

## 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

FEBRERO 2019

SERIE  
FPTA-INIA

79

**“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”**

**FPTA - 295**

**Responsable del proyecto:**

Jorge Monza \*

**Institución ejecutora:**

UdelaR / Facultad de Agronomía

**Título:** “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”

**Período de ejecución:** Abril 2014 – Junio 2018

**Responsable técnico del proyecto:** Jorge Monza

**Institución ejecutora:** UdelaR / Facultad de Agronomía

**Serie:** FPTA N° 79

**ISBN:** 978-9974-38-418-7

© 2019, INIA

Editado por la Unidad de Comunicación y Transferencia de Tecnología de INIA  
Andes 1365, Piso 12. Montevideo, Uruguay  
<http://www.inia.uy>

Quedan reservados todos los derechos de la presente edición. Este libro no se podrá reproducir total o parcialmente sin expreso consentimiento del INIA.

# Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria

---

## Integración de la Junta Directiva

**D.M.T.V., Ph.D. José Luis Repetto** - Presidente

**Ing. Agr., Mag. Mariana Hill** - Vicepresidenta



**Ing. Agr. Jaime Gomes de Freitas**

**Ing. Agr. Jorge Peñagaricano**



**Ing. Agr. Pablo Gorriti**

**Ing. Agr. Alberto Bozzo**





## FONDO DE PROMOCIÓN DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA

El Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria (FPTA) fue instituido por el artículo 18° de la ley 16.065 (ley de creación del INIA), con el destino de financiar proyectos especiales de investigación tecnológica relativos al sector agropecuario del Uruguay, no previstos en los planes del Instituto.

El FPTA se integra con la afectación preceptiva del 10% de los recursos del INIA provenientes del financiamiento básico (adicional del 4o/oo del Impuesto a la Enajenación de Bienes Agropecuarios y contrapartida del Estado), con aportes voluntarios que efectúen los productores u otras instituciones, y con los fondos provenientes de financiamiento externo con tal fin.

EL FPTA es un instrumento para financiar la ejecución de proyectos de investigación en forma conjunta entre INIA y otras organizaciones nacionales o internacionales, y una herramienta para coordinar las políticas tecnológicas nacionales para el agro.

Los proyectos a ser financiados por el FPTA pueden surgir de propuestas presentadas por:

- a) los productores agropecuarios, beneficiarios finales de la investigación, o por sus instituciones.
- b) por instituciones nacionales o internacionales ejecutoras de la investigación, de acuerdo a temas definidos por sí o en acuerdo con INIA.
- c) por consultoras privadas, organizaciones no gubernamentales o cualquier otro organismo con capacidad para ejecutar la investigación propuesta.

En todos los casos, la Junta Directiva del INIA decide la aplicación de recursos del FPTA para financiar proyectos, de acuerdo a su potencial contribución al desarrollo del sector agropecuario nacional y del acervo científico y tecnológico relativo a la investigación agropecuaria.

El INIA a través de su Junta Directiva y de sus técnicos especializados en las diferentes áreas de investigación, asesora y facilita la presentación de proyectos a los potenciales interesados. Las políticas y procedimientos para la presentación de proyectos son fijados periódicamente y hechos públicos a través de una amplia gama de medios de comunicación.

El FPTA es un instrumento para profundizar las vinculaciones tecnológicas con instituciones públicas y privadas, a los efectos de llevar a cabo proyectos conjuntos.

De esta manera, se busca potenciar el uso de capacidades técnicas y de infraestructura instalada, lo que resulta en un mejor aprovechamiento de los recursos nacionales para resolver problemas tecnológicos del sector agropecuario.

El Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria contribuye de esta manera a la consolidación de un sistema integrado de investigación agropecuaria para el Uruguay.

A través del Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria (FPTA), INIA ha financiado numerosos proyectos de investigación agropecuaria a distintas instituciones nacionales e internacionales. Muchos de estos proyectos han producido resultados que se integran a las recomendaciones tecnológicas que realiza la institución por sus medios habituales.

En esta serie de publicaciones, se han seleccionado los proyectos cuyos resultados se considera contribuyen al desarrollo del sector agropecuario nacional. Su relevancia, el potencial impacto de sus conclusiones y recomendaciones, y su aporte al conocimiento científico y tecnológico nacional e internacional, hacen necesaria la amplia difusión de estos resultados, objetivo al cual se pretende contribuir con esta publicación.



