. tibeticum* has multiple hosts such as *Trigonella archiducis-nicolai*, *Medicago lupulina*, *Phaseolus vulgaris*, among others (Abd-Alla et al., 2014; Torres Tejerizo et al., 2017). In congruence, our genome based phylogenetic analysis showed that *R. favelukesii* strains (ORY1, Or191, and LPU83) clustered together among them but separated from *R. tibeticum* strain CCBAU85039 (Figure 2A). Moreover, the genome comparison based on common genes revealed that ORY1 strain is more similar to Or191 isolated from USA than LPU83 isolated from Argentina (Figure 2C). The limited number of unique genes in ORY1 (2.7%) are mostly uncharacterized genes and we did not identify any symbiotic genes.

Our results also showed a greater diversity than that observed in Argentinian acid soils. In our study, among the five strains isolated from Uruguayan acid soils, two strains presented the same BOX profile as LPU83 and Or191, identified in Argentina and USA respectively, while the other three presented a profile different to those. Unlike this result, twelve isolated from Argentinian acid soils resulted in the very same ERIC fingerprint profile as Or191 from USA (Wegener et al., 2001), representing a very low genetic

diversity. The low genetic diversity is different to what is often reported for rhizobia having a wide geographic distribution (Martínez-Romero and Caballero-Mellado, 1996), and to what we observed for clover-nodulating rhizobia (Irisarri et al., Tartaglia et al., 2019) and lotus-nodulating rhizobia (Sotelo et al., 2011; Batista et al., 2013) isolated from Uruguayan soils. Nevertheless, the twelve isolates tested by Wegener et al. (2001) were selected from an initial collection of 465 isolated from Argentinian soils, with pH between 5.5 and 6.2, by growing them at pH 5.0 (Del Papa et al., 1999). This means that the twelve isolated with identical ERIC fingerprint were selected by high tolerance to low pH, and extreme environmental conditions are known to reduce genetic diversity, whereas the pH of Uruguayan soils where our strains were isolated were only slightly acid (pH 5.4 - 5.8), explaining the greater genetic diversity observed in our collection.

Alfalfa co-inoculation with ORY1/U143: Competitiveness and biomass production

The high competitiveness of the parasitic ORY1 strain was evidenced by the occupancy of nodules in the 1% treatment (Figure 3A). Interestingly, the biomass production was high, and not different to that for U143 (Figure 3B), even though more than 50% of nodules were occupied by the parasite strain ORY1. This result suggests that the presence of parasitic rhizobia should not be a problem for biomass production if our design (1:99, parasite:efficient rhizobia) represents the situation occurring during the first few days after sowing, where the strain used as commercial inoculants are expected to be at greater concentration than native parasitic rhizobia. On the other hand, our results show that if the load of commercial inoculant is very low, or if the load of parasitic rhizobia in the soil is high, severe problems in biomass production can be found (Figure 3B).

At first glance, it sounds counterintuitive the fact that we observe a high biomass production when the occupation by the parasite strain, ORY1, is greater than 50%. This can be in part explained by the fact that the 1% treatment had approximately 30% more white (effective) nodules relative to the 99% treatment (Figure 3D). It is worth noting that the incompatible plasmid-carrying strain can induce a higher number of nodules than the effective strains, even though the resulting nodules are less beneficial to the host (Crook et al., 2012). This goes in line with our observations, where we found a greater number of total nodules in the treatment enriched in ORY1 relative to the 1% treatment (Figure 3C). However, the nodules produced by the parasite strain were shown to be less beneficial for the plant compared to those produced by effective strains, which were suggested to produce bigger and more dense nodules (Crook et al., 2012). Therefore, if we only consider the white nodule as nitrogen fixing active nodules, it is not surprising that the 1% treatment had a greater biomass production than the 99%

treatment. Another factor that could account for the high biomass production even when the occupation of ORY1 is relatively high, is the possibility of co-occupation with efficient strains. Co-occupation has been reported in *M. sativa* – *E. meliloti* symbiosis (Checcucci et al., 2016). Hence, we hypothesize that many of the blue nodules can be also occupied with the effective strain which contributes to nitrogen fixation. In fact, we observed a few well-developed nodules that were marked with the parasite strain (Figure 3G), strongly suggesting the possibility of co-occupation in those nodules. Thus, our observations remark the importance of not only evaluating competitiveness as percentage of occupied nodules, as usually tested (Irisarri et al., 2019), but also in terms of total, well-developed, not developed, and co-occupied nodules, to better understand the consequence at plant level.

