

Tesina para obtener el título de Licenciada en Bioquímica

Diversidad de rizobios aislados de *Desmodium incanum* en diferentes regiones del país

Catalina Telechea Gloodtdofsky

Tutora: Dra. Cecilia Taulé

Co-tutor: Dr. Ionel Hernández

Laboratorio de Interacción Planta Microorganismo, Departamento de
Bioquímica y Genómica Microbianas, Instituto de Investigaciones Biológicas
Clemente Estable

Tribunal: Dra. Gabriela Illarze y Msc. Matías Giménez

Montevideo, República Oriental del Uruguay, Abril 2026

Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República, por la formación y los conocimientos brindados a lo largo de la carrera.

A mis tutores, Cecilia Taulé e Ionel Hernández, por su permanente disponibilidad, orientación y apoyo durante la realización de esta tesis de grado.

Al Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, por brindarme la oportunidad de llevar a cabo este trabajo. En particular, a Raúl Platero, por abrirme las puertas del Instituto desde el año 2023.

A todas las personas con quienes compartí en el Instituto, por su buena disposición y por la ayuda brindada en todo momento.

A mi familia, por su apoyo incondicional a lo largo de toda la carrera.

A mis amigos y compañeros, por el acompañamiento y los buenos momentos compartidos.

Índice

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Campo natural del Uruguay y leguminosas nativas.....	2
1.2 <i>Desmodium incanum</i>	3
1.3 La planta y su microbioma asociado.....	4
1.4 Rizobios como componentes del microbioma vegetal.....	6
1.5 Antecedentes de la interacción rizobio- <i>Desmodium</i> en Uruguay.....	9
2. OBJETIVOS.....	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
3.1 Origen y descripción del material biológico.....	12
3.2 Aislamiento de simbiontes y construcción de la colección.....	13
3.3 Extracción de ADN genómico.....	14
3.4 Amplificación del gen <i>nifH</i> por PCR.....	15
3.5 Amplificación del gen <i>ARNr 16S</i> por PCR.....	15
3.6 Visualización de los productos de PCR, secuenciación y análisis.....	16
3.7 Ensayo de nodulación <i>in vitro</i> en plantas.....	17
4. RESULTADOS.....	19
4.1 Aislamiento de simbiontes.....	19
4.2 Caracterización molecular de los aislamientos.....	22
4.2.1 Amplificación del gen <i>nifH</i>	22
4.2.2 Secuenciación del gen <i>nifH</i>	23
4.3 Identificación de los aislamientos.....	24
4.4 Ensayo de nodulación <i>in vitro</i> en plantas.....	26
5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	30
6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	35
7. ANEXO.....	37
7.1 Medios de cultivo para bacterias.....	37
7.2 Medio de cultivo para plantas utilizado.....	38
7.3 Soluciones utilizadas.....	39
7.4 Marcador de peso molecular.....	39
7.5 Lista de los aislamientos de la colección detallando la morfología de las colonias en medio YMA.....	40
8. BIBLIOGRAFÍA.....	43

Índice de Tablas

Tabla 3.1. Origen geográfico de las muestras.....	12
Tabla 3.2. Secuencia nucleotídica de los cebadores <i>ARNr 16S</i> y <i>nifH</i> y tamaño del amplicón.....	15
Tabla 4.1. Número de aislamientos obtenidos por sitio.....	19
Tabla 4.2. Lista de los aislamientos de la colección detallando el sitio de la muestra y la presencia del gen <i>nifH</i>	20
Tabla 4.3. Mejor candidato obtenido en la comparación de las secuencias del gen <i>nifH</i>	23
Tabla 4.4. Mejor candidato obtenido en la comparación de las secuencias del gen <i>ARNr 16S</i>	25
Tabla 4.5 Porcentaje de plantas noduladas, porcentaje de nódulos efectivos y promedio de nódulos por planta de <i>Desmodium incanum</i>	29

Índice de Figuras

Figura 1.1. Morfología de <i>Desmodium incanum</i>	4
Figura 1.2. Etapas iniciales del establecimiento de la simbiosis rizobio–leguminosa.....	9
Figura 3.1. Ubicación geográfica del origen de las muestras.....	13
Figura 4.1. Etapas de la generación de la colección de aislamientos provenientes de nódulos de plantas de <i>Desmodium incanum</i> desinfectados en la superficie.....	19
Figura 4.2. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR correspondientes a la amplificación del gen <i>nifH</i>	23
Figura 4.3. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR correspondientes a la amplificación del gen <i>ARNr 16S</i>	25
Figura 4.4. Vista del crecimiento in vitro de plantas de <i>Desmodium incanum</i>	27
Figura 4.5. Cinética de nodulación de plantas de <i>Desmodium incanum</i> cultivadas en medio Jensen durante 35 días en condiciones in vitro.....	28

RESUMEN

El campo natural uruguayo constituye una de las ecorregiones de pastizales más relevantes a nivel global y uno de los ecosistemas con mayor diversidad vegetal. Además, más del 60 % de la ganadería en el territorio uruguayo se desarrolla sobre este tipo de sistemas. Las leguminosas nativas cumplen funciones ecosistémicas fundamentales, ya que contribuyen a la biodiversidad vegetal y mejoran la fertilidad del suelo. Esto se debe a su capacidad de establecer una simbiosis específica con bacterias del suelo llamadas rizobios, las cuales fijan el nitrógeno atmosférico dentro de nódulos radiculares que se forman como resultados de dicha interacción. *Desmodium incanum* es una leguminosa nativa que destaca por su adaptación a condiciones locales y potencial de integración en sistemas pastoriles. Sin embargo, en Uruguay los inoculantes comerciales a base de rizobios se han desarrollado principalmente para leguminosas introducidas. Son pocos los trabajos que se han realizado con *D. incanum* bioinsumos que permitan mejorar el establecimiento de esta leguminosa en el campo natural. El objetivo de este trabajo fue estudiar la diversidad de rizobios asociados a *Desmodium incanum* provenientes de diferentes regiones del país. Para ello, se colectaron nódulos de la leguminosa en nueve puntos de prospección, ubicados en en la región centro y norte de Uruguay. Los nódulos se desinfectaron en la superficie, se maceraron y el contenido se cultivó en medio sólido Extracto de Levadura Manitol. Para los aislamientos obtenidos, se amplificó el gen *nifH* usando los cebadores PolR/PolF. Los que resultaron positivos a la presencia del gen, por un lado, se identificaron por secuenciación del gen *ARNr 16S* y su comparación con bases de datos. Por otro lado, se realizaron ensayos de inoculación *in vitro* en tubos con medio Jensen donde se evaluó el porcentaje de plantas noduladas, el porcentaje de nódulos efectivos y el promedio de nódulos por planta. Se obtuvo una colección de 46 aislamientos, con características morfológicas diversas en el medio de cultivo Extracto de Levadura Manitol. La amplificación del gen *nifH* se corroboró en el 17% de los aislamientos (8 aislamientos). De ellos, cinco se asociaron al género *Bradyrhizobium*, uno al género *Rhizobium*, y a los dos aislamientos restantes no se pudo asignar género. El ensayo de inoculación mostró que 7 de los 8 aislamientos seleccionados nodularon las plantas de *D. incanum*, destacándose los aislamientos LMg15, *Bradyrhizobium* sp. Bar10 y *Bradyrhizobium* sp. Bar11 del Departamento de Tacuarembó por presentar valores similares en los parámetros evaluados a la cepa perteneciente a la colección de cepas del MGAP para la inoculación de *Desmodium* en Uruguay. Estos resultados constituyen una base para el desarrollo de inoculantes que contribuyan a mejorar el establecimiento de *D. incanum* en el campo natural.

Palabras clave: *Desmodium incanum*; campo natural; fijación biológica de nitrógeno; rizobios.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Campo natural del Uruguay y leguminosas nativas

El campo natural de Uruguay forma parte del bioma Pampa o Campos, una región ecológica que se extiende aproximadamente sobre 0,5 millones de km² del centro-este de Argentina, el sur de Brasil y Uruguay. Este bioma se caracteriza por presentar condiciones térmicas variables y por estar dominado por un pastizal subtropical, estructurado como un mosaico complejo de comunidades vegetales cuya composición depende estrechamente de los tipos de suelo y de la intensidad del pastoreo (Ziliotto et al., 2023). En particular, el campo natural uruguayo alberga una elevada diversidad florística, con más de 2.500 especies vegetales registradas (Brazeiro et al., 2020), lo que lo posiciona como una de las ecorregiones de pastizales más relevantes a nivel global y de uno de los ecosistemas con mayor diversidad vegetal. Dentro de esta diversidad se destacan más de 400 especies de gramíneas y alrededor de 100 especies de leguminosas (Lezama et al., 2019; Mello et al., 2023). Esta elevada biodiversidad resulta clave, ya que diversos estudios han demostrado que existe una relación positiva entre la diversidad de especies, la productividad del sistema y su capacidad de resiliencia frente a perturbaciones, tanto climáticas como antrópicas. Dentro de los servicios ecosistémicos que desempeña el campo natural se encuentran: la conservación del suelo, la regulación hídrica, el secuestro de carbono y la conservación de la biodiversidad (Modernel et al., 2016).

En el país, el campo natural constituye el ecosistema dominante, cubriendo más del 60 % del territorio (Berretta, 1998). En términos productivos, la ganadería es una de las principales actividades económicas del Uruguay y se desarrolla mayoritariamente sobre estos pastizales naturales. Se estima que entre 10 y 11 millones de hectáreas se destinan a ganadería extensiva basada en campo natural, lo que representa aproximadamente el 65–70 % del área ganadera nacional (Ministerio de Ambiente, 2024). Por lo tanto, es un gran reservorio natural de carbono y en él, a partir de la actividad ganadera, se logra transformar la fibra en productos con alto valor agregado. Este modelo productivo configura no solo la matriz económica, sino también la identidad rural del Uruguay.

Los géneros *Paspalum*, *Axonopus*, *Andropogon* y *Bothriochloa*, constituyen los más representativos dentro de las gramíneas perennes, las cuales a su vez, constituyen el grupo dominante del campo natural uruguayo y determinan en gran medida la estructura y productividad del sistema (Berretta, 1998). En menor proporción relativa a las gramíneas se encuentran las leguminosas nativas, ya

que su biomasa suele representar una fracción reducida del total del pastizal. Sin embargo, desempeñan un rol esencial en la calidad del forraje y mantenimiento de la fertilidad del suelo (Jaurena et al., 2005). Su impacto sobre la productividad y estabilidad del sistema puede ser desproporcionadamente alto, particularmente bajo manejos que favorecen su persistencia (INIA, 2011; Martínez-Hidalgo & Hirsch, 2017).

En Uruguay se han estudiado aproximadamente 45 especies de leguminosas nativas con potencial para praderas sembradas (Rebuffo et al., 1980), aunque actualmente estas praderas implantadas cubren menos del 5 % del área pastoril del país. El género *Desmodium* (Fabaceae, subfamilia Faboideae), está ampliamente distribuido en regiones tropicales y subtropicales del mundo, incluyendo el campo natural uruguayo y comprende numerosas especies herbáceas, muchas de ellas con valor forrajero (Izaguirre & Beyhaut, 1997). En Uruguay se han registrado 9 especies de este género: *D. affine*, *D. arechavaletae*, *D. cuneatum*, *D. pachyrrhizum*, *D. polygaloides*, *D. triarticulatum*, *D. uncinatum*, *D. venosum* y *D. incanum* adaptadas a distintos ambientes, incluyendo suelos de fertilidad variable y condiciones de pastoreo continuo (Marchesi et al., 2026). Estas especies contribuyen a la diversidad funcional del pastizal y forman parte de las leguminosas nativas con potencial interés agronómico (Izaguirre & Beyhaut, 1997; Reyno et al., 2006).

1.2 *Desmodium incanum*

D. incanum, comúnmente conocida como “pega-pega”, es una especie nativa de América y presenta un amplio rango de distribución desde México hasta el centro de Sudamérica, incluyendo Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay. Si bien en algunas regiones ha sido introducida con fines forrajeros o se ha dispersado accidentalmente fuera de su área original, en el Cono Sur forma parte de la flora nativa (Izaguirre & Beyhaut, 1997).

Desde el punto de vista morfológico, *D. incanum* se presenta como una planta rastrera a ascendente. Bajo condiciones de pastoreo frecuente puede mantener un porte bajo (inferior a 20 cm), mientras que en ausencia de perturbación puede alcanzar mayor altura. Sus tallos son pilosos y tienden a enraizar en los nudos, favoreciendo su expansión lateral (Izaguirre & Beyhaut, 1997).

Las hojas de *D. incanum* son trifoliadas, con folíolos de forma variable, desde ovados hasta lanceolados siendo el folíolo terminal generalmente de mayor tamaño que los laterales (Figura 1.1). La superficie adaxial es verde oscura,

mientras que el envés es más claro y densamente piloso (Izaguirre & Beyhaut, 1997).