## Índice general

<b>Capítulo 1. Selección de cepas eficientes por competitividad</b> .....	9
1. Rizobios nativos - naturalizados que nodulan trébol .....	9
1.1 Estrategia y metodología .....	10
1.2 Resultados .....	10
2. Competitividad de las cepas eficientes N2, N5 y 249 en diferentes suelos .....	11
2.1 Estrategia y metodología .....	11
2.2 Resultados .....	13
2.2.1 Cantidad de rizobios que nodulan trébol en los distintos suelos .....	13
2.2.2 Competitividad de las cepas eficientes en distintos suelos .....	13
2.2.3 Eficiencia de las cepas en otros tréboles de uso agronómico .....	15
3. Bibliografía .....	16
<b>Capítulo 2. Evaluación en campo de las cepas promisorias como inoculantes</b> .....	19
1. Criterios para evaluar las cepas en campo .....	19
2. Estrategia y metodología .....	19
3. Resultados .....	20
3.1 Implantación y competitividad de la cepa 317 en la UEPP .....	20
3.2 Evaluación de las cepas N2, 249 y 317 en Glencoe y en la UEPP .....	21
3.2.1 Implantación .....	21
3.2.2 Ocupación de nódulos por los inoculantes y cepas del suelo .....	22
3.2.3 Producción de biomasa .....	23
3.2.4 Biomasa acumulada en diferentes órganos de trébol blanco .....	24
3.2.5 Nitrógeno proveniente de la fijación .....	25
4. Bibliografía .....	26
<b>Capítulo 3. Ocupación de nódulos por el inoculante en semillas preinoculadas</b> .....	27
1. Inoculación de leguminosas forrajeras en Uruguay .....	27
2. Preinoculación de semillas de trébol .....	27
2.1 Estrategia .....	28
2.2 Resultados .....	28
2.3 Ensayo 1: Semillas sembradas 30 días después de preinoculadas .....	28
2.3.1 La Estanzuela .....	28
2.3.2 Tacuarembó .....	29
2.4 Ensayo 2: Semillas sembradas 15 días después de preinoculadas .....	29
2.4.1 La Estanzuela .....	29
2.4.2 Glencoe .....	29
3. Bibliografía .....	32
<b>Capítulo 4. Caracterización de rizobios que nodulan <i>Trifolium polymorphum</i></b> .....	
1. Diversidad y eficiencia simbiótica de rizobios que nodulan <i>Trifolium polymorphum</i> .....	33
1.1 Estrategia .....	33
1.2 Resultados .....	34
1.2.1 Generación de una colección de aislamientos de <i>Trifolium polymorphum</i> .....	34
1.2.2 Eficiencia simbiótica y nodulación de cepas aisladas de <i>T. polymorphum</i> en <i>T. repens</i> .....	36
1.2.3 Eficiencia simbiótica y nodulación de aislamientos de <i>T. polymorphum</i> en ese hospedero .....	38
1.2.4 Competitividad en <i>T. repens</i> de la cepa ineficiente P3 vs. cepas eficientes .....	39



2. Respuesta de la planta frente a la infección por cepas ineficientes – parásitas .....	39
2.1 Estrategia .....	40
2.2 Resultados .....	40
2.2.1 Anatomía de nódulos de <i>T. repens</i> inducidos por cepas aisladas de <i>T. polymorphum</i> .....	40
2.2.2 Respuesta de la planta medida por la producción de ROS .....	41
3. Bibliografía .....	44

**Capítulo 5. Relaciones filogenéticas de rizobios que nodulan tréboles presentes en suelos de Uruguay** .....

1. Rizobios que nodulan tréboles en suelos de Uruguay .....	47
2. Estrategia .....	47
3. Resultados .....	48
3.1 Análisis de las secuencias del gen 16S rRNA y del ITS 16S-23S rRNA .....	48
3.2 Relaciones filogenéticas a través de secuencias de los genes <i>atpD</i> , <i>glnII</i> , <i>recA</i> y <i>rpoB</i> .....	50
3.2.1 Filogenia basada en el gen <i>atpD</i> .....	50
3.2.2 Filogenia basada en el gen <i>glnII</i> .....	52
3.2.3 Filogenia basada en el gen <i>recA</i> .....	53
3.2.4 Filogenia basada en el gen <i>rpoB</i> .....	53
3.2.5 Comparación de secuencias del conjunto de genes <i>housekeeping</i> .....	55
3.4 Relaciones filogenéticas basadas en secuencias de genes simbióticos .....	58
4. Bibliografía .....	58

Gutiérrez P.<sup>1</sup>, Sanjuán J.<sup>2</sup> y Monza J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Uruguay.

