

**UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA
FACULTAD DE AGRONOMIA**

***TRIFOLIUM REPENS*: EVALUACIÓN DE LA COMPETITIVIDAD DE
INOCULANTES RIZOBIANOS VS CEPAS NATIVAS Y DE TÉCNICAS DE
INOCULACIÓN**

por

**Patricio GOMEZ LOHIGORRY
Marcos MILLER DIAZ**

**TESIS presentada como uno de
los requisitos para obtener el
título de Ingeniero Agrónomo**

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2013**

Tesis aprobada por:

Director:

Dr. Jorge Monza

Ing. Agr. (MSc) Mónica Rebuffo

Ing. Agr. (MSc) Pilar Irisarri

Fecha:

17 de julio de 2013

Autor:

Patricio Gómez Lohigorry

Marcos Miller Díaz

AGRADECIMIENTOS

A nuestro director de tesis Dr. Jorge Monza por estar siempre a disposición y predispuesto al trabajo.

A todo el grupo del laboratorio de Bioquímica, especialmente a Maxi, Francisco, Gastón y Leti.

A la Ing. Agr. Mónica Rebuffo codirectora, por su apoyo en los ensayos a campo realizados en las estaciones experimentales INIA Tacuarembó e INIA La Estanzuela.

A nuestras familias.

A Fede y Eri.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PAGINA DE APROBACION.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VI
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	2
2.1. RESERVORIOS DE NITRÓGENO.....	2
2.2. MICROORGANISMOS DIAZÓTROFOS.....	3
2.3. LA NODULACIÓN: PROCESO EN EL QUE PARTICIPAN SEÑALES DE LA PLANTA, DE LA BACTERIA Y CONDICIONES DEL MEDIO.....	4
2.3.1. <u>Comunicación bacteria – planta</u>	4
2.3.2. <u>Las condiciones del medio afectan la nodulación</u>	5
2.3.2.1. Temperatura y nodulación.....	6
2.3.2.2. Nodulación y concentración de nitrógeno combinado en el suelo.....	7
2.3.3. <u>Competitividad entre cepas de rizobios</u>	9
2.3.4. <u>Condiciones ambientales</u>	9
2.4. FERTILIZACIÓN QUÍMICA Y FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO EN LA AGRICULTURA.....	10
2.5. EL TRÉBOL BLANCO: CARACTERÍSTICAS Y SOS.....	11
2.6. URUGUAY TIENE UNA POSICIÓN VENTAJOSA EN LA PRÁCTICA DE INOCULAR LEGUMINOSAS FORRAJERAS...	13
2.7. INOCULACIÓN DE LEGUMINOSAS FORRAJERAS EN URUGUAY.....	14
2.8. SELECCIÓN DE CEPAS.....	16
2.8.1. <u>La eficiencia simbiótica y la competitividad son características usadas en la selección de cepas comerciales...</u>	16
2.8.2. <u>La generación de <i>fingerprinting</i> por PCR permite identificar cepas.....</u>	17
2.8.3. <u>Los genes delatores son una herramienta útil para evaluar la ocupación de nódulos en condiciones de laboratorio.....</u>	17
2.9. UTILIZACIÓN DE CEPAS NATIVAS COMO INOCULANTES	

COMERCIALES.....	18
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	19
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	19
3.2. CRECIMIENTO DE BACTERIAS Y PREPARACIÓN DE INÓCULOS.....	20
3.3. CRECIMIENTO DE PLANTAS EN CONDICIONES <i>IN-VITRO</i> ...	21
3.3.1. <u>Esterilización y germinación de las semillas</u>	21
3.3.2. <u>Medio de crecimiento</u>	21
3.3.3. <u>Condiciones de crecimiento</u>	22
3.4. NODULACIÓN EN DIFERENTES SUELOS.....	22
3.5. OCUPACIÓN DE NÓDULOS A CAMPO.....	23
3.5.1. <u>Aislamiento de bacterias de los nódulos</u>	24
3.5.2. <u>Aislamiento del ADN genómico de rizobios</u>	24
3.5.3. <u>Amplificación de ADN genómico por PCR y resolución de perfiles</u>	25
3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	25
4. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	27
4.1. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRELA NODULACIÓN...	27
4.2. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO COMBINADO SOBRE LA NODULACIÓN.....	29
4.2.1. <u>Nodulación con diferentes concentraciones de NO₃</u>	29
4.2.2. <u>Cinética de nodulación según la concentración de NO₃</u>	30
4.2.3. <u>Consideraciones agronómicas</u>	31
4.3. EVALUACIÓN DE LA COMPETITIVIDAD DE DOS INOCULANTES EN DIFERENTES SUELOS DEL URUGUAY	33
4.4. EVALUACIÓN DE LA NODULACIÓN EN SEMILLAS PREINOCULADAS Y CON INOCULACIÓN CONVENCIONAL	36
5. <u>CONCLUSIONES</u>	42
6. <u>RESUMEN</u>	43
7. <u>SUMMARY</u>	44
8. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	45

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Distribución y cantidad de nitrógeno en distintos estratos.....	2
2. Temperatura promedio de 2008, 2009 y 2010 para los meses de otoño e inicio de invierno.....	7
3. Trébol rojo y blanco en Uruguay. A. Producción y distribución de trébol blanco y rojo en Uruguay. B. Fijación de N por las principales leguminosas sembradas en Uruguay.....	12
4. Evolución de la superficie total de mejoramientos forrajeros en el Uruguay por departamento entre el 2001 y el 2009.....	15
5. Características de las cepas de <i>Rhizobium leguminosarum</i> y de los trasncjugantes derivados de la cepa comercial (U204:: <i>gusA</i>) y de la cepa nativa (317:: <i>gusA</i>).....	19
6. Composición del medio YEM.....	20
7. Composición del medio Jensen.....	21
8. Procedencia, tipo e historia de los suelos.....	22
9. Esquema de aleatorización de los cilindros de suelos.....	23
10. Equivalencia entre la concentración de NO_3^- en ppm y mM.....	29
11. Número total de nódulos analizados cuando se realizó inoculación convencional y preinoculación.....	41
Figura No.	
1. Microscopía electrónica de una célula nodular infectada.....	4
2. Estructura de los factores Nod.....	5
3. Proceso de infección rizobio – leguminosa.....	6
4. Evolución del N como NO_3^- en un suelo de Uruguay.....	7

5. Entrada y salida de nitrógeno de los ecosistemas.....	10
6. Producción de materia seca por trébol blanco según el número de rizobios por semilla en el momento de la siembra.....	16
7. Nódulos ocupados por una cepa marcada con el gen <i>gusA</i>	18
8. Esquema del transposón mTn5SS <i>gusA</i> 31.....	20
9. Esquema de siembra para ambos tipos de suelo.....	24
10. Cinética de nodulación.....	28
11. Número de nódulos por planta promedio.....	30
12. Cinética de nodulación en distintas concentraciones de NO ₃	31
13. Crecimiento de plantas noduladas en diferentes concentraciones de NO ₃	32
14. Ocupación de nódulos por dos inoculantes en distintos suelos.....	34
15. Porcentaje de nódulos ocupados por las cepas usadas como inoculantes y las cepas nativas.....	35
16. Número total de nódulos por planta promedio ocupados por las cepas marcadas con <i>gusA</i>	36
17. Perfiles ERIC de aislados de nódulos.....	38
18. Perfiles BOX de aislados de nódulos.....	39
19. Fracción de nódulos ocupados cuando se usó inoculación convencional y preinoculación.....	40

1. INTRODUCCIÓN

En Uruguay, las leguminosas usadas en el mejoramiento de praderas son principalmente los Lotus (*Lotus corniculatus*, *L. uliginosus* Schkuhr y *L. subbiflorus* Lag), alfalfa (*Medicago sativa*) y tréboles (*Trifolium pratense* y *T. repens*). El trébol rojo y el trébol blanco son leguminosas que tienen las mayores tasas de crecimiento en otoño e invierno, con un destacado aporte de forraje de alta calidad en sistemas intensivos lecheros y ganaderos (Díaz Lago et al., 1996). Estas leguminosas tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, pero para ello es necesaria la simbiosis con bacterias diazótroficas, colectivamente llamadas rizobios. Con estas bacterias se desarrollan a nivel mundial inoculantes para promover la fijación de nitrógeno atmosférico (N₂).

Si bien Uruguay tiene una posición destacada en la producción y uso de inoculantes rizobianos, hay dos situaciones que deben considerarse. Una es el desplazamiento de las explotaciones lecheras y ganaderas intensivas a suelos marginales por la expansión del área agrícola (Díaz 2011, URUGUAY. MGAP. DIEA 2011), y la otra es el abandono progresivo de los agricultores de la práctica de inocular, porque no siempre encuentran el beneficio esperado de la inoculación.

Es necesario entonces contar con inoculantes que permitan mejorar la implantación, producción y duración de las praderas en este escenario. En esta tesis nos propusimos evaluar una cepa nativa promisorias, colectada y caracterizada parcialmente en trébol rojo, en el marco del proyecto FONTAGRO FTG-787/05 (2008), llevado adelante entre Facultad de Agronomía e INIA. También se entendió necesario evaluar cómo afecta a la nodulación la temperatura y la concentración de NO₃⁻ del suelo, factores que pueden ser determinantes en el éxito de la pradera.

En la implantación de la pradera se debe tener en cuenta la técnica de inoculación. Usualmente en nuestro país se realiza la inoculación de semillas con inoculante en base turba, a la concentración recomendada por las fábricas, según la normativa del MGAP. Esta práctica consiste en adherir a las semillas el inoculante, para sembrarlas en un período de tiempo breve y con determinados cuidados. Otra estrategia consiste en aumentar la concentración del inoculante para favorecer la ocupación de nódulos. Recientemente comenzó a usarse semilla preinoculada. Esta alternativa facilita la logística en leguminosas de semilla grande, como soja. Sin embargo en leguminosas de semilla pequeña, como trébol blanco, hay poca información sobre la viabilidad de esta práctica.

El mejorar la fijación de nitrógeno a través del uso de inoculantes eficientes y competitivos permite ahorro en el uso de fertilizantes nitrogenados, disminuye el riesgo de contaminación con nitratos y se promueven así prácticas sustentables.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 RESERVORIOS DE NITRÓGENO

El nitrógeno es un nutriente esencial para los vegetales, y uno de los principales constituyentes de compuestos como aminoácidos, proteínas, enzimas, ácidos nucleicos y clorofilas, entre otros. Las principales reservas de nitrógeno son las rocas ígneas, sedimentos fósiles, compuestos orgánicos del fondo marino, y la atmósfera, en la cual el 78 % se encuentra bajo la forma de N₂ (Cuadro 1). Estas reservas no están disponibles a corto plazo para las plantas (Perdomo y Barbazán, 2008), y a pesar de su abundancia es un nutriente limitante en la producción agropecuaria debido a la pequeña fracción disponible, y al alto requerimiento que tienen los vegetales.

Cuadro 1. Distribución y cantidad de nitrógeno en distintos estratos.

Estrato	Tg de N
<i>Litósfera</i>	1,63 x 10 ¹¹
Rocas Ígneas	
Corteza	1,0 x 10 ⁹
Manto	1,62 x 10 ¹¹
Núcleo de la Tierra	1,3 x 10 ⁸
Sedimentos Fósiles	3,5-5,5 x 10 ⁸
Carbón	1,0 x 10 ⁵
Compuestos orgánicos del fondo marino	5,4 x 10 ⁵
Suelo	
Materia orgánica	2,2 x 10 ⁵
NH ₄ ⁺ fijado en arcillas	2,0 x 10 ⁴
<i>Atmósfera</i>	3,86 x 10 ⁹
<i>Hidrosfera</i>	2,3 x 10 ⁷
<i>Biósfera</i>	2,8 x 10 ⁵

Tg = Teragramo, que equivale a un millón de toneladas métricas.

Fuente: Perdomo y Barbazán (2008).

Los vegetales absorben nitrógeno de la solución del suelo como amonio (NH₄⁺) y como nitrato (NO₃⁻). Sin embargo la mayor parte del nitrógeno presente en el suelo se encuentra en restos de animales, vegetales y microorganismos, en forma orgánica no disponible para las plantas. Para que se haga disponible es necesaria la mineralización, proceso que realizan microorganismos del suelo.

Por otra parte, el N₂ atmosférico sólo puede ser reducido a NH₃ por un grupo minoritario de procariotas, y bajo esa forma puede ser asimilado por las plantas. Este

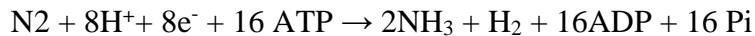
proceso, llamado Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) lo realizan sólo los microorganismos denominados diazótrofos o fijadores de nitrógeno.

2.2 MICROORGANISMOS DIAZÓTROFOS

Los microorganismos diazótrofos se encuentran libres en suelos y aguas, o establecen diferentes grados de relación con las plantas. Estas relaciones van desde microorganismos que viven sobre las raíces de manera más o menos específica, hasta los que lo hacen dentro de las plantas, como los endófitos generalmente en los espacios intercelulares, o dentro de las células como los rizobios.

Todos los diazótrofos tienen en común una enzima, la nitrogenasa, que cataliza la reducción N_2 a NH_3 . Esta reacción es la responsable del ingreso a los ecosistemas, a nivel global, de unas 250×10^6 T nitrógeno \times año⁻¹ (Monza y Palacios, 2004). De todas formas hay otras vías de ingreso de nitrógeno de menor importancia cuantitativa, inferiores al 5%, como las descargas eléctricas y de la liberación a partir de rocas.

La nitrogenasa es un complejo enzimático compuesto básicamente por dos proteínas, la Fe-S (dinitrogenasa reductasa) y la Mo-Fe (dinitrogenasa). Los requisitos de esta enzima son energía (ATP) y poder reductor (NAD(P)H), que en el caso de las leguminosas, el bacterioide genera a partir de la fuente carbonada suministrada por la planta, principalmente succinato (Monza y Palacios, 2004). La reacción resume la reducción fuertemente endérgica, catalizada por la nitrogenasa.



Una característica de la nitrogenasa es que se daña irreversiblemente por O_2 . Por esta razón los diazótrofos desarrollaron diferentes mecanismos de protección frente al O_2 . *Azotobacter*, que fija en vida libre, protege a la nitrogenasa mediante la formación de una pared celular engrosada y mucoide que dificulta la difusión de gases, y por el aumento de su respiración. Estos mecanismos mantienen condiciones microaerofílicas en el entorno celular y hacen posible la actividad nitrogenasa. En cianobacterias con heterocistos, la pared celular engrosada que limita esas células limita la permeabilidad gaseosa, pero además no poseen fotosistema II que es el que produce O_2 . De esta manera, es posible la actividad nitrogenasa por la separación espacial que se da entre la fotosíntesis y la fijación de nitrógeno (Monza y Palacios, 2004).

Los rizobios, fijadores de nitrógeno endocelulares, tienen una proteína clave, la leghemoglobina que hace posible la FBN. Esta proteína que da el color rojo característico a los nódulos funcionales, se une al O_2 y lo libera gradualmente en la medida que es consumido por la respiración del rizobio. Es decir, hace posible que la bacteria respire sin que quede O_2 libre y dañe irreversiblemente a la nitrogenasa. La relación entre el O_2 ligado a leghemoglobina y el O_2 libre en la célula nodular es del

orden de 10.000:1 (Madigan et al., 2003). Una evidencia interesante de la simbiosis rizobio - leguminosa está dada por coordinación en la síntesis de leghemoglobina; mientras que la planta sintetiza la fracción proteica, la bacteria produce el grupo hemo (Monza y Palacios, 2004).

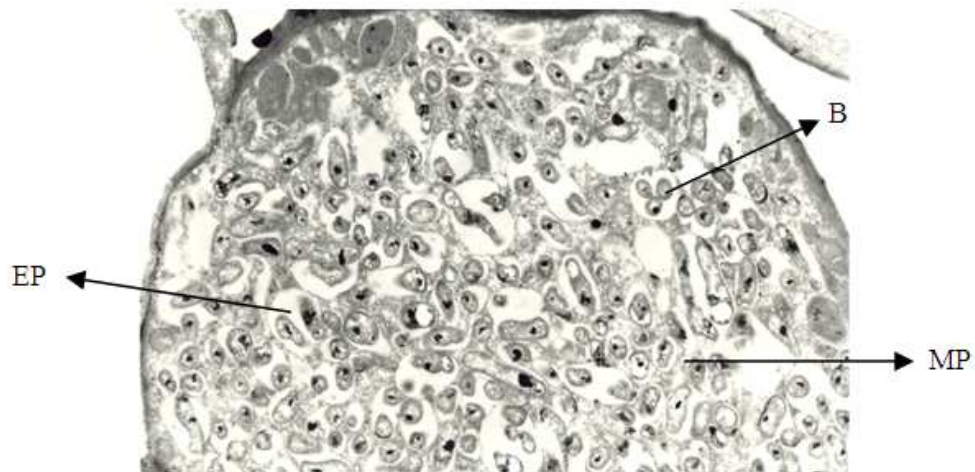


Figura 1. Microscopía electrónica de una célula nodular infectada. B bacteroides, que corresponde al rizobio en estado simbiótico, MP membrana peribacteroidal de origen vegetal. EP espacio peribacteroidal, situado entre el bacteroide y la MP, allí se encuentra la leghemoglobina

Fuente: Monza y Palacios (2004).

2.3 LA NODULACIÓN: PROCESO EN EL QUE PARTICIPAN SEÑALES DE LA PLANTA, DE LA BACTERIA Y CONDICIONES DEL MEDIO

2.3.1 Comunicación bacteria – planta

La comunicación bacteria - planta empieza por la secreción de exudados radicales de distintas moléculas, entre ellas flavonoides, especialmente en condiciones limitantes de nitrógeno (Taiz y Zeiger, 1998). Los flavonoides desencadenan una respuesta quimiotáctica que hace que los rizobios migren hacia los pelos radicales, y además se unen a la proteína reguladora Nod D, que induce la expresión de los genes *nod*.

