

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE *Bradyrhizobium* sp. CEPA U531:  
EFICIENCIA SIMBIÓTICA EN *Lotus angustissimus* INIA Basalto**

**Por**

**Tomás DI LORENZO**

**Federico HERMIDA**

**Mateo VINCENT**

**Trabajo final de grado presentado  
como uno de los requisitos para  
obtener el título de Ingeniero  
Agrónomo**

**MONTEVIDEO**

**URUGUAY**

**2023**

**PÁGINA DE APROBACIÓN**

Trabajo final de grado aprobado por:

Director/a:

---

Dr. Jorge Monza

---

Dr. Rafael Reyno

Tribunal:

---

Dr. Martín Lage

---

Dra. María Morel

---

Dra. Pilar Irisarri

Fecha: 14 de abril de 2023

Estudiante:

---

Tomás Di Lorenzo

---

Federico Hermida

---

Mateo Vincent

## **AGRADECIMIENTOS**

A todas las personas que de diferentes formas colaboraron para que se realizara este trabajo. En primer lugar, al Dr. Jorge Monza por su apoyo y dedicación en todas las instancias que lo necesitamos. Al Ing. Agr. Rafael Reyno, por su soporte y colaboración a lo largo del trabajo. A Carla Silva, Andrés Berais y Santiago Signorelli por el apoyo en el día a día del laboratorio. A María Morel por colaborar en la elaboración de los árboles filogenéticos. Finalmente, a nuestras familias por su apoyo incondicional.

## TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS .....	3
TABLA DE CONTENIDO.....	4
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS .....	6
RESUMEN.....	7
SUMMARY .....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1. Hipótesis.....	12
1.2. Objetivos .....	12
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1. Ventajas de las leguminosas del género <i>Lotus</i> utilizadas para el mejoramiento de pasturas en el Uruguay .....	13
2.2. Rol de las leguminosas invernales <i>L. subbiflorus</i> y <i>L. angustissimus</i> en mejoramientos extensivos de campo natural .....	16
2.3. Valor agronómico de <i>L. angustissimus</i> .....	17
2.4. Entrada y salida de Nitrógeno de los ecosistemas.....	18
2.4.1. Entrada de nitrógeno a los ecosistemas: Fijación Biológica de Nitrógeno.....	19
2.4.2. Salida de nitrógeno de los ecosistemas: desnitrificación.....	21
2.5. FBN en leguminosas forrajeras: cuantificación de la eficiencia simbiótica .....	22
2.6. Simbiosis rizobio-lotus .....	23
2.6.1. Cepas de rizobios que nodulan lotus en suelos del Uruguay .....	24
2.7. Competitividad de las cepas para ocupar nódulos.....	27
2.8. Características deseables de los inoculantes rizobianos .....	28
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
3.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento .....	30
3.1.1. Desinfección y germinación de semillas.....	30
3.1.2. Condiciones de crecimiento de plantas.....	30
3.2. Bacterias, condiciones de crecimiento e inoculación. ....	32
3.2.1. Rizobios .....	32
3.2.2. <i>Escherichia coli</i> .....	33
3.3. Conjugación <i>Bradyrhizobium</i> sp. U531 x <i>Escherichia coli</i> pCAM131 .	34
3.4. Extracción, amplificación y secuenciación del ADN .....	35
3.4.1. Extracción del ADN genómico .....	35

3.4.2.	Amplificación del ADN genómico.....	35
3.4.3.	Electroforesis en Gel de agarosa .....	35
3.5.	Eficiencia simbiótica.....	36
3.5.1.	Cepa U531 en <i>L. subbiflorus</i> y <i>L. angustissimus</i> .....	36
3.5.2.	Aislamientos obtenidos de nódulos de <i>L. angustissimus</i> en INIA Glencoe 36	
3.5.3.	Determinación del peso seco de la biomasa aérea.....	36
3.5.4.	Análisis estadístico .....	37
3.6.	Inoculación de <i>Lotus angustissimus</i> con <i>Mesorhizobium huakuii</i> cepa U510 37	
3.7.	Caracterización genética de <i>Bradyrhizobium</i> sp. cepa U531.....	37
3.8.	Respiración de nitrato de la cepa U531 .....	37
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
4.1.	Caracterización molecular de <i>Bradyrhizobium</i> sp. cepa U531 usada como inoculante comercial de <i>Lotus subbiflorus</i> .....	38
4.1.1.	Taxonomía de <i>Bradyrhizobium</i> sp. que nodulan <i>Lotus</i> sp. basada en la secuencia del gen 16S rRNA.....	38
4.1.2.	Filogenia de <i>Bradyrhizobium</i> sp. cepa U531 establecida a través de secuencias de genes <i>housekeeping</i> .....	40
4.1.3.	Relaciones filogenéticas establecidas a partir de los genes simbióticos <i>nodC</i> y <i>nifH</i> .....	41
4.1.4.	Identificación de los genes <i>nap</i> , <i>nir</i> , <i>nor</i> y <i>nos</i> : capacidad de desnitrificar de <i>Bradyrhizobium</i> sp. cepa U531 .....	44
4.2.	Eficiencia simbiótica <i>Bradyrhizobium</i> sp. cepa U531 – <i>L. angustissimus</i> y <i>L. subbiflorus</i> .....	45
4.3.	Efecto de la inoculación de <i>L. angustissimus</i> con <i>Mesorhizobium huakuii</i> cepa U510 .....	49
4.4.	Generación de una colección de cepas aisladas de nódulos de <i>L.</i> <i>angustissimus</i> .....	51
4.4.1.	Identificación de los aislamientos mediante sus perfiles ERIC .....	51
4.4.2.	Eficiencia simbiótica de las cepas aisladas de <i>L. angustissimus</i> .....	52
4.5.	Marcaje de la cepa U531 con el gen reportero <i>gusA</i> para estudios de competencia .....	55
5.	CONCLUSIONES.....	56
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	57

## LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

<b>Tabla 1</b> Concentración de taninos condensados de diferentes especies y cultivares de lotus usados en Uruguay.....	14
<b>Tabla 2</b> Volumen de semilla comercializado para su uso a nivel nacional entre 2019-2022.....	15
<b>Tabla 3</b> Especie, cepa y origen de los inoculantes comerciales utilizados para las distintas especies de lotus cultivadas en Uruguay.....	24
<b>Tabla 4</b> Composición del medio Jensen.....	30
<b>Tabla 5</b> Solución Rigaud y Puppo .....	31
<b>Tabla 6</b> Riego de los controles con N .....	31
<b>Tabla 7</b> Composición del medio YEM (Yeast extract manitol).....	33
<b>Tabla 8</b> Composición del medio LB.....	34
<b>Tabla 9</b> Identificación de genes de la desnitrificación en <i>Bradyrhizobium</i> sp. cepa U531.....	44
<b>Tabla 10</b> Biomasa aérea acumulada (primer y segundo corte) por <i>L. subbiflorus</i> y <i>L. angustissimus</i> .....	46
<b>Tabla 11</b> Biomasa aérea acumulada de plantas de <i>L. angustissimus</i> en dos cortes .....	52
<b>Figura 1</b> Ciclo del Nitrógeno.....	19
<b>Figura 2</b> Modelo de la nitrogenasa .....	20
<b>Figura 3</b> Reacciones de la vía de desnitrificación .....	21
<b>Figura 4</b> Métodos para cuantificar la fijación de N <sub>2</sub> en leguminosas .....	23
<b>Figura 5</b> Reacción que explica la coloración azul de nódulos que llevan rizobios marcados .....	28
<b>Figura 6</b> Sistema de riego automático.....	32
<b>Figura 7</b> Estructura del trasposón donador del gen <i>gusA</i> de <i>E. coli</i> pCAM131...	34
<b>Figura 8</b> Filogenia realizada con el gen 16S rRNA.....	39
<b>Figura 9</b> Filogenia realizada con secuencias parciales de los genes housekeeping .....	41
<b>Figura 10</b> Árbol filogenético realizado con los genes simbióticos <i>A. nodC</i> y <i>B. nifH</i> .....	43
<b>Figura 11</b> Nodulación eficiente de <i>Bradyrhizobium</i> sp. cepa U531 en plantas de <i>L. angustissimus</i> .....	48
<b>Figura 12</b> Plántulas inoculadas con <i>Mesorhizobium huakuii</i> cepa U510 .....	50
<b>Figura 13</b> Perfiles ERIC de 10 aislamientos de nódulos de <i>L. angustissimus</i> y la cepa U531.....	51
<b>Figura 14</b> Evolución de biomasa aérea del primer y segundo corte y el acumulado según tratamiento.....	52
<b>Figura 15</b> Biomasa aérea de <i>L. angustissimus</i> inoculado con las distintas cepas aisladas de nódulos y la cepa U531 .....	53

## RESUMEN

*Lotus angustissimus* es una leguminosa cada vez más usada en Uruguay como especie forrajera para el mejoramiento de campo natural. Actualmente se inocula con *Bradyrhizobium* sp. cepa U531, el inoculante comercial para *Lotus subbiflorus*. En condiciones controladas, la eficiencia simbiótica de la cepa U531 en ambos hospederos, evidenció que en *L. subbiflorus* la biomasa rindió un 63% respecto al control con KNO<sub>3</sub> 10 mM, mientras en *L. angustissimus* la biomasa del tratamiento inoculado fue 57% mayor al control con N. Esto sugiere que la cepa U531 tiene una eficiencia simbiótica adecuada en *L. angustissimus*, pero también plantea interrogantes sobre las razones por las que el control con N acumula menos biomasa que el tratamiento inoculado. Los tratamientos con diferentes concentraciones de KNO<sub>3</sub> y fuentes de N (urea) tampoco permitieron superar la producción de biomasa aérea generada por las plantas noduladas. Por otra parte, de 5 aislamientos con diferente perfil ERIC obtenidos de nódulos de *L. angustissimus* colectados en Glencoe, las cepas GL2 y GL10 indujeron la misma biomasa seca que el tratamiento con la cepa U531, mientras que la cepa GL5 indujo mayor acumulación de biomasa. Para estimar la competitividad de la cepa U531 se intentó el marcaje con el gen delator *gusA*. Los diferentes tiempos de conjugación ensayados no permitieron incorporar el trasposón en el receptor, lo que indica incompatibilidad entre el donador y el receptor, por lo que debe ser evaluado otro tipo de marcaje, o una evaluación a través de identificación de perfiles ERIC o BOX-PCR. En cuanto al efecto del inoculante de *L. corniculatus*, *Mesorhizobium huakuii* cepa U510 sobre *L. angustissimus*, a los 21 días en condiciones *in-vitro* no indujo una nodulación eficiente.

La caracterización genética de *Bradyrhizobium* sp. cepa U531 incluyó el análisis de la secuencia del gen 16S RNA (1.245 nt), de los genes *housekeeping* *atpD* (330 nt), *glnII* (525 nt) y *recA* (368 nt) y de los genes simbióticos genes *nodC* (203 nt) y *nifH* (240 nt). La secuencia del gen 16S RNA sitúa a esta cepa dentro del género *Bradyrhizobium*, pero la secuencia de los genes *housekeeping* concatenados no la agrupa con ninguna de las especies de *Bradyrhizobium* descritas, por lo que se propone que se trata de una nueva especie. Según los genes simbióticos agrupa junto a una cepa de *Bradyrhizobium* aislada de *Chamaecytisus proliferus* en Islas Canarias y a la cepa CNL9, aislada en Uruguay de *Lotus uliginosus*. Dado que es

frecuente entre los *Bradyrhizobium* la capacidad de desnitrificar se buscó en el genoma de la cepa U531 secuencias homólogas a la de los genes que participan en la desnitrificación. Mediante este análisis se identificaron secuencias con homología con los genes *nir*, *nor* y *nos*, responsables de esta vía. El análisis fenotípico de la capacidad de desnitrificar en un medio anaeróbico con  $\text{NO}_3^-$ , no permite asegurar que la cepa desnitrifique.

*Palabras clave:* *Bradyrhizobium* sp. cepa U531, *Lotus angustissimus*, eficiencia simbiótica, caracterización genética



## SUMMARY

*Lotus angustissimus* is a legume that is increasingly used in Uruguay as a forage species for the improvement of natural fields. It is currently inoculated with *Bradyrhizobium* sp. strain U531, the commercial inoculant for *Lotus subbiflorus*. Under controlled conditions, the symbiotic efficiency of strain U531 in both hosts showed that in *L. subbiflorus* the biomass yielded 63% compared to the nitrogen control with 10 mM KNO<sub>3</sub>, while in *L. angustissimus* the biomass of the inoculated treatment was 57% higher than the control with N. This suggests that strain U531 has an adequate symbiotic efficiency in *L. angustissimus*, but also raises questions about why the N control accumulates less biomass than the inoculated treatment. None of the treatments with different concentrations of KNO<sub>3</sub> and sources of N (urea) was able to overcome the production of aerial biomass generated by the nodulated plants. On the other hand, of 5 isolates with different ERIC profiles obtained from *L. angustissimus* nodules collected in Glencoe, GL2 and GL10 strains induced the same dry biomass as the treatment with the U531 strain, while GL5 strain induced more accumulation of biomass. To estimate the competitiveness of strain U531, the marking with the reporter gene *gusA* was attempted. The different conjugation times tested did not allow the transposon to be incorporated into the receiver, which indicates incompatibility between the donor and the receiver, so another type of marking should be evaluated, or an evaluation through the identification of ERIC or BOX-PCR profiles. Regarding the effect of the inoculant of *L. corniculatus*, *Mesorhizobium huakuii* strain U510 on *L. angustissimus*, at 21 days *in-vitro* conditions, efficient nodulation was not induced with this strain.

The genetic characterization of *Bradyrhizobium* sp. strain U531 included the analysis of the sequence of 16S RNA gene (1,245 nt), the housekeeping genes *atpD* (330 nt), *glnII* (525 nt) and *recA* (368 nt) and the symbiotic genes *nodC* (203 nt) and *nifH* (240 nt). The sequence of the 16S RNA gene places this strain within the genus *Bradyrhizobium*, but the sequence of the concatenated housekeeping genes does not group it with any of the described species, so it is proposed that it is a new species. According to the symbiotic genes, it groups together with a *Bradyrhizobium* strain isolated from *Chamaecytisus proliferus* in the Canary Islands and the CNL9 strain, isolated in Uruguay from *Lotus uliginosus*. Since the

ability to denitrify is common among *Bradyrhizobium*, homologous sequences to the genes involved in denitrification were searched in the genome of strain U531. Through this analysis, sequences with homology to the *nir*, *nor* and *nos* genes, responsible for this pathway, were identified. The phenotypic analysis of the ability to denitrify in an anaerobic medium with  $\text{NO}_3^-$  does not allow us to ensure that the strain denitrifies.

*Keywords:* *Bradyrhizobium* sp. Strain U531, *Lotus angustissimus*, symbiotic efficiency, genetic characterization

## 1. INTRODUCCIÓN

La producción de carne vacuna en el Uruguay se ha basado históricamente en sistemas pastoriles, siendo la ganadería extensiva sobre campo natural el principal sistema de producción. En este tipo de sistemas dominan las gramíneas estivales de baja calidad nutricional que limitan la productividad de los campos. La demanda creciente por los productos cárnicos ha generado una presión por aumentar la productividad del rubro ganadero. En este contexto es que la investigación a nivel país, ha buscado desarrollar tecnologías que reduzcan las limitantes nutricionales de los campos ganaderos. Dentro de estas tecnologías destacan los mejoramientos extensivos sobre campo natural con el uso de leguminosas forrajeras. La utilización de este tipo de alternativas tecnológicas ha logrado aumentar la productividad y mejorar el resultado económico de los productores ganaderos (Rebuffo et al., 2006).

Las leguminosas forrajeras son de conocida relevancia a nivel agronómico tanto por la importancia que tienen en términos de calidad nutricional para sistemas forrajeros, como por su capacidad de, asociadas a rizobios, realizar fijación biológica de nitrógeno (FBN). Así, la simbiosis rizobio-leguminosa es responsable de un importante ingreso de nitrógeno al sistema en mejoramientos extensivos, el cual incrementa la cantidad y la calidad de las gramíneas (Rebuffo et al., 2006).

El género *Lotus* incluye las principales leguminosas forrajeras utilizadas en el Uruguay, caracterizándose por poseer buena persistencia en suelos de baja fertilidad y bajo contenido de fósforo (Zanoniani & Ducamp, 2004). Este género incluye especies de tipo perenne estival, destacándose *L. corniculatus*, *L. tenuis*, y *L. uliginosus (pedunculatus)* y especies de tipo anual invernal, como *L. subbiflorus* y *L. angustissimus*. Estas últimas tienen una marcada importancia en los sistemas de producción ganaderos extensivos del país, y *L. subbiflorus* es la leguminosa más utilizada para mejoramientos de campo natural (Rebuffo et al., 2006). Dado su ciclo de producción invernal, contribuyen a levantar las limitantes de forraje que ocurren típicamente en el campo natural en esta estación, porque permiten mantener capacidades de carga más estables.

*L. angustissimus* cv. INIA Basalto, desarrollado por el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA, s.f.), es utilizado en el mejoramiento de campo

natural, con buena adaptación a varios suelos y regiones. Por el momento, para esta especie se usa como inoculante *Bradyrhizobium* sp. cepa U531, el inoculante comercial de *L. subbiflorus*. Esta cepa, escasamente caracterizada, se aisló de un suelo de Uruguay del que no hay registro, y se utiliza como inoculante comercial de *L. subbiflorus*, desde la década del '90. El proyecto FPTA “Enfoque rizobiológico para mejorar la performance de leguminosas forrajeras promisorias para zonas ganaderas, con énfasis en la región de basalto”, buscó identificar cepas de rizobios específicas para un número importante de especies en evaluación. En este contexto, los resultados obtenidos permitieron proponer a la cepa U531 como una de las más prometedoras para *L. angustissimus* (Labandera, 2004). Sin embargo, los ensayos en condiciones controladas para estimar la eficiencia de este par simbiótico han sido escasos.

### 1.1. Hipótesis

Como hipótesis principal de este trabajo nos planteamos que *Bradyrhizobium* sp. cepa U531, usada como inoculante comercial para *L. subbiflorus*, será eficiente en *L. angustissimus*, así como también pueden serlo cepas presentes en suelos donde esta leguminosa se ha cultivado.