<sup>2</sup> Laboratorio de Sistemas Simbióticos, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, España.

## Capítulo 1. Selección de cepas eficientes por competitividad

FPTA 295

Período de ejecución:

Abril 2014 – Junio 2018

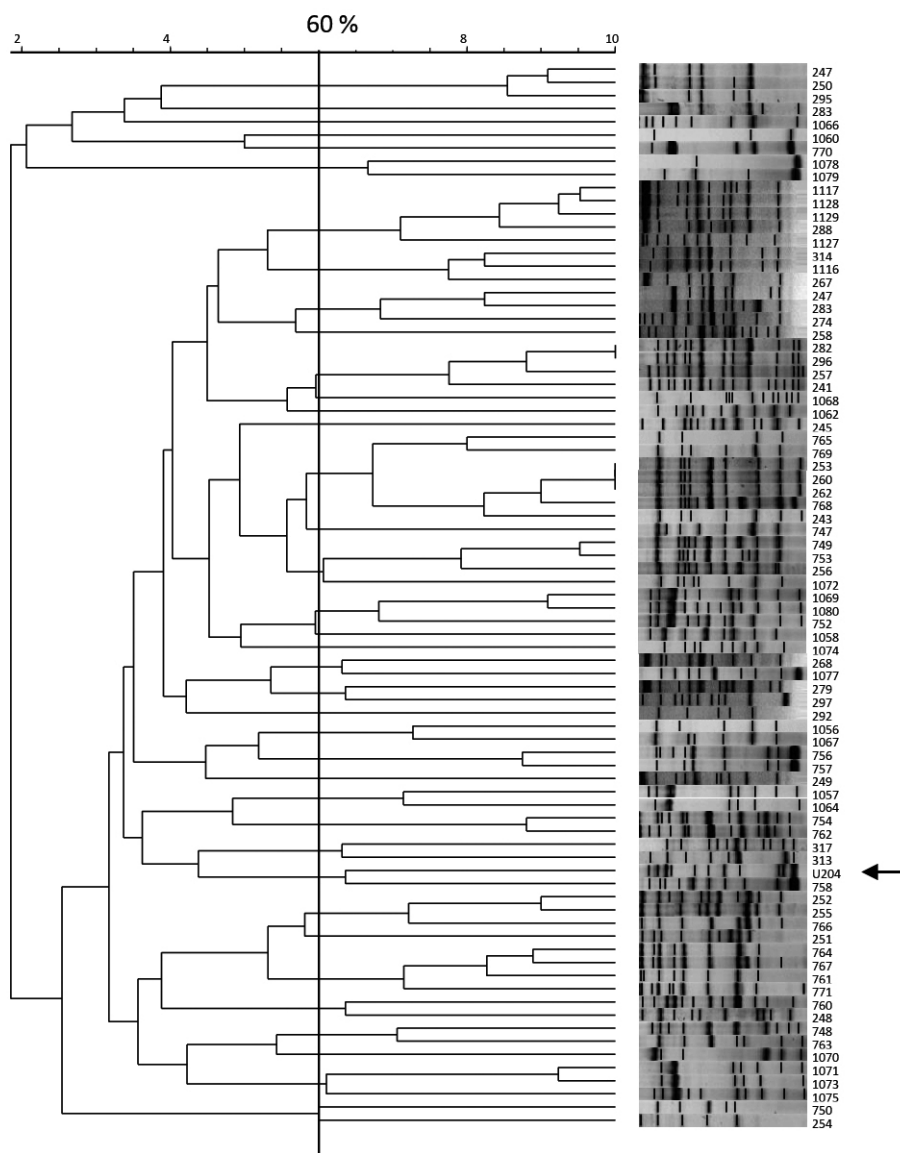
### 1. Rizobios nativos - naturalizados que nodulan trébol

Para desarrollar inoculantes rizobianos a partir de cepas nativas-naturalizadas, el primer paso es establecer la diversidad genética de las poblaciones, debido a que son la base para la selección. De esta forma, la diversidad de rizobios nativos – naturalizados constituyen una fuente sostenible de cepas que pueden ser usadas para desarrollar inoculantes comerciales (Lindström *et al.*, 2010), con la ventaja de partir de material adaptado a condiciones locales. Por otra parte, una diversidad amplia se considera un indicador de la salud del suelo y de la productividad (Kaschuk *et al.*, 2006) y puede contribuir con la fijación biológica de N (FBN) en condiciones ambientales estresantes (Loreau *et al.*, 2001).