En *Rhizobium leguminosarum* los genes *nod* se encuentran en el plásmido simbiótico. Los genes *nodABC*, comunes en todos los rizobios codifican las enzimas necesarias para la síntesis de la estructura básica, el lipoquitín oligosacárido (LPQ) (Figura 2). Los genes *nod* específicos codifican enzimas que modifican al LPQ (Figura 2) y determinan la especificidad por el hospedador (Madigan et al., 2003).

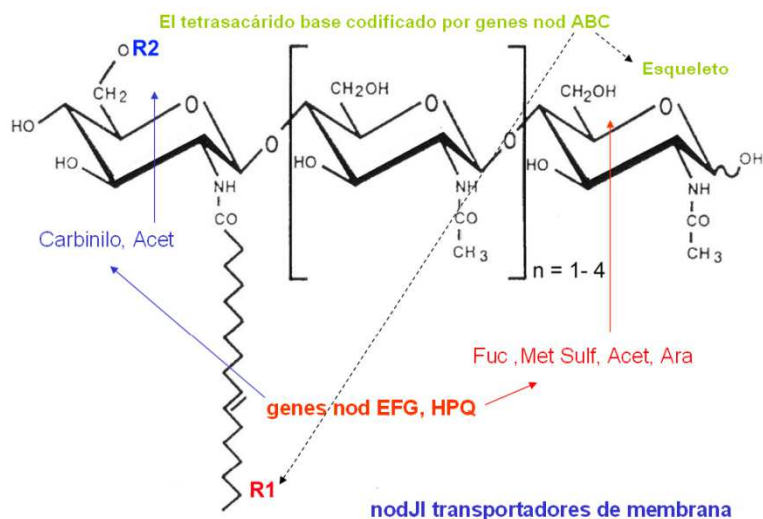


Figura 2. Estructura de los factores Nod. Los genes *nod* ABC codifican para el oligosacárido común en todos los rizobios. Los genes *nod* E, F, G, H, P y Q codifican para enzimas que realizan modificaciones del oligosacárido y confieren especificidad.

La bacteria libera factores Nod que inducen la curvatura del pelo radical. En esas zonas, la membrana se invagina y da lugar al tubo de infección, por el que penetran y se multiplican los microorganismos hasta llegar a las células del cortex de la raíz (Figura 3). Cuando el tubo de infección alcanza las células corticales, los rizobios entran a ellas y quedan envueltos por una membrana de origen vegetal, la membrana peribacteroidal (Figura 3). Las células vegetales proliferan y forman el nódulo. A su vez, los rizobios dentro de la planta se diferencian en bacteroides, que es donde ocurre la reducción de N_2 a NH_3 , a partir del poder reductor y energía suministrada por la planta. En esto consiste la simbiosis rizobio – leguminosa, en la que ambos organismos se benefician.

Si bien los bacteroides no tienen capacidad de división, cuando la planta muere los rizobios que están en los cordones de infección quedan libres en el suelo y pueden infectar otras raíces (Monza y Palacios, 2004).

2.3.2 Las condiciones del medio afectan la nodulación

La temperatura del suelo, la concentración de nitrógeno combinado y la presencia de cepas de rizobios nativas, afectan a la nodulación y a la fijación de N_2 . Por esta razón esos factores deben ser considerados, dada su importancia en la elección de la época de siembra, en la aplicación de fertilizantes y en la ocupación de nódulos por el inoculante.

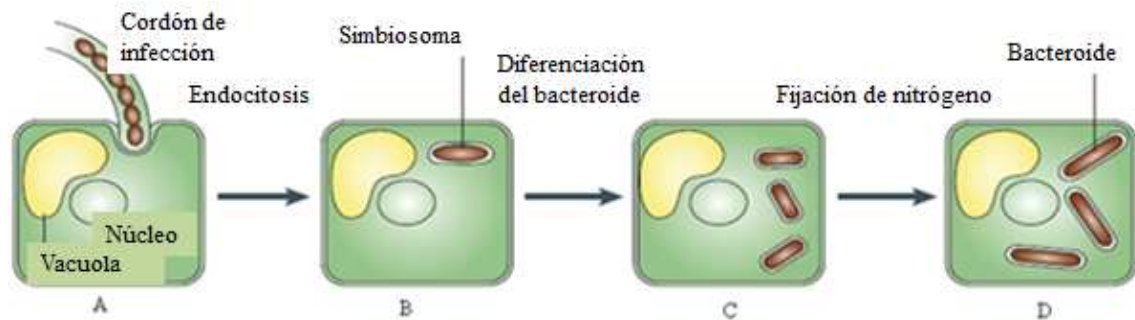


Figura 3. Proceso de infección rizobio – leguminosa. A. Los factores Nod inducen la formación del cordón de infección que llega a una célula del cortex; B. Formación del simbiosoma; C. Los rizobios se diferencian en bacteroides; D. Los bacteroides son capaces de fijar nitrógeno.

Fuente: Jones et al. (2007).

2.3.2.1 Temperatura y nodulación

La FBN en leguminosas se afecta tanto por baja como por alta temperatura, debido a que ésta produce inhibición, tanto de la nodulación como de la actividad nitrogenasa una vez que el nódulo es funcional.

En Uruguay el trébol blanco se siembra principalmente en los meses de otoño. En el Cuadro 2 se muestra la temperatura mínima promedio del suelo de marzo a junio (Camargo, 2012). El otoño es el momento óptimo para la siembra de trébol, pero ésta no debe ser muy temprana para evitar riesgos de sequía, ni muy tardía para no acortar el período de implantación y que las plantas lleguen al invierno sin estar arraigadas.

En siembras muy tardías se pueden registrar fríos intensos. En el mes de mayo se dan temperaturas mínimas de 5°C promedio y heladas que ocasionan lenta germinación de la semilla y baja formación de nódulos. Esto lleva a plántulas débiles y de establecimiento retardado, que muchas veces terminan muriendo. De todas formas los tréboles y las gramíneas anuales invernales tienen capacidad para germinar a temperaturas más bajas que las gramíneas perennes y las leguminosas estivales.

Según Liu et al. (2011) la nodulación en trébol blanco se ve favorecida con el incremento de temperatura en el rango de 10 a 35°C. Esto pone de manifiesto la importancia que tiene la época de siembra para obtener un rendimiento óptimo en cuanto a la nodulación, implantación y fijación de nitrógeno.

Cuadro 2. Temperatura mínima promedio de 2008, 2009 y 2010 para los meses de otoño e inicio de invierno.

Meses	Temperatura mínimas promedio
Marzo	22°C
Abril	18°C
Mayo	15°C
Junio	10°C

Fuente: Camargo (2012).

2.3.2.2 Nodulación y concentración de nitrógeno combinado en el suelo

La concentración de nitrógeno combinado en el suelo puede inhibir la nodulación y la actividad nitrogenasa, ya que para la planta la FBN supone un proceso de mayor costo energético que la absorción de NO_3^- o de NH_3 del suelo (Liu et al., 2011).

Cuando las concentraciones de nitrógeno combinado son $< 4 \text{ mM}$ de NH_3 o $< 2 \text{ mM}$ de NO_3^- , el inicio de la nodulación y de la fijación de N_2 se estimulan. Sin embargo, al aumentar la concentración de nitrógeno combinado se produce una inhibición de la nodulación, proporcional a ese aumento. Los valores de inhibición están sujetos a un rango de variación que depende del cultivar empleado y de las condiciones de crecimiento (Liu et al., 2011).

La concentración de nitrógeno en el suelo varía en las distintas épocas del año. Las fluctuaciones del contenido de NO_3^- en suelos del Uruguay puede ser grande (Figura 4) y estas se deben principalmente a las precipitaciones.

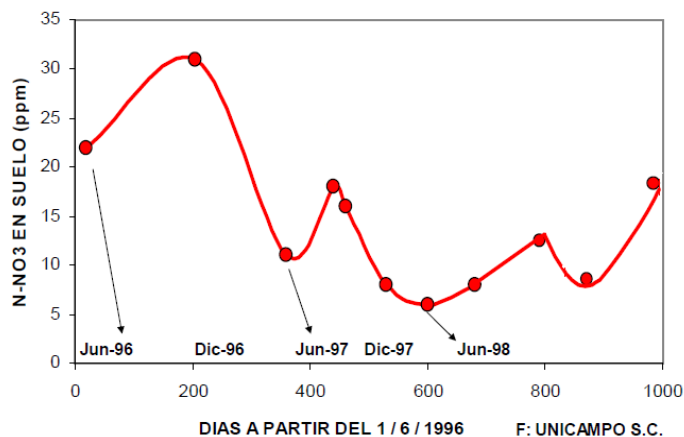


Figura 4. Evolución del N como NO_3^- en un suelo de Uruguay. La concentración de nitrógeno como NO_3^- en ppm se tomó durante dos años.

Fuente: Hoffman y Ernst (1999).

Sundstrom et al. (1982), determinaron que el mayor peso de la masa nodular por planta y de actividad nitrogenasa se daba a 10 ppm de NO_3^- , en comparación a concentraciones de 0, 20 y 40 ppm y que la mayor producción de materia seca ocurría a 40 ppm. El efecto estimulante del NO_3^- a 10 ppm ocurre entre la infección y el comienzo de la FBN. Una deficiencia de N para la planta huésped durante esta fase es perjudicial para la formación y desarrollo de un área foliar que sea suficientemente grande para suministrar los fotosintatos necesarios para el crecimiento y actividad de los nódulos (Marschner, 1995).

La mayor actividad de los nódulos, en lo que refiere a fijación de nitrógeno, es lograda cuando N combinado obtenido de las reservas del suelo o de la fertilización está disponible en cantidades que son suficientes para un vigoroso crecimiento vegetal durante las primeras semanas del establecimiento de las leguminosas. Cuando los niveles de N *starter* aumentan, disminuye drásticamente la actividad de la nitrogenasa y también el número de nódulos. Sin embargo, el crecimiento de la planta continúa aumentando, indicando el cambio de la fuente de nitrógeno aportado por la FBN al NO_3^- disponible en el suelo (Marschner, 1995).

La disminución de la nodulación por el nitrógeno combinado en el suelo puede deberse a la represión de genes *nod*, a la disminución de la síntesis de lectinas, menor formación de pelos radicales, aborto de los cordones de infección, o por inhibición de la transformación de bacterias en bacteroides (Racca y Collino, 2006). De todas formas, los procesos bioquímicos y genéticos que determinan tal inhibición son poco conocidos todavía.

Se han descrito reducciones del 32 – 65 % en el número de nódulos y del 33 – 55 % en el peso seco de los mismos al fertilizar *Vicia faba* con dosis de $120 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ de nitrógeno (Nadal Moyano et al., 2004). Sin embargo hay mutantes *nts*⁻ tolerantes a NO_3^- en soja y *Pisum*, capaces de desarrollar una nodulación y fijación de N_2 , tanto en presencia como en ausencia de NO_3^- .

Otro aspecto a considerar es la capacidad de fijar nitrógeno, y por lo tanto la actividad nitrogenasa, en presencia de nitrógeno combinado. También en esa situación hay variabilidad en lo que hace a la sensibilidad - tolerancia del proceso en distintas concentraciones de NO_3^- , según la especie de leguminosa. Así, mientras que la soja es sensible, en *Pisum* y lupinos la inhibición se logra con mayores cantidades de NO_3^- . El nivel de sensibilidad varía incluso entre distintos cultivares de soja (Monza y Palacios, 2004).

De esta forma, el efecto del nitrógeno combinado tiene consecuencias cuando se aplican prácticas agrícolas, dado que si se inocula sobre un suelo que fue previamente fertilizado, la nodulación, y por tanto la simbiosis, puede no establecerse de forma

óptima. Del mismo modo, si se fertiliza un cultivo inoculado la fijación de N₂ puede inhibirse por represión de la nitrogenasa. Esto conlleva a un inadecuado uso de recursos y a un mal aprovechamiento económico, ya que lo invertido no tendrá el resultado deseado.

2.3.3 Competitividad entre cepas de rizobios

Cuando se introduce un inoculante, éste tiene que competir por los recursos con las cepas nativas presentes en los suelos, adaptadas al medio en que viven. Entre esas cepas que son persistentes en los suelos, las más competentes tienen mayor capacidad de colonizar raíces y formar nódulos, pero no necesariamente son las más eficientes fijando N₂ (Camargo, 2012). Por eso, la competencia es una característica que debe ser considerada en la selección de cepas para ser usadas como inoculantes comerciales. Sin embargo, esta propiedad ha sido menos considerada que la capacidad de fijar nitrógeno. Esto se debe a las dificultades que surgen debido a la necesidad de manejar grandes cantidades de bacterias a las que hay que aislar y obtener su ADN para así poder establecer la cantidad de nódulos que ocupa la cepa en evaluación.

Para evaluar la competitividad de cepas en el suelo han sido usadas técnicas como la resistencia a antibióticos, serología, producción de melanina y perfil de plásmidos (Monza et al. 1992, Rodríguez et al. 2010), pero el desarrollo de la PCR y de cebadores como ERIC (Versalovic et al. 1991, de Bruijn 1992), BOX (Menna et al., 2009) y REP (Mantilla et al., 2004) han mejorado la precisión y rapidez en la identificación de cepas. El uso de genes reporteros como *gusA* también ha simplificado la forma y precisión con que se evalúa la ocupación de nódulos por los rizobios usados como inoculantes frente a los rizobios nativos, ya que permite analizar visualmente los nódulos teñidos para saber si el inoculante los ocupa, sin necesidad de aislar bacterias ni amplificar su ADN (Camargo, 2012). Esta metodología tiene como limitante que no puede realizarse en el campo, dado que se usan microorganismos modificados genéticamente. Pero permite evaluar la competencia de cepas en diferentes suelos bajo condiciones controladas, que es una estrategia usada en esta tesis.

2.3.4 Condiciones ambientales

Otra consideración a tener presente en la eficiencia de la nodulación son las condiciones ambientales en el momento de la inoculación - siembra, que afectan la colonización de las raíces por unas u otras cepas. Cuando se dan condiciones adversas de humedad y temperatura en los primeros días del cultivo, se favorece la ocupación de nódulos por cepas nativas respecto al inoculante, generalmente desarrollado con cepas introducidas.

A su vez la sequía también retarda la nodulación y hace que los nódulos se desplacen a raíces secundarias y terciarias, lo que cambia la topofisis y disminuye la

eficacia de la FBN, que es mayor en nódulos próximos al cuello de la planta (Racca y Collino, 2006). También la poca humedad en el suelo provoca baja nodulación a causa de la muerte de rizobios, y por menor germinación de la semilla (Carámbula, 2010).

2.4 FERTILIZACIÓN QUÍMICA Y FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO EN LA AGRICULTURA

Los procesos microbianos de desnitrificación y FBN suceden aproximadamente a la misma tasa, de manera que no llega a acumularse nitrógeno combinado en el medio. Sin embargo, durante los últimos 100 años la incorporación de nitrógeno combinado de origen antropogénico se ha incrementado fuertemente y tiende a desestabilizar el equilibrio natural (Bottomley y Myrold, 2007).

Se estima que la FBN a nivel global es responsable de la entrada a los ecosistemas de unas 250×10^6 toneladas de nitrógeno anuales. De esta forma, la mayor fuente de nitrógeno para los ecosistemas es la atmósfera, de donde proviene aproximadamente un 80%. Los fertilizantes y el suelo aportan un 15 % y las descargas eléctricas hasta un 5 % (Monza y Palacios, 2004).

El aumento del nitrógeno combinado tiene efectos secundarios en el ciclo del nitrógeno, especialmente en la distribución de la FBN. Áreas extensas con diversa vegetación en las que había especies fijadoras de N_2 , han sido sustituidas por monocultivos no fijadores, mientras que pequeñas áreas agrícolas concentran las especies que fijan N_2 . Además, el cambio de uso del suelo ha liberado nitrógeno combinado almacenado en la materia orgánica, lo que resultó en una exportación neta de nitrógeno (Keeney y Hatfield, 2001).

A diferencia de la FBN, en la que el nitrógeno fijado es rápidamente asimilado en los constituyentes celulares, una parte de los fertilizantes nitrogenados se transforman en óxidos de nitrógeno y en NH_3 , liberados por los procesos microbianos de nitrificación y desnitrificación al aire y al agua (Figura 5). Una excesiva acumulación de nitrógeno combinado puede acidificar los suelos, aumentar la cantidad de NO_3^- lixiviado y reducir la diversidad vegetal en ecosistemas terrestres (Bottomley y Myrold, 2007).

La producción de fertilizantes nitrogenados incluye el consumo de energía en su elaboración, así como en su distribución, lo que representa un costo económico y ambiental. El uso de inoculantes rizobianos reduce esos costos, tanto en su elaboración que utiliza menos energía que la necesaria en la producción de fertilizantes nitrogenados, como en su distribución a los sitios de uso.

De esta forma, el costo económico y los riesgos ambientales derivados de la fertilización química pueden ser menores con el uso de microorganismos fijadores de N_2 , en combinación con otras prácticas que favorecen la agricultura sustentable.