### 1.2. Objetivos

El objetivo general de esta tesis es contribuir con un par simbiótico eficiente entre *L. angustissimus*-rizobio que permitirá desarrollar la tecnología de los mejoramientos de campos naturales de productores ganaderos del país.

Los objetivos específicos que se plantean son:

- i. Disponer de la caracterización molecular de la cepa U531 que permita identificarla y establecer sus relaciones filogenéticas.
- ii. Cuantificar la eficiencia simbiótica y competitividad de *Bradyrhizobium* sp. cepa U531 en *Lotus angustissimus*.
- iii. Conocer el efecto del inoculante de *L. corniculatus* cepa U510 sobre *L. angustissimus* en el período inicial de la relación planta-bacteria.
- iv. Iniciar una colección de aislados de nódulos de *L. angustissimus* que puedan ser la base para seleccionar cepas eficientes y competitivas.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Ventajas de las leguminosas del género *Lotus* utilizadas para el mejoramiento de pasturas en el Uruguay

En Uruguay, las leguminosas forrajeras más usadas para los mejoramientos de campo natural pertenecen al género *Lotus* por su demostrada adaptación a distintos ambientes de la región. Las especies del género *Lotus* se adaptan para su uso en suelos de menor fertilidad natural, de topografías variables, bajos niveles de fósforo y amplios rangos de pH. Si bien varias especies del género son también utilizadas en sistemas intensivos, en algunas condiciones de suelo de alta fertilidad, no logran competir con otras leguminosas de mayor potencial productivo. Por lo tanto, para amplias zonas del país donde las condiciones edáficas son limitantes, la inclusión de leguminosas de este género en Uruguay ha significado un cambio productivo (Ayala & Carámbula, 2009).

En las últimas décadas, muchos sistemas de producción se han visto en la necesidad de producir de una manera más sostenible, lo que implica reducir el uso de insumos como los fertilizantes. Es así como diferentes especies del género *Lotus* se adecuan a situaciones como la de Uruguay y la región, donde los sistemas de producción animal a base de pasturas no justifican económicamente el elevado uso de insumos de alto costo. Por esto, el potencial del género *Lotus* ha sido tenido en cuenta para el desarrollo de la ganadería en la región, dado la mejora en la sostenibilidad y la productividad en sistemas de producción económicamente competitivos (Ayala & Carámbula, 2009).

Los suelos del Uruguay se caracterizan por su bajo contenido de fósforo, nutriente particularmente limitante para leguminosas. Sin embargo, las especies del género *Lotus* tienen una ventaja, ya que son las leguminosas con los menores requerimientos de fósforo con un nivel crítico entre 10-12 ppm reportado para *Lotus corniculatus* (Bordoli, 1998). Además, existen regiones donde leguminosas de los géneros *Trifolium* y *Medicago* ven restringida su producción, debido a factores de estrés como lo son los suelos ácidos con aluminio intercambiable y de baja fertilidad. En estas regiones, diferentes especies de *Lotus* se adaptan a esas condiciones limitantes logrando mayores producciones. (Ayala & Carámbula, 2009). Esto ha llevado a que el género *Lotus* encuentre un lugar importante en los

sistemas de producción pastoriles del mundo, dadas sus virtudes de carácter agronómico y nutricional (Bullard & Crawford, 1995), que las destacan de otras leguminosas disponibles en el mercado.

A su vez, considerando que se trata de leguminosas forrajeras, es decir, cuyo objetivo es producir forraje de calidad para alimentar el ganado, la alta concentración de taninos condensados en los tejidos, se vuelve una característica clave en lo que respecta a la nutrición animal (De Souza et al., 2018). La concentración promedio de taninos condensados de distintas especies y cultivares de lotus usados en Uruguay se presentan en la tabla 1. Estos compuestos brindan a las especies de lotus ciertas ventajas nutricionales como no producir meteorismo y favorecer la proteína de sobrepeso que no se degradada en el rumen siendo absorbida a nivel intestinal. Además, la alta concentración de taninos es responsable de una menor velocidad de descomposición de restos aéreos y subterráneos. Esto indirectamente se convierte en una ventaja nutricional, ya que la pastura mantiene su calidad por más tiempo una vez que muere (Ayala & Carámbula, 2009).

**Tabla 1**

*Concentración de taninos condensados de diferentes especies y cultivares de lotus usados en Uruguay*

<b>Especie y cultivar</b>	<b>Taninos condensados totales % MS</b>
<i>L. corniculatus</i> INIA Draco	1,7 - 1,9
<i>L. corniculatus</i> San Gabriel	2,2 - 2,5
<i>L. corniculatus</i> INIA Rigel	2,2 - 2,6
<i>L. uliginosus</i> INIA Gemma	5,5 - 6,5
<i>L. uliginosus</i> INIA E-Tanin	6,0 - 6,5
<i>L. angustissimus</i> INIA Basalto	5,5 - 6,5

*Nota.* Tomado de De Souza et al. (2018).

De las cinco especies de lotus cultivadas en Uruguay; tres son perennes estivales, (*L. corniculatus*, *L. uliginosus* y *L. tenuis*) y dos anuales invernales, (*L. subbiflorus* y *L. angustissimus*). En la tabla 2, se resumen los volúmenes de semilla de estas leguminosas comercializados para uso a nivel nacional en los últimos cuatro años.

Considerando una densidad de siembra de 8 kg . ha<sup>-1</sup> en *L. corniculatus*, para el año 2022 se habrían sembrado unas 95.000 ha aproximadamente, mientras que para *L. subbiflorus* (5 . kg ha<sup>-1</sup>) y *L. angustissimus* (3 . kg ha<sup>-1</sup>) unas 15.000 y 4.000 ha respectivamente, según los datos de kg de semilla comercializada (Tabla 2)

(Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria [INIA], s.f.). En este contexto, y a pesar de los enormes desafíos que ha enfrentado la producción de semilla forrajeras en los últimos años debido a los efectos del déficit hídrico, *L. angustissimus* es la única especie que viene aumentando el volumen de semilla comercializada en los últimos 4 años, considerando datos oficiales. Este comportamiento se debe a que es una nueva especie recientemente comercializada con un cultivar, INIA Basalto, que ha respondido muy bien a los desafíos productivos de los sistemas ganaderos extensivos (R. Reyno, comunicación personal, 31 de enero, 2023).

**Tabla 2**

*Volumen de semilla comercializado para su uso a nivel nacional entre 2019-2022*

Especie	Volumen de semilla comercializado (kg)			
	2019	2020	2021	2022
<i>L. corniculatus</i>	1.316.017	1.276.112	851.677	763.343
<i>L. tenuis</i>	130.889	140.260	103.796	97.374
<i>L. uliginosus</i>	6.350	13.217	6.511	2.763
<i>L. subbiflorus</i>	87.963	115.293	82.175	77.101
<i>L. angustissimus</i>	650	2.575	258	12.135

*Nota.* D. Bayce (comunicación personal, 21 de Julio, 2022).

Las especies perenne estivales son utilizadas tanto para mejoramientos extensivos como intensivos. En pasturas sembradas, generalmente se utilizan en mezclas con gramíneas y otras leguminosas. Su uso es esencialmente pastoril, siendo una tecnología clave en sistemas de ganadería intensiva (Rebuffo et al., 2006). A su vez, en sistemas en rotación cultivos-pasturas, estas leguminosas son un factor clave en la entrada de nitrógeno (N) al sistema vía FBN (Siri & Ernst, 2010).

Por otra parte, las especies de tipo anual invernal son esencialmente utilizadas en mejoramientos extensivos de campo natural. *L. subbiflorus* ha sido la más promovida a nivel de mejoramientos, dada su adaptación a suelos de menor potencial productivo (Rebuffo et al., 2006). La utilización de esta especie se convirtió en una tecnología importante y de bajo costo para los sistemas ganaderos criadores que se destacan en este tipo de suelos (Carámbula et al., 1994). Por su parte *L. angustissimus*, de reciente liberación (2019) no ha tenido aún un desarrollo considerable en Uruguay, siendo una especie que año a año viene incrementando el área sembrada. Además, posee algunas características distintivas que lo hacen apto

para suelos medios y superficiales de amplias zonas ganaderas como el basalto, sierras y lomadas del este (basamento cristalino) y suelos de areniscas (Rimoldi & Suberbié, 2018). Estas características podrían llevar a esta especie a ocupar un lugar de mayor relevancia para los productores ganaderos, como lo indica el volumen de semilla comercializada en los últimos años (Tabla 2). El Lotus INIA Basalto, puede hacer un aporte importante en cantidad y calidad de forraje apoyando a la cría y recría en sistemas ganaderos (Porcile et al., 2021).

## **2.2. Rol de las leguminosas invernales *L. subbiflorus* y *L. angustissimus* en mejoramientos extensivos de campo natural**

Los mejoramientos de campo natural surgen de la necesidad de los sistemas de producción ganadera de solucionar las limitantes nutricionales características del tapiz natural. La baja cantidad y calidad de las pasturas, sumado a una distribución estacional de producción de forraje con un marcado déficit invernal, son parte de los problemas que deben resolver los productores ganaderos (Mas et al., 1992).

Existen distintas estrategias de mejoramientos de campo natural, sea mediante fertilizaciones estratégicas, y/o mediante la siembra de especies de alto valor productivo. La tecnología de mejoramientos más utilizada es la combinación estratégica de siembras de leguminosas con fertilizaciones fosfatadas que permiten mantener una producción y población estable dentro del tapiz del campo natural. De esta manera se logra no solo la inclusión de especies de alto valor productivo, sino que se brinda una entrada de N al ecosistema más económica, generando una mayor y mejor producción del tapiz natural, en el cuál predominan las gramíneas (Carámbula, 1992).

Como ya fue mencionado, las especies del género *Lotus* han sido de la más utilizadas para este tipo de alternativas tecnológicas, dadas sus características de rusticidad y adaptación a condiciones de baja fertilidad. Dentro de estas especies, *Lotus subbiflorus* cv. El Rincón se ha destacado entre otros aspectos por su gran adaptación a un amplio rango de tipos de suelo, su bajo costo de implantación y su persistencia productiva (Risso & Carámbula, 1998). Según Soca et al. (2001), la implementación estratégica de esta tecnología en sistemas de producción de carne vacuna brinda múltiples ventajas productivas, como, por ejemplo, evitar la pérdida de peso de los terneros en el primer invierno de vida, reducir la edad al primer entore



de vaquillonas, mejorar el porcentaje de preñez en vaquillonas y vacas flacas, incrementar la carga del campo, entre otras. Todas estas ventajas productivas, en contraste con una alternativa tecnológica de bajo costo generan importantes beneficios económicos para los productores ganaderos. De este punto surge la importancia de la investigación en mejoramientos extensivos de campo natural.

La diversidad de suelos de Uruguay, derivados de distintas formaciones geológicas, permiten dividir al país en distintas ecorregiones. El uso de *L. subbiflorus* cv. El Rincón para mejoramientos extensivos de campo natural, ha trascendido esta variabilidad de ecorregiones, y se utiliza en todo el país. Sin embargo, esta especie en particular ha tenido un comportamiento errático en la región de Basalto, teniendo poca consistencia en los datos experimentales y demostrando un menor potencial productivo que en el resto de las ecorregiones donde es utilizado (Risso & Carámbula, 1998). En el marco de esta problemática entra en juego el potencial del *L. angustissimus* cv. INIA Basalto, un cultivar desarrollado en base a la selección por adaptabilidad a este tipo de suelos, entre otros (INIA, s.f.).

### **2.3. Valor agronómico de *L. angustissimus***

En lo que respecta a *L. angustissimus* y *L. subbiflorus*, se destaca su ciclo de vida anual y su producción invierno - primaveral. A diferencia de *L. subbiflorus*, *L. angustissimus* presenta un hábito de vida semiprostrado y no tan erecto (Zanoniani & Ducamp, 2004). En cuanto a las características agronómicas, el cultivar INIA Basalto de *L. angustissimus* tiene una alta concentración de taninos y una destacada adaptación a suelos medios y superficiales de la región de basalto, cristalino, lomadas y sierras del este, incluyendo suelos livianos de la región de areniscas. La utilización de esta especie en campos naturales permite alcanzar producciones del doble del promedio, con un aporte de leguminosa que puede variar entre el 20 y 35% de la producción total anual. En suelos profundos de textura arcillosa, los incrementos en productividad a partir del segundo o tercer año rondan el 60-70%. La producción de forraje puede variar desde 1500 a 2000 kg MS de leguminosa ha<sup>-1</sup> en el primer año, a producciones de 6000 a 8000 kg MS en los años siguientes (INIA, s.f.).

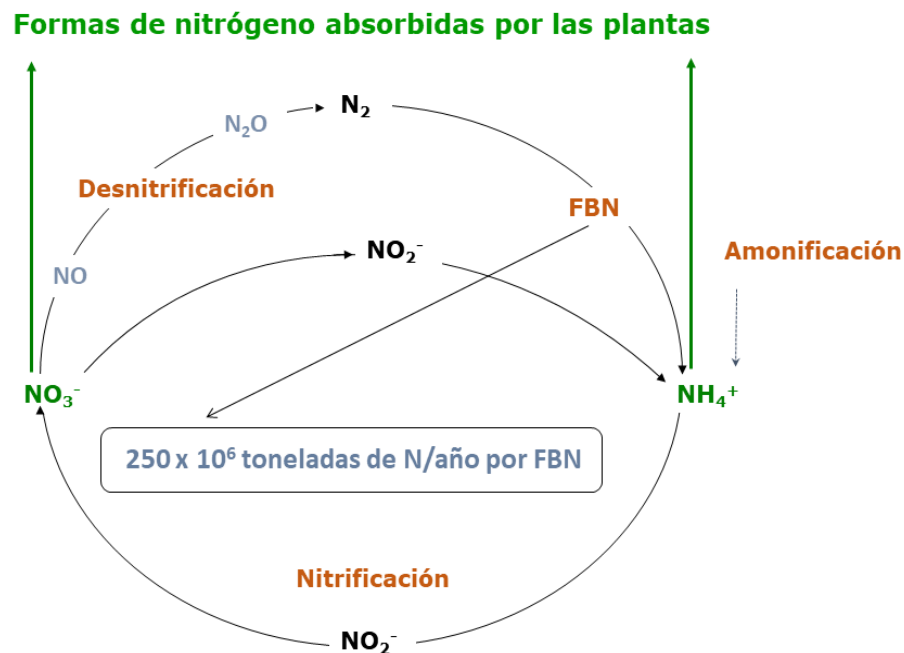
INIA Basalto germina en los meses de marzo/abril, y concentra su floración entre fines de octubre y primera quincena de noviembre. Presenta una buena resiembra natural, inclusive en suelos de limitada profundidad, donde *L. subbiflorus* no logra buenos resultados en este aspecto (Rimoldi & Suberbié, 2018). El aporte de la leguminosa a la producción de forraje comienza a ser significativo en los meses de junio y julio, maximizándose en octubre y noviembre. Mientras que las tasas de crecimiento anual del campo natural se encuentran en el orden de 10 a 12 kg MS ha<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>, la de los mejoramientos con esta especie oscila en el entorno de los 20 a 22 Kg MS ha<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>, logrando picos de crecimiento de 50 Kg MS ha<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup> a fines de octubre (INIA, s.f.).

En lo que refiere al valor nutritivo del mejoramiento, el mismo varía en promedio entre un 10% a 20% de proteína cruda, presentando una digestibilidad de 65% aproximadamente (INIA, s.f.).

#### **2.4. Entrada y salida de Nitrógeno de los ecosistemas**

El flujo de N en los ecosistemas involucra a diferentes microorganismos, animales, plantas y hongos. En cuanto a la entrada de N a los ecosistemas acuáticos y terrestres, la FBN realizada sólo por algunos procariotas, es el principal proceso que permite su incorporación. Por otra parte, en la salida de N de los ecosistemas que ocurre por desnitrificación, también participan variados microorganismos, entre ellos algunos rizobios (Figura 1).

**Figura 1**  
Ciclo del Nitrógeno



*Nota.* El nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) son las principales formas de N combinado absorbidas por las plantas. Cuando los seres vivos mueren, mediante el proceso de descomposición de la materia orgánica y la amonificación, se libera  $\text{NH}_4^+$  al suelo. El  $\text{NO}_3^-$  procedente mayormente de la nitrificación, puede ser respirado por los microorganismos en condiciones de microaerobiosis, generando  $\text{NO}$ ,  $\text{N}_2\text{O}$  y  $\text{N}_2$ , proceso conocido como desnitrificación. Mediante la FBN el  $\text{N}_2$  se reduce a  $\text{NH}_4^+$ , una forma asimilable por las plantas. Modificado de Monza y Palacios (2004).

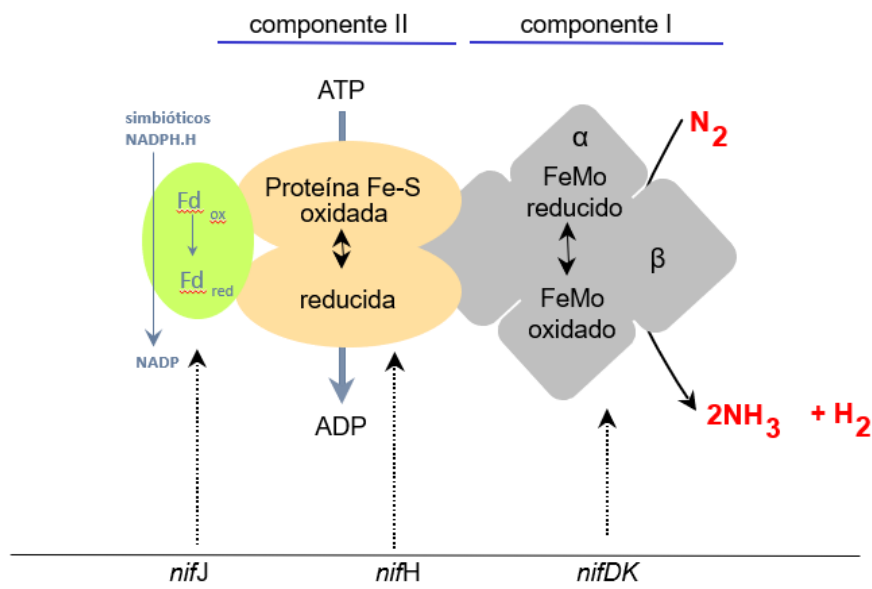
#### 2.4.1. Entrada de nitrógeno a los ecosistemas: Fijación Biológica de Nitrógeno

Después del agua, en ecosistemas terrestres el N es el principal factor que limita el crecimiento de las plantas (Fernández et al., 2002). El N forma parte de las proteínas, ácidos nucleicos, clorofilas, entre otras moléculas necesarias para el funcionamiento celular. Las plantas absorben N del suelo en forma de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) o de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), formas que suelen ser escasas en el suelo. Por otra parte, el N molecular ( $\text{N}_2$ ), que representa el 79% del volumen atmosférico, no puede ser usado como tal por las plantas. Solo un grupo minoritario de procariontes, los diazotófos, en simbiosis o libres en suelos y aguas son capaces de reducir el  $\text{N}_2$  a

$\text{NH}_4^+$  (Figura 1). Mediante este proceso ingresa la mayor parte del N a los ecosistemas acuáticos y terrestres, representando un 80% del N total fijado en la naturaleza, que se estima anualmente en  $250 \times 10^6$  toneladas (Monza & Palacios, 2004).