Las inflorescencias se disponen en racimos terminales o axilares, con flores de coloración rosada, violácea o azulada y estructura papilionada, típica de las leguminosas. El fruto es un lomento segmentado (legumbre con constricciones entre semillas) de varios segmentos, cada uno con una sola semilla. Estos segmentos maduros están cubiertos de tricomas uncinados (pelos con ganchos) que facilitan su dispersión al adherirse al pelaje de los animales o a la ropa, lo que explica parte de su distribución local y su nombre común (Figura 1.1).



Figura 1.1. Morfología de *Desmodium incanum*. 1.A Aspecto general de la planta, 1.B inflorescencias y frutos, 1.C detalle de la inflorescencia, 1.D detalle del fruto tipo lomento segmentado, 1.E segmentos del lomento y semillas aisladas. (Imágenes tomadas de Tropical Forages, s. f.).

1.3 La planta y su microbioma asociado

Las plantas no constituyen entidades biológicas aisladas, sino que interactúan de forma estrecha y continua con una gran diversidad de microorganismos asociados a sus tejidos y al suelo circundante. Estas comunidades microbianas

incluyen bacterias, hongos, arqueas y protistas, los cuales participan activamente en numerosos procesos ecológicos y fisiológicos que influyen en la fisiología, crecimiento y desarrollo de la planta como la adquisición de agua y nutrientes, la tolerancia al estrés abiótico y la defensa frente a patógenos, entre otros (Turner et al., 2013; Vandenkoornhuyse et al., 2015).

El conjunto de microorganismos asociados a una planta, junto con su información genética y sus interacciones funcionales, se conoce como microbioma vegetal (Mundra et al., 2023). En este contexto, la planta y su microbioma pueden considerarse como una unidad ecológica integrada denominada holobionte, en la cual las interacciones entre el hospedador y sus microorganismos asociados influyen en rasgos clave del organismo vegetal y en su adaptación al ambiente (Vandenkoornhuyse et al., 2015; Berg et al., 2016).

Las interacciones entre plantas y microorganismos abarcan un amplio espectro de asociaciones que varían en grado de especificidad e intimidad, así como en su localización dentro del hábitat donde se establecen. Estas pueden ser desde interacciones relativamente laxas en la rizosfera, hasta asociaciones más estrechas como las establecidas por microorganismos endofíticos, que colonizan tejidos internos de la planta sin causar daño como es la interacción mutualista. Asimismo, se reconocen comunidades microbianas asociadas a otros compartimentos de la planta, como la filósfera, que comprende los microorganismos presentes en la superficie de hojas y tallos, y la espermósfera, vinculada a los microorganismos asociados a la superficie de las semillas (Turner et al., 2013; Compant et al., 2010).

Desde el punto de vista ecológico, las interacciones planta–microorganismo pueden clasificarse según el efecto que ejercen sobre el hospedador vegetal. Estas incluyen interacciones patogénicas, en las que los microorganismos provocan enfermedades y afectan negativamente el crecimiento de la planta; interacciones neutrales o comensales, donde los microorganismos utilizan los recursos asociados a la planta sin generar efectos evidentes sobre ella; e interacciones beneficiosas o mutualistas, en las que ambos organismos obtienen ventajas de la asociación (Compant et al., 2010; Berg et al., 2016).

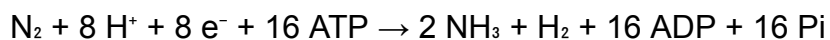
Dentro de las interacciones beneficiosas se destacan diversos microorganismos capaces de promover el crecimiento vegetal, comúnmente denominados microorganismos promotores del crecimiento vegetal (MPCV). En el caso de las bacterias, estos microorganismos se conocen como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) y pueden ejercer efectos positivos a través de la

biofertilización (incrementan la disponibilidad de nutrientes a la planta como la solubilización de fósforo, la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) y el hierro mediante la producción de sideróforos); bioestimulación (producción de fitohormonas como auxinas, giberelinas y citoquininas); y de biocontrol (producción de compuestos antimicrobianos, la competencia por nutrientes o nichos ecológicos y la inducción de respuestas de defensa en la planta frente a patógenos) (Glick, 2012; Lugtenberg & Kamilova, 2009). En este contexto, los rizobios constituyen un grupo particular de BPCV capaces de establecer asociaciones simbióticas altamente especializadas con leguminosas, mediante las cuales llevan a cabo la FBN, resultando fundamentales para el desempeño ecológico y productivo de estas plantas en ambientes con baja disponibilidad de nitrógeno (Oldroyd & Downie, 2008; Zgadzaj et al., 2016).

1.4 Rizobios como componentes del microbioma vegetal

Los rizobios constituyen un conjunto particular de bacterias del suelo capaces de establecer una simbiosis con plantas de la familia Fabaceae (Oldroyd & Downie, 2008). Estas bacterias se definen funcionalmente por su capacidad de inducir la formación de un nódulo en las raíces de la mayoría de las leguminosas, donde fijan el nitrógeno atmosférico como amonio mediante el complejo enzimático llamado nitrogenasa. Este complejo cataliza la reducción del nitrógeno atmosférico a amonio, mediante la ruptura del triple enlace altamente energético entre los dos átomos de nitrógeno. Posteriormente, el amonio es asimilado por la planta hospedera y utilizado para la síntesis de proteínas y otras moléculas esenciales para su normal crecimiento y desarrollo. El rizobio, a cambio, recibe de la planta compuestos carbonados provenientes de la fotosíntesis, que emplea como fuente de carbono, y un nicho protegido dentro del nódulo (Sprent et al., 2017).

La reacción catalizada por la nitrogenasa puede representarse de manera simplificada como:



Este proceso requiere una elevada inversión energética, consumiendo grandes cantidades de ATP, por lo que se considera metabólicamente costoso. En consecuencia, la FBN se encuentra finamente regulada, tanto por factores ambientales como por el estado nutricional de la planta, siendo la disponibilidad de nitrógeno mineral en el suelo uno de los principales reguladores negativos de la nodulación y de la actividad fijadora (Udvardi & Poole, 2013).

A nivel genético, la capacidad de fijar nitrógeno en los rizobios depende principalmente de los genes *nif* (del inglés *nitrogen fixation genes*), que codifican componentes estructurales y regulatorios del sistema nitrogenasa. Entre ellos, el gen *nifH* es uno de los más conservados y estudiados, ya que codifica la dinitrogenasa reductasa, una subunidad encargada de transferir electrones al complejo nitrogenasa durante la reducción del nitrógeno atmosférico. Debido a su alta conservación filogenética y su relación directa con la actividad fijadora, *nifH* es ampliamente utilizado como marcador molecular para detectar y caracterizar microorganismos diazotróficos en estudios ecológicos y taxonómicos (Gaby & Buckley, 2014). Además de los genes *nif*, otros genes simbióticos, como los genes *nod*, participan en el reconocimiento molecular entre rizobios y leguminosas y en la síntesis de los factores Nod necesarios para iniciar el proceso de nodulación (Oldroyd & Downie, 2008).

La interacción entre rizobios y leguminosas presenta distintos grados de especificidad, determinados por mecanismos de reconocimiento molecular entre la planta y la bacteria, que incluyen el intercambio de señales químicas las cuales desencadenan el proceso de nodulación (Oldroyd & Downie, 2008).

Este diálogo molecular comienza en la rizosfera, cuando las raíces de la leguminosa liberan compuestos fenólicos, principalmente flavonoides, que actúan como señales químicas capaces de atraer a los rizobios compatibles y que se encuentran en el entorno de la raíz (Oldroyd & Downie, 2008; Perret et al., 2000). Como respuesta a estas señales, los rizobios sintetizan y secretan factores Nod, lipoquitooligosacáridos que son reconocidos por receptores específicos en las células epidérmicas de la raíz. Este reconocimiento desencadena una cascada de señalización en la planta que inicia el establecimiento de la simbiosis (Geurts & Bisseling, 2002).

La infección de los rizobios al tejido vegetal ocurre generalmente a través de los pelos radiculares, los cuales se curvan y engloban a las bacterias, dando origen a una estructura tubular denominada hilo de infección (Figura 1.2). A través de este hilo, los rizobios se multiplican y avanzan hacia las capas internas de la raíz, se transforman en bacteroides (rizobios diferenciados) mientras que, de forma simultánea, se activan divisiones celulares en la corteza radical que conducen a la formación del primordio nodular (Oldroyd et al., 2011). Dentro de la estructura nodular, se forman los simbiosomas que constituyen uno o varios bacteroides rodeados por una membrana derivada de la planta, llamada membrana peribacteroidal o membrana del simbiosoma, que delimita un compartimento intracelular donde ocurre la FBN. El simbiosoma, por tanto, constituye una unidad estrecha entre la leguminosa y el rizobio especializado en

el intercambio metabólico entre los simbios. El nódulo constituye así un órgano especializado, resultado del desarrollo coordinado entre la planta y la bacteria (Udvardi & Poole, 2013).

En este contexto, la planta regula el microambiente interno del nódulo para propiciar la FBN. La producción de la proteína leghemoglobina, constituye uno de los mecanismos principales para este fin ya que mantiene una baja concentración de oxígeno dentro del nódulo, condición que permite simultáneamente la respiración bacteriana y la actividad de la enzima nitrogenasa, altamente sensible al oxígeno (Udvardi & Poole, 2013). La presencia de leghemoglobina puede evidenciarse por una coloración rojiza del tejido interno del nódulo, observable al seccionar un nódulo activo, lo cual constituye un indicador indirecto de que se está llevando a cabo la FBN (Du et al., 2020).

Finalmente, los nódulos experimentan un proceso de senescencia, caracterizado por la degradación progresiva de los bacteroides y de los tejidos nodulares, lo que conduce a la pérdida de la actividad fijadora de nitrógeno y al reciclaje de nutrientes hacia la planta (Li et al., 2025).

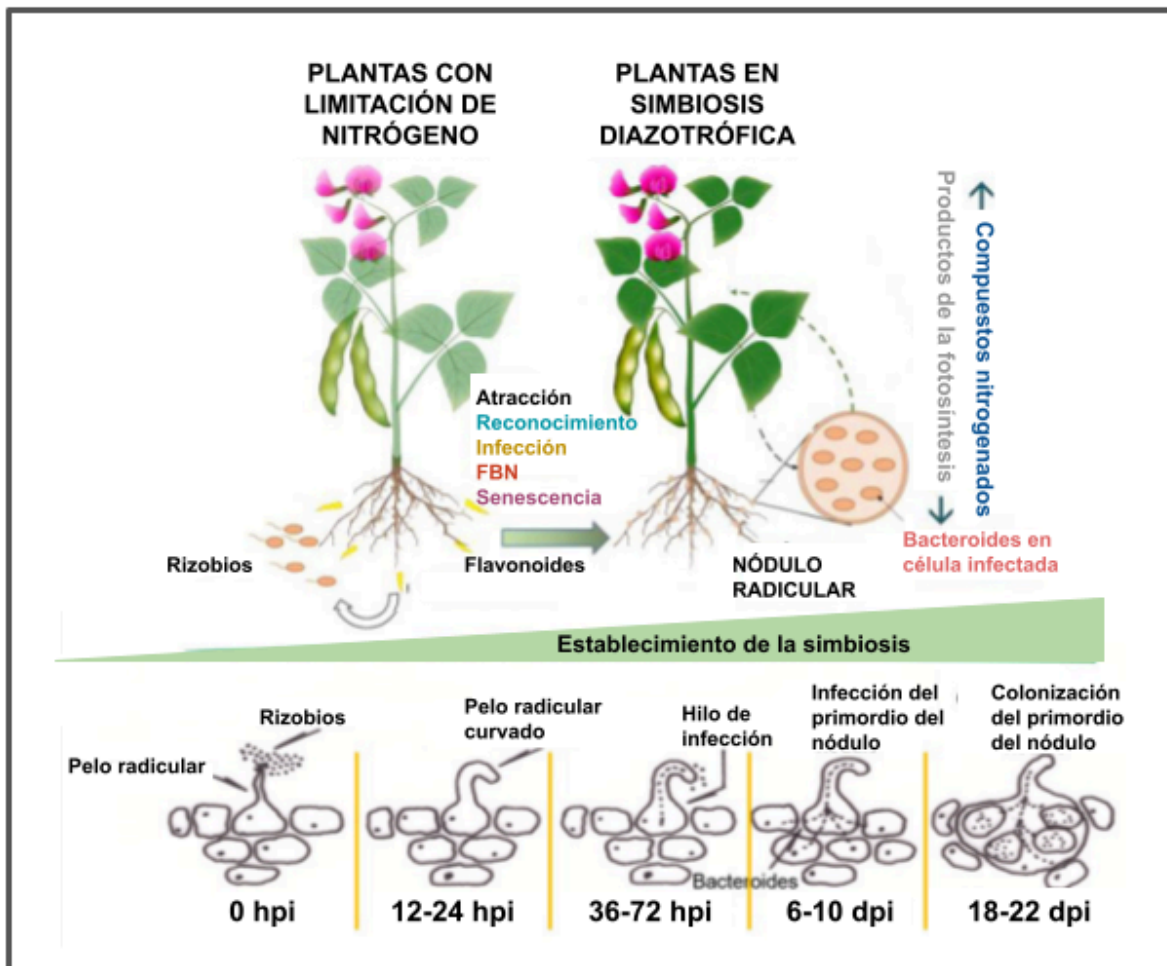


Figura 1.2. Etapas iniciales del establecimiento de la simbiosis rizobio–leguminosa. hpi: horas post infección, dpi: días post infección. (Modificado de Hernández-López & Díaz-Camino, 2022).