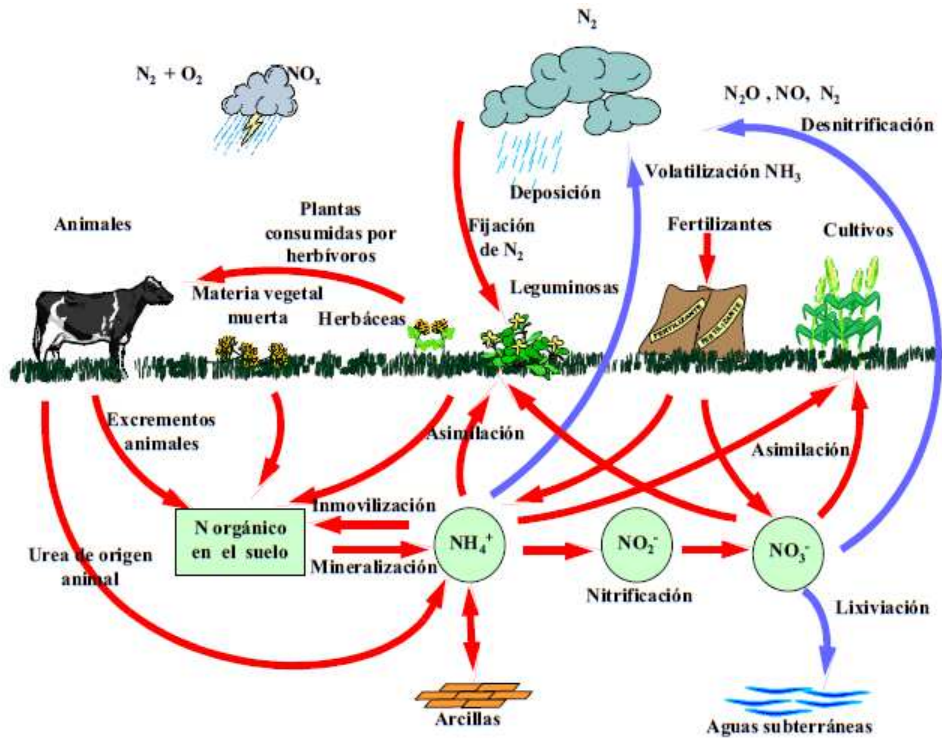


Figura 5. Entrada y salida de nitrógeno de los ecosistemas.
Fuente: Monza y Palacios (2004).

2.5 EL TRÉBOL BLANCO: CARACTERÍSTICAS Y USOS

Las leguminosas incluyen plantas cuyo fruto es una legumbre o vaina, herbáceas y leñosas, anuales o perennes, con especies capaces de formar simbiosis radiculares con rizobios específicos. Las leguminosas forrajeras constituyen un componente importante en la producción de pasturas. En Uruguay, las pasturas artificialmente implantadas ocupan 970.000 ha, mientras que el total de mejoramientos asciende a 2.300.000 ha (URUGUAY. MGAP. DIEA, 2009).

Las leguminosas son usadas para el mejoramiento de praderas por su alta palatabilidad y valor nutritivo en términos proteicos y minerales, su menor nivel de fibra, una mayor relación carbohidratos solubles / carbohidratos insolubles, su alta digestibilidad y por su capacidad de fijar nitrógeno asociadas a rizobios. Esto promueve una elevada ingestión voluntaria por parte de los rumiantes. Además hay un especial interés en las leguminosas por su capacidad de mejorar la estructura del suelo, sobre todo en profundidad, por lo rápido que se degradan sus residuos debido a la baja relación carbono nitrógeno. Esto promueve mayor actividad en la masa microbiana del suelo que permite una preparación más rápida de la chacra para el cultivo siguiente.

Las principales leguminosas utilizadas en sistemas intensivos en Uruguay son *Lotus corniculatus*, trébol rojo, trébol blanco y alfalfa (Carámbula, 2010). El trébol blanco es usado principalmente en la alimentación del ganado lechero y el engorde del ganado de carne por contribuir a resolver los problemas forrajeros en el invierno, con un destacado aporte de forraje de alta calidad. Se integran mayoritariamente en la implantación de praderas cultivadas polifíticas, aunque también se realizan siembras puras, consociadas con cereales de invierno o raigrás (Rebuffo et al., 2006). El trébol blanco se adapta bien a suelos medios a pesados, fértiles y húmedos pero no tolera suelos superficiales ni la falta de agua aunque tolera suelos ácidos (pH de 5,2 a 5,6). Tiene una muy buena semillazón y resiembra natural, su densidad de siembra es de 2 a 4 Kg · ha⁻¹ y presenta bajo vigor inicial y es de lento establecimiento (Carámbula, 2010).

El trébol blanco produce menos materia seca que el trébol rojo, pero con mayor aporte invernal, estación que presenta el mayor déficit de forraje. Además al ser perenne y tener buena resiembra, puede producir forraje durante 4 años o más, mientras que el trébol rojo se comporta como bianual (Carámbula, 2010). En el cuadro 3 se detalla la producción de materia seca del trébol blanco en comparación al trébol rojo en Uruguay.

Cuadro 3. Trébol rojo y blanco en Uruguay. A. Producción y distribución de trébol blanco y rojo en Uruguay. B. Fijación de N por las principales leguminosas sembradas en Uruguay.

A.

Producción de materia seca	Trébol Blanco	Trébol Rojo
Producción Máxima (T MS/ha/año)	14	17,9
Producción Media (T MS/ha/año)	7,5	10
Producción Mínima (T MS/ha/año)	2,5	3,2
Distribución anual de la producción		
Otoño	12 %	9 %
Invierno	23 %	15 %
Primavera	52 %	50 %
Verano	13 %	26 %

B.

	Forraje T MS/ha	N fijado Kg/ha	Eficiencia KgN/T de MS
<i>Trifolium repens</i>	7,5	229	31
<i>Lotus corniculatus</i>	8,3	226	27
<i>Trifolium pratense</i>	8,8	308	35
<i>Medicago sativa</i>	11,6	366	32

MS materia seca

Fuente: García et al. (1994).

Uno de los problemas de la baja persistencia del trébol blanco se debe a su sensibilidad a la sequía, la cual provoca un comportamiento anual que disminuye su potencial. Otra limitación es la presencia en el campo natural de un trébol nativo, *Trifolium polimorfum* Poiret (trébol polimorfo o trébol del campo) que es nodulado por rizobios nativos que son capaces de establecer relaciones de parasitismo con los tréboles sembrados. Esta situación se manifiesta más en trébol blanco que en trébol rojo y es la causa de frecuentes problemas o fracasos en la implantación del trébol blanco, en chacras sin antecedentes de tréboles cultivados. En consecuencia, para lograr un buen establecimiento del trébol blanco hay que lograr que los rizobios del inoculante compitan con la población nativa para formar al menos, una parte de los nódulos (Dutto, 2002).

2.6. URUGUAY TIENE UNA POSICIÓN VENTAJOSA EN LA PRÁCTICA DE INOCULAR LEGUMINOSAS FORRAJERAS

En relación a la producción y uso de inoculantes el Uruguay es un referente a nivel mundial junto a Nueva Zelanda y Canadá (Date, 2000). Esto se ha debido a las políticas llevadas adelante por más de 40 años, que involucran la implementación de mecanismos legales, la participación de la industria de inoculantes y los esfuerzos de extensión realizados por el Instituto Plan Agropecuario desde la década del 60 para que los agricultores adopten la práctica inoculación como la principal fuente de nitrógeno (Labandera, 2007).

A pesar de esta posición ventajosa, se está dando un abandono progresivo de los productores de la práctica de inocular, probablemente debido a que en muchas situaciones no obtienen los beneficios esperados de la misma. La encuesta realizada por el acuerdo entre DIEA y CAF (Cooperativa Agraria Federada) puso en evidencia que el 50 % de los productores del área agrícola no inocula trébol blanco y el 22 % no inocula trébol rojo (Acosta, 2008), cuando se asumía como adoptado por la mayoría de los productores.

Respecto al trébol blanco, los problemas de implantación se han hecho particularmente evidentes en la región este y norte del país, donde, en general no es fácil establecer tréboles, entre otros factores por la presencia de cepas de rizobios parásitas presentes en las poblaciones nativas, que serían responsables del fracaso de la implantación de muchas praderas (Fabiano y Arias, 1991).

Los rizobios son habitantes normales de los suelos, aún en ausencia de su leguminosa huésped. En cada chacra hay rizobios que son parte de las poblaciones nativas, naturalizadas o de inoculaciones anteriores. En consecuencia, cuando se siembra una leguminosa, los rizobios presentes en el suelo pueden afectar la nodulación por el inoculante. Una situación de este tipo se da cuando se siembra *Lotus subbiflorus* en chacras donde hubo *Lotus corniculatus*. En estos casos las cepas de *Mesorizobium* sp.

que nodulan a esta leguminosa, forman pseudonódulos en *Lotus subbiflorus* (Irisarri, 1996).

En otros casos, la población nativa o naturalizada del suelo está constituida por rizobios parásitos. En esta situación, el éxito de la implantación del cultivo dependerá de que la cepa del inoculante tenga mayor competitividad que los rizobios del suelo y formen la mayor cantidad posible de nódulos efectivos. El fracaso en la competitividad conducirá a la formación, al menos parcial, de nódulos inefectivos y la potencial pérdida del cultivo.

En Uruguay el inoculante comercial usado para trébol blanco y trébol rojo, es desde hace más de 50 años la cepa U204 de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*, introducida de EE.UU. y designada así en la colección del Laboratorio de Microbiología de suelos de (URUGUAY. MGAP, 2008).

En el cuadro 4 se observa que en los departamentos del litoral, con mayor influencia agrícola como lo son Río Negro, Paysandú, Colonia y Soriano, hay un descenso en el área de mejoramiento de campos, que incluye praderas artificiales, campos fertilizados mejorados y cultivos forrajeros anuales en los cuales sería utilizado el trébol blanco. También se observa que en los departamentos con menor influencia agrícola y mayor presencia de *T. polymorphum*, como lo son Tacuarembó, Artigas, Rivera, Rocha, Treinta y Tres y Salto, hay un aumento en el área de mejoramientos. En los demás departamentos, no ocurrieron cambios significativos en el área de mejoramientos de campos. Esto pone de manifiesto el desplazamiento de los mejoramientos a zonas de menor aptitud productiva (zonas marginales).

En este nuevo escenario, se plantea el desafío de mantener la productividad de las pasturas de las zonas de mayor aptitud. Para ello es necesario, entre otras cosas, contar con un inoculante eficiente, que sea capaz de lograr el número de rizobios viables requeridos por semilla y con una competitividad adecuada. En esta tesis se evaluaron distintos métodos de inoculación así como el uso de una nueva cepa como inoculante en comparación a la ya existente.

2.7 INOCULACIÓN DE LEGUMINOSAS FORRAJERAS EN URUGUAY

En Uruguay la inoculación de leguminosas forrajeras se realiza según las instrucciones dadas por los fabricantes de inoculantes rizobianos, que están controladas por el Laboratorio de Microbiología de suelos del MGAP.

Las fallas en el procedimiento de inoculación tienen consecuencias posteriores sobre la nodulación e implantación de la pradera. Uno de los factores más importantes involucrado en la ocupación de nódulos por la cepa usada como inoculante, es el número de rizobios de éste sobre la semilla. Se considera que 1.000 rizobios/semilla a la salida

de la sembradora es un número razonable para lograr una buena implantación (Dutto, 2002). Un aspecto a tener en cuenta es que la semilla de trébol blanco tiene un tamaño inferior a la mayoría de las forrajeras, lo que implica una dificultad para lograr la cantidad de rizobios por semilla. Por otra parte la inclusión de leguminosas en campo natural se realiza generalmente en cobertura, que aumenta la exposición del inoculante a la luz y la desecación con la consecuente pérdida de rizobios en contacto con la semilla.

Cuadro 4. Evolución de la superficie total de mejoramientos forrajeros en el Uruguay por departamento entre el 2001 y el 2009.

Departamento	2001/02	2003/04	2005/06	2006/07	2008/09	2010/11
Total mejoramientos	2.461.373	2.487.557	2.715.003	2.721.907	2.335.266	2.314.365
Colonia	257.106	259.885	282.114	271.326	223.769	221.240
Soriano	298.439	277.986	282.683	267.266	187.417	172.516
Rocha	136.594	133.863	156.424	165.886	166.537	169.573
Paysandú	178.351	176.448	181.704	169.164	150.615	130.246
Rio Negro	201.885	187.626	200.643	168.769	117.687	117.787
Tacuarembó	85.002	72.636	88.024	109.667	103.669	102.420
Treinta y Tres	77.495	83.050	97.040	102.579	99.324	108.577
Rivera	48.442	51.146	63.412	81.670	79.847	83.451
Salto	50.618	52.531	82.777	73.792	67.609	66.893
Artigas	38.992	43.379	50.273	50.841	50.927	44.794
Evolución	100	101	110	111	95	93

La superficie contabilizada como mejoramientos incluye praderas artificiales, campos fertilizados, mejorados y cultivos forrajeros anuales.

Fuente: URUGUAY. MGAP. DIEA (2011).

Una estrategia usada para mejorar la inoculación de trébol blanco en zonas donde hay cepas nativas parásitas, consiste en aumentar el número de rizobios por semilla a través del aumento de la dosis de inoculante. El efecto del aumento de la concentración del inoculante sobre la semilla de trébol blanco se muestra en la Figura 6, donde se evidencia el aumento de aproximadamente un 40 % de la biomasa como consecuencia de esta práctica, que permitió pasar de 1.300 a 3.000 rizobios por semilla.

La preinoculación consiste en inocular y peletizar semillas mediante procesos industriales. Esta estrategia tiene ventajas porque el productor ahorra tiempo al mejorar la flexibilidad en la logística de siembra y por permitir almacenar la semilla por 30 días conservando la viabilidad e infectividad. La inoculación convencional la realiza el productor, y queda liberada a fallos en la aplicación del inoculante, y tiene un acotado tiempo de almacenaje. Esto se debe a que la viabilidad de las bacterias una vez aplicadas

a las semillas es baja, de manera que si las condiciones ambientales no permiten la siembra en un tiempo breve se genera una dificultad. En los últimos años parece haber una tendencia a favor del uso de semilla preinoculada de soja por las ventajas mencionadas. De todas formas hay cuestionamientos sobre si la cantidad de bacterias viables en las semillas es la adecuada, sobre todo en aquellas pequeñas como la de los tréboles, en función del decreto 7/99 del 8 de enero 1999 MGAP/MEF.

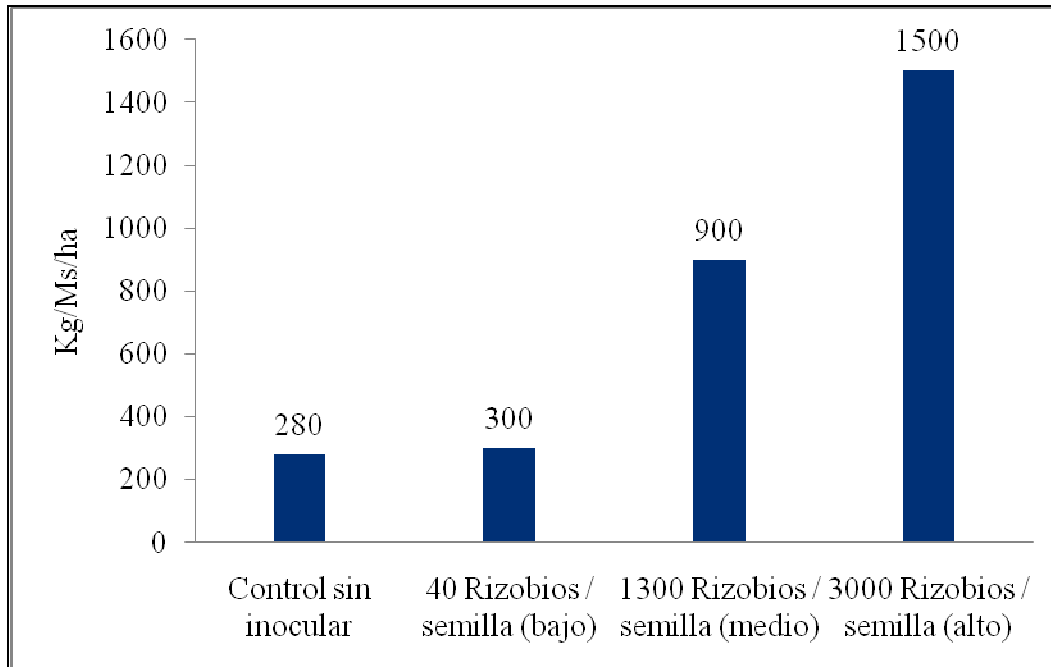


Figura 6. Producción de materia seca por trébol blanco según el número de rizobios por semilla en el momento de la siembra.

Fuente: Dutto (2002).

2.8 SELECCIÓN DE CEPAS

2.8.1 La eficiencia simbiótica y la competitividad son características usadas en la selección de cepas comerciales

Las características básicas en las que hay acuerdo en las distintas propuestas para selección de cepas son la capacidad de fijar nitrógeno en una leguminosa, es decir su eficiencia simbiótica, la competitividad y la sobrevivencia o persistencia en el suelo. Otras características en la selección de las cepas están relacionadas con su tolerancia/sensibilidad al pH del suelo, habilidad de nodular con alto contenido de nitrógeno y tolerancia a herbicidas, que son también criterios usados en situaciones particulares.

En relación a la eficiencia simbiótica hay que considerar la ubicación de los nódulos en la raíz, es decir la topófisis, ya que a igual masa nodular, los nódulos implantados en la raíz primaria, cercanos al cuello de la planta, tienen actividad nitrogenasa varias veces superior a los de las raíces secundarias o terciarias, posiblemente como consecuencia de un mayor suministro de fotoasimilados (Racca y Collino, 2006).

Una característica relevante en la selección de cepas es su capacidad competitiva, que en general no ha sido utilizada debido a la dificultad para diferenciar cepas en grandes números. Actualmente el uso de técnicas moleculares, hace posible utilizar ese criterio en la selección, y es parte de esta de tesis el evaluar competitividad de cepas con esa estrategia.

2.8.2 La generación de *fingerprinting* por PCR permite identificar cepas

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 utilizaron dos tipos de elementos repetitivos para la identificación de bacterias: las secuencias consenso intergénicas repetidas de enterobacterias ERIC (Versalovic et al. 1991, de Bruijn 1992) y los elementos BOX localizados en regiones intergénicas (Menna et al., 2009). En esta tesis se usaron esos *primers* para los experimentos realizados a campo, ya que para los experimentos de competitividad en diferentes suelos realizados en laboratorio se utilizaron genes delatores, por su simplicidad.

2.8.3 Los genes delatores son una herramienta útil para evaluar la ocupación de nódulos en condiciones de laboratorio

Mediante la introducción del gen *gusA* a las cepas que se evalúan para ser usadas como inoculante, es posible diferenciar los nódulos ocupados por él, respecto a los ocupados por los rizobios nativos. Esto se debe a la coloración azul que adquieren los nódulos ocupados por los rizobios marcados con *gusA*, dado que al ser expuestos al sustrato de la enzima codificada por ese gen se genera un producto de color azul (Figura 7). Esta técnica muy precisa, permite evaluar en menor tiempo y con mucha facilidad la colonización del rizobio de interés en un elevado número de suelos. La limitación que presenta el uso de genes delatores es que al tener que utilizar un microorganismo

transgénico no se pueden realizar a campo, por lo que hay que llevar los suelos al laboratorio.