Identification of putative *hrrP* and *sapA* genes in ORY1 strain

One of the plasmid detected in ORY1 genome encoded contagious putative M16 peptidase, which are highly conserved in the three available genomes of *R. favelukesii*. The phylogenetic analysis of putative M16 peptidases in a comprehensive set of *Rhizobium* plasmids showed that the *R. favelukesii* putative peptidases do not cluster by species in the phylogenetic tree, similarly to what occurs for Ensifer sequences (Figure 4). This has been proposed as a result of lateral transfer events shaping the evolutionary pathways of these plasmid peptidases (Price et al., 2015).

M16 plasmid peptidases have been previously studied in *E. meliloti* and could be linked to host restriction functions (Price et al., 2015). The two M16 peptidases encoded in a *R. favelukesii* plasmid are contiguous and both of them together mimic the domain architecture of *E. meliloti* HrrP protein, where one sequence encodes for M16 – M16C domains, and the next sequence for another M16C domain. Given the proximity of M16 peptidase-encoding genes we propose that they could be related to *hrrP* as part of a gene fusion or fission event, as it has been seen in a set of Gram + and Gram – bacteria (Pasek et al., 2006). Additionally, these proteins could be implied in a similar host restriction mechanism as the one previously described in *E. meliloti* species. In particular, HrrP and SapA peptidases play a role in the digestion of NCR peptides produced by the host, for instance, the indispensable peptide for bacteroid differentiation NCR169 (Horváth et al., 2015; Price et al., 2015; Benedict et al., 2021). These peptides are necessary for the correct establishment of the symbiosis *E. meliloti* – *M. truncatula* (Price et al., 2015; Benedict et al., 2021). The plasmidic peptidase HrrP degrades NCR peptides, attributing the rhizobia an active mechanism to control de host (Pan and Wang, 2017; Benedict et al., 2021), and its expression is often associated with a parasite behaviour (Price et al., 2015). The presence of putative *hrrP* and *sapA* genes in *R.*

favelukesii Oregon strains, ORY1, Or191, and LPU83 can partially explain the parasitic behaviour of *R. favelukesii* evidenced by the unusual globular aspect of nodules, hyper-nodulation, and low symbiotic efficiency.

Conclusions

In Uruguay, alfalfa is mainly sowed in acid soils, in which we confirmed the presence of Oregon type parasitic strains, whose BOX profiles allow us to suppose that the diversity of this strains is higher than reported before. Co-inoculation assays with a low parasite/efficient strains ratio evidenced, on the one hand, ORY1 strain is significantly more competitive than the U143 strain, and on the other hand that in the first stages of seedling development the biomass loss is not significative. These findings support the need of inoculating in areas where inefficient strains are likely to be present. Finally, we described for first time the presence of *hrrP* and *sapA* genes in *R. favelukesii*, which can partially explain the parasitic behaviour of Oregon – like strains characterized by the unusual globular aspect of nodules, hyper-nodulation, and low symbiotic efficiency.

Data availability statement

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found below: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, JAIWAY000000000.1.

Author contributions

The authors confirm contribution to the paper as follows: Study conception and design: JM. Data collection: AB-R, MG and MM. Analysis and interpretation of results: SS, AB-R, MG and MM, JM. Draft manuscript preparation: AB-R, SS, JM. All authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

Authors are grateful to the funding of grants from INIA L1 Proyecto 4. PEDECIBA, Udelar-CAP (Magister grant for A. Berais-Rubio) and SNI Uruguay.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated

organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

References

- Abd-Alla, M. H., Issa, A. A., and Ohya, T. (2014). "Impact of harsh environmental conditions on nodule formation and dinitrogen fixation of legumes," in *Advances in biology and ecology of nitrogen fixation*, (London: IntechOpen) vol. 9, 1.
- Altier, N., Beyhaut, E., and Pérez, C. (2013). "Root nodule and rhizosphere bacteria for forage legume growth promotion and disease management," in *Bacteria in agrobiology: Crop productivity* (Berlin, Heidelberg: Springer), 167–184.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., et al. (2012). SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 19 (5), 455–477. doi: 10.1089/cmb.2012.0021
- Bateman, A., Coin, L., Durbin, R., Finn, R. D., Hollich, V., Griffiths-Jones, S., et al. (2004). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* 32 (suppl_1), D138–D141. doi: 10.1093/nar/gkh121
- Batista, L., Tomasco, I., Lorite, M. J., Sanjuán, J., and Monza, J. (2013). Diversity and phylogeny of rhizobial strains isolated from *Lotus uliginosus* grown in Uruguayan soils. *Appl. Soil Ecol.* 66, 19–28. doi: 10.1016/j.apsoil.2013.01.009
- Benedict, A. B., Ghosh, P., Scott, S. M., and Griffiths, J. S. (2021). A conserved rhizobial peptidase that interacts with host-derived symbiotic peptides. *Sci. Rep.* 11 (1), 1–10. doi: 10.1038/s41598-021-91394-x
- Beringer, J. E. (1974). R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Gen. Microbiol.* 84, 188–198. doi: 10.1099/00221287-84-1-188
- Bodenhofer, U., Bonatesta, E., Horeš-Kainrath, C., and Hochreiter, S. (2015). Msa: An r package for multiple sequence alignment. *Bioinformatics* 31 (24), 3997–3999. doi: 10.1093/bioinformatics/btv494
- Bolger, A. M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for illumina sequence data. *Bioinformatics* 30 (15), 2114–2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170
- Bouton, J. H. (2012). An overview of the role of lucerne (*Medicago sativa* L.) in pastoral agriculture. *Crop Pasture Sci.* 63 (9), 734. doi: 10.1071/cp1212
- Bromfield, E. S. P., Tambong, J. T., Cloutier, S., Laguerre, G., Prevost, D., Laguerre, G., et al. (2010). *Ensifer*, *Phyllobacterium* and *Rhizobium* species occupy nodules of *Medicago sativa* (alfalfa) and *Melilotus alba* (sweet clover) grown at a Canadian site without a history of cultivation. *Microbiology* 156 (pt2), 505–520. doi: 10.1099/mic.0.034058-0
- Castro-Sowinsky, S., Carrera, I., Catalan, A. I., Coll, J., and Martínez-Drets, G. (2002). Occurrence, diversity and effectiveness of mid-acid tolerant alfalfa nodulating rhizobia in Uruguay. *Symbiosis* 32, 105–118.
- Checucci, A., Azzarello, E., Bazzicalupo, M., Galardini, M., Lagomarsino, A., Mancuso, S., et al. (2016). Mixed nodule infection in *Sinorhizobium meliloti*-*Medicago sativa* symbiosis suggest the presence of cheating behavior. *Front. Plant Sci.* 7, 835. doi: 10.3389/fpls.2016.00835
- Crook, M. B., Lindsay, D. P., Biggs, M. B., Bentley, J. S., Price, J. C., Clement, S. C., et al. (2012). Rhizobial plasmids that cause impaired symbiotic nitrogen fixation and enhanced host invasion. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 25 (8), 1026–1033. doi: 10.1094/MPMI-02-12-0052-R
- Del Papa, M. F., Balague, L. J., Castro-Sowinsky, S. C., Wegener, C., Segundo, E., Abarca, F. M., et al. (1999). Isolation and characterization of alfalfa-nodulating rhizobia present in acidic soils of central Argentina and Uruguay. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (4), 1420–1427. doi: 10.1128/AEM.65.4.1420-1427.1999
- Del Papa, M. F., Pistorio, M., Balagué, L. J., Draghi, W. O., Wegener, C., Perticari, A., et al. (2003). A microcosm study on the influence of pH and the host-plant on the soil persistence of two alfalfa-nodulating rhizobia with different saprophytic and symbiotic characteristics. *Biol. fertility soils* 39 (2), 112–116. doi: 10.1007/s00374-003-0690-6
- Eardly, B. D., and David, B. (1985). Characterization of rhizobia from ineffective alfalfa nodules: Ability to nodulate bean plants [*Phaseolus vulgaris* (L.) savi]. *T. Appl. Environ. Microbiol.* 50 (6), 1422–1427. doi: 10.1128/aem.50.6.1422-1427.1985