La FBN consiste en la reducción de  $\text{N}_2$  a  $\text{NH}_4^+$ , mediante una reacción catalizada por la enzima nitrogenasa, presente en todos los diazotrofos. Esta enzima (Figura 2) tiene dos componentes, la reductasa de la dinitrogenasa (proteína Fe) codificada por el gen *nifH* y la dinitrogenasa (proteína Mo-Fe) codificada por los genes *nifD* y *nifK* (Newton, 2007).

**Figura 2**  
Modelo de la nitrogenasa



*Nota.* El componente II reductasa (codificado por el gen *nifH*) abastece de poder reductor al componente I dinitrogenasa (codificada por los genes *nifD* y *nifK*). La dinitrogenasa reduce el  $\text{N}_2$  formando 2 moléculas de  $\text{NH}_3$  y una de  $\text{H}_2$ . El total del proceso tiene un costo energético de 8 moles de ATP por cada mol de  $\text{NH}_3$ . Tomado de Monza y Palacios (2004).

La reacción catalizada por la nitrogenasa es costosa energéticamente, ya que requiere al menos 16 ATP para reducir 2 moles de  $\text{NH}_3$ . En los fijadores simbióticos como los rizobios, la energía proviene de los fotoasimilados que suministra la planta a los bacteroides. Así, en la simbiosis rizobio-leguminosa, la planta suministra

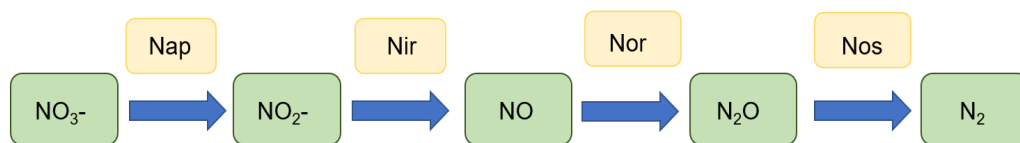
fotosintatos al rizobio, y este provee a la planta N en forma asimilable (Madigan et al., 1999). Además, en los ecosistemas terrestres las leguminosas aportan N al suelo (Figura 1), debido a la descomposición de sus raíces y parte aérea (Berriel et al., 2022).

Teniendo en cuenta la lógica de los mejoramientos de campo natural, el uso de leguminosas forrajeras que logren adaptarse a la competencia que ejerce el tapiz y producir materia seca, se convierte en una tecnología clave para lograr un buen aporte de N. Esta entrada de N al suelo favorece la fertilidad del campo natural, y potencia la producción de las gramíneas que son predominantes en el mismo.

#### 2.4.2. Salida de nitrógeno de los ecosistemas: desnitrificación

El término desnitrificación refiere a una forma alternativa de respiración en la que ocurre la reducción de  $\text{NO}_3^-$  o de  $\text{NO}_2^-$  a formas gaseosas como óxido nítrico (NO), óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) y  $\text{N}_2$ . La secuencia de reacciones (Figura 2) la catalizan las enzimas nitrato reductasa periplásmica (Nap), nitrito reductasa (Nir), óxido nítrico reductasa (Nor) y óxido nitroso reductasa (Nos) (Monza et al., 2006). Estas enzimas están codificadas por grupos de genes que en *B. diazoefficiens* USDA 110 son los denominados *napEDABC*, *nirKV*, *norCBQD* y *nosRZDFYLX* que codifican nitrato, nitrito, óxido nítrico y óxido nitroso reductasa, respectivamente (Bedmar et al., 2005).

**Figura 3**  
*Reacciones de la vía de desnitrificación*



*Nota.* El  $\text{NO}_3^-$  es reducido a  $\text{NO}_2^-$  por la enzima Nap (nitrato reductasa periplásmica) y el  $\text{NO}_2^-$  generado puede ser reducido a NO (óxido nítrico) por la enzima Nir (nitrito reductasa de membrana). El NO puede ser reducido a  $\text{N}_2\text{O}$  (óxido nitroso) por la enzima óxido nítrico reductasa (Nor) y finalmente la oxidación del  $\text{N}_2\text{O}$  a  $\text{N}_2$  la cataliza la enzima óxido nitroso reductasa (Nos).

El  $N_2O$  es el único óxido de N de efecto invernadero, que además también afecta la acumulación de ozono ( $O_3$ ) (Sánchez et al., 2013). El  $N_2O$  contribuye con el 6% del efecto invernadero, con un poder de calentamiento 300 veces mayor que el  $CO_2$ , y más del 60% de las emisiones globales provienen de suelos agrícolas (Benavides & León., 2007; Hidalgo-García et al., 2019). Estas emisiones, en parte son generadas por la respiración de microorganismos del suelo (Figura 1) cuando se dan condiciones limitantes de oxígeno. Entre estos microorganismos, algunas cepas de los géneros *Bradyrhizobium* (Monza et al., 2006) y *Ensifer* (Bueno et al., 2015), en vida libre o en simbiosis, pueden desnitrificar.

### **2.5. FBN en leguminosas forrajeras: cuantificación de la eficiencia simbiótica**

Como fue mencionado anteriormente, las leguminosas forrajeras cumplen un rol importante como fuente de entrada de N a los agroecosistemas. Mallarino et al. (1990) cuantificaron este aporte de N de 3 especies de leguminosas en pasturas mezcla con *Festuca arundinacea* (festuca). Las especies evaluadas fueron *Trifolium repens* (trébol blanco), *Trifolium pratense* (trébol rojo) y *Lotus corniculatus* (lotus). En dos años de evaluación, la especie que más N aportó fue trébol rojo con 390 kg N ha<sup>-1</sup> y 330 kg N ha<sup>-1</sup> (primer y segundo año respectivamente), luego trébol blanco con 257 kg N ha<sup>-1</sup> y 242 kg N ha<sup>-1</sup>, y por último lotus con 187 kg N ha<sup>-1</sup> y 293 kg N ha<sup>-1</sup>.

A su vez, Lussich (2020) determinó para estas leguminosas y para *Medicago sativa* (alfalfa), un factor que permite conocer los kg de N fijado tonelada<sup>-1</sup> de MS producida. Estos valores fueron de 22, 27, 26 y 28 kg N t<sup>-1</sup> MS para alfalfa, lotus, trébol rojo y trébol blanco, respectivamente.

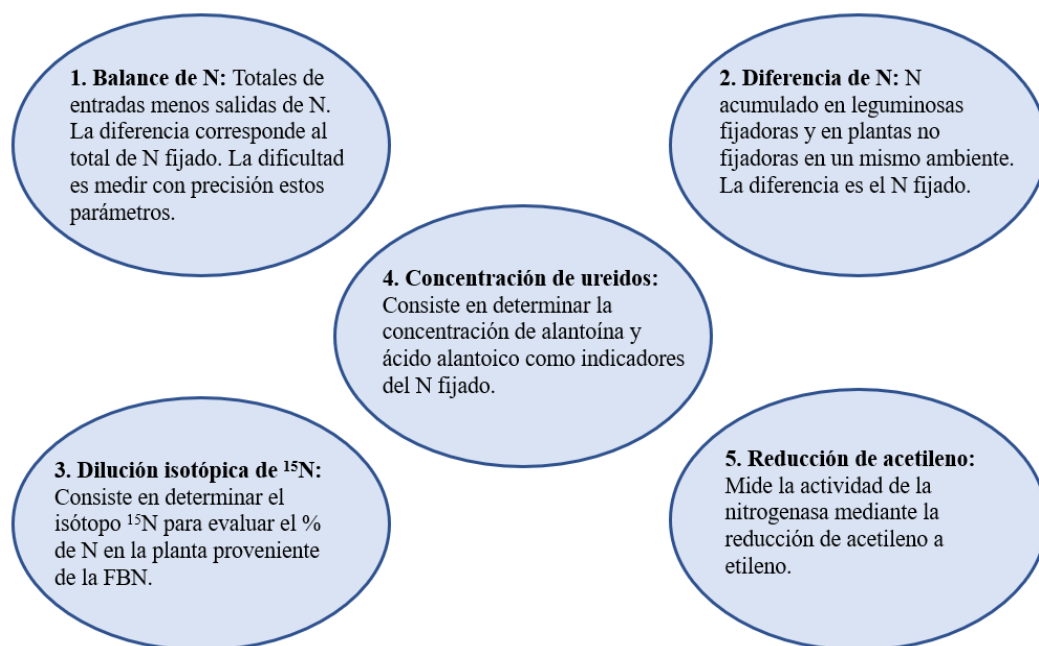
Existe un paradigma importante en el significado del término “eficiencia simbiótica” y en las diferentes metodologías usadas para estimarla. Lindström y Mousavi (2019) definen este proceso como el cociente entre la energía utilizada por la enzima nitrogenasa y la cantidad de  $N_2$  fijado. Los mismos autores, hacen referencia a otro término que es el de “efectividad de la simbiosis”, en el cuál involucran la productividad del sistema para el beneficio que buscamos. Howieson y Dilworth (2016) consideran a la eficiencia en términos del beneficio generado sobre el hospedero, ya sea en forma de grado de nodulación alcanzado, rendimiento

como biomasa y/o en grano. En leguminosas forrajeras, lo que importa es la biomasa aérea.

Como método más práctico para medir la eficiencia simbiótica de un par rizobio-leguminosa, se propone la comparación de biomasa seca de parte aérea producida entre un tratamiento inoculado y un tratamiento sin inocular, en un medio libre de N (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación [FAO], 1995). Otro método ampliamente usado es incorporar un control con una fuente de N ( $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , urea) que se considera el máximo potencial que la planta puede desarrollar. El Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP) utiliza  $\text{KNO}_3$  0,05 % para la evaluación de leguminosas forrajeras. Otro criterio para medir la eficiencia simbiótica es estimando la cantidad de N procedente de la atmósfera (figura 4).

#### Figura 4

*Métodos para cuantificar la fijación de  $\text{N}_2$  en leguminosas*



*Nota.* Adaptado de Howieson y Dilworth (2016).

### 2.6. Simbiosis rizobio-lotus

Al complejo Lotus lo integran especies que pertenecen a dos grupos de nodulación, uno compuesto por *L. corniculatus* y *L. tenuis*, que establecen simbiosis eficientes con especies del género *Mesorhizobium*, y otro compuesto por *L. subbiflorus*, *L. angustissimus* y *L. uliginosus*, que lo hacen con especies del género

*Bradyrhizobium* (Monza et al., 1992; Lorite et al., 2018). Los inoculantes comerciales para lotus utilizados en el Uruguay se resumen en la tabla 3.

**Tabla 3**

*Especie, cepa y origen de los inoculantes comerciales utilizados para las distintas especies de lotus cultivadas en Uruguay*

<b>Especie de lotus</b>	<b>Especie de rizobio</b>	<b>Cepa</b>	<b>Origen</b>
<i>L. corniculatus</i> <i>L. glaber (tenuis)</i>	<i>Mesorhizobium huakuii</i>	U510 (=U226)	Australia
<i>L. subbiflorus</i> <i>L. angustissimus</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	U531 (=NC3)	Uruguay
<i>L. uliginosus</i> ( <i>pedunculatus</i> )	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	NZP 2309 (=U526)	Nueva Zelandia

*Nota.* Adaptado de Dirección General de Servicios Agrícolas [DGSA] (2017).

La existencia de dos grupos de nodulación tiene derivaciones en el manejo agronómico de estas especies, ya que se pueden establecer relaciones ineficientes cuando lotus crece en suelos donde hay cepas que no son compatibles. Una situación conocida es el comportamiento parásito en *L. subbiflorus* y *L. uliginosus* de la cepa U510 usada como inoculante comercial para *L. corniculatus* y *L. tenuis* (Dutto, 2002). En esta interacción se generan estructuras denominadas “pseudonodulos” que no presentan bacteroides en su interior, y por lo tanto no fijan nitrógeno (Monza et al., 1992; Irisarri et al., 1996). Por esto, parece razonable pensar que el mismo problema ocurra cuando *L. angustissimus*, se siembra en suelos con antecedentes de uso del inoculante usado para *L. corniculatus*.

### **2.6.1. Cepas de rizobios que nodulan lotus en suelos del Uruguay**

En estudios de diversidad de rizobios ha sido muy utilizada la generación de *fingerprinting*. Para esto se amplifica ADN bacteriano mediante PCR, usando diferentes *primers* como ERIC y BOX, entre otros, que han demostrado ser eficaces en la identificación de cepas (De Brujin, 1992; Batista et al., 2015; Sotelo et al., 2011; Irisarri et al., 2019). Por otro lado, para establecer relaciones filogenéticas se usa la secuencia del gen 16S rRNA, de regiones intergénicas (ITS), así como la secuencia de genes que codifican proteínas como los *housekeeping*, *atpD*, *recA* y *glnII* (Gaunt et al., 2001; Tartaglia et al., 2019), entre otros.



El análisis multilocus (MLSA) de secuencias parciales de genes que codifican proteínas con funciones conservadas, llamados genes *housekeeping* es un método ampliamente utilizado porque permiten establecer las relaciones filogenéticas más sólidas de especies dentro de un género, así como de géneros dentro de una familia. Por esto, las aproximaciones mediante MLSA se utilizan para generar árboles filogenéticos y establecer filogenias (Glaeser & Kämpfer, 2015).

Las cepas de rizobios que nodulan lotus presentes en nuestros suelos han sido estudiadas a través de estas técnicas, y se puso en evidencia una diversidad interesante de cepas de *Mesohrizobium* sp. y *Bradyrhizobium* sp. aisladas de *L. corniculatus* (Sotelo et al., 2011) y *L. uliginosus* (Batista et al., 2013).

*L. corniculatus* y *L. tenuis* se inoculan desde 1972 hasta la actualidad con la cepa U510 (=U226) introducida desde Australia (Labandera et al., 1982). Sin embargo, a pesar del tiempo prolongado del uso de esta cepa como inoculante comercial, fue escasa su recuperación desde nódulos de plantas de diferentes regiones del país (Sotelo et al., 2011; Batista, 2013). Los análisis filogenéticos evidenciaron que todos los aislamientos de nódulos de *L. corniculatus* pertenecen al género *Mesorhizobium*, y también que la mayoría de ellos y la cepa U510 corresponden a la especie *M. huakuii*. Los otros aislamientos agrupan fuertemente con *M. septentrionale* y *M. caraganae*. Sin embargo, la secuencia de los genes simbióticos *nodC* y *nifH*, de localización cromosómica en *Mesorhizobium* sp., evidenció que las cepas autóctonas estudiadas agrupan con *M. tarimense* y *M. loti* (Sotelo et al., 2011), lo que evidencia eventos de transferencia horizontal de islas simbióticas entre cepas de *Mesorhizobium* spp., algo que también fue observado por otros autores (Ramsay & Ronson, 2015).

Algo similar en cuanto a la diversidad de cepas en suelos de Uruguay se observó en *L. uliginosus*, que fue introducido en la década de 1980 e inoculado desde 1995 con la cepa NZP 2309 (=U526, =U1401) aislada en Nueva Zelanda (Batista et al., 2013). A diferencia de lo observado en aislamientos de nódulos de *L. corniculatus*, la cepa NZP 2309 se identificó en casi el 10% de aislamientos de nódulos de diferentes regiones del país (Batista et al., 2013). También la filogenia establecida con la secuencia de los genes simbióticos *nodC* y *nifH*, de localización cromosómica, mostró que las cepas autóctonas que nodulan *L. uliginosus* agrupan

mayoritariamente con la cepa NZP 2309 (Batista et al., 2013). Esto también se debería a la transferencia horizontal de genes simbióticos dentro del género *Bradyrhizobium* (Lorite et al., 2018).

La situación de *L. subbiflorus* es diferente a las anteriores. Esta especie fue introducida en la década del 60', en una mezcla de semillas forrajeras importadas que fue sembrada en la estancia "El Rincón", donde prosperó bajo condiciones de pastoreo. Al mostrar una buena adaptación y una producción destacable, a partir del año 1987 se comenzó a comercializar esta leguminosa (Carámbula et al., 1994). Acompañando la introducción de una leguminosa surge la necesidad de contar con un inoculante, y en este caso inicialmente se la inoculó con suelo y posteriormente con *Bradyrhizobium* sp. cepa U531 (=NC3) aislada en Uruguay. A continuación, se resumen las etapas por las que pasó la inoculación de *L. subbiflorus*, información suministrada y revisada por el Ing. Agr. Rafael Gallinal, que fue quien desarrolló el cultivar "El Rincón" de esta especie y comenzó la búsqueda del inoculante:

- En 1985, para los primeros ensayos y evaluaciones con la leguminosa se utilizaron macetas con tierra y plantas vivas para inocular, de manera similar a lo que hoy se hace con la inoculación con turba.
- En 1987, se comenzó a comercializar la semilla de *L. subbiflorus* y para su inoculación se suministraba una maceta de 1 kg de suelo con plantas vivas por cada bolsa de 25 kg de semilla. Como el sistema de comercialización de macetas era complejo, se comienza a sembrar en hileras a 30 cm para concentrar el inóculo, logrando muy buenas implantaciones.
- Finalmente, en 1992, el Laboratorio de Microbiología del MGAP realizó aislamientos y evaluación de rizobios de nódulos de *L. subbiflorus*, a partir de los cuales se seleccionó a *Bradyrhizobium* sp. cepa U531. Con esta cepa se inocula hasta ahora a *L. subbiflorus*.

