



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE CIENCIAS

# Desarrollo de un inoculante rizobiano para un nuevo cultivar de *Lotus uliginosus*



TESIS DE MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Ing. Agr. Danny Camargo

TUTOR: Dr. Jorge Monza

FACULTAD DE AGRONOMÍA LABORATORIO DE BIOQUIMICA

## INDICE GENERAL

Pg.

Agradecimientos.....	
Resumen.....	
I INTRODUCCIÓN.....	1
1    USO AGRONÓMICO DE <i>Lotus uliginosus</i> .....	1
2    MICROSIMBIOTES DEL GÉNERO <i>Lotus</i> .....	2
2.1    Identificación de cepas a través de perfiles ERIC y BOX .....	3
2.2    Genes usados en taxonomía molecular para determinar género –especie..	3
3    CICLO BIOGEOQUÍMICO DEL NITRÓGENO.....	5
3.1    Entrada de nitrógeno a los ecosistemas .....	5
3.2    Desnitrificación por <i>Bradyrhizobium</i> .....	6
4    ESTABLECIMIENTO DE LA SIMBIOSIS RIZOBIO – LEGUMINOSA.....	8
5    FACTORES QUE AFECTAN LA NODULACIÓN.....	10
5.1    Temperatura.....	10
5.2    Concentración de nitrógeno combinado en el suelo.....	10
6    COMPETITIVIDAD ENTRE CEPAS INTRODUCIDAS Y CEPAS NATIVAS.....	11
7    CRITERIOS PARA LA SELECCIÓN DE CEPAS.....	12
7.1    Determinación de la eficiencia simbiótica.....	12
7.2    Competencia.....	12
7.3    Estabilidad genética.....	13
7.4    Comportamiento industrial.....	14
7.5    Sobrevivencia en semillas.....	14
7.6    Tolerancia a factores bióticos y abióticos.....	14
7.7    Incapacidad de desnitrificar .....	15
8    INOCULACIÓN DE LEGUMINOSAS FORRAJERAS EN URUGUAY.....	15
8.1    Fabricación de inoculantes.....	16
8.2    Normativas de control de calidad de los inoculantes del MGAP.....	20
II OBJETIVOS.....	22
1    OBJETIVO GENERAL.....	22
2    OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	22
III MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
1    BACTERIAS.....	23
1.1    Rizobios.....	22

1.2	<i>Escherichia coli</i> .....	24
2	PLANTAS.....	24
3	CRECIMIENTO DE BACTERIAS.....	24
4	CRECIMIENTO DE PLANTAS .....	27
4.1	Desinfección y germinación de semillas.....	27
4.2	Crecimiento de las plantas en condiciones controladas.....	28
5	EFICIENCIA SIMBIÓTICA EN MACETAS.....	28
6	EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA NODULACIÓN.....	29
7	DETERMINACIÓN DE ÓXIDO NITROSO.....	30
8	PREPARACION DE INOCULANTES EN CONDICIÓN INDUSTRIAL PARA ENSAYO A CAMPO.....	31
9	MULTIPLICACIÓN DE INOCULANTES.....	32
10	EFICIENCIA SIMBIOTICA Y COMPETITIVIDAD DE RIZOBIOS EN CONDICION DE CAMPO .....	32
10.1	Eficiencia simbiótica.....	32
10.2	Competitividad en campo.....	34
11	COMPETTIVIDAD DEL INOCULANTE COMERCIAL EN DISTINTOS SUELOS	36
11.1	Colecta de suelos.....	36
11.2	Marcaje de la cepas usada como inoculante comercial con el gen reportero <i>gusA</i> .....	37
11.3	Cinética de nodulación del parental y transconjugantes <i>in-vitro</i> .....	38
11.4	Inoculación y siembra de las semillas en cilindros de suelo.....	39
11.5	Ocupación de nódulos.....	39
IV	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
1	EFICIENCIA SIMBIÓTICA EN MACETAS.....	43
2	EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA NODULACIÓN.....	43
3	CAPACIDAD DE DESNITRIFICACIÓN DE LAS CEPAS.....	45
4	PREPARACION DE INOCULANTES EN CONDICIÓN INDUSTRIAL.....	48
4.1	Preparación de los inoculantes para ensayos de campo.....	50
4.2	Evaluación de manitol y glicerol como fuentes de carbono.....	52
5	SELECCIÓN DE UN CEBADOR PARA EL MONITOREO DEL INOCULANTE EN CAMPO.....	53
6	EVALUACIÓN DE LOS INOCULANTES EN CAMPO.....	58
6.1	Implantación.....	58

6.2	Eficiencia simbiótica y ocupación de nódulos.....	59
7	COMPETITIVIDAD DEL INOCULANTE COMERCIAL CON CEPAS NATIVAS...	67
7.1	Uso del gen reportero <i>gusA</i> en evaluación de competencia.....	67
7.2	Nódulos inducidos en raíces de los cultivares LE306 y 'Grasslands Maku' en diferentes suelos.....	69
7.3	Competencia del inoculante comercial y cepas nativas presentes en distintos suelos.....	71
VI	BIBLIOGRAFÍA.....	80

## AGRADECIMIENTOS

A mi familia, en especial a mis padres, sin olvidar a mi abuelita y mis hermanos; muchas gracias por su apoyo constante.

A la Fundación Gran Mariscal de Ayacucho de Venezuela por otorgarme la beca de maestría.

A mi tutor Jorge Monza por la confianza que depositó en mí, por todas sus enseñanzas y su apoyo en la realización de esta tesis.

A Máximo y Leti, por su colaboración en la elaboración de los ensayos y por brindarme su amistad.

A mis compañeros de Bioquímica: Esteban, Gastón, Yolanda, Santiago, Pedro, Omar, Florencia y Pilar; por su disponibilidad para ayudarme.

A los que ya no están en el laboratorio, pero que estuvieron conmigo en esas largas Jornadas: Sabrina, Marianita, Soledad, Matías y Betina.

A Mónica Rebuffo, por su interés y disponibilidad en todo lo referente a ejecución de los ensayos, por sus acertadas correcciones y por responder siempre a mis interrogantes.

A María José, Omar, Pepe y Jose; por todo su apoyo en la siembra y cosecha en campo. También por hacer que las jornadas de trabajo fueran divertidas.

A Guillermo Arrospe por abrirme las puertas de la Empresa CALISTER para la realización de la tesis y por su apoyo para que los ensayos fueran exitosos.

A Analía y Federico por la ayuda; y al personal de la empresa CALISTER por ser buenos anfitriones.

A alguien muy especial, Janneth Guerrero mil gracias por todo el apoyo, fuiste una persona clave sin lugar a dudas en la realización de la maestría, estuviste presente desde el inicio y hasta el final. Tu gran ayuda tuvo sus frutos y siempre voy a tener presente todo lo que hiciste por mí.

A la Familia Andueza, Carlos, Gelná y Ariana, por abrirme las puertas de su casa, el rincón Tachirense en Uruguay y por hacerme sentir como parte de ustedes.

A Tibusay y Eduardo, los hermanos y compadres que conocí en Uruguay, fue numerosa la ayuda que recibí de ustedes.

A Marianela, María Sofía, Flavia, Ely, Naryu, Chrystel, Mafer, Paty y a toda la comunidad de Venezolanos en Uruguay por los grandes momentos que pasamos.

A Dios y a la Virgen de la Pastora, por protegerme y darme salud.

### I. INTRODUCCIÓN

#### 1. USO AGRONÓMICO DE *Lotus uliginosus*

El género *Lotus* incluye más de 180 especies perennes y anuales, que viven en diferentes hábitats (Díaz *et al.*, 2005) y son usadas para el desarrollo de pasturas y heno de calidad donde otras especies de leguminosas no son apropiadas (Papadoupoulos y Kelman, 1999).

Las cuatro especies domesticadas usadas en el mejoramiento de praderas en Uruguay son *Lotus corniculatus*, *Lotus glaber* (syn. *Lotus tenuis*), *Lotus uliginosus* Schkuhr (syn. *Lotus pedunculatus*) y *Lotus subbiflorus* (Díaz *et al.*, 2005). Estas leguminosas presentan buena adaptación a suelos con baja disponibilidad de fósforo, taninos que impiden la ocurrencia de meteorismo (Rebuffo *et al.*, 2007) y alto aporte de proteína que se genera básicamente a partir de nitrógeno derivado de la fijación biológica de nitrógeno (FBN) realizada por bacterias del género *Bradyrhizobium* y *Mezorhizobium* (Labandera *et al.*, 2005).

*Lotus uliginosus*, perteneciente a la familia Fabaceae, es una leguminosa perenne, con tallos erectos, hojas con 5 foliolos, inflorescencias pedunculadas y vainas dispuestas en forma de racimo (Tormo, 2010). Presenta una raíz pivotante central con raíces fibrosas que colonizan exitosamente el tapiz natural, además de rizomas y estolones (Hernández *et al.*, 2005).

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

La principal desventaja del cultivar 'Grasslands Maku' es el bajo rendimiento de producción de semilla en las condiciones ambientales de Uruguay (Hernández *et al.*, 2005), lo que lleva al alto costo de las mismas. Por este motivo, el programa de mejoramiento genético del INIA desarrolló la línea

LE306, un material diploide de *L. uliginosus* con floración temprana y alto potencial de semillazon (Hernández *et al.*, 2005). Su adaptación varía según las regiones del país, y su rentabilidad depende, entre otras, del inoculante rizobiano (Hernández *et al.*, 2005).

En el entendido que cuando se introduce una leguminosa en una región es recomendable evaluarla con los microsimbiontes del lugar, en esta tesis se ensayó con la línea LE306 de *L. uliginosus*, las características de la simbiosis con el inoculante comercial recomendado para Grasslands Maku, cepa U526 de *Bradyrhizobium* sp., y con cepas nativas-naturalizadas (Batista, 2009), para conocer entre estas últimas el potencial para ser usada como inoculante comercial.

## 2. MICROSIMBIOTES DEL GÉNERO *Lotus*

En general, las leguminosas del género *Lotus* establecen simbiosis específicas con rizobios pertenecientes a los géneros *Mesorhizobium* y *Bradyrhizobium* (Jordan, 1982; Pankhurst *et al.*, 1986). *L. corniculatus* y *L. glaber* son nodulados típicamente por bacterias del género *Mesorhizobium*, mientras que *L. subbiflorus* y *L. uliginosus* son nodulados por bacterias del género *Bradyrhizobium* (Monza *et al.*, 1992). Entre estos grupos de inoculación se han identificado relaciones incompatibles, dado que las bacterias que pertenecen a un grupo, no producen nodulación en el otro, o bien nodulan pero son inefectivas o parásitas. En este sentido, si se siembran en forma consecutiva *L. uliginosus* y/o *L. subbiflorus* en un campo con historia de *L. corniculatus*, o viceversa, pueden inducirse nódulos ineficientes o pseudonódulos. Un ejemplo de esto en Uruguay lo constituye *L. subbiflorus*, típicamente nodulado por *Bradyrhizobium* sp., que sembrado en suelos donde se cultivó *L. corniculatus* o *L. tenuis* inoculados con la cepa comercial de *Mesorhizobium* sp., se forman numerosos nódulos inefectivos (Fillat y Puppo, 1994). Debido a esto han surgido problemas de implantación y pérdida en la producción de biomasa. De todas formas, según Labandera *et al.* (2005) y Labandera (2007) esto no significa que no se puedan manejar esas situaciones, dado que si la concentración del inoculante y metodología de aplicación son las recomendadas esta situación no debería constituirse en una restricción productiva.

Para solucionar esta situación en Uruguay se probó otra alternativa que consistió en utilizar como inoculante a la cepa de Nueva Zelanda de *Mesorhizobium* sp., denominada U261 en Uruguay, que tiene amplio rango de hospedero y nodula a *L. subbiflorus* y *L. corniculatus*. Esta estrategia

fracasó, debido a que no logró buen desempeño en campo en ninguno de los hospederos (Fillat y Puppo, 1994).

### 2.1 Identificación de cepas a través de perfiles ERIC y BOX

El rep-PCR, es una técnica basada en la rápida obtención de huellas genómicas (*fingerprints*) mediante la amplificación de ácidos nucleicos, para lo que es necesario utilizar cebadores diseñados a partir de secuencias repetitivas dispersas en el genoma (Mantilla *et al.*, 2004). Esta técnica es considerada adecuada para evaluar la diversidad de bacterias, incluyendo los rizobios (Versalovic *et al.*, 1991; de Bruijn 1992; Laguerre *et al.*, 1997; Menna *et al.*, 2009).

Se han utilizado tres tipos de elementos repetitivos para la tipificación de bacterias: los elementos repetitivos extragénicos palindrómicos (REPs; Stern *et al.*, 1984), las secuencias consenso intergénicas repetidas de enterobacterias (ERIC; Versalovic *et al.*, 1991; de Bruijn, 1992) y los elementos BOX localizados en regiones intergénicas. Estos elementos están compuestos de varias combinaciones de tres subunidades de secuencias (boxA, boxB y boxC), aunque sólo la región boxA parece estar conservada en diversas bacterias (Menna *et al.*, 2009).

Para la identificación de rizobios se han utilizado diferentes elementos repetitivos como REP-PCR, BOX-PCR y ERIC-PCR, designados en conjunto como rep-PCR. Vinuesa *et al.* (2005) cuantificaron altos niveles de diversidad genética entre aislados de *Bradyrhizobium canariense* y *B. japonicum*, provenientes de muestreos realizados en Marruecos e Islas Canarias. A su vez Menna *et al.* (2009) usando BOX-PCR, hicieron una caracterización preliminar de colecciones de cepas de rizobios e identificaron 68 cepas usadas como inoculantes comerciales.

Con el uso de ERIC-PCR, Sotelo *et al.* (2011) identificaron 104 perfiles diferentes en una colección de 168 aislamientos de nódulos de *L. corniculatus* de diferentes zonas de Uruguay. En ese trabajo también se propone que la cepa U510, utilizada como inoculante comercial para *L. corniculatus*, tiene problemas de adaptación a las condiciones edafoclimáticas del país, ya que no se identifica en las pasturas con al menos un año de establecidos.

## 2.2 Genes usados en taxonomía molecular para determinar género -especie

La secuencia del gen ribosomal 16S ARNr se usa en taxonomía molecular en la búsqueda de filogenias de bacterias, entre ellas rizobios (Woese *et al.*, 1990; Garrity y Holt, 2001; Vinuesa *et al.*, 2005). Este gen tiene determinadas características que lo hacen útil como cronómetro evolutivo. El ARN ribosomal es una molécula muy antigua, distribuida universalmente en los seres vivos y funcionalmente constante, que contiene regiones con secuencias conservadas y otras secuencias variables (Madigan *et al.*, 2004). De todas forma, aunque el gen 16S ARNr es preciso para la definición de los géneros, en algunos casos ofrece una pobre resolución para asignar especies y subespecies (Woese, 1987, Garrity y Holt, 2001). Las limitaciones surgen principalmente del alto nivel de conservación de estos genes (Gevers *et al.*, 2005).

El hecho de haberse demostrado recombinación genética y transferencia horizontal del gen 16S ARNr (van Berkum *et al.*, 2003; Gevers *et al.*, 2005) pone en evidencia que hay que reconsiderar el alcance del uso de este gen como criterio taxonómico. Basándose en estas observaciones y para minimizar sus consecuencias se ha propuesto como alternativa el uso de otros genes con una tasa de evolución más rápida que el 16S ARNr, pero que a su vez se conserven lo suficiente como para mantener la información genética (Stackebrandt *et al.*, 2002; Stepkowski *et al.*, 2003; Martens *et al.*, 2007; Alexandre *et al.*, 2008).

Los genes ribosomales como el 23S ARNr y las secuencias ITS (*internal transcribed spacer*) pueden aportar en la definición de una especie (Tesfaye *et al.*, 1997; Vinuesa *et al.*, 1998; van Berkum y Fuhrman, 2000; Willems *et al.*, 2001; Germano *et al.*, 2006; Menna *et al.*, 2009). Sin embargo, como las ITS se encuentran en el mismo operón que el 16S ARNr, las limitaciones que surgen como consecuencia de la transferencia horizontal de genes, también son de considerar cuando se usan esas secuencias.

Por estas razones, en estudios filogenéticos realizados en bacterias pertenecientes al orden *Rhizobiales*, se han incluido los genes denominados *housekeeping* que codifican para determinadas proteínas, para los que en general hay que diseñar *primers* específicos. Entre los más usados se encuentran el *atpD*, *dnaK*, *dnaJ*, *gap*, *glnA*, *glnII*, *gltA*, *gyrB*, *pnp*, *recA*, *rpoA*, *rpoB* and *thrC* (Turner y

Young 2000; Gaunt *et al.*, 2001; Alexandre *et al.*, 2008; Martens *et al.*, 2008; Vinuesa *et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 2009; Rivas *et al.*, 2009; Menna *et al.*, 2009). Estos genes han sido usados con éxito para estudiar la filogenia y diversidad genética en el género *Bradyrhizobium*. Vinuesa *et al.* (2005) en base a múltiples marcadores moleculares, concretamente: REP-PCR, PCR-RFLP de amplicones (*rrs*, ITS y *rrl*), análisis de polimorfismos de ADN en 5 locus (ITS, *atpD*, *glnII*, *recA* y *rpoB*) y el gen simbiótico (*nifH*); estudiaron el impacto de la migración y la recombinación genética en la historia evolutiva de *B. canariense* y *B. japonicum*, aislados de Islas Canarias y Marruecos. Recientemente, Lorite *et al.*, (2011) caracterizaron bacterias que establecen simbiosis eficientes con *L. uliginosus*. La identificación molecular de 39 aislados, más la cepa utilizada como inoculante comercial, fue realizada por REP-PCR, RFLP de 16S ARNr y análisis de las secuencias 16S ARNr, *glnII* y *recA*. Esto permitió establecer que los simbiosiontes de *L. uliginosus* tienen una estrecha relación filogenética con *B. japonicum*.

También se ha usado REP-PCR, análisis de las secuencias 16S ARNr, *atpD* y *recA*, así como el de secuencias ITS en estudios de diversidad y filogenia de rizobios que nodulan otras especies del género *Lotus* spp. Lorite *et al.* (2010b) caracterizó 180 cepas capaces de formar simbiosis eficientes con *L. corniculatus* y *L. tenuis* mediante REP-PCR y análisis de las secuencias 16S ARNr, *atpD* y *recA* y determinaron que estos aislados están relacionados genéticamente con diferentes especies del género *Mesorhizobium*. También Sotelo *et al.* (2011) establecieron relaciones filogenéticas entre aislados de *L. corniculatus* de diferentes suelos de Uruguay con distintas especies del género *Mesorhizobium*, usando como criterio secuencias de 16S ARNr, *atpD*, *nifH*, *nodC* e ITS.

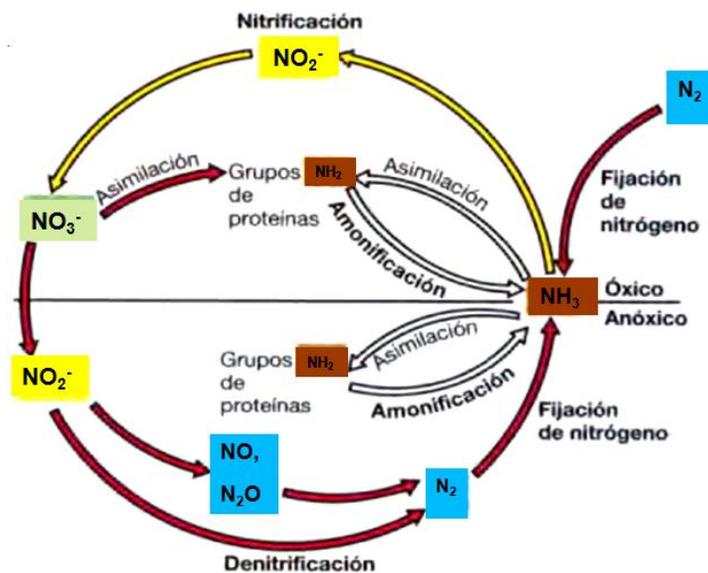
### 3. CICLO BIOGEOQUÍMICO DEL NITRÓGENO

Los seres vivos pueden sintetizar moléculas nitrogenadas a partir de componentes nitrogenados como aminoácidos, bases púricas o pirimídicas, del amonio o nitratos, o utilizar el nitrógeno elemental (N<sub>2</sub>), forma abundante en la atmósfera y en el agua (Fuentes *et al.*, 2003).

Los principales procesos microbianos que participan en la transformación del nitrógeno son la fijación biológica (FBN), la nitrificación y la desnitrificación (Madigan *et al.*, 2004), resumidos junto a otros procesos en la figura 1.

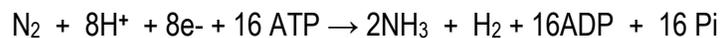
### 3.1. Entrada de nitrógeno a los ecosistemas

El  $N_2$  es una molécula estable y no puede ser utilizado como tal por las plantas, los animales, ni los hongos. En la naturaleza, sólo un grupo minoritario de procariotas, denominados genéricamente diazótrofos, son capaces de reducirlo a  $NH_4^+$  a través de un proceso conocido como fijación biológica de nitrógeno (FBN), que consiste en romper la unión triple del  $N_2$ .



**Figura 1.** Ciclo del nitrógeno. Las reacciones de oxidación están representadas por las flechas amarillas y las de reducción en flechas rojas. La fijación biológica de nitrógeno permite su incorporación a los ecosistemas, mientras que la desnitrificación su salida bajo la forma de  $N_2$ ,  $N_2O$  o  $NO$ . (Tomado de Madigan *et al.*, 2004).

En la FBN es clave la enzima nitrogenasa, responsable de la reducción de  $N_2$  a  $NH_3$ , que requiere energía en forma de ATP y poder reductor (Monza y Palacios, 2004). La ecuación simplificada se presenta a continuación:



Los diazótrofos pueden realizar este proceso reductivo en vida libre o asociados a otros organismos, por ejemplo en simbiosis con leguminosas.

### 3.2. Desnitrificación por *Bradyrhizobium*

En determinadas condiciones el nitrógeno se pierde del suelo bajo la forma de  $N_2$ , óxido nítrico ( $N_2O$ ) y óxido nitroso (NO). Este proceso (Figura 1) es conocido como desnitrificación. La desnitrificación produce entonces la salida de nitrógeno del suelo, cuando la concentración de oxígeno es limitante (Mesa *et al.*, 2004).

El proceso consiste en la reducción del nitrato ( $NO_3^-$ ) o del nitrito ( $NO_2^-$ ) a nitrógeno gas (Figura 1), con el pasaje a través de formas oxidadas intermedias correspondientes al NO y  $N_2O$  (Sameshina *et al.*, 2003).

La capacidad de desnitrificar es infrecuente entre los rizobios, y sólo algunas cepas del género *Bradyrhizobium* pueden realizarla. La vía consiste en la acción secuencial de las enzimas nitrato reductasa (Nap/Nar), nitrito reductasa (Nir), óxido nítrico reductasa (Nor) y óxido nitroso reductasa (Nos; Delgado *et al.*, 2007), según se resume en la figura 2. Las enzimas Nap, Nir, Nor y Nos en *Bradyrhizobium japonicus* están codificadas por los genes *napEDABC*, *nirK*, *norCBQD* y *nosRZDFYLX*, respetivamente (Bedmar *et al.*, 2005).



**Figura 2.** Reacciones implicadas en la desnitrificación. El proceso es catalizado en forma secuencial por las enzimas nitrato reductasa (Nap/Nar), nitrito reductasa (Nir), óxido nítrico reductasa (Nor) y óxido nitroso reductasa (Nos). La salida de nitrógeno en forma gaseosa (desnitrificación) puede ser como NO,  $N_2O$  o  $N_2$ .

Las bacterias reducen el  $NO_3^-$  a  $NO_2^-$  con diferentes finalidades: para su asimilación, como fuente de energía cuando el nitrato actúa como aceptor final de electrones (respiración) y para disipar el exceso de poder reductor (desasimilación; Bueno, 2008). En estos tres procesos intervienen,

respectivamente, la nitrato reductasa asimilatoria (Nas), la nitrato reductasa respiratoria de membrana (Nar) y la nitrato reductasa periplásmica (Nap).

La reducción de  $\text{NO}_2^-$  a NO es catalizado por dos tipos de Nir, ambas periplásmicas, la NirS y la NirK (Bedmar *et al.*, 2005). Por su parte, la reducción de NO a  $\text{N}_2\text{O}$  involucra la formación de un enlace N-N, reacción catalizada por los dos tipos de enzimas Nor, un tipo llamado el cNor que recibe los electrones del citocromo c oxidasa, y el otro tipo llamado qNor, que recibe los electrones de una quino. El último paso de la desnitrificación es la reducción de  $\text{N}_2\text{O}$  a  $\text{N}_2$ , reacción catalizada por la enzima Nos, de localización periplásmica en *B. japonicum* (Bedmar *et al.*, 2005).

En la agricultura, es usual la fertilización de suelos con nitratos. Cuando se generan condiciones microaeróbicas, como consecuencia de las lluvias, el nitrato se pierde como NO,  $\text{N}_2\text{O}$ , o  $\text{N}_2$  (Bueno, 2008) con las consecuentes pérdidas económicas para el productor. A su vez, la pérdida de NO y  $\text{N}_2\text{O}$  tiene un impacto ambiental negativo por su efecto invernadero, porque contribuyen en la formación de lluvia ácida y en la destrucción de la capa de ozono (Bueno, 2008).

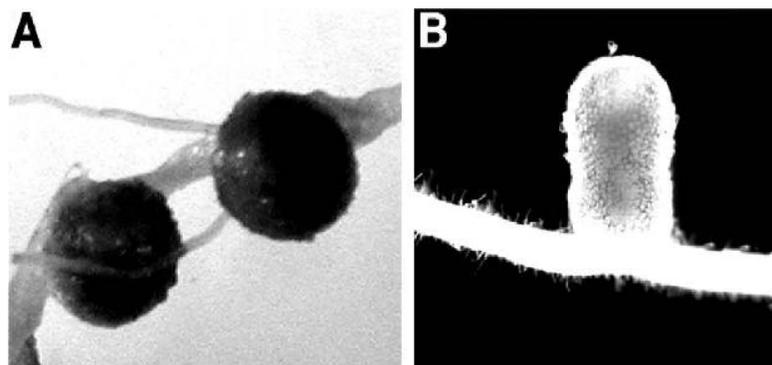
Por esto, cuando se busca desarrollar un inoculante comercial, además de las características deseadas en cuanto a su competitividad y eficiencia simbiótica, es recomendable evaluar el potencial desnitrificador, dadas las derivaciones económicas y medio ambientales que esto implica (Delgado *et al.*, 2007). En este sentido Monza *et al.* (2006) han descrito cepas de *Mesorhizobium* sp. aisladas de suelos de Uruguay que contienen la vía de desnitrificación incompleta.

#### 4. ESTABLECIMIENTO DE LA SIMBIOSIS RIZOBIO – LEGUMINOSA

Los rizobios son bacilos Gram negativos, aerobios, incapaces de formar esporas, se mueven por medio de 1-6 flagelos que pueden ser peritricos o subpolares, se alimentan de materia orgánica del suelo y de compuestos secretados por las raíces. En este estado, conocido como vida libre, son incapaces de fijar  $\text{N}_2$ . Frente a compuestos producidos y exudados por las raíces de leguminosas los rizobios tienen respuestas quimiotácticas, que son claves en el proceso de nodulación (Fuentes *et al.*, 2003; Monza y Palacios, 2004).