Por estas razones, en el proyecto FONTAGRO FTG-787 (2006-2009) el Laboratorio de Bioquímica de Facultad de Agronomía y el grupo de Mejoramiento Genético de Especies Forrajeras de INIA La

Estanzuela se generó una colección de rizobios aislados de nódulos de *Trifolium pratense* de praderas de un año, en sitios con y sin historia de trébol. De esa colección se caracterizaron 80 aislamientos provenientes de Colonia, San José y Paysandú (Batista, 2013) y 84 aislamientos de Colonia y San José (Hernández, 2012).

Los aislamientos se identificaron según sus perfiles ERIC (Fig. 1) y cuando la similitud entre ellos era igual o mayor al 60% se consideraron la misma cepa. Con este criterio Batista *et al.* (2015) identificaron 38 perfiles genómicos únicos (48% de diversidad) y Hernández (2012) 21 perfiles genómicos únicos (25% de diversidad). La cepa U204 (= U28 MGAP, = CIAT 2455) de *Rhizobium leguminosarum* sv *trifolii* introducida de Estados Unidos, se usa como inoculante comercial para trébol rojo y trébol blanco desde el año 1967 (MGAP, 2008) y entre los 80 perfiles analizados por Batista (2013), solo uno muestra el mismo perfil que el del inoculante comercial.



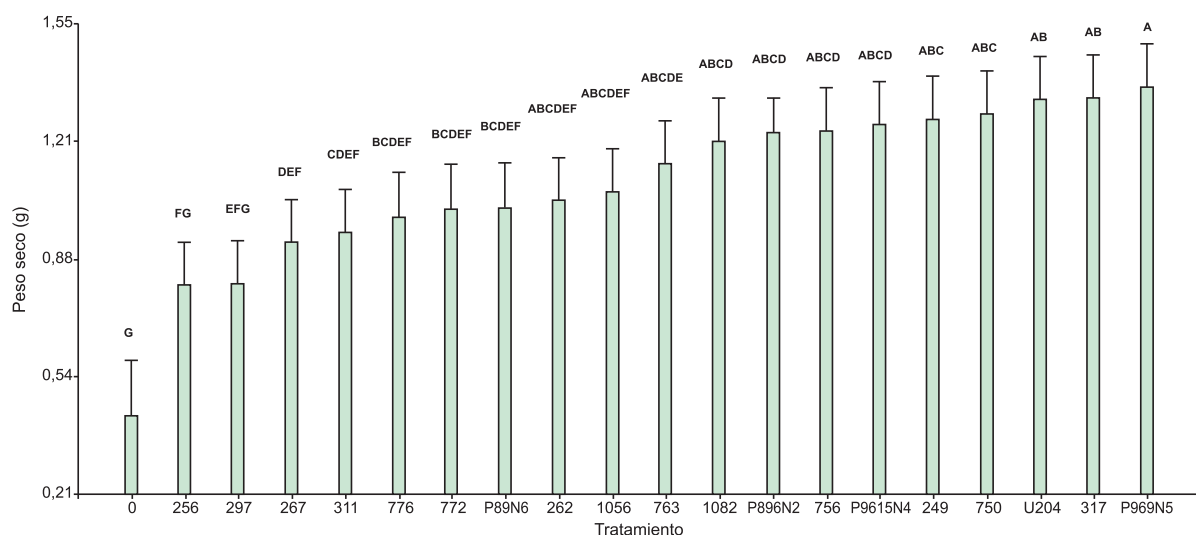
**Figura 1.** Dendrograma derivado del análisis de los perfiles ERIC de los 80 aislados y la cepa U204. Se consideraron perfiles iguales cuando la semejanza fue igual o mayor al 60%. La flecha indica el perfil de la cepa U204. Tomado de Batista (2013).