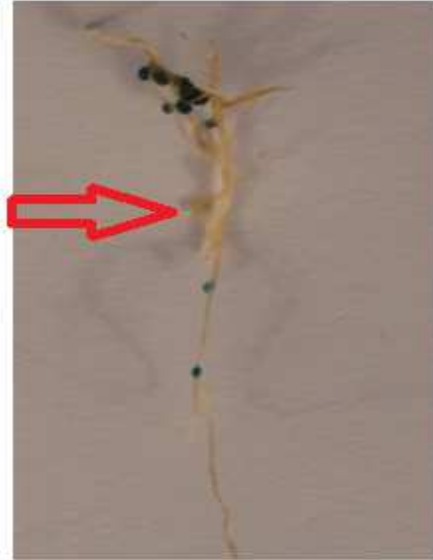


Figura 7. Nódulos ocupados por una cepa marcada con el gen *gusA*. Los nódulos teñidos se deben a que el sustrato Xglu se transforma en un producto azul. La flecha indica un nódulo ocupado por una cepa del suelo, no marcada.

2.9. UTILIZACIÓN DE CEPAS NATIVAS COMO INOCULANTES COMERCIALES

En el marco del proyecto FONTRAGRO FTG 787/05 en el que participó el Laboratorio de Bioquímica de Facultad de Agronomía y el INIA se generó una colección de más de 100 aislados de nódulos de trébol rojo y se evaluaron las cepas en condiciones controladas. Entre esos aislados, el 317 tiene características interesantes para ser evaluada a campo, dado que presentó la misma eficiencia simbiótica que el inoculante comercial, en dos experimentos independientes en macetas (Monza et al., 2008).

Para desarrollar inoculantes es importante conocer la diversidad de las poblaciones nativas, tanto para seleccionar cepas por su capacidad para fijar nitrógeno, como por sus propiedades para ser usadas como inoculantes (Lindström et al., 2010). El éxito de los inoculantes, además de su persistencia en el suelo que es independiente de la eficiencia que la cepa tenga, depende de la presencia de rizobios nativos en el suelo. Esos rizobios muchas veces son más competitivos que el usado como inoculante y ocupan la mayoría de los nódulos, tanto porque sus poblaciones son más abundantes, por su distribución en el perfil del suelo, o por su mejor adaptación a las condiciones locales (Estrella et al., 2009).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Se usaron dos cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* U204, inoculante comercial para tréboles en Uruguay, y la 317, una cepa nativa aislada de nódulos de *Trifolium pratense*, obtenida en el marco del proyecto FONTAGRO FTG-787/05, con ejecución 2005-2010. En el cuadro 5 se resumen las características de las bacterias usadas.

Cuadro 5. Características de las cepas de *Rhizobium leguminosarum* y de los transcojugantes derivados de la cepa comercial (U204::*gusA*) y de la cepa nativa (317::*gusA*).

Cepa	Origen	Características	Referencia
<i>R. leguminosarum</i> U204	Inoculante comercial. Introducida de USA en la década del 60.	<i>fix+</i> en <i>Trifolium pratense</i> y <i>Trifolium repens</i> .	Labandera y Mayans (2006).
<i>R. leguminosarum</i> 317	Aislado de nódulo de <i>T. repens</i> .	<i>fix+</i> en <i>T. pratense</i> y <i>T. repens</i> . Aislamiento nativo.	FONTAGRO (2005).
U204:: <i>gusA</i>	Laboratorio de Bioquímica Facultad de Agronomía	<i>nod+</i> en <i>T. pratense</i> y <i>T. repens</i> . Igual cinética de nodulación que U204 a los 25 días.	Batista (2013).
317:: <i>gusA</i>	Laboratorio de Bioquímica Facultad de Agronomía	<i>nod+</i> en <i>T. pratense</i> y <i>T. repens</i> . Igual cinética de nodulación que 317 a los 25 días.	Batista (2013).

Las cepas U204 y 317 fueron transformadas por Batista (2013) por conjugación biparental con *E. coli* S17-1 λ -pir, portadora del plásmido pCAM130::Tn5SS*gusA*31 (Wilson et al., 1995). Ese plásmido incluye el transposón mTn5SS*gusA*31 que contiene el gen *gusA* bajo el control del promotor *nifA* y un casete de resistencia a espectinomicina (Sm) y estreptomycinina (Sp) (Figura 8).

Como leguminosa hospedadora se usó (trébol blanco) “Estanzuela Zapicán”. Las semillas fueron cedidas por la Ing. Agr. Mónica Rebuffo, INIA La Estanzuela.

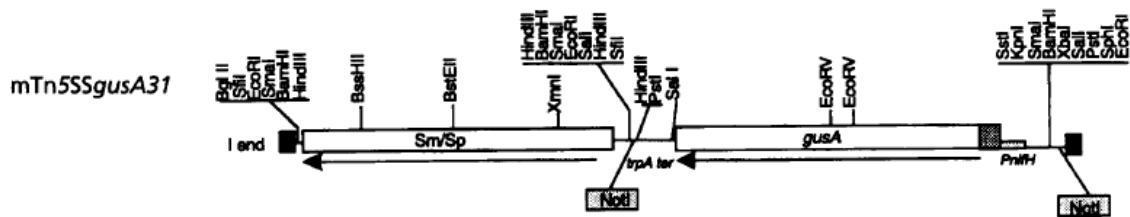


Figura 8. Esquema del transposón mTn5SSgusA31. El transposón contiene el gen *gusA* y el casete con resistencia a espectinomicina (Sm) y estreptomicina (Sp) bajo el control inducible *PniFH*.

Fuente: Wilson et al. (1995).

3.2. CRECIMIENTO DE BACTERIAS Y PREPARACIÓN DE INÓCULOS

Para el crecimiento de bacterias se usó medio YEM (Yeast-Extract-Manitol, Vincent, 1970) líquido, o solidificado con agar 1,5 % (p/v). La composición se detalla en el Cuadro 6. Cuando el crecimiento fue en medio líquido se usó agitación a 200 rpm. La temperatura de crecimiento fue 27°C. Para verificar la inserción del trasposón se adicionó al medio Sp 50 µg/mL.

El inóculo para los ensayos *in vitro* creció en medio líquido hasta una DO 600_{nm} entre 0,8 y 0,9, que corresponde a unas 10⁸ células/mL. Los 30 mL de cultivo se centrifugaron a 6000 rpm por 5 min, se lavaron con agua estéril y se resuspendieron en 10 mL de agua estéril. Con 150 µL de esa suspensión se inoculó cada tubo.

Cuadro 6. Composición del medio YEM.

Compuesto	Cantidad
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
Manitol	10 g
Extracto de levadura	1,0 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 L
pH	6,8-7,2

Para evaluar la competencia de las cepas U204 y 317 en diferentes suelos se usaron los clones U204::*gusA* y 317::*gusA*. Los inóculos elaborados con estos clones se prepararon en turba estéril, usando la misma metodología que la utilizada en la

fabricación industrial de inoculantes rizobianos por la empresa CALISTER S.A. La inoculación se realizó con la misma relación usada en el campo, 800 mL de inóculo y adherente cada 25 Kg de semilla, en nuestro caso 10 µL de esta solución. Las semillas inoculadas se dejaron secar y se sembraron en los distintos cilindros con diferentes suelos, a razón de 10 semillas por cilindro.

Las semillas preinoculadas y el inoculante para los ensayos a campo fueron preparados por la empresa CALISTER S.A., según las normativas del decreto 7/99 del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP). En Uruguay, el Laboratorio de Microbiología de Suelos del MGAP, antes de la entrega de los biofertilizantes a la industria y/o liberación al mercado, las cepas pasan por un control en el que se evalúa las características simbióticas, siguiendo protocolos establecidos por Labandera y Vincent (1972). Los parámetros de calidad del inoculante refieren a la concentración de la cepa, que debe ser superior a 2×10^9 ufc/g en el momento de utilizarlo en el campo, y a la ausencia de microorganismos no declarados (Labandera y Mayans, 2006).

3.3. CRECIMIENTO DE PLANTAS EN CONDICIONES *IN-VITRO*

3.3.1 Esterilización y germinación de las semillas

La esterilización de semillas se realizó por inmersión en etanol 96 % durante 1 min en agitación, se descartó el etanol y se lavó en agua estéril. Se adicionó hipoclorito de sodio al 40 %, (v/v) y se agitó durante 2 min. El hipoclorito de sodio se descartó y se lavó repetidas veces con agua estéril. Las semillas se dejaron en agua estéril al menos durante 1 h y luego se germinaron a 27°C en agar agua 1 % (p/v) estéril, hasta que la radícula emergió 1-3 mm.

3.3.2. Medio de crecimiento

Las plantas crecieron en medio Jensen (1942), cuadro 7.

Cuadro 7. Composición del medio Jensen.

Compuesto	Cantidad
CaHPO ₄	1,0 g
K ₂ HPO ₄	0,2 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,2 g
FeCl ₃	0,1 g
Agar	8,0 g
Agua destilada	1 L
pH	6,8 – 7,2

3.3.3. Condiciones de crecimiento

Las semillas, se sembraron a razón de 3 por tubo, crecieron con un fotoperiodo con 16 h de luz, con una intensidad de $200 \mu\text{M}$ de fotones $\cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{seg}^{-1}$.

Para evaluar el efecto de la temperatura sobre la nodulación, las semillas germinadas crecieron en medio Jensen sin nitrógeno a 10, 15 y 24°C durante 21 días para las dos primeras temperaturas y 24 días para la última. Para evaluar el efecto de la concentración de nitrato sobre la nodulación, las semillas germinadas crecieron a 24°C durante 23 días en medio Jensen con KNO_3 , a concentraciones 0, 2, 4, 8 y 10 μM .

Para ambos ensayos la unidad experimental fue el tubo, y para reducir el error experimental se contabilizó el número de nódulos por planta promedio.

3.4. NODULACIÓN EN DIFERENTES SUELOS

Los suelos colectados entre el 10 y 12 de abril de 2012 fueron provistos por la Ing. Agr. María José Cuitiño y Diego Giorello de INIA La Estanzuela. En el cuadro 8 figuran los orígenes de los suelos.

Cuadro 8. Procedencia, tipo e historia de los suelos.

Regiones de muestreo	Coordenadas	Tipo de suelo	Uso de los suelos
La Estanzuela (Colonia)	83 msnm 34°19' S y 57°43' O	Brunosol éútrico típico	Rotación agrícola ganadera
La Carolina (Flores)	170 msnm 33°52' S y 57°04' O	Brunosol éútrico	Campo natural sobre cristalino
Tambores (Tacuarembó)	276 msnm 31°54' S y 56°14' O	Litosol éútrico 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 subéútrico	Campo natural de lomadas

Los suelos se colectaron en cilindros de plástico de 7,7 cm de diámetro por 14 cm de altura, que se enterraron en el suelo para recoger la muestra con el mínimo disturbio y sin remoción del tapiz existente. Los cilindros se regaron a la siembra con 50 mL de agua cada uno y cada 48 h hasta los 6 días. A partir de entonces se regaron con 20 mL de agua cada 48 h. Estos volúmenes equivalen, respectivamente, a 10,7 mm y 5,35 mm de lluvia.

Las semillas, inoculadas con U204::*gusA*, como se indica en el punto 2, se sembraron a razón de 10 por cilindro. Las plantas crecieron en condiciones controladas a 24°C con un fotoperíodo de 16 h de luz, con una intensidad de 300 μM de fotones $\cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{seg}^{-1}$. El cilindro de suelo fue considerado la unidad experimental y se aleatorizaron tal como se muestra en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Esquema de aleatorización de los cilindros de suelos. TaM (Tambores), LaG (Paso de la Laguna), LE (La Estanzuela), PaP (Palo a Pique), LaC (La Carolina). Con la denominación U204 y 317 se refiere a U204::*gusA* y 317::*gusA* y la numeración (1 al 4) a la repetición.

	1	2	3	4	5	6	7	8
1	TaM-317-1	LaG-317-3	PaP-U204-1	TaM-U204-4	TaM-317-2	LaC-317-2	LaG-317-1	TaM-U204-1
2	LE-U20LE-2	LaG-U204-2	LaG-317-2	LE-U20LE-1	PaP-U204-2	LE-317-2	LaC-U204-4	LaC-317-1
3	LaG-U204-1	LE-U20LE-4	PaP-317-3	LE-317-1	TaM-U204-2	LaC-U204-2	TaM-317-4	TaM-U204-3
4	LE-317-4	TaM-317-3	LaG-317-4	PaP-U204-3	LaG-U204-3	LE-U20LE-3	PaP-U204-4	PaP-317-1
5	LaG-U204-4	LaC-U204-3	LaC-317-4	LaC-317-3	PaP-317-2	LaC-U204-1	LE-317-3	PaP-317-4

Las raíces noduladas se cosecharon mediante desagregación del suelo con abundante agua, se separaron de las plantas y se lavaron con agua destilada durante 15 min en agitación. Las raíces se colocaron en tubos Falcon con una solución X-gluc (5-bromo 4-cloro-3indolil-b-D-glucurónido) 1mM en tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7,5 con 1 % (v/v) de SDS y se agregaron 200 μL de X-gluc. El X-gluc se preparó disolviendo 21 mg en 1 mL de dimetilformamida (DMF) y se conservó a -20°C, cubierto de papel aluminio. Los tubos Falcon abiertos se colocaron en una campana en la que se realizó vacío durante 3 min para que el sustrato se infiltre en el tejido. Los tubos se retiraron de la campana, se taparon y permanecieron durante 16 h a 37°C, en oscuridad.

3.5. OCUPACIÓN DE NÓDULOS A CAMPO

Las semillas preinoculadas, las inoculadas de manera convencional con la cepa U204 y un testigo sin inocular se sembraron en ensayos que se instalaron en INIA La Estanzuela, Colonia, sobre suelos del tipo Brunosol Eútrico Típico el 23 de abril de 2012 y en INIA Tacuarembó sobre Litosol Eútrico Melánico, en la localidad de Tambores, por la Ing. Arg. María José Cuitiño y Diego Giorello, respectivamente. En la Figura 9 se muestra el esquema de siembra en ambas zonas.

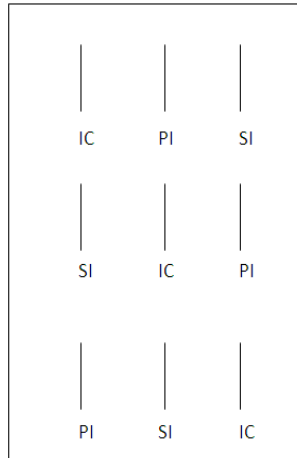


Figura 9. Esquema de siembra para ambos tipos de suelo; SI sin inocular (Testigo), IC Inoculado Común, PI Preinoculado.

Las semillas se sembraron en surcos superficiales, por su pequeño tamaño, de 1 m de largo, separados entre sí por 1 m para evitar la contaminación, y se regaron en el momento de la siembra. Para evitar contaminación se sembró el testigo sin inocular primero. A los 60 días se colectaron 25 plantas/surco con el pan de tierra. La densidad de siembra fue de 2 kg/ha (0,2 g/surco de 1 m), corregido por el peso de la semilla más el inoculante o preinoculado.

3.5.1 Aislamiento de bacterias de los nódulos

La ocupación de nódulos por rizobios con los inoculantes ensayados se determinó a los 45 días posteriores a la siembra. Los nódulos se lavaron con abundante agua, y se esterilizaron superficialmente por inmersión 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) y se realizaron 4 enjuagues sucesivos con agua estéril. Los nódulos se colocaron en placas de Petri estériles y se maceraron individualmente. El macerado se sembró con ansa, en estrías en placas de Petri con medio YEM. Se incubaron a 27°C hasta aparición de colonias. Se hicieron 2-3 pasajes en el mismo medio hasta obtener un cultivo puro.

3.5.2 Aislamiento del ADN genómico de rizobios

A partir de colonias aisladas, sembradas y crecidas en 3 mL de medio YEM líquido, se aisló el ADN por lisado celular según Batista (2013). A 1,5 mL de cultivo con una DO_{600} en el orden de 0,7 – 0,8 se centrifugó a 10.000 rpm 5 min. El precipitado se resuspendió en 100 µL de NaOH 0,05 M y se incubó en un baño a 100°C durante 4 min. El tubo se transfirió a hielo 2 min, se agregaron 500 µL de agua MiliQ estéril y se

centrifugó a 13.000 rpm 4 min. Se recogieron 100 µl de la parte superior y se conservó a -20°C.

3.5.3 Amplificación de ADN genómico por PCR y resolución de perfiles

Para amplificar el ADN genómico se usaron los cebadores ERIC (Versalovic et al. 1991, de Bruijn 1992) y BOX (Menna et al., 2009), cuyas secuencias son:

ERIC1 (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3')
ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3')

BoxA (5' CTACGGCAAGGCGACGCTGACG -3')

Para amplificar con los cebadores ERIC, la reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25µL: 5 µL de ADN genómico, 2µL del cebador ERIC1 y ERIC2 (25 pmol/µL), 0,5µL de dNTPs (10 mM), 0,4µL de Taq polimerasa, 2 µL de MgCl₂ (25 µM) y 2,5 µL de buffer NH₄SO₄ (10X). El programa de amplificación utilizado fue: 1 ciclo de 5 min a 95°C; 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 52°C, 6 min a 65°C y 1 ciclo de 16 min a 65°C.

La amplificación de ADN genómico con BoxA se realizó según Agius et al. (1997). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl y consistió de 2 µL de ADN, 1 µL de cebador boxA (10 µM), 1 µL de dNTPs (10 mM), 0,2 µL de Taq polimerasa, 2,5 µL de MgCl₂ (25 µM), 2,5 µL de buffer NH₄SO₄ (10X) y 2,5 µL de BSA (50 mg/mL). El programa de amplificación utilizado fue: 1 ciclo de 7 min a 94°C; 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 50°C y 2 min a 72°C; 1 ciclo de 7 min a 74°C.