Los nódulos inducidos en las raíces de las leguminosas pueden ser de dos tipos morfológicos: determinados e indeterminados. Los nódulos determinados (Figura 3A), característicos de *Lotus*, *Glycine* y *Phaseolus*, no mantienen meristema apical y las células periféricas y centrales se encuentran en similar estado de desarrollo (Monza y Palacios, 2004; Krishnan y Bennett, 2006). Por el contrario, los nódulos indeterminados, de aspecto alargado (Figura 3B), tienen un meristema persistente en su ápice y están presentes en leguminosas como *Medicago* y *Pisum* (Monza y Palacios, 2004; Krishnan y Bennett, 2006).

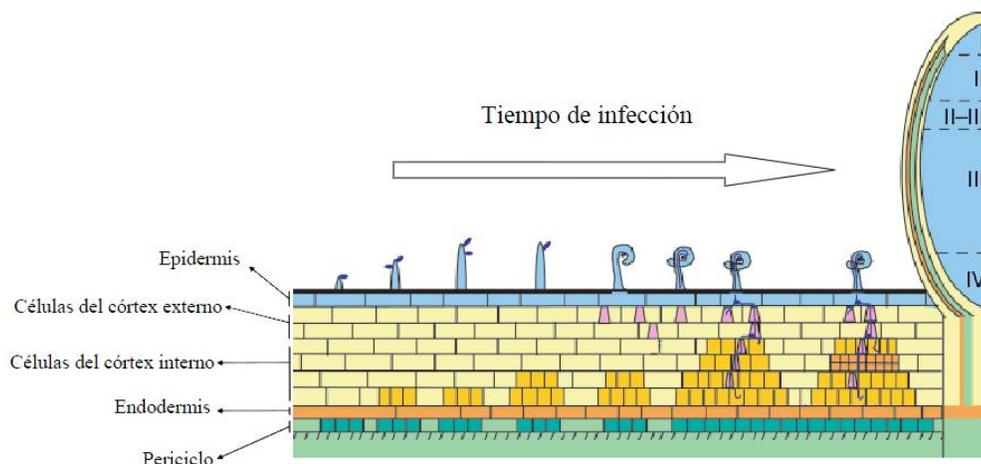
El proceso de nodulación depende del intercambio de señales químicas entre la leguminosa y la bacteria, en el que participan flavonoides liberados por las leguminosas y lipoquitinolisacáridos (LPQ) producto de los genes *nod* sintetizados por los rizobios (Dénarié *et al.*, 1996; Parniske y Downie, 2003).



**Figura 3.** Fotomicrografía de nódulos. A) determinados y B) indeterminados. (Tomado de Krishnan y Bennett, 2006).

La unión de los rizobios a las raíces de las leguminosas y la producción de los factores de nodulación, tienen como consecuencia el enrollamiento de los pelos radicales (Figura 4). El hilo de infección que se genera, donde los rizobios se multiplican activamente, penetra hasta llegar a células corticales en las que se liberan los rizobios (Figura 4) y pasan al estado denominado bacteroide (Krishnan y Bennett, 2006), que incluye cambios morfológicos y funcionales. Los bacteroides, rodeados

por la membrana peribacteroidal de origen vegetal, constituyen los simbiosomas (Monza y Palacios, 2004).



**Figura 4.** Esquema del proceso de infección y desarrollo de un nódulo (Tomado de Oliva, 2008).

Seguidamente a la formación del simbiosoma, el primordio nodular se transforma en nódulo maduro (Oliva, 2008) y los bacteroides reducen enzimáticamente el  $N_2$  a  $NH_3$  (Monza y Palacios, 2004).

## 5. FACTORES QUE AFECTAN LA NODULACIÓN

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

### 5.1 Temperatura

La temperatura del suelo en la zona de la raíz es uno de los factores que controlan la aparición y la formación del nódulo (Liu *et al.*, 2011). En *Trifolium vesiculosum* Schomburg y Weaver (1992) determinaron que la nodulación a 25 °C fue más rápida que a 18 °C y 32 °C. De todas formas, la velocidad de nodulación en relación a la temperatura varía entre especies y variedades (Liu *et al.*,

2011). En *Glycine max* a 25 °C también se producen más nódulos en la etapa temprana de crecimiento. Sin embargo para lograr mayor tamaño de los nódulos resultó ser 20 °C la temperatura óptima, respecto a 15 °C y 30 °C (Lindemann y Ham, 1979). Por su parte, Montañez *et al.* (1995), con el mismo cultivar de soja en un estudio que incluyó el efecto de la temperatura sobre la nodulación con cinco cepas de *B. japonicum*, encontraron que a 25 °C y 35 °C se produce mayor cantidad de nódulos que a 15 °C. De igual forma en *Trifolium repens* el establecimiento de nódulos se ve mejorado con al aumento de la temperatura en el rango de 10 °C a 35 °C (Richardson y Syers, 1985; Whitehead, 1995).

### 5.2 Concentración de nitrógeno combinado en el suelo

El nitrógeno combinado presente en el suelo inhibe el establecimiento de nódulos en las raíces de las leguminosas (Liu *et al.*, 2011). La abundancia de nitrógeno combinado en el suelo determina la represión de los genes *nod* así como disminución de la síntesis de lectinas, por lo que disminuye la capacidad de anclaje de la bacteria a la raíz. Además es menor la formación de pelos radicales, con lo que baja de la superficie radical expuesta. También se produce aborto de los cordones de infección, se inhibe la transformación de bacterias en bacteroides, disminuye la actividad nitrogenasa, aumenta la síntesis de etileno por las raíces y la abscisión de nódulos. De esta forma, cuando hay suficiente disponibilidad de nitrógeno en el suelo, la planta privilegia la incorporación del nitrógeno edáfico respecto al derivado de la atmósfera por razones de economía energética (Racca y Collino, 2006).

## 6. COMPETITIVIDAD ENTRE CEPAS INTRODUCIDAS Y CEPAS NATIVAS

Las cepas introducidas como inoculante, compiten por los nutrientes con comunidades de cepas nativas que viven en la rizosfera y que están adaptadas a ese ambiente (Toro, 1996). La capacidad de colonizar la raíz y formar nódulos depende de la competitividad de las bacterias, pero se ha demostrado que las cepas más competitivas recuperadas de los nódulos resultaron ser las menos efectivas (Amarger y Lobreau, 1982; Castro *et al.*, 2000).

En la evaluación de cepas para ser usadas como inoculantes, además de establecer la gama de huéspedes y métodos de inoculación, es necesario conocer la competitividad y persistencia. Y en

este sentido, cuando se inocula se debe considerar que la cepa usada debe desempeñarse en dos situaciones diferentes: en suelos que tienen agotadas o bajas poblaciones de bacterias nativas o cuando hay poblaciones establecidas de rizobios ineficientes (Toro, 1996).

La colonización de raíces por cepas usadas como inoculantes es afectada por variables ambientales, en particular el estrés hídrico y/o térmico en los primeros días de implantación del cultivo. La sequía en épocas cercanas a la siembra retarda la nodulación y favorece la formación de nódulos por las cepas nativas-naturalizadas respecto a la cepa usada como inoculante (Racca y Collino, 2006), generalmente introducida.

De esta forma, los factores ambientales tienen consecuencias sobre la cepa de rizobio que formará los nódulos, y también en la localización de éstos en las raíces, lo que es determinante en la eficiencia de la fijación de nitrógeno. La diferente topofisis de los nódulos es importante desde el punto de vista productivo, ya que a igualdad de masa nodular, los nódulos implantados en la raíz primaria cercanos al cuello de la planta, tienen actividad nitrogenasa específica varias veces superior a los de las raíces secundarias o terciarias, posiblemente como consecuencia de un mayor suministro de fotoasimilados (Racca y Collino, 2006).

Para evaluar la competitividad de cepas en el suelo se han usado diferentes estrategias como la resistencia a antibióticos (Turco *et al.*, 1986; Ramírez *et al.*, 1998), serología (Evans *et al.*, 1996; Reuhs *et al.*, 1999), producción de melanina (Cubo *et al.*, 1988; Castro *et al.*, 2000) y perfil de plásmidos (Monza *et al.* 1992). Sin embargo, es claro que estas técnicas además de no tener siempre la exactitud requerida, no son adecuadas para diferenciar gran número de cepas. Desde hace algo más de 10 años, la universalización del uso de la PCR y el desarrollo de *primers* como ERIC, BOX y REP (Versalovic *et al.*, 1991; Menna *et al.*, 2009; Stern *et al.*, 1984) ha hecho posible evaluaciones precisas y rápidas de muchas cepas simultáneamente, con costos cada vez más accesibles.

Por otra parte, también se han desarrollado y usado en estudios de competencia genes reporteros, como *gusA* (Wilson *et al.*, 1995), que son utilizados para evaluar la ocupación de nódulos por rizobios (Sessitsch *et al.*, 1996; Mrabet *et al.*, 2005). El uso de genes reporteros es una técnica

simple, rápida y permite la prospección de un alto número de nódulos, ya que se usa el sistema entero (Streit *et al.*, 1992; Wilson *et al.*, 1995), es decir se tiñe el nódulo sin necesidad de recurrir al aislamiento de bacterias desde los nódulos, extracción y amplificación de ADN.

### 7. CRITERIOS PARA LA SELECCIÓN DE CEPAS

En general, la selección de cepas de rizobios para desarrollar inoculantes para leguminosas es realizada según los siguientes criterios: eficiencia simbiótica, competencia en la nodulación, competencia saprofitica, compatibilidad interespecífica, estabilidad genética, comportamiento industrial, sobrevivencia en semillas y tolerancia a factores bióticos y abióticos. Actualmente, para seleccionar cepas del género *Bradyrhizobium*, se ha sugerido incorporar otro criterio, relacionado con el potencial desnitrificador de la cepa en cuestión. Hay que considerar entonces que no tengan capacidad de desnitrificar, o bajo potencial desnitrificador (Delgado *et al.*, 2007).

#### 7.1 Determinación de la eficiencia simbiótica

La estimación de la cantidad de nitrógeno proveniente de la FBN se realiza mediante el uso del isótopo estable  $^{15}\text{N}$  y cuantificación de la reducción del acetileno. De todas formas las pruebas más implementadas, y definitivas, son los ensayos de siembra en invernáculo y en campo, en los que se mide, entre otras cosas, la materia seca de la parte aérea.

**a) Determinación de la FBN a través del  $^{15}\text{N}$ .** Las técnicas isotópicas del  $^{15}\text{N}$  para medir FBN se consideran como las únicas que ofrecen cuantificaciones integrales de la FBN, que permiten distinguir la proporción de N en la planta que procede del suelo, de un fertilizante o de la atmósfera y entregan valores de FBN integrados para todo un ciclo de crecimiento de un sistema Leguminosa-rizobio dado (Campillo *et al.*, 2002). Entre las técnicas disponibles se encuentran los métodos de abundancia de  $^{15}\text{N}$  y la dilución Isotópica de  $^{15}\text{N}$ . El análisis realiza mediante una planta de referencia (no fijadora de  $\text{N}_2$ ), la cual es totalmente dependiente del nitrógeno del suelo para su crecimiento (Valles de la Mora *et al.*, 2003). El equipo utilizado para realizar las mediciones es el espectrofotómetro de masas y el principio en que se basan ambos métodos es que las plantas fijadoras de  $\text{N}_2$  se desarrollan en un suelo que

posee una proporción de  $^{15}\text{N} \text{ }^{14}\text{N}^{-1}$  diferente de aquella casi constante proporción de  $^{15}\text{N}^{14}\text{N}^{-1}$  de 0.3663% presente en el  $\text{N}_2$  de la atmósfera. Así, la incorporación de N, proveniente de la FBN determinará una proporción diferente de  $^{15}\text{N} \text{ }^{14}\text{N}^{-1}$  en el tejido de la planta respecto de aquella del suelo en donde crece la planta (Campillo *et al.*, 2002).

**b) Cuantificación de la FBN por reducción de acetileno.** La capacidad de la nitrogenasa para reducir compuestos con triples enlaces se utiliza desde finales de los años 60 para medir la actividad de esta enzima. Para esto, se coloca la planta entera, su raíz nodulada, o nódulos separados de la raíz en un recipiente cerrado en el que se substituye entre el 5 y 10% de su volumen por acetileno. Al cabo del tiempo, en el que la reacción es lineal, se toma la muestra para determinar por cromatografía de gases la concentración del etileno producido como consecuencia de la reducción del etileno (Olivares, 2011). Esta técnica tiene una limitación importante, dado que la actividad de la enzima se determina en un momento dado, y no representa el efecto a lo largo del tiempo: no se evalúa el efecto a lo largo del tiempo.

### 7.2 Competencia

El tipo de cepas de rizobio que formarán los nódulos y su ubicación en las raíces, está condicionada por su sobrevivencia, capacidad de colonizar la raíz y competitividad con cepas nativas. Respecto a la competencia por la nodulación, el tema se describió en el apartado 6.

En relación a la competencia saprofítica, la supervivencia de los rizobios en vida libre, como la de cualquier bacteria, está condicionada por la capacidad de competir por los nutrientes con bacterias nativas presentes en el suelo, que suelen ser altamente competitivas. También esta característica se ve afectada por la presencia de antibióticos producidos por los hongos y bacterias, así como por la predación que realizan otros organismos también presentes en el suelo.

### 7.3 Estabilidad genética

La estabilidad genética es necesaria para que se conserven las características por las cuales fueron seleccionadas las cepas. Se ha observado que algunas cepas de rizobios pierden con relativa facilidad su capacidad de nodular y/o fijar nitrógeno después de un tiempo de ser conservadas en condiciones de laboratorio. Una explicación a este hecho es que en ausencia de presión selectiva se pueden perder los plásmidos simbióticos (pSym), que llevan los genes responsables de la fijación de N<sub>2</sub> (Fillat y Puppo, 1994). En el caso de los *Bradyrhizobium* estos genes son más estables porque están localizados en el cromosoma, al igual que lo están en las distintas especies de *Mesorhizobium* sp. que nodulan lotus.

### 7.4 Comportamiento industrial

El comportamiento industrial de una cepa se considera apto cuando esta tiene un crecimiento rápido y logra una concentración de bacterias adecuadas en medio de cultivo con una fuente de C económica sin formar grumos. Además las cepas así crecidas deben ser capaces de dispersarse y sobrevivir en el soporte empleado.

En Uruguay, los niveles de exigencia de los inoculantes en base a turba están entre  $2 \times 10^9$  y  $1 \times 10^9$  rizobios vivos por gramo de producto para la comercialización y al vencimiento respectivamente (Labandera y Mayans, 2006).

### 7.5 Sobrevivencia en semillas

La infectividad de rizobios en los inoculantes se relaciona con la cantidad de bacterias provistas sobre las semillas. Por ello, algunos países como Argentina, tienen normativas vigentes que establecen que las semillas pre-inoculadas y/o peleteadas deben tener un número mínimo de bacterias viables en el momento de la siembra, que es de 80.000 ufc/semilla para semillas del tamaño de soja y de 1.000 ufc/semilla para semillas tamaño alfalfa. Sin embargo, no están establecidos ni descritos los

métodos para realizar el control de calidad de estos parámetros, así como tampoco la pureza del producto en cuanto a la presencia de microorganismos contaminantes (Corvalan *et al.*, 2007).

### 7.6 Tolerancia a factores bióticos y abióticos

La ocurrencia de factores ambientales adversos (estrés por temperatura, humedad, acidez, etc.) afecta la supervivencia del rizobio, disminuyendo el número de la población naturalizada o introducida con el inoculante. También la nodulación se ve afectada por factores de estrés biológico impuesto por patógenos o plagas, que condicionen la supervivencia de la planta. Por tal motivo, la cepa a ser utilizada como inoculante comercial se busca que sea tolerante a las condiciones ambientales de la zona donde se va a usar.

### 7.7 Incapacidad de desnitrificar

Como se ha mencionado en el apartado 3.2 la desnitrificación es realizada por algunas cepas de *Bradyrhizobium*. Con la realización de algunas prácticas agrícolas se generan condiciones microaeróbicas, que provocan la salida del  $\text{NO}_3^-$  como  $\text{NO}$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ , o  $\text{N}_2$  y se produzcan pérdidas económicas del producto (Bueno, 2008). Además, cuando el proceso queda en etapas intermedias ( $\text{NO}$  y  $\text{N}_2\text{O}$ ) intervienen en la formación de lluvia ácida, en el calentamiento global de la atmósfera, y en el deterioro de la capa de ozono de la misma.

## 8. INOCULACIÓN DE LEGUMINOSAS FORRAJERAS EN URUGUAY

El mejor éxito en cuanto a la implementación de prácticas agrícolas sustentables vinculadas con la FBN, ha sido sin lugar a dudas el desarrollo de inoculantes para leguminosas a base de cepas de rizobios (Toresani *et al.*, 2007). La inoculación de leguminosas es una práctica que permite incorporar artificialmente bacterias fijadoras de nitrógeno a las semillas o al suelo (Hardanson *et al.*, 1989). Estos rizobios son seleccionados por su especificidad, infectividad (capacidad de formar nódulos), y efectividad (capacidad de fijar  $\text{N}_2$ ; Toresani *et al.*, 2007).

En Uruguay, entre 1960 y 1970 se realizó un amplio programa de selección de cepas de rizobios para leguminosas forrajeras, así como de soportes para la fabricación de biofertilizantes. Se estableció entonces la Industria Nacional de Inoculantes, y el marco legal para garantizar la calidad del producto.

Entre 1970 y 1980 los proyectos se extendieron a otras leguminosas, especialmente soja, como respuesta al interés del país por ese cultivo. En el periodo 1980-1990 se generalizó el uso de turba estéril como soporte en la formulación de los inoculantes y se ampliaron los niveles de exigencia a  $2 \times 10^9$  rizobios vivos por gramo de producto para la comercialización y al vencimiento respectivamente. Esto permitió una mejora sustantiva en la calidad de los biofertilizantes en el país y en el establecimiento de las leguminosas. Paralelamente se desarrollaron con la industria nuevas formulaciones de biofertilizantes (inoculantes líquidos) así como tecnologías de inoculación (Labandera, 2007).

Actualmente, se busca garantizar altos niveles de calidad en los inoculantes comerciales y una adecuada difusión de las ventajas de la inoculación. Para ello se llevan a cabo estudios sobre la selección de mejores cepas para leguminosas forrajeras, así como desarrollos tecnológicos de nuevas tecnologías de inoculación, control de calidad de los inoculantes y actualización del marco legal para el comercio de inoculantes (Labandera, 2007).

### **8.1 Fabricación de inoculantes**

En general, la elaboración de un inoculante comercial consiste en la multiplicación de la bacteria en medio líquido hasta tener alta concentración y su posterior mezclado (impregnación) con el soporte. Los inoculantes rizobianos en Uruguay son fabricados utilizando como soporte turba y la preparación consta de los siguientes pasos que se describen a continuación.

#### **a) Multiplicación de la bacteria a nivel de matraz**

Para la multiplicación de la cepa se debe contar con un medio de cultivo que tenga los componentes nutricionales apropiados, como la cantidad y calidad de la fuente de carbono y nitrógeno,

entre otros. La economía de este proceso está determinada básicamente al costo de la fuente de carbono (Rojas, 2008).

Para la multiplicación en matraz se parte de la cepa suministrada por el Departamento de Microbiología de Suelos perteneciente al Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. El subcultivo de la cepa en cuestión, crecida en tubos con agar inclinado, es resuspendido en agua estéril y se añade al matraz o al recipiente equivalente con el medio de cultivo correspondiente. El cultivo se incuba a 30 °C en agitación constante (Figura 5), hasta lograr la concentración deseada (Orivo y Temprano, 1981). La multiplicación en matraz indica que un proceso con interés industrial es factible (Sarmiento, 2006).

### **b) Proceso de escalado**

Consiste en pasar de la escala del laboratorio, donde se trabaja con volúmenes de pequeña escala, hasta el fermentador (Figura 5). Para ello son necesarias varias fases:

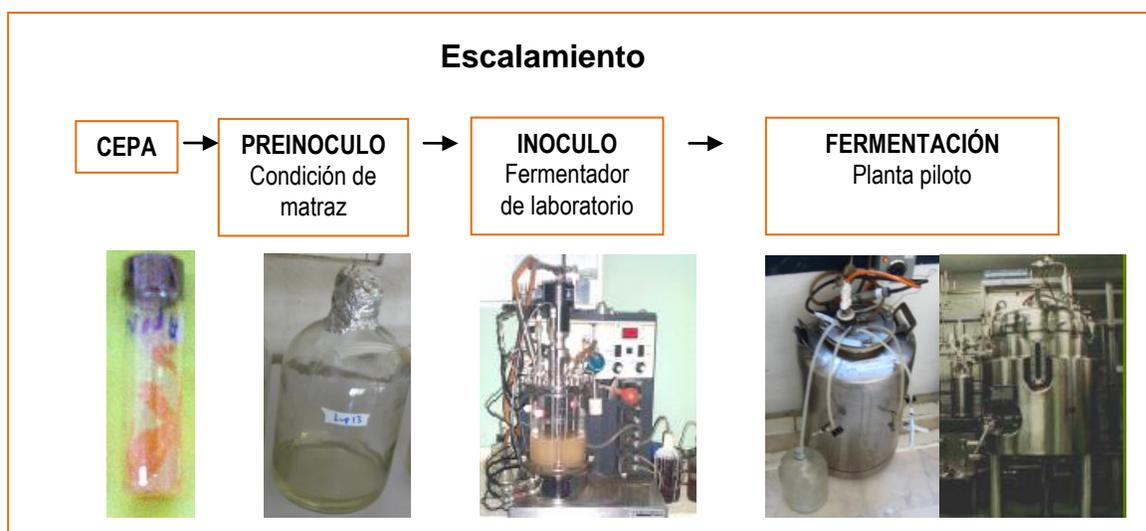
Ensayo en un fermentador de pequeña escala, generalmente de vidrio de 1 a 10 L de capacidad. Mediante este procedimiento se pueden hacer variaciones de concentración de nutrientes, de temperatura, pH del medio, sin grandes gastos, hasta optimizar las condiciones (Madigan *et al.*, 2004).

Multiplicación del inoculante en la planta piloto, para esta etapa se usan fermentadores de 100 a 3000 L de capacidad (Sarmiento, 2006; figura 6a). Aquí se obtiene gran cantidad de biomasa, lo que conlleva a una mayor demanda de oxígeno (Madigan *et al.*, 2004).

En todas las fases del escalado la aireación está controlada. A medida que se avanza desde el matraz al fermentador se mide la dinámica de cantidad de oxígeno en el medio para determinar como el incremento de volumen afecta su demanda en la fermentación (Madigan *et al.*, 2004).

Los fermentadores usados en procesos industriales son recipientes cilíndricos, casi siempre de acero inoxidable. En la planta piloto, los fermentadores de 100 L, contienen válvulas de cierre hermético

en su parte superior para introducir el inóculo y la entrada de aire estéril, y una inferior para la descarga (Figura 5; Orivo y Temprano, 1981). Estos fermentadores se llenan con el medio de cultivo definido en fermentador de pequeña escala, se añade antiespumante y se esterilizan en autoclave. Una vez esterilizado se conecta a una línea de aire comprimido y se inocula haciendo pasar el caldo del inóculo al fermentador (Orivo y Temprano, 1981).

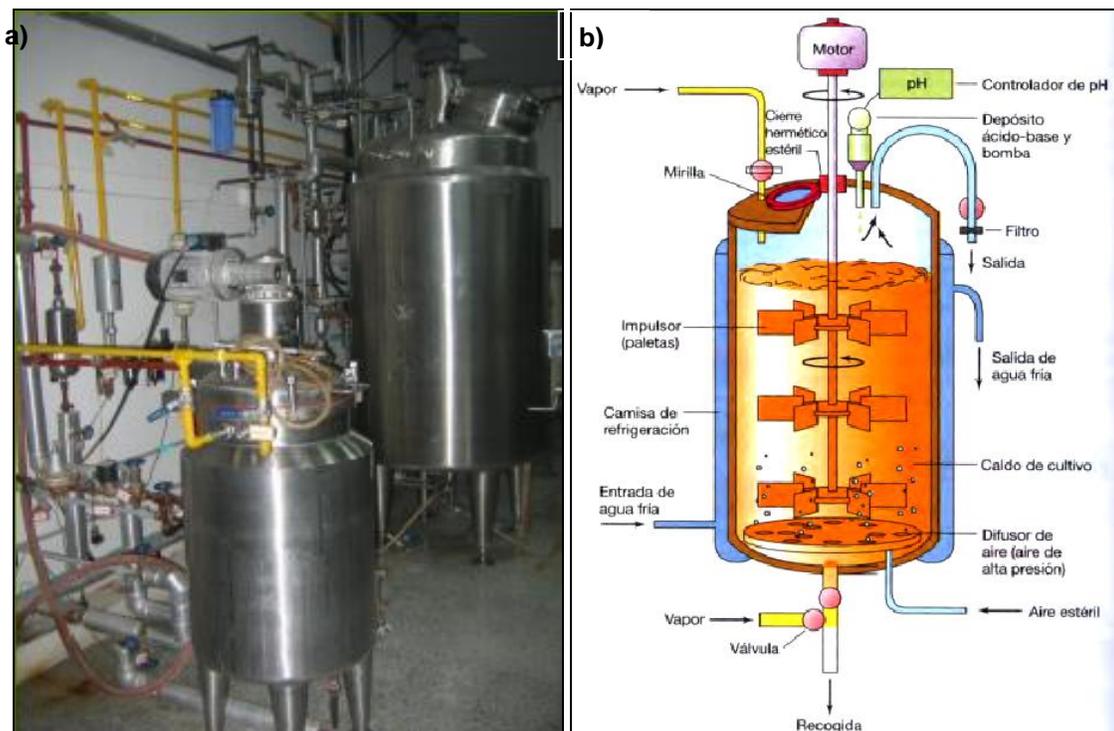


**Figura 5.** Representación esquemática del proceso de escalamiento del inoculante (Tomado de Sarmiento, 2006).

Por otro lado, los fermentadores que por su volumen no pueden ser esterilizados en autoclave, se esterilizan mediante una corriente de vapor de agua, la entrada de oxígeno se realiza mediante aire filtrado y contiene un sistema para el mezclado del caldo de cultivo (Figura 6b). En caso de los fermentadores para grandes volúmenes, mayor a 3000 L, la transferencia de calor a través de la cubierta es insuficiente, por lo que este tipo de fermentadores va equipado con una serie de refrigerantes externos a través de los cuales pasa vapor o agua (Madigan *et al.*, 2004).

## c) Impregnación en turba

El soporte consistente de 200 g turba pulverizada esterilizada por acelerador de electrones y distribuido a las empresas de inoculantes en bolsas de polietileno. Por su parte, el proceso de impregnación es realizado mediante la inyección a cada bolsa de 100 mL de cultivo, una vez finalizada la multiplicación y después del control de calidad. Al cabo de una semana se controla la calidad y concentración del inoculante en la turba y se empaqueta en una segunda bolsa de polietileno, que se cierra por calor y se conservan en cámara fría. La bolsa lleva impresa la siguiente información: Marca, logotipo de la empresa, leguminosa hospedadora, fecha de caducidad y recomendaciones.