1.5 Antecedentes de la interacción rizobio-*Desmodium* en Uruguay

En Uruguay existen antecedentes de estudios sobre rizobios asociados a leguminosas nativas. En estos trabajos se han aislado, identificado y caracterizado bacterias simbióticas provenientes de especies como *Parapiptadenia rigida*, *Mimosa* spp., *Lupinus* spp. y *Eucalyptus* spp. lo que ha permitido ampliar el conocimiento sobre la diversidad de rizobios presentes en los suelos del país (Taulé et al., 2012; Platero et al., 2016; Pereira-Gómez et al., 2020; Costa et al., 2023; Fabiano et al., 2023; Beyhaut et al., 2012). En conjunto, estos estudios evidencian que las leguminosas nativas establecen asociaciones selectivas con comunidades rizobianas adaptadas a las condiciones ambientales locales.

D. incanum presenta una distribución predominante en la región centro-norte del Uruguay (Marchesi et al., 2026) y es considerada una leguminosa promisoría para el mejoramiento del campo natural, debido a su buena adaptación a las condiciones locales y a su capacidad de presentar nodulación efectiva en condiciones de campo (Reyno et al., 2006).

Uno de los primeros antecedentes nacionales relacionados con el estudio de *D. incanum* corresponde al trabajo de Crosa (1999), quien obtuvo aislamientos bacterianos a partir de nódulos de esta especie. A continuación evaluó la capacidad de nodulación de los mismos. Pruebas en invernáculo, utilizando suelos de diferentes regiones, mostraron la formación de nódulos efectivos en las plantas inoculadas con cepas de rizobios provenientes de varios suelos uruguayos. Estos resultados evidencian la presencia de poblaciones de rizobios capaces de establecer simbiosis efectiva con *D. incanum* en distintos ambientes. A pesar de los esfuerzos realizados en este sentido, los aislamientos de rizobios utilizados en el estudio, no se conservan.

Por otra parte, el Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP), a través de la Dirección General de Servicios Agrícolas (DGSA), dispone de una colección de cepas específicas de rizobios utilizadas en la formulación de inoculantes para su uso en nuestro país. La cepa *Bradyrhizobium embrapense* CNPSo 2833^T aislada en *Desmodium* heterocarpon en Colombia ha sido propuesta de forma genérica para el conjunto de *Desmodium* spp. en Uruguay,

(Delamuta et al., 2015). Además, existen cepas recomendadas para las especies *D. intortum* y *D. uncinatum*. Sin embargo, en Uruguay no existen reportes donde se haya evaluado la compatibilidad y la eficiencia de estas cepas de rizobios con *D. incanum* en condiciones locales ni se cuenta con una recomendación específica para la inoculación de esta especie.

Estos antecedentes respaldan la estrategia de la presente tesina de explorar y caracterizar rizobios asociados a *D. incanum* en distintas regiones del país.

A su vez este trabajo se enmarca en el proyecto INIA-FPTA llamado “Selección y evaluación de nuevos inoculantes para potenciar la FBN en leguminosas introducidas y nativas”.

2. OBJETIVOS

Objetivo general: Estudiar la diversidad de rizobios asociada a *Desmodium incanum* en Uruguay.

Objetivos específicos:

- Aislar y caracterizar posibles rizobios provenientes de nódulos de *Desmodium incanum* recolectados en distintas regiones de Uruguay.
- Confirmar la pertenencia de las cepas al grupo de los rizobios, mediante ensayos de inoculación *in vitro* en plantas de *Desmodium incanum*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Origen y descripción del material biológico

Se emplearon muestras de plantas de *Desmodium incanum* provenientes de nueve puntos de prospección, ubicados en seis departamentos de Uruguay (Tabla 3.1, Figura 3.1). Las muestras incluyeron: raíces con nódulos y plantas noduladas asociadas a terrones de suelo en estado vegetativo activo.

Tabla 3.1. Origen geográfico de las muestras.

Departamento	Sitio	Coordenadas	Descripción
Durazno	Baygorria Portón	32°52'52.04" S, 56°48'17.47" O	Borde de la Ruta 4
Flores	Andresito	33°8'36.46" S, 57°9'22.90" O	Borde del camino parque Andresito
Soriano	Bartolomé Hidalgo	33°7'51.82" S, 57°10'3.08" O	Borde de la Ruta 3
Tacuarembó	Los Rosanos	31°48'30.05" S, 56°9'38.22" O	Borde de la Ruta 26 frente a escuela rural nº 47
	Cerro Batoví	31°52'32.46" S, 56°1'3.78" O	Borde del camino
	La Magnolia	31°42'17.2"S 55°50'19.0"O	Campo natural, a aprox 120 m del camino
	Glencoe	32°01'11.0" S 57°10'07.6" O	Campo natural, con pastoreo rotativo
Cerro Largo	Bañado de Medina	32°22'10.64" S, 54°26'38.39" O	Campo natural. Ensayo de intensidad de pastoreo en la Estación Experimental Bernardo Rosengurtt

Rivera	Buena Unión	31°14'00.0" S 55°38'00.0" O	Banquina de ruta
--------	-------------	--------------------------------	------------------



Figura 3.1. Ubicación geográfica del origen de las muestras descritas.

3.2 Aislamiento de simbiontes y construcción de la colección

Para el aislamiento de simbiontes de nódulos de las plantas de *D. incanum*, se procesaron raíces provenientes de dos plantas por sitio de muestreo. En los sitios Baygorria Portón, Andresito, Bartolomé Hidalgo, Bañado de Medina y Los Rosanos, si bien se muestrearon dos plantas, solo una de ellas presentó nódulos, por lo que el análisis se realizó sobre un único ejemplar (Tabla 4.1).

Las raíces noduladas se lavaron con agua de la pileta para desprender suelo adherido y posteriormente se colocaron sobre portaobjetos. Se cortaron con bisturí fragmentos de raíz, de aproximadamente 5-10 mm, donde se encontraban los nódulos, procurando no dañarlos.

A continuación, se realizó la desinfección de la superficie de los nódulos. Para ello, se embebieron en etanol 70% durante 1 minuto, y posteriormente en una solución de hipoclorito de sodio 4% (v/v) durante 10 minutos. Por último, los nódulos se lavaron seis veces con agua destilada estéril para eliminar restos del desinfectante. Se realizaron controles de la desinfección, por diseminación de 100 μ L de agua del último lavado, con un rastrillo estéril, en medio sólido Extracto de Levadura Manitol (YM, por sus siglas en inglés Yeast Mannitol) con Rojo Congo (Vincent, 1970) (ver Anexo). Las placas se incubaron en estufa a 30°C durante 48 h.

Para aquellos nódulos grandes se realizó un macerado con una varilla de vidrio estéril, la cual se deslizó sobre el medio YM sólido, tratando que el contenido del macerado se distribuyera sobre la superficie del medio. De esta forma se procesaron dos nódulos por planta. En caso que se trataran de nódulos muy pequeños, de cada planta se colectaron todos sus nódulos y se maceraron juntos con 900 μ L de solución de NaCl 0,9 % p/v. Se realizaron dos diluciones decimales seriadas y 100 μ L de estas se sembraron en la superficie de placas conteniendo medio YM sólido con rastrillo. Las placas se incubaron en estufa a 30°C durante al menos 48 horas.

Las colonias aisladas con distinta morfología se purificaron mediante repiques sucesivos en el medio YM sólido con Rojo Congo y se confirmó su pureza en el medio Triptona Extracto de Levadura (TY, por sus siglas en inglés, Yeast Tryptone extract) (ver Anexo). Por último, los aislamientos se conservaron en glicerol 25% a -80°C y -20°C y formaron parte de la colección del laboratorio.

3.3 Extracción de ADN genómico

La extracción del ADN genómico se realizó mediante lisado celular aplicando un choque térmico (Taulé et al., 2012). Se partió de un cultivo fresco (3-4 días) en placa de los aislamientos bacterianos cultivados en medio TY. Se tomaron varias colonias y se suspendieron en 100 μ L de agua ultra pura estéril. Se sometió a agitación en vortex y se centrifugó a 10.040 g durante 2 min. Se descartó el sobrenadante y se suspendió el pellet en 100 μ L de NaOH 0,05 M. La suspensión se calentó a 100 °C durante 4 min y se incubó 2 min en hielo para lograr la lisis celular por choque térmico. A continuación, se añadieron 900 μ L de agua ultrapura estéril y se centrifugó a 10.040 g durante 2 min. Se colectaron 700 μ L del sobrenadante, conteniendo el ADN bacteriano, que se conservó a -20°C (Taulé et al., 2012).

3.4 Amplificación del gen *nifH* por PCR

Para identificar en los aislamientos la presencia del gen *nifH*, uno de los genes estructurales de la nitrogenasa, se empleó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR del inglés Polymerase Chain Reaction). Para ello, se emplearon los cebadores PolF y PolR (Poly et al., 2001), cuya secuencia se presenta en la Tabla 3.2. La reacción se realizó en un volumen total de 25 µL de una mezcla (MIX de PCR), que contenía los siguientes componentes: 16,3 µL de agua ultrapura estéril, 2,5 µL de buffer 10x, 1 µL de una mezcla de desoxinucleótido trifosfatos (dNTPs) a 5 mM, 1 µL de cada cebador a 20 µM, 1 µL de Albúmina de Suero Bovino (BSA) al 0,1%, 0,2 µL de Taq polimerasa DFS 5 U/µL (Bioron) y 2 µL del lisado celular descrito en el punto anterior. El control negativo de la PCR consistió en un MIX de PCR con 2 µL de agua ultrapura estéril. Como control positivo se utilizó un lisado celular, resultante de la misma metodología descrita previamente, de la cepa *Kosakonia radicincitans* UYSO10 (Taulé-Mareque et al., 2012).

Tabla 3.2. Secuencia nucleotídica de los cebadores *ARNr 16S* y *nifH* y tamaño del amplicón.

Gen amplificado	Cebador	Secuencia del cebador	Tamaño del amplicón (pb)
<i>nifH</i>	PolF PolR	5'-TGCGAYCCSAARGCBGACTC-3' 5'-ATSGCCATCATYTCRCCGGA-3'	360
<i>ARNr 16S</i>	27F 1492R	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'	1500

El programa utilizado para la PCR fue: un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 45 segundos, hibridación de los cebadores al ADN a 59°C por 45 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos, con una extensión final a 72°C durante 5 minutos.

3.5 Amplificación del gen *ARNr 16S* por PCR

Los aislamientos que amplificaron el gen *nifH*, se seleccionaron para amplificar mediante PCR el gen *ARNr 16S*. Además, se incluyó la cepa *Bradyrhizobium embrapense* CNPSo 2833^T, perteneciente a la colección del MGAP, con fines comparativos. Para esto, se utilizaron los cebadores 27F y 1492R (Shah, 2014), cuyas secuencias y tamaño del amplicón se indican en la Tabla 3.2. La reacción se realizó en un volumen total de 25 μ L, utilizando la misma mezcla de reacción que la empleada para la amplificación del gen *nifH* (punto 3.4). Se empleó un control negativo igual al descrito en 3.4. El programa de ciclado para la PCR fue: un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 minuto, hibridación de los cebadores al ADN a 60°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto y 30 segundos, con una extensión final a 72°C durante 5 minutos.

3.6 Visualización de los productos de PCR, secuenciación y análisis

Los productos de amplificación de los genes *nifH* y *ARNr 16S* se visualizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % (p/v) preparado en buffer Tris-Acético-EDTA (TAE 1X) (ver Anexo). A 40 mL del gel se le añadió 2 μ L del intercalante GoodView™ (Beijing SBS Genetech Co., Ltd.) en el momento de su preparación. 5 μ L de las muestras de ADN (amplicones) se mezclaron previamente con 1 μ L de buffer de carga (loading buffer) y se sembró en el gel. Se empleó 1 μ L del marcador de peso molecular HyperLadder™ 1 kb (Meridian Bioscience) (ver Anexo).

La corrida electroforética se realizó a 90 V durante 30 minutos y las bandas de ADN se visualizaron bajo luz ultravioleta. El tamaño de los amplicones se estimó por comparación con las bandas de tamaño conocido del marcador de peso molecular.

En los casos en que se observaron productos de amplificación del tamaño esperado, los productos se enviaron a Macrogen Inc., Corea para su secuenciación. Para el gen *ARNr 16S*, la secuenciación se realizó desde ambos extremos del amplicón, utilizando los cebadores 27F y 1492R. Para el *nifH* se realizó en un único sentido, con el cebador PoIF.