Los productos de amplificación se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,2 % (p/v), con buffer TBE 0,5 X (Tris, Acido Bórico, EDTA 0,5 M pH 8). Se cargaron 5 µL de ADN con 2 µL de buffer de carga en cada pocillo, y como marcador de peso molecular se usó 1 µL de Gene Ruler 1 Kb Plus DNA Ladder Fermentas preparado según las indicaciones del fabricante: marcador de peso molecular 1µL (0,5 µg), buffer de carga 1 µL y agua desionizada 4µL. La corrida se llevó a cabo con voltaje constante (10 V/cm) durante 2 h. Para evidenciar el ADN se incluyó cada 75 mL de agarosa 2,5 µL de "GoodView"[®].

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para evaluar el efecto de la temperatura sobre la nodulación, se crecieron plantas *in vitro* en medio Jensen sin nitrógeno, inoculadas con la cepa U204, incubadas a 10, 15 y 24°C durante 21 días. Los tratamientos de temperatura fueron aplicados bajo un diseño completamente al azar con 5 repeticiones por tratamiento. En cada tubo (repetición) se

colocaron 3 semillas pre-germinadas al momento de la inoculación. La variable analizada fue número de nódulos por planta promedio por tubo y se realizaron doce conteos a lo largo del ensayo. Para el análisis estadístico de la cinética de nodulación se utilizó un modelo de regresión múltiple, donde se comparó el efecto de la temperatura sobre la velocidad (pendiente) de nodulación. El análisis de los datos se realizó con el software Infostat (Di Rienzo et al., 2010).

Para evaluar el efecto de la concentración de nitrógeno sobre la nodulación, se crecieron semillas inoculadas con la cepa U204 durante 23 días en medio Jensen con NO_3^- , a concentraciones 0, 2, 4, 8 y 10 mM. Los tratamientos de nitrógeno fueron aplicados bajo un diseño completamente al azar con 4 repeticiones por tratamiento. En cada tubo (repetición) se colocaron tres semillas pre-germinadas al momento de la aplicación de los tratamientos. Para la identificación de diferencias significativas entre tratamientos se realizó un análisis de varianza con un $P < 0,05$ para lo cual se utilizó el software Infostat (Di Rienzo et al., 2010).

Para establecer la competitividad de las cepas U204 y 317, en relación a las cepas nativas presentes en 5 suelos, se sembraron, en cilindros que contenían suelos de La Estanzuela, La Carolina, Tambores, Paso de la Laguna y Palo a Pique, semillas inoculadas con dichas cepas. Luego de 40 días se contabilizó la cantidad de nódulos ocupados por las cepas marcadas. Los tratamientos se aplicaron bajo un diseño completamente aleatorizado con estructura factorial de tratamientos. En cada cilindro (repetición) se sembraron 10 semillas y se utilizaron 4 repeticiones por arreglo factorial de tratamientos (cepa vs suelo). Para la identificación de diferencias significativas e interacciones entre tratamientos se realizó un análisis de varianza con un $P < 0,05$ para lo cual se utilizó el software Infostat (Di Rienzo et al., 2010).

Para evaluar la ocupación de nódulos cuando se usa la inoculación convencional y la preinoculación se realizaron dos ensayos, ambos con la cepa comercial U204 como inoculante. Los ensayos se instalaron en dos suelos con distinta historia de inoculación. A los 60 días de sembradas las plantas se levantó el ensayo. En cada ensayo se aplicaron 3 tratamientos, inoculación convencional, preinoculación y sin inoculación, bajo un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones por tratamiento. En cada surco se sembraron 0,2 g de semillas al momento de la inoculación. Para la identificación de diferencias significativas entre tratamientos se realizó un análisis de varianza con un $P < 0,05$ para lo cual se utilizó el software Infostat (Di Rienzo et al., 2010).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA NODULACIÓN

Como la temperatura incide sobre la nodulación, se evaluó su efecto en trébol blanco. Para esto, se realizó un ensayo en el que se usaron las temperaturas mínimas promedio de los primeros 5 cm de suelo, de la época en la que se siembra esta leguminosa en Uruguay y se determinó la cantidad de nódulos formados. Las plantas fueron crecidas *in vitro* en medio Jensen sin nitrógeno, inoculadas con la cepa U204 y se incubaron a 10, 15 y 24°C durante 21 días.

Las plantas cultivadas a 10°C desarrollaron sólo los dos primeros foliolos, lo que demuestra un crecimiento restringido, mientras que la nodulación fue inhibida. Seguidamente se dejaron crecer a 24°C en el entendido que se podría activar la nodulación y desarrollo vegetal aumentado la temperatura, pero esta condición no revirtió la nodulación ni el crecimiento de las plantas. 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, Liu et al. 2011, Camargo 2012).

Cuando las plantas crecieron a 15 y a 24°C la aparición del primer nódulo fue después del décimo y sexto día respectivamente. A su vez, el número total de nódulos por planta fue del orden de 1 para las crecidas a 15°C y de 4 para las crecidas a 24°C (Figura 10 A). Cuando se analizó la cinética de nodulación entre el día 8 y 22 a partir de las rectas de regresión, se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre la temperatura y el número de nódulos inducidos (Figura 10. B).

En *Trifolium vesiculosum* Savi. la nodulación aumenta cuando las plantas crecen a 25°C, en relación a cuando lo hacen a 18°C o a 32°C. Este rango de temperatura del suelo puede ser usado para definir la temperatura óptima para la fijación de nitrógeno, que es variable según la especie y cultivar. En soja se producen más nódulos en etapas tempranas del crecimiento a 25°C, mientras que una vez formados, para desarrollar el tamaño máximo la temperatura óptima es 20°C, si se compara con cultivos realizados a 15°C y 30°C. Si bien la temperatura óptima para el desarrollo de trébol blanco es de 24°C (Harris y Thomas, 1973), la nodulación de esta leguminosa se ve favorecida con temperaturas en el rango entre 10 y 35°C (Liu et al., 2011). Los resultados de este trabajo coinciden en términos generales con los obtenidos en esta tesis, ya que entre los 8 y 22 días, la nodulación a 24°C resultó ser mayor que a 15°C. Sin embargo, faltaría confirmar que el aumento en el número de nódulos continúe hasta los 35°C.

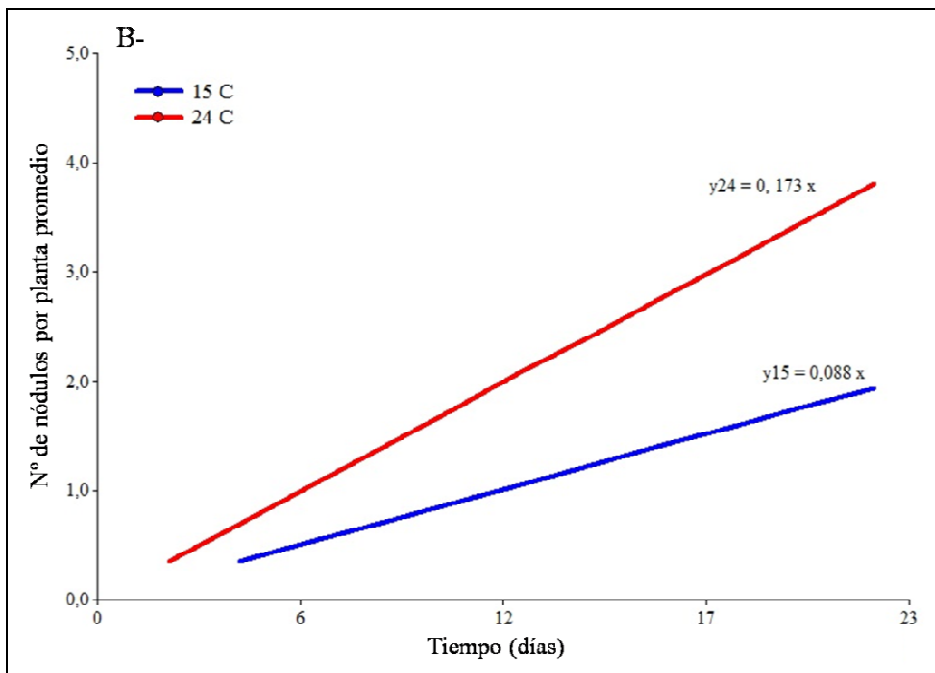
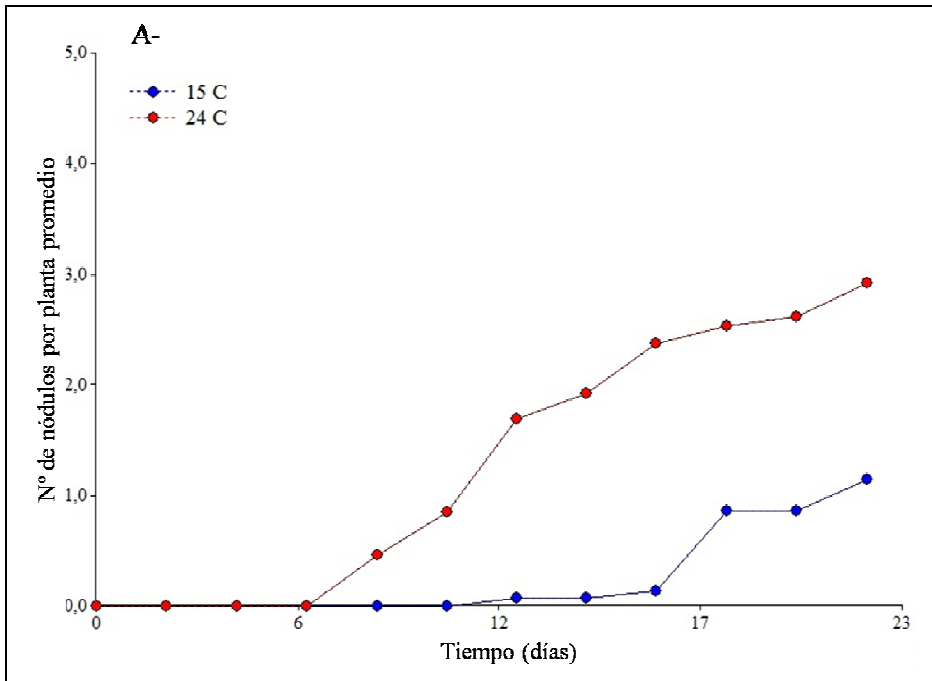


Figura 10. Cinética de nodulación. A. Cinética de nodulación representada como número de nodulos promedio por planta para 15 y 24°C. B. Regresión lineal múltiple elaborada a partir del promedio de nódulos por planta a diferentes tiempos, según las temperaturas.

La temperatura promedio en los meses de otoño en Uruguay (Cuadro 2) se sitúan entre 22 y 10°C, por lo que las siembras tempranas en el otoño (marzo), resultarían las más adecuadas para favorecer la nodulación. La recomendación de no realizar siembras tardías en el otoño se debe en parte, a la pérdida de la eficiencia en la nodulación por baja temperatura. De todas formas, la cinética de nodulación no es el único factor a considerar a la hora de elegir la época de siembra de una pradera. Temperaturas similares se presentan en los meses de primavera, y se podrían obtener los mismos niveles de nodulación, pero en esta época de siembra la sobrevivencia de las plantas de trébol blanco se ve comprometida debido al escaso desarrollo que tienen cuando llega el verano, y a la alta probabilidad de ocurrencia de déficit hídrico en esa época (Carámbula, 2010).

4.2 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO SOBRE LA NODULACIÓN

Para separar el efecto de la concentración de nitrógeno de otros factores que inciden en la nodulación, se crecieron semillas inoculadas con la cepa U204 durante 23 días en medio Jensen con NO_3^- , a concentraciones 0, 2, 4, 8 y 10 mM. En la figura 4 se muestra la variación de la concentración del nitrógeno como NO_3^- en un suelo de Uruguay entre junio y agosto. Las concentraciones de NO_3^- utilizadas en este ensayo están dentro de ese rango.

Como la concentración de NO_3^- en suelo se expresa habitualmente en ppm, para calcular las concentraciones ensayadas asumimos que el suelo presenta 50% de material sólido, 25% agua y 25% aire, cuando se encuentra a capacidad de campo, en los primeros 20 cm de profundidad (Cuadro 10).

Cuadro 10. Equivalencia entre la concentración de NO_3^- en ppm y mM.

mM	Ppm
0	0
2	5,6
4	11,2
8	22,4
10	28

4.2.1 Nodulación con diferentes concentraciones de NO_3^-

El mayor número de nódulos finales se observó en las plantas crecidas a 0 mM de NO_3^- , concentración que no se encuentra normalmente en el campo (Figura 11). Este tratamiento testigo fue, significativamente diferente a las plantas crecidas a 2, 4, 8 y 10

mM, a los 23 días, tiempo final del ensayo. A su vez, entre estas concentraciones no se observaron diferencias significativas en el número de nódulos promedio por planta. Como se observa en la Figura 11, el número de nódulos promedio por planta fue 57 % mayor en las crecidas a 0 mM respecto a las crecidas a 2 mM. Si bien no se encontraron diferencias significativas, las plantas crecidas a 2 mM de NO_3^- presentaron un 61 % más nódulos que el siguiente más nodulado, 10 mM.

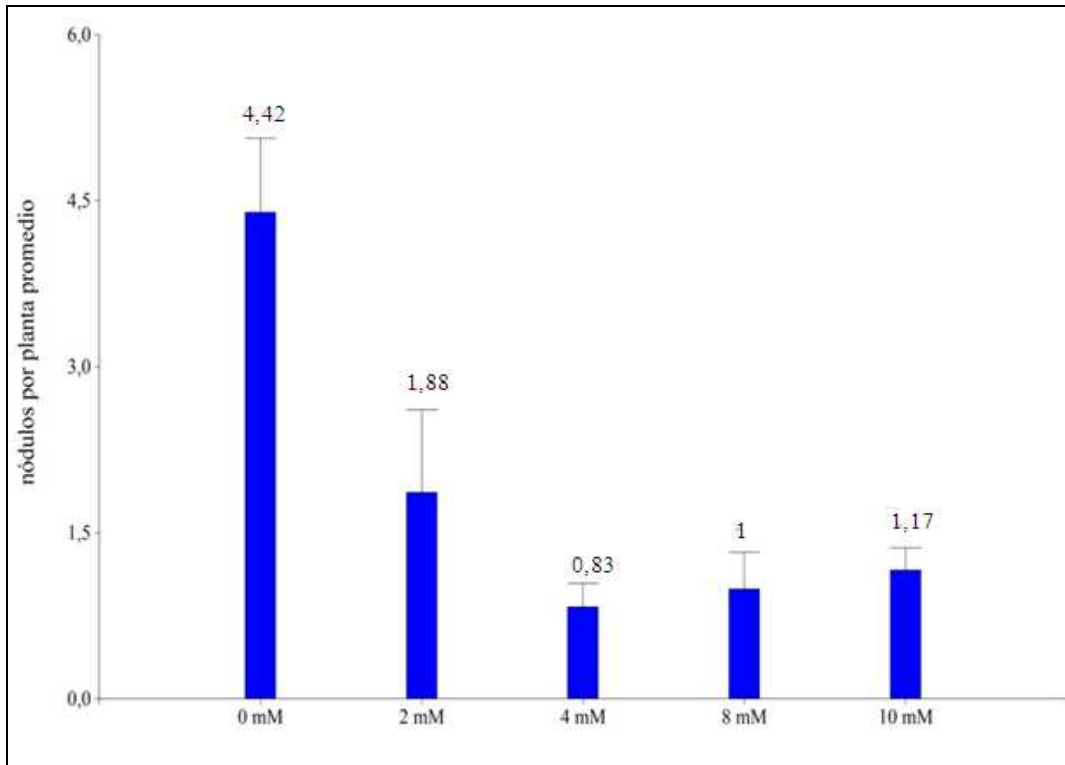


Figura 11. Número de nódulos por planta promedio. El número de nódulos se determinó 22 días después de la inoculación.

4.2.2 Cinética de nodulación según la concentración de NO_3^-

Según la concentración de NO_3^- en el medio, hubo diferencias significativas ($P < 0,05$) en la cinética de nodulación (Figura 12). En las plantas crecidas a 0 mM la aparición de los primeros nódulos ocurrió 5 días después de la inoculación. En las otras concentraciones ensayadas, los primeros nódulos aparecieron al menos 3 días más tarde. El mayor número de nódulos por planta promedio ocurrió en las crecidas a 0 mM, presentando una tasa de aparición mayor a las demás concentraciones, hasta el cuarto día después de la aparición del primer nódulo (Figura 12). A partir de ese momento la velocidad de aparición de nódulos disminuyó y fue similar a la cinética observada en las concentraciones 2, 4, 8 y 10 mM de NO_3^- , que no presentaron diferencias significativas

entre ellas. En esas concentraciones se observó un incremento lineal en la aparición de nódulos hasta el día 13 después de la aparición del primer nódulo (Figura 12). Según Liu et al. (2011) las concentraciones de NO_3^- en el suelo $< 2\text{mM}$ estimulan el inicio de la nodulación en trébol blanco, lo que coincide con los resultados obtenidos en esta tesis.