- Eardly, B. D., Osman, W. A. M., Ardley, J., Zandberg, J., Gollagher, M., van Berkum, P., et al. (2022). The genome of the acid soil-adapted strain rhizobium favelukesii OR191 encodes determinants for effective symbiotic interaction with both an inverted repeat lacking clade and a phaseoloid legume host. *Front. Microbiol.* 13. doi: 10.3389/fmicb.2022.735911
- Eardly, B. D., Young, J. P. W., and Selander, R. K. (1992). Phylogenetic position of rhizobium sp. strain Or191 a symbiont of both *Medicago sativa* and *Phaseolus vulgaris*, based on partial sequences of the 16S rRNA and *nifH* genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (6), 1809–1815. doi: 10.1128/aem.58.6.1809-1815.1992
- Eddy, S. R. (2011). Accelerated profile HMM searches. *PLoS Comput. Biol.* 7 (10), e1002195. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002195
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *evolution* 39 (4), 783–791. doi: 10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x
- Fu, L., Niu, B., Zhu, Z., Wu, S., and Li, W. (2012). CD-HIT: Accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics* 28, 3150–3152. doi: 10.1093/bioinformatics/bts565
- Galata, V., Fehlmann, T., Backes, C., and Keller, A. (2019). PLSDb: A resource of complete bacterial plasmids. *Nucleic Acids Res.* 47 (D1), D195–D202. doi: 10.1093/nar/gky1050
- Giménez, M., Ferrés, I., and Iraola, G. (2022). Improved detection and classification of plasmids from circularized and fragmented assemblies. *bioRxiv*. doi: 10.1101/2022.08.04.502827
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., and Tesler, G. (2013). QUAST: Quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 29 (8), 1072–1075. doi: 10.1093/bioinformatics/btt086
- Horváth, B., Domonkos, A., Kereszt, A., Szucs, A., Ábrahám, E., Ayaydin, F., et al. (2015). Loss of the nodule-specific cysteine rich peptide, NCR169 abolishes symbiotic nitrogen fixation in the medicago truncatula dnf7 mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 15232–15237. doi: 10.1073/pnas.1500777112
- Hou, B. C., Wang, E. T., Li, Y. J., Jia, R. Z., Chen, W. F., Gao, Y., et al. (2009). *Rhizobium tibeticum* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from *Trigonella archiducis-nicolai* (Sif.) vassilcz. *Int. J. systematic evolutionary Microbiol.* 59 (12), 3051–3057. doi: 10.1099/ijs.0.009647-0
- Irisarri, P., Cardozo, G., Tartaglia, C., Reyno, R., Gutiérrez, P., Lattanzi, F., et al. (2019). Selection of competitive and efficient rhizobia strains for white clover. *Front. Microbiol.* 10. doi: 10.3389/fmicb.2019.00768
- Jaiswal, S. K., Naamala, J., and Dakora, F. D. (2018). Nature and mechanisms of aluminium toxicity, tolerance and amelioration in symbiotic legumes and rhizobia. *Biol. Fertil. Soils* 54, 309–318. doi: 10.1007/s00374-018-1262-0
- Jensen, H. L. (1942). Nitrogen fixation in leguminous plants. i. general characters of nodule-bacteria isolated from species of medicago and 95 *Trifolium* in Australia. *Proc. Linn. Soc. New South Wales* 66, 98–108.
- Koeuth, T., Versalovic, J., and Lupski, J. R. (1995). Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. *Genome Res.* 5 (4), 408–418. doi: 10.1101/gr.5.4.408.html
- Lane, D. J. (1991). "16S/23S rRNA sequencing," in *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Eds. E. Stackebrandt and M. Goodfellow (New York, NY: John Wiley and Sons).
- Martínez-Romero, E., and Caballero-Mellado, J. (1996). *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. *Crit. Rev. Plant Sci.* 15 (2), 113–140. doi: 10.1080/07352689.1996.10393183
- Meier-Kolthoff, J. P., and Göker, M. (2019). TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nat. Commun.* 10 (1), 1–10. doi: 10.1038/s41467-019-10210-3
- Miller, J. H. (1972). *Experiments in molecular genetics* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory), 466.
- Nilsson, J. F., Castellani, L. G., Draghi, W. O., Pérez-Giménez, J., Torres Tejerizo, G. A., and Pistorio, M. (2019). Proteomic analysis of rhizobium favelukesii LPU83 in response to acid stress. *J. Proteome Res.* 18 (10), 3615–3629. doi: 10.1021/acs.jproteome.9b00275
- Pan, H., and Wang, D. (2017). Nodule cysteine-rich peptides maintain a working balance during nitrogen-fixing symbiosis. *Nat. Plants* 3 (5), 1–6. doi: 10.1038/nplants.2017.48