**Figura 6.** Fermentadores. a) Planta piloto (Tomado de Sarmiento, 2006). b) Esquema de un fermentador (Tomado de Madigan *et al.*, 2004).

### d) Control de calidad por la empresa

El inoculante fabricado tiene 6 meses de caducidad si se conserva en cámara fría. En el momento de utilizarlo en el campo debe tener una población superior a  $2 \times 10^9$  ufc/g de inoculante (Labandera y Mayans, 2006), para asegurar que colonice la raíz de la leguminosa. También se realizan controles previos del caldo de fermentación antes de impregnar la turba, mediante las siguientes pruebas: tinción de Gram, recuento de células viables en placa y pH del caldo.

### 8.2 Normativas de control de calidad de los inoculantes del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca

En Uruguay, el Departamento de Microbiología de Suelos perteneciente al Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca es responsable del mantenimiento y caracterización de la Colección Nacional de Cepas de Rizobios. Las cepas se mantienen en glicerol a  $-80^{\circ}\text{C}$ , con un duplicado en tubos con extracto de levadura manitol a  $4^{\circ}\text{C}$ , o bien liofilizadas en ampollas como es el caso de las cepas recomendadas para la industria que se entregan anualmente (Labandera, 2007).

Antes de su entrega a la industria y/o liberación al mercado de biofertilizantes todas las cepas pasan por un control en el que se evalúan las características simbióticas originales, siguiendo protocolos establecidos por Labandera y Vincent (1972). El control de calidad de inoculantes para leguminosas está regulado por los Decretos 546/81 del 28 de octubre de 1981 y 7/99 del 8 de enero de 1999.

Los parámetros de calidad que se utilizan refieren a la concentración (número de microorganismos vivos por unidad de producto), a la pureza del producto (ausencia de microorganismos no declarados) y a la comprobación de la identidad del organismo suministrado por el Departamento de Microbiología de Suelos (Labandera y Mayans, 2006).

### II. OBJETIVOS

#### Objetivo general

Desarrollar un inoculante rizobiano para un nuevo cultivar de *L. uliginosus* y estrategias que permitan evaluar la competitividad de las cepas para usar ese criterio en la generación de inoculantes.

#### Objetivos específicos

1. Evaluar cepas nativas para ser usadas como inoculante comercial de un nuevo cultivar de *Lotus uliginosus*.
2. Desarrollar una metodología para establecer la competitividad entre cepas de diferentes suelos.
3. Determinar el efecto del momento de siembra sobre la ocupación de los nódulos.

## III. MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. BACTERIAS

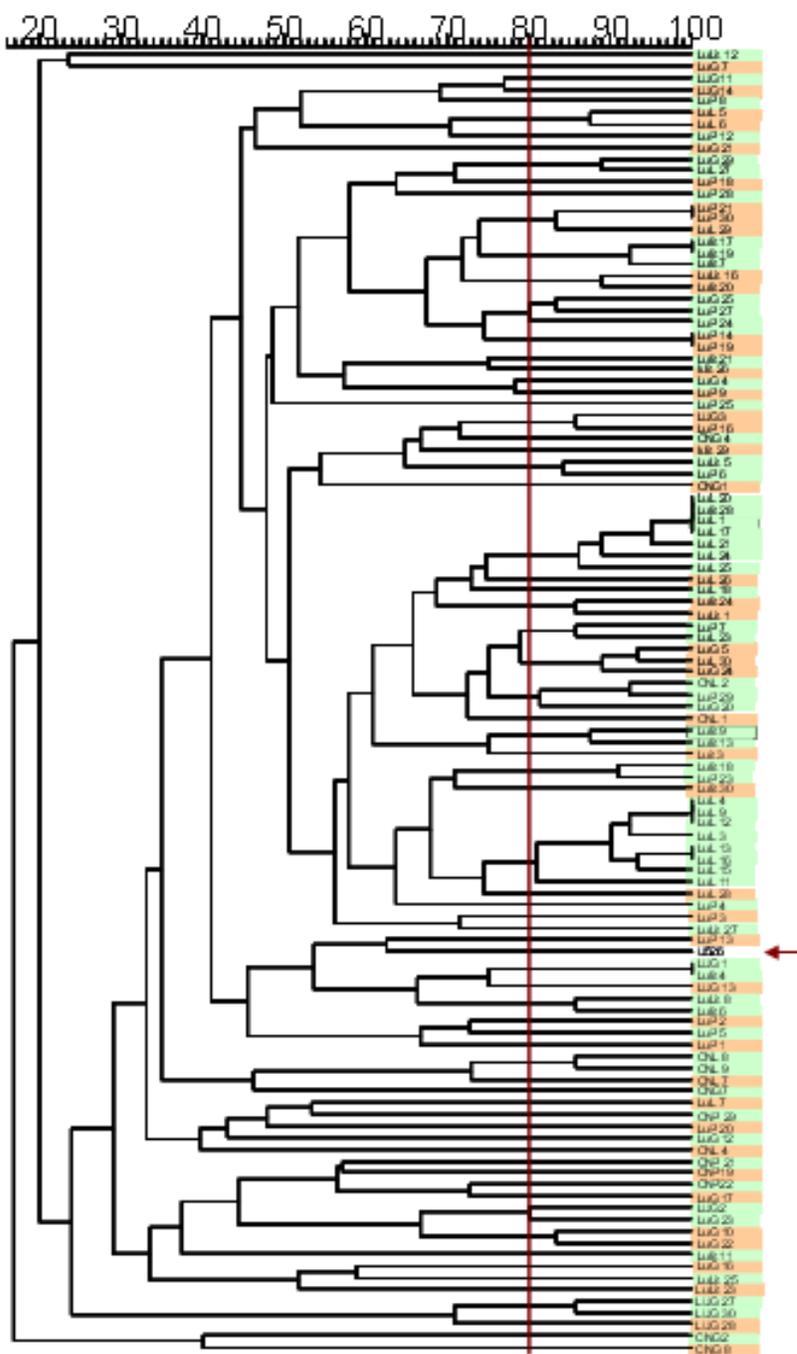
## 1.1 Rizobios

Los rizobios se aislaron de nódulos de plantas trampa por el Laboratorio de Microbiología del MGAP en cuatro tipos de suelos del Uruguay (Cuadro 1). En cada suelo de muestreo se colectó en campo natural (CN) y en campos con historia de cultivo de *Lotus uliginosus* (CH), salvo en el sitio Litoral donde no había praderas de CN (Cuadro 1). En esta tesis se evaluaron las 14 cepas más frecuentes de la colección original de 75 cepas, caracterizadas por Batista (2009) mediante ERIC-PCR, a partir de 111 aislados (Figura 7).

El inoculante comercial para *L. uliginosus* 'Grasslands Maku' es la cepa NZP2309 de *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) introducida de Nueva Zelanda. Esta cepa figura en la Colección Nacional de Cepas de Rizobios del MPAG con el número 1401 (Punschke, 2010), y se la designa como U526, y así se hará referencia de ella en esta tesis.

**Cuadro 1.** Cepas seleccionadas por regiones de muestreo. Campo natural (CN) y campo con historia de siembra de *L. uliginosus* (CH).

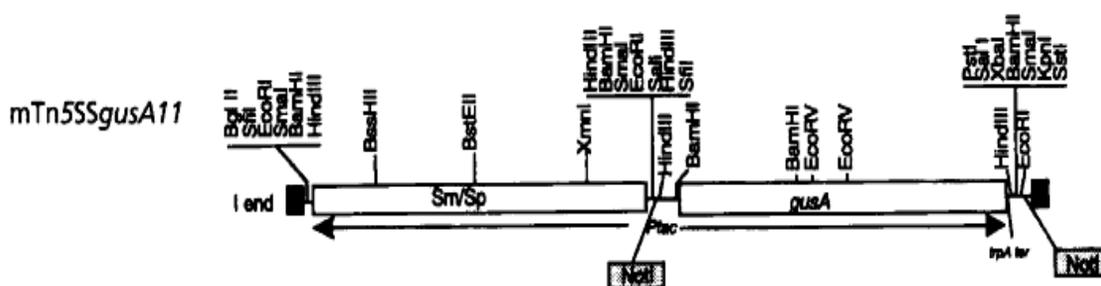
Regiones de muestreo	Tipo de suelo	Origen	Cepas
Palo e Pique (Treinta y Tres). 10 msnm 33°14' S y 54°15' O	Argisol subeitríco	CH	LuP13 y LuP30
		CN	CNP21 y CNP22
Glencoe (Paysandú) 124 msnm 32°24' S y 57°08' O	Litosol eutríco melánico	CH	LuG11 y LuG24
		CN	CNG7 y CNG2
La Magnolia (Tacuarembó) 140 msnm 31°42' S y 57°49' O	Areniscas	CH	LuL17 y LuL29
		CN	CNL7 y CNL8
Litoral (Soriano) 88 msnm 33°30' S y 57°47' O	Brunosol eutríco típico	CH	LuLit19 y LuLit27



**Figura 7.** Dendrograma con los 111 aislados de los cuatro sitios de muestreo y el inoculante comercial, cepa U526, señalada con una flecha. Los perfiles fueron obtenidos mediante la técnica ERIC-PCR. Tomado de Batista (2009).

### 1.2 *Escherichia coli*

La cepa S17-1  $\lambda$ -*pir* de *E. coli*, que contiene el plásmido pCAM111, portador del trasposón mTn5SSgusA11, se usó como donadora en la conjugación biparental con el rizobio receptor. En esta construcción (Wilson *et al.*, 1995) el gen *gusA* está bajo el control del promotor constitutivo *Ptac*, fusionado al terminador transcripcional *trpA* y lleva un casete de resistencia a estreptomicina (Sm) y espectinomicina (Sp; Figura 8)



**Figura 8.** Esquema del trasposón mTn5SSgusA11. El trasposón contiene el gen *gusA* y el casete con resistencia a espectinomicina (Sm) y estreptomicina (Sp) bajo el control constitutivo *Ptac*. Tomado de Wilson *et al.* (1995).

## 2. PLANTAS

El material vegetal utilizado fue la línea experimental diploide LE306 de *Lotus uliginosus*, generada por la Ing. Agr. Mónica Rebuffo, INIA La Estanzuela y 'Grasslands Maku', el cultivar tetraploide introducido desde Nueva Zelanda.

## 3. CRECIMIENTO DE BACTERIAS

a) Los rizobios se crecieron en extracto de levadura manitol (YEM; Vincent, 1970), cuya composición figura en el cuadro 2. La cepa U526 y las 14 cepas nativas (Cuadro 1) se multiplicaron a partir de colonias aisladas que se sembraron en medio YEM líquido durante 72 h a 27 °C en agitación orbital a 120 rpm., hasta lograr una D.O<sub>600</sub> entre 0.8 y 0.9 (aproximadamente 10<sup>8</sup> células/mL). Cuando se usó medio sólido se agregó agar.

b) *E. coli* se creció en medio Luria Bertami (LB), (Miller, 1972), cuya composición figura en el cuadro 3, a 37°C durante 6 h.

c) La conjugación biparental se realizó en medio triptona extracto de levadura (TY), (Beringer, 1974), cuya composición figura en el cuadro 4, incubadas durante 72 h a 27°C

d) Los antibióticos estreptomycin (Sm) y espectinomycin (Sp) fueron preparados como soluciones concentradas (X100) en agua desionizada y esterilizados a través de filtros de 0.45 µm de tamaño de poro. La nitrofurantoína se preparó en metanol. La concentración final de los antibióticos se detalla en el cuadro 5.

**Cuadro 2.** Composición del medio YEM y ELMARC.

<b>Componentes</b>	<b>Cantidad</b>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.2 g
NaCl	0.1 g
Manitol	5 g
Extracto de levadura	1 g
Agua	1000 mL
Agar (para medio sólido)	15 g
Ajustar a pH	6.8 - 7.0
Rojo Congo 0.25% (ELMARC)	10mL

**Cuadro 3.** Composición de medio LB.

<b>Componentes</b>	<b>Cantidad</b>
NaCl	5 g
Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
Agua	1000 mL
Agar (para medio sólido)	15 g
Ajustar a pH	6.8 - 7.0

**Cuadro 4.** Composición del medio TY.

Componentes	Cantidad
Disco bacto tryptona	0.5 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.6 g
Extracto de levadura	3 g
Agua	1000 mL
Agar	15 g
Ajustar a pH	6.8 - 7.0

**Cuadro 5.** Concentración final de antibióticos utilizados.

Antibiótico	Concentración (µg/mL)	
	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	<i>E. coli</i>
Sulfato de estreptomicina (Sm)	200	50
Espectinomicina (Sp)	300	100
Nitrofurantoina		20

**Cuadro 6.** Composición del medio para producción industrial del inoculante comercial para *L. uliginosus* 'Grasslands Maku'

Componentes	Cantidad
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.15 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (1.54 g/mL)	0.23 mL
MgSO <sub>4</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0.2 g
NaCl	0.1 g
Extracto de levadura	2.3 g
Manitol	10 g
Agua volumen final	1000 mL
Ajustar a pH	6.8 - 6.9

**Cuadro 7.** Composición del medio para producción industrial del inoculante comercial para soja.

<b>Componentes</b>	<b>Cantidad</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.13 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (1.54 g/mL)	0.24 mL
Mg SO <sub>4</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0.2 g
NaCl	0.1 g
Extracto de levadura	2.3 g
Glicerina	9 mL
KNO <sub>3</sub>	0.7 mL
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2 g
MnSO <sub>4</sub>	0.005 g
CaCl <sub>2</sub>	0.1 g
FeCl <sub>3</sub>	0.005 g
Agua volumen final	1000 mL
Ajustar a pH	7.0 - 7.1

e) Para generar el preinóculo, para hacer el conteo de células viables en el inoculante y en las semillas inoculadas, crecieron en medio YEM-rojo congo (ELMARC; Rodríguez *et al.*, 1993) cuya composición figura en el cuadro 2. Para la multiplicación de los inoculantes experimentales en condición industrial se usó el medio de cultivo utilizado para el inoculante comercial U526 (Cuadro 6), y el medio de cultivo utilizado para crecer el inoculante para soja (Cuadro 7) en la empresa productora de inoculantes CALISTER.

#### 4. CRECIMIENTO DE PLANTAS

##### 4.1. Desinfección y germinación de semillas

Las semillas se escarificaron manualmente con lija de arena y se esterilizaron superficialmente con etanol 96 GL durante 2 min, 1 enjuague con agua estéril, hipoclorito de sodio 4 % (v/v) durante 2 min y 4 enjuagues con agua estéril. Las semillas permanecieron en agua estéril durante al menos 30

min para que se hidrataran y liberaran taninos. Las semillas se germinaron en placas de Petri con agar-agua 1 % (p/v) estéril en cámara de crecimiento a 28 °C. Cuando la radícula tenía una longitud de alrededor de 2-3 mm se sembraron en medio Jensen *in vitro* o en arena vermiculita en macetas.

#### 4.2. Crecimiento de las plantas en condiciones controladas

**a. Ensayo en macetas.** La arena se trató 8 h con una solución de HCl en agua (50 mL HCl en 20 L de agua), y se lavó hasta alcanzar un pH superior a 5.5. La vermiculita se lavó con agua corriente durante 30 min. La mezcla arena-vermiculita (1:1) se colocó en macetas y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 min. En cámara de crecimiento las plantas crecieron con una intensidad lumínica de  $200 \mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$  (400 – 700 nm), fotoperíodo 16/8 h (luz/oscuridad), 25/18 °C de temperatura y 40 – 50 % de humedad relativa.

**b. Ensayo *in vitro*.** Las plantas crecieron en medio Jensen (1942) estéril (Cuadro 8) en tubos de 3 cm x 16 cm cámara PERCIVAL SCIENTIFIC con las temperaturas establecidas. intensidad lumínica de  $100 \mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$  (400 – 700 nm), fotoperíodo 16/8 h (luz/oscuridad)

**c. Ensayo en cilindros de suelo.** Se usaron cilindros con suelo de diferentes regiones de Uruguay (cuadro 9). Las plantas crecieron en las mismas condiciones de luz, temperatura y humedad indicadas en el ensayo de macetas.

**Cuadro 8.** Composición del medio Jensen.

Componentes	Cantidad
CaHPO <sub>4</sub>	1.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.2 g
NaCl	0.2 g
FeCl <sub>3</sub>	0.1 g
Agar	8.0 g
H <sub>2</sub> O destilada	1000 mL
pH	6.8 – 7.2

#### 5. EFICIENCIA SIMBIÓTICA EN MACETAS

Para determinar la eficiencia simbiótica se siguió la metodología descrita por Batista (2009). Las semillas pregerminadas, como se indica en el apartado 4.1, se sembraron a razón de 8 por maceta, y después de 10 días se ralearon para dejar 5. Los inoculos se prepararon por centrifugación de 30 mL de cultivo en tubo estéril, durante 3 min a 10.000 rpm. Las bacterias se resuspendieron en 25 mL de agua estéril y la inoculación se realizó a razón de 1 mL por planta, un día después de sembradas. El riego se realizó cada 3 días alternando uno con agua corriente y otro con solución Hornum sin nitrógeno (Handberg y Stougaard, 1992), ambas estériles.

Para evaluar la producción de biomasa de la parte aérea de las plantas se realizaron dos ensayos con cortes a los 45 y 75 días después de la siembra. Se usó un diseño experimental completamente aleatorizado, con tratamientos correspondientes a: 14 cepas, control positivo (inoculante comercial), control negativo (sin inocular y sin nitrógeno), con 4 repeticiones. La variable peso seco de la parte aérea se analizó a través del análisis de varianza (ANOVA); para las comparaciones de medias se usó la prueba de DUNCAN al 5%.

#### 6. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA NODULACIÓN

Se sembraron 3 plántulas de *L. uliginosus* LE306 por tubo con medio Jensen, que crecieron durante 21 días en las condiciones indicadas en 4.2 b. La inoculación se realizó según Batista (2009), y consistió en centrifugar 1.5 mL del cultivo a 5.000 rpm durante 3 min en tubos de microcentrífuga estériles. El sobrenadante se descartó y las bacterias se resuspendieron en 500  $\mu$ L de agua estéril, con los que se inoculó a cada tubo. Las temperaturas ensayadas fueron 10 °C, 15 °C, 18 °C y 22 °C. Las mismas se definieron en función del promedio mensual de los registros de temperaturas mínimas a 5 cm de profundidad en suelo, en los años 2008 a 2010, entre marzo y junio, en la unidad experimental INIA La Estanzuela (cuadro 10; Calistro, 2010).

**Cuadro 10.** Promedio de temperaturas mínimas (°C) del suelo en INIA La Estanzuela.

Meses	Años			Promedio de 3 años
	2008	2009	2010	
<b>Marzo</b>	23.17	22.67	21.35	22
<b>Abril</b>	19.33	18.51	16.83	18
<b>Mayo</b>	14.70	15.01	14.35	15
<b>Junio</b>	10.09	10.31	10.64	10

Se usó un diseño experimental bifactorial de cepa-temperatura completamente aleatorizado de 3 niveles para las temperaturas definidas (15 °C, 18 °C y 22 °C) y 7 niveles para cepas con 3 repeticiones para un total de 63 unidades experimentales. La variable número de nódulos por planta, cuando se cumplieron los supuestos de homogeneidad y normalidad, se evaluó a través de análisis de varianza (ANOVA). Los conteos de nódulos se realizaron a 14, 17 y 21 días después de la inoculación y con ello se determinó:

- Respuesta de la nodulación de las plantas a la inoculación con distintas cepas.
- Efecto de la temperatura sobre la nodulación.
- Interacción entre los factores temperaturas y cepas sobre la nodulación.

Para la comparación de medias se usó el test de Tukey al 5%. Cuando no se cumplieron los supuestos de homogeneidad y normalidad se realizó un análisis de varianza no paramétrico con la prueba de Kruskal-Wallis.

## 7. DETERMINACIÓN DE ÓXIDO NITROSO

La capacidad de desnitrificar de la cepa U526 y de las nativas se determinó según Monza *et al.* (2006). Las cepas se crecieron en 30 mL de medio YEM líquido, se centrifugó 1.5 mL a 5.000 rpm durante 3 min en tubos de microcentrifuga estériles y se descartó el sobrenadante. Las bacterias se resuspendieron en 200 µL de agua estéril, con los que se inocularon frascos con 30 mL de medio YEM líquido con KNO<sub>3</sub> 5 mM. Cada frasco, tapado con un tapón de goma y un precinto de aluminio se gaseó con N<sub>2</sub> durante 2 min. Para el gaseado se colocó en el tapón una aguja de salida de gas y con otra

conectada con una manguera al tanque de N<sub>2</sub> se produjo el barboteo en el medio. Con cada cepa se inocularon 6 frascos, y a 3 de ellos se les inyectó acetileno para alcanzar una concentración final de 5% a efectos de inhibir la enzima Nos (Yoshinari y Knowles 1976). Los frascos se incubaron durante 24 h a 27 °C con agitación de 120 rpm y de cada frasco se inyectó al cromatógrafo 1 mL del aire del *head space*. El N<sub>2</sub>O se analizó con un cromatógrafo de gases Shimadzu modelo 14B equipado con un detector de captura de electrones y un sistema de rasante y de regreso para evitar interferencias de N<sub>2</sub>O, oxígeno y acetileno. La columna de 250 x 0.3 cm tenía como relleno Porapak Q (80-100) y el flujo de N<sub>2</sub> fue de 60 mL/min. Las temperatura del inyector, horno y detector fueron 90, 70, 300 °C, respectivamente. La concentración de N<sub>2</sub>O se calculó usando estándares de N<sub>2</sub>O establecidos por Christensen y Tiedje (1988).

La concentración de proteínas se determinó según Bradford (1976) con modificaciones. A 0.2 mL de la suspensión bacteriana se los trataron con 0.2 mL de NaOH 0.1 M durante 10 min a 90 °C. A los 0.4 mL resultantes se le agregaron 2 mL de Comassie brilliant blue (6250 Sigma) 0.2 % disuelto en 3.5 mL de HClO<sub>4</sub> y 96.5 mL de agua destilada. Las muestras se agitaron vigorosamente 15 seg y se leyó la absorbancia a 595 nm. El blanco se preparó sustituyendo los 0.4 mL de suspensión bacteriana por igual volumen de agua destilada. Para la curva de calibración se usó seroalbúmina bovina a concentraciones de 100, 200, 400, 600 µg/mL.

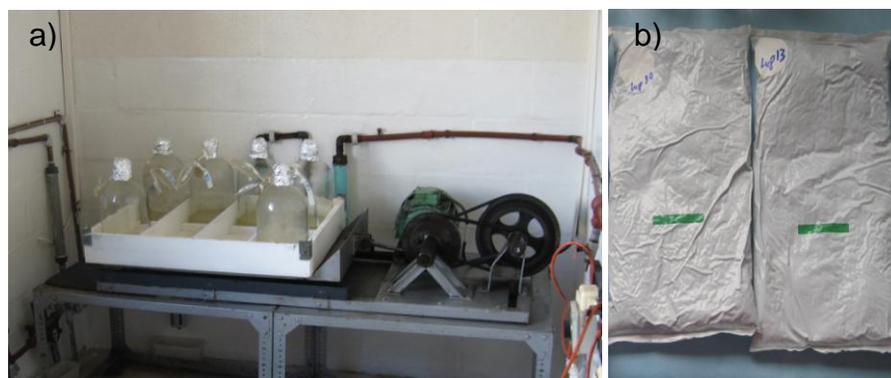
#### **8. PREPARACION DE INOCULANTES EN CONDICIÓN INDUSTRIAL PARA ENSAYO A CAMPO**

Para la preparación del preinóculo experimental, se repicaron las cepas a ensayar en campo en tubos inclinados con medio ELMARC (Cuadro 2) y se incubaron durante 5 días a 27 °C. El cultivo se resuspendió en 10 mL de agua estéril, volumen que se sembró en 300 mL de medio de cultivo estéril usado por la industria para producir inoculante de *L. uliginosus* (Cuadro 7). El cultivo se incubó durante 7 días a 27 °C en agitación constante (Figura 9a), hasta una D.O.<sub>600</sub> de aproximadamente 10<sup>8</sup> células/mL. Finalmente, se inyectaron 100 mL de cultivo bacteriano en cada bolsa con soporte de estabilización en base de turba, usada en la industria para producir inoculantes sólidos (Figura 9b). Las bolsas, 3 por cada cepa, se incubaron 7 días a temperatura ambiente a 25 °C.

Con el fin de constatar que el inoculante estaba en la concentración deseada se realizó el recuento de placa de rizobios según la metodología usada en el Laboratorio de Microbiología del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca del Uruguay (Labandera y Mayans, 2006). Para ello, se tomaron 10 g de la formulación y se mezclaron con 100 mL de agua estéril. A partir de esta dilución ( $10^{-1}$ ) se hicieron diluciones seriadas hasta  $10^{-7}$  y se sembró 1 mL de esta dilución, incorporada al medio ELMARC (Cuadro 2) en placas de Petri. A los 7 días se realizó el conteo de unidades formadoras de colonia (ufc).

#### 9. MULTIPLICACIÓN DE INOCULANTES

Para el desarrollo industrial del inoculante se ensayó el crecimiento de las cepas experimentales y comercial en 2 medios de cultivo usados por la empresa CALISTER para la producción de inoculante de soja (cuadro 7) y para el inoculante de 'Grasslands Maku' (Cuadro 6). Para ello se inocularon con cada cepa, frascos con 13 mL y 300 mL de medio de cultivo estéril y se incubaron en agitación a 120 rpm durante 7 días a 27 °C, hasta una  $D.O_{600}$  entre 0.7 y 0.8 (aproximadamente  $10^7$  células/mL). El inoculante se formuló en turba y el conteo de ufc se realizó con la metodología descrita en el apartado 8.



**Figura 9.** Preparación de inoculantes para ensayos de campo. a) Crecimiento en agitación, b) Bolsas de soporte estéril en las que se le inyectó el inóculo.

## 10. EFICIENCIA SIMBIÓTICA Y COMPETITIVIDAD DE RIZOBIOS EN CONDICION DE CAMPO

### 10.1 Eficiencia simbiótica

#### a) Inoculación de semillas

Las semillas se inocularon según las recomendaciones de la empresa CALISTER con el inoculante experimental y comercial. La misma consistió en preparar una solución A de adherente-agua en relación 1.5 : 1, una solución B de inoculante-solución A en relación 1 : 2.7 y una mezcla C de semillas-solución C en relación 31 : 1.

Para 50 g de semilla se usaron:

- Solución A: 25 mL de adherente + 16.5 mL de agua = 41.5 mL
- Solución B: 9.2 g de inoculante + 25 mL de sol A = 32 mL sol 2
- Solución C: 1.6 mL de sol B + 50 g de semilla
- Después de inoculadas, las semillas se dejaron secar durante 30 min en condiciones ambiente.