## 1.1 Estrategia y metodología

Se partió de la colección de cepas que nodulan trébol rojo, y las 18 cepas más eficientes en esa leguminosa se evaluaron en trébol blanco (*Trifolium repens* cv Zapicán). Las semillas inoculadas se sembraron en macetas con arena-vermiculita y las plantas crecieron en cámara de crecimiento en condiciones controladas (Gutiérrez, 2017). Se realizaron 5 repeticiones por cada tratamiento y la biomasa aérea se estimó en dos cortes, realizados a los 30 y 60 días después de la siembra. Los resultados se analizaron con un modelo lineal general mixto.

## 1.2 Resultados

La biomasa vegetal acumulada en dos cortes evidenció que 14 de las 18 cepas eficientes en trébol rojo (Batista, 2013) tuvieron en trébol blanco la misma eficiencia simbiótica que la cepa U204 (Fig. 2). Las cepas N2, N5, 249 se seleccionaron para evaluar su competencia frente a rizobios presentes en suelos definidos como problema para trébol blanco. La cepa 317 había sido evaluada por Batista *et al.* (2015) en un suelo de La Estanzuela con historia de trébol, y en Glencoe donde hay cepas no fijadoras, consideradas parásitas para trébol (Labandera y Vincent, 1975; Yates *et al.*, 2003).



**Figura 2.** Eficiencia simbiótica de cepas promisorias en trébol blanco. Se representa la media del peso seco aéreo acumulado en dos cortes (30 y 60 días después de la siembra). Se incluyó al inoculante comercial, cepa U204 y un control sin inocular (0). Cada tratamiento tuvo 5 repeticiones y los datos se analizaron con un modelo lineal general mixto. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos (LSD Fisher  $p < 0,05$ ).

## 2. Competitividad de las cepas eficientes N2, N5 y 249 en diferentes suelos

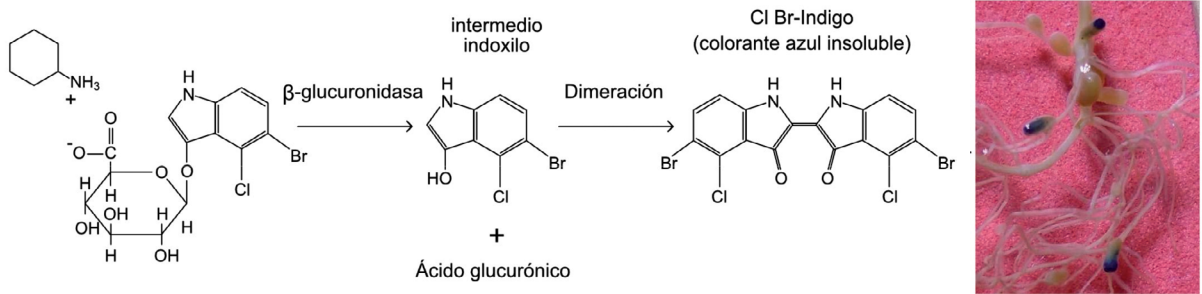
En la selección de rizobios para el desarrollo de inoculantes, el criterio de competitividad ha sido difícil de establecer debido a que son necesarias técnicas de identificación precisas que se puedan aplicar a un gran número de muestras, y en condiciones de selección cercanas a la situación de campo. Esto ha llevado a que en la selección de cepas predomine el criterio de eficiencia simbiótica. Pero si la cepa es poco competitiva no ocupará la cantidad de nódulos deseable, y si no es persistente tampoco ocupará nódulos en las plantas que surgen del estolón o de la resiembra.

En diferentes pares simbióticos la fijación biológica de nitrógeno parece estar en su límite superior, de manera que su mejora no podría lograrse sólo a través de cepas más eficientes, sino con cepas que ocupen mayor número de nódulos. En diferentes leguminosas se ha demostrado que las cepas indígenas ocupan el mayor número de nódulos respecto a cepas foráneas usadas como inoculante (Batista *et al.*, 2015; Gutiérrez, 2017; Denton *et al.*, 2002). Debido a esto, seleccionar entre las cepas nativas eficientes las más competitivas puede mejorar la producción, y en esto se basó el proyecto FPTA-295.