Con la cepa U531 también se inocula desde el 2005 a *L. angustissimus* a nivel experimental, y los ensayos de campo realizados en INIA Glencoe, indican que es eficiente en esta leguminosa (Labandera, 2004). Hasta el momento no se dispone de estudios taxonómicos ni filogenéticos sobre esta cepa, como tampoco sobre su

eficiencia en *L. angustissimus* en condiciones controladas, lo que es objeto de estudio de esta tesis.

## 2.7. Competitividad de las cepas para ocupar nódulos

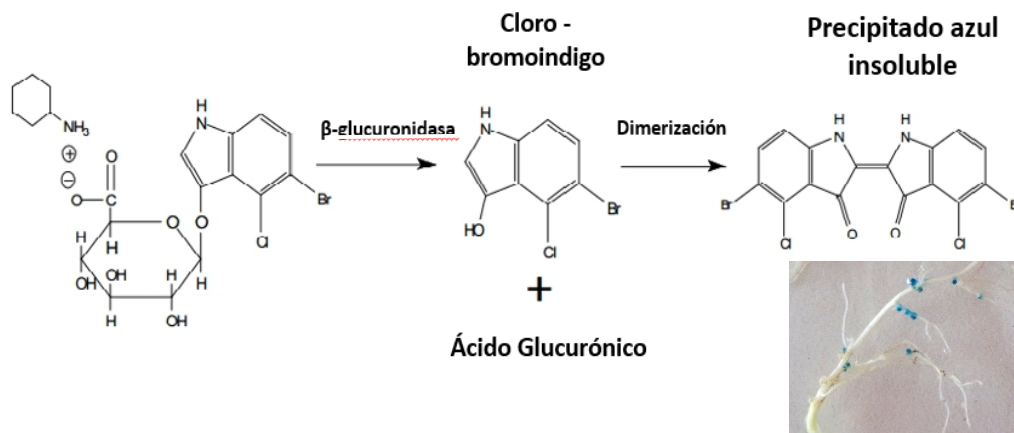
Una de las características deseables a la hora de desarrollar un inoculante es la competitividad de la cepa utilizada. Esta cepa debe competir por la ocupación de nódulos con otros rizobios presentes en el suelo, que tienen como ventaja el estar adaptados a esos ambientes (Sadowsky & Graham, 1998; Batista et al., 2015; Gutiérrez, 2017). Si la cepa usada como inoculante no compite eficazmente por la nodulación, otras cepas ineficientes o parásitas pueden ocupar su lugar perjudicando la producción de biomasa de esas leguminosas.

Existen distintas metodologías para evaluar la competitividad de una cepa. En la actualidad, distintas técnicas moleculares están disponibles para identificar de manera precisa y rápida un gran número de cepas con costos accesibles. Una de estas técnicas es la amplificación del ADN mediante PCR a partir de *primers* ERIC, BOX o REP para generar *fingerprintings* que permiten la identificación certera de las cepas (Gaunt et al., 2001; Tartaglia et al., 2019).

Por otra parte, se han desarrollado otras técnicas accesibles y útiles para evaluar la competencia que se basan en el uso de genes delatores como GFP y RFP (Chovanec et al., 2008; Mendoza Suárez et al., 2020) o *gusA* (Sessitsch et al., 1998; Irisarri et al., 2019). Estas técnicas tienen la ventaja de que permiten evaluar un gran número de nódulos, con una visualización sencilla que se basa en identificar a la bacteria en aquellos nódulos que se tiñen de color. En particular, la evaluación de competencia mediante el uso del gen *gusA* se realiza a partir de una tinción histoquímica. La enzima  $\beta$ -glucuronidasa codificada por el gen *gusA* transforma al sustrato X-Gluc (5-bromo-6cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucurónido) en ácido glucurónico y cloro-bromoindigo, que se dimeriza y produce un precipitado azul insoluble (Wilson et al., 1995). En la figura 5 se demuestra esta reacción.

## Figura 5

Reacción que explica la coloración azul de nódulos que llevan rizobios marcados



*Nota.* El X-Gluc (5-bromo-6cloro-3-indolil-β-D-glucurónido) es el sustrato de la β-glucuronidasa que produce cloro-bromindigo, que se dimeriza y forma un compuesto azul insoluble. Tomado de Gutiérrez et al. (2019).

### 2.8. Características deseables de los inoculantes rizobianos

Los inoculantes rizobianos están compuestos por un medio nutritivo y una concentración establecida de una cepa específica. Para llegar a formular un producto de calidad, que logre cumplir con el objetivo de la inoculación de lograr una nodulación eficiente, la cepa en cuestión debe cumplir una serie de exigencias:

- Eficiencia simbiótica

Un inoculante debe ser eficiente en la planta huésped, de manera que logre fijar una alta cantidad de N. La eficiencia se determina según diferentes criterios descritos en 2.5, a través de aproximaciones que se hacen en condiciones controladas, como en esta tesis, y necesariamente en ensayos en condiciones de campo.

- Competitividad:

La cepa usada como inoculante debe ser competitiva, es decir, ocupar el mayor número de nódulos en la planta en presencia de otros rizobios del suelo que también la pueden nodular y ser menos eficientes, o incluso parásitos. Actualmente hay técnicas moleculares accesibles y precisas que permiten evaluar esta característica.

- Habilidad industrial

Existen otro tipo de exigencias que no se refieren a la simbiosis en sí, sino a la facilidad o complejidad de multiplicar una cepa industrialmente y formular un inoculante. Esto se conoce como “habilidad industrial” que es la capacidad de la cepa de crecer en el medio de cultivo utilizado por la industria, así como en el medio utilizado como inóculo, ya sea turba o líquido. Todos estos aspectos significan para la industria una complejidad importante a la hora de la fabricación de cada inoculante en particular.

- Sobrevivencia

Luego de la inoculación, la semilla sembrada estará expuesta a diversos factores bióticos y abióticos (temperatura, humedad y patógenos) que pueden aumentar la mortandad de los rizobios. En este sentido, es importante que la cepa a ser utilizada como inoculante comercial, esté adaptada a estos factores de estrés, de manera de lograr el objetivo de la inoculación, de proveer a la planta con el mayor número de rizobios vivos al momento de la nodulación (Howieson & Dilworth, 2016).

- Persistencia

La persistencia, en general, es un factor deseable para los inoculantes. Sin embargo, cuando la cepa usada se comporta como parásita-ineficiente en la leguminosa que se siembra después, esta característica puede pasar a ser un problema. En esta situación la persistencia no sería una característica deseable. Como ejemplos de esta situación, es cuando se siembra *L. uliginosus* o *L. subbiflorus* sobre suelos con historia de *L. cornicularus* o *T. vesiculosum* en suelos con historia de *T. repens* (Dutto, 2002).

- Inteligencia ambiental de los inoculantes

Como fue explicado en 2.4.2, algunas cepas del género *Bradyrhizobium* spp. tienen la capacidad de desnitrificar. El uso agrícola de estas bacterias puede contribuir a la liberación del N<sub>2</sub>O, gas que contribuye a generar efecto invernadero. Por este motivo, el uso como inoculante de cepas “inteligentes ambientalmente”, es decir, que no desnitrifiquen parcialmente, es un factor que, a nuestro entender, está tomando cierta relevancia.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento

Se utilizaron como hospederos *Lotus subbiflorus* cv El Rincón y *Lotus angustissimus* cv INIA Basalto. Las semillas fueron suministradas por el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA).

##### 3.1.1. Desinfección y germinación de semillas

Las semillas se trataron con etanol 96 GL durante 1 min, se enjuagaron con agua estéril y se las sumergió en hipoclorito de sodio 4% (v/v) durante 2 minutos, realizando luego 4 enjuagues con agua estéril. (Howieson & Dilworth, 2016) Las semillas desinfectadas permanecieron en agua estéril durante al menos 1 h en agitación suave para favorecer la liberación de taninos, inhibidores de la germinación. Seguidamente se sembraron en placas de Petri con agar agua 0.8% (p/v) estéril y se incubaron en cámara de crecimiento a 23°C durante aproximadamente 3 días, hasta que la radícula alcanzó unos 5 mm.

##### 3.1.2. Condiciones de crecimiento de plantas

Según el ensayo, las semillas germinadas se sembraron en macetas de 350 mL con arena - vermiculita (1:1) estéril, o en tubos de 24 cm x 2 cm con 30 mL de medio Jensen estéril (Vincent, 1970), cuya composición se describe en la tabla 4. Cuando se sembraron en macetas se sembró a razón de 8 plántulas por maceta, mientras que en tubo se sembraron 3 por tubo. Las plantas crecieron en condiciones controladas en cámara de crecimiento a 23°C, con fotoperíodo de 16/8 h (luz/oscuridad), 200  $\mu\text{M}$  de fotones  $\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

**Tabla 4**

*Composición del medio Jensen*

Compuesto	Cantidad
<b>CaHPO<sub>4</sub></b>	1 g
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	0,2 g
<b>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	0,2 g
<b>NaCl</b>	0,2 g
<b>FeCl<sub>3</sub></b>	0,1 g
<b>Agua</b>	1000 mL

Las plantas inoculadas se regaron con solución de Rigaud y Puppo (1977) sin N (Tabla 5) y las sin inocular, además de esta solución, con diferentes fuentes y concentraciones de N combinado (Tabla 6).

**Tabla 5**

*Solución Rigaud y Puppo*

Macronutrientes	g/L	Micronutrientes	mg/L
<b>K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	0,174	EDTA-Fe	25
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>2</sub></b>	0,068	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,11
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	0,044	H <sub>3</sub> PO <sub>3</sub>	2,85
<b>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	0,123	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,2
<b>CaSO<sub>4</sub></b>	0,120	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,55

*Nota.* Tomado de Rigaud y Puppo (1977).

La solución de riego se diluyó 3 veces.

**Tabla 6**

*Riego de los controles con N*

Experimento	Fuente de N	Concentración	Frecuencia semanal	Tipo de riego
<b>1</b>	KNO <sub>3</sub>	10 mM	3	Automático
<b>2</b>	KNO <sub>3</sub>	5 mM	3	Automático
<b>3</b>	KNO <sub>3</sub>	0,5 mM	1	Manual
<b>4</b>	KNO <sub>3</sub>	5 mM	1	Manual
<b>5</b>	Urea	1 g/L	3	Manual

*Nota.* Se indica la fuente, concentración, frecuencia semanal y forma de suministro de riego con N.

Para los ensayos en macetas, se diseñó un sistema de riego consistente en una bomba sumergible (25 W, caudal máximo 1500 L/h) y goteros con caudal fijo de 2 L/h. Un temporizador digital permitió automatizar el riego (Figura 6). La bomba se sumergió en un bidón de 10 L con la solución de riego sin N. Las plantas inoculadas se regaron siempre con el sistema automatizado sin N, mientras que los controles se regaron dependiendo del experimento con este sistema o manualmente (Tabla 6). El sistema de riego se configuró para que suministre 20 mL por maceta 3 veces por semana, a excepción del experimento 3 y 4 (Tabla 6), donde la frecuencia de riego automático se disminuyó a 2 veces por semana (riego sin N), realizando el tercer riego de forma manual (con N). Para el experimento 5, el riego fue manual 3 veces por semana.

## Figura 6

### Sistema de riego automático



*Nota.* Las bombas estaban sumergidas en bidones de 10 L con solución de riego sin N para los tratamientos inoculados y con N para el riego del control. Los caños distribuían la solución a lo largo con goteros fijos cada 11 cm.

### 3.2. Bacterias, condiciones de crecimiento e inoculación.

#### 3.2.1. Rizobios

Se utilizó *Bradyrhizobium* sp. cepa U531 (=NC3) y *Mesorhizobium huakuii* cepa U510 (=U226). Como control positivo para respiración de  $\text{NO}_3^-$  se usó *Bradyrhizobium* cepa NZP 2309. Todas las cepas fueron suministradas por el Laboratorio de Microbiología del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP).

Por otra parte, se generó una colección de 10 aislamientos de nódulos de *L. angustissimus*, colectados en la unidad experimental Glencoe, perteneciente a INIA Tacuarembó. Este campo fue sembrado con semillas inoculadas con la cepa U531 hace 15 años y presenta plantas de resiembra. A continuación, se indica la denominación inicial y la de la colección actual: T8B1=GL1; T8B2=GL2; T8B3=GL3; T8C1=GL4; T8C2=GL5; T8C3=GL6; T8C4=GL7; T9A1=GL8; T9A2=GL9 y T9C2=GL10. Para la generación de esta colección se tomaron nódulos grandes y rojos de raíces principales de distintas plantas. Los nódulos se esterilizaron superficialmente siguiendo en general el procedimiento de Howieson y Dilworth (2016), que consiste en sumergir los nódulos en etanol 1 min en alcohol



70%, lavado en agua destilada estéril, hipoclorito de sodio 4% por 3 min y sucesivos lavados en agua destilada estéril. Los nódulos esterilizados fueron aplastados individualmente con dos portaobjetos esterilizados y el contenido del aplastado se utilizó para sembrar en placa con medio YEM.

Las cepas de rizobios crecieron en medio YEM (Vincent, 1970) a 28 °C (Tabla 7). Los aislamientos de campo crecieron en medio YEM con Vancomicina (1 mg/L). Cuando crecieron en medio líquido lo hicieron con agitación orbital 120 rpm y cuando se usó medio sólido se agregó agar.

**Tabla 7**

*Composición del medio YEM (Yeast extract manitol)*

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad</b>
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	0,5 g
<b>MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O</b>	0,2 g
<b>NaCl</b>	0,1 g
<b>Manitol</b>	5 g
<b>Extracto de levadura</b>	0,4 g
<b>Agua destilada</b>	Hasta completar 1 L
<b>Agar</b>	15 g

*Nota.* El agar se agrega solamente para medio sólido.

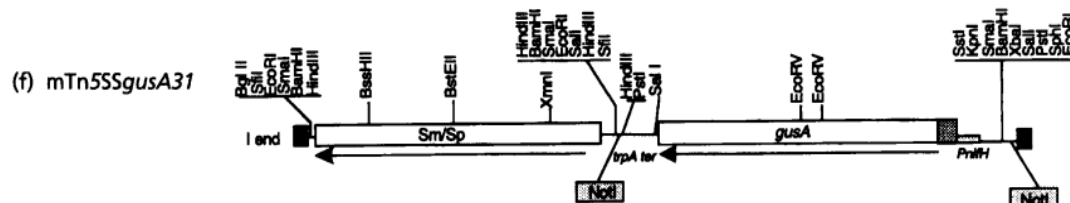
Para inocular las plantas las bacterias crecieron en medio YEM hasta una DO<sub>600</sub> de aproximadamente 0.7, se centrifugaron 8 min a 8000 rpm y el *pellet* se suspendió en agua estéril, en el mismo volumen del que se partió. Las semillas pregerminadas sembradas en macetas se inocularon a razón de 100 µL de suspensión bacteriana cada una. Cuando se sembraron en tubos, se inoculó con 100 µL por tubo.

### **3.2.2. *Escherichia coli***

Como donadora del gen *gusA* se utilizó *Escherichia coli* pCAM131 (Wilson et al., 1995) que lleva un trasposón cuya estructura se resume en la figura 7. Esta cepa creció en medio LB líquido (Miller, 1972) (Tabla 8) suplementado con Espectinomicina (Sp) 100 µg mL<sup>-1</sup> a 37 °C en agitación orbital a 120 rpm, o solidificado con agar a razón de 1,6 g cada 100 mL. Para eliminar *E. coli* se usó Nitrofurantoína (Nf) 20 µg mL<sup>-1</sup>.

**Figura 7**

Estructura del trasposón donador del gen *gusA* de *E. coli* pCAM131



Nota. Tomado de Wilson et al. (1995).

**Tabla 8**

Composición del medio LB.

Compuesto	Cantidad
Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g
Agua	1.000 mL
Agar	15 g/L
Ph	6,8 – 7,0

Nota. Tomado de Miller (1972).

### 3.3. Conjugación *Bradyrhizobium* sp. U531 x *Escherichia coli* pCAM131

Para el marcaje con el gen delator *gusA*, se llevó a cabo la conjugación de *Bradyrhizobium* sp. cepa U531 (sensible a Sp) con *E. coli* pCAM131 (tolerante a Sp y sensible a Nf). Se realizó en medio YEM a 28°C durante 10, 12 y 18 h, con el objetivo de obtener transconjugantes U531::*gusA*. El producto de la conjugación se colectó con un ansa, se resuspendió en 1 mL de agua destilada estéril y se hicieron diluciones seriadas hasta la -4. De cada dilución se sembraron 100 µL en placas de medio YEM que contenían antibióticos de selección (Sp 100 µg mL<sup>-1</sup>, Nf 20 µg mL<sup>-1</sup>).

### 3.4. Extracción, amplificación y secuenciación del ADN

#### 3.4.1. Extracción del ADN genómico

Para extraer el ADN genómico de las cepas se realizaron lisados celulares según (Rivas et al., 2001). Se suspendió cultivo de placa en 1 mL de buffer NaCl al 0,85% y se centrifugó por 10 min a 10000 rpm. El precipitado se resuspendió en 400  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O filtrada, se incubó por 10 min a 100 °C y luego se enfrió por 5 min a -20 °C. Por último, se centrifugó por 10 min a 10000 rpm y se extrajo el sobrenadante que se conservó a -20 °C.

Para la secuenciación del genoma, el ADN de la cepa U531 se extrajo con DNA Extraction Kit (Qiagen, Alemania). La concentración y calidad del ADN se determinó en un Nanodrop (Thermo).