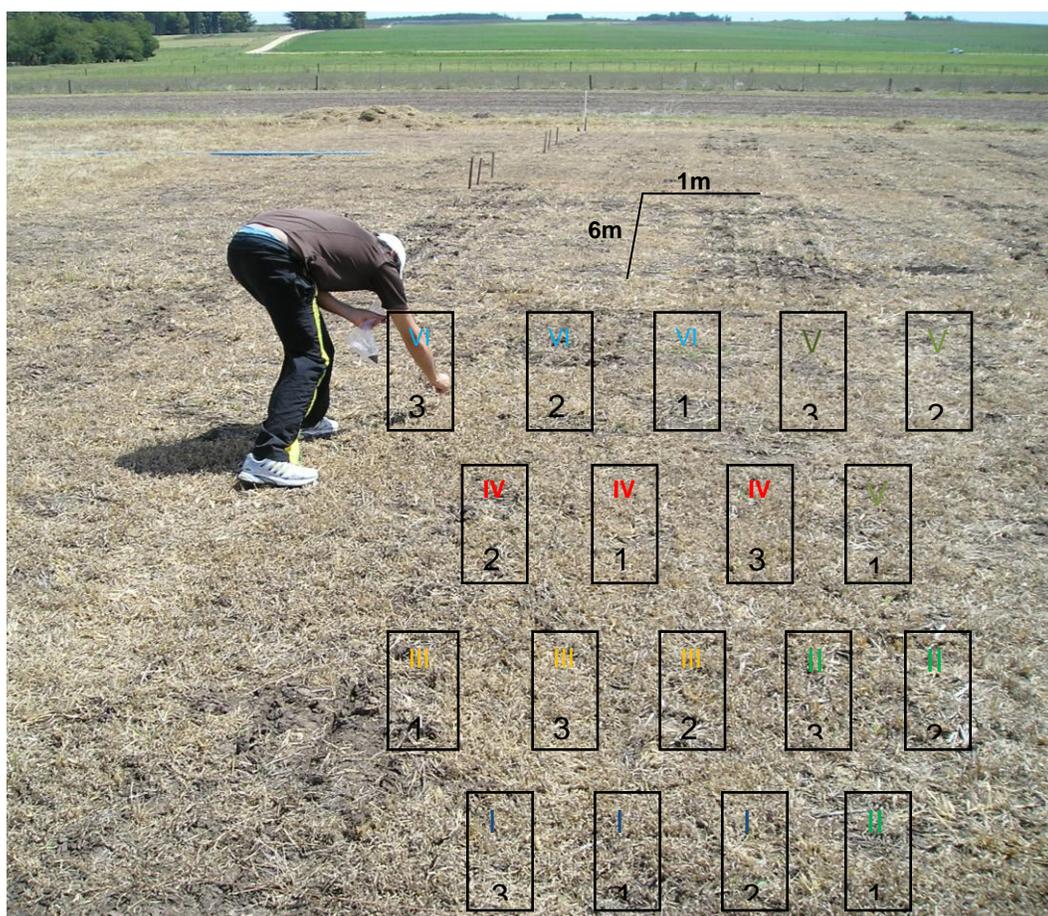
#### b) Siembra

El mismo día de inoculadas las semillas se sembraron en el Campo Experimental N° 1 del INIA La Estanzuela a una densidad de siembra de 5 kg/ha en 18 parcelas alternas para evitar la contaminación (figura 10). La estrategia para una siembra uniforme fue dividir los 3 g de semillas que corresponden a cada parcela, en 6 surcos de 6 m de longitud, distanciados a 0.17 m. Las fechas de siembra fueron marzo, abril y mayo del 2011. Los surcos se marcaron con una sembradora experimental de siembra directa.

El diseño usado fue en bloques completamente aleatorizados con 6 bloques para los 3 tratamientos (LuP13, U526 y el testigo sin inocular). La variable número de nódulos ocupados por las cepas experimentales y la materia seca se evaluaron a través de análisis de varianza (ANOVA). Para la comparación de medias se usó el test de Tukey al 5%..

c) Implantación y muestreo de plantas

La densidad de plántulas, estado fenológico y evolución de la nodulación se evaluó a los 30, 45 y 60 días después de la siembra. Para ello, se procedió a contar las plantas presentes en 2 m lineales de los surcos 2 y 5 de cada parcela. Se tomaron 30 plantas por parcela para evaluar el estado fenológico, definido por el número de hojas verdaderas por tallo y el largo del tallo.



**Figura 10.** Siembra de los ensayos en campo y su diseño experimental. Las 18 parcelas de 6 m<sup>2</sup> están divididas en 6 bloques I, II, III, IV, V y VI. Los tratamientos están distribuidos al azar: 1 corresponde al testigo sin inocular, 2 inoculante comercial (U526) y 3 al inoculante experimental (LuP13).

#### d) Determinación de biomasa

Dos meses después de la siembra se cosecharon, 30 plantas de cada parcela para determinar la biomasa aérea producida, medida como materia seca. Para esto se secó la parte aérea de las muestras en estufa con circulación de aire forzada a 70 °C durante 72 h.

#### 10.2 Competitividad en campo

La ocupación de nódulos por rizobios nativos y los inoculantes ensayados se determinó a los 60 días postsiembra, de cada uno de los 3 ensayos cuya fecha y lugar se indican el apartado 10.1.b.

#### a) Aislamiento de rizobios

Los nódulos se esterilizaron según Camargo (2007) con modificaciones. Se lavaron con agua, se sumergieron 1 min en etanol 70 % en agua (v/v), se enjuagaron con agua estéril, se trataron durante 3 min con solución de hipoclorito de sodio al 2 % en agua (v/v), se realizaron 4 enjuagues sucesivos con agua estéril, se colocaron en placas de Petri y se maceraron individualmente. El macerado se sembró en estrías en placas de Petri con medio YEM (Cuadro 2) y se incubó a 27 °C hasta aparición de colonias. Se hicieron 2-3 pasajes en el mismo medio hasta obtener un cultivo puro.

#### b) Extracción de ADN genómico

A partir de 3 mL de cultivo de rizobios crecidos en medio YEM, se aisló el ADN según el protocolo general para bacterias Gram negativas (Sambrook *et al.*, 1989), con modificaciones. El cultivo se centrifugó 5 min a 10.000 rpm y el precipitado se resuspendió en 750 µL de Sarkosyl 0.1% en agua, por agitación durante 1 min. Se volvió a centrifugar 5 min a 10.000 rpm y el *pellet* se resuspendió en 200 µL de Tris 50 mM pH 8 y EDTA 20 mM (TE); se añadieron 250 µL de Sarkosyl 2 % en TE, 50 µL de Pronasa K 5mg/mL, y se incubó 3 h a 37 °C. Posteriormente, se agregaron 200 µL de agua destilada y 500 µL de fenol cloroformo; se mezcló y centrifugó 5 min a 10.000 rpm, se recogió la fase superior en un microtubo, se le agregaron 400 µL de cloroformo isoamílico 24:1 y se centrifugó 5 min a 10.000 rpm.

La fase superior se recogió en un microtubo, se le agregaron 10  $\mu\text{L}$  de NaCl 5 M, 500  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto y se mantuvo a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 1 h. Se centrifugó durante 15 min a 8.000 rpm, se lavó el *pellet* con etanol 70 % en agua (v/v) y nuevamente se centrifugó por 15 min a 8.000 rpm. Se descartó el sobrenadante, se secó y se resuspendió en 100  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril.

El ADN se visualizó por electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v) en buffer TBE 0.5 X (Tris, Acido bórico, EDTA-Na (0.5 M, pH 8). En cada pocillo se cargaron 5  $\mu\text{L}$  de ADN y 2  $\mu\text{L}$  de buffer de carga, y la corrida se realizó a voltaje constante a 10V/cm durante 40 min. El ADN se tiñó con Good View™ Nucleic Acido Strain (0.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), incorporado al gel.

#### **c) Amplificación de ADN mediante BOX-PCR**

La amplificación de ADN genómico se realizó según Agius *et al.* (1997) con el cebador boxA (5' CTACGGCAAGGCGACGCTGACG -3'). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25  $\mu\text{L}$  y consistió de 2  $\mu\text{L}$  de ADN, 1  $\mu\text{L}$  de cebador boxA (10  $\mu\text{M}$ ), 1  $\mu\text{L}$  de dNTPs (10 mM), 0.2  $\mu\text{L}$  de *Taq* polimerasa, 2.5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (25  $\mu\text{M}$ ), 2.5  $\mu\text{L}$  de buffer  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  (10X) y 2.5  $\mu\text{L}$  de BSA (50 mg/mL). El programa de amplificación utilizado fue: 1 ciclo de 7 min a  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 30 ciclos de 1 min a  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 1 min a  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  y 2 min a  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 1 ciclo de 7 min a  $74\text{ }^{\circ}\text{C}$  y 4  $^{\circ}\text{C}$ .

#### **d) Resolución de fragmentos amplificados**

Los productos de amplificación se separaron por electroforesis en geles de agarosa 2 % (p/v), con buffer TBE 0.5 X. Cada pocillo se cargó con 10  $\mu\text{L}$  de ADN y 2  $\mu\text{L}$  de buffer. Como marcador de peso molecular se usó el GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder Fermentas, según las indicaciones del fabricante: marcador de peso molecular 1  $\mu\text{L}$  (0.5  $\mu\text{g}$ ), buffer de carga 2  $\mu\text{L}$  y agua desionizada 7  $\mu\text{L}$ . La corrida se llevó a cabo con voltaje constante (10V/cm) durante 2 h. El ADN se tiñó con Good View™ Nucleic Acido Strain (0.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), incorporado al gel.

#### e) Análisis de perfiles BOX

La amplificación del ADN de los aislados se realizó por duplicado. Para el análisis digital de la imagen de los productos amplificados se empleó el software Gelcompar versión 4.2 (Maths applied) y se evaluó el grado de diversidad genética mediante análisis de conglomerados (*cluster* análisis). La similitud genética fue calculada con el coeficiente DICE. La clasificación jerárquica de los aislados fue realizada con el método de agrupamiento UPGMA. Con el objetivo de evaluar la estructura de los datos se calculó, para los dendrogramas realizados, el coeficiente de correlación cofenética (CCC). Para el análisis se consideraron las bandas conservadas, de buena intensidad y dentro del rango entre 300 y 3000 pb.

## 11 COMPETITIVIDAD DEL INOCULANTE COMERCIAL EN DISTINTOS SUELOS

### 11.1 Colecta de suelos

De 5 regiones de interés agrícola del Uruguay (cuadro 9) se colectaron al azar (Figura 11a), 18 cilindros de PVC de 14 cm de alto por 7,5 cm de diámetro, de cada región de muestreo. Esto hizo un total de 90 muestras que se colectaron entre el 22 y el 26 de marzo de 2011. Los cilindros de PVC se enterraron totalmente y se levantó la tierra de alrededor con una pala para extraerlos sin perder la muestra contenida en cada cilindro (figuras 11b y c).

### 11.2 Marcaje de la cepas usada como inoculante comercial con el gen reportero *gusA*

*E. coli* se cultivó en placa con medio LB sólido (Cuadro 3) con los antibióticos Sp 100 µg/mL y Sm 50 µg/mL durante 24 h a 37°C. Los antibióticos se prepararon a partir de soluciones concentradas (100X) y se conservaron en heladera a 4 °C. El cultivo de *E. coli* (donador) se rejuveneció por repique y crecimiento en el mismo medio y con los mismos antibióticos durante 6 h. La cepa de *Bradhyrizobium* sp. U526 (receptor) se hizo crecer en medio TY sólido (Cuadro 4) durante 72 h.

La conjugación se realizó a partir de una ansada de cada cultivo, que se sembró uno sobre otro y se mezcló con el ansa en una placa con medio TY (Cuadro 4). El cocultivo se dejó 24 h a 28°C. Luego se resuspendió una ansada en 1 mL de suero fisiológico, se agitó con vortex vigorosamente 1 min y se hicieron diluciones de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ . Se sembraron 100  $\mu$ L de cada dilución, por duplicado, en placas con medio YEM (Cuadro 2) con Sm 200  $\mu$ g/mL, Sp 300  $\mu$ g/mL y nitrofurantoína 20  $\mu$ g/mL, esta última para eliminar *E. coli*. Como controles se usaron la cepa U526 de *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) y la cepa dS17-1  $\lambda$ -pir de *E. coli* que se sembraron en el mismo medio. Los cultivos se incubaron a 27°C hasta la aparición de colonias. Los transconjugantes se seleccionaron por resistencia a antibióticos y además se verificó que la construcción se expresara repicando 20 clones transjugantes U526::*gusA* en placas, con medio YEM con antibióticos, al que se agregaron 70  $\mu$ L de Xglu ( 20 mg Xglu / mL dimetilformamida).

Cuadro 9. Regiones seleccionadas para la colecta de suelos.

Regiones de muestreo	Localización	Tipo de suelo	Uso de los suelos
La Estanzuela (Colonia).	83 msnm 34°19' S y 57°43' O	Brunosol eutrítico típico	Rotación agrícola Ganadera
La Carolina (Flores)	170 msnm 33°52' S y 57°04' O	Brunosol eutrítico	Campo natural sobre cristalino
Tambores (Tacuarembó)	276 msnm 31°54' S y 56°14' O	Litosol eutrítico melánico	Campo natural sobre basalto profundo
Paso de la Laguna (Treinta y Tres)	45 msnm 33°10' S y 54°26' O	Solod melánico	Rotación arroz-pasturas con drenaje pobre
Palo e Pique (Treinta y Tres)	10 msnm 33°14' S y 54°15' O	Argisol subeutrítico	Campo natural de lomadas



**Figura 11.** Colecta de muestras de suelo. a) Distribución al azar de los cilindros, b) enterrado de cilindros, c) extracción del cilindro y d) cilindro con el suelo colectado.

### 11.3 Cinética de nodulación del parental y transconjugantes *in vitro*

A 8 clones U526::*gusA* que expresaron el gen *gusA* en condición de vida libre, se les ensayó la cinética de nodulación respecto a la cepa parental en condición *in vitro*. Para esto se consideró la aparición del primer nódulo y el número total de nódulos a los 21 días de inoculadas las plántulas. Para ello se inocularon las semillas como se describió en el apartado 6 y crecieron según se describe en el apartado 4.2b.

Se usó un diseño experimental completamente aleatorizado con 9 tratamientos, correspondientes a los 8 clones y al parental (U526) y 3 repeticiones, con un total de 27 unidades experimentales. La variable número de nódulos se analizó a través del análisis de varianza (ANOVA); para las comparaciones de medias se usó la prueba de Duncan al 5 %.

#### 11.4 Inoculación y siembra de las semillas en cilindros de suelo

El clon 8 de U526::*gusA* se cultivó en medio YEM (Cuadro 2), cuando el cultivo llegó a una D.O.<sub>600</sub> de aproximadamente  $10^7$  cél/mL se centrifugaron 100 mL a 10.000 rpm durante 2 min, se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 5 mL de agua estéril. Los 5 mL de suspensión bacteriana se mezclaron con 1 g de turba estéril y 2 g de semilla, que se dejaron secar durante 20 min. En cada cilindro se sembraron 20 semillas inoculadas distribuidas sobre el suelo, sin eliminar la capa vegetal, para simular siembra en cobertura.

#### 11.5 Ocupación de los nódulos

A los 50 días se levantaron 4 plantas de cada cilindro, se contaron los nódulos y se aislaron rizobios como se describe en el apartado 10.2a. El medio YEM en el que se sembraron contenía Xglu incorporado a razón de 70  $\mu$ L (20 mg/mL disuelto en dimetilformamida) por placa con 25 mL de medio. Las placas se reticularon para ser sembradas con 20 aislados en cada una y se incubaron a 27 °C. La presencia de la cepa transformada se detectó por aparición del color azul.

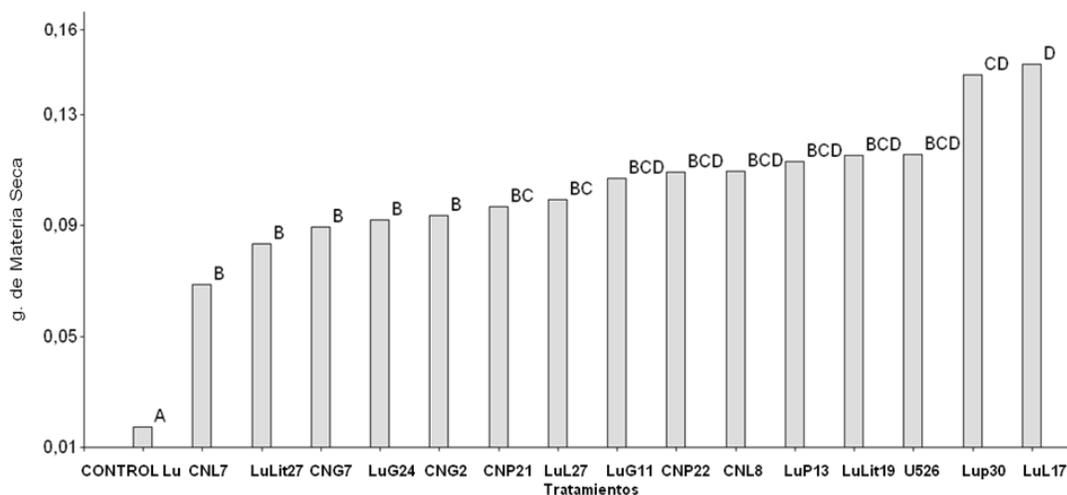
Se usó un experimento factorial, dispuesto en un diseño completamente aleatorizado con 2 factores: suelos y cultivares de *L. uliginosus*, 5 niveles para suelos y 2 niveles para cultivar (LE 306 y 'Grasslands Maku'); con 10 tratamientos y 9 repeticiones para un total de 90 unidades experimentales. La variable número de nódulos ocupados por U526::*gusA* sobre el total de nódulos, expresado como %, se evaluó a través de análisis de varianza (ANOVA). Con ello se determinó la respuesta a la ocupación de nódulos con la inoculación de U526::*gusA* en los dos cultivares de *L. uliginosus* y la interacción entre los factores suelo-cepa sobre la ocupación de nódulos de U526::*gusA*. Para la comparación de medias se usó el test de Duncan al 5.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 1. EFICIENCIA SIMBIOTICA EN MACETAS

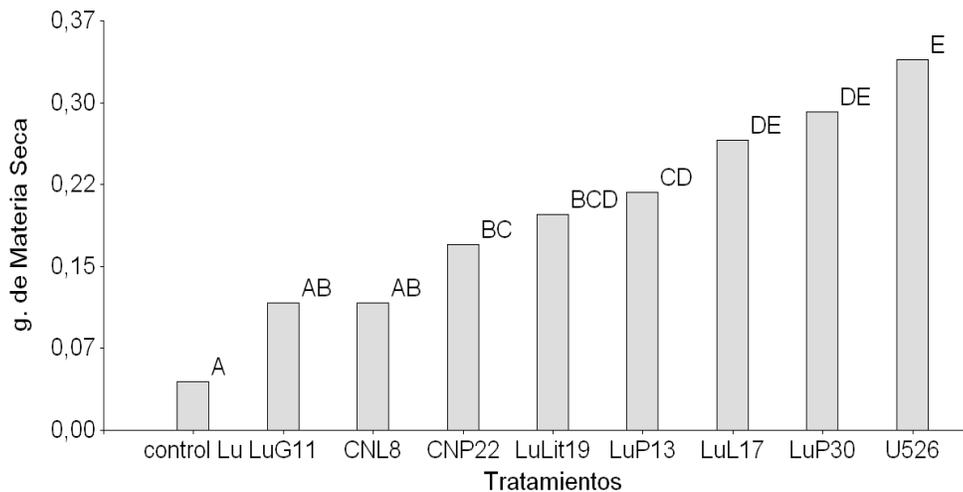
La eficiencia simbiótica de 14 cepas en simbiosis con *L. uliginosus* LE306, en condiciones controladas, se evaluó a través de la biomasa de la parte aérea. Las cepas se seleccionaron entre una colección de 75 (Cuadro 1), usando como criterio aquellas aquellas cuyo perfil ERIC aparecía con mayor frecuencia en cada sitio de muestreo (Figura 7).

El peso seco de la parte aérea, determinado 45 días después de sembradas las semillas, fue mayor en todos los pares simbióticos respecto al control sin inocular (Figura 12). A su vez la cepa LuL17 fue más eficiente que las cepas LuL27, CNP21, CNG2, LuG24, CNG7, LuLit27 y CNL7 en producción de biomasa, pero no se encontró diferencia respecto a las cepas CNP22, LuLit19, LuP13, LuP30, CNL8, LuG11 y el inoculante comercial U526 (Figura 12).



**Figura 12.** Biomasa producida por la parte aérea de *L. uliginosus* en simbiosis con aislados nativos y el inoculante comercial, *Bradyrhizobium* sp cepa U526. Se incluyó un control sin inocular y sin nitrógeno. La biomasa se expresa como peso seco por maceta a los 45 días. Las diferentes letras indican diferencias significativas, (Test de Duncan  $p < 0,05$ )

Las 7 cepas que produjeron igual biomasa que la LuL17, se incluyeron en el segundo ensayo de eficiencia simbiótica, en el que se determinó la biomasa a 45 y 80 días después de la siembra. A los 45 días no se mostraron diferencias en la producción de biomasa entre los tratamientos analizados (datos no mostrados). A los 80 días las plantas inoculadas con cepa U526 produjeron la misma cantidad de biomasa que las simbiosis con las cepas LuP30 y LuL17, pero mayor cantidad que las cepas LuP13, LuLit19, CNP22, CNL8 y LuG11 (Figura 13). Las cepas CNL8 y LuG11 agruparon con el testigo sin inocular, por lo que no se incluyeron en ensayos posteriores (Figura 13).



**Figura 13.** Biomasa producida por la parte aérea de *L. uliginosus* en simbiosis con aislados nativos y el inoculante comercial, *Bradyrhizobium* sp cepa U526. Se incluyó un control sin inocular y sin nitrógeno. La biomasa se expresa como peso seco en g/planta de la parte aérea, en el segundo corte, a los 80 días. Las diferentes letras indican diferencias significativas, (Test de Duncan  $p < 0,05$ )

Si bien es sabido que *L. corniculatus* y *L. tenuis* son nodulados eficientemente por el género *Mesorhizobium*, mientras que *L. uliginosus* y *L. subbiflorus* por el género *Bradyrhizobium*, hay cepas que nodulan indistintamente ambos hospederos. Sin embargo, estas situaciones pueden conducir a simbiosis poco eficientes, o a relaciones de tipo parasitarias (Monza *et al.*, 1992; Irisarri *et al.*, 1996) donde las plantas noduladas producen menos biomasa que el control sin inocular. Batista (2009) en estudios de eficiencia simbiótica, con *L. uliginosus* 'Grasslands Maku' y *L. corniculatus* 'San Gabriel', no identificó diferencias significativas entre las diferentes cepas ensayadas, pero sí identificó cepas con

capacidad de nodular ambas especies de Lotus, aunque en *L. corniculatus* los nódulos desarrollados presentaron un color blanco.

Irisarri *et al.* (1996) caracterizaron rizobios nativos aislados de nódulos de *L. subbiflorus* y que también nodulan efectivamente a *L. uliginosus*, pero no nodularon a *L. corniculatus* ni a *L. tenuis*. Por otro lado, cuando inocularon *L. subbiflorus* con aislados provenientes de raíces de *L. tenuis* y *L. corniculatus*, observaron la formación de pseudonódulos *fix-*, con aspecto de manchas de color rojo intenso, que no contenían bacterias en su interior.

Sotelo *et al.* (2011) determinaron que la eficiencia de pares simbióticos establecidos entre *Mesorhizobium* sp. y *L. corniculatus*, determinada a través de la biomasa producida, fue similar en todos los pares evaluados, entre los que se encontraba el inoculante comercial. También identificaron muchos aislados de nódulos de *L. corniculatus* que indujeron nódulos fijadores de nitrógeno en *L. uliginosus*, al igual que la cepa NZP2037 de *Mesorhizobium* sp., de amplio rango de nodulación. Esto fue sorprendente, ya que es conocida la incompatibilidad entre los simbiotes de *L. uliginosus* y *L. corniculatus*, y viceversa, entre *L. corniculatus*, y *L. uliginosus* (Lorite *et al.*, 2010a, 2010b; Estrella *et al.*, 2009). Sin embargo, las cinco cepas que son eficientes en ambas especies de Lotus, no mostraron rendimientos óptimos con *L. uliginosus*.

El cultivar tetraploide 'Grasslands Maku', originario de Nueva Zelanda, se comenzó a evaluar en Uruguay en las décadas del 80 y 90, ya que es un forraje con buen comportamiento productivo en las mejoras de campo natural (Labandera *et al.* 2005). El microsimbionte recomendado para *Lotus uliginosus* 'Grasslands Maku' es la cepa U526, introducida de Nueva Zelanda (Punschke, 2010), incluida en este trabajo, seleccionada por su alta eficiencia en campo (Labandera *et al.*, 2005). Actualmente con el incremento del área sembrada de Maku, se han detectado problemas en la implantación en semillero y en campo, provocadas por fallas en el establecimiento de la simbiosis (Labandera *et al.*, 2005). La principal desventaja de 'Grasslands Maku' es el bajo rendimiento de producción de semilla (Ayala *et al.*, 2003), que ha incentivado al desarrollo de nuevos cultivares como el LE306, con alta producción de semilla (Hernandez *et al.*, 2006). Los estudios del cultivar LE306 han demostrado que su adaptación varía según las regiones del país, y su rentabilidad depende, entre otras

cosas, de un inoculante rizobiano adecuado (Hernandez *et al.*, 2006). A partir de estas conclusiones, en el presente trabajo nos hemos planteado buscar un posible inoculante para el cultivar diploide LE306. Los resultados del ensayo de eficiencia simbiótica, demostraron que la cepa comercial U526, fue eficiente con LE306, al igual que las cepas CNP22, LuLit19, LuP13, LuP30 y LuL17 (Figuras 12 y 13).

### 2. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA NODULACIÓN

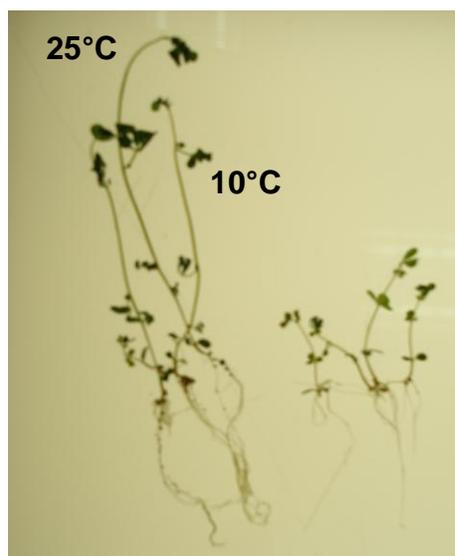
Para responder la interrogante sobre si las bajas temperaturas son responsables de la inhibición de la nodulación cuando se siembra tardíamente, se realizaron ensayos *in vitro* usando como hospedero a *L. uliginosus* LE306. Se usaron las temperaturas promedio del suelo de INIA La Estanzuela (Cuadro 10) y también se incluyó 25 °C, temperatura considerada óptima para la FBN en *Bradyrhizobium japonicum* (Montañez *et al.*, 1995).