Actualmente las técnicas moleculares aplicadas en investigación básica se han hecho accesibles y permiten la identificación precisa de las cepas con un costo razonable. Una de estas técnicas es la amplificación de ADN mediante PCR usando diferentes *primers* como ERIC, BOX, CER, etc. (Schneider y de Bruijn, 1996). Mediante esta técnica se genera un perfil o patrón (*fingerprint*) exclusivo para cada cepa, lo que permite identificarlas de forma confiable, a diferencia de otras técnicas como la resistencia a antibióticos y serología. También el uso de genes delatores o reporteros, como *gusA*, permiten establecer la competitividad de manera precisa y rápida en gran cantidad de nódulos. Esta estrategia ha sido usada para evaluar competencia en diferentes suelos en condiciones controladas (Batista *et al.*, 2015; Gutiérrez, 2017; Denton *et al.*, 2003).

### 2.1 Estrategia y metodología

Para estudios de competencia es útil introducir en el genoma bacteriano reporteros como el gen *gusA* o *ceIB* (Sessitsch *et al.* 1998), lo que permite identificar la presencia de la bacteria mediante un sencillo ensayo de tinción histoquímica. El gen *gusA* codifica para la enzima  $\beta$ -glucuronidasa que escinde al sustrato X-Gluc (5-bromo-6-cloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucurónido) en ácido glucurónico y cloro-bromoindigo, que se dimeriza para producir dicloro-dibromoindigo, un precipitado azul insoluble. La reacción se resume a continuación.



Para determinar la competitividad, las cepas eficientes N2, N5, 249 y 317 se marcaron con el gen delator *gusA* por conjugación biparental con *E. coli* S17<sup>-1</sup>  $\lambda$ -*pir* que lleva el plásmido pCAM130::Tn5SS*gusA*31 (Wilson *et al.* 1995). Los transformantes N2::*gusA*, N5::*gusA*, 249::*gusA* (Gutiérrez, 2017), 317::*gusA* y U204::*gusA* (Batista *et al.* 2014) se compararon con sus parentales en relación a la cinética de nodulación y número total de nódulos inducidos, para verificar que esas características se conservan iguales después de la inserción del gen *gusA*. Con las cepas marcadas se prepararon inoculantes en turba con la cantidad de rizobios requerida por el MGAP (superior a 2,0 x 10<sup>9</sup> ufc por g de turba). Las semillas se inocularon según las recomendaciones del fabricante y se sembraron en cilindros con los suelos colectados con mínimos disturbios (Fig. 3). Antes de sembrar las semillas inoculadas, se determinó el NMP

(Número Más Probable) de rizobios capaces de nodular trébol blanco en cada suelo. Las plantas crecieron en condiciones controladas a 24°C con 16 h de luz (Fig. 3) y a los 65 días se levantó el ensayo para analizar la ocupación de los nódulos. Para ello, los nódulos fueron incubados en presencia del compuesto X-Gluc, sustrato de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa (Batista *et al.*, 2013). De esta forma, los nódulos ocupados por la cepa marcada adquieren una coloración azul, que los diferencia de manera inequívoca de los ocupados por los rizobios del suelo (Fig. 3).

Las cepas promisorias se evaluaron en tréboles los de uso agronómico *T. resupinatum* *T. alexandrinum* y *T. vesiculosum*. El carácter Fix +/- se determinó como la biomasa aérea producida en sistema arena:verminulita a los 45 días. Como controles se usaron el tratamiento sin inocular y el inoculado con la cepa U204 y sin inocular.



**Figura 3.** Competitividad en diferentes suelos con cepas marcadas. A. Cilindros con suelos problema (Basalto, Cristalino central, Brunosoles del Noreste y Areniscas) en los que se sembraron las semillas inoculadas con la cepas marcadas, con 5 repeticiones por suelo. B. Raíces de plantas inoculadas con U204::*gusA*. Los nódulos azules están ocupados por la cepa marcada y los blancos por cepas presentes en el suelo.