Todas las secuencias (ambos genes) se editaron, eliminando los pares de base de baja calidad. Las secuencias del gen *ARNr 16S* editadas, además se ensamblaron para generar una secuencia consenso, utilizando el programa DNA Baser Sequence Assembler v3. Las secuencias resultantes se compararon con las disponibles en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) mediante el algoritmo BLASTN.

3.7 Ensayo de nodulación *in vitro* en plantas

Con el objetivo de evaluar la eficiencia simbiótica por coloración rojiza en el interior del nódulo como resultado de la presencia de la leghemoglobina, los aislamientos que resultaron *nifH* positivos se seleccionaron para realizar ensayos de inoculación *in vitro*.

Para ello se emplearon semillas de *D. incanum* provenientes del Banco de germoplasma de la Facultad de Agronomía (UdelaR) con número accesión 7093.

Las semillas se escarificaron mecánicamente mediante un lijado suave empleando una lija de grano 180 según lo reportado (Cibele et al., 1997). A continuación, se realizó la desinfección de la superficie de las semillas. Para ello, se lavaron durante unos segundos con hipoclorito de sodio al 1% (v/v), seguido de seis lavados con agua destilada estéril. Se realizaron controles de la desinfección, empleando 100 µL del agua del último lavado, y sembrando por diseminación con un rastrillo estéril, en placas conteniendo medio TY. Las semillas se colocaron en placas Petri sobre papel absorbente estéril, humedecido previamente con 2 mL de agua destilada estéril y se incubaron en oscuridad a 25 °C para facilitar la germinación durante 7 días.

Una vez germinadas las semillas, se colocaron en tubos de ensayo (20 cm largo, 2,5 cm diámetro) conteniendo 20 mL de medio semisólido Jensen sin nitrógeno (Vincent, 1970) (ver Anexo), a razón de una semilla por tubo. Posteriormente, las semillas se inocularon con 100 µL de suspensiones celulares de los aislamientos, a una concentración de 1×10^8 células/mL, determinada a partir de mediciones de densidad óptica a 600 nm (DO600). Los tratamientos incluyeron todos los aislamientos que amplificaron el gen *nifH*, dos controles y un tratamiento de referencia. El control negativo consistió en plantas sin inocular y el control positivo en plantas inoculadas con el mismo volumen y concentración de la cepa *B. embrapense* CNPSo 2833^T, perteneciente a la colección del MGAP para la inoculación de *Desmodium* spp. en Uruguay. Se agregó también un tratamiento de referencia que consistió en plantas que no fueron inoculadas pero fueron suplementadas con nitrógeno en una concentración final de KNO₃ 0,05 % (p/v) (Vincent, 1970). Se realizaron seis réplicas por condición.

Las plantas se crecieron en condiciones controladas, a 24 °C con un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, y una humedad relativa de 43-54%. Con el objetivo de realizar una dinámica de nodulación, se evaluó el número de nódulos

por planta cada cuatro días, durante un período de 35 días, momento en que se cosechó el ensayo. Los nódulos de cada planta se separaron y se cuantificaron. La efectividad de los nódulos se verificó mediante un corte transversal con un bisturí y la presencia de una coloración rojiza en su interior referente a la presencia de la leghemoglobina. Algunos de esos nódulos se visualizaron en una lupa estereoscópica Stemi 305 equipada con una cámara digital AxioCam 208 color (Carl Zeiss, Alemania).

4. RESULTADOS

4.1 Aislamiento de simbios

A partir de estos nódulos fue posible obtener aislamientos bacterianos con diferentes morfologías en el medio YM sólido (Figura 4.1) (ver Anexo).

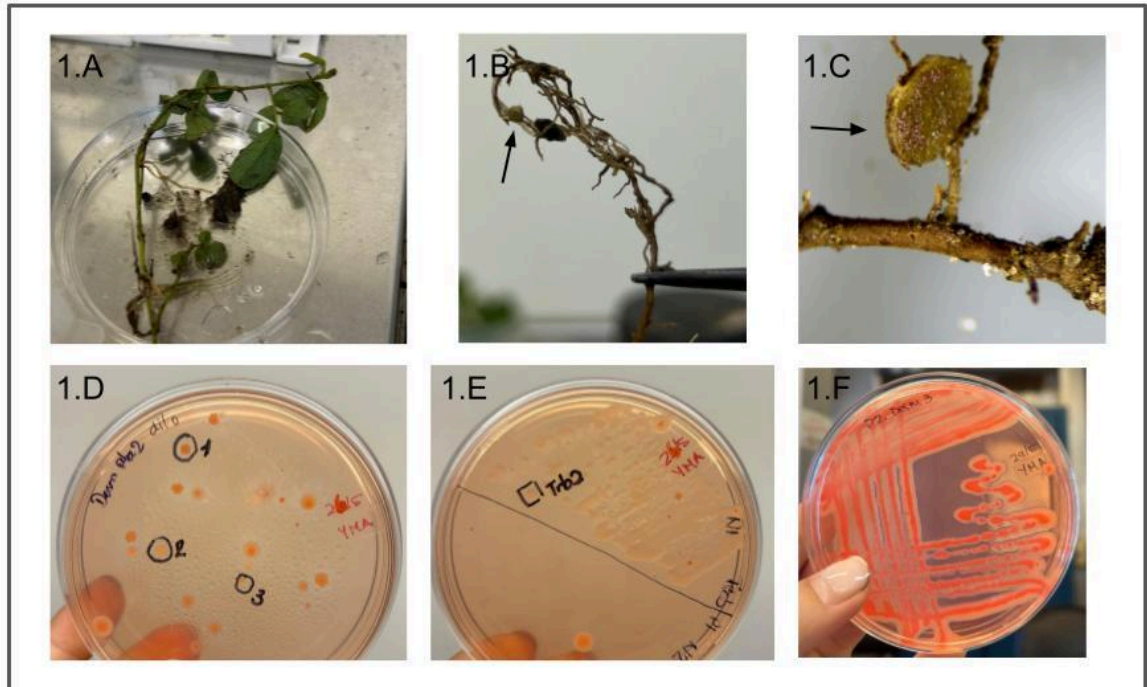


Figura 4.1. Etapas de la generación de la colección de aislamientos provenientes de nódulos de plantas de *Desmodium incanum* desinfectados en la superficie. 1.A Muestras de plantas provenientes de campo natural, 1.B raíces de una planta donde se observa un nódulo, 1.C nódulo ubicado en raíz secundaria, 1.D cultivo por siembra en superficie de 100 µL de un macerado de varios nódulos en medio YM sólido con Rojo Congo, 1.E aislamiento mediante el macerado de un nódulo con varilla de vidrio en medio YM sólido con Rojo Congo, 1.F aislamiento purificado en medio YM sólido con Rojo Congo.

Se obtuvieron un total de 46 aislamientos bacterianos (Tabla 4.2 y Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Número de aislamientos obtenidos por sitio.

Sitio	Nº de plantas procesadas	Nº de aislamientos
-------	--------------------------	--------------------

Baygorria Portón	1	4
Andresito	1	5
Bartolomé Hidalgo	1	1
Los Rosanos	1	3
Cerro Batoví	2	5
La Magnolia	2	12
Glencoe	2	7
Bañado de Medina	1	4
Buena Unión	2	5

Los aislamientos obtenidos en medio YM sólido con Rojo Congo presentaron una amplia diversidad morfológica (hasta 6 morfotipos bacterianos diferentes por nódulo analizado), observándose variaciones en la forma del borde, textura, diámetro y particularmente en la coloración. Se registraron colonias blanquecinas, translúcidas, rosadas, rojizas y rojizas con centro más oscuro (ver Anexo).

Tabla 4.2. Lista de los aislamientos de la colección detallando el sitio de la muestra y la presencia del gen *nifH*.

Aislamiento	Sitio de origen	Procedencia ^(a)	<i>nifH</i> ^(b)
BP6	Baygorria Portón	P1, N1	NO
BP7		P1, N2	NO
BG2		P1, N2	SI
BG3		P1, N2	NO
AB1	Andresito	P1, N1	NO
AB2		P1, N1	NO
AB13		P1, N2	NO
AB3		P1, N2	NO
AB15		P1, N2	NO

BH3	Bartolomé Hidalgo	P1*	NO
LMg1	La Magnolia	P1, N1	NO
LMg2		P1, N1	SI
LMg3		P1, N2	NO
LMg4		P1, N2	NO
LMg5		P1, N2	NO
LMg6		P1, N2	NO
LMg7		P1, N2	NO
LMg8		P1, N2	NO
LMg10		P2, N1	NO
LMg11		P2, N2	NO
LMg12		P2, N2	NO
LMg15		P2, N2	SI
BDM1		Bañado de Medina	P1*
BDM2	P1*		NO
BDM3	P1*		NO
BDM4	P1*		SI
BU1	Buena Unión	P1, N1	NO
BU3		P1, N2	NO
BU4		P1, N2	NO
BU5		P1, N2	NO
BU10		P2, N2	NO
G1	Glencoe	P1, N1	NO
G2		P1, N1	SI
G3		P2, N1	NO
G4		P2, N1	NO
G5		P2, N2	NO
G6		P2, N2	NO
G7		P2, N2	NO
Bar1	Cerro Batoví	P1, N1	NO
Bar4		P2, N1	NO
Bar5		P2, N1	NO
Bar10		P2, N2	SI
Bar11		P2, N2	SI

LR1	Los Rosanos	P1, N1	NO
LR6		P1, N2	SI
LR7		P1, N2	NO

^(a)Planta (P), nódulo (N). Los números en la tabla indican la cantidad de plantas analizadas y el número de nódulos observados en cada caso.; * El aislamiento proviene de un pool de nódulos; ^(b) SI: amplicón del tamaño esperado para el gen *nifH* por PCR utilizando los cebadores PolF y PolR; NO: no se detectó el amplicón esperado.

4.2 Caracterización molecular de los aislamientos

4.2.1 Amplificación del gen *nifH*

Seguidamente, se evaluó mediante la técnica de PCR y utilizando los cebadores PolF y PolR, la presencia del gen *nifH* en los 46 aislamientos.

Los resultados mostraron la amplificación de un fragmento del tamaño esperado (~360 pb) en ocho aislamientos: LMg2, LMg15, G2, Bar10, Bar11, BDM4, LR6 y BG2, lo que se corresponde con el 17 % del total de la colección (Tabla 4.2, Figura 4.2). En la electroforesis también se observó para algunos aislamientos la amplificación de fragmentos de diferentes tamaños, así como casos donde se observó más de un amplicón.

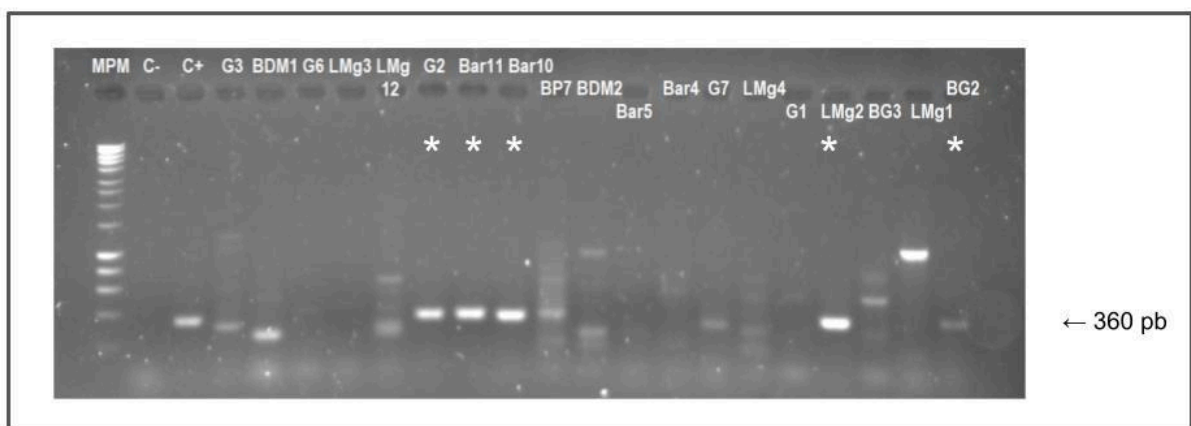


Figura 4.2. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR correspondientes a la amplificación del gen *nifH*. Se muestra un gel con los productos de PCR de algunos aislamientos de la colección. MPM: marcador de peso molecular: HyperLadder™ 1 kb (Meridian Bioscience). C+: *K. radicincitans* UYSO10; C- control negativo; *Se indican los aislamientos considerados positivos a la presencia del gen *nifH*.

4.2.2 Secuenciación del gen *nifH*

Con el fin de confirmar la identidad del fragmento amplificado del gen *nifH*, se obtuvieron las secuencias correspondientes a los productos de PCR de los aislamientos que se consideraron positivos. El análisis comparativo de estas secuencias con la base de datos del NCBI indicó que estas secuencias corresponden al gen *nifH*, lo que confirma la especificidad de la amplificación observada en los geles de PCR (Tabla 4.3).