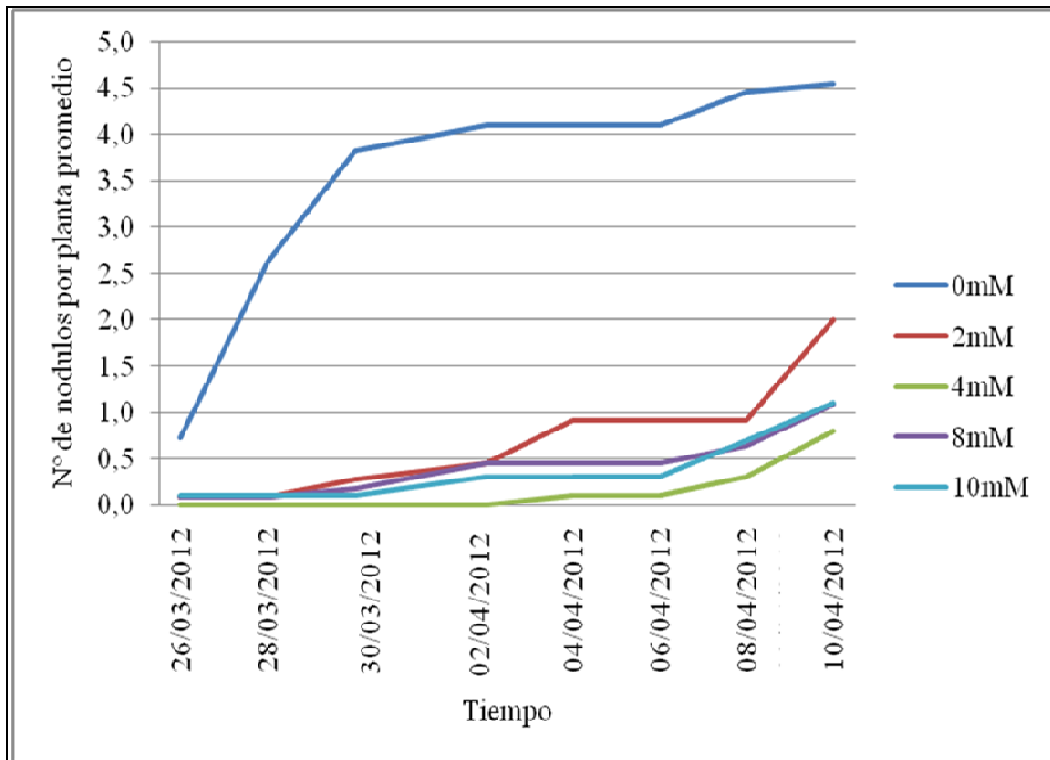


Figura 12. Cinética de nodulación en distintas concentraciones de NO_3^- .

Liu et al. (2011) observaron que al aumentar el contenido de nitrógeno en el medio, se produce una inhibición de la nodulación proporcional a la concentración de éste. Sin embargo, en las condiciones experimentales de esta tesis, a los 20 días después de la inoculación no se observó esa respuesta en el número de nódulos, ni en la cinética de nodulación entre las plantas crecidas a 2, 4, 8 y 10 μM .

4.2.3 Consideraciones agronómicas

En la Figura 13 se observa como las plantas crecidas a 0 mM de NO_3^- si bien tuvieron mayor número de nódulos, presentaron menor crecimiento que las crecidas a concentraciones 2, 4, 8 y 10 mM. La menor nodulación en medio con NO_3^- se debe a que la FBN supone un mayor costo energético que la absorción y reducción de éste desde el suelo (Liu et al., 2011).

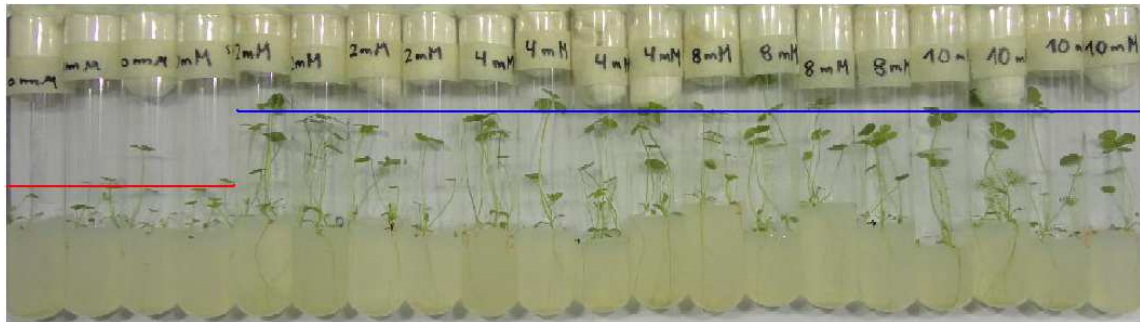


Figura 13. Crecimiento de plantas noduladas en diferentes concentraciones de NO_3^- . La línea roja representa un promedio de la altura de las plantas crecidas a 0 mM de NO_3^- y la línea azul el promedio de la altura de las plantas crecidas a concentraciones 2, 4, 8 y 10 mM de NO_3^- .

Cuando se determinó el número de nódulos no se consideró el tamaño de los mismos, ni su color. De todas formas se apreció una coloración más rojiza y un mayor tamaño en los nódulos de las plantas crecidas en las concentraciones de 0 y 2 mM. Esta coloración se debe a la leghemoglobina, que es usada como un indicador de la FBN (Frioni, 1999).

Sundstrom et al. (1982), demostraron que el mayor peso de la masa nodular por planta y la actividad nitrogenasa se daban a una concentración de 10 ppm de NO_3^- , en comparación a concentraciones de 0, 20 y 40 ppm de NO_3^- . La máxima producción de materia seca se obtuvo a una concentración 40 ppm de NO_3^- .

En Uruguay la siembra de trébol blanco se realiza principalmente asociado a gramíneas perennes invernales, que presentan un nivel crítico de 10 ppm de NO_3^- al momento de la implantación. Esta concentración crítica para la implantación de las gramíneas perennes invernales coincide con lo expuesto por Sundstrom et al. (1982), en cuanto a la mayor actividad nitrogenasa y masa nodular, aunque no coincide con la concentración con la que se obtiene el mayor número de nódulos por planta. Al trasladar estos resultados a la práctica se encuentran algunas dificultades cuando se realiza el análisis de suelo. En los primeros 20 cm se asume una distribución homogénea del NO_3^- en el perfil, que no se ajusta a la realidad porque la concentración de NO_3^- donde se ubica la semilla (primeros cm de suelo) es superior. En este sentido hay una diferencia experimental con la nodulación a diferentes concentraciones de NO_3^- obtenidas en tubos, donde la concentración es homogénea. Al ajustar la fertilización nitrogenada, sería recomendable considerar este aspecto.

4.3 EVALUACIÓN DE LA COMPETITIVIDAD DE DOS INOCULANTES EN DIFERENTES SUELOS DEL URUGUAY

Se evaluó la competitividad del inoculante comercial y de un inoculante experimental, cepas U204 y 317 respectivamente, en relación a las cepas nativas presentes en 5 suelos. Para esto se marcaron con el gen delator *gusA* a esas cepas y los transconjugantes (U204::*gusA* y 317::*gusA*) se usaron como inóculos de semillas de trébol blanco, que se sembraron en cilindros que contenían suelos de La Estanzuela, La Carolina, Tambores, Paso de la Laguna y Palo a Pique (Cuadro 8). Luego de 40 días se contabilizó la cantidad de nódulos ocupados por las cepas marcadas, respecto al total de nódulos. Para esto las raíces noduladas se incubaron en presencia del sustrato Xgluc. Los nódulos que se colorearon de azul estaban ocupados por la cepa marcada. En la Figura 14 se muestran nódulos inducidos por los transconjugantes y por las cepas nativas en diferentes suelos.

Cuando se analizó el número de nódulos ocupados por U204::*gusA* respecto a los ocupados por 317::*gusA* en suelo de La Estanzuela, se observó que 317::*gusA* ocupó el 52 % de los nódulos mientras que U204::*gusA* el 21 % (Figura 15). Este fue el único suelo en donde se encontraron diferencias significativas en la fracción de nódulos ocupados por las cepas U204 y 317. En los suelos de La Carolina, Tambores y Paso de la Laguna los porcentajes de ocupación de nódulos por ambas cepas fue similar (Figura 15). Una situación intermedia se observó en Palo a Pique donde la cepa nativa 317 ocupó el 62 % de los nódulos y el inoculante comercial U204 el 37 %, aunque la diferencia entre ambos tratamientos no fue estadísticamente significativa ($P < 0,05$).

Cuando se comparó la diferencia en la ocupación de nódulos en los distintos suelos, la fracción de nódulos ocupados por la cepa comercial U204 y la cepa nativa 317 en La Estanzuela, La Carolina y en Palo a Pique, fue menor a la observada en Paso la de Laguna y Tambores (Figura 15). Tanto en La Carolina como en La Estanzuela, la práctica de inoculación se realiza desde hace más de 40 años, de manera que estos suelos se encuentran bacterizados. Esto podría explicar los resultados obtenidos en la medida que en los suelos sin bacterizar, el porcentaje de nódulos ocupados por el inoculante fue claramente mayor.

Dutto (2002) consideró que una de las situaciones problemáticas que se pueden presentar en la nodulación de trébol blanco, es en campos sin historia de tréboles, dado que puede estar presente un trébol nativo, *Trifolium polimorfum*, cuyos rizobios asociados son capaces de formar nódulos inefectivos o parásitos en los tréboles sembrados.

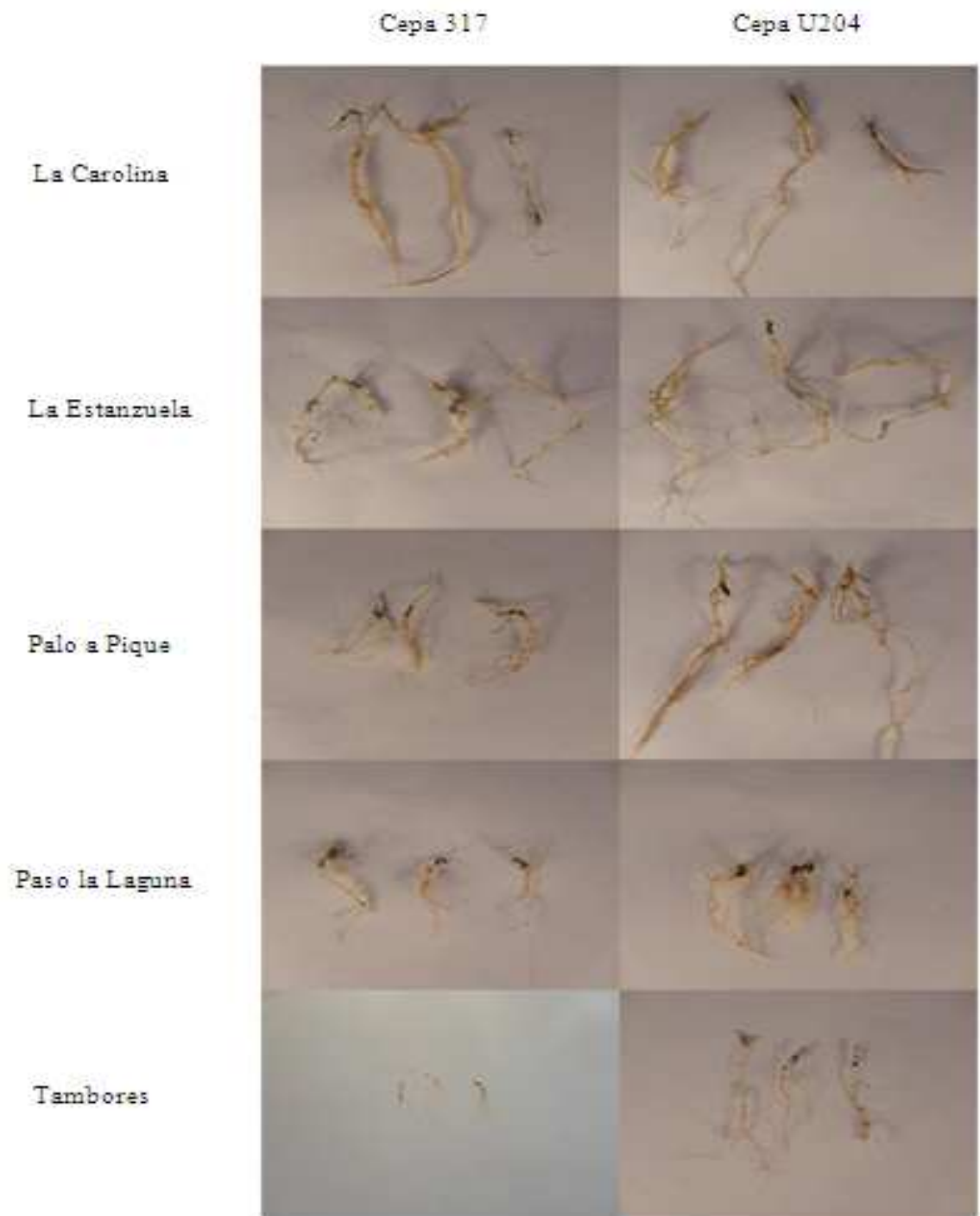


Figura 14. Ocupación de nódulos por dos inoculantes en distintos suelos. Las cepas usadas como inoculantes, marcadas con *gusA*, indujeron nódulos que en presencia del sustrato Xgluc tomaron color azul.

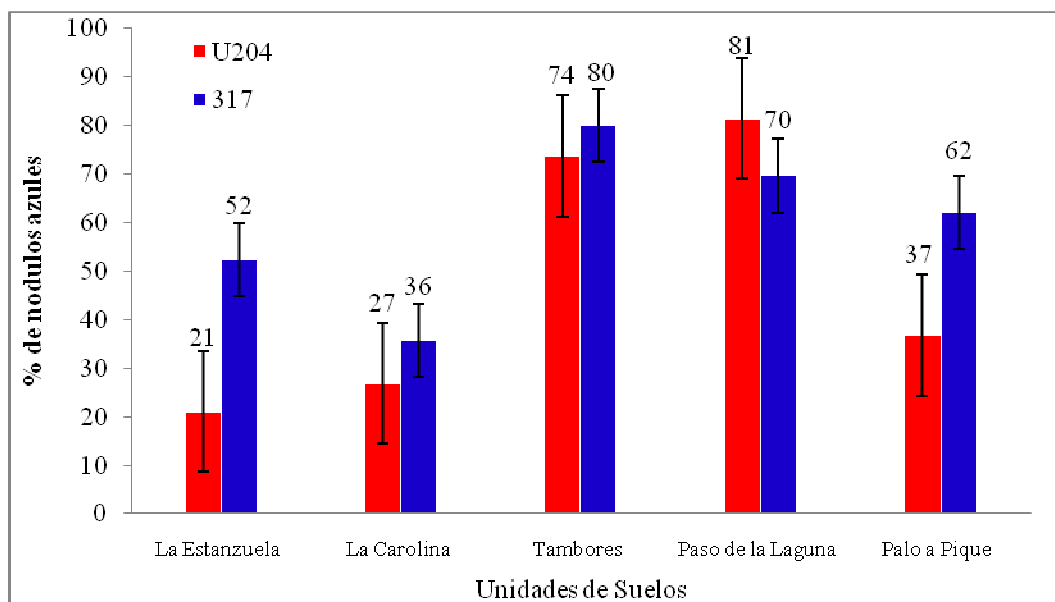


Figura 15. Porcentaje de nódulos ocupados por las cepas usadas como inoculantes y las cepas nativas. U204 es la cepa usada como inoculante comercial para tréboles y 317 una cepa nativa promisorio como inoculante para tréboles.

En los suelos de Tambores y Paso de la Laguna, campos sin antecedentes de trébol blanco, no parece haber ocurrido infección por rizobios nativos parásitos porque la mayoría de los nódulos estaban ocupados por las cepas usadas como inoculante. Sin embargo, la presencia de esos rizobios puede ser la causa de que en Palo a Pique (campos sin antecedentes de trébol blanco) la fracción de nódulos ocupados por las cepas usadas como inoculantes haya sido significativamente menor ($P < 0,05$) que en los suelos de Tambores y Paso de la Laguna, y estadísticamente igual a los suelos de La Carolina y La Estanzuela (Figura 15).

Aun cuando el porcentaje de ocupación de nódulos por la cepa comercial fue inferior en el suelo de La Estanzuela, como consecuencia del alto número de nódulos totales por planta, el número de nódulos por planta inducidos por esta cepa fue el mayor (Figura 16). Lo contrario ocurrió en los suelos de La Carolina y Palo a Pique, donde el número de nódulos ocupados por la cepa comercial fue el más bajo. La ocupación de nódulos por las cepas usadas como inoculantes fue intermedia en los suelos de Tambores y Paso de la Laguna respecto a La Carolina, Palo a Pique y La Estanzuela (Figura 16).

Es interesante observar como el número total de nódulos ocupados por la cepa 317 fue siempre mayor o igual a los ocupados por la cepa U204, de manera similar a lo que sucedió cuando se analizó como porcentaje de ocupación de nódulos (Figura 16).

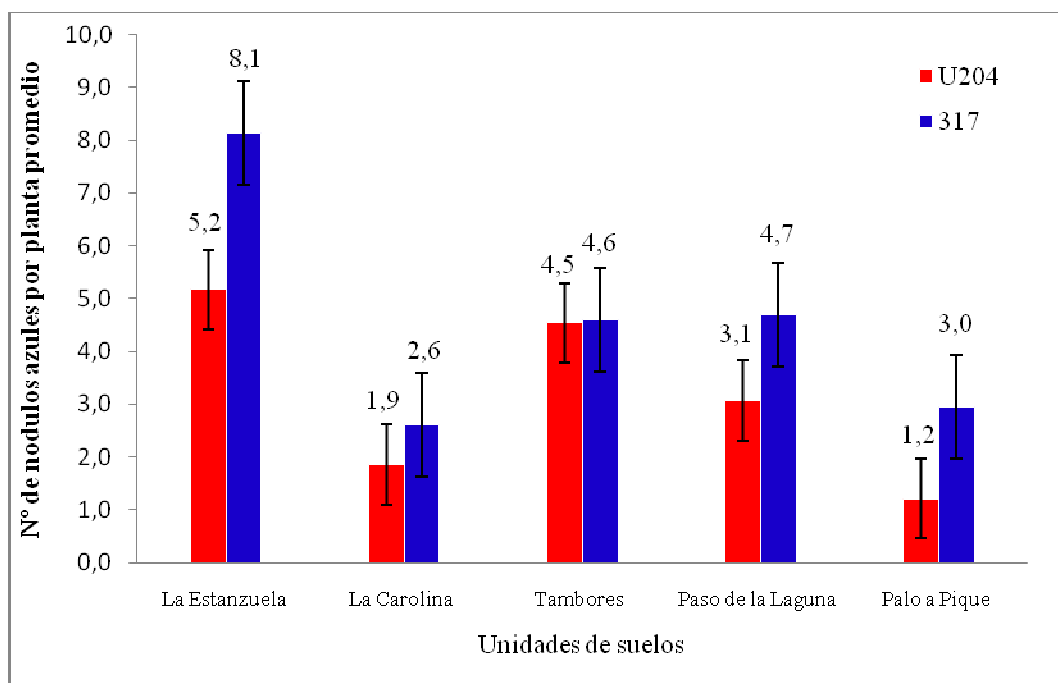


Figura 16. Número de nódulos por planta promedio ocupados por las cepas 317 y U204 marcadas con *gusA*. Las líneas verticales indican el desvío estándar, y los números sobre ellas el valor del número de nódulos azules por planta promedio.