## 2.2 Resultados

### 2.2.1 Cantidad de rizobios que nodulan trébol en los distintos suelos

En los suelos analizados el número de rizobios antes de la siembra se situó entre 0,5 y 350 rizobios por gramo de suelo. En la UEPP en un suelo con historia de trébol, el número de rizobios fue 22 veces mayor que en suelo sin historia de trébol, 350 y 16 rizobios/g de suelo respectivamente. En Basalto, Cristalino central, Brunosoles del Noreste y Areniscas no hubo diferencias en el número de rizobios según la historia de trébol blanco. En los suelos con historia de trébol inoculado (CH) y sin historia de trébol inoculado (SH) el número de rizobios fue similar en todos ellos, a excepción del suelo CH en la UEPP, que fue superior al resto (Cuadro 1).

Batista *et al.* (2014) analizaron el NMP de rizobios en tres suelos, usando trébol rojo como hospedero. En La Estanzuela, con 47 años de historia de inoculación de tréboles, se obtuvieron  $5,1 \times 10^4$  rizobios/g de suelo, probablemente porque la historia de inoculación condujo al establecimiento de poblaciones adaptadas, más persistentes y competitivas que el inoculante comercial. En suelos SH de Tambores y en la UEPP el NMP de rizobios por gramo de suelo fue  $3,2 \times 10^1$  y  $1,9 \times 10^4$  respectivamente. Estos rizobios pueden provenir de *T. polymorphum*, un trébol nativo presente en esos sitios. A pesar de que en la UEPP existe una población de rizobios alta, de igual magnitud que en La Estanzuela, los nódulos inducidos por estas cepas fueron ineficientes, pequeños y verdes, y las plantas presentaron síntomas de deficiencia de N, color amarillento y poco crecimiento. Los mismos síntomas fueron encontrados por Gutiérrez (2017) en plantas de trébol blanco sembradas en los suelos SH de UEPP y CH de Glencoe (Fig. 7).

La cantidad de rizobios presentes en suelo de la UEPP SH fue 1000 veces menor que la encontrada por Batista *et al.* (2014) para rizobios que nodulan trébol rojo para el mismo suelo. Las diferencias pueden deberse a distintas condiciones del suelo en el momento de su colecta, pero también a las

distintas especies de trébol utilizadas (Sprent *et al.*, 2007) y a diferencias metodológicas.

Martyniuk y Oron (2008) en 46 suelos de campo natural en Australia determinaron en 31 de ellos un número alto de *R. leguminosarum* bv *trifolii* (102 y 105 rizobios/g de suelo), en 8 valores bajos (17 y 58 rizobios/g de suelo), en 3 valores muy bajos (6 y 7 rizobios/g de suelo) y en 4 suelos no encontraron rizobios para esa leguminosa. Siguiendo en general este criterio, en Areniscas, Brunosoles, Glencoe y Cristalino central (Cuadro 1) la cantidad de rizobios que nodulan trébol blanco se sitúa entre baja y muy baja (0,5 y 90 rizobios/g de suelo) y solo en la UEPP, un sitio CH, el número de rizobios fue alto.

Para estimar el tamaño de las poblaciones de rizobios presentes en suelo, McDonald *et al.* (2011) determinaron la cantidad de rizobios capaces de nodular trébol blanco por el NMP y por qPCR. La cantidad de rizobios estimada por esta técnica fue mayor que la estimada por el NMP, lo que debe ser tenido en cuenta para mejorar la precisión sobre el tamaño de las poblaciones presentes en suelos. De todas formas, nuestros resultados son comparables entre sí y con otros que usaron el NMP como forma de estimar la cantidad de rizobios.

### 2.2.2 Competitividad de las cepas eficientes en distintos suelos

El marcaje con *gusA* es una estrategia adecuada para determinar la habilidad competitiva de cepas de rizobios en distintos suelos en condiciones controladas (Batista, 2013; Denton *et al.*, 2003). La competitividad se calculó a partir del número de nódulos ocupados por las cepas marcadas con el gen delator (azules) respecto al total nódulos (azules más blancos). En la figura 3 se muestra la ocupación de nódulos por una cepa marcada (U204::*gusA*) y por cepas del suelo.

La ocupación de nódulos por las cepas usadas como inoculantes se analizó en relación a la geología de los suelos (Cuadro 2), a la historia de pradera de trébol (Cuadro 3) y por cada cepa en cada suelo (Cuadro 4).

**Cuadro 1.** Cantidad de rizobios que nodulan trébol blanco en los suelos problema. La cantidad de rizobios se estimó como el número más probable (NMP) en suelos con historia de trébol (CH) y sin historia de trébol (SH). Letras diferentes indican diferencias significativas según Tukey con  $p < 0,05$ .