Seis aislamientos presentaron una muy alta homología (99.6 %) con la secuencia del gen *nifH* de la cepa *Bradyrhizobium* sp. ApV4. Además, los aislamientos BDM4 y BG2 mostraron mayor porcentaje de similitud con *Bradyrhizobium* sp. cmy11 y *Rhizobium* sp. UYPR7.63, respectivamente.

Tabla 4.3. Mejor candidato obtenido en la comparación de las secuencias del gen *nifH* de los aislamientos de la colección con las secuencias disponibles en la base de datos del NCBI.

Depto. (Sitio)	Aislamiento	Mejor candidato ^(a)	Número de acceso ^(d)	Similaridad (%) ^(b)	Compleitud (%) ^(c)
Tacuarembó (LM)	LMg2	<i>Bradyrhizobium</i> sp. ApV4	LC461097.1	99.66	100
	LMg15	<i>Bradyrhizobium</i> sp. ApV4	LC461097.1	99.66	100
Tacuarembó (G)	G2	<i>Bradyrhizobium</i> sp. ApV4	LC461097.1	99.66	100
Tacuarembó (Bar)	Bar10	<i>Bradyrhizobium</i> sp. ApV4	LC461097.1	99.66	100
	Bar11	<i>Bradyrhizobium</i> sp. ApV4	LC461097.1	99.66	100
Cerro Largo (BDM)	BDM4	<i>Bradyrhizobium</i> sp. cmy11	JF821048.1	97.22	100

Tacuarembó (LR)	LR6	<i>Bradyrhizobium</i> sp. ApV4	LC461097.1	99.66	100
Durazno (BG)	BG2	<i>Rhizobium</i> sp. UYPR7.63	JF683706.1	98.21	99

^(a)Mejor candidato hace referencia a la secuencia depositada en la base de datos que presentó el mayor porcentaje de similitud^(b) con la secuencia analizada, utilizado como indicador del grado de identidad entre ambas secuencias. El porcentaje de completitud^(c) expresa el nivel de cobertura de la secuencia obtenida respecto de la secuencia correspondiente al mejor candidato disponible en la base de datos.^(d)Número de referencia asignado a la secuencia en la base de datos del NCBI.

4.3 Identificación de los aislamientos

Con el fin de identificar taxonómicamente los aislamientos que amplificaron el gen *nifH*, se realizó la amplificación por PCR del gen *ARNr 16S* y su secuenciación. Para la totalidad de los aislamientos, se obtuvo un producto de amplificación del tamaño esperado (~1500 pb), evidenciado por la presencia de una banda única y definida (Figura 4.3).

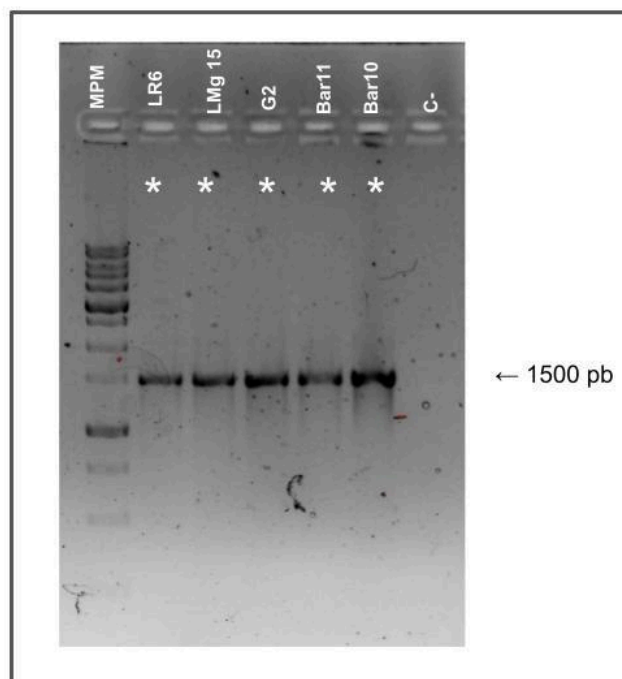


Figura 4.3. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR correspondientes a la amplificación del gen *ARNr 16S* en algunos aislamientos de la colección. MPM: marcador de peso molecular. Se empleó la cepa *K. radicincitans* UYSO10 como control de la reacción (C+), control negativo (C-). (*) Aislamientos considerados positivos para el gen *ARNr 16S*.

A partir del análisis de las secuencias del gen *ARNr 16S* y su comparación con la base de datos del NCBI, los resultados mostraron que la mayoría de los aislamientos se asociaron al género *Bradyrhizobium* (Tabla 4.4). Dentro de este género, los mejores candidatos corresponden a distintas cepas, incluyendo *Bradyrhizobium* sp. TUTMJM5, *Bradyrhizobium* sp. RITF 1311 y *Bradyrhizobium* sp. AZCC_0077, *Bradyrhizobium elkanii* LNW9 y *Bradyrhizobium embrapense* CNPSo 2833^T. Por otra parte, el aislamiento BG2 se asoció al género *Rhizobium*, con mayor similitud a la cepa tipo *Rhizobium grahamii* Cli80 (Tabla 4.4). Los dos aislamientos restantes presentaron un porcentaje de identidad menor al 95 %, por lo que no se asociaron al género *Bradyrhizobium*, pero fueron identificados a nivel de familia (*Bradyrhizobiaceae*). Cabe destacar que estos aislamientos presentaron secuencias de baja calidad, lo que limitó la resolución de la identificación taxonómica a nivel de género.

En el análisis se incluyó además la cepa perteneciente a la colección de cepas del MGAP con fines comparativos: *B. embrapense* CNPSo 2833^T. Los resultados verificaron la identidad de la cepa (Tabla 4.4).

Tabla 4.4. Mejor candidato obtenido en la comparación de las secuencias del gen *ARNr 16S* de los aislamientos de la colección con secuencias disponibles en la base de datos del NCBI.

Depto. (Sitio)	Aislamiento	Mejor candidato ^(a)	Número de acceso ^(b)	Similaridad ^(c) (%)	Compleitud ^(d) (%)
Tacuarembó (LM)	LMg2*	<i>Bradyrhizobium</i> sp. PC-ML80	MT227127.1	92.90	100
	LMg15*	<i>Bradyrhizobium</i> sp. P4-5	KF113077.2	93.48	100
Tacuarembó (G)	G2*	<i>Bradyrhizobium</i> sp. TUTMJM5	MF140380.1	98.94	100
Tacuarembó (Bar)	Bar10	<i>Bradyrhizobium embrapense</i> CNPSo 2833 ^T	NR145861.1	96.95	100
	Bar11	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> LNW9	GQ181029.1	97.54	100

Cerro Largo (BDM)	BDM4	<i>Bradyrhizobium sp.</i> RITF 1311	JQ697605.1	97.71	86
Tacuarembó (LR)	LR6*	<i>Bradyrhizobium sp.</i> AZCC_0077	MK875897.1	97.70	100
Durazno (BG)	BG2	<i>Rhizobium grahamii</i> Cli80	JF424609.1	98.93	100
Cepa del MGAP	CNPSO 2833 ^T	<i>Bradyrhizobium</i> <i>embrapense</i> CNPSO 2833 ^T	NR145861.1	97.53	100

^(a)Mejor candidato hace referencia a la secuencia depositada en la base de datos que presentó el mayor porcentaje de similaridad^(b) con la secuencia analizada, utilizado como indicador del grado de identidad entre ambas secuencias. El porcentaje de completitud^(c) expresa el nivel de cobertura de la secuencia obtenida respecto de la secuencia correspondiente al mejor candidato disponible en la base de datos.^(d)Número de referencia asignado a la secuencia en la base de datos del NCBI. Los aislamientos identificados a partir de una única secuencia del gen marcador se indican con un asterisco^(*).

4.4 Ensayo de nodulación *in vitro* en plantas

Se realizó un ensayo de nodulación *in vitro* con el objetivo de verificar si los aislamientos, previamente seleccionados como positivos a la presencia del gen *nifH*, tienen la capacidad de inducir nódulos en plantas de *D. incanum* (Figura 4.4).

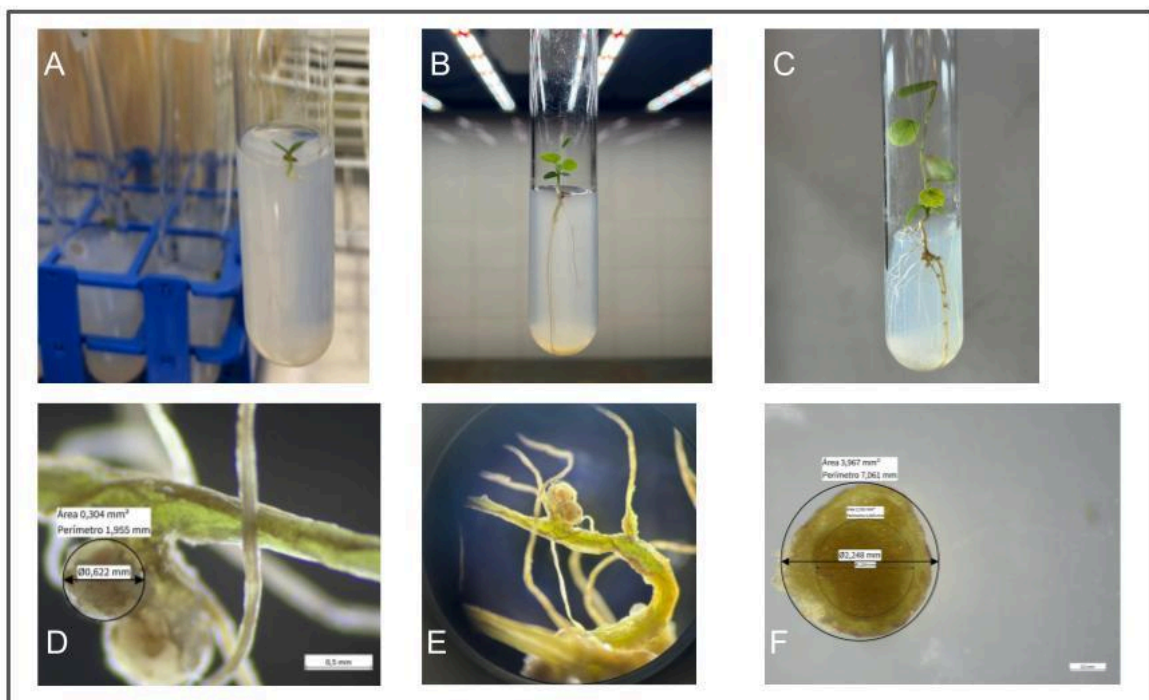


Figura 4.4. Vista del crecimiento *in vitro* de plantas de *Desmodium incanum* en condiciones de temperatura y fotoperíodo controlado. Plántula transferida a tubo con medio Jensen previo a la inoculación (A), 7 días post-inoculación (B), 35 días post-inoculación (C), área y diámetro de un nódulo (D); región radicular y nódulo (E); corte transversal de nódulo donde se observa coloración rojiza, área y diámetro (F).

Los resultados mostraron que las plantas inoculadas con los aislamientos LMg2, LMg15, y los aislamientos pertenecientes al género *Bradyrhizobium* Bar10, Bar11, LR6, BDM4 y G2, así como la cepa de referencia *B. embrapense* CNPSo 2833^T presentaron nódulos radiculares, los cuales comenzaron a observarse a partir del día 18 después de la inoculación y cuyo número fue incrementándose hasta el día 35. En las plantas que se inocularon con el aislamiento *Rhizobium* sp. BG2, las no inoculadas (control negativo) y aquellas que se suplementaron con nitrógeno (KNO_3) no se observaron nódulos durante los 35 días que se desarrolló el ensayo (Figura 4.5).