#### 3.4.2. Amplificación del ADN genómico

La amplificación del ADN se realizó utilizando los cebadores ERIC 1 y 2 (de Bruijn, 1992):

ERIC1 (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3')

ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3')

La reacción de PCR se realizó en un volumen de 25  $\mu$ L compuesto por: 2,5  $\mu$ L de *buffer* NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> (10 X) con MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,5  $\mu$ L de dNTPs (10 mM), 2  $\mu$ L de *primer* ERIC 1 (*forward*), y 2  $\mu$ L de *primer* ERIC 2 (*reverse*) (25  $\mu$ M), 0,4  $\mu$ L de Taq ADN polimerasa, 5  $\mu$ L de ADN genómico y 12,5  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O mQ (Agius et al., 1997). El programa de amplificación se configuró de la siguiente manera: 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.

#### 3.4.3. Electroforesis en gel de agarosa

Los geles de agarosa de 100 mL se prepararon al 1% (p/v) en *buffer* TAE pH 8,2 y 1  $\mu$ L de SYBR Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific, USA). A los 25  $\mu$ L del producto de PCR se le agregó un volumen de 2,7  $\mu$ L de *loading buffer* 10X. En cada pocillo se cargó un volumen total de 5  $\mu$ L de la mezcla. Como marcador de peso molecular se usó 1 kb DNA Ladder (Maestrogen Inc, Taiwán). La electroforesis se realizó durante 45 min a un voltaje de 95 V (8 V/cm).

Los geles se visualizaron en un transiluminador con fuente UV y las imágenes se capturaron con un equipo fotográfico Kodak. Para analizar los perfiles se tuvieron en cuenta las bandas con tamaños entre 250 y 1200 pb y se consideraron perfiles iguales cuando las bandas presentaban entre sí al menos 60 % de similitud.

### **3.5. Eficiencia simbiótica**

Se realizaron 2 ensayos, uno con la cepa U531 en *L. subbiflorus* y *L. angustissimus*, y otro con las cepas aisladas de nódulos identificadas mediante perfiles ERIC, en *L. angustissimus*.

#### **3.5.1. Cepa U531 en *L. subbiflorus* y *L. angustissimus***

Como hospederos se usaron *L. angustissimus* y *L. subbiflorus*. El diseño experimental consistió en 2 tratamientos, el inoculado con *Bradyrhizobium sp.* cepa U531 y el sin inocular, regado con solución de riego con N. La unidad experimental de cada tratamiento fue una maceta. Para cada hospedero se realizaron 3 repeticiones independientes de 5 macetas cada una, ya sea tratamiento inoculado o con N.

#### **3.5.2. Aislamientos obtenidos de nódulos de *L. angustissimus* en INIA Glencoe**

Como hospedero se usó *L. angustissimus*. Se realizaron 7 tratamientos correspondientes a cada una de las cepas identificadas en esta tesis según su perfil ERIC y la cepa U531 como referencia. Cada tratamiento consistió en 5 réplicas de macetas y se inoculó cada uno con la cepa correspondiente.

#### **3.5.3. Determinación del peso seco de la biomasa aérea**

Para estimar la eficiencia simbiótica, en ambos ensayos se usó el peso seco de la parte aérea acumulado en dos cortes. El primer corte se realizó a los 30 días, dejando 2 nudos por planta, y el segundo a los 45 días cortando sobre la base del tallo. La parte aérea de las plantas se colocó en un sobre y se registró el número de plantas de cada maceta. En ambos cortes se secó en estufa a 60 °C por 72 h y el peso seco se determinó con una balanza de precisión, manteniendo las muestras en una campana con gel seco.

### 3.5.4. Análisis estadístico

Para determinar si existen diferencias significativas se realizó un ANOVA, modelo factorial de un solo factor con el software R, y para la comparación de medias una prueba de Tukey ( $p=0,05$ ).

### 3.6. Inoculación de *Lotus angustissimus* con *Mesorhizobium huakuii* cepa U510

El ensayo se realizó en tubos con medio Jensen y consistió en 2 tratamientos: *L. angustissimus* inoculado con *M. huakuii* cepa U510 (=U226) y *L. angustissimus* sin inocular y sin N. Se sembraron 9 tubos de cada tratamiento y las plantas crecieron en las condiciones de luz y temperatura indicadas en 3.1.2 durante 21 días, cuando se analizaron las raíces. Las observaciones se realizaron con una Lupa binocular Olympus CX31 provista de un sistema de captura de imagen digital DynoCapture 2000.

### 3.7. Caracterización genética de *Bradyrhizobium* sp. cepa U531

El ADN de la cepa U531 extraído según se indica en 3.4.1 se cuantificó con *Nanodrop* y se envió a secuenciar a Macrogen Korea (Sistema Illumina). Previo a la secuenciación del genoma se secuenció el gen 16S para comprobar la pureza de la cepa. En el genoma ensamblado se identificaron los genes *housekeeping atpD*, *recA* y *glnII*, los genes simbióticos *nifH* y *nodC*, y los genes de la vía de desnitrificación *nap*, *nirKV*, *norEFCBQD* y *nosRZDFYLYX*.

Para construir los árboles filogenéticos se utilizó el programa MEGA, mediante la función Maximum Likelihood.

### 3.8. Respiración de nitrato de la cepa U531

La capacidad de desnitrificar de la cepa U531 se evaluó en medio YEM líquido con y sin  $\text{KNO}_3$  10 mM en tubos de 15 mL cerrados herméticamente. Como controles se utilizaron tubos sin  $\text{KNO}_3$ . Como control positivo se usó la cepa NZP 2309. Los tubos se inocularon con un cultivo joven de cada cepa ( $\text{DO}_{600} = 0,4-0,5$ ), con los que se partió de una  $\text{DO}_{600}$  inicial aproximada de 0,07. Los tubos permanecieron a 28°C en agitación a 120 rpm durante 14 días, y el crecimiento se determinó leyendo la absorbancia a 600nm en un espectrofotómetro. Para este ensayo se siguió en general la metodología usada por Bueno et al. (2009).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Caracterización molecular de *Bradyrhizobium* sp. cepa U531 usada como inoculante comercial de *Lotus subbiflorus*

La caracterización molecular se realizó a través de las secuencias del gen 16S rRNA, de genes conservados que codifican para proteínas llamados *housekeeping* *atpD*, *recA* y *glnII* y de los genes simbióticos *nodC* y *nifH*.

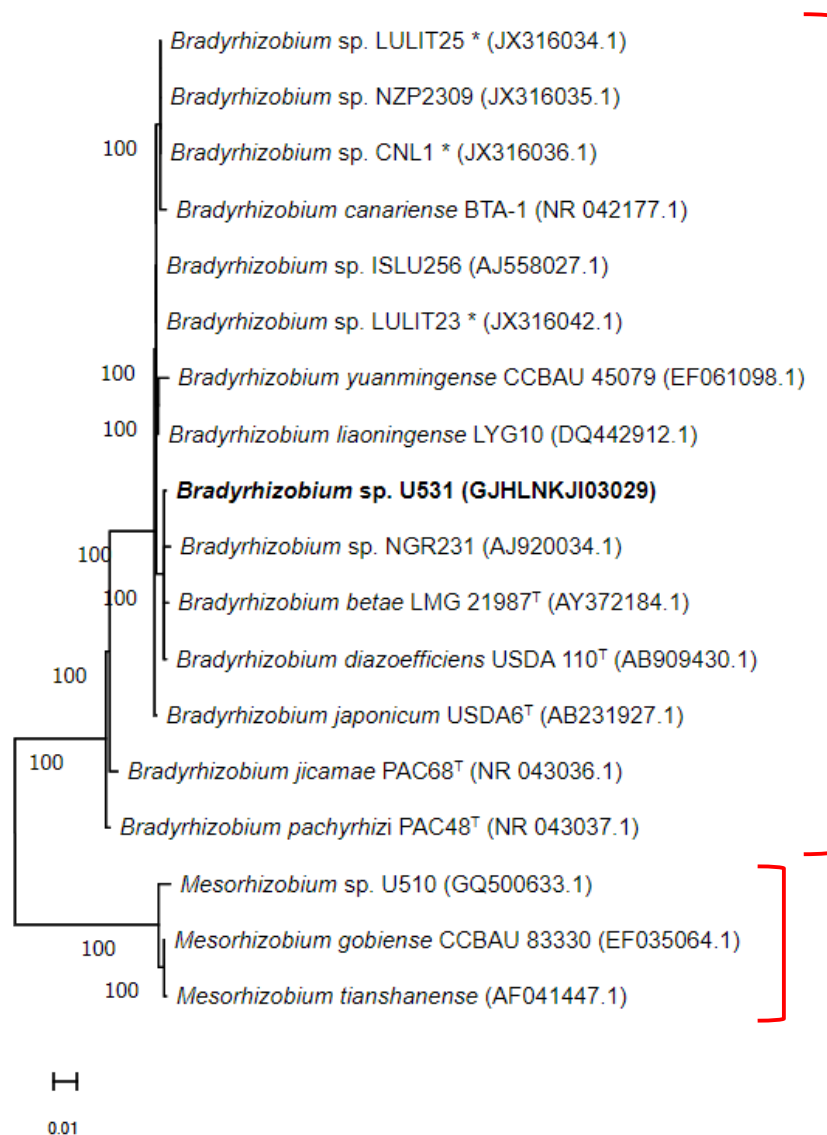
#### 4.1.1. Taxonomía de *Bradyrhizobium* spp. que nodulan *Lotus* sp. basada en la secuencia del gen 16S rRNA

Según la secuencia del gen 16S rRNA se pudieron identificar dos grandes grupos de rizobios que nodulan lotus: los que pertenecen al género *Bradyrhizobium* y los que pertenecen al género *Mesorhizobium* (Figura 8). Dentro del supergrupo de *Bradyrhizobium*, se identificaron 2 subgrupos: uno incluye a las cepas autóctonas aisladas de *L. uliginosus* (LULIT25, CNL1, LULIT23), a la cepa NZP2309 (inoculante de esa leguminosa), y a la cepa U531 (inoculante de *L. subbiflorus*), junto a otras especies de *Bradyrhizobium*. El otro subgrupo lo integran *B. jicamae* y *B. pachyrihizi*. El segundo supergrupo lo integran especies del género *Mesorhizobium*, entre ellas la cepa U510, el inoculante comercial de *L. corniculatus* (Figura 8).

Las leguminosas introducidas *L. uliginosus* y *L. subbiflorus* se inoculan con las cepas NZP2309 aislada en Nueva Zelandia y U531 aislada en Uruguay. Si bien ambas cepas pertenecen al mismo supergrupo, a pesar de su diferente origen geográfico y hospedero, es un hecho esperable que en árboles construidos con secuencias individuales del 16S rRNA agrupen juntos (Menna et al., 2009). Sin embargo, este gen, que tiene regiones alternadamente conservadas y otras variables, mediante una aproximación polifásica permite discriminar especies taxonómicamente diferentes e identificar la especie particular (Raina et al., 2019).

## Figura 8

Filogenia realizada con el gen 16S rRNA



*Nota.* El árbol se construyó con secuencias parciales de 1.245 nt de 18 cepas rizobios que nodulan lotus. Se incluyeron las usadas como inoculantes para *L. subbiflorus* (*Bradyrhizobium* sp. U531), *L. uliginosus* (*Bradyrhizobium* sp. NZP2309) y *L. corniculatus* (*Mesorhizobium huakuii* U510). Con T se indican las cepas Tipo, con \* las cepas aisladas de suelos de Uruguay y en negrita la cepa usada como inoculante comercial para *L. subbiflorus* y *L. angustissimus*. Los *Bootstrap* se indican en los puntos de bifurcación (se representan solo los mayores a 50%). Los números de accesión figuran después del nombre de cada especie. La barra de escala representa 1 base cada 100. El árbol fue generado a partir del programa MEGA mediante la función Maximum Likelihood. Las llaves rojas indican las agrupaciones mencionadas en el texto.

#### 4.1.2. Filogenia de *Bradyrhizobium* sp. cepa U531 establecida a través de secuencias de genes *housekeeping*

Los genes *housekeeping* concatenados proporcionan mucha información debido a que poseen una tasa evolutiva más rápida. Por esto, se realizó el análisis filogenético a partir de 3 genes *housekeeping* concatenados: *atpD*, *glnIII* y *recA* (Figura 9). En primer lugar, se debe destacar que el árbol muestra dos grupos bien diferenciados, uno al que pertenecen las especies del género *Mesorhizobium* y otro al que pertenecen las especies del género *Bradyrhizobium*. Las cepas que nodulan *L. uliginosus* aisladas de suelos de Uruguay LUP3, LULIT25 y el inoculante comercial NZP2309, agrupan juntas. Por otro lado, *Bradyrhizobium* sp. U531 no agrupa con ninguna de las especies de *Bradyrhizobium* incluidas en el árbol, y las especies más próximas son *B. liaoninguense* y *B. canariense*.

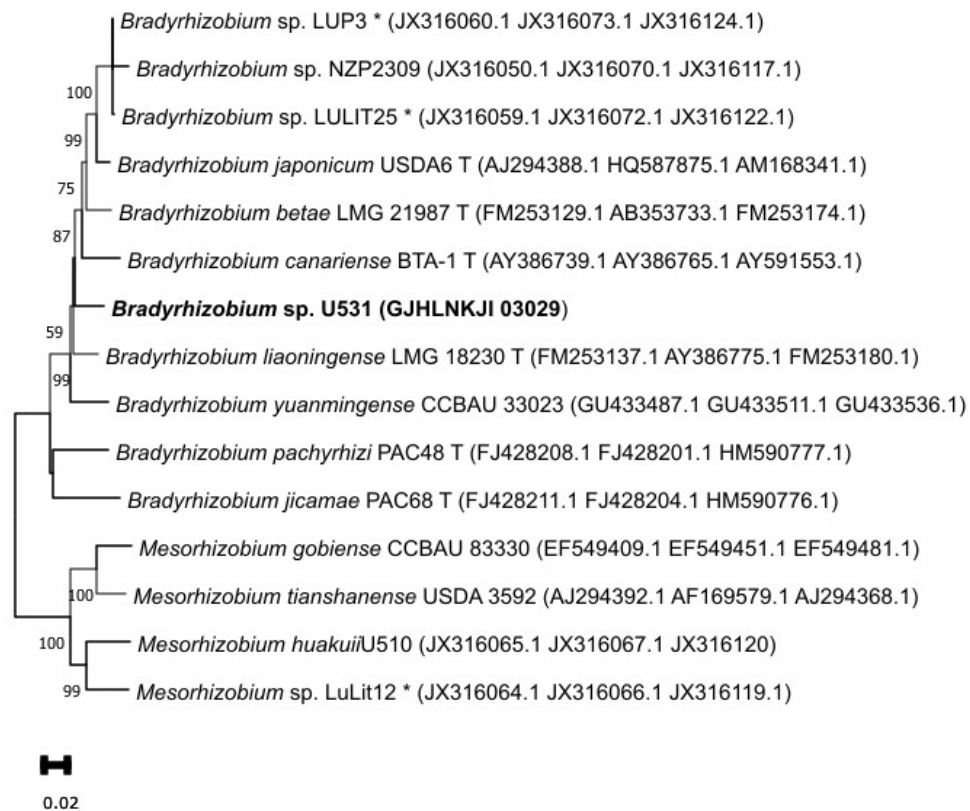
Dado que la cepa U531 se separa claramente de las otras especies de rizobios incluídas en el árbol, es posible que pertenezca a una nueva especie del género *Bradyrhizobium*. En este género, Menna et al. (2009) y Serenato Klepa et al. (2022) establecieron filogenias con los genes *atpD*, *dnaK*, *glnIII*, *gyrB*, *recA*, y *rpoB* que permitieron diferenciar cepas de todas las especies de *Bradyrhizobium* descritas. Además, el análisis comparativo del genoma completo de la cepa U531, el índice ANI y Tetra, fortalecen esta idea (M. Morel, comunicación personal, 2 de noviembre, 2022). De esta forma, los resultados obtenidos con el MLSA confirman que esta aproximación es fiable en cuanto a la información que proporciona sobre las relaciones filogenéticas, y a la identificación de cepas de rizobios que potencialmente son nuevas especies (Menna et al., 2009).

Es interesante como mediante el MLSA, los 2 aislamientos autóctonos LUP3 y LULIT25 agrupan fuertemente con el inoculante comercial de *L. uliginosus* NZP2309, del que podrían derivar, dado que este inoculante es utilizado hace más de 25 años.



## Figura 9

Filogenia realizada con secuencias parciales de los genes *housekeeping*



*Nota.* El árbol que se construyó con el concatenado de los genes *atpD* (330 nt), *glnII* (525 nt) y *recA* (368 nt), muestra las relaciones filogenéticas entre 15 rizobios que nodulan lotus y *Bradyrhizobium* sp. cepa U531. Con T se indican las cepas Tipo, con \* las cepas aisladas de suelos de Uruguay y en negrita la cepa usada como inoculante comercial para *L. subbiflorus* y *L. angustissimus*. Entre paréntesis siguiendo al nombre de cada especie se encuentran los *accession numbers* de cada uno de los tres genes. La barra de escala representa 2 bases cada 1000. El árbol fue realizado en base a secuencias de genes concatenados, utilizando el programa MEGA mediante su función Maximum Likelihood.

### 4.1.3. Relaciones filogenéticas establecidas a partir de los genes simbióticos *nodC* y *nifH*

La taxonomía de los rizobios establecida a través de genes 16S rRNA y *housekeeping* no refleja las propiedades simbióticas de las cepas, ni su rango de hospedero (Laguerre et al., 2001). Así, los genes *nodC* y *nifH*, que codifican la

síntesis del quitin oligosacárido y la subunidad hierro de la nitrogenasa respectivamente, se utilizan para inferir la diversidad de genes simbióticos (Serenato Klepa et al., 2022). En este sentido la transferencia lateral de genes denominados simbióticos (*Sym*) explica los casos de incongruencia filogenética entre estos genes y otros usados en la taxonomía de rizobios (Martínez-Romero & Caballero-Mellado, 1996).