Inicialmente se ensayó la nodulación a 10 °C, temperatura promedio del suelo en el mes de junio, fecha no recomendada para la siembra de *L. uliginosus*, y a 25 °C, temperatura algo superior al promedio en el suelo en el mes de marzo, recomendado para la siembra de *L. uliginosus* (Guillén, 2007). En estas condiciones se evaluó la capacidad de inducir nódulos por la cepa usada como inoculante comercial (U526) y por la cepa nativa aislada de campo natural, la CNP22, que tiene eficiencia simbiótica igual al inoculante comercial (Figura 12). A 10 °C se inhibió totalmente la nodulación, y marcadamente el desarrollo radicular (Figura 14). En este sentido, la inhibición de la capacidad de nodulación por rizobios ocasionada por las bajas temperaturas del suelo, ha sido comunicada en diferentes especies de leguminosas (Lindemann y Ham, 1979; Richardson y Syers, 1985; Schomberg y Weaver, 1992; Montañez *et al.*, 1995; Whitehead, 1995; Liu *et al.*, 2011).

A 25 °C se formaron en promedio 5 nódulos por planta, independientemente que se hubiera usado la cepa U526 o la CNP22. En la figura 14 se muestra la diferencia en el crecimiento de LE306 a 25 °C y 10 °C, después de 21 días de crecimiento.

Los resultados obtenidos en relación al crecimiento y nodulación de las plantas a 10 °C, confirman lo que se recomienda en la literatura respecto a la época de siembra de *L. uliginosus* en

Argentina y Uruguay, que debe hacerse tempranamente, antes que las bajas temperaturas del suelo la afecten, para lograr mejor implantación del cultivo, así como un desarrollo adecuado de planta a la entrada del invierno (Ayala *et al*, 2003; Guillen, 2007).



**Figura 14.** Plantas de *L. uliginosus* después de 21 días de crecimiento a 25 °C y a 10 °C.

Con 25 °C se evidenció un buen crecimiento de plantas y formación de nódulos, pero de igual forma se descartó para próximos ensayos, ya que los meses de siembra que tradicionalmente utiliza el productor en Uruguay son marzo y abril, con temperaturas promedio de 22 °C y 18 °C respectivamente, y el mes de mayo, con temperatura promedio de 15 °C, que es considerada una siembra tardía (Cuadro 10).

En el segundo ensayo realizado, se evaluó el efecto del momento de la siembra sobre la nodulación. Para esto se usaron las temperaturas promedio del suelo de los meses de marzo, abril y mayo, 22 °C, 18 °C y 15 °C respectivamente (Cuadro 11), correspondientes al período de siembra de *Lotus uliginosus* usado por los productores en Uruguay. Este ensayo incluyó el inoculante comercial U526 y las cepas nativas promisorias, seleccionadas por su eficiencia simbiótica: LuL17, CNP22, LuLit19, LuP13, y LuP30 (Cuadro 1). La cuantificación de los nódulos se realizó a los 14, 17 y 21 días después de inoculadas las plantas en tubos con medio Jensen.

Cuando se analizó el número de nódulos inducidos a 15 °C, se encontró que, a excepción de la cepa LuP30 que indujo nódulos a partir de los 17 días, la nodulación se inhibió (Cuadro 11).

A 18 °C se indujeron nódulos a partir de los 17 días por 4 de las cepas, pero en los tratamientos con U526 y CNP22 no se formaron nódulos en ese tiempo (Cuadro 11). Sin embargo, a los 21 días todas las cepas promovieron la nodulación. Se destacó la cepa LuP13 (Figura 15) porque indujo en promedio 7 nódulos por planta, a diferencia de las cepas LuLit19, LuL17, LuP13, CNL8 y U526, que indujeron entre 2.0 y 4.3 nódulos por planta (Cuadro 11).

**Cuadro 11.** Nódulos inducidos en raíces de *L. uliginosus* por cepas nativas y el inoculante comercial a diferentes temperaturas. Los ensayos se realizaron en cámara de crecimiento a 15, 18 y 22 °C. El número de nódulos corresponde a la media de 9 plantas, sembradas en tres tubos, seguido del error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas (Test de Tukey  $p < 0,05$ ). \* No se analizó el error estándar.

Cepa	Número de nódulos					
	15 °C		18 °C		22 °C	
	17 días	21 días	17 días	21 días	17 días	21 días
U526	0	0	0	2.0 ± 0.6 <sup>a</sup>	3.3 ± 1.5 <sup>bc</sup>	7.0 ± 1.0 <sup>a</sup>
LuLit19	0	0	1.3 ± 0.6 <sup>a</sup>	2.3 ± 0.6 <sup>ab</sup>	3.0 ± 1.0 <sup>abc</sup>	6.7 ± 1.5 <sup>a</sup>
LuL17	0	0	0.7 ± 0.3 <sup>a</sup>	4.3 ± 0.6 <sup>b</sup>	1.3 ± 0.6 <sup>a</sup>	7.0 ± 1.0 <sup>a</sup>
LuP13	0	0	1.7 ± 0.6 <sup>a</sup>	7.0 ± 1.0 <sup>c</sup>	2.0 ± 0.0 <sup>ab</sup>	6.7 ± 2.1 <sup>a</sup>
LuP30	0.22 *	0.5 *	1.7 ± 0.6 <sup>a</sup>	3.3 ± 0.6 <sup>ab</sup>	4.0 ± 1.0 <sup>c</sup>	7.1 ± 1.0 <sup>a</sup>
CNP22	0	0	0	2.3 ± 0.6 <sup>ab</sup>	2.3 ± 0.6 <sup>abc</sup>	4.7 ± 1.2 <sup>a</sup>

A 22 °C, la cepa LuP30 indujo más nódulos que la cepa LuL17 y LuP13 a los 17 días, mientras que a los 21 días no se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos (Cuadro 11).



**Figura 15.** Nódulos inducidos en raíces de *L. uliginosus* por la cepa LuP13 a 18 °C a los 17 y 21 días, tiempo de cosecha.

El cultivo de *L. uliginosus* en Uruguay se ve afectado por las bajas temperaturas del suelo que se presentan en la temporada de invierno, que limitan su crecimiento y rendimiento forrajero en el año de inoculación. Sin embargo dentro de las especies del género *Lotus*, ésta es la que produce mas forraje en invierno (Ayala *et al.*, 2003). En esta tesis se demostró la inhibición de la nodulación inducida por cepas de *Bradyrhizobium* sp. en *L. uliginosus* LE306 como consecuencia de baja temperatura. Esto fue evidente en la medida que a los 21 días el mayor número de nódulos se habían formado en plantas crecidas a 22 °C, seguidas de las crecidas a 18 °C, mientras que a 15 °C sólo una cepa indujo nódulos (Cuadro 11). Una explicación a este retraso de la nodulación está relacionada a la inhibición de la expresión de los genes *nod* por baja temperatura (Zhang *et al.*, 2003a), cuya expresión es necesaria para la formación de nódulos y el establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa (Monza y Palacios, 2004).

Se ha reportado que el efecto de las bajas temperatura en la raíz puede causar inhibición de la nodulación, aún en presencia del microsimbionte compatible (Duzan *et al.*, 2004). En Canadá, las bajas temperaturas del suelo se consideran el principal factor que limita el crecimiento potencial y la fijación simbiótica de nitrógeno de la Soja (Zhang *et al.*, 2003b). Todas las etapas del establecimiento de la simbiosis investigadas (intercambio de señales, unión de los rizobios a la raíz, enrollamiento de los

pelos radicales, formación de hilo de infección y desarrollo de nódulos) son inhibidos por las bajas temperaturas (Zhang y Smith, 1996; Zhang *et al.*, 2003b; Duzan *et al.*, 2004).

Duzan *et al.* (2004), estudiaron el efecto inhibitorio de las bajas temperaturas sobre las primeras etapas de la nodulación, específicamente en el enrollamiento de los pelos radicales, determinado a través de la actividad biológica, con la aplicación de 3 concentraciones del factor Nod, en las raíces de plantas de soja incubadas a 15 °C, 17 °C y 25 °C.

Hernández *et al.* (2005), en evaluaciones en cilindros con cuatro tipos de suelos de Uruguay, estudiaron el establecimiento de *L. uliginosus* de los cultivares 'Grasslands Maku' y LE306, en ambientes con temperaturas entre 18 y 25 °C y entre 8 y 20 °C. Entre 8 y 20 °C 'Grasslands Maku' respondió a la inoculación por U526 en un tipo de suelo, mientras que LE306 no respondió a la inoculación en ninguno de ellos. Cuando la temperatura se situó entre 18 y 25 °C, hubo respuesta a la inoculación al menos en un tipo de suelo, en ambos cultivares. Los autores concluyeron en que se debe hacer un esfuerzo para seleccionar la cepa que mejor se adapte a las condiciones edafoclimáticas de Uruguay, e hicieron hincapié en la búsqueda de un inoculante para el cultivar LE306, ya que en 'Grasslands Maku' corroboraron el buen comportamiento en simbiosis con la cepa U526.

Una de las soluciones que se han propuesto en Uruguay para el establecimiento eficiente de la simbiosis entre *L. uliginosus* y su microsimbioente, es sembrar lo más temprano posible, para evitar los daños por las heladas del invierno en el momento de la implantación, ya que las plantas pequeñas no son tolerantes al estrés ocasionado por las bajas temperaturas (Ayala *et al.*, 2003). De todas formas hay limitantes para siembras en enero o febrero, porque el promedio de las máximas temperaturas de estos meses es superior a los 29 °C (Calistro, 2011), y *L. uliginosus* es poco tolerante a condiciones de sequía que por lo general van acompañadas de las altas temperaturas. Sumado a esto, temperaturas por encima de 28 °C producen una reducción significativa en la fijación biológica de nitrógeno (Quiñones *et al.*, 2011). Por este motivo se recomiendan siembras en otoño, cuando las situaciones de déficit hídrico son menos frecuentes (Ayala *et al.*, 2003).

Ante las dificultades ocasionadas por las condiciones edafoclimáticas de las zonas donde se siembra Lotus en Uruguay, una alternativa es seleccionar cepas nativas adaptadas a baja temperatura, para minimizar los efectos adversos de ésta sobre la nodulación y la fijación biológica de nitrógeno. En este trabajo se seleccionaron las cepas LuP30, que indujo nódulos a 15 °C, y LuP13, que indujo mayor cantidad de nódulos a 18 °C (Cuadro 11).

Roughly (1970) determinó que la cepa TA1, aislada de un ambiente frío, formaba nódulos en *Trifolium subterraneum*, mientras que la cepa SU297, aislada de un ambiente cálido, no formó nódulos a esa temperatura. Por su parte Jander y Fahraus (1971) reportaron que el rendimiento de las cepas de rizobios en simbiosis con soja, fue influenciado por su origen geográfico. Zhang *et al.* (2003a) evaluaron la nodulación y FBN en soja durante 2 años, en condiciones de campo, con 2 cepas (USDA 30 y 31) aisladas de suelos con bajas temperaturas y seleccionadas de laboratorio por su capacidad de nodular a 15 °C, y la cepa 532C utilizada como inoculante en EEUU. El número de nódulos en las simbiosis con las cepas USDA 30 y 31 fue mayor que con la cepa 532C. Además, con las cepas USDA 30 y 31 el aumento en el rendimiento de grano fue de 6,2 y 7,7% en el primer año y el 9,2 y el 8,7% en el segundo.

### 3. CAPACIDAD DE DESNITRIFICAR DE LAS CEPAS

Para determinar si las cepas promisorias para ser usadas como inoculante tienen capacidad de desnitrificar, se evaluó en células en vida libre y en condiciones microaeróbicas, la capacidad de acumular N<sub>2</sub>O. Para esto, los cultivos se incubaron en presencia y ausencia de acetileno, un inhibidor de la enzima óxido nítrico reductasa (Nos). Esta metodología es comúnmente usada para estimar la cantidad de N<sub>2</sub> liberado por la reacción catalizada por la Nos, dado que la determinación directa del N<sub>2</sub> no es sencilla de realizar (Sameshina *et al.*, 2003).

Según se observa en el cuadro 12, la acumulación de N<sub>2</sub>O en presencia de acetileno fue mayor con las cepas U526, LuL17, LuLit19, LuP30 y LuP13 respecto al tratamiento sin inhibidor. Sin embargo la cepa CNP22 produjo la misma cantidad de N<sub>2</sub>O sin y con acetileno, lo que indica ausencia de actividad Nos (Cuadro 12).

**Cuadro 12.** Acumulación de óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) por cepas de *Bradyrhizobium spp.* en condición de vida libre. La concentración de N<sub>2</sub>O se determinó en la parte aérea de los frascos después de 24 h de incubación con (+) y sin (-) acetileno. Los valores son la media de tres repeticiones seguido del error estándar.

Cepas	μmol N <sub>2</sub> O . mg de proteína <sup>-1</sup>	
	+ Acetileno	- Acetileno
U526	8.3±2.0	≤4
CNP22	15.4±6.3	14,2±6,4
LuP13	6.8±1.0	≤4
LuP30	21.6±3.7	≤4
LuL17	18.2±3.5	≤4
LuLit19	12.3±2.2	≤4

La capacidad de desnitrificar no está muy extendida entre los rizobios, ya que sólo algunas especies como *Bradyrhizobium japonicum* y *Azorhizobium caulinodans*, son capaces de crecer cuando se cultivan en condiciones limitantes de oxígeno y en presencia de nitrato como aceptor final de electrones (Sánchez, 2009). En esta tesis se encontró que todas las cepas de *Bradyrhizobium sp.* estudiadas, aisladas de nódulos de *L. uliginosus*, tienen la capacidad de desnitrificar en vida libre (Cuadro 12). La capacidad de desnitrificar de cepas de *Bradyrhizobium sp.* aisladas de *L. subbiflorus* ha sido reportada por Monza *et al.* (2006). Esto demuestra que en bacterias del género *Bradyrhizobium*, no sólo *B. japonicum* tiene la capacidad de desnitrificar, aunque sí es la única bacteria donde se han aislado y caracterizado los genes de la desnitrificación (Sánchez, 2009).

En la agricultura, es usual la fertilización de suelos con nitratos. Cuando se generan condiciones microarólicas, como consecuencia de las lluvias, el NO<sub>3</sub><sup>-</sup> se pierde como NO, N<sub>2</sub>O, o N<sub>2</sub> (Bueno, 2008), con las consecuentes pérdidas económicas para el productor. Además los productos

intermedios de la desnitrificación, el NO y N<sub>2</sub>O, tienen también un enorme impacto negativo sobre la contaminación atmosférica, dado que intervienen en la formación de lluvia ácida, en el calentamiento global de la atmósfera y en la destrucción de la capa de ozono. En este trabajo, entre otras razones, se descartó la cepa CNP22 como posible inoculante ya que tiene la vía de desnitrificación incompleta (Cuadro 12), y puede causar un alto impacto negativo al medio ambiente,

En bacterias que nodulan leguminosas se han hecho pocos estudios de la capacidad de desnitrificar. En *Sinorhizobium meliloti*, concretamente en el plásmido simbiótico *PsymA*, se han localizado genes que presentan homología con los genes *nap*, *nir*, *nor* y *nos* de otras bacterias desnitrificantes (Sánchez, 2009), aunque no crece en microaerobiosis con NO<sub>3</sub><sup>-</sup> o NO<sub>2</sub><sup>-</sup> como aceptores finales de electrones.

Por otro lado, en *Mesorhizobium loti* se han descrito cepas aisladas de suelos de Uruguay que contienen genes de la desnitrificación, algunas cepas contienen sólo los genes *nir*, otras sólo los genes *nor* y otras sólo genes *nos*, por lo tanto las cepas tienen la vía de desnitrificación incompleta (Monza *et al.*, 2006). Ninguna de esas cepas desnitrificó en condiciones microaeróbicas cuando se usó NO<sub>3</sub><sup>-</sup> como aceptor final de electrones.

Por otro lado, la capacidad de desnitrificar en simbiosis es de gran interés, dado que esta habilidad permite a las bacterias sobrevivir durante periodos de anoxia. En estas condiciones, los bacteroides pueden poner en marcha el mecanismo necesario para desnitrificar y mediante este proceso pueden generar ATP en condiciones en las que el oxígeno disponible es limitante. De esta forma, cuando se genera estrés abiótico por encharcamiento, habitual en la agricultura, ocurre una disminución de la difusión de oxígeno hacia el interior del nódulo, y consecuentemente los bacteroides pueden producir ATP (Sánchez, 2009), a partir de la respiración de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y con la participación de una oxidasa terminal de alta afinidad por oxígeno (*cbb3*). En este sentido, Mesa *et al.* (2004) demostraron que los genes *nir*, *nor* y *nos* se expresan en nódulos de plantas de soja, mediante el empleo de fusiones transcripcionales *nirK-LacZ*, *norC-LacZ* y *nosC-LacZ*, y también por detección histoquímica *in situ* de actividad β-galactosidasa. Además, encontraron que en simbiosis la limitación de oxígeno es el principal

factor implicado en la expresión de dichos genes, y no la presencia de  $\text{NO}_3^-$ , lo contrario que en vida libre donde el  $\text{NO}_3^-$  es determinante para la expresión de esos genes.

#### 4. PREPARACIÓN DE INOCULANTES EN CONDICIÓN INDUSTRIAL

La habilidad industrial, actividad realizada en la empresa de inoculantes CALISTER S.A., se ensayaron las cepas LuL17, LuP13 y LuP30 seleccionadas por su eficiencia simbiótica y además las dos últimas presentaron buena nodulación a baja temperatura (Cuadro 11).

##### 4.1 Preparación de los inoculantes para ensayos de campo

Con esas 3 cepas se ensayó la preparación de inoculante usando el mismo medio en el que se prepara el inoculante comercial para el cultivar 'Grasslands Maku', cepa U526 (Cuadro 6). La cepa LuP13 creció como la cepa U526, mientras que las cepas LuP30 y LuL17, lo hicieron pobremente, y formaron grumos. En la figura 16 se muestra la diferencia de crecimiento entre las cepas LuP13 y U526, respecto a la cepa LuP30, después de 7 días de incubación en agitación constante a 27 °C.



**Figura 16.** Diferencia de crecimiento de las cepas U526 y LuP13 respecto a la cepa LuP30. Las cepas crecieron 7 días en el medio de cultivo usado para crecer el inoculante comercial para Maku.

El paso siguiente fue evaluar si los inoculantes en cuestión podían alcanzar la concentración necesaria en turba, para lo que se impregnó este soporte con los caldos de cultivo, y se hizo el recuento de rizobios vivos en placa, a los 7 días. La cepa LuP13 llegó a una concentración final de rizobios de  $2.8 \times 10^9$  ufc.g<sup>-1</sup> y el inoculante comercial U526 a  $2.9 \times 10^9$  ufc.g<sup>-1</sup> (Cuadro 13). De esta forma, la cepa LuP13 puede ser multiplicada en el medio de cultivo para 'Grasslands Maku' y además se logra en turba la concentración de rizobios establecida en la normativa de control de calidad de inoculantes del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, que exige para la comercialización de inoculantes una concentración inicial superior de  $2 \times 10^9$  ufc.g<sup>-1</sup> y de  $1 \times 10^9$  ufc.g<sup>-1</sup> en la fecha de su vencimiento (Labandera y Mayans, 2006). Por otro lado, con las cepas LuL17 y LuP30 se logró una concentración inferior a  $1 \times 10^7$  ufc.g<sup>-1</sup> (Cuadro 13), concentración insuficiente para las exigencias del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca.

En la producción de inoculantes las normas de calidad son primordiales para garantizar el mínimo de las poblaciones bacterianas y libres de contaminantes (Stephens y Rask, 2000). Por este motivo se descartaron las cepas LuP30 y LuL17 (Cuadro 13) para las siembras en campo, ya que no llegan a las concentraciones necesarias, lo que puede repercutir en un desempeño inadecuado del inoculante, y además en el posterior abandono del productor agropecuario de realizar dicha práctica (Stephens y Rask, 2000).

**Cuadro 13.** Concentración final de rizobios en turba. El número de rizobios se expresa como ufc.g<sup>-1</sup> de turba y los valores corresponden a la media de tres repeticiones, seguidos del error estándar.

Cepas	Número de rizobios viables (ufc.g <sup>-1</sup> )
LuP13	$2.78 \times 10^9 \pm 0.42 \times 10^9$
LuP30	$< 1 \times 10^7$
LuL17	$< 1 \times 10^7$
U526	$2.88 \times 10^9 \pm 0.0 \times 10^9$

#### 4.2 Evaluación de manitol y glicerol como fuentes de carbono

Con las mismas cepas se realizó un ensayo para buscar un medio de cultivo con una fuente de carbono más económica. Por esto se ensayó el medio de cultivo para el inoculante de soja (Cuadro 7), en el que se usa como fuente de carbono al glicerol, una alternativa más económica que el manitol usado para multiplicar el inoculante para 'Grasslands Maku' (Cuadro 6). En el medio con glicerol, usado para multiplicar el inoculante de soja se encontró que las cepas LuP13 y U526 crecieron más que en el medio para 'Grasslands Maku' que usa como fuente de carbono el manitol. En el medio para soja las cepas LuP13 y U526 llegaron a concentraciones de  $6.6 \times 10^8$  y  $5.5 \times 10^8$  ufc.mL<sup>-1</sup> respectivamente, mientras que en el medio de cultivo para 'Grasslands Maku', lograron concentraciones de  $3 \times 10^7$  y  $7 \times 10^7$  ufc.mL<sup>-1</sup> respectivamente. Las cepas LuL17 y LuP30 no tuvieron la habilidad industrial requerida para un inoculante comercial en los dos medios ensayados, dado que el crecimiento fue inferior a  $1 \times 10^7$  ufc.mL<sup>-1</sup> y formaron grumos (Cuadro 14).

Los caldos de cultivo con las cepas LuP13 y U526 se usaron para impregnar el soporte en base turba y generar el inoculante para los ensayos en campo. El recuento de rizobios vivos en placa evidenció que ambas cepas lograron una concentración final entre  $2.2 \times 10^9$  a  $2.4 \times 10^9$  ufc. g<sup>-1</sup> (Cuadro 14), indistintamente del medio de cultivo en el que fueron crecidas, cumpliendo con las exigencias establecidas en las normativas de control de calidad del MGAP (Labandera y Mayans, 2006). Con los inóculos así preparados con las cepas LuP13 y U526, se sembraron los ensayos en marzo, abril y mayo del 2011, en el INIA La Estanzuela.

De las 3 cepas seleccionadas para ensayar su crecimiento en condiciones industriales en la fábrica de inoculantes, sólo la Lup13 tuvo una habilidad aceptable en la medida que no formó grumos y logró la concentración final necesaria en medio líquido y en turba (Cuadros 13, 14). También la Lup13 y el inoculante comercial U526 se desarrollaron adecuadamente en el medio de cultivo para soja (Cuadro 14).

**Cuadro 14.** Concentración de rizobios en diferentes medios de cultivo y en turba. Los ensayos se realizaron con los medios de cultivo para 'Grasslands Maku' y para soja. Los valores son la media de tres repeticiones, seguidos del error estándar.

Medio de cultivo	Cepa	Número de rizobios viables	
		Medio Líquido (ufc.mL <sup>-1</sup> )	Turba (ufc.g <sup>-1</sup> )
M A K U	LuP13	$3 \times 10^7 \pm 2 \times 10^7$	$2.3 \times 10^9 \pm 0.24$
	LuP30	$< 1 \times 10^7$	
	U526	$7 \times 10^7 \pm 2 \times 10^7$	$2.2 \times 10^9 \pm 0.41$
	LuL17	$< 1 \times 10^7$	
S O J A	LuP13	$6,6 \times 10^8 \pm 1,1 \times 10^8$	$2.3 \times 10^9 \pm 0.46$
	LuP30	$< 1 \times 10^7$	
	U526	$5,5 \times 10^8 \pm 0,52 \times 10^8$	$2.4 \times 10^9 \pm 0.37$
	LuL17	$< 1 \times 10^7$	

Para la formulación y producción de inoculantes rizobianos se debe tener en cuenta parámetros físicos, químicos y biológicos, para que las cepas en el campo sean competitivas y sobrevivan, de manera de mantener a largo plazo las poblaciones en suelo. Una de las barreras más comunes en la producción de inoculantes comerciales son insuficiencias en la formulación, que han llevado a que el producto no llegue al campo con las condiciones que le permiten rendir el óptimo. En este sentido hay que tener en cuenta que el usuario final del inoculante se preocupa principalmente por la productividad de los cultivos, no de la fisiología bacteriana, ni de la ecología. Entonces cuando se produce un inoculante, se debe aceptar esta realidad y asegurar que la probabilidad de éxito de la inoculación se maximice, a pesar que el usuario final no puede comprender los principios biológicos en los que se basa el producto (Stephens y Rask, 2000).

Los inoculantes de leguminosas se comercializan por lo general en formulaciones de turba, líquido y granulado, aunque los más comunes son los que utilizan turba como soporte. Su ventaja radica en una mayor protección a los rizobios frente a factores adversos del suelo como altas temperaturas, deshidratación y biocidas sobre la semilla, entre otras. Por el contrario en los inoculantes

con soportes líquidos, la sobrevivencia de los rizobios en la semilla es menor, ya que no proveen la protección que se logra con la turba (Labandera, 2003). Aunque este tipo de inoculantes pueden tener inconvenientes, uno de los principales, es que cada semilla puede transportar una cantidad limitada de inóculo y por lo tanto de número de bacterias, lo que puede limitar el éxito de la inoculación en entornos desfavorables donde los suelos contienen rizobios nativos. En cultivos que tienen semillas chicas, los inoculantes granulados tienen la ventaja de poderse aplicar sobre la tierra, en banda, de manera similar a la que se aplica el fertilizante. Actualmente se siguen buscando nuevas alternativas de formulación, y todas giran en torno al aumento de la población de rizobios en el volumen o peso del producto, así como a la vida del rizobio en el soporte (Stephens y Rask, 2000).

#### 5. SELECCIÓN DE UN CEBADOR PARA EL MONITOREO DEL INOCULANTE EN CAMPO

Con el fin de monitorear los inoculantes experimentales mediante el uso de *fingerprints* PCR, se evaluó el primer BOX respecto al ERIC, usado por Batista (2009) para clasificar la colección de cepas que nodulan *L. uliginosus*, parte de la cual se usó en esta tesis. Para esto se generaron 40 perfiles con BOX y se compararon con los obtenidos para las mismas cepas con ERIC (Batista 2009).

De la comparación de los 40 perfiles con los dos juegos de primers, con BOX se pudieron diferenciar 24 perfiles únicos mientras que con ERIC 16 (Figuras 17 y 18). En ambos casos se consideró que dos perfiles eran los mismos cuando la similitud fue igual o mayor a 80%. En el rango entre 300 y 3000 pb, en los perfiles obtenidos con BOX la cantidad de bandas amplificadas fue mayor que en las obtenidas con ERIC, con máximos de 9 y 7 respectivamente (Figura 17 y 18). Por esta razón se prefirió usar el primer BOX para identificar, y por lo tanto poder monitorear las cepas usadas como inoculantes de *Bradyrhizobium* sp. en las siembras en campo realizadas en INIA La Estanzuela.