- Paradis, E., Claude, J., and Strimmer, K. (2004). APE: Analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics* 20 (2), 289–290. doi: 10.1093/bioinformatics/btg412
- Pasek, S., Rislér, J. L., and Brézellec, P. (2006). Gene fusion/fission is a major contributor to evolution of multi-domain bacterial proteins. *Bioinformatics* 22 (12), 1418–1423. doi: 10.1093/bioinformatics/btl135
- Price, P. A., Tanner, H. R., Dillon, B. A., Shabab, M., Walker, G. C., and Griffiths, J. S. (2015). Rhizobial peptidase HrrP cleaves host-encoded signaling peptides and mediates symbiotic compatibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 15244–15249. doi: 10.1073/pnas.1417797112
- Richter, M., Rosselló-Móra, R., Oliver Glöckner, F., and Peplies, J. (2016). JSpeciesWS: A web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics* 32 (6), 929–931. doi: 10.1093/bioinformatics/btv681
- Riviezzi, B., Cagide, C., Pereira, A., Herrmann, C., Lombide, R., Lage, M., et al. (2020). Improved nodulation and seed yield of soybean (*Glycine max*) with a new isoflavone-based inoculant of *Bradyrhizobium elkanii*. *Rhizosphere* 15, 100219. doi: 10.1016/j.rhisp.2020.100219
- Seemann, T. (2014). Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30 (14), 2068–2069. doi: 10.1093/bioinformatics/btu153
- Shi, H., Sun, G., Gou, L., and Guo, Z. (2022). Rhizobia-legume symbiosis increases aluminum Resistance in alfalfa. *Plants* 11 (10), 1275. doi: 10.3390/plants11101275
- Sotelo, M., Irisarri, P., Lorite, M., Casaretto, E., Rebuffo, M., Sanjuán, J., et al. (2011). Diversity of rhizobia nodulating *Lotus corniculatus* grown in northern and southern regions of Uruguay. *Appl. Soil Ecol.* 49, 197–207. doi: 10.1016/j.apsoil.2011.05.005
- Tamura, K., and Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10 (3), 512–526. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023
- Tamura, K., Stecher, G., and Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Mol. Biol. Evol.* 38 (7), 3022–3027. doi: 10.1093/molbev/msab120
- Tartaglia, C., Azziz, G., Lorite, M. J., Sanjuán, J., and Monza, J. (2019). Phylogenetic relationships among introduced and autochthonous rhizobia nodulating *Trifolium* spp. in Uruguayan soils. *Appl. Soil Ecol.* 139, 40–46. doi: 10.1016/j.apsoil.2019.03.014
- Torres Tejerizo, G., Rogel, M. A., Ormeño-Orrillo, E., Althabegoiti, M. J., Nilsson, J. F., Niehaus, K., et al. (2016). *Rhizobium favelukesii* sp. nov., isolated from the root nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Int. J. System. Evolut. Microbiol.* 66 (11), 4451–4457. doi: 10.1099/ijsem.0.001373
- Torres Tejerizo, G. T., Del Papa, M. F., Draghi, W., Lozano, M., Giusti, M. de los A., Martini, C., et al. (2011). First genomic analysis of the broad-host-range *Rhizobium* sp. LPU83 strain, a member of the low-genetic diversity Oregon-like *Rhizobium* sp. group. *J. @ Biotechnol.* 155 (1), 3–10. doi: 10.1016/j.jbiotec.2011.01.011
- Torres Tejerizo, G. T., Wibberg, D., Winkler, A., Ormeño-Orrillo, E., Martínez-Romero, E., Niehaus, K., et al. (2017). Genome sequence of the symbiotic type strain *Rhizobium tibeticum* CCBAU85039T. *Genome Announcements* 5 (4), e01513–e01516. doi: 10.1128/genomeA.01513-16
- Vincent, J. M. (1970). *A manual for the practical study of root-nodule bacteria* (Oxford: Blackwell Scientific Press).
- Wegener, C., Schröder, S., Kapp, D., Pühler, A., Segundo López, E., Martínez-Abarca, F., et al. (2001). A population of twelve acid tolerant alfalfa nodulating *Rhizobium* strains isolated from different sites in Argentina exhibit the same molecular characteristics as the *Rhizobium* sp. strain Or191. *Symbiosis* 30, 141–162.
- Wilson, K., Sessitsch, A., Corbo, J., Giller, K., Akkermans, A., and Jefferson, R. (1995). B-glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other gram-negative bacteria. *Microbiology* 141 (7), 1691–1705. doi: 10.1099/13500872-141-7-1691
- Yu, G., Smith, D. K., Zhu, H., Guan, Y., and Lam, T. T. Y. (2017). Ggtree: an R package for visualization and annotation of phylogenetic trees with their covariates and other associated data. *Methods Ecol. Evol.* 8 (1), 28–36. doi: 10.1111/2041-210X.12628
- Zhou, P., Silverstein, K. A., Gao, L., Walton, J. D., Guehl, J., and Young, N. D. (2013). Detecting small plant peptides using SPADA (Small peptide alignment discovery application). *BMC Bioinf.* 14, 335. doi: 10.1186/1471-2105-14-335