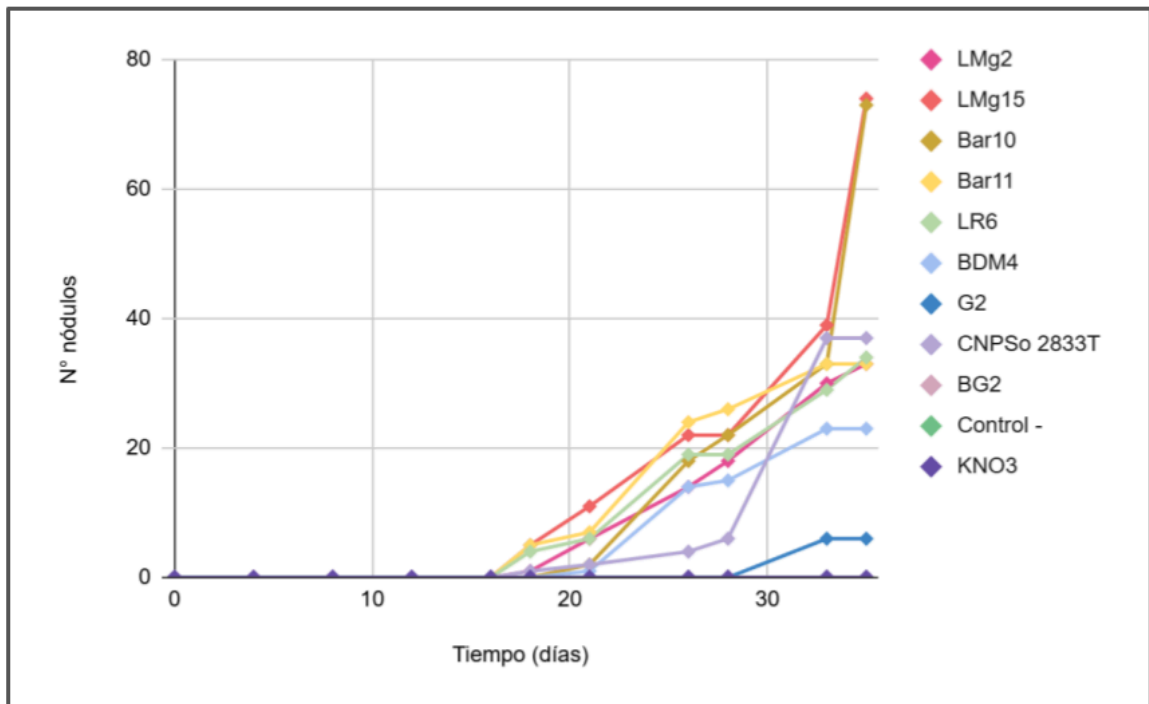


Figura 4.5. Cinética de nodulación de plantas de *Desmodium incanum* cultivadas en medio Jensen durante 35 días en condiciones *in vitro*. La cepa *Bradyrhizobium embrapense* CNPSo 2833^T se empleó como referencia del ensayo. Los puntos sobre las líneas corresponden al número de nódulos totales (por tratamiento) cuantificados desde el inicio de la nodulación.

Las plantas inoculadas con los aislamientos LMg15 y *Bradyrhizobium* sp. Bar10 presentaron un incremento importante de nódulos en las etapas finales del ensayo (del día 28 al 35), comportamiento similar a las inoculadas con la cepa de referencia. En las plantas tratadas con el aislamiento *Bradyrhizobium* sp. G2, se constató una aparición de nódulos más tardíamente (a partir del día 28) que el resto de los tratamientos (Figura 4.5).

Los resultados mostraron además que el mayor porcentaje de plantas noduladas correspondió con las inoculadas con el aislamiento LMg15 y la cepa de referencia, ambos con el 100 % de las plantas (Tabla 4.5). Le siguen las plantas inoculadas con los aislamientos LMg2, Bar10, Bar11 y LR6, con un 83%. Las plantas tratadas con el aislamiento G2 fueron las de menor porcentaje de nodulación (17 %, 1 de 6 plantas noduladas) (Tabla 4.5).

Tabla 4.5 Porcentaje de plantas noduladas, porcentaje de nódulos efectivos y promedio de nódulos por planta de *Desmodium incanum* inoculadas con los aislamientos *nifH+*, cultivadas en condiciones *in vitro* durante 35 días.

Tratamiento	% plantas noduladas	% nódulos efectivos	Promedio de nódulos por planta
LMg2	83	33	4,7
LMg15	100	51	7,5
Bar10	83	70	8
Bar11	83	64	5,5
LR6	83	53	6,8
BDM4	50	27	4,6
G2	17	33	1,2
CNPSo 2833 ^T	100	59	6,2

En cuanto al porcentaje de nódulos efectivos, se destacaron las plantas inoculadas con los aislamientos *Bradyrhizobium* sp. Bar10 y *Bradyrhizobium* sp. Bar11 con un 70 y 64 % respectivamente, ya que superaron a las plantas inoculadas con la cepa de referencia (59 %).

Por último, el promedio de nódulos por planta más elevado se evidenció en las inoculadas con el aislamiento *Bradyrhizobium* sp. Bar10 (8 nódulos), seguido de las plantas tratadas con el aislamiento LMg15 (7,5 nódulos) y *Bradyrhizobium*

sp. LR6 (6,8 nódulos). Los valores más bajos de esta variable se obtuvieron en las plantas inoculadas con el aislamiento *Bradyrhizobium* sp. G2 (1,2 nódulos).

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Considerando el objetivo de esta investigación de aislar y caracterizar rizobios asociados a nódulos radiculares de plantas de *D. incanum*, la estrategia empleada se basó por un lado en el aislamiento de simbioses de plantas de diferentes regiones del país y por otro lado en confirmar la pertenencia de las cepas al grupo de los rizobios. De esta forma, se generó una colección de 46 aislamientos. En algunos casos, a partir de un mismo nódulo se identificaron hasta seis morfotipos bacterianos diferentes, en placas de medio YM sólido, lo que sugiere que los nódulos de *D. incanum* constituyen hábitats ecológicos complejos. Es importante considerar que el medio YM sólido, si bien es un medio de cultivo selectivo y comúnmente empleado para el aislamiento de rizobios, permite el desarrollo de otras bacterias (Abd-Alla et al., 2024).

A continuación, se evaluó la presencia del gen *nifH* como marcador de bacterias fijadoras del nitrógeno, y luego la verificación de su capacidad de inducir nódulos al ser inoculados en plantas de *D. incanum* en un sistema *in vitro*.

La amplificación del gen *nifH* mediante PCR en aislamientos provenientes de nódulos constituye una estrategia ampliamente utilizada para evaluar la capacidad de FBN (Zehr et al., 2003; Gaby & Buckley, 2014). En particular, los cebadores PolF/PolR han sido frecuentemente utilizados en estudios de diversidad de microorganismos diazotróficos en suelos y otros ambientes, debido a su capacidad de amplificar el gen *nifH* en un amplio rango de bacterias fijadoras de nitrógeno (Poly et al., 2001; Gaby & Buckley, 2012). Sin embargo, al tratarse de cebadores degenerados, su uso puede presentar limitaciones, incluyendo sesgos de amplificación y baja recuperación del gen en algunos aislamientos (Gaby & Buckley, 2017).

En este estudio, mediante el empleo de los cebadores PolF/PolR, se obtuvieron 8 aislamientos *nifH* positivos (17%), los cuales fueron posteriormente verificados por secuenciación. Este porcentaje contrasta con estudios basados en colecciones de rizobios previamente caracterizados, donde la amplificación del gen *nifH* suele ser altamente eficiente. Por ejemplo, en el trabajo de Laguerre et al. (2001), en el que se estudiaron rizobios asociados a *Phaseolus vulgaris*, el gen *nifH* fue detectado en 74 de 76 cepas analizadas, evidenciando una alta proporción de aislamientos positivos.

Sin embargo, nuestros resultados concuerdan con estudios en las leguminosas *Mimosa*, *Cyclopia* y *Aspalathus*, donde una fracción significativa de bacterias aisladas de nódulos carece de genes involucrados en la FBN (Gyaneshwar et al., 2011). Estos microorganismos pueden corresponder a bacterias endofíticas

oportunistas o asociadas de manera transitoria al tejido nodular, sin participar directamente en el proceso simbiótico clásico. Especies del género *Desmodium* establecen asociaciones con diversos grupos de rizobios simbióticos y también con bacterias endofíticas no simbióticas, cuya diversidad y composición varía entre sitios de colecta, incluso dentro de una misma especie de leguminosa, en función de factores edáficos como el pH, la disponibilidad de nutrientes entre otras condiciones ambientales (Palmer & Young, 2000; Sprent, 2007; Mutch et al., 2013; Ben-Laouane et al., 2026).

Por otro lado, resulta llamativo que no se haya obtenido al menos un aislamiento *nifH* positivo por nódulo analizado y en particular que en los sitios Baygorria Portón, Andresito, Bartolomé Hidalgo y Buena Unión no se obtuvieron aislamientos que pudieran ser potenciales rizobios. Este resultado podría estar asociado a limitaciones de la metodología de aislamiento empleada. En particular, algunas especies de rizobios presentan crecimiento lento (Nakei et al., 2022), por lo que podrían no haber sido recuperadas bajo las condiciones de cultivo y los tiempos de incubación utilizados.

La posterior amplificación y secuenciación del gen *ARNr 16S* en los aislamientos positivos para el gen *nifH* constituyó una estrategia adecuada para avanzar en la identificación taxonómica de las cepas con potencial capacidad de FBN. El uso del gen *ARNr 16S*, como marcador molecular, es ampliamente aceptado debido a su presencia universal en bacterias y a la combinación de regiones conservadas y variables que permiten discriminar entre distintos taxones (Weisburg et al., 1991). La identificación taxonómica de los aislamientos permitió confirmar que cinco de las bacterias asociadas a los nódulos de *D. incanum* pertenecen a géneros típicamente vinculados a la simbiosis con leguminosas, principalmente *Bradyrhizobium* y, un aislamiento al género *Rhizobium*. Es interesante resaltar que la asignación taxonómica mostró concordancia a nivel de género bacteriano con las secuencias del gen *nifH*. Sin embargo, dos aislamientos no pudieron ser asignados al género *Bradyrhizobium* mediante el análisis del gen *ARNr 16S*, ya que no superaron el umbral de identidad comúnmente aceptado (Ormeño-Orrillo & Martínez-Romero, 2019). Para estos dos aislamientos no fue posible obtener secuencias consenso a partir de la secuenciación en ambos sentidos del gen, por lo que se sugiere repetir la secuenciación, implementar la secuenciación de otros genes *housekeeping* (por ejemplo, *recA*, *gyrB* o *dnaK*).

Estudios realizados en distintas regiones han reportado el aislamiento y caracterización de rizobios asociados a especies del género *Desmodium*, incluyendo *Desmodium incanum* (Protachevicz et al., 2023). Estos trabajos

evidencian una elevada diversidad de bacterias simbióticas, fundamentalmente especies del género *Bradyrhizobium*. Sin embargo, también se han identificado representantes de otros géneros como *Rhizobium*, *Mesorhizobium* y *Paraburkholderia* (Gu et al., 2007; Toniutti et al., 2017). Asimismo, las poblaciones de rizobios asociadas a *Desmodium* pueden presentar una alta diversidad genética, incluso entre sitios cercanos, lo que sugiere una fuerte influencia de las condiciones ambientales locales en la estructura de estas comunidades simbióticas (Andrews & Andrews, 2017).

Finalmente, para validar funcionalmente la capacidad simbiótica de los aislamientos portadores del gen *nifH* se realizó un ensayo de nodulación *in vitro*. La expresión fenotípica de esta capacidad depende de la compatibilidad entre el hospedero y la bacteria, así como de la correcta regulación de los sistemas genéticos involucrados en la infección radicular y la organogénesis nodular (Oldroyd et al., 2011). En este contexto, la inoculación con los aislamientos LMg2, LMg15, y los pertenecientes al género *Bradyrhizobium* G2, Bar10, Bar11, BDM4 y LR6 indujeron la formación de nódulos efectivos en las plantas de *D. incanum* en condiciones *in vitro*. Esto permite agruparlos dentro de los rizobios, lo cual está en concordancia con la identificación asignada a la mayoría de ellos cuando se secuenció el gen *ARNr 16S* (Tabla 4.4).

Las dinámicas de nodulación evidenciaron diferencias entre aislamientos como LMg15, *Bradyrhizobium* sp. Bar10 y la cepa de referencia *B. embrapense* CNPSo 2833^T, que propiciaron una aparición de nódulos más temprana (a partir de los 18 días de la inoculación) y el aislamiento *Bradyrhizobium* sp. G2 con aparición más tardía (33 días después de la inoculación).

La heterogeneidad entre estos tratamientos podría reflejar diferencias en la capacidad de los aislamientos para establecer la simbiosis con las plantas de *D. incanum*, particularmente en las etapas iniciales de colonización. La cinética de formación de nódulos está estrechamente vinculada a la producción de factores de señalización bacterianos y a la capacidad de infección de los pelos radicales por el rizobio, procesos que determinan la velocidad de establecimiento de la simbiosis (Oldroyd et al., 2011; Denison & Kiers, 2011; Masson-Boivin et al., 2009). En especies modelo como *Medicago truncatula* y *Lotus japonicus*, la nodulación puede detectarse entre 7 y 12 días, mientras que en leguminosas de importancia agronómica como *Phaseolus vulgaris* y *Glycine max* suele registrarse entre 10 y 21 días, dependiendo de la interacción hospedero-simbionte y de las condiciones experimentales (Hungria & Vargas, 2000).