Sitio		NMP
Lomadas del Este (UEPP)	CH	3,5 X 102 a
	SH	1,6 X 101 cd
Basalto (Glencoe)	CH	7,0 x 101 bc
	SH	4,3 x 101 bcd
Cristalino central (SUL)	CH	8,5 cd
	SH	6,0 cd
Brunosoles del Noreste	CH	9,0 x 101 b
	SH	6,3 x 101 bcd
Areniscas	CH	1,3 d
	SH	0,5 d

La ocupación de nódulos por el conjunto de las cepas promisorias usadas como inoculantes en cada suelo se muestra en el cuadro 2. La mayor ocupación se obtuvo en Arenisca (70%), seguida de suelos de la UEPP y en Brunosoles de Noreste (40%), y la menor ocupación fue en Cristalino central y Glencoe (23 - 26%).

**Cuadro 2.** Ocupación de nódulos por el conjunto de inoculantes en distintos suelos. Letras diferentes indican diferencias significativas según Tukey  $p < 0,05$ .

Suelo	Proporción (%) de nódulos ocupados por inoculantes
Areniscas	70 a
Lomadas del Este (UEPP)	40 b
Brunosoles del Noreste	40 b
Cristalino central (SUL)	26 c
Basalto (Glencoe)	23 c

El cuadro 3 resume la ocupación de nódulos por los inoculantes en suelos SH y CH. En suelos SH las cepas ocuparon más del doble de nódulos respecto a suelos CH (56 y 25% respectivamente). El tamaño de las poblaciones de rizobios en los tres suelos ensayados fue la misma en predios CH

y SH, salvo en la UEPP donde en predio CH fue mayor (Cuadro 1). De esta forma no parece ser la cantidad de rizobios del suelo lo que determine la ocupación en nódulos, sino su competitividad.

**Cuadro 3.** Ocupación de nódulos por el conjunto de los inoculantes en suelos con y sin historia de trébol. Letras diferentes indican diferencias significativas según Tukey  $p < 0,05$ .

Historia del suelo	Proporción (%) de nódulos ocupados por el inoculante
Sin historia de trébol	56 a
Con historia de trébol	25 b

El cuadro 4 muestra la ocupación de nódulos por las cepas N2, N5 y 249 que varió entre 52 y 63%, y por el inoculante comercial cepa U204 que se situó en 6%. Dado que en este ensayo las cepas más competitivas fueron N2 y 249 y en el ensayo realizado por Batista *et al.* (2013) fue 317, se seleccionaron estas tres cepas para evaluarlas en ensayos en campo.

**Cuadro 4.** Ocupación de nódulos por cepas usadas como inoculante en el conjunto de los diferentes suelos. Letras diferentes indican diferencias significativas según Tukey  $p < 0,05$ .

Cepa	Proporción (%) de nódulos ocupados por el inoculante
N5::gusA	52 a
U204::gusA	6 b
249::gusA	60 c
N2::gusA	63 d

Los resultados de ocupación de nódulos con las cepas marcadas evidencian por un lado la baja competitividad de la cepa comercial U204 y por otro la interacción significativa entre la geología del suelo y la historia de inoculación.

Los suelos donde la ocupación de nódulos por los inoculantes fue menor, habían sido definidos como problemáticos para la implantación y producción de trébol blanco (com. pers. M. Rebuffo). Los rizobios presentes en esos suelos pueden ser muy competitivos, aunque las condiciones del suelo como pH, contenido de N y presencia de microorganismos antagonistas también podrían determinar la baja ocupación de nódulos por los inoculantes.

Otro aspecto a considerar es la presencia de trébol polimorfo, que es nodulado por cepas que han sido reportadas como parásitas en trébol blanco (Yates *et al.*, 2005; Dutto, 2002). En Glencoe el suelo ha sido mejorado durante varios años y la presencia del trébol polimorfo es escasa (com. pers. R. Reyno), si bien sus rizobios pueden estar presentes. De todas formas Yates *et al.* (2005) reportaron que la cantidad de rizobios que nodulan trébol polimorfo en ese suelo alcanza  $3,3 \times 10^4$ /g de suelo y que son ineficientes en trébol blanco. En Glencoe, en un sitio SH (Cuadro 1) la cantidad de rizobios capaces de