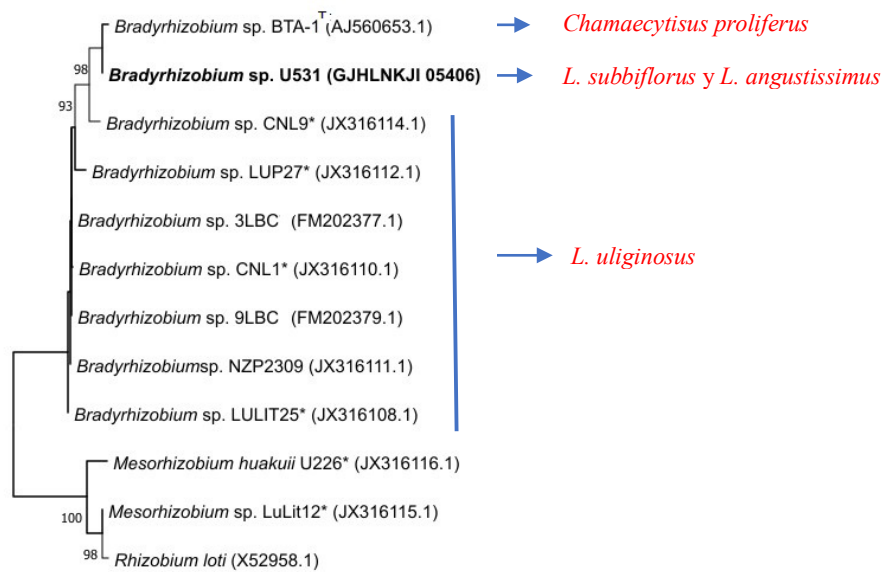
Los árboles construidos con los genes *nodC* y *nifH* (Figura 10 A y B) evidencian que el grupo de cepas pertenecientes al género *Mesorhizobium* está claramente separado de aquellas incluidas en el género *Bradyrhizobium*, como también se observó con los genes *housekeeping* (Figura 9). Según las secuencias de los genes *nodC* y *nifH*, dentro del grupo *Bradyrhizobium* se identificaron dos subgrupos, uno incluye a las cepas U531 aislada de *L. subbiflorus*, CNL9 aislada de *L. uliginosus*, ambas en suelos de Uruguay, y a *B. canariense* BTA-1 aislada de *Chamaecytisus proliferus* en Islas Canarias. El otro subgrupo lo integran cepas aisladas de *L. uliginosus* crecido en suelos de Uruguay, junto al inoculante comercial, cepa NZP 2309 introducida de Nueva Zelanda.

Estos resultados, obtenidos con secuencias de los genes *nifH* y *nodC* (Figura 10), evidencian la transferencia lateral de estos genes entre linajes, lo que explica el agrupamiento de cepas de acuerdo con sus hospederos y no por su asignación de especies (Vinuesa et al., 2005).

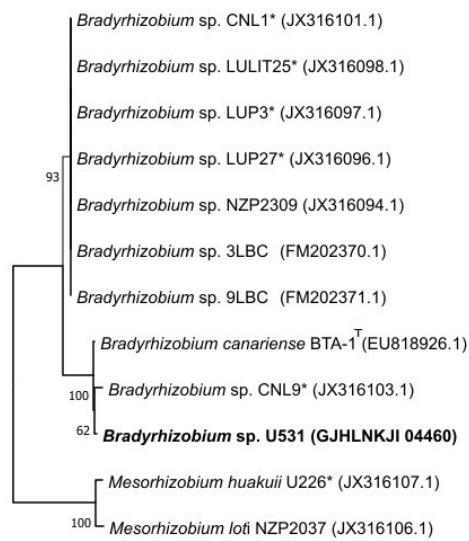
Las distintas cepas de *Bradyrhizobium* usadas para la construcción de los árboles *nodC* y *nifH* pertenecen a la simbiovariedad genisteraum, caracterizadas por tener un amplio rango de hospedero, a tal punto que se superpone con el de cepas de *B. japonicum* de la misma simbiovariedad (Vinuesa et al., 2005). Estos autores proponen que estas cepas comparten entre ellas alelos monofiléticos de los genes *nifH* y *nodC*, consecuencia de la transferencia horizontal de una isla conjugativa cromosómica entre especies. Es evidente entonces, que este proceso juega un papel importante en la diversificación y estructura de las poblaciones de rizobios. En nuestro caso, la transferencia horizontal de genes simbióticos *nodC* y *nifH* explicaría el agrupamiento de *Bradyrhizobium* cepa U531, aislada de Uruguay, y *Bradyrhizobium* sp. BTA-1 aislada de Islas Canarias.

**Figura 10**

Árbol filogenético realizado con los genes simbióticos *A. nodC* y *B. nifH*



A



B

0.050

*Nota.* El árbol fue realizado en base a secuencias parciales de los genes *nodC* (203 nt) y *nifH* (240 nt), utilizando el programa MEGA mediante su función *Neighbor Joining Maximum Likelihood* (NJML). Con T se indican las cepas Tipo, con \* las cepas aisladas de suelos de Uruguay y en negrita la cepa usada como inoculante comercial de *L. subbiflorus* y *L. angustissimus*. En rojo se indican las leguminosas de donde se aislaron las cepas. La barra de escala representa 5 bases cada 1000.

Entre paréntesis siguiendo al nombre de cada especie se encuentran los *accession numbers*.

#### 4.1.4. Identificación de los genes *nap*, *nir*, *nor* y *nos*: capacidad de desnitrificar de *Bradyrhizobium* sp. cepa U531

Muchas leguminosas establecen simbiosis con cepas de *Bradyrhizobium*, que pueden tener los genes de la vía de la desnitrificación (Bedmar et al., 2005). Esto implica que potencialmente pueden respirar  $\text{NO}_3^-$  y contribuir con la emisión de  $\text{N}_2\text{O}$ . Por esta razón, se buscaron en la cepa U531 secuencias homólogas a la de genes que codifican para enzimas de la vía de la desnitrificación. En el genoma de esta cepa se encontraron secuencias con homología a genes *napC*, *nirK*, *norC* y *nosZ* (Tabla 9), lo que implica que en condiciones microaeróbicas como las que se generan durante el anegamiento de suelo puede respirar  $\text{NO}_3^-$ , es decir, tiene capacidad de desnitrificar.

**Tabla 9**

*Identificación de genes de la desnitrificación en Bradyrhizobium sp. cepa U531*

Gen	Query cover %	% homología nucleótidos	Número de accesión	Query cover %	% homología aminoácidos	Número de accesión
<i>napC</i>	100	89,27	CP011360.1	99	89,20	WP_011089777.1
<i>nirK</i>	99	93,44	CP011360.1	98	97,23	BAC52354.1
<i>norC</i>	100	91,41	CP011360.1	99	96,67	WP_011085998.1
<i>nosZ</i>	100	87,62	CP011360.1	99	91,08	WP_011083147.1

*Nota.* Se comparó la secuencia de los genes *napC*, *nirK*, *norC* y *nosZ* y sus respectivas secuencias de aminoácidos de la cepa U531 con los homólogos de *Bradyrhizobium diazoefficiens* (sin. *japonicum*) USDA 110.

La comparación de la secuencia de nucleótidos como de la secuencia aminoacídica de la cepa U531 respecto a la cepa tipo USDA 110 de *Bradyrhizobium diazoefficiens* fue alta, lo que evidencia un grado de conservación de estos genes. Esta cepa representa un modelo de referencia en cuanto a desnitrificación tanto en vida libre como a nivel de nódulo. La presencia y expresión de genes de la vía de la desnitrificación son útiles para las bacterias en condiciones microaeróbicas como

las que ocurren en condiciones de anegamiento, dado que pueden obtener ATP mediante la respiración de  $\text{NO}_3^-$ .

En 4 cepas de *Bradyrhizobium* sp. aisladas de suelos de Uruguay de nódulos de *L. uliginosus* y en el inoculante comercial de esta leguminosa, la cepa NZP2309 (=U526, =U1401), Monza et al. (2006) identificaron secuencias con homología a los genes *nirK*, *norBDQ* y *nosZ*, que no encontraron en 5 cepas de *Mesorhizobium* sp. evaluadas. Estos autores evidenciaron la capacidad de respirar  $\text{NO}_3^-$  en las 4 cepas que poseían los genes de la vía de la desnitrificación. Si bien la capacidad de desnitrificar no es una característica deseada, por sus derivaciones medioambientales y económicas, la posibilidad de respirar nitrato le confiere al microorganismo mayor capacidad de sobrevivir en condiciones de anegamiento. Sin embargo, en esta tesis no evidenciamos la capacidad de respirar  $\text{NO}_3^-$  a través de un incremento significativo de la  $\text{DO}_{600}$ , que permaneció en torno a 0,07. Esto no quiere decir que la cepa no desnitrifique, dado que puede respirar  $\text{NO}_3^-$  pero no incrementar la biomasa estimada a través de la  $\text{DO}_{600}$ .

Considerando la creciente promoción de la agricultura sostenible, esta implica aumentar la FBN mediante el uso de leguminosas y así reducir el uso de fertilizantes químicos, como también el uso de inoculantes que no desnitrifiquen. De todas formas, en la medida que las leguminosas proporcionan al suelo restos ricos en N, también hay que tener presente que contribuyen indirectamente con las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$  (Rees et al., 2013; Sánchez et al., 2013).

#### **4.2. Eficiencia simbiótica *Bradyrhizobium* sp. cepa U531 – *L. angustissimus* y *L. subbiflorus***

En un escenario como el actual, en donde lotus ha mostrado un papel destacado en el mejoramiento de campo natural por la capacidad de adaptarse a diferentes suelos, es interesante la inclusión de otras especies del género que han sido menos usadas. En el desarrollo de nuevas especies a ser utilizadas, se vuelve imprescindible la evaluación del inoculante rizobiano a ser utilizado. Por estas razones, en esta tesis se evaluó a *Bradyrhizobium* sp. cepa U531, el inoculante comercial de *L. subbiflorus*, en *L. angustissimus*. Para establecer la comparación de la capacidad de fijar N de esta cepa se utilizó un control con N, considerado para

ambas especies, el potencial máximo de la planta. El peso seco acumulado de la parte aérea a los 60 días, con un corte previo a los 45 días se resume en la tabla 10.

La biomasa aérea acumulada por las plantas de *L. subbiflorus* del tratamiento inoculado con la cepa U531 rindió un 63% con respecto al control con KNO<sub>3</sub> 10 mM (experimento 1) (Tabla 10). Sin embargo, la biomasa aérea acumulada por las plantas de *L. angustissimus* del tratamiento inoculado rindió un 157 % con respecto al control con KNO<sub>3</sub> 10 mM (Tabla 10).

**Tabla 10**

*Biomasa aérea acumulada (primer y segundo corte) por L. subbiflorus y L. angustissimus*

Especie	Inoculado	Control KNO <sub>3</sub>	%
	mg/planta		
<i>L. subbiflorus</i>	55,90± 4,40 <b>b</b>	88,85± 9,50 <b>a</b>	63
<i>L. angustissimus</i>	46,03± 4,25 <b>b</b>	29,38± 9,50 <b>b</b>	157

*Nota.* El peso seco por planta corresponde a los tratamientos inoculado con la cepa U531 y al control con KNO<sub>3</sub> 10 mM. El % corresponde a la biomasa del tratamiento inoculado respecto al control con KNO<sub>3</sub>. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos, p valor=0,05.

La biomasa producida por las leguminosas noduladas suele ser inferior a la del tratamiento fertilizado con N, si su concentración y fuente son las adecuadas. Por esta razón, es que se considera al control con N, la condición en la cual la planta rinde su máximo potencial. Sin embargo, en el experimento 1, la biomasa aérea del control con N de *L. angustissimus* fue inferior al de las plantas inoculadas. Por esto, para determinar el crecimiento potencial de *L. angustissimus*, se realizaron otros 4 experimentos en los que se usaron diferentes concentraciones y fuentes de N.

- Experimento 2 (KNO<sub>3</sub> 5 mM con 3 riegos semanales).

Con la hipótesis de que la concentración de KNO<sub>3</sub> 10 mM hubiera resultado alta, considerando los valores recomendados por el MGAP para esta leguminosa (0,05% KNO<sub>3</sub> = 5 mM KNO<sub>3</sub>), se realizó este ensayo. Las plantas de *L. angustissimus* crecieron con síntomas de estrés y no superaron el primer corte, mientras que las de *L. subbiflorus* se desarrollaron y la biomasa aérea acumulada fue similar a la del experimento 1.

- Experimento 3 ( $\text{KNO}_3$  0,5 mM con 1 riego semanal).

Se usó esta concentración que es la sugerida por Howieson y Dilworth (2016), recomendada para un riego semanal. En estas condiciones, la biomasa aérea acumulada no superó los 14 mg/planta en ninguna de las dos especies evaluadas, lo que evidenció que esta concentración de N es insuficiente para ambas especies de Lotus.

- Experimento 4 ( $\text{KNO}_3$  5 mM con 1 riego semanal).

En este experimento, en el que se usó la misma concentración de  $\text{KNO}_3$  que la usada en el experimento 2, el riego con solución con N se realizó 1 vez por semana. Las plantas crecidas en estas condiciones no superaron el primer corte, lo que indica que el N fue limitante.

- Experimento 5 (urea 1 g L<sup>-1</sup> con 3 riegos semanales).

Las plantas de *L. angustissimus* y *L. subbiflorus* no sobrevivieron al primer corte, y mostraron a partir del día 15 marchitez y coloración amarilla que podría estar relacionada con un exceso de N.

La dificultad surgida con *L. angustissimus* crecido con diferentes fuentes y concentraciones de N evidencian un comportamiento diferente al de *L. subbiflorus*, así como a *L. corniculatus* y *L. uliginosus*. Estas especies crecen con 8 mM de  $\text{KNO}_3$ , una concentración similar a la usada en los experimentos 1, 2 y 4 (Muttoni Pastorino, 2008; Díaz Gadea, 2011; Castillo, 2012; Mederos, 2016). De esta forma, queda planteado el desafío de buscar y encontrar una fuente y una concentración de N, que permita expresar el potencial de crecimiento de *L. angustissimus* en condiciones no limitantes de N.

Las razones por las cuales esta especie-cultivar no responde a la aplicación de N combinado no son sencillas de explicar. A modo de hipótesis podría tratarse de un cultivar que está en proceso de domesticación, que en su ambiente natural las plantas son noduladas y obtienen el N vía fijación y no responde como otras leguminosas del género a la fertilización nitrogenada. El problema también podría estar relacionado al sustrato utilizado. Sin embargo, distintos trabajos realizados con otras especies del género en condiciones de sustrato similares mostraron un

crecimiento normal de las plantas de los controles con N (Muttoni Pastorino, 2008; Díaz Gadea, 2011; Castillo, 2012; Mederos, 2016).

A pesar de los problemas relacionados a la expresión del potencial de crecimiento de la planta sin limitantes de N, es interesante destacar que la inoculación con la cepa U531 generó en *L. angustissimus* un crecimiento aceptable. Teniendo en cuenta la definición de eficiencia simbiótica de Howieson y Dilworth (2016), se puede concluir que esta cepa es eficiente en *L. angustissimus*, al generar un beneficio sobre el hospedero, en el que induce nódulos voluminosos y de aspecto eficiente (Figura 11), logrando una buena producción de MS (tabla 10). Sin embargo, es necesario destacar que la magnitud de este beneficio no pudo ser comparado con el potencial de crecimiento de esta planta en condiciones no limitantes de N.

### Figura 11

*Nodulación eficiente de Bradyrhizobium sp. cepa U531 en plantas de L. angustissimus*



*Nota.* La imagen fue tomada de una planta de 60 días de crecimiento.

Resulta relevante llevar estos resultados a una escala mayor, de manera de poder medir los kg N ha<sup>-1</sup> que esta leguminosa podría aportar a un sistema de mejoramiento de campo natural. Como fue descrito anteriormente y teniendo en cuenta que esta cepa es eficiente en *L. angustissimus*, las producciones de 1er año estarían en promedio en torno a 1750 kg MS ha<sup>-1</sup>, y las de 2do año en torno a 7000



kg MS ha<sup>-1</sup> (INIA, s.f.). Esto significa que, considerando un factor de conversión de 27 kg N t<sup>-1</sup> MS (Lussich, 2020), un mejoramiento de campo natural con *L. angustissimus* inoculado con esta cepa estaría aportando al sistema alrededor de 47 kg N ha<sup>-1</sup> en el primer año y 189 kg N ha<sup>-1</sup> a partir del segundo año. Estas estimaciones deben ser comparadas con valores reales de fijación de N, a partir de una evaluación a campo.

Un punto para destacar en este trabajo de tesis es que se evaluó una misma cepa de inoculante en 2 especies de lotus distintas. Esto es importante para la industria ya que al lograr unificar un inoculante para 2 o más especies, se simplifican los procesos de producción de inoculantes, mejorando así la eficiencia en términos de trabajo, tiempo y costos. En este sentido, esta tesis tiene también la relevancia de buscar unificar una cepa eficiente y competitiva que funcione en dos especies de lotus distintas: *L. subbiflorus* y *L. angustissimus*.

#### **4.3. Efecto de la inoculación de *L. angustissimus* con *Mesorhizobium huakuii* cepa U510**

Es un problema conocido la incompatibilidad existente cuando se siembra *L. subbiflorus* o *L. uliginosus* en campos con historia de *L. corniculatus* inoculado con *M. huakuii* cepa U510. Para conocer el efecto de esta cepa sobre *L. angustissimus* se realizó un ensayo en tubos con medio Jensen durante 21 días. En las raíces de plantas inoculadas con U510 se observó una coloración roja intensa, puntos de color rojizo y formación de estructuras abultadas, probablemente pseudonódulos (Figura 12). Si bien no fueron claros los síntomas de una interacción planta-parásito en el tiempo ensayado, las plantas no progresaron como los controles sin N y sin inocular.

## Figura 12

*Plántulas inoculadas con Mesorhizobium huakuii cepa U510*



*Nota.* Las plántulas fueron evaluadas a los 21 días de crecimiento. La imagen de las estructuras abultadas a la derecha se obtuvo con una lupa binocular con un aumento de 5x.

Estos resultados primarios, obtenidos en un período de tiempo corto, evidencian el establecimiento de una relación ineficiente como ha sido comunicado por diferentes autores (Monza et al., 1992; Irisarri et al., 1996). Sin embargo, este ensayo fue realizado en condiciones de laboratorio y en un tiempo de evaluación de 21 días, por lo que sería el inicio para el desarrollo de nuevas evaluaciones con mayor intervalo de tiempo y en condiciones de campo, que puedan confirmar o rechazar, la hipótesis de que existe un efecto parásito de esta cepa sobre *L. angustissimus*. En el mismo sentido, sería interesante realizar un ensayo de co-inoculación con las cepas U531 y U510, de manera de observar cuál de las dos logra nodular a *L. angustissimus*, y si el efecto dañino de la U510, se da también en presencia de una cepa eficiente.