Por otro lado, se pudo constatar una variabilidad en el número de nódulos efectivos entre tratamientos (Tabla 4.5). Según lo reportado previamente, el número de nódulos y la presencia de nódulos con coloración rojiza (indicativa de actividad fijadora de nitrógeno) pueden no estar directamente asociados (Sprent, 2009). En este sentido, las plantas inoculadas con el aislamiento LMg15, si bien se destacaron por su elevado porcentaje de plantas noduladas y el promedio de nódulos por planta, no presentó el mayor porcentaje de nódulos efectivos. Por el contrario, las plantas que se inocularon con los aislamientos *Bradyrhizobium* sp. Bar10 y *Bradyrhizobium* sp. Bar11 mostraron un mayor porcentaje de nódulos efectivos, lo que sugiere una mayor eficiencia simbiótica. En la interacción leguminosa-rizobio, la planta selecciona las cepas más eficientes para el establecimiento de la simbiosis, contribuyendo así a la estabilidad evolutiva de la interacción (Kiers et al., 2003; Denison & Kiers, 2011). En este sentido, sería interesante evaluar en ensayos de co-inoculación si la planta presenta preferencia por alguno de los aislamientos en función de su eficiencia simbiótica.

Por otro lado, el aislamiento *Rhizobium* sp. BG2, pese a haber sido seleccionado por la presencia del gen *nifH* y a su afiliación al género *Rhizobium*, las plantas que se inocularon con él no presentaron nódulos. Este comportamiento podría estar asociado a una incompatibilidad específica entre el aislamiento y el hospedero, a que las condiciones del ensayo no hayan favorecido el establecimiento de la interacción, o a la ausencia de los genes necesarios para la nodulación, considerando que existen cepas dentro del género que no presentan capacidad nodulante (Masson-Boivin et al., 2009). La falta de asociación entre la detección del gen *nifH* y la formación de nódulos observada en algunos aislamientos pone de manifiesto que este gen, si bien está involucrado en la fijación biológica de nitrógeno, no constituye un marcador específico de simbiosis. En este sentido, su presencia no implica necesariamente la capacidad de establecer una interacción nodulante con el hospedero, lo cual es consistente con la amplia distribución del gen *nifH* en bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre o endófitas (Gaby & Buckley, 2014). Estos resultados evidencian la complejidad funcional de las comunidades bacterianas asociadas a los nódulos de *D. incanum*. Estudios previos han identificado cepas filogenéticamente cercanas a rizobios que carecen de capacidad nodulante, presentan determinantes simbióticos incompletos o han perdido genes esenciales para el establecimiento efectivo de la simbiosis (Masson-Boivin et al., 2009; Martínez-Romero, 2003). En este contexto, nuestros resultados subrayan que la identidad taxonómica por sí sola no permite predecir la funcionalidad simbiótica y refuerzan la necesidad de integrar enfoques genéticos y ensayos funcionales para caracterizar adecuadamente los microorganismos asociados a leguminosas.

En conjunto, este trabajo permitió obtener una colección de rizobios aislados de distintas regiones de Uruguay, cuya identificación molecular confirmó su pertenencia a géneros característicos del grupo. Algunos aislamientos presentaron valores comparables, y en parámetros específicos superiores a la cepa de referencia. En particular, los aislamientos *Bradyrhizobium* sp. Bar10 y Bar11 mostraron un mayor porcentaje de nódulos efectivos, mientras que el aislamiento LMg15 presentó valores comparables en el porcentaje de plantas noduladas y en el número promedio de nódulos por planta. Estos resultados evidencian el potencial de los simbiontes nativos y destacan la importancia de su adaptación a las condiciones edafoclimáticas locales. No obstante, la simbiosis está condicionada por factores abióticos y bióticos del suelo, por lo que resulta necesario en una siguiente etapa evaluar estos aislamientos en ensayos en maceta utilizando suelo como sustrato, a fin de determinar si los patrones observados *in vitro* se mantienen en un contexto más cercano a las condiciones naturales.

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Mediante la estrategia utilizada en este trabajo se logró generar una colección de 46 aislamientos bacterianos obtenidos a partir de nódulos de *Desmodium incanum* provenientes de seis departamentos de Uruguay.

Se identificaron ocho aislamientos que amplificaron el gen *nifH*, de los cuales el aislamiento BG2 fue asignado al género *Rhizobium*; los aislamientos G2, Bar10, Bar11, BDM4 y LR6 al género *Bradyrhizobium*; y los aislamientos LMg2 y LMg15 fueron identificados a nivel de familia (*Bradyrhizobiaceae*).

En los ensayos de inoculación *in vitro* se verificó la capacidad de nodulación en siete de los ocho aislamientos evaluados, todos ellos pertenecientes a la familia *Bradyrhizobiaceae* y cinco de ellos al género *Bradyrhizobium*. Los aislamientos LMg15, *Bradyrhizobium* sp. Bar10 y *Bradyrhizobium* sp. Bar11 mostraron un comportamiento comparable o superior al de la cepa perteneciente a la colección del MGAP, considerando el porcentaje de plantas noduladas, el número promedio de nódulos por planta y el porcentaje de nódulos efectivos.

Este trabajo constituye el primer reporte en Uruguay que caracteriza a nivel de género aislamientos bacterianos obtenidos a partir de nódulos de *D. incanum*.

A partir de los resultados obtenidos, se proponen futuras líneas de trabajo asociadas a las distintas etapas del estudio.

En relación con la colección de aislamientos, se sugiere ampliar el muestreo a regiones del país no incluidas en este trabajo y extender los tiempos de incubación en placa para favorecer la recuperación de rizobios de crecimiento lento.

Respecto a la caracterización molecular, se propone mejorar la identificación de los aislamientos con bajos porcentajes de identidad mediante la resecuenciación del gen o la incorporación de estrategias complementarias, como la secuenciación de otros genes *housekeeping* (por ejemplo, *recA*, *gyrB* o *dnaK*), así como la secuenciación del genoma completo. También se podría profundizar la caracterización de las cepas ya confirmadas como rizobios tanto a nivel genético mediante secuenciación de su genoma e identificación a nivel de especie, como en parámetros de crecimiento (tasa de crecimiento, tiempo de duplicación, respuesta a distintas condiciones de pH y temperatura, utilización

de diferentes fuentes de carbono y tolerancia a la salinidad). Adicionalmente, sería de interés realizar la caracterización del simbioma completo de los nódulos mediante estrategias de metabarcoding del gen *ARNr 16S*, con el fin de evaluar la diversidad de microorganismos asociados a estas estructuras.

Realizar ensayos de co-inoculación para evaluar competencia entre aislamientos y preferencia del hospedero durante la nodulación.

Finalmente, se recomienda validar la capacidad de nodulación mediante ensayos en maceta y a campo, empleando distintos tipos de suelo como sustrato, y cuantificar parámetros de promoción del crecimiento vegetal, con el fin de aproximarse a condiciones más cercanas al ambiente natural.

7. ANEXO

7.1 Medios de cultivo para bacterias

YM / Rojo congo

Manitol	10 g
K ₂ HPO ₄ anh.	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
YE	0,25 g
Glutamato	1 g
Agua destilada c.s.p.	1000 mL
Rojo Congo	25 mg

El pH se ajustó a 6,8 - 7,0.

TY

Triptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
CaCl ₂ anh.	0,05 g

Agua destilada c.s.p.	1000 mL
-----------------------	---------

El pH se ajustó a 7,0.

Para solidificar los medios, se utilizó agar a una concentración de 15 g/L. La esterilización de los mismos se realizó a 121 °C durante 15 minutos.

7.2 Medio de cultivo para plantas utilizado

Medio Jensen

CaHPO ₄	1,0 g
K ₂ HPO ₄ anh. 5 %	0,2 g
MgSO ₄ anh. 5 %	0,2 g
NaCl anh. 1 %	0,2 g
FeCl ₃	0,01 g
Solución micronutrientes	1 mL
Agua destilada c.s.p.	1000 mL

El pH se ajustó a 7,0.

Solución de micronutrientes

H ₃ BO ₃	0,28 g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,15 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,02 g
MoO ₃ .H ₂ O	0,008 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,008 g

Agua destilada c.s.p.	100 mL
-----------------------	--------

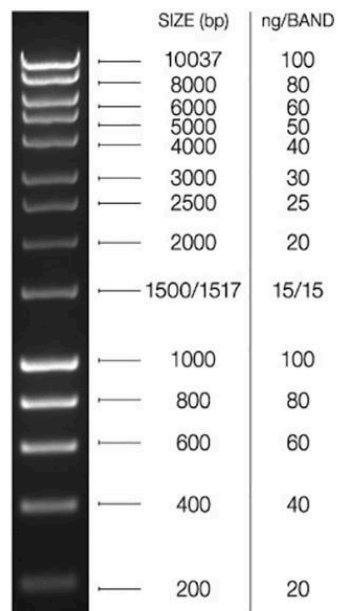
7.3 Soluciones utilizadas

Buffer Tris-Acético-EDTA (TAE) 1X

Tris-Acetato	0,04 M
EDTA pH 8,0	0,001 M

7.4 Marcador de peso molecular

HyperLadder™ 1 kb (Meridian Bioscience)



7.5 Lista de los aislamientos de la colección detallando la morfología de las colonias en medio YMA.

Aislamiento	Morfología de las colonias en YMA^(a)
BP6	1, B
BP7	1-2, RCO
BG2	<1, T
BG3	1-2, T, M
AB1	4-5, M
AB2	3-4, RCO
AB13	3-4, B
AB3	3-4, RCO
AB15	3-4, B
BH3	1-2, T
LMg1	2-3, RO, RE,

	M
LMg2	1, T, S
LMg3	2, R, I, S
LMg4	1, RO, I, M
LMg5	<1, RO, RE, S
LMg6	1, R, RE, S
LMg7	1, RO, I, M
LMg8	2, T, RE, M
LMg10	<1
LMg11	1-2, RO, RE, M
LMg12	1
LMg15	RO, M
BDM1	RO, RE, M
BDM2	2, RO, RE, S
BDM3	3-4, R, I, S
BDM4	1-1.5, R, RE, S
BU1	
BU3	1, RO, RE, M
BU4	
BU5	T, I, S
BU10	<1, T, RE, S
G1	1-2
G2	
G3	1
G4	
G5	RO, RE, M
G6	1, RO, RE, M
G7	2, RO, I, M
Bar1	3-4, T
Bar4	<1, T
Bar5	<1, RCO

Bar10	3, RO, M
Bar11	3, T, M
LR1	RO
LR6	3-4, RO, M
LR7	RO

^(a)diámetro de la colonia, coloración blanquecina (B), coloración rojiza con centro más oscuro (RCO), translúcidas (T), coloración roja (R), coloración rosa (RO), mucosa (M), seca (S), borde regular (RE), borde irregular (I).

En algunos aislamientos no fue posible completar la caracterización morfológica, debido al tamaño reducido de las colonias y a su alta transparencia, lo que impidió la evaluación de una o más de las características consideradas.

8. BIBLIOGRAFÍA

Abd-Alla, M. H., Nafady, N. A., Hassan, A. A., & Bashandy, S. R. (2024). Isolation and characterization of non-rhizobial bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi from legumes. *BMC Microbiology*, 24, 454.

Andrews, M., & Andrews, M. E. (2017). Specificity in legume-rhizobia symbioses. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4), 705. <https://doi.org/10.3390/ijms18040705>

Ben-Laouane, R., Ait-El-Mokhtar, M., Meddich, A., & Baslam, M. (2026). Nodule–microbiome dynamics: Deciphering the complexities of nodule symbiosis and the root microbiome. *International Journal of Molecular Sciences*, 27(3), 1487. <https://doi.org/10.3390/ijms27031487>

Berg, G., Rybakova, D., Grube, M., & Köberl, M. (2016). The plant microbiome explored: Implications for experimental botany. *Journal of Experimental Botany*, 67(4), 995–1002. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv466>

Berretta, E. J. (1998). Efecto del pastoreo y de la introducción de especies en la evolución de la composición botánica de pasturas naturales. En E. J. Berretta (Ed.), *Seminario de actualización en tecnologías para basalto* (Serie Técnica INIA No. 102, pp. 91–97). INIA.

Beyhaut, E., Caraballo, P., Illarze, G., & Sicardi, M. (2012). Inter-cropped perennial legumes in commercial *Eucalyptus* spp. plantations enhance soil quality. *Agrociencia Uruguay*, 16(3), 71–75. <https://doi.org/10.31285/AGRO.16.648>

Brazeiro, A., et al. (2020). *Biodiversidad del pastizal: clave para la sostenibilidad ganadera*. Revista Iberoamericana de Ciencia y Tecnología para la Agricultura.

Cibele, J., et al. (1997). Superação da dormência de sementes de carrapicho-beiço-de-boi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 32(2), 173–178. <https://doi.org/10.1590/S0100-83581997000200003>

Compant, S., Clément, C., & Sessitsch, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(5), 669–678. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.024>

Costa, A., Panzera, M., Roldán, D. M., et al. (2023). Diversity of *Bradyrhizobium* strains that nodulate *Lupinus* species native to Uruguay. *Environmental Sustainability*, 6, 195–211. <https://doi.org/10.1007/s42398-023-00263-y>

Crosa, M., Oliveira, A., Goyenola, R., & Frioni, L. (1999). Symbiotic relationships between native ecotypes of *Desmodium incanum* and rhizobia in Uruguay. *Agrociencia Uruguay*, 3(1), 38–42.