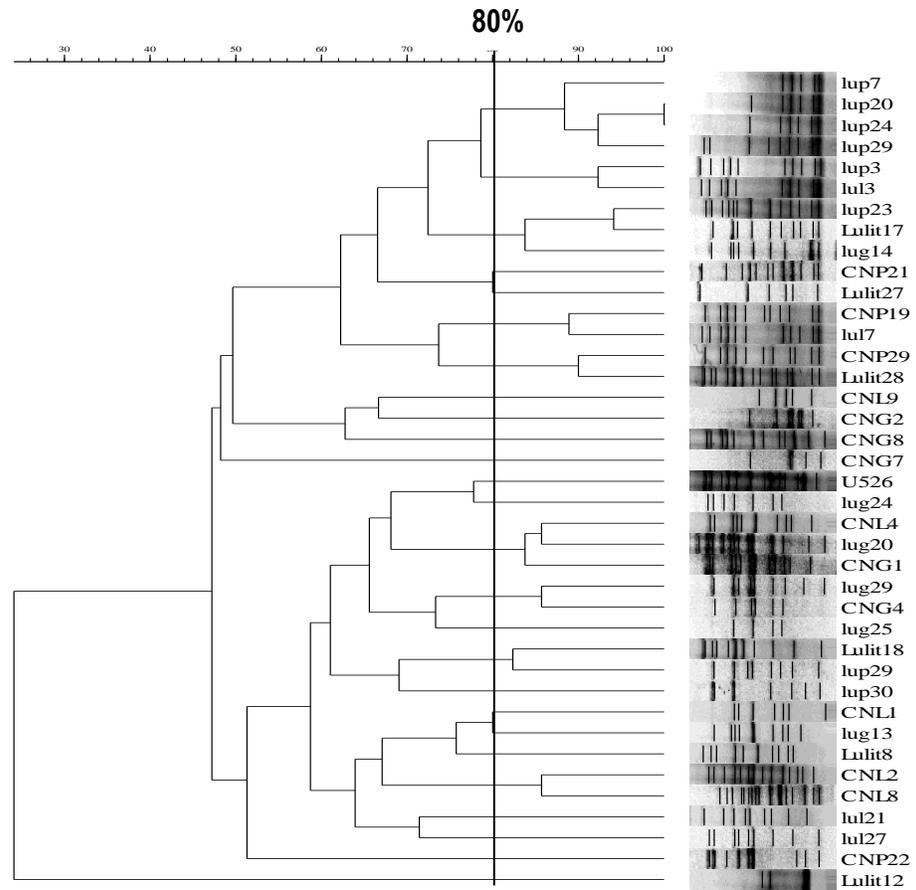
El rep-PCR es una técnica basada en la obtención rápida de huellas genómicas (*fingerprints*) por la amplificación de ADN, y los *primers* BOX, ERIC y REP, fueron diseñados con este fin a partir de secuencias repetitivas dispersas en el genoma (Mantilla *et al.*, 2004). Los *primers* BOX se han utilizado con éxito para estudiar la diversidad genética de rizobios (Fernandes *et al.*, 2003; Galli-Terasawa *et al.*, 2003; Alberton *et al.*, 2006; Kaschuk *et al.*, 2006; Barcellos *et al.*, 2007; Batista *et al.*, 2007; Pinto *et al.*,

2007). Además se ha reportado su eficacia para el control de calidad de diferentes inoculantes rizobianos en campo, entre los que se encuentran, inoculantes comerciales preparados con cepas del género *Bradyrhizobium* (Menna *et al.*, 2009). También se han obtenido resultados similares con los *primers* ERIC y REP en estudios de diversidad genética de rizobios (Santos *et al.*, 1999; Ferreira y Hungria, 2002; Mostasso *et al.*, 2002; Vinuesa *et al.*, 2005; Hungria *et al.*, 2006; Pinto *et al.*, 2007; Barcellos *et al.*, 2007; Estrella *et al.*, 2009; Batista, 2009; Lorite *et al.*, 2011; Sotelo *et al.*, 2011). Santamaría *et al.* (1999) identificaron, usando además de ERIC-PCR el perfil de lipopolisacáridos, cepas de *Bradyrhizobium* sp. colectadas en distintos suelos de Uruguay; estas estrategias fueron comparadas con el fin de contar con una herramienta para el monitoreo de cepas.

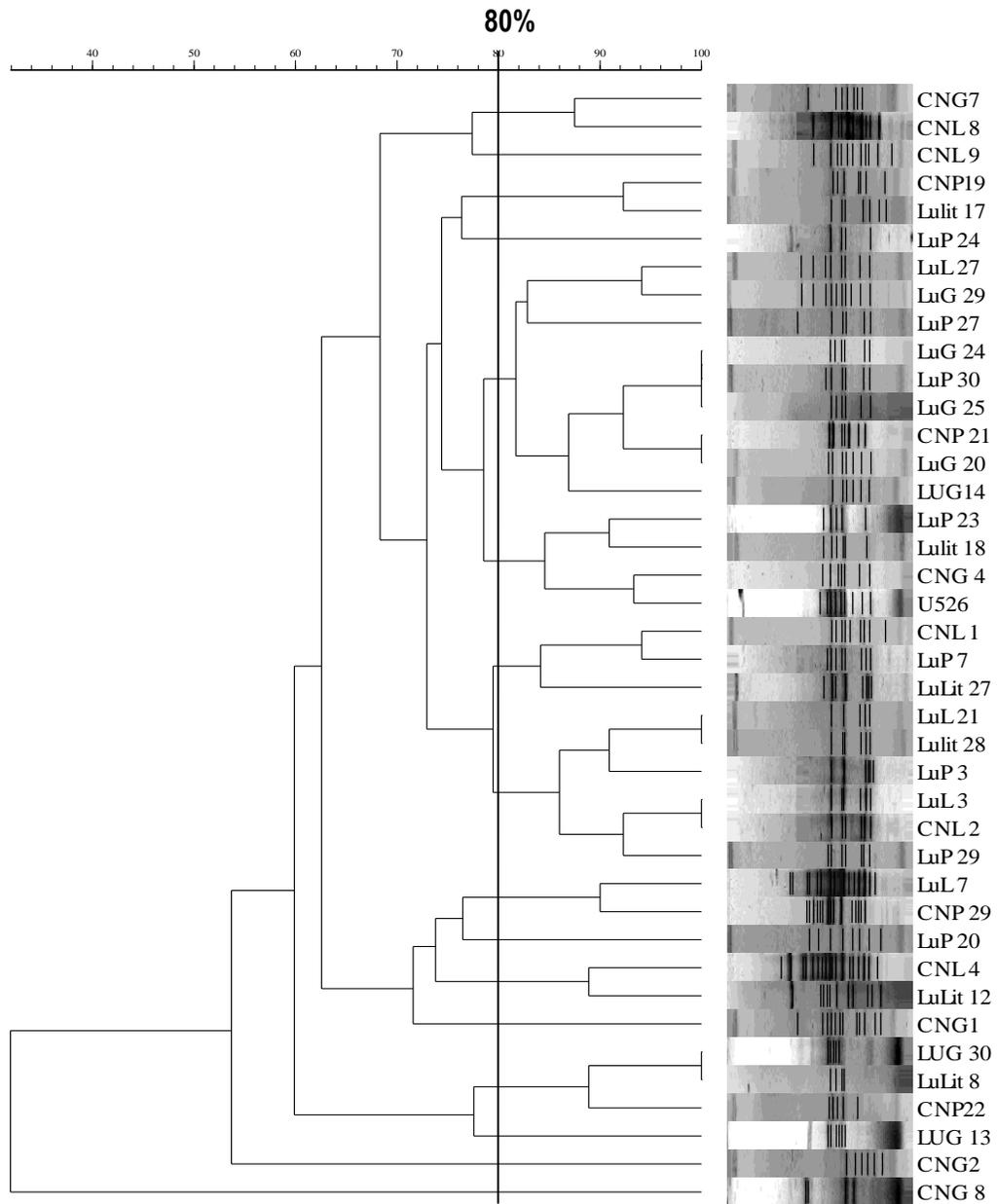
Vinuesa *et al.* (2005) identificaron, usando REP-PCR, altos niveles de diversidad genética entre aislados de *Bradyrhizobium canariense* y *B. japonicum*, provenientes de colectas realizadas en Marruecos e Islas Canarias. Con esta misma metodología Estrella *et al.* (2009), evaluaron la diversidad genética de rizobios que nodulan *L. tenuis* en suelos del Valle del Río Salado (Argentina). Por otro lado, Lorite *et al.* (2011) caracterizaron bacterias que establecen simbiosis eficientes con *L. uliginosus*. La identificación molecular de 39 aislados, más la cepa utilizada como inoculante comercial, fue realizada por REP-PCR, RFLP de 16S ARNr y análisis de las secuencias 16S ARNr, *glnII* y *recA*. Esto permitió establecer que los simbiosites de *L. uliginosus* tienen una estrecha relación filogenética con *B. japonicum* (Lorite *et al.*, 2011).

Menna *et al.* (2009), hicieron una caracterización preliminar de colecciones de cepas de rizobios que nodulan diferentes leguminosas, y también monitorearon en campo 68 cepas usadas como inoculantes comerciales.

La técnica de rep-PCR ha hecho posible evaluaciones precisas de muchas cepas simultáneamente, con costos cada vez más accesibles. En la identificación de cepas de *Bradyrhizobium* sp. se presentan dificultades en la obtención de perfiles genómicos, dado que es necesario realizar extracción fenólica de ADN, en la medida que no es posible amplificarlo usando la técnica de lisado de células. Esta dificultad conllevó a evaluar la competitividad de los



**Figura 17.** Dendrograma construido a partir de los perfiles BOX de 39 aislados, procedentes de los cuatro sitios de muestreo, y del inoculante comercial (U526). Se encontraron 24 perfiles diferentes con una similitud igual o mayor a 80%. Se usó el coeficiente de similitud DICE y el método de agrupamiento UPGMA.



**Figura 18.** Dendrograma construido a partir de los perfiles ERIC de 39 aislados, procedentes de los cuatro sitios de muestreo, y del inoculante comercial (U526). Se encontraron 16 perfiles diferentes con una similitud igual o mayor a 80%. Se usó el coeficiente de similitud DICE y el método de agrupamiento UPGMA. Los perfiles fueron obtenidos mediante la técnica ERIC-PCR.

inoculantes experimentales en una localidad, para la que se seleccionó INIA La Estanzuela. En otros sitios de interés porque en ellos se usa Lotus en las praderas, la competitividad fue evaluada como se describe en el apartado 7, a través del uso de gen reportero *gusA*. En este sentido, se debe considerar que las evaluaciones de competencia con *gusA*, a diferencia de las realizadas mediante el uso de perfiles genómicos, permite establecer los nódulos ocupados por la cepa marcada (inoculante comercial en nuestro caso) de los ocupados por las cepas nativas, mientras que los perfiles genómicos permiten además establecer la diversidad de cepas e identificar aquellas que son más frecuentes. También el uso de cepas marcadas, modificadas genéticamente, implica que no se puede realizar en condiciones de campo, y en laboratorio se debe tener un control estricto del material microbiológico y suelo con el que se trabaja.

### 6. EVALUACIÓN DE LOS INOCULANTES EN CAMPO

Los inoculantes experimentales, LuP13 y U526, preparados según la metodología de producción de la empresa CALISTER S.A., se evaluaron en el Campo de la Estación Experimental INIA La Estanzuela, con el cultivar LE306 como huésped. Las semillas inoculadas, al igual que un testigo sin inocular, se sembraron en los meses de marzo, abril y mayo de 2011, a una densidad de 5 kg/ha.

#### 6.1. Implantación

La densidad de plantas, se evaluó a los 45 días, en cada lote de siembra experimental correspondientes a marzo, abril y mayo, contando las plantas presentes por metro lineal, en cada parcela.

En el ensayo correspondiente a la siembra de marzo, el promedio de plantas por metro lineal fue 7, con un coeficiente de variación (CV) de 45 %, y no se detectaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos. En la siembra correspondiente al mes de abril, el promedio de plantas por metro lineal fue 9, con un CV de 49 %, sin diferencias entre los tratamientos, En la siembra de mayo,

considerada tardía, el promedio de plantas por metro lineal fue 2, con un CV de 25 %, sin diferencias entre tratamientos.

El bajo número de plantas en la siembra de tardía (mayo), con respecto a la época habitual de siembra (marzo y abril), se debió a las bajas temperaturas del suelo en ese mes, 15 °C promedio (Calistro, 2011). Estos resultados, coinciden con los obtenidos en el ensayo de nodulación *in vitro*, a 10 °C, donde hubo baja nodulación y menor desarrollo de la planta (Figura 14). De esta forma, la siembra tardía de *L. uliginosus* no es recomendada debido a que a finales de otoño la temperatura no contribuye con el adecuado desarrollo de la planta, que se realizaría en buena parte en la entrada de invierno (Ayala *et al.*, 2003), cuando las bajas temperaturas del suelo limitan su crecimiento y rendimiento forrajero.

### 6.2. Eficiencia simbiótica y ocupación de nódulos

Para determinar la eficiencia simbiótica y ocupación de nódulos por los inoculantes experimentales, se colectaron plantas a los 60 días después de la siembra, de cada siembra (marzo, abril y mayo), de las parcelas inoculadas con las cepas LuP13 y U526, y del testigo sin inocular. En las raíces se cuantificó el número de nódulos y mediante la generación de perfiles genómicos BOX-PCR se determinó el porcentaje de ocupación por las cepas usadas como inoculantes respecto a las cepas nativas.

En la siembra de marzo, cuando se analizó el número de nódulos presentes en las raíces de las plantas, el tratamiento inoculado con la cepa comercial tenía 25 nódulos en promedio, mientras que en los tratamientos inoculados con LuP13 y el testigo sin inocular, 8 y 5 nódulos respectivamente (Figura 19). Cuando se analizó el porcentaje de plantas noduladas, en el tratamiento inoculado con U526 el 71 % de las plantas presentaban al menos un nódulo, mientras que en los tratamientos inoculados con LuP13 y el testigo sin inocular, la proporción de nodulación fue de 36 y 22 % respectivamente (Figura 20). Sin embargo, la eficiencia simbiótica, evaluada mediante el peso seco de la parte aérea, fue igual en los pares simbióticos, inclusive en el control sin inocular (Figura 21).

La igualdad en la producción de biomasa en todos los tratamientos, a pesar que el tratamiento con la cepa U526 indujo más nódulos, posiblemente sea consecuencia de que el nitrógeno combinado en el suelo (Cuadro 15) suplió las necesidades de este macroelemento para esta etapa de crecimiento de la planta. Después de 90 días, se observó diferencia visual entre los tratamientos, manifestado por la coloración amarillenta en los tratamientos inoculados con LuP13 y el testigo sin inocular, característico de déficit de nitrógeno (Agrios, 1998). En el tratamiento inoculado con la cepa comercial, las plantas presentaban color verde intenso, característico de en buen estado nutricional.

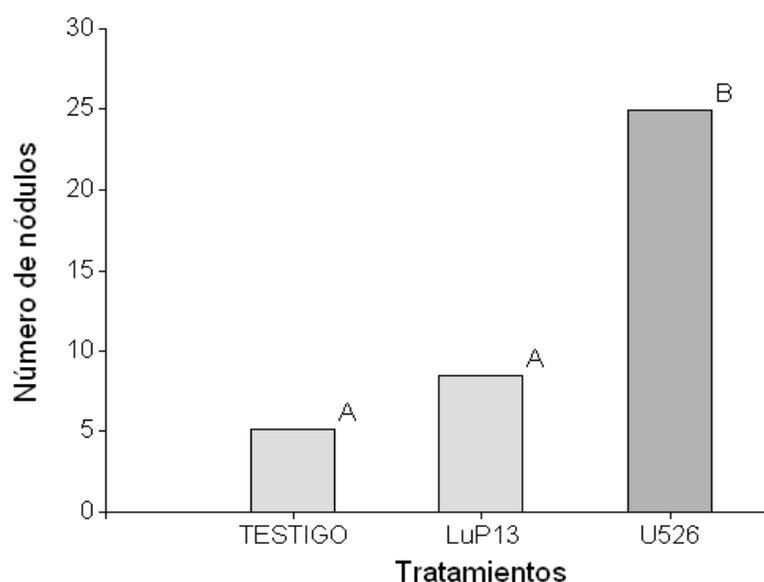
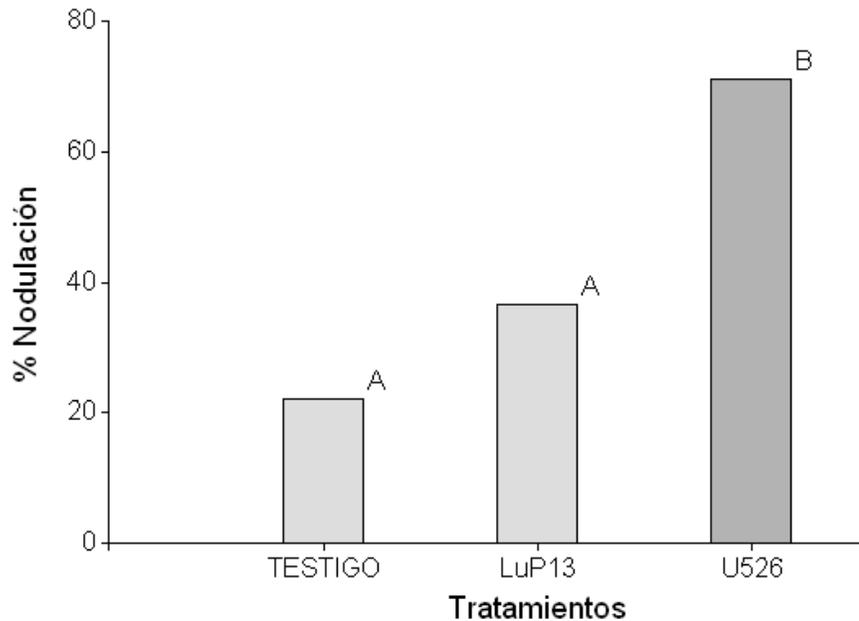
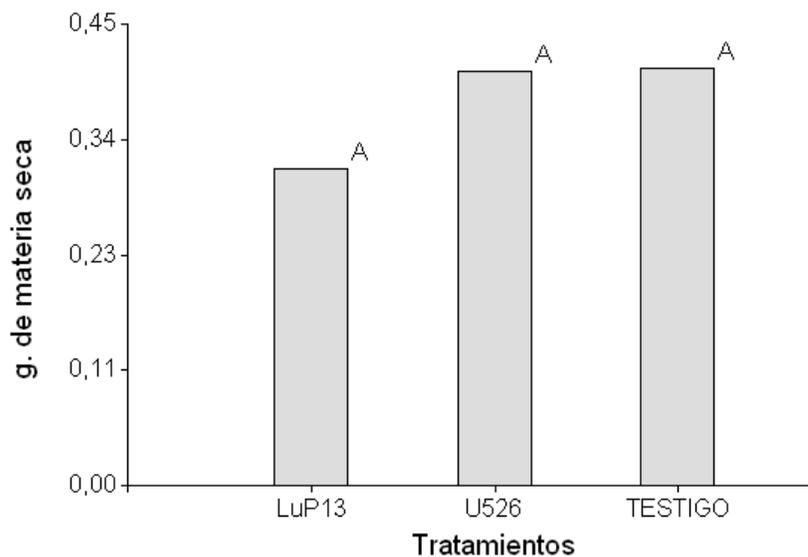


Figura 19. Número de nódulos inducidos en raíces de plantas de *L. uliginosus* inoculadas con las cepas U526 y LuP13, y el testigo sin inocular. Los valores son la media de nódulos presentes en 30 plantas por parcela a los 60 días después de la siembra de marzo. Las diferentes letras indican diferencias significativas (Test de Tukey  $p < 0.05$ ).



**Figura 20.** Porcentaje de nodulación de plantas de *L. uliginosus* inoculadas con las cepas U526, LuP13, y el testigo sin inocular. Los valores corresponden a la media del porcentaje de plantas noduladas a los 60 días después de la siembra de marzo. Las diferentes letras indican diferencias significativas (Test de Tukey  $p < 0.05$ ).

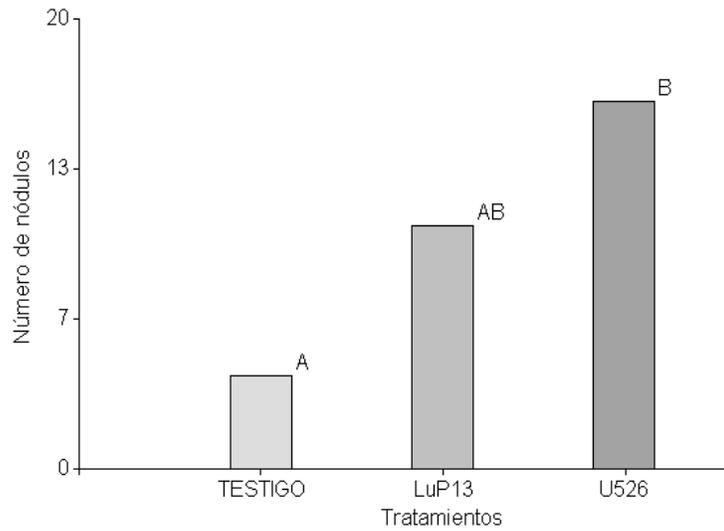
En la siembra del mes de abril, el tratamiento con la cepa U526 indujo más nódulos que el testigo sin inocular, pero no se diferenció del tratamiento LuP13 (Figura 22). Sin embargo, cuando se determinó la proporción de plantas noduladas, el tratamiento con la cepa U526, con 71 % de nodulación, se diferenció del tratamiento LuP13 con 39 %, y también del testigo sin inocular con 22 % (Figura 23). De igual forma, se determinó la superioridad de la cepa U526, sobre los tratamientos con las cepas LuP13 y el testigo sin inocular, cuando se evaluó la eficiencia simbiótica, medida como la materia seca de la parte aérea (Figura 24).



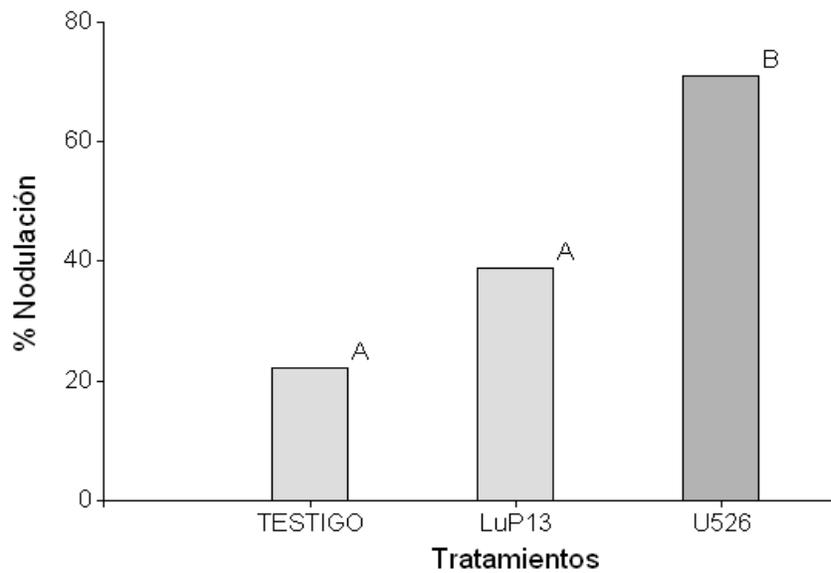
**Figura 21.** Biomasa producida por la parte aérea de *L. uliginosus* en simbiosis con el inoculante comercial, *Bradyrhizobium* sp cepa U526, y la cepa nativa LuP13, y el control sin inocular. La biomasa de la parte aérea se expresa como peso seco en g/planta, a los 60 días. Las diferentes letras indican diferencias significativas (Test de Tukey  $p < 0,05$ ).

**Cuadro 15.** Análisis de suelo del campo experimental INIA-La Estanzuela. La composición se expresa como N (nitrógeno), N-NO<sub>3</sub> (nitrato), P (fósforo), Ca (calcio), K (potasio) y A.Tit (acidez titulable).

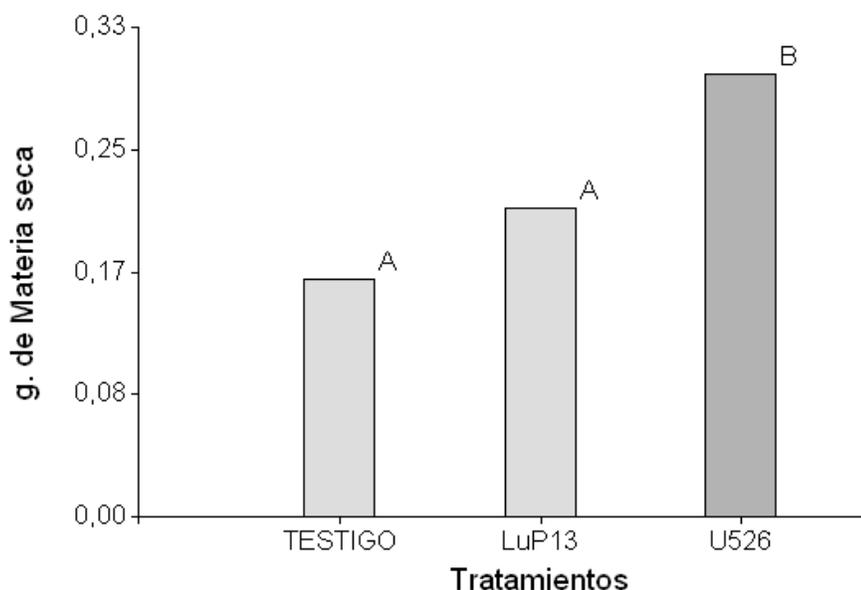
pH	N	N-NO <sub>3</sub>	P Bray I	Ca	K	A.Tit
(H <sub>2</sub> O)	%	µg N/g	µg P/g	meq/100g	meq/100g	meq/100g
5,4	0,16	26,8	7,3	8,3	1,33	6,4



**Figura 22.** Número de nódulos inducidos en raíces de plantas de *L. uliginosus* inoculadas con las cepas U526 y LuP13, y el testigo sin inocular. Los valores son la media de los nódulos presentes por parcela a los 60 días después de la siembra de abril. Las diferentes letras indican diferencias significativas (Test de Tukey  $p < 0.05$ ).



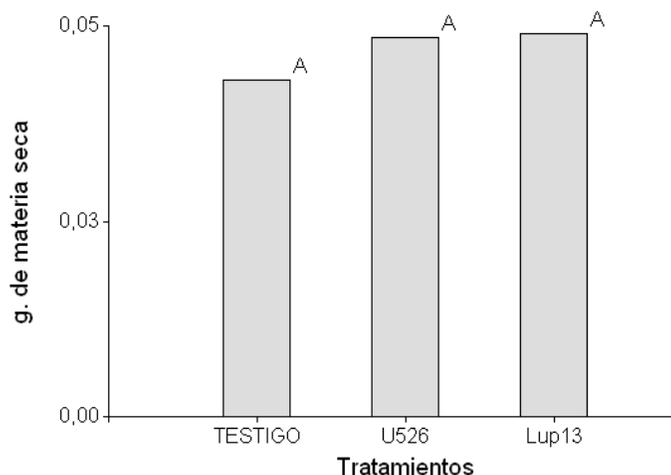
**Figura 23.** Porcentaje de nodulación de plantas de *L. uliginosus* inoculadas con las cepas U526, LuP13, y el testigo sin inocular. Los valores son la media del porcentaje de plantas noduladas a los 60 días después de la siembra de abril. Las diferentes letras indican diferencias significativas (Test de Tukey  $p < 0.05$ ).