Este ensayo es de destacada relevancia, debido a que, en caso de confirmarse que *L. angustissimus* no establece una relación parásita con *Mesorhizobium* sp., esta leguminosa podría ser una solución a un problema que enfrentan los productores a la hora de realizar un mejoramiento sobre campos que tuvieron *L. corniculatus*.

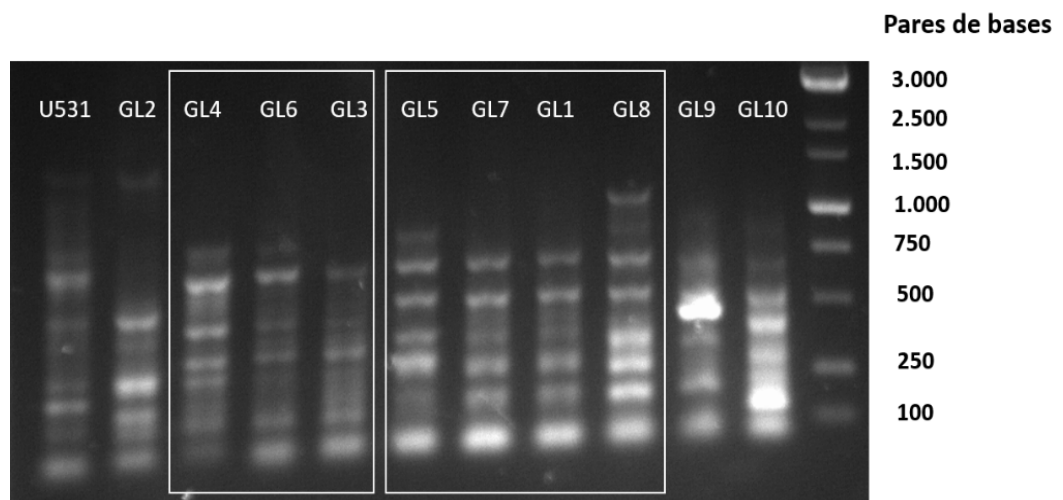
#### 4.4. Generación de una colección de cepas aisladas de nódulos de *L. angustissimus*

##### 4.4.1. Identificación de los aislamientos mediante sus perfiles ERIC

Se realizó una colección de cepas partiendo de nódulos de plantas de resiembra de *L. angustissimus* recolectadas en la estación experimental de INIA Tacuarembó, en Glencoe, específicamente en zonas sin historial de uso de inoculantes en al menos 15 años previos. A partir de 9 plantas se realizaron un total de 29 aislamientos de nódulos, de los cuales se lograron purificar 10, designados como GL1 a GL10. A estos aislamientos se les realizó un ERIC PCR que dio como resultado 5 perfiles distintos: GL2, GL5, GL6, GL9 y GL10 (Figura 13). Estos 5 aislamientos distintos fueron sometidos a una evaluación de eficiencia simbiótica la cual se describe en el punto 4.4.2.

#### Figura 13

*Perfiles ERIC de 10 aislamientos de nódulos de L. angustissimus y la cepa U531*



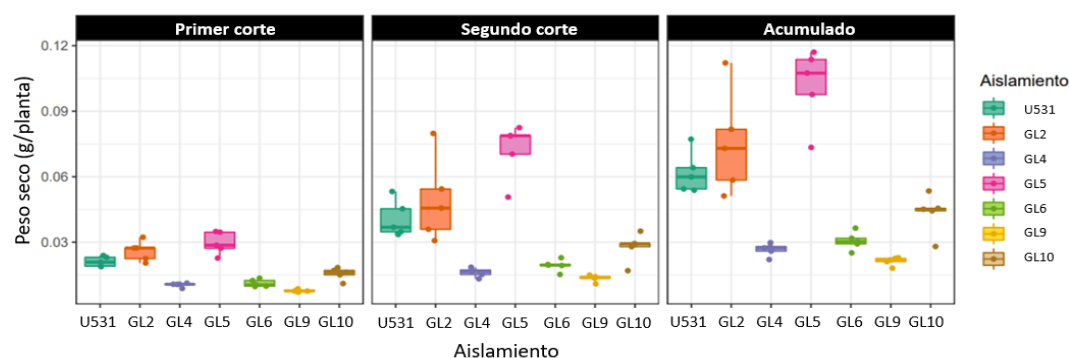
*Nota.* El carril 1 corresponde a la cepa U531, los carriles 2 al 11 las cepas aisladas de nódulos GL1 a GL10, el carril 12 es el marcador de peso molecular. En cuadrados blancos se agrupan los perfiles que son iguales entre sí.

#### 4.4.2. Eficiencia simbiótica de las cepas aisladas de *L. angustissimus*

La eficiencia simbiótica de las cepas de la colección generada se evaluó en el mismo hospedero de donde fueron aisladas, *L. angustissimus*. De las 6 cepas evaluadas (Tabla 11 y Figura 14), solo la cepa GL5 indujo más biomasa (64% más) que la cepa U531, el inoculante comercial. A su vez, las cepas GL2 y GL10 indujeron la misma biomasa que este. Por otra parte, la producción de biomasa aérea con las cepas GL6, GL4 y GL9 fue francamente inferior a las anteriores. Se observó también que los pares simbióticos evaluados mantienen el mismo comportamiento en ambos momentos de corte. En la figura 15 se muestra también la biomasa aérea producida por los aislamientos a los 45 días de crecimiento.

**Figura 14**

*Evolución de biomasa aérea del primer y segundo corte y el acumulado según tratamiento*



*Nota.* El peso seco se expresa en g por planta. Cada peso surge de una unidad experimental (maceta) con 8 plantas cada una. La línea horizontal de cada caja indica la mediana del tratamiento y el desvío se muestra con una línea vertical.

**Tabla 11**

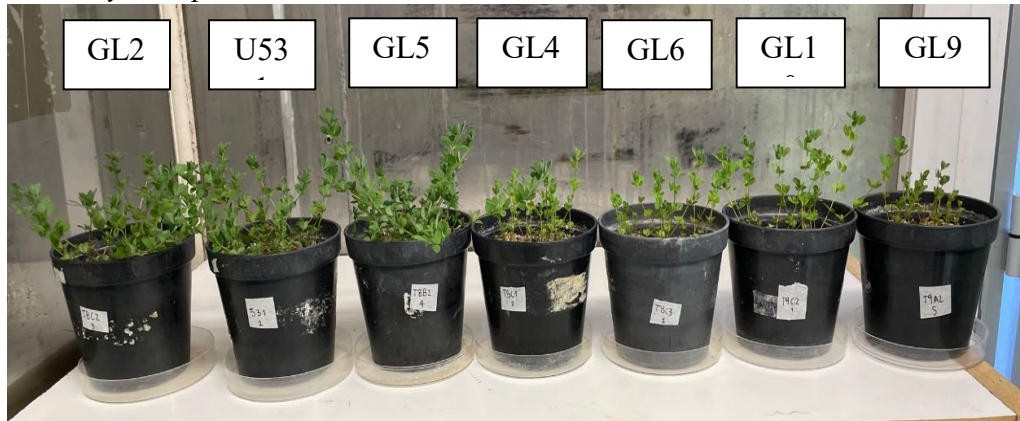
*Biomasa aérea acumulada de plantas de *L. angustissimus* en dos cortes*

Tratamiento	Peso seco (mg/planta)
GL5	101.9 a
GL2	75.3 b
U531	61.9 bc
GL10	43.3 cd
GL6	30.6 d
GL4	26.6 d
GL9	21.3 d

*Nota.* El peso seco (mg · planta<sup>-1</sup>) corresponde a la media de 5 macetas, con 8 plantas cada una. Las letras distintas indican diferencias significativas ( $p=0,05$ ).

### Figura 15

*Biomasa aérea de L. angustissimus inoculado con las distintas cepas aisladas de nódulos y la cepa U531*



*Nota.* Las plantas muestran un crecimiento de 60 días con un corte a los 45 días.

Dado el desplazamiento de las praderas a suelos diferentes a donde habían sido evaluadas las cepas usadas como inoculantes, en el marco de proyectos llevados adelante entre Facultad de Agronomía y el INIA se realizaron colectas y evaluaciones de cepas de rizobios que nodulan lotus de los dos grupos simbióticos. Sotelo et al. (2011) generaron una colección de 168 aislados de nódulos de *L. corniculatus* entre los que identificaron 110 con diferente perfil ERIC único (65% perfiles diferentes), y 14 de esas cepas, el 13%, exhibieron una eficiencia simbiótica igual o mayor a la del inoculante comercial, *M. huakuii* cepa U510. Algo similar ocurrió con 111 aislados de nódulos de *L. uliginosus*, entre los que se identificaron 52 perfiles únicos (47% diferentes), entre los cuales 5 cepas (10%) tuvieron una eficiencia igual o mayor a la del inoculante comercial, *Bradyrhizobium* sp. cepa NZP2309 (Batista et al., 2015). Entre las 10 cepas aisladas de nódulos de *L. angustissimus* en esta tesis, la diversidad de perfiles ERIC (60%) se encuentra dentro de los valores reportados para las cepas de *Bradyrhizobium* y *Mesorhizobium* aisladas de nódulos de *L. uliginosus* por Batista et al. (2015) y de *L. corniculatus* (Sotelo et al., 2011). Sin embargo, entre las cepas aisladas de *L. angustissimus* se encontró un porcentaje algo mayor (50%) de cepas con eficiencia igual o superior a *Bradyrhizobium* sp. cepa U531, el inoculante usado para *L. subbiflorus*. De todas formas, el número de aislamientos evaluados en esta tesis fue aproximadamente 12 veces inferior al usado en los trabajos mencionados, lo que debe ser considerado a los efectos de establecer las comparaciones.

La adquisición por cepas autóctonas de genes simbióticos de otras cepas, como lo son las introducidas, puede explicar el origen de poblaciones de rizobios eficientes. Estas poblaciones de rizobios eficientes pueden explicar que la respuesta a la inoculación sea más pronunciada en suelos sin antecedentes de inoculación. Estas cepas son un material a considerar para el desarrollo de nuevos inoculantes, porque además están adaptadas a nuestras condiciones edáficas y climáticas (Sotelo et al., 2011). En este caso, a su vez, es destacable el hecho de que la cepa comercial no aparezca dentro de los aislados. Dado que se trata de un campo que no se inocula hace 15 años, se podría suponer que las cepas presentes hoy en día son derivadas de la cepa U531, que lograron una buena adaptabilidad a ese ambiente. Sin embargo, es necesario realizar un número mayor de aislamientos para así corroborar de forma representativa la presencia u ausencia de esta cepa, en nódulos de plantas.

De esta forma, la presencia de cepas con buena eficiencia simbiótica en distintas especies de lotus, presentes en algunos suelos, puede explicar aquellas situaciones en las que los productores no observen diferencias claras en la producción de biomasa cuando no inoculan la semilla. Igualmente, la relación entre el bajo costo por unidad de superficie y el riesgo de tener una simbiosis ineficiente, hace que la recomendación a nivel productiva sea a favor de la inoculación.

Resulta interesante cuantificar el beneficio potencial a nivel de campo de la cepa GL5 con respecto al inoculante comercial. Suponiendo que a nivel de campo esta cepa lograra comportarse de la misma manera que en condiciones controladas, se podría estimar un 64% de aumento en la producción de MS/ha de esta leguminosa. Esto daría como resultado, según las estimaciones de INIA (s.f.) y Lussich (2020), producciones de 2800 kg MS ha<sup>-1</sup> en el primer año y 11480 kg MS ha<sup>-1</sup> a partir del segundo año, significando así un aporte de 75 kg N ha<sup>-1</sup> y 309 kg N ha<sup>-1</sup> al sistema respectivamente. De todas formas, no es previsible que la magnitud del aumento de biomasa se reproduzca en condiciones de campo. Debido a la eficiencia simbiótica de esta cepa, este año comienzan los ensayos de evaluación a nivel de campo en INIA Tacuarembó.

#### 4.5. Marcaje de la cepa U531 con el gen reportero *gusA* para estudios de competencia

Una característica deseable de un inoculante es la competitividad de la cepa, es decir, su capacidad de ocupar nódulos respecto a rizobios presentes en los suelos. Para estimar esta característica nos planteamos marcar a la cepa U531 con el gen reportero *gusA*, Para marcar la cepa U531 se hicieron 3 ensayos, en los que varió el tiempo de conjugación, es decir, el período que permanecieron juntos donador y receptor. Los tiempos ensayados fueron 10 h, 12 h y 18 h. De todas formas, en ninguno de estos tiempos de incubación donador – receptor obtuvimos transconjugantes U531::*gusA*, dado que no hubo crecimiento de colonias en el medio de selección cuando se sembraron las diluciones 0, -1 y -2.

Si bien el plásmido pCAM131 que lleva el trasposón con el gen *gusA* ha podido ser transferido a rizobios que nodulan trébol (Irisarri et al., 2019), lotus (Camargo, 2012) y alfalfa (Berai-Rubio et al., 2023) exitosamente, todo indica que no es posible su transferencia a la cepa U531 de *Bradyrhizobium* sp. Teniendo en cuenta que el marcaje con el gen reportero *gusA* no se pudo realizar, se puede pensar en cambiar el trasposón a otro plásmido o bien usar otros sistemas de marcaje como las proteínas GFP (*Green Fluorescent Protein*) o RFP (*Red Fluorescent Protein*). Esta última estrategia implica reconocer los nódulos ocupados por la cepa marcada por emisión de fluorescencia, algo más complejo que el sistema *gusA*. La ocupación de nódulos también puede realizarse mediante la identificación de cepas según sus perfiles ERIC o BOX - PCR, pero esto también implica una metodología laboriosa y lenta, que puede incluir un número limitado de nódulos.

## 5. CONCLUSIONES

La cepa U531 usada como inoculante comercial de *L. subbiflorus*, establece una simbiosis eficiente con *L. angustissimus*, de todas formas, parece necesario evaluar aislamientos procedentes de nódulos de *L. angustissimus* que podrían mejorar la eficiencia.

Si bien los perfiles ERIC de los aislamientos de nódulos de *L. angustissimus* indicarían una diversidad de cepas mayor a la de los aislamientos de *L. uliginosus*, el número analizado es insuficiente para una generalización.

Entre las cepas nativas-naturalizadas se observó que algunas son tan eficientes como la cepa U531, lo que permite suponer que al evaluar un mayor número de aislamientos se generará una colección en la que se podrán identificar cepas promisorias para ser usadas como inoculante.

La caracterización genética de la cepa U531 basada en las secuencias de los genes 16S RNA y *housekeeping* permite proponer que esta cepa pertenece a una nueva especie de *Bradyrhizobium*.

El fenotipo de la respiración de  $\text{NO}_3^-$  en condiciones micro aeróbicas no se estableció claramente con la técnica usada, pero es posible que la cepa U531 desnitrifique, dado que presenta todos los genes de la vía de desnitrificación.

*M. huakuii* cepa U510 establece una relación de tipo ineficiente con *L. angustissimus*.

Quedan planteados los desafíos de encontrar una fuente y concentración de N que permita medir el potencial de crecimiento de *L. angustissimus* en condiciones no limitantes de N, así como otra cepa donadora que permita transferir genes delatores para evaluar la competitividad de la cepa U531.



## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Agius, F., Sanguinetti, C., & Monza, J. (1997). Strain-specific fingerprints of *Rhizobium loti* generated by PCR with arbitrary and repetitive sequences. *FEMS Microbiology Ecology*, 24(1), 87-92.
- Ayala, W., & Carámbula, M. (2009). El valor agronómico del género *Lotus*. INIA.
- Batista, L. (2013). *Prospección y caracterización de rizobios para el desarrollo de inoculantes para trébol y lotus* [Tesis de Maestría]. Universidad de la República.
- Batista, L., Irisarri, P., & Rebuffo, M. (2015). Nodulation competitiveness as a requisite for improved rhizobial inoculants of *Trifolium pratense*. *Biology and Fertility of Soils*, 51, 11-20. <https://doi.org/10.1007/s00374-014-0946-3>
- Batista, L., Tomasco, I., Lorite, M. J., Sanjuán, J., & Monza, J. (2013). Diversity and phylogeny of rhizobial strains isolated from *Lotus uliginosus* grown in Uruguayan soils. *Applied Soil Ecology*, 66, 19-28. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.01.009>
- Bedmar, E. J., Robles, E. F., & Delgado, M. J. (2005). The complete denitrification pathway of the symbiotic, nitrogen-fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochemical Society transactions*, 33(1), 141-144. <https://doi.org/10.1042/BST0330141>
- Benavides, H., & León, G. (2007). *Información técnica sobre gases de efecto invernadero y cambio climático*. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales. <http://www.ideam.gov.co/documents/21021/21138/Gases+de+Efecto+Invernadero+y+el+Cambio+Climatico.pdf>
- Berais-Rubio, A., Morel Revetria, M. A., Giménez, M., Signorelli, S., & Monza, J. (2023). Competitiveness and symbiotic efficiency in alfalfa of *Rhizobium favelukesii* ORY1 strain in which homologous genes of peptidases HrrP and SapA that negatively affect symbiosis were identified. *Frontiers in Agronomy*, 4, 1-12. <https://doi.org/10.3389/fagro.2022.1092169>

- Berriel, V., Perdomo, C., Signorelli, S., & Monza, J. (2022). Crop performance indexes applied to legume used as summer cover crops under water deficit conditions. *Agronomy*, *12*(2), Artículo e443.  
<https://doi.org/10.3390/agronomy12020443>
- Bordoli, J. M. (1998). Fertilización de pasturas de leguminosas y mezclas de gramíneas y leguminosas. En *Manejo de la fertilidad en sistemas extensivos: Cultivos y pasturas* (pp. 71-79). Facultad de Agronomía.
- Bueno, E., Mania, D., Frostegard, A., Bedmar, E. J., Bakken, L. R., & Delgado, M. J. (2015). Anoxic growth of *Ensifer meliloti* 1021 by N<sub>2</sub>O-reduction, a potential mitigation strategy. *Frontiers in Microbiology*, *6*, Artículo e537.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00537>
- Bueno, E., Richardson, D. J., Bedmar, E. J., & Delgado, M. J. (2009). Expression of *Bradyrhizobium japonicum* *cbb3* terminal oxidase under denitrifying conditions is subjected to redox control. *FEMS Microbiology Letters*, *298*(1), 20-28. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01711.x>
- Bullard, M. J., & Crawford, T. J. (1995). Productivity of *Lotus corniculatus* L. (bird's-foot trefoil) in the UK when grown under low-input conditions as spaced plants, monoculture swards or mixed swards. *Grass and Forage Science*, *50*(4), 439-446. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.1995.tb02338.x>
- Camargo, D. (2012). *Desarrollo de un inoculante rizobiano para un nuevo cultivar de Lotus uliginosus* [Tesis de Maestría]. Universidad de la República.
- Carámbula, M. (1992). Mejoramientos extensivos: Fundamentos. En C. Mas, M. Carámbula, R. Bermúdez, W. Ayala & E. Carriquiry (Eds.), *Mejoramientos extensivos en la región este: Resultados experimentales 1991-92* (pp. 12-16). INIA.  
<http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/4134/1/Mejoramientos-Extensivos-Fundamentos.pdf>

- Carámbula, M., Carriquiry, E., & Ayala, W. (1994). *Mejoramientos de campo con lotus subbiflorus cv El Rincón*. INIA.  
<http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/2743/1/111219240807155712.pdf>
- Castillo, A. (2012). *Generación de híbridos interespecíficos de L. uliginosus x L. corniculatus y evaluación de la respuesta a déficit hídrico* [Disertación doctoral, Universidad de la República]. Colibri.  
<https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/3933/1/uy24-16039.pdf>
- Chovanec, P., Hovorka, O., & Novák, K. (2008). Visualization of symbiotic tissue in intact root nodules of *Vicia tetrasperma* using GFP-marked *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae. *Folia Microbiologica (Praha)*, 53(2), 139-146.  
<https://doi.org/10.1007/s12223-008-0020-3>
- De Bruijn, F. (1992). Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 58(7), 2180-2187. <https://doi.org/10.1128/aem.58.7.2180-2187.1992>
- De Souza, G., Silveira, F., Mederos, A., Reyno, R., Rebuffo, M., Rey, J., & Rey, D. (2018). Desarrollando más capacidades: Determinación de taninos condensados en pasturas. *Revista INIA*, (54), 28-31.  
<http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/13640/1/revista-INIA-54-setiembre-2018p.pdf>
- Díaz Gadea, P. (2011). *Asimilación de amonio y acumulación de osmolitos nitrogenados en condiciones de déficit hídrico en la leguminosa modelo Lotus japonicus* [Disertación doctoral, Universidad de la República]. Colibri. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/4133>
- Dirección General de Servicios Agrícolas. (2017). *Colección nacional de cepas de rizobios de Uruguay (CNCRU)*. MGAP.

- Dutto, P. (2002). Recomendaciones para situaciones con problemas: Inoculación de Leguminosas. *Revista del Plan Agropecuario*, (102), 54-57.  
[https://www.planagropecuario.org.uy/publicaciones/revista/R102/R102\\_54.pdf](https://www.planagropecuario.org.uy/publicaciones/revista/R102/R102_54.pdf)
- Fernández, M., De María, N., & De Felipe, M. (2002). Fijación biológica de nitrógeno: Factores limitantes. En F. Valladares (Ed.), *Ciencia y medio ambiente: Segundas jornadas científicas sobre medio ambiente del CCMA-CSIC* (pp. 195-202). CCMA; CSIC.  
<https://digital.csic.es/bitstream/10261/128283/1/Fijaci%c3%b3n%20Bio%20c3%b3gica391%28MC%20F%20Pascual%29.pdf>
- Gaunt, M. W., Turner, S. L., Rigottier-Gois, L., Lloyd-Macgilp, S. A., & Young, J. P. W. (2001). Phylogenies of atpD and recA support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(6), 2037-2048.  
<https://doi.org/10.1099/00207713-51-6-2037>
- Glaeser, S. P., & Kämpfer, P. (2015). Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. *Systematic and Applied Microbiology*, 38(4), 237-245. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.03.007>
- Gutiérrez, P. (2017). *Evaluación de rizobios para el desarrollo de un inoculante eficiente y competitivo de Trifolium repens* [Tesis de Maestría]. Universidad de la República.
- Gutiérrez, P., Sanjuán, J., & Monza, J. (2019). Selección de cepas eficientes por competitividad. En J. Monza (Ed.), *Evaluación de cepas nativas para el desarrollo de un inoculante rizobiano competitivo y eficiente en trébol blanco enfocado a suelos con poblaciones de rizobios parásitos* (pp. 9-17). INIA.
- Hidalgo-García, A., Torres, M. J., Salas, A., Bedmar, E. J., Girard, L., & Delgado, M. J. (2019). *Rhizobium etli* produces nitrous oxide by coupling the assimilatory and denitrification pathways. *Frontiers in Microbiology*, 10, Artículo e980. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00980>

- Howieson, J. G., & Dilworth, M. J. (Eds.). (2016). *Working with rhizobia*. Australian Centre for International Agricultural Research. [https://www.aciar.gov.au/sites/default/files/legacy/aciar\\_mn\\_173\\_web-updated\\_31\\_may\\_2016.pdf](https://www.aciar.gov.au/sites/default/files/legacy/aciar_mn_173_web-updated_31_may_2016.pdf)
- Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. (s.f.). *Lotus angustissimus*. <https://pasturas.inia.org.uy/catalogo/index.php?id=149>
- Irisarri, P., Cardozo, G., Tartaglia, C., Reyno, R., Gutiérrez, P., Lattanzi, F. A., Rebuffo, M., & Monza, J. (2019). Selection of competitive and efficient rhizobia strains for white clover. *Frontiers in Microbiology*, 10(768), Artículo e768. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00768>
- Irisarri, P., Milnitsky, F., Monza, J., & Bedmar, E. J. (1996). Characterization of rhizobia nodulating *Lotus subbiflorus* from Uruguayan soils. *Plant and Soil*, 180(1), 39-47. <https://doi.org/10.1007/BF00015409>
- Labandera, C. A. (2004). *Enfoque rizobiológico para mejorar la performance de leguminosas forrajeras promisorias para zonas ganaderas, con énfasis en la región de basalto*. INIA.
- Labandera, C. A., Baraibar, A., & Milian, A. (1982). Tecnología de *Rhizobium*. *Revista del Plan Agropecuario*, (3), 11-17.
- Laguerre, G., Nour, S. M., Macheret, V., Sanjuan, J., Drouin, P., & Amarger, N. (2001). Classification of rhizobia based on nodC and nifH gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology*, 147(4), 981-993. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-4-981>
- Lindström, K., & Mousavi, S. A. (2019). Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbial Biotechnology*, 13(5), 1314-1335. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13517>
- Lorite, M. J., Estrella, M. J., Escaray, F., Sannazaro, A., Videira e Castro, I. M., Monza, J., Sanjuán, J., & León-Barrios, M. (2018). The rhizobia-lotus symbioses: Deeply specific and widely diverse. *Frontiers in Microbiology*, 9, Artículo e2055. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02055>

- Lussich, F. (2020). *Variabilidad de la fijación biológica de nitrógeno de leguminosas forrajeras en uruguay: Posibles causas y consecuencias nutricionales* [Trabajo final de grado, Universidad de la República]. Colibri.  
<https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/29848>
- Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (1999). *Brock: Biología de los microorganismos* (8<sup>a</sup> ed.). Prentice Hall.
- Mallarino, A. P., Wedin, W. F., Goyenola, R. S., Perdomo, C. H., & West, C. P. (1990). Legume species and proportion effects on symbiotic dinitrogen fixation in legume-grass mixtures. *Agronomy Journal*, 82(4), 785-789.  
<https://doi.org/10.2134/agronj1990.00021962008200040026x>
- Martínez-Romero, E., & Caballero-Mellado, J. (1996). Rhizobium phylogenies and bacterial genetic diversity. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 15(2), 113-140. <https://doi.org/10.1080/07352689.1996.10393183>
- Mas, C., Carámbula, M., Bermúdez, R., Ayala, W., & Carriquiry, E. (1992). *Mejoramientos extensivos en la región este*. INIA.  
<http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/4130/1/Mejoramientos-Extensivos-en-la-Region-Este-1992.pdf>
- Mederos, M. (2016). *Evaluación de la eficiencia simbiótica de híbridos interespecíficos de Lotus uliginosus x Lotus corniculatus* [Tesis de grado, Universidad de la República]. Colibri.  
<https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/19702>
- Mendoza Suárez, M. A., Geddesa, B. A., Sánchez Cañizaresa, C., Ramírez González, R. H., Kirchhellea, C., Jorrina, B., & Poolea, P. S. (2020) Optimizing Rhizobium-legume symbioses by simultaneous measurement of rhizobial competitiveness and N<sub>2</sub> fixation in nodules. *Agricultural Sciences*, 117(18), 9822-9831. <https://doi.org/10.1073/pnas.1921225117>
- Menna, P., Gomes Barcellos, F., & Hungría, M. (2009). Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of Bradyrhizobium strains based on multilocus sequence analysis of the 16S rRNA gene, ITS region and glnII, recA, atpD

and dnaK genes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(12), 2934-2950. <https://doi.org/10.1099/ijss.0.009779-0>

- Miller, J. H. (1972). *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Monza, J., Fabiano, E., & Arias, A. (1992). Characterization of and indigenous population of rhizobia nodulating *Lotus corniculatus*. *Soil Biology Biochemistry*, 24(3), 241-247. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(92\)90225-M](https://doi.org/10.1016/0038-0717(92)90225-M)
- Monza, J., Irisarri, P., Díaz, P., Delgado, M. J., Mesa, S., & Bedmar, E. (2006). Denitrification ability of rhizobial strains isolated from *Lotus* sp. *Antonie van Leeuwenhoek*, 89, 479-484. <https://doi.org/10.1007/s10482-005-9046-6>
- Monza, J., & Palacios, J. (2004). Fijación biológica de nitrógeno en la simbiosis rizobio-leguminosa. En J. Monza & A. Márquez (Coords.), *El metabolismo del nitrógeno en las plantas* (pp. 15-38). Almuzara.
- Muttoni Pastorino, G. (2008). *Evaluación bioquímica y fisiológica de poblaciones de Lotus corniculatus L. sensibles y tolerantes a sequía* [Tesis de grado, Universidad de la República]. Colibri. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/27731>
- Newton, W. E. (2007). Physiology, biochemistry, and molecular biology of nitrogen fixation. En H. Bothe, S. J. Ferguson & W. E. Newton (Eds.), *Biology of the nitrogen Cycle* (pp. 109-129). Elsevier.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (1995). *Manual técnico de la fijación simbiótica del nitrógeno: Leguminosa/Rhizobium* (2ª ed.). [https://books.google.co.ve/books?id=Lcf6ZUeOvdAC&hl=es&source=gbs\\_navlinks\\_s](https://books.google.co.ve/books?id=Lcf6ZUeOvdAC&hl=es&source=gbs_navlinks_s)
- Porcile, V., Reyno, R., Maranges, F., Nolla, F., Becoña, G., De Brum, F., Llovet, P., Gutiérrez, F., Baraibar, N., Lattanzi, F., Sotelo, D., & Rossi, C. (2021). ¿Conocemos los materiales forrajeros generados por la investigación uruguaya en los últimos años?: Informe especial. *Revista INIA*, (66),

68-77. <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/16011/1/Revista-INIA-66-Setiembre-2021-18.pdf>

- Raina, V., Nayak, T., Ray, L., Kumari, K., & Suar, M. (2019). A polyphasic taxonomic approach for designation and description of novel microbial species. En S. Das & H. R. Dash (Eds.), *Microbial diversity in the genomic era* (pp. 137-152). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814849-5.00009-5>
- Ramsay, J. P., & Ronson, C. W. (2015). Genetic regulation of symbiosis island transfer in *Mesorhizobium loti*. En F. J. de Bruijn (Ed.), *Biological nitrogen fixation* (pp. 219-223). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781119053095.ch21>
- Rebuffo, M., Bemhaja, M., & Risso, D. (2006). Utilization of forage legumes in pastoral systems: State of art in Uruguay. *Lotus Newsletter*, 36(1), 22-33. <http://www.inia.org.uy/sitios/lnl/vol36/rebuffo.pdf>
- Rees, R. M., Augustin, J., Alberti, G., Ball, B. C., Boeckx, P., Cantarel, A., Castaldi, S., Chirinda, N., Chojnicki, B., Giebels, M., Gordon, H., Grosz, B., Horvath, L., Juszczak, R., Klemedtsson, A. K., Klemedtsson, L., Medinets, S., Machon, A., Mapanda, F., ... Wuta, M. (2013). Nitrous oxide emissions from European agriculture – an analysis of variability and drivers of emissions from field experiments. *Biogeosciences*, 10(4), 2671-2682. <https://doi.org/10.5194/bg-10-2671-2013>
- Rigaud, J., & Puppo, A. (1977). Effect of the nitrite upon leghemoglobin and interaction with nitrogen fixation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 497(3), 702-706. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(77\)90291-4](https://doi.org/10.1016/0304-4165(77)90291-4)
- Rimoldi, A., & Suberbié, A. (2018). *Evaluación del banco de semillas de Lotus angustissimus cv INIA Basalto, bajo diferentes densidades de siembra y niveles productivos* [Trabajo final de grado]. Universidad de la Empresa.
- Risso, D., & Carámbula, M. (1998). *Lotus El Rincón: Producción y utilización de los mejoramientos*. INIA. <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/6412/1/bd-65-1998.pdf>



- Rivas, R., Velázquez, E., Valverde, A., Mateos, P. F., & Martínez-Molina, E. (2001). A two primers random amplified polymorphic DNA procedure to obtain polymerase chain reaction fingerprints of bacterial species. *Electrophoresis*, 22(2), 1086-1089. [https://doi.org/10.1002/1522-2683\(200102\)22:6<1086::AID-ELPS1086>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/1522-2683(200102)22:6<1086::AID-ELPS1086>3.0.CO;2-6)
- Sadowsky, M., & Graham, P. (1998). Soil biology of the Rhizobiaceae. En H. P. Spink, A. Kondorosi & P. J. J. Hooykaas (Eds.), *The Rhizobiaceae* (pp. 155-172). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-5060-6\\_8](https://doi.org/10.1007/978-94-011-5060-6_8)
- Sánchez, C., Itakura, M., Mitsui, H., & Minamisawa, K. (2013). Linked expressions of nap and nos genes in a Bradyrhizobium japonicum mutant with increased N<sub>2</sub>O reductase activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(13), 4178-4180. <https://doi.org/10.1128/AEM.00703-13>
- Serenato Klepa, M., Ferraz Helene, L. C., O'Hara, G., & Hungria, M. (2022). *Bradyrhizobium cenepequi* sp. nov., *Bradyrhizobium semiaridum* sp. nov., *Bradyrhizobium hereditatis* sp. nov. and *Bradyrhizobium australafricanum* sp. nov., symbionts of different leguminous plants of Western Australia and South Africa and definition of three novel symbiovars. *Microbiology Society*, 72(7), Artículo e5446. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005446>
- Sessitsch, A., Hardarson, G., de Vos, W. M., & Wilson, K. J. (1998). Use of marker genes in competition studies of *Rhizobium*. En G. Hardarson & W. J. Broughton (Eds.), *Molecular microbial ecology of the soil: Results from an FAO/IAEA co-ordinated research programme, 1992–1996* (pp. 35-45). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-2321-3\\_3](https://doi.org/10.1007/978-94-017-2321-3_3)
- Siri, G., & Ernst, O. (2010). *Manejo del suelo y rotación con pasturas: Efecto sobre la calidad del suelo, el rendimiento de los cultivos y el uso de insumos*. Sitio Argentino de Producción Animal. [https://www.produccion-animal.com.ar/suelos\\_ganaderos/78-manejo\\_rotacion.pdf](https://www.produccion-animal.com.ar/suelos_ganaderos/78-manejo_rotacion.pdf)
- Soca, P., Henry, A., & Pereira, G. (2001). Utilización de mejoramientos de campo natural con *Lotus subbiflorus* cv: El Rincón en sistemas ganaderos de la región Este: Resultados físicos. *Cangué*, (22), 18-20. [http://www.eemac.edu.uy/cangué/joomdocs/Cangué\\_22/18-20.pdf](http://www.eemac.edu.uy/cangué/joomdocs/Cangué_22/18-20.pdf)

- Sotelo, M., Irisarri, P., Lorite, M. J., Casaretto, E., Rebuffo, M., Sanjuán, J., & Monza, J. (2011). Diversity of rhizobia nodulating *Lotus corniculatus* grown in northern and southern regions of Uruguay. *Applied Soil Ecology*, 49, 197-207. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.05.005>
- Tartaglia, C., Azziz, G., Lorite, M. J., Sanjuán, J., & Monza, J. (2019). Phylogenetic relationships among introduced and autochthonous rhizobia nodulating *Trifolium* spp. in Uruguayan soils. *Applied Soil Ecology*, 139, 40-46. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.03.014>
- Vincent, J. M. (1970). *A manual for the practical study of root-nodule bacteria*. Blackwell Scientific.
- Vinuesa, P., Silva, C., Werner, D., & Martínez-Romero, E. (2005). Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: The roles of migration and recombination in Bradyrhizobium species cohesion and delineation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 34(1), 29-54. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2004.08.020>
- Wilson, K., Sessitsch, A., Corbo, J., Giller, K., Akkermans, A., & Jefferson, R. (1995).  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other Gram-negative bacteria. *Microbiology*, 141(7), 1691-1705. <https://doi.org/10.1099/13500872-141-7-1691>
- Zanoniani, R., & Ducamp, F. (2004). Leguminosas forrajeras del género *Lotus* en el Uruguay. *Cangué*, (25), 5-11. [http://www.eemac.edu.uy/cangué/joomdocs/Cangué\\_25/5-11.pdf](http://www.eemac.edu.uy/cangué/joomdocs/Cangué_25/5-11.pdf)