Delamuta, J. R. M., Ribeiro, R. A., Ormeño-Orrillo, E., Parma, M. M., Melo, I. S., Martínez-Romero, E., & Hungria, M. (2015). *Bradyrhizobium tropiciagri* sp. nov. and *Bradyrhizobium embrapense* sp. nov., nitrogen-fixing symbionts of tropical forage legumes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65, 4424–4433. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000592>

Denison, R. F., & Kiers, E. T. (2011). Life histories of symbiotic rhizobia and mycorrhizal fungi. *Current Biology*, 21(18), R775–R785. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.06.018>

Du, M., Gao, Z., Li, X., & Liao, H. (2020). Excess nitrate induces nodule greening and reduces transcript and protein expression levels of soybean leghaemoglobins. *Annals of Botany*, 126(1), 61–72. <https://doi.org/10.1093/aob/mcaa002>

Fabiano, E., Platero, R., Irisarri, P., Azziz, G., Morel, M., & Monza, J. (2023). Rhizobia biodiversity in Uruguay: Preservation and uses. *Environmental Sustainability*. <https://doi.org/10.1007/s42398-023-00278-5>

Gaby, J. C., & Buckley, D. H. (2014). A comprehensive evaluation of PCR primers to amplify the *nifH* gene of nitrogenase. *PLoS ONE*, 9(7), e105381. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105381>

Gaby, J. C., & Buckley, D. H. (2017). The use of degenerate primers in qPCR analysis of functional genes can cause dramatic quantification bias as revealed by investigation of *nifH* primer performance. *Microbial Ecology*, 74(3), 701–708. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-0968-0>

Geurts, R., & Bisseling, T. (2002). Rhizobium Nod factor perception and signalling. *The Plant Cell*, 14(Suppl.), S239–S249. <https://doi.org/10.1105/tpc.002451>

Glick, B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: Mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012, 963401. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>

Gu, J., Wang, E. T., & Chen, W. X. (2007). *Genetic diversity of rhizobia associated with Desmodium species grown in China*. *Letters in Applied Microbiology*, 44(3), 286–292. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02071.x>

Gyaneshwar, P., Hirsch, A. M., Moulin, L., Chen, W. M., Elliott, G. N., Bontemps, C., Estrada-de Los Santos, P., Gross, E., Dos Reis, F. B., Sprent, J. I., Young, J. P., & James, E. K. (2011). *Legume-nodulating betaproteobacteria: Diversity, host range, and*

future prospects. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(11), 1276–1288.
<https://doi.org/10.1094/MPMI-06-11-0172>

Hungria, M., & Vargas, M. A. T. (2000). Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crops Research*, 65(2–3), 151–164. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(99\)00083-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(99)00083-7)

INIA. (2011). *Campo natural: conocimiento y estrategias para su manejo sustentable*.

Izaguirre, P., & Beyhaut, R. (1997). *Las leguminosas en Uruguay y regiones vecinas. Parte 1: Papilionoideae*. Editorial Hemisferio Sur.

Jaurena, M., Mayans, M., Punschke, K., Reyno, R., Millot, J. C., & Labandera, C. (2005). Diversidad simbiótica en leguminosas forrajeras nativas: Aportes para el mejoramiento sustentable del campo natural. En R. Gómez Miller & M. M. Albicette (Eds.), *Seminario de actualización técnica en manejo de campo natural* (Serie Técnica N.º 151). Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA).

Kiers, E. T., Rousseau, R. A., West, S. A., & Denison, R. F. (2003). Host sanctions and the legume–rhizobium mutualism. *Nature*, 425(6953), 78–81.
<https://doi.org/10.1038/nature01931>

Laguerre, G., Nour, S. M., Macheret, V., Sanjuan, J., Drouin, P., & Amarger, N. (2001). Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology (Reading, England)*, 147(Pt 4), 981–993. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-4-981>

Lezama, F., Pereira, M., Altesor, A., & Paruelo, J. M. (2019). Grasslands of Uruguay: Classification based on vegetation plots. *Phytocoenologia*, 49(3), 211–229. <https://doi.org/10.1127/phyto/2019/0215>

Li, X., Zhang, Y., Wang, P., Chen, L., Liu, H., & Zhao, J. (2025). Regulation of nodule senescence and nitrogen fixation in legumes. *Nature Communications*, 16, 1234.
<https://doi.org/10.1038/s41467-025-64708-0>

Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63, 541–556.
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>

Marchesi, E., Mailhos, A., & Bonifacino, J. M. (2026). *Desmodium incanum* (Sw.) DC. En: Marchesi E., Mailhos A. & Bonifacino J.M. (Eds.). *Flora Uruguaya: Flora Vascular*

del Uruguay. ISSN 3121-2050, V1.0. [Data set] 13-01-2026. Zenodo.
<https://doi.org/10.5281/zenodo.18272759>

Martínez-Hidalgo, P., & Hirsch, A. M. (2017). The nodule microbiome: N₂-fixing rhizobia do not live alone. *Phytobiomes Journal*, 1(2), 70–82.
<https://doi.org/10.1094/PBIOMES-12-16-0019-RVW>

Martínez-Romero, E. (2003). Diversity of Rhizobium–Phaseolus vulgaris symbiosis: Overview and perspectives. *Plant and Soil*, 252, 11–23.
<https://doi.org/10.1023/A:1024199013926>

Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., & Batut, J. (2009). Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: How many rhizobium recipes? *Trends in Microbiology*, 17(10), 458–466. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.07.004>

Mello, A. L., Lezama, F., & Baeza, S. (2023). Patrones y controles regionales de la fragmentación de pastizales naturales en Uruguay. *Ecosistemas*, 32(2), Article 2534. <https://doi.org/10.7818/ecos.2534>

Ministerio de Ambiente. (2024). *Informe del estado del ambiente en Uruguay 2024*. Gobierno de Uruguay.

Modernel, P., Rossing, W. A. H., Corbeels, M., Dogliotti, S., Picasso, V., & Tiftonell, P. (2016). Land use change and ecosystem service provision in Pampas and Campos grasslands of southern South America. *Environmental Research Letters*, 11(11), 113002. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/11/11/113002>

Mundra, S., Shockey, J., & Morsy, M. (2023). Editorial: Plant microbiome: Ecology, functions, and application trends. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1175556. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1175556>

Mutch, L. A., Young, J. P. W., & colaboradores. (2013). Genetic diversity of resident soil rhizobia isolated from nodules of hairy vetch (*Vicia villosa*). *Applied Soil Ecology*, 64, 201–213. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.12.010>

Nakei, M. D., Venkataramana, P. B., & Ndakidemi, P. A. (2022). Soybean-nodulating rhizobia: Ecology, characterization, diversity, and growth promoting functions. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 6, 824444. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2022.824444>

Oldroyd, G. E. D., & Downie, J. A. (2008). Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 519–546. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092839>

Oldroyd, G. E. D., Murray, J. D., Poole, P. S., & Downie, J. A. (2011). The rules of engagement in the legume–rhizobial symbiosis. *Annual Review of Genetics*, *45*, 119–144. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132549>

Ormeño-Orrillo, E., & Martínez-Romero, E. (2019). A genomotaxonomy view of the *Bradyrhizobium* genus. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 1334. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01334>

Palmer, K. M., & Young, J. P. W. (2000). Higher diversity of *Rhizobium leguminosarum* populations in arable soils than in grass soils. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(6), 2445–2450. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.6.2445-2450.2000>

Perret, X., Staehelin, C., & Broughton, W. J. (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *64*(1), 180–201. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.1.180-201.2000>

Pereira-Gómez, M., Ríos, C., Zabaleta, M., Lagurara, P., Galvalisi, U., Iccardi, P., Azziz, G., Battistoni, F., Platero, R., & Fabiano, E. (2020). Native legumes of the Farrapos protected area in Uruguay establish selective associations with rhizobia in their natural habitat. *Soil Biology and Biochemistry*, *148*, 107854. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107854>

Platero, R., James, E. K., Ríos, C., Iriarte, A., Sandes, L., Zabaleta, M., Battistoni, F., & Fabiano, E. (2016). Novel *Cupriavidus* strains isolated from root nodules of native Uruguayan *Mimosa* species. *Applied and Environmental Microbiology*, *82*(11), 3150–3164. <https://doi.org/10.1128/AEM.00389-16>

Poly, F., Ranjard, L., Nazaret, S., Gourbière, F., & Monrozier, L. J. (2001). Comparison of *nifH* gene pools in soils and soil microenvironments with contrasting properties. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*(5), 2255–2262. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.5.2255-2262.2001>

Protachevicz, A. P., Paulitsch, F., Klepa, M. S., Hainosz, J., Olchanheski, L. R., Hungria, M., & Batista, J. S. S. (2023). Pioneering *Desmodium* spp. are nodulated by natural populations of stress-tolerant alpha- and beta-rhizobia. *Brazilian Journal of Microbiology*, *54*(4), 3127–3135. <https://doi.org/10.1007/s42770-023-01113-z>

Rebuffo, M., Bemhaja, M., & Risso, D. F. (2006). Uso de leguminosas forrajeras en sistemas pastoriles: Situación actual de Uruguay. En *Lotus Newsletter* (Vol. 36, N.º 2, pp. 22–33). Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA).

Reyno, R., Jaurena, M., Real, D., Zarza, M., Merola, R., Viana, A., Dalla Rizza, M., & Labandera, C. (2006). Evaluación de leguminosas forrajeras promisorias en la zona de areniscas. En M. Bemhaja & O. Pittaluga (Eds.), *30 años de investigación en suelos de areniscas* (pp. 57–60). Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA).

Shah, M. (2014). An application of sequencing batch reactors in the identification of microbial community structure from an activated sludge. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 2(4), 176–184. <https://doi.org/10.12691/jaem-2-4-11>

Sprent, J. I. (2009). *Legume nodulation: A global perspective*. Wiley-Blackwell.

Sprent, J. I., & James, E. K. (2007). *Legume evolution: Where do nodules and mycorrhizas fit in?* *Plant Physiology*, 144(2), 575–581. <https://doi.org/10.1104/pp.107.096156>

Sprent, J. I., Ardley, J., & James, E. K. (2017). Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts. *New Phytologist*, 215(1), 40–56. <https://doi.org/10.1111/nph.14474>

Taulé, C., Zabaleta, M., Mareque, C., Platero, R., Sanjurjo, L., Sicardi, M., Frioni, L., Battistoni, F., & Fabiano, E. (2012). New betaproteobacterial *Rhizobium* strains able to efficiently nodulate *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(6), 1692–1700. <https://doi.org/10.1128/AEM.06215-11>

Taulé, C., Mareque, C., Barlocco, C., Hackembruch, F., Reis, V. M., Sicardi, M., & Battistoni, F. (2012). The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. *Plant and Soil*, 356(1–2), 35–49.

Toniutti, M. A., Fornasero, M. L., Albicoro, F. J., Martini, M. C., Draghi, W. O., Alvarez, F., Lagares, A., Pensiero, J. F., & Del Papa, M. F. (2017). Nitrogen-fixing rhizobial strains isolated from *Desmodium incanum* DC in Argentina: Phylogeny, biodiversity and symbiotic ability. *Systematic and Applied Microbiology*, 40(5), 297–307. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.04.004>

Tropical Forages. (s. f.). *Desmodium*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), International Livestock Research Institute (ILRI) & partners. Recuperado el 26 de febrero de 2026 de <https://www.tropicalforages.info>

Turner, T. R., James, E. K., & Poole, P. S. (2013). The plant microbiome. *Genome Biology*, 14, 209. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-6-209>

- Udvardi, M., & Poole, P. (2013). Transport and metabolism in legume–rhizobia symbioses. *Annual Review of Plant Biology*, 64, 781–805. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120235>
- Vandenkoornhuysse, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Le Van, A., & Dufresne, A. (2015). The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist*, 206(4), 1196–1206. <https://doi.org/10.1111/nph.13312>
- Vincent, J. M. (1970). *A manual for the practical study of root-nodule bacteria*. International Biological Programme Handbook. Blackwell Scientific Publications.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). *16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study*. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697–703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>
- Zehr, J. P., Jenkins, B. D., Short, S. M., & Steward, G. F. (2003). *Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: A cross-system comparison*. *Environmental Microbiology*, 5(7), 539–554. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00451.x>
- Zgad Zaj, R., James, E. K., Kelly, S., Kawaharada, Y., de Jonge, N., Jensen, D. B., ... & Radutoiu, S. (2016). A legume genetic framework controls infection of nodules by symbiotic and endophytic bacteria. *PLoS Genetics*, 12(6), e1006020. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006020>
- Ziliotto, M., Kulmann-Leal, B., Roitman, A., Bogo Chies, J. A., & Ellwanger, J. H. (2023). Pesticide pollution in the Brazilian Pampa: Detrimental impacts on ecosystems and human health in a neglected biome. *Pollutants*, 3(2), 280–292. <https://doi.org/10.3390/pollutants3020020>