**Figura 24.** Biomasa aérea producida por *L. uliginosus* en simbiosis con las cepas U526, inoculante comercial para 'Grasslands Maku', y LuP13, cepa nativa, y el control sin inocular. La biomasa se expresa como peso seco de la parte aérea en g/planta, a los 60 días. Las diferentes letras indican diferencias significativas (Test de Tukey  $p < 0,05$ ).

Por otro lado, en la siembra tardía, correspondiente a la realizada en el mes de mayo, las plantas o estaban noduladas en ninguno de los tratamientos. La ausencia de nodulación en campo en esta condición, al igual que los resultados de nodulación obtenidos *in vitro* (Cuadro 11), evidencian que temperaturas inferiores a 15 °C inhiben la nodulación, de igual forma que la producción forrajera, ya que la biomasa aérea obtenida en la siembra de mayo fue inferior a la producida por las plantas sembradas en marzo y abril (Figuras 25, 21 y 23, respectivamente).

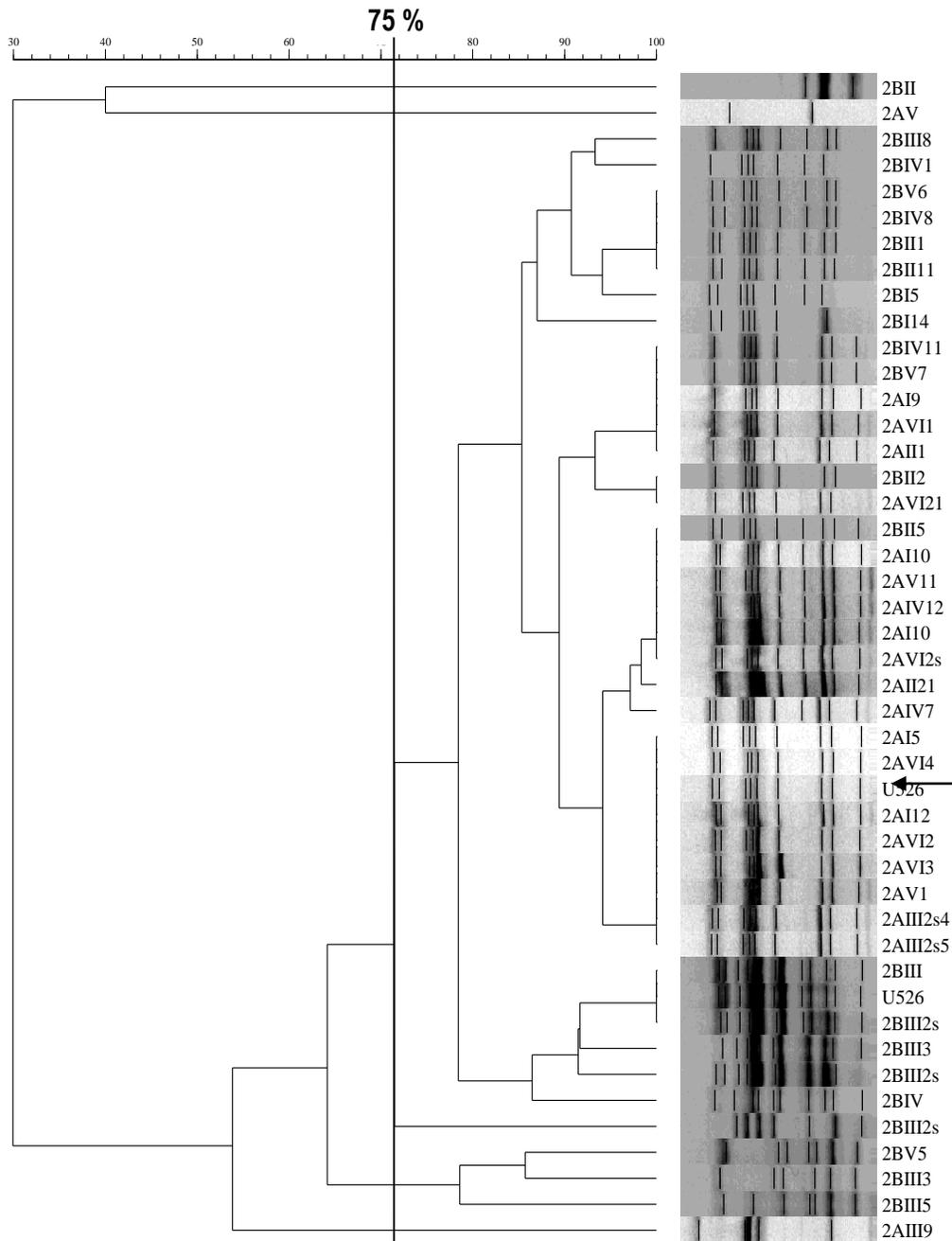
La ocupación de nódulos por las cepas usadas como inoculantes en relación a las cepas nativas se realizó a partir de los perfiles genómicos generados por BOX-PCR, y se consideraron cepas iguales aquellas con un 75% de similitud. De los nódulos ocupados en la siembra de marzo y abril se evidenció que el inoculante comercial para 'Grasslands Maku', cepa U526, ocupó el 84 % de los nódulos analizados, lo que muestra que es más competitiva que las cepas nativas (Figura 26). De estos resultados, se puede inferir que la cepa usada como inoculante comercial también tiene habilidad en el nuevo cultivar LE306, y confirma el buen desempeño de la misma, observado también en ensayos de eficiencia simbiótica en condiciones controladas (Figura 12 y 13).



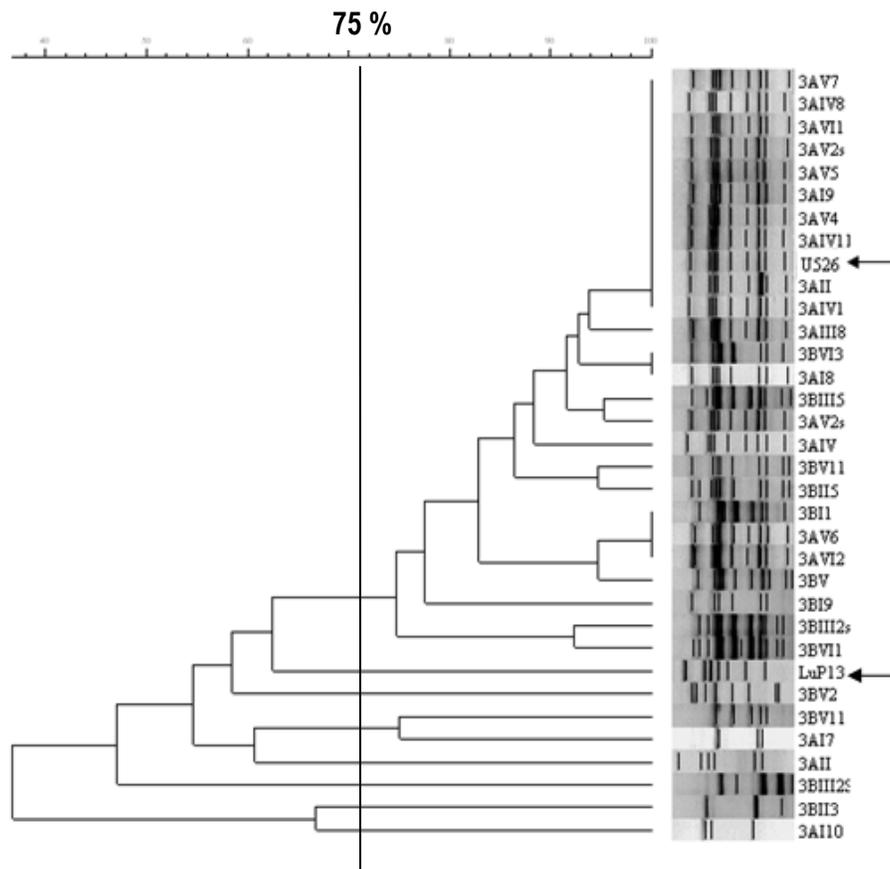
**Figura 25.** Biomasa producida por la parte aérea de plantas de *L. uliginosus* sembradas en el mes de mayo, que no nodularon. Los tratamientos corresponden a plantas inoculadas con las cepas U526, inoculante comercial para 'Grasslands Maku', y LuP13, cepa nativa y el control sin inocular (testigo). La biomasa se expresa como peso seco de la parte aérea en g/planta, a los 60 días. Las diferentes letras indican diferencias significativas (Test de Tukey  $p < 0,05$ ).

Por otro lado, de los nódulos provenientes del tratamiento inoculado con la cepa LuP13, no se aisló esa cepa (Figura 27). De esta forma, la cepa LuP13, eficiente en laboratorio y con habilidad industrial, no es competitiva en campo. Para determinar por qué falló esta cepa en el establecimiento de la simbiosis es necesario hacer más ensayos en campo relacionados a su competencia saprofítica. Por otro lado los perfiles de los aislados de estos nódulos fueron iguales a los de la cepa comercial U526 (Figura 27). También se observaron los mismos perfiles de la cepa U526 en el testigo, correspondiente al tratamiento sin inocular (Figura 28).

La ocupación de nódulos por la cepa comercial, de 78 %, en los nódulos analizados del tratamiento inoculado con LuP13, y 96 %, en los nódulos analizados del testigo sin inocular, puede ser debido a siembras anteriores de *L. uliginosus* 'Grasslands Maku' en el campo experimental, inoculado con la cepa comercial U526. Los rizobios, aún en ausencia de su leguminosa huésped, son habitantes normales de los suelos y en las chacras se pueden encontrar poblaciones nativas e introducidas producto de inoculaciones de siembras previas (Dutto, 2002).



**Figura 26.** Dendrograma construido a partir de los perfiles BOX de 45 aislados, procedentes de lotes de siembra de marzo y abril, inoculados con la cepa comercial (U526). El 84 % de los aislados pertenece al inoculante comercial, con una similitud igual o mayor a 75 %. Se usó el coeficiente de similitud DICE y el método de agrupamiento UPGMA.

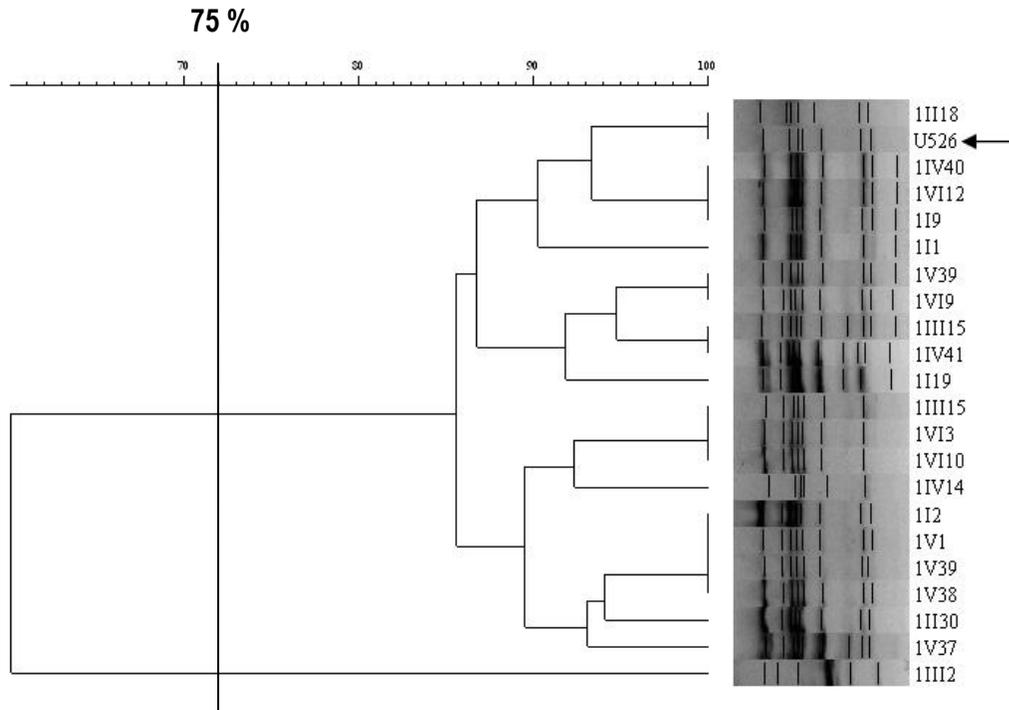


**Figura 27.** Dendrograma construido a partir de los perfiles BOX de 34 aislados, procedentes de lotes de siembra de marzo y abril, inoculados con de la cepa experimental LuP13. Se incluyó el inoculante comercial (U526). Se identificaron 10 perfiles diferentes con una similitud igual o mayor a 75 %. Se usó el coeficiente de similitud DICE y el método de agrupamiento UPGMA.

Se han comunicado situaciones similares en cuanto a la nodulación sin previa inoculación en especies del género *Lotus* en Uruguay. Para *L. corniculatus* y *L. tenuis* existe una población de rizobios nativos que es efectiva en estas especies, por lo que en casos de fallas en la inoculación o ausencia de esta práctica se forman nódulos efectivos con las poblaciones del suelo (Dutto, 2002).

También existen situaciones problema, cuando existen en el suelo poblaciones de rizobios parásitos que pueden afectar la implantación de una leguminosa (Monza *et al.*, 1992; Irisarri *et al.*, 1996). En este sentido, la siembra de *L. uliginosus* o *L. subbiflorus* sobre campos con historia de *L.*

*corniculatus* es contraproducente, ya que la cepa comercial de *L. corniculatus* forma nódulos parásitos en *L. subbiflorus*.



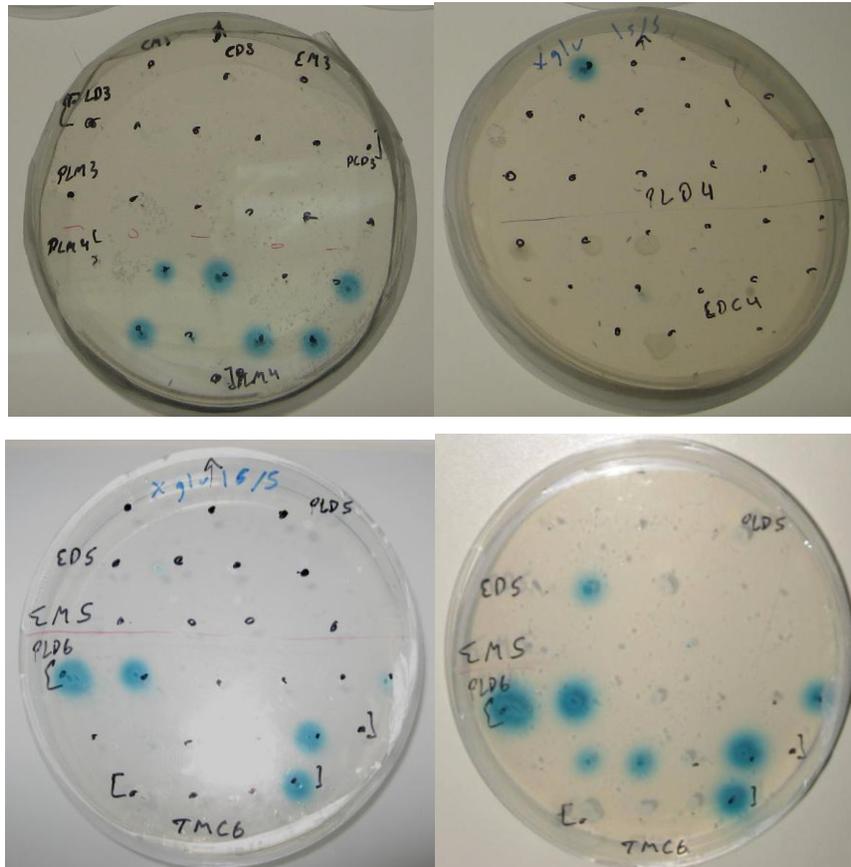
**Figura 28.** Dendrograma construido a partir de los perfiles BOX de 22 aislados, procedentes de lotes de siembra de marzo y abril, se incluyó la cepa experimental LuP13, y el inoculante comercial (U526). El 90 % de los nódulos estaba ocupado por U526, con una similitud igual o mayor a 75 %. Se usó el coeficiente de similitud DICE y el método de agrupamiento UPGMA.

## 7. COMPETITIVIDAD DEL INOCULANTE COMERCIAL CON CEPAS NATIVAS

### 7.1 Uso del gen reportero *gusA* en evaluación de competencia

Para evaluar la competencia de la cepa U526 de *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*), inoculante comercial de *Lotus uliginosus* 'Grasslands Maku', respecto a cepas nativas, se usaron suelos procedentes de 5 regiones de interés agrícola en Uruguay (Cuadro 9). Para analizar la ocupación de nódulos se marcó la cepa U526 con el gen *gusA* (U526::*gusA*) y como hospederos se usaron los cultivares LE306 y 'Grasslands Maku' de *L. uliginosus*.

El número de nódulos ocupados por U526::*gusA* se determinó a partir del conteo de colonias azules, obtenidas por aislamiento de bacterias desde nódulos individuales que se sembraron en placas con medio YEM (Cuadro 2) con el sustrato X-glu incorporado al mismo (Figura 29). Los nódulos se cosecharon a los 50 días después de la siembra.



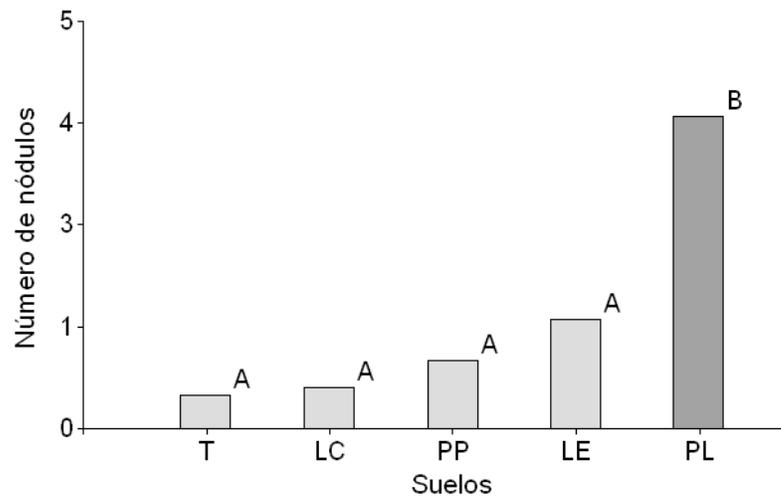
**Figura 29.** Aislamientos de nódulos ocupados por la cepa comercial marcada y cepa nativas. La coloración azul corresponde a aislados de nódulos ocupados por la cepa comercial marcada (U526::*gusA*) y las colonias blancas a las cepas nativas.

Si bien el promotor del gen reportero *gusA* se expresa tanto en vida libre como en simbiosis, dada la coloración granate intensa de los nódulos en esta especie se dificultó la visualización del color azul característico. Además, tampoco fue clara la aparición de esa coloración en condición simbiótica, por lo que se recurrió a realizar el aislamiento de bacterias desde los nódulos. Otro elemento que se tuvo en cuenta es que la expresión en nódulos decae con los días. Mrabet *et al.* (2005) marcaron con el

plásmido pCAM120, desarrollado por Wilson *et al.* (1995), una cepa de *Rizobium gallicum* con alta eficiencia simbiótica, para estudiar su competitividad con cepas nativas en *Phaseolus vulgaris*. A los 30 días de inoculadas las plantas, la cepa marcada ocupaba más del 90 % de los nódulos, mientras que a los 45 días la cantidad de nódulos ocupados no llegó al 20%, sin que hubiera habido un aumento de la nodulación de las cepas nativas. Sin embargo cuando se aislaron bacterias de esos nódulos y se sembraron en medio TY (Cuadro 4) con X-gluc incorporado, se observó actividad en la totalidad de los aislados. Otros autores han observado resultados similares en relación a la expresión en nódulo (Streit *et al.*, 1992; Wilson *et al.*, 1995). Una explicación podría estar relacionada con la limitación de oxígeno en nódulos viejos, o el enmascaramiento de la coloración azul por el aumento de la concentración de leghemoglobina (Mrabet *et al.*, 2005). Por estas razones en esta tesis se recurrió a realizar aislamientos desde nódulos, que si bien fue hecha a los 50 días, los resultados son fiables porque el tiempo de vida nodular no interfiere, en la medida que se cuantificaron los aislados y no la expresión dentro de los nódulos.

### **7.2 Nódulos inducidos en raíces de los cultivares LE306 y 'Grasslands Maku' en diferentes suelos**

Previo al estudio de la competitividad, se determinó en ambos cultivares de *L. uliginosus*, el número de nódulos total formados en los diferentes tipos de suelo, cuando se usó como inoculante U526::*gusA*. El tipo de suelo (Cuadro 9) tuvo incidencia sobre el número de nódulos inducidos en las raíces primarias (Figura 30), dado que en los cilindros con suelo de Paso de la Laguna (PL) se produjo el mayor número de nódulos por planta, respecto a los suelos ensayados procedentes de La Estanzuela (LE), La Carolina (LC), Tambores (T) y Palo e Pique (PP). Entre estos orígenes no hubo diferencia en el número de nódulos formados en las raíces primarias, que fue menos de 2 por planta (Figura 30).



**Figura 30.** Número de nódulos inducidos en raíces primarias de *L. uliginosus* en suelos de distintas localidades. Tambores (T), La Caronlina (LC), Palo e Pique (PP), La Estanzuela (LE) y Paso de la Laguna (PL). Los valores son la media de los nódulos presentes a los 50 días después de la siembra. Las diferentes letras indican diferencias significativas (Test de Duncan  $p < 0.05$ ).

Cuando se evaluó el efecto del suelo sobre los cultivares ‘Grasslands Maku’ y LE306, para la variable números de nódulos inducidos por las cepas nativas y por U526::*gusA* en raíces primarias, en todos los suelos se formó la misma cantidad nódulos por planta en ambos cultivares (Cuadro 16). A su vez, el número de nódulos en raíces de ‘Grasslands Maku’ en suelo de PL fue superior al alcanzado en los suelos LE, LC, T y PP, mientras no se detectaron diferencias entre suelos por LE306 (Cuadro 16).

En las raíces secundarias, el tratamiento con mayor número de nódulos fue el suelo de LE con el cultivar ‘Grasslands Maku’, con 10 nódulos por planta (Cuadro 16), lo que lo diferenció de PP con menos de 1 nódulo por planta (Cuadro 16). Sin embargo el número de nódulos inducidos en ‘Grasslands Maku’ y LE306 en los suelos de todas las otras localidades fueron iguales.

Cuando se analizó el número total de nódulos, correspondientes a raíces primarias y secundarias, se observó la mayor cantidad de éstos en el cultivar ‘Grasslands Maku’, en suelos de PL y LE, respecto a PP (Cuadro 16).

**Cuadro 16.** Nodulación de los cultivares LE306 y 'Grasslands Maku' de *L. uliginosus* en diferentes suelos. Los valores corresponden a la media de los nódulos por planta. Las letras significan las diferencias significativas (Test de Duncan  $p < 0.05$ ).

Tratamientos		número de nódulos plantas <sup>-1</sup>		
Suelo	Cultivar	Raíz primaria	Raíz secundaria	Total
La Estanzuela (LE)	LE306	2.0 a	2.3 ab	4.3 ab
	Maku	0.7 a	10 b	10.7 b
La Carolina (LC)	LE306	0.5 a	3.8 ab	4.3 ab
	Maku	0.5 a	6.7 ab	7.2 ab
Tambores (T)	LE306	0.3 a	3.0 ab	3.3 ab
	Maku	0.5 a	4.2 ab	4.7 ab
Palo e Pique (PP)	LE306	1.2 a	7.3 ab	8.5 ab
	Maku	0.5 a	0.7 a	1.2 a
Paso de la Laguna (PL)	LE306	3.0 ab	6.5 ab	9.5 ab
	Maku	4.7 b	7.3 ab	12.0 b

### 7.3 Competencia del inoculante comercial y cepas nativas presentes en distintos suelos

En la evaluación de la competencia entre U526::*gusA* y las cepas nativas en los diferentes suelos y en los 2 cultivares, se encontró que en las raíces primarias del cultivar 'Grasslands Maku' presentaron mayor ocupación por U526::*gusA* en los suelos de PL y T, con 67 % de nódulos ocupados, respecto a los otros suelos y también respecto al cultivar LE306 tratamientos (Cuadro 17). En los tratamientos con LE306 en suelos de T y con 'Grasslands Maku' en suelos de LC, no se observó ocupación de nódulos por U526::*gusA* (Cuadro 17). En raíces secundarias, la ocupación fue inferior; el cultivar LE306 en el suelo de PL presentó 25% de nódulos ocupados por U526::*gusA* y se diferenció de los tratamientos con LE306 en los suelos de PP y LE, con 16 y 14% respectivamente, seguido de los tratamientos con 'Grasslands Maku' en los suelos de PL y LE, con 7 y 5% respectivamente. En los suelos de T y LC no hubo ocupación de nódulos por U526::*gusA* en ambos cultivares, al igual que lo ocurrido con el cultivar 'Grasslands Maku' en el suelo de PP (Cuadro 17). En los nódulos totales, la ocupación por U526::*gusA* en el cultivar LE306 en PL, con 35% de nódulos ocupados, se diferenció, del cultivar

'Grasslands Maku' en el mismo suelo, con 21% de ocupación. De igual forma LE306 en PL se diferenció de los restantes tratamientos (Cuadro 17).

**Cuadro 17.** Ocupación de nódulos por U526::gusA en LE306 y 'Grasslands Maku' en diferentes suelos. La eficiencia se expresa como la media del número de nódulos ocupados por U526::gusA sobre el total de nódulos. Las letras significan las diferencias significativas (Test de Duncan  $p < 0,05$ ).

Tratamientos		Eficiencia en la ocupación por U526::gusA		
Suelo	Cultivar	Raíz primaria	Raíz secundaria	Total
La Estanzuela (LE)	LE306	0.25 a	0.14 bc	0.19 cd
	Maku	0.50 cd	0.05 a	0.12 abc
La Carolina (LC)	LE306	0.33 ab	0	0.04 a
	Maku	0	0	0
Tambores (T)	LE306	0	0	0
	Maku	0.67 f	0	0.07 ab
Palo e Pique (PP)	LE306	0.43 bc	0.16 c	0.20 cd
	Maku	0.33 ab	0	0.14 bcd
Paso de la Laguna (PL)	LE306	0.56 de	0.25 d	0.35 e
	Maku	0.67 f	0.07 ab	0.21 d

Las cepas usadas como inoculante, generalmente introducidas, compiten por los nutrientes con poblaciones de cepas nativas que viven en la rizosfera, y que están adaptadas a ese ambiente (Toro, 1996). La capacidad de colonizar la raíz y formar nódulos depende de la competitividad de las bacterias, pero se ha demostrado que las cepas más competitivas recuperadas de los nódulos resultaron ser las menos eficientes (Amarger y Lobreau, 1982; Castro *et al.*, 2000).