4.4 EVALUACIÓN DE LA NODULACIÓN EN SEMILLAS PREINOCULADAS Y CON INOCULACIÓN CONVENCIONAL

La preinoculación consiste en inocular semillas mediante procesos industriales, lo que da cierta flexibilidad en la logística de siembra por permitir almacenar la semilla por 30 días, durante los que se conserva la viabilidad e infectividad de las bacterias. En el caso de la inoculación convencional, realizada por el productor, pueden ocurrir fallas en la aplicación del inoculante, además de ser acotado el tiempo de almacenaje de las semillas a poco más de un día una vez inoculadas, hasta el momento de la siembra.

Se realizaron dos ensayos para evaluar dos estrategias de inoculación, la convencional y la preinoculación. Para esto se usó a la cepa comercial U204 y los ensayos se instalaron en dos suelos contrastantes según la historia de inoculación: en La Estanzuela, Colonia (Brunosol Éútrico Típico) con una larga historia de inoculación y en Tambores, Tacuarembó (Litosol Éútrico Melánico) sin antecedentes de inoculación. Los tratamientos fueron, inoculación convencional, preinoculación y sin inocular.

Los ensayos se cosecharon 60 días después de la siembra y se extrajeron los nódulos de las raíces principales y secundarias para analizar su ocupación. Para esto se aislaron rizobios y se extrajo ADN genómico, que se amplificó por PCR con los *primers* ERIC para identificar los aislados del ensayo de La Estanzuela y BOX para identificar los aislados de Tacuarembó. En las Figuras 17 y 18 se muestran tres geles representativos de perfiles genómicos de cada lugar, de cada tratamiento.

En los suelos de La Estanzuela se observó una gran diversidad de cepas, tanto en los tratamientos inoculados como en el testigo sin inocular. Esto corrobora que son suelos bacterizados, consecuencia de una larga historia de inoculación (Figura 17). Lo contrario se observó en los suelos de Tacuarembó en donde la diversidad de cepas encontradas fue menor que en los suelos de La Estanzuela. Esto indica que se trata de un suelo no bacterizados (Figura 18).

En La Estanzuela no se encontró diferencia en el número de nódulos ocupados por el inoculante cuando se comparó la estrategia de preinoculación con la inoculación convencional (Figura 19), tanto en raíces principales como en secundarias. El porcentaje de ocupación de nódulos por la cepa comercial en este sitio fue menor al 10 %, tanto en raíces principales como secundarias. Tampoco se determinaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en la ocupación de nódulos entre el tratamiento inoculado convencional y preinoculado, con el testigo sin inocular (Figura 19). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Schumpp y Deakin (2010) que reportan que en un 90 % de los casos la inoculación con rizobios no tendría efecto sobre la nodulación.

Contrariamente a lo observado en La Estanzuela, en Tacuarembó se encontró un alto porcentajes de nódulos ocupados por la cepa comercial, mayor al 90 % en el tratamiento con inoculación convencional y también en el preinoculado, cuando se analizaron nódulos de raíz principal y de raíz secundaria. El testigo no presentó nódulos ocupados por el inoculante (Figura 19). En este suelo se determinó una diferencia significativa en la ocupación de nódulos por el inoculante comercial entre los dos tratamientos inoculados y el testigo sin inocular. Esto evidencia por un lado la necesidad de inocular en suelos sin antecedentes de inoculación (Dutto, 2002) y por otro, que la historia de inoculación es la principal responsable de los porcentajes de ocupación, y no la técnica de inoculación utilizada. La preinoculación podría ser una tecnología que facilite las actividades de siembra, aunque su valides en el tiempo sea acotada y requiera inocular el lote para asegurar la implantación en aquellos suelos donde hay alta respuesta a la inoculación.

Los resultados obtenidos en La Estanzuela en cuanto a la ocupación de nódulos por el inoculante fueron similares a los obtenidos en el marco del proyecto FONTAGRO FTG 787/05 de 2008, en el que se observó que el impacto de la inoculación es menor en suelos con larga historia de inoculación.

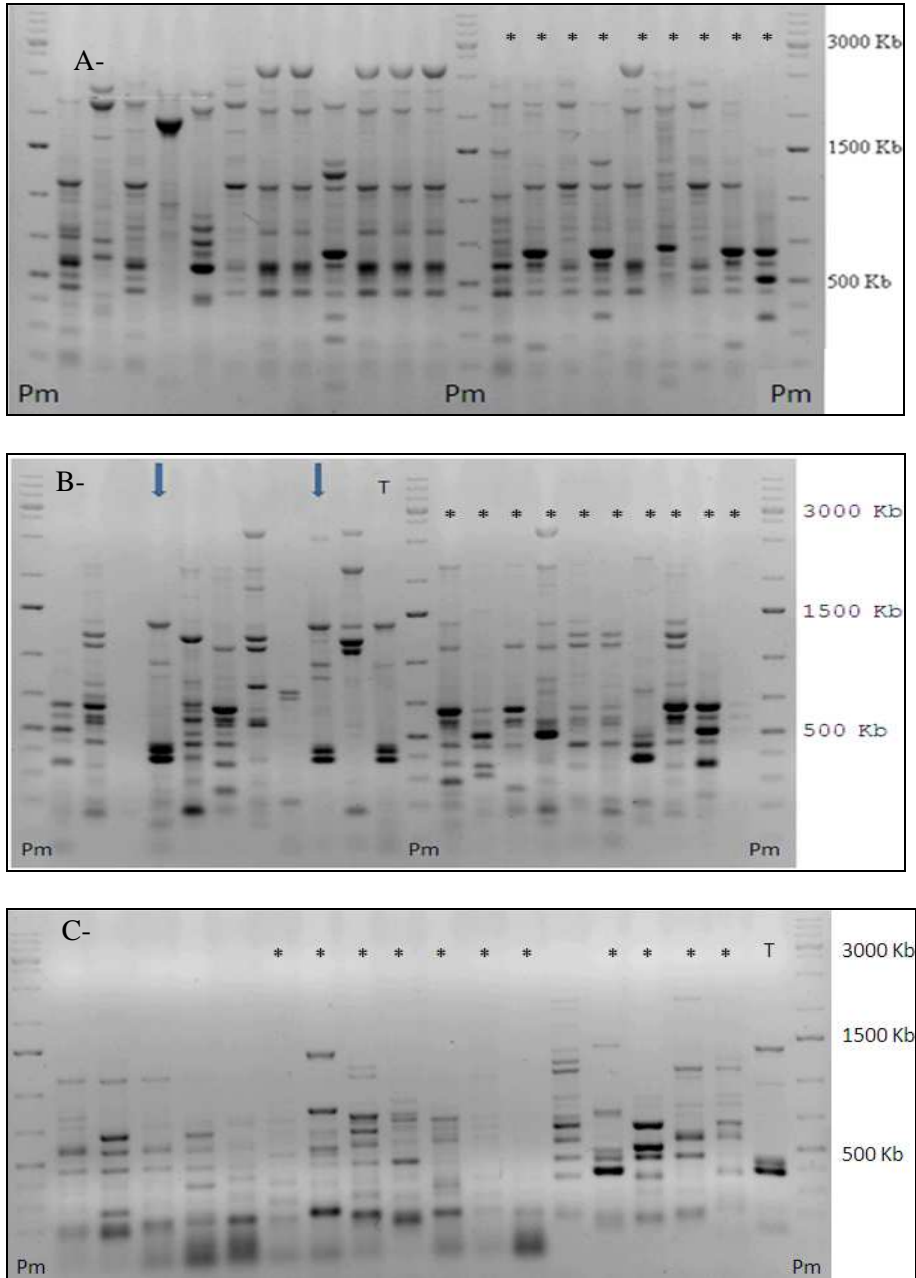


Figura 17. Perfiles ERIC de aislados de nódulos del ensayo realizado en La Estanzuela. A. preinoculado, B. inoculado convencional y C. sin inocular. PM indica el marcador de peso molecular, T corresponde al perfil del inoculante comercial usado como control. Los perfiles indicados con una flecha corresponden a cepas que tienen al menos 60 % de las bandas iguales al control, y se consideran iguales entre sí. Los * indican nódulos inducidos en raíces secundarias y los carriles sin asterisco a aislados de nódulos de raíz principal.

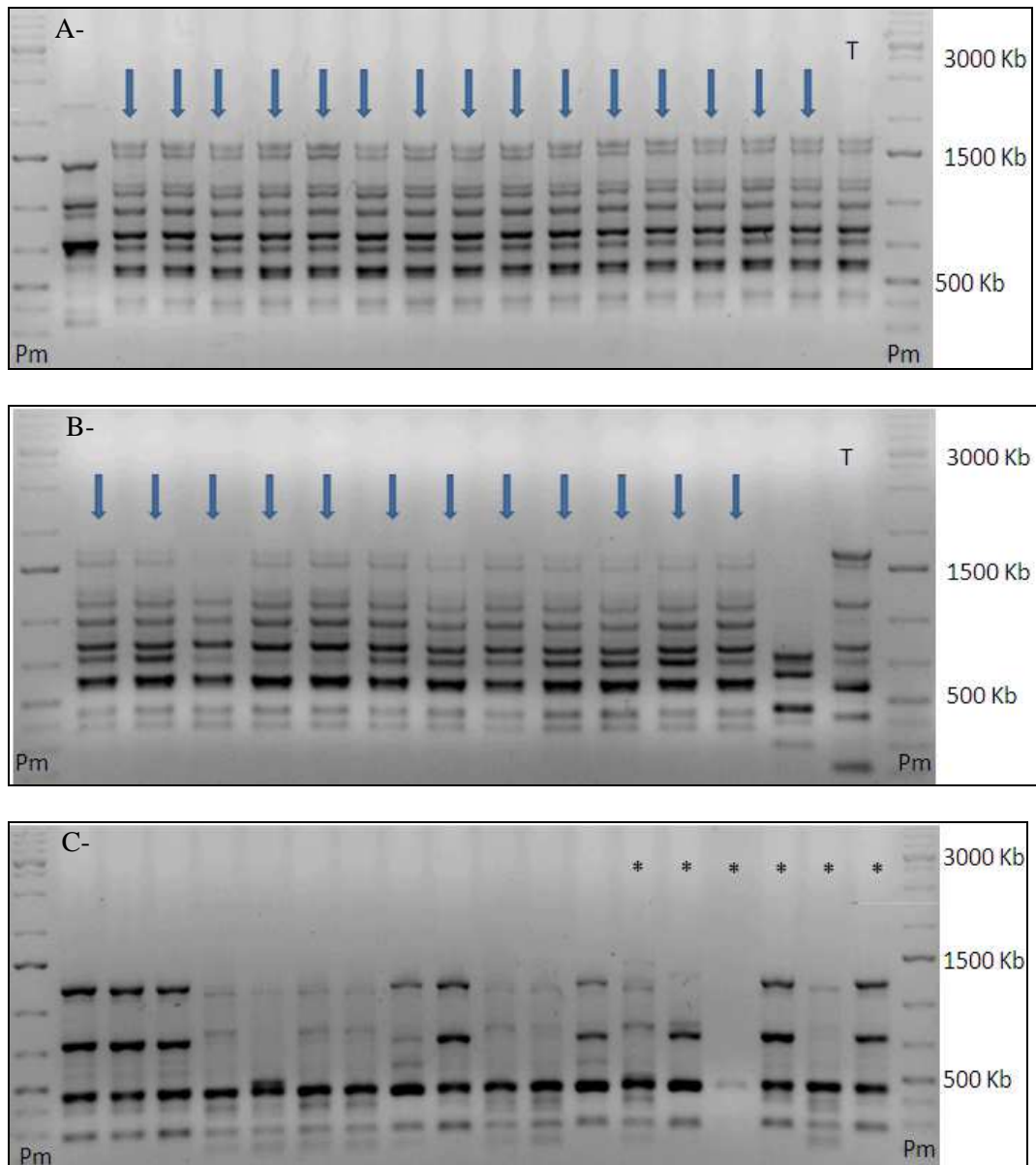


Figura 18. Perfiles BOX de aislados de nódulos del ensayo realizado en Tacuarembó. A. preinoculado, B. inoculado convencional y C. sin inocular. El ensayo se realizó en Tacuarembó. PM indica el marcador de peso molecular, T corresponde al perfil del inoculante comercial usado como control. Los perfiles indicados con una flecha corresponden a cepas que tienen al menos 60 % de las bandas iguales al control, y se consideran iguales entre sí. Los * indican nódulos inducidos en raíces secundarias y los carriles sin asterisco a aislados de nódulos de raíz principal.

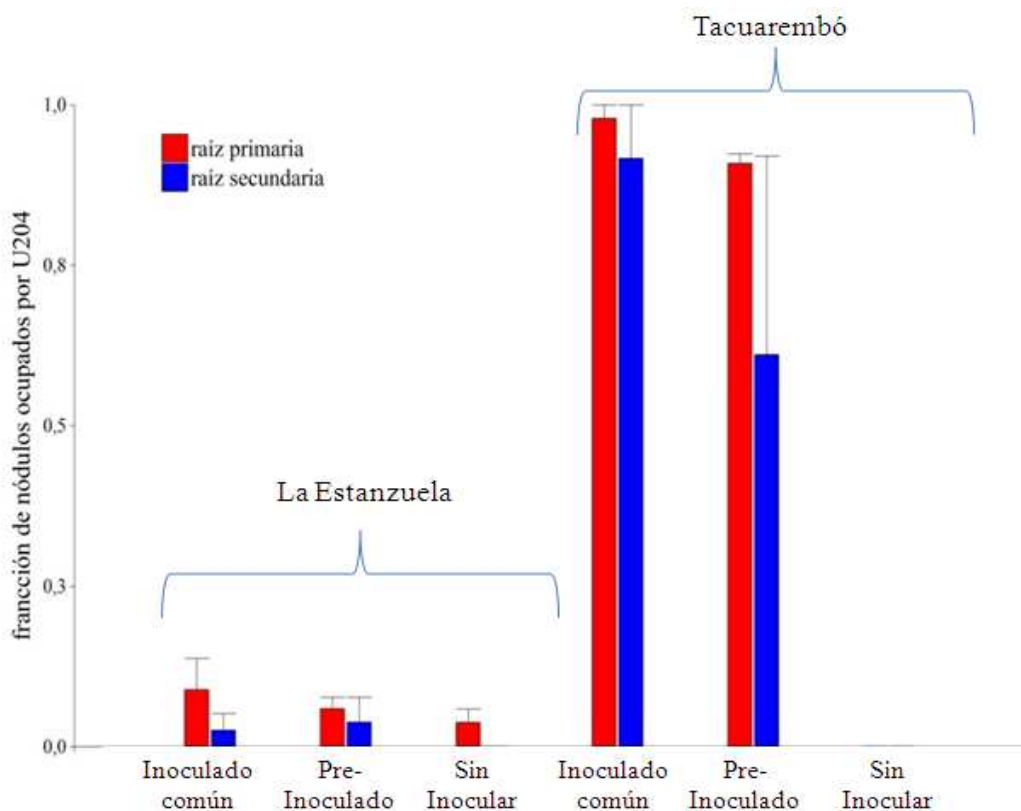


Figura 19. Fracción de nódulos ocupados cuando se usó inoculación convencional y preinoculación. Las dos formas de inoculación se ensayaron en dos suelos, uno con historia de inoculación (La Estanzuela) y otro sin historia (Tacuarembó). Se analizaron nódulos de raíces principales y secundarias de cada tratamiento y lugar. Las líneas verticales indican el desvío estándar.

En las raíces secundarias, si bien no se registraron diferencias significativas ($P < 0,05$) en la fracción de nódulos ocupados respecto a las raíces principales, en el tratamiento preinoculado y el inoculado convencional, se observó que la fracción de nódulos fue siempre menor en valor absoluto (Figura 19). Este resultado no concuerda con el reportado en el proyecto Fontagro FTG 787/05 de 2008, en relación a que el inoculante comercial indujo nódulos en la raíz principal, pero en las raíces secundarias los nódulos estaban ocupados casi exclusivamente por cepas nativas.

En el Cuadro 11 se resume el total de nódulos analizados por sitio y tratamientos (inoculación convencional y preinoculación) y se incluyó el control sin inocular. En total se analizaron 419 perfiles genómicos de rizobios aislados de nódulos de tratamientos instalados en Tacuarembó y en La Estanzuela. Si bien el número de perfiles analizados

es alto, fue algo mayor en La Estanzuela (223) que en Tacuarembó (196), debido a que las plantas en este último sitio siempre tuvieron un menor desarrollo y número de nódulos respecto a las carecidas en La Estanzuela.

Cuadro 11. Número total de nódulos analizados cuando se realizó inoculación convencional y preinoculación.

Número de nódulos analizados por tratamiento				
Lugares de ensayo	Raíces	Inoculado convencional	Preinoculado	Sin inocular
La Estanzuela	Primaria	33	37	56
	Secundaria	38	36	23
Total de nódulos analizados		71	73	79
Tacuarembó	Primaria	54	44	24
	Secundaria	14	19	41
Total de nódulos analizados		68	63	65

La diferente topofisis de los nódulos importa desde el punto de vista productivo, ya que a igualdad de masa nodular, los nódulos implantados en la raíz principal cercanos al cuello de la planta, tienen actividad nitrogenosa específica varias veces superior a los de las raíces secundarias, posiblemente como consecuencia de un mayor suministro de fotoasimilados (Racca y Collino, 2006).