Antes de la inoculación con cepas de rizobios eficientes, a gran escala, es necesario estudiar la competitividad entre el inoculante y las cepas nativas por la leguminosa, ya que puede ser el factor determinante en el éxito de la inoculación. En este sentido, se puede evaluar la competitividad, mediante el uso de genes reporteros, ya que es una técnica simple, rápida y que permite la prospección de un alto número de nódulos, ya que se usa el sistema entero (Streit *et al.*, 1992; Wilson *et al.*, 1992), es decir se tiñe el nódulo sin necesidad de recurrir al aislamiento de bacterias, extracción y

amplificación de ADN. Además del trabajo de Mrabet *et al.* (2005), que usaron una cepa de *R. gallicum* marcada con el plásmido pCAM120 (Wilson *et al.*, 1995), para determinar su competitividad con cepas nativas en *Phaseolus vulgaris*, Shamseldín (2006) evaluó, en condiciones de acidez y altas temperaturas, la competencia también en *P. vulgaris* entre cepas de *R. etli* y una de *R. tropici* marcada con *gusA*. En este trabajo se pudo determinar la competencia entre cepas usando esta metodología.

**V. BIBLIOGRAFÍA**

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

Agrios G. 1998. *Fitopatología*. 3° edición, editorial Limusa. México.

Alberton O., Kaschuk G. and Hungria M. 2006. Sampling effects on the assessment of genetic diversity of rhizobia associated with soybean and common bean. *Soil Biology and Biochemistry* 38: 1298-1307.

Alexandre A., Laranjo M., Young J.P.W. and Oliveira S. 2008. *dnaJ* is a useful phylogenetic marker for alphaproteobacteria. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*. 58:2839–2849.

Amarger N. and Lobreau J.P. 1982. Quantitative study of nodulation competitiveness in *Rhizobium* strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 44: 583–588.

Ayala W., Bermudez R. y Ferres S. 2003. *Lotus* MAKU: en los 90 una promesa hoy una firme realidad. *Revista plan Agropecuario de Uruguay*.

Barcellos, F.G., Menna, P., Batista, I.S.S., and Hungria, M. 2007. Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strain to indigenous *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian savannah soil. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 2635-2643.

Batista L. 2009. Estudio de la diversidad y eficiencia simbiótica de rizobios aislados de nódulos de *Lotus uliginosus*. Tesis de grado. Facultad de Ciencias. Universidad de la República. Uruguay.

Batista I.S.S., Hungria M., Barcellos F.G., Ferreira M.C. and Mendes, L.C. 2007. Variability in *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* seven years after introduction of both the exotic microsymbiont and the soybean host in a cerrado soil. *Microbial Ecology* 53: 270-284.

Bedmar E.J., Robles E.F. and Delgado, M.J., 2005. The complete denitrification pathway of the symbiotic, nitrogen-fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochemical Society Transactions*. 33: 141-144.

Beringer J.E. 1974. Factor de transferencia en *Rhizobium leguminosaron*. *General Microbiology*. 84:188-198.

Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-54.

Bueno E. 2008. Desnitrificación en *Bradyrhizobium japonicum*. Implicaciones de las proteínas FIXK<sub>2</sub> y NIFA. Tesis doctoral. Universidad de Granada. España.

Calistro T. 2010. Banco de datos agroclimáticos del INIA la Estanzuela. Uruguay. Consulta 11 de agosto de 2010. Disponible en <http://www.inia.org.uy/online/site/69264611.php>.

Camargo D. 2007. Efecto de la inoculación con rizobios en el crecimiento de *Phaseolus vulgaris L.* Tesis de grado. Universidad del Táchira. Venezuela.

Campillo R., Urquiaga S. y Pino I. 2002. Estimación de la fijación biológica de nitrógeno en trébol blanco mediante la metodología del <sup>15</sup>N. *Agricultura Técnica*. 2:25-34.

Castro S., Carrera I. and Martínez-Drets G. 2000. Methods to evaluate nodulation competitiveness between *Sinorhizobium meliloti* strains using melanin production as a marker. *Journal of Microbiological Methods*. 41:173–17.

Christensen S. and Tiedje J.M. 1988. Sub-parts-per-billion nitrate method: use of an N<sub>2</sub>O producing denitrifier to convert NO<sub>3</sub> or 15 NO<sub>3</sub> to N<sub>2</sub>O. *Applied and Environmental Microbiology*. 54:1409–1413.

Corvalán D., Dubois M., Medana M., Peticari A., Racca R. y Ruiz O. 2007. Situación actual y perspectivas del mercado de semillas y biofertilizantes en la Argentina. *En: Biofertilizantes en Iberoamerica una visión técnica, científica y empresarial.* Izaguirre-Mayoral M.L., Labandera C., y Sanjuán J (eds). Red iberoamericana de biofertilizantes microbianos para la agricultura.

Cubo T.M., Buendia-Claveria A.M., Beringer J.E. and Ruiz-Sainz J.E. 1988. Melanin production by *Rhizobium* strains. *Applied and Environmental Microbiology.* 58:2180–2187.

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.* 58:2180-2187.

Delgado M., Casella S. and Bedmar E. 2007. Denitrification in rhizobia – Legume Symbiosis. *Biology of the Nitrogen Cycle.*

Dénarié J., Debelle F. and Promé, J.C. 1996. Rhizobium lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: Signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annual Review of Biochemistry.* 65:503-535.

Díaz P., Borsani O. y Monza J. 2005. *Lotus japonicus* related species and their agronomi importance. *En: Lotus Handbook Márquez A. J. (Ed). Springer-Verlag, Dordrecht.*

Dutto P. 2002. Recomendaciones para situaciones con problema en la inoculación de leguminosas. *Revista Plan Agropecuario de Uruguay*

Duzan H.M., Zhou X., Souleimanov A. and Smith D.L. 2004. Perception of *Bradyrhizobium japonicum* Nod factor by soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] root hairs under abiotic stress conditions. *Journal of Experimental Botany.* 55: 2641–2646.

Estrella M., Muñoz S., Soto M., Ruiz O., and Sanjuan, J. 2009. Genetic diversity and host range of rhizobia nodulating *Lotus tenuis* in typical soils of the Salado River Basin (Argentina). *Applied and Environmental Microbiology*. 75: 1088-1098.

Fernandes M.F., Fernandes R.P.M. and Hungria, M. 2003. Caracterizacao genetica de riz6bios nativos dos tabuleiros costeiros eficientes em culturas do guandu e caupi. *Pesquisa Agropecudria Brasileira* 38: 911-920.

Ferreira, M.C. and Hungria, M. 2002. Recovery of soybean inoculant strains from uncropped soils in Brazil. *Field Crops Research* 79: 139-152.

Fillat F. y Puppo D. 1994. Evaluación bioquímica y genética de aislamientos de rizobios que nodulan *Lotus subbiflorus*. Tesis de grado. Facultad de Agronomía. Universidad de la República. Uruguay.

Fuentes L., Tapia A., Jimenez T., Mascarua M., Santoyo Y., Caso L., Hilario T., Romero H., Cajica M., León B; Rosales P. y Castillo M. 2003. Bacterias acéticas: diversidad e interacción con las plantas (En línea). Disponible en <http://www.elementos.buap.mx/num49/pdf/47.pdf>.

Galli-Terasawa L.V., Glienke-Blanco C. and Hungria M. 2003. Diversity of a soybean rhizobial population adapted to a Cerrados soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 19: 933-939.

Garrity G.M. and Holt J.G. 2001. The road map to the manual. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Garrity, G.M., Boone, D.R., and Castenholz, R.W. (Eds). Springer-Verlag, New York.

Gaunt M.W., Turner S.L., Rigottier-Gois L., Lloyd-Macgilp S.A. and Young J.P.W. 2001. Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*. 51:2037–2048.

Germano M.G., Menna P., Mostasso F.L. and Hungria M. 2006. RFLP analysis of the rRNA operon of a Brazilian collection of bradyrhizobial strains from 33 legumes species. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*. 56:217-229.

Gevers D., Cohan F.M., Lawrence J.G., Spratt B.G., Coenye T., Feil E.J, Stackebrandt E., de Peer Y.V., Vandamme P., Thompson F.L. and Swings J. 2005. Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Reviews Microbiology*. 3:733-739.

Guillen R. 2007. Consideraciones en la producción de semillasde *Lotus* spp.. *Lotus newsletter*. 37: 47-51.

Handberg K. and Stougaard J. 1992. *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *The Plant Journal*. 2:487-496.

Hardarson G., Golbs M., Danso S.K.A. 1989. Nitrogen fixation in soybean (*Glycine max* L . *Merrill*) as affected by nodulation patterns. *Soil Biology Biochemistry*. 21:783-787.

Hernandez S., Rebuffo M. y Lavandera C. 2005. Evaluación de la interacción Genotipo Ambiente en *Lotus uliginosus* en cilindros de suelo. *Lotus Newsletters*. 35:120-130.

Hungria M., Chueire L.M.O., Megias M., Lamrabet Y., Probanza A., Gutierrez-Mafiero F.I. and Campo R.J. 2006. Genetic diversity of indigenous tropical fast-growing rhizobia isolated from soybean nodules. *Plant and Soil*. 288: 343-356.

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

Jander J. and Fahraus G. 1971. Adaptation of rhizobium to subarctic environment in Scandinavia. *Plan and Soil*. 35(1): 129-137.

Jensen H. 1942. Nitrogen fixation in leguminous plants. General characters of root-nodule bacteria isolated from species of *Medicago* and *Trifolium* in Australia. Proceedings of the Linnean Society of New South Wales. 66:98-108.

Jordan D.C. 1982. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. International Journal of Systematic Bacteriology. 32:136–139.

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

Krishnan H. and Bennett J. 2006. Rhizobium-legume symbioses: molecular signals elaborated by rhizobia that are important for nodulation. In: S.S. Gnanamanickam (Ed.). Plant-Associated Bacteria.

Labandera C. 2003. Soja: inoculantes e inoculación. Revista Plan Agropecuario de Uruguay.

Labandera C. 2007. Actividades en fijación biológica de nitrógeno: situación actual y perspectivas en Uruguay. En: Biofertilizantes en Iberoamerica una visión técnica, científica y empresarial. Izaguirre-Mayoral M.L., Labandera C., y Sanjuán J (Eds). Red Iberoamericana de Biofertilizantes Microbianos para la Agricultura.

Labandera C. and Vincent J.M. 1975a. Competition between an introduced strain and native Uruguayan strain of *Rhizobium trifoli*. Plant and Soil. 42:327-347.

Labandera C. and Vincent J.M. 1975b. Loss of symbiotic capacity in commercially useful strains of *Rhizobium trifolii*. Journal of Applied Bacteriology. 39:209-211.

Labandera C., Jaureana M. y Biassini G. 2005. Inoculación de *Lotus* MAKU. Revista Plan Agropecuario de Uruguay.

Labandera C., y Mayans M. 2006. Control de inoculantes en Uruguay. Dpto. de Microbiología de Suelos. Dirección General de Recursos Naturales. En: Memorias Curso Internacional de Producción de Biofertilizantes desde laboratorio hasta la aplicación en campo. Universidad Nacional. Bogotá, Colombia.

Labandera C., y Vincent J.M. 1972. Importancia del mantenimiento, control periódico y selección cuantitativa de las cepas de rizobios usadas en los inoculantes comerciales. VI Reunión Latinoamericana sobre *Rhizobium*.

Laguerre G., van Berkum P., Amarger N., and Prevost D. 1997. Genetic diversity of rhizobial symbionts isolated from legume species within the genera *Astragalus*, *Oxytropis*, and *Onobrychis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 4748-4758.

Lindemann W.C. and Ham G.E. 1979. Soybean plant growth, nodulation, and nitrogen fixation as affected by root temperature. *Soil Science Society of America Journal*. 43:1134–1137.

Liu Y., Wu L., Baddeley J. and Watson C. 2011. Models of biological nitrogen fixation of legumes. A review. *Agronomy for Sustainable Development*. 31:155–172.

Lorite M.J., Donate-Correa J., Del Arco-Aguilar M., Pérez Galdona R., Sanjuán J. and León- Barrios M. 2010a. Lotus endemic to the Canary Islands are nodulated by diverse and novel rhizobial species and symbiotypes. *Systematic and Applied Microbiology*. 33: 282-290.

Lorite M.J., Muñoz S., Olivares J., Soto M.J., and Sanjuán J. 2010b. Characterization of strains unlike *Mesorhizobium loti* that nodulate *Lotus* spp. in saline soils of Granada, Spain. *Applied and Environmental Microbiology*. 76:4019-4026.

Lorite M.J., Videira I., Muñoz S. and Sanjuán J. 2011. Phylogenetic relationship of *Lotus uliginosus* symbionts with bradyrhizobia nodulating genistoid legumes. *FEMS Microbiology Ecology*. 78:87-92.

Madigan M., Martiko J., y Parker, J. 2004. Brock, biología de los microorganismos 10<sup>a</sup> Ed. Madrid: Prentice Hall.

Mantilla R., García T., Espinel A. y Valenzuela E. 2004. Estandarización de tres sistemas de rep-PCR para la tipificación de *Klebsiella pneumoniae*. Revista Colombiana de Ciencias Químico farmacéuticas. 33 (1): 48-58.

Martens M., Dawyndt P., Coopman R., Gillis M. and Willems A. 2008. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology. 58:200–214.

Martens M., Delaere M., Coopman R., de Vos P., Gillis M. and Willems A. 2007. Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology. 57:489–503.

McKay I.A. and Djordjevic M.A. 1993. Production and excretion of nod metabolites by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* are disrupted by the same environmental factors that reduce nodulation in the field. Applied and Environmental Microbiology. 59:3385–3392.

Menna P., Pereira A.A., Bangel E.V. and Hungria M. 2009. Rep-PCR of tropical rhizobia for strain fingerprinting, biodiversity appraisal and as a taxonomic and phylogenetic tool. Symbiosis. 48:120–130.

Mesa S., Alche J., Bedmar E.M. and Delgado M. 2004. Expression of *nir*, *nor* and *nos* denitrification genes from *Bradyrhizobium japonicum* in soybean root nodules. Physiologia Plantarum. 120:205–211.

Miller J.H. 1972. Experiments in molecular genetics. Col Spring Harber Laboratory.

Montañez A., Danso S.K.A. and Hardarson G. 1995. The effect of temperature on nodulation and nitrogen fixation by five *Bradyrhizobium japonicum* strains. Applied Soil Ecology. 3:165-174.

Monza J. y Palacios J. 2004. Fijación biológica de nitrógeno en la simbiosis rizobio-leguminosa. En: El metabolismo del nitrógeno en las plantas. Monza, J., y Márquez, A. (Eds). Almuzara estudios, S.A.

Monza J., Fabiano E. and Arias A. 1992. Characterization of indigenous population of rhizobia nodulating *Lotus corniculatus*. Soil Biology Biochemistry. 24:241–247.

Monza J., Irisarri P. and Díaz P. 2006. Denitrification ability of rhizobial strains isolated from *Lotus sp.* Antonie Van Leeuwenhoek. 89:479–484.

Mostasso L., Mostasso F.L., Dias B.G., Vargas M.AT., and Hungria M. 2002. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. Field Crops Research. 73: 121-132.

Mrabet M., Mhamdi R,I., Tajini F., Tiwari R., Trabelsi M. and Elarbi M. 2005. Competitiveness and symbiotic effectiveness of a *R. gallicum* strain isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris*. European Journal of Agronomy. 22:209-216.

Oliva J. 2008. Mutualismo y patogénesis: Importancia de genes implicados en la virulencia de patogénesis para la simbiosis de *Rhizobium*-leguminosa. 2008. Tesis doctoral. Universidad de Granada. España.

Olivares P. 2011. Medida de la actividad nitrogenasa por reducción del acetileno a etileno (en línea). En: <http://www.eez.csic.es/~olivares/ciencia/fijacion/ara.html>.

Orivo R. y Temprano F. 1981. Proceso de fabricación de inoculantes contra la lucha biológica de *Agrobacterium tumefaciens*. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. España.

Pankhurst C., Macdonald P. and Reeves, J. 1986. Enhanced nitrogen fixation and competitiveness for nodulation of *Lotus pedunculatus*. Journal of General Microbiology. 132: 2321-2328.

Papadopoulos Y. and Kelman W. 1999. Traditional breeding of lotus species. American Society of Agronomy.

Parniske M. and Downie J. A. 2003. Locks, keys and symbioses. *Nature*. 425: 569-570.

Pinto F.G.S., Hungria M. and Mercante F.M. 2007. Polyphasic characterization of Brazilian *Rhizobium tropici* strains effective in fixing N<sub>2</sub> with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Soil Biology and Biochemistry*. 39: 1851-1864.

Punschke K. 2010. Colección Nacional de cepas de *Rhizobium* spp. Departamento de Microbiología de Suelos Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Montevideo, Uruguay.

Quiñones M., Coba T., Ruiz B., Ocho C., Garcia V., Cordero I., Nonnoi F., de Felipe M., Rincón N., Manrique E., Fernandez M., Herrera J. and Fuego J. 2011. Estrategias para mejorar la tolerancia a estreses abióticos de las simbiosis Rhizobium-Leguminosa. En: Fundamentos y aplicaciones agroambientales de las interacciones beneficiosas planta-microorganismo. Megias M., Rivilla R., Soto M.J., Delgado M.J., Gonzales E., Mateos P., León M., Gonzales B. and Bedmar E. (Eds). Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno. Pp 119-120

Racca R.W. y Collino D.J. 2006. Bases fisiológicas para el manejo de la fijación biológica del nitrógeno en soja. En: Memorias Curso Internacional de Producción de Biofertilizantes desde laboratorio hasta la aplicación en campo. Universidad Nacional. Bogotá, Colombia.

Ramirez M.E., Israel D.W. and Wollum A.G. 1998. Using spontaneous antibiotic-resistant mutants to assess competitiveness of bradyrhizobial inoculants for nodulation of soybean. *Canadian Journal of Microbiology*. 44: 753–758.

Rebah B., Prévost D., Yezza A. and Tyagi R. 2007. Agro-industrial waste materials and wastewater sludge for rhizobial inoculant production: A review. [Bioresource Technology](#). 99:3535-3546.

Rebuffo M., Zarza R., Borzani O., Casaretto M., Díaz P. y Monza J. 2007. Recursos genéticos de leguminosas forrajeras para sistema agro-pastoriles en Uruguay. *Lotus Newsletter*. 37:56.

Reuhs B.L., Stephens S.B., Geller D.P., Kim J.S., Glenn J., Przytycki J. and Ojanew-Reuhs T. 1999. Epitope identification for a panel of anti-*Sinorhizobium meliloti* monoclonal antibodies and application to the analysis of the K-antigen and lipopolysaccharides from bacteroids. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:5186–5191.

Ribeiro R.A., Barcellos F.G., Thompson F.L. and Hungria M. 2009. Multilocus sequence analysis of Brazilian Rhizobium strains microsymbionts of common beans (*Phaseolus vulgaris*) reveal unexpected taxonomic diversity. *Research in Microbiology*. 160:297–306.

Richardson A.C. and Syers J.K. 1985. Edaphic limitations and soil nutrient requirements of legume-based forage systems in temperate regions of New Zealand. In: *Forage Legumes for Energyefficient Animal Production*, USDA, Washington.

Rivas R., Martens M., de Lajudie P. and Willems A. 2009. Multilocus sequence analysis of the genus *Bradyrhizobium*. *Systematic and Applied Microbiology*. 32:101–110.

Rodríguez-Mendoza M. 1993. Asociación *Rhizobium* – Leguminosa. En: *Manual de Agromicrobiología*. Ferrera-Cerrato R., González M. y Rodríguez M. (Eds). Editorial Trillas. México.

Rojas F. 2008. Estandarización de un medio de cultivo complejo para la multiplicación de cepa C50 de *Rhizobium* sp. Tesis de grado. Universidad Javeriana. Colombia.

Roughly R.J. 1970. The influence of root temperature, *Rhizobium* strain and host selection on the structure and nitrogen-fixing efficiency of the root nodules of *Trifolium subterraneum*. *Annals of Botany*. 34: 631-646.

Sambrook J., Fritsch E., and Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2ª Ed.

Sameshima R., Isawa T., Sadowsky M., J, Hamada T., Kosai H., Shutsrirung A., Mitsui H. and Minamisawa K. 2003. Phylogeny and distribution of extra-slow-growing *Bradyrhizobium japonicum* harboring high copy numbers of RSalfa RSbeta and IS1631. *FEMS Microbiology Ecology*. 44:191–202.

Sanchez C. 2009. Producción de oxido nitroso en nódulos de soja. Implicación de la desnitrificación. Tesis doctoral. Universidad de Granada. España.

Santamaría M., Agius F., Monza J., Gutierrez-Navarro A-M. and Corzo J. 1999. Comparative performance of enterobacterial repetitive intragenic consensus-polymerase chain reaction and lipopolysaccharide electrophoresis for the identification of *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) strains. *FEMS Microbiology Ecology*. 28: 163-168.

Santos M.A., Vargas M.A.T. and Hungria M. 1999. Characterization of soybean bradyrhizobia strains adapted to the Brazilian cerrados region. *FEMS Microbiology Ecology* 30: 261-272.

Sarmiento N. 2006. Esquemas de producción de biofertilizantes. En: Memorias Curso Internacional de Producción de Biofertilizantes desde laboratorio hasta la aplicación en campo. Universidad Nacional. Bogotá, Colombia.

Schomberg H.H. and Weaver R.W. 1992. Nodulation, nitrogen fixation, and early growth of arrow leaf clover in response to root temperature and starter nitrogen. *Agronomy Journal*. 84: 1046–1050.

Sessitsch A., Wilson K.J., Akkermans A.D.L. and De-Vos W.M. 1996. Simultaneous detection of different *Rhizobium* strains marked with the *Escherichia coli gusA* gene or the *Pyrococcus furiosus CelB* gene. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 4191–4194.

Shamseldin A. 2007. Use of DNA marker to select well-adapted *Phaseolus*-symbionts strains under acid conditions and high temperature. *Biotechnology Letters*. 29:37–44.

Sotelo M., Irisarri P., Lorite M., Casaretto E., Rebuffo M., Sanjuan J. and Monza J. 2011. Diversity of rhizobia nodulating *Lotus corniculatus* grown in northern and southern regions of Uruguay. *Applied Soil Ecology*. 49:197–207.

Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G.M., Grimont P.A.D., Kampfer P., Maiden M.C.J., Nesme X., Rossello R., Swings J., Truper H.G., Vauterin L. and Whitman W.B. 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52:1043-1047.

Stephens J.H.G. and Rask H.M. 2000. Inoculant production and formulation. *Field Crops Research* 65: 249-258.

Stepkowski T., Czaplinska M., Miedzinska K. and Moulin L. 2003. The variable part of the *dnaK* gene as an alternative marker for phylogenetic studies of rhizobia and related alpha Proteobacteria. *Systematic and Applied Microbiology*. 26:483–494.

Stern M., Ames F., Smith N., Robinson E. and Higgins C. 1984. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. *Cell*. 37: 1015-1026.

Streit W., Kosch K. and Werner D. 1992. Nodulation competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* and *Rhizobium tropici* strains measured by glucuronidase (*gus*) gene fusion. *Biology and fertility of soils*. 14:140–144.

Tesfaye M., Petersen D.J., and Holl F.B. 1997. Comparison of partial 23S rDNA sequences from *Rhizobium* species. *Canadian Journal of Microbiology*. 43:526–533.

Toresani S., Bodrero M. and Enrico J.M. 2007. Comportamientos de inoculantes para soja en la zona sur de la provincia de Santa Fe. *Revista de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias*. 11: 35-44.

Tormo M. 2010. Lecciones de Botánica. Universidad de Extremadura (online). Disponible en [www.sib.gov.ar/taxonomia/genero/lotus](http://www.sib.gov.ar/taxonomia/genero/lotus).

Toro N. 1996. Nodulation competitiveness in the *Rhizobium*-legume symbiosis. World Journal Of Microbiology and Biotechnology. 12: 57-162.

Turco R.F., Thomas B., Man M. and David F.B. 1986. Effectiveness and competitiveness of spontaneous antibiotic-resistant mutant of *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium japonicum*. *Soil Boiological Biochemistry*.18: 259–262.

Turner S.L. and Young J.P.W. 2000. The glutamine synthetases of rhizobia: phylogenetics and evolutionary implications. *Molecular Biology and Evolution*. 17:309–319.

Valles-de-la-Mora B., Cadisch G. and Aluja-Shunemans A. 2003. Comparison of isotope methodologies to assess N<sub>2</sub> fixation and ITS fate in plants and soils. 2003. *Agrociencia*. 37: 117-128.

van Berkum P. and Fuhrmann J.J. 2000. Evolutionary relationships among the soybean bradyrhizobia reconstructed from 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequence divergence. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*. 50:2165–2172.

van Berkum P., Terefework Z., Paulin L., Suomalainen S. and Eardly BD. 2003. Discordant phylogenies within the *rrn* loci of rhizobia. *Journal Bacteriology*. 185:2988–2998.

Versalovic J., Koeuth T. and Lupski J. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*. 19:6823–6831.

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

Vinuesa P., Rademaker J.L.W., de Bruijn F.J. and Werner D. 1998. Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rRNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rRNA sequencing. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 2096-2104.

Vinuesa P., Rojas-Jimenez K., Contreras-Moreira B., Mahna S.K., Prasad B.N, Moe H., Selvaraju S.B, Thierfelder H. and Werner D. 2008. Multilocus sequence analysis for assessment of the biogeography and evolutionary genetics of four *Bradyrhizobium* species that nodulate soybeans on the Asiatic Continent. *Applied and Environmental Microbiology*. 74:6987–6996.

Vinuesa P., Silva C., Werner D. y Martínez-Romero E. 2005. Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and recombination in *Bradyrhizobium* species cohesion and delineation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 34:29–54.

Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A. and Lane D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal Bacteriology*. 173:697–703.

Whitehead D.C. 1995. Legumes: Biological Nitrogen Fixation and Interaction with Grasses. In: Whitehead D.C. (Ed.), *Grassland Nitrogen*. CAB International.

Willems A., Coopman R. and Gillis M. 2001. Comparison of sequence analysis of 16S–23S rDNA spacer regions, AFLP analysis and DNA-DNA hybridizations in *Bradyrhizobium*. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*. 51:623–632.

Wilson K., Sessitsch A., Corbo J., Giller K., Akkermans A. and Jefferson R. 1995.  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other Gram-negative bacteria. *Microbiology*. 141:1691-1705.

Woese C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*. 51: 221-271.

Woese C.R., Kandler O. and Wheelis M.L. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the Domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 87: 4576-4579.

Yoshinari T. and Knowles R. 1976. Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction by denitrifying bacteria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 69:705–710.

Zhang F. and Smith D.L. 1996. Inoculation of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) with genistein preincubated *Bradyrhizobium japonicum* or genistein directly into soil increases soybean protein and dry matter yield under short season conditions. *Plant Soil*. 179:233-241.

Zhang H., Charles T.C., Driscoll B.T., Prithviraj B. and Smith, D.L., 2003b. Low temperature tolerant *Bradyrhizobium japonicum* strains allowing improved soybean yield in short season areas. *European Journal of Agronomy*. 19:205-213.

Zhang H., Prithviraj B., Charles T.C., Driscoll B.T. and Smith D.L. 2003a. Low temperature tolerant *Bradyrhizobium japonicum* strains allowing improved nodulation and nitrogen fixation of soybean in a short season (cool spring) area. *European Journal Agronomy*. 19: 205-213.