En trébol rojo la presencia de cepas nativas en los nódulos distales sugiere que la competencia o persistencia de la cepa comercial en el suelo es insuficiente para ocupar esos nódulos. Así, a partir del 6to u 8vo mes, el nitrógeno fijado provendría de los nódulos ocupados por las cepas nativas por lo general con menor eficiencia que la cepa comercial o directamente de cepas parásitas. De esta forma, el beneficio de la inoculación es relevante en la implantación del trébol rojo, particularmente en suelos donde no hay historia previa del cultivo, ya que difícilmente el beneficio se extienda durante un tiempo más prologado en la vida de la planta, debido a que entre los nódulos que se forman en las raíces nuevas predominan los inducidos por las cepas nativas (Batista, 2013). Los resultados obtenidos en esta tesis para trébol blanco difieren de estos, pero falta establecer el tiempo en que los nódulos de tréboles son funcionales y si esto puede incidir en la reinfeción.

De cualquier forma, aun en suelos bacterizados, el costo de la inoculación en relación al costo de implantación de una pradera es muy bajo, aunque conlleva una tarea extra y una mínima operativa que se elimina con el uso de semilla preinoculada, además de evitar inconvenientes en el proceso de inoculación convencional.

5. CONCLUSIONES

1. En condiciones *in vitro*:
 - a. La cinética de nodulación del inoculante comercial U204 disminuye con la temperatura y es crítica debajo de 10°C, temperatura promedio que se da a fines de otoño principios de invierno. En este sentido la siembra tardía compromete la nodulación.
 - b. La nodulación no varía en concentraciones de nitrato frecuentes en suelos entre 2 y 10 mM, pero se incrementa a concentraciones menores a 2 mM, infrecuentes en suelos.

2. La cepa nativa 317, promisorio para ser usada como inoculante por su eficiencia simbiótica, lo es también por su competitividad en distintos suelos dado que ocupa igual o más nódulos que la cepa usada como inoculante comercial.

3. El porcentaje de nódulos ocupados por los inoculantes (317 y U204) está más relacionado con la historia del uso de inoculantes en los suelos, que con la cepa utilizada como inoculante.

4. El número de nódulos ocupados por el inoculante no depende de la práctica de inoculación (convencional o preinoculación) pero sí de la historia de inoculación del predio porque en los suelos no bacterizados la ocupación de nódulos por el inoculante es mayor que en suelos bacterizados.

5. Las técnicas de identificación de cepas utilizadas, PCR y genes delatores, facilitan la evaluación de la competencia de cepas. Esto permitirá:
 - a. Incorporar el criterio de competencia en la selección de cepas a ser utilizadas como inoculantes.
 - b. Evaluar la eficiencia simbiótica (producción de biomasa) de los inoculantes en relación a las cepas presentes en los nódulos.
 - c. Evaluar mayor número de nódulos, respecto a los que eran posibles evaluar con técnicas convencionales.

6. RESUMEN

Inicialmente se determinó el efecto de la temperatura y de la concentración de nitrógeno combinado sobre la nodulación de trébol blanco por el inoculante comercial para tréboles usado en Uruguay, cepa U204 de *Rhizobium leguminosarum*. Las temperaturas ensayadas fueron las promedio de los meses de otoño (24, 15 y 10°C) y se estimó la cantidad de nódulos formados en cada situación. Las plantas crecieron *in vitro* en medio Jensen sin nitrógeno durante 21 días. A 10°C sólo se desarrollaron los dos primeros foliolos y no hubo nodulación y a 15 y 24°C la aparición del primer nódulo fue, respectivamente, después del décimo y sexto día de la inoculación. El número total de nódulos por planta fue del orden de 1 para las crecidas a 15°C y de 4 para las crecidas a 24°C, y hubo diferencias significativas en la tasa de nodulación entre 15 y 24°C. El efecto de la concentración de NO₃⁻ sobre la nodulación se determinó a los 23 días, en plantas crecidas *in vitro* en medio Jensen con NO₃⁻ 0, 2, 4, 8 y 10 mM, concentraciones posibles de encontrarse en suelos del Uruguay. Las plantas crecidas a 0 mM de NO₃⁻ desarrollaron más nódulos que las plantas crecidas con 2, 4, 8 y 10 mM. Entre estas concentraciones no hubo diferencias significativas en el número de nódulos promedio por planta. Para evaluar la competitividad del inoculante comercial y de la cepa nativa promisoría 317 en relación a las cepas nativas presentes en 5 suelos, las cepas U204 y 317 se marcaron con el gen delator *gusA*. Los transconjugantes (U204::*gusA* y 317::*gusA*) se usaron como inóculos de semillas de trébol blanco, que se sembraron en cilindros que contenían suelos de La Estanzuela, La Carolina, Tambores, Paso de la Laguna y Palo a Pique. A los 40 días después de la siembra, en suelo de La Estanzuela U204::*gusA* ocupó el 21 % de los nódulos y 317::*gusA* el 52 %. Este fue el único suelo en donde se encontraron diferencias significativas en la cantidad de nódulos ocupados por estas cepas. En los suelos de La Carolina, Tambores, Palo a Pique y Paso de la Laguna no hubo diferencias significativas en la ocupación de nódulos entre U204 y 317. Cuando se comparó el porcentaje de ocupación de nódulos en los suelos con distinta historia de inoculación, el porcentaje de nódulos ocupados por estas cepas fue menor en La Estanzuela, La Carolina y Palo a Pique, respecto a Paso de la Laguna y Tambores. La preinoculación se evaluó respecto a la inoculación convencional con la cepa U204. Los ensayos se realizaron en La Estanzuela, suelos con larga historia de inoculación, y en Tacuarembó, en suelos sin antecedentes de inoculación. En La Estanzuela no se encontraron diferencias significativas en la ocupación de nódulos entre el tratamiento inoculado convencional, preinoculado y el testigo sin inocular. Los nódulos ocupados por U204 fueron menores al 10 %, en raíces principales y secundarias. En Tacuarembó, los nódulos ocupados por U204 fueron mayores al 90 % tanto con inoculación convencional como con preinoculación, mientras que el testigo no presentó nódulos ocupados por U204. No hubo diferencias significativas en la ocupación de nódulos entre ambas técnicas de inoculación en este suelo, no bacterizado.

Palabras clave: Leguminosas; FBN; *gusA*; Preinoculación; *Rhizobium leguminosarum*.

7. SUMMARY

The effects of temperature and combined nitrogen concentration on white clover nodulation by the commercial inoculant for clovers used in Uruguay, *Rhizobium leguminosarum* U-204 strain, were determined. The temperatures tested were the average of the autumn months (24, 15 and 10°C) and the number of nodules formed in each situation were evaluated. The plants were grown in vitro in Jensen medium without nitrogen during 21 days. At 10°C only the first two leaflets developed and there was no nodulation. At 15 and 24°C the first nodule appeared after the tenth and sixth day of the inoculation, respectively. The total number of nodules per plant was in the order of 1 for those grown at 15°C and 4 for the ones grown at 24°C, and significant differences occurred in the rate of nodulation between 15 and 24°C. The effect of NO₃⁻ concentration over the nodulation was determined at 23 days, in plants grown in vitro on Jensen medium with NO₃⁻ 0, 2, 4, 8 and 10 mM concentrations, possible values to be found in Uruguayan soils. The plants grown in 0 mM NO₃⁻ developed more nodules than plants grown with 2, 4, 8 and 10 mM. Among these concentrations there were no significant differences in the average number of nodules per plant. To evaluate the competitiveness of the commercial inoculant and a native promising strain, 317, in relation to the native strains present in 5 soils, U204 and 317 strains were marked with the *gusA* reporter gene. Transconjugants (U204::*gusA* and 317::*gusA*) were used as inoculants of white clover seeds, sown in cylinders containing soils from La Estanzuela, La Carolina, Tambores, Paso de la Laguna and Palo a Pique. After 40 days of the sowing, we observed that in La Estanzuela the strain U204::*gusA* occupied 21 % of the nodules and 317::*gusA* the 52 %. This was the only soil where significant differences were found in the number of nodules occupied by these strains. In La Carolina, Tambores, Palo a Pique and Paso de la Laguna there was no significant differences in the percentage of occupancy of nodules between U204 and 317. When comparing the percentage of occupancy of nodules in soils with different history of inoculation, the percentage of nodules occupied by these strains were lower in La Estanzuela, La Carolina and Palo a Pique, regarding Paso de la Laguna and Tambores. Pre-inoculation was evaluated in relation with the conventional inoculation with the strain U204. The rehearsals were performed in La Estanzuela soils with a long history of inoculation, and in Tacuarembó, with no history of inoculation. In La Estanzuela no significant differences were found in nodule occupancy between conventional inoculated treatments, pre-inoculated and the control without inoculation. The nodules occupied by U204 was lower than 10% in the main and secondary roots. In Tacuarembó, the nodules occupied by U204 was greater than 90% with both conventional inoculation and pre-inoculation, while the control showed no nodule occupied by U204. No significant differences in nodule occupancy among the two inoculation techniques in this soil not bacterized was detected.

Key words: Legumes; FBN; *gusA*; Pre-inoculation; *Rhizobium leguminosarum*.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. AGIUS, F.; SANGUINETTI, C.; MONZA, J. 1997. Strain-specific fingerprints of *Rhizobium loti* generated by PCR with arbitrary and repetitive sequences. FEMS Microbiology Ecology. no. 24: 87-92.
2. BATISTA, L. 2013. Prospección y caracterización de rizobios para el desarrollo de inoculantes para trébol y lotus. Tesis de maestría en Ciencias Agrarias. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 140 p.
3. BOSMAN, H. G.; CASTILLO, E.; VALLÉS, B.; DE LUCÍA, G. R. 1990. Composición botánica y nodulación de leguminosas en las pasturas nativas de la planicie costera del Golfo de México. Pasturas Tropicales. no. 12: 1-8.
4. BOTTOMLEY, P. J.; MYROLD, D.D. 2007. Biological nitrogen fixation; the return of N to the soil. In: Paul, E. A. ed. Soil microbiology, ecology, and biochemistry. 3rd. ed. Burlington, USA, Academic Press. pp. 365-387.
5. CAMARGO, D. 2012. Desarrollo de un inoculante rizobiano para un nuevo cultivar de *Lotus uliginosus*. Tesis de Maestría en Biotecnología. Montevideo, Uruguay. Facultad de Ciencias. 93 p.
6. CARÁMBULA, M. 2003. Pasturas y forrajes; potenciales y alternativas para producir forraje. Buenos Aires, Argentina, Hemisferio Sur. t. 1, 357 p.
7. DE BRUIJN, F. 1992. Use of repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and the soil bacteria. Applied and Environmental Microbiology. no. 58: 2180 - 2187.
8. DÍAZ, R. 2011. Importancia de la fijación biológica del nitrógeno en la restauración de carbono en los suelos y su impacto en la productividad y sostenibilidad. In: Reunión Latinoamericana de Rizobiología (25^a., 2011, Piriápolis, Uruguay). Resúmenes. Montevideo, Uruguay, Alar. p. 25.
9. DUTTO, P. 2002. Recomendaciones para situaciones con problemas; inoculación de leguminosas. Revista del Plan Agropecuario. no. 102: 54 - 57.
10. ESTRELLA, M.; MUÑOZ, S.; SOTO, M.; RUIZ, O.; 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*. no. 75: 1088-1098.

11. FABIANO, E.; ARIAS, A. 1991. Competition between a native isolate of *Rhizobium leguminosarum* by trifolii and two commercial inoculant strains for nodulation of colver. *Plant and Soil*. 137: 293 – 296.
12. FONTAGRO. 2009. Proyecto 787/05. Ampliación de la base genética de leguminosas forrajeras naturalizadas para sistemas pastoriles sustentables; informe de seguimiento técnico en el periodo 2008-2009. New York. 13 p.
13. FRIONI, L. 1999. Procesos microbianos. Córdoba, Argentina, Universidad Nacional de Río Cuarto. t. 2, 286 p.
14. GARCÍA, J.A. 1994. Nitrógeno en pasturas; fijación de nitrógeno leguminosas en La Estanzuela. Montevideo, INIA. 64 p. (Serie Técnica no. 51).
15. HARRIS, W.; THOMAS, V.J. 1973. Competition among pasture plants 3. Effects of frequency and height of cutting on competition between white clover and two ryegrass cultivars. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. no. 16: 49- 58.
16. IRISARRI, P.; MILNITSKY, F.; MONZA, J.; BEDMAR, E. 1996. Characterization of rhizobia nodulating *Lotus subbiflorus* from Uruguayan soils. *Plant and Soil*. 180: 39-47.
17. 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.
18. JONES, K.M.; KOBAYASHI, H.; DAVIES, B.W.; TAGA M.E.; WALKER, G.C., 2007. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium–Medicago* model. *Nature Reviews Microbiology*. no. 5: 619 – 633.
19. KEENEY, D.R.; HATFIELD, J. L. 2001. The nitrogen cycle, historical perspective and current and potential future concerns. Cambridge, UK, Elsevier Science. 92 p.
20. LABANDERA, C.; VINCENT, J.M. 1972. Importancia del mantenimiento, control periódico y selección cuantitativa de las cepas de rhizobios usadas en los inoculantes comerciales. In: Reunión Latinoamericana de

Rhizobiología (6ª., 1972, Montevideo, Uruguay). Trabajos presentados. Montevideo, s.e. s.p.

21. _____.; MAYANS, M. 2006. Control de inoculantes en Uruguay. In: Curso Internacional de Producción de Biofertilizantes desde el Laboratorio hasta la Aplicación en Campo (2006, Bogotá, Colombia). Memorias. Bogotá, Colombia, Universidad Nacional. s.p.
22. _____. 2007. Biofertilizantes en Iberoamérica una visión técnica, científica y empresarial, actividades en fijación biológica de nitrógeno; situación actual y perspectivas en Uruguay. Montevideo, Uruguay, Denad Internacional. 78 p.
23. LAGUERRE, G.; VAN BERKUM, P.; AMARGER, N.; PREVOST, D. 1997. Genetic diversity of rhizobial symbionts isolated from legume species within the genera *Astragalus*, *Oxytropis*, and *Onobrychis*. *Applied and Environmental Microbiology*. no. 63: 4748-4758.
24. LINDEMANN, W.C.; HAM, G.F. 1979. Soybean plant growth, nodulation, and nitrogen fixation as affected by root temperatura. New York, USA, Soil Science Society. 1134 p.
25. LINDSTRÖM K, MURWIRA M, WILLEMS A, ALTIER N. 2010. The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism; the case of rhizobia. *Research in Microbiology*. 161: 453 – 463.
26. LIU, Y.; WU, L.; BADDELEY, J. A.; WATSON, C. A. 2011. Models of biological nitrogen fixation of legumes. *Agronomy for Sustainable Development*. 31: 155–172.
27. MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. 2003. Brock **b**ología de los microorganismos. 10ª ed. Naucalpan de Juárez, México, Pearson. 1011 p.
28. MENNA, P.; PALACIOS, J. 2004. Fijación biológica de nitrógeno en la simbiosis rizobio-leguminosa. In: Monza, J.; Márquez, A. eds. El metabolismo del nitrógeno en las plantas. Córdoba, España, Almuzara. pp. 15-38.
29. _____.; PEREIRA, A.A.; BANGEL, E.V.; HUNGRÍA, M. 2009. Rep-PCR of tropical rhizobia for strain fingerprinting, biodiversity appraisal and as a taxonomic and phylogenetic tool. *Symbiosis*. no. 48: 120 – 130.

30. NADAL, S.; MORENO, M. T.; CUBERO, J. I. 2004. Las leguminosas grano en la agricultura moderna. Sevilla, España, Junta de Andalucía. 318 p.
31. PERDOMO, C.; BARBAZÁN, M. 2008. Nitrógeno. Montevideo, Uruguay, Facultad de Agronomía. 72 p.
32. RACCA, R.W.; COLLINO, D.J. 2006. Bases fisiológicas para el manejo de la fijación biológica del nitrógeno en soja. In: Curso Internacional de Producción de Biofertilizantes desde el Laboratorio hasta la Aplicación en Campo (2006, Bogotá, Colombia). Memorias. Bogotá, Colombia, Universidad Nacional. s.p.
33. REBUFFO, M.; BEMHAJA, M.; RISSO, D. 2006. Utilization of forage legumes in pastoral systems; state of art in Uruguay. Lotus Newsletter. no. 3: 22–33.
34. RICHARDSON, A.C.; SYERS, J.K. 1985. Edaphic limitations and soil nutrient requirements of legume-based forage systems in temperate regions of New Zealand. In: Barnes, R.F. ed. Forage legumes for energy-efficient animal production. Washington, D. C., USA, s.e. pp. 89-94.
35. SCHUMPP, O.; DEAKIN, W.J. 2010. How inefficient rhizobia prolong their existence within nodules. Trends in Plant Science. 15: 189-195.
36. SUNDSTROM, F.J.; MORSE, R.D.; NEAL, J.L. (1982). Nodulation and nitrogen fixation of *Phaseolus vulgaris* L. grown in minesoil as affected by soil compaction and N fertilization. Communications in Soil Science and Plant Analysis. 13: 231-245.
37. TAIZ, L.; ZEIGER, E. 1998. Plant physiology. 2nd. ed. Sunderland, USA, Sinauer. 786 p.
38. URUGUAY. MINISTERIO DE GANADERÍA, AGRICULTURA Y PESCA. DIRECCION ESTADISTICA AGROPECUARIA. 2011. Anuario estadístico agropecuario 2011. Montevideo. 246 p.
39. VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Research. 19: 6823–6831.
40. VINCENT, J. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. Oxford, UK, Blackwell Scientific Publications. 164 p.

41. WILSON, K.; SESSITSCH, A.; CORBO, J.; GILLER, K.; AKKERMANS, A.M.; JEFFERSON, R. 1995. β -Glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other Gram-negative bacteria. *Microbiology*. 141: 1691-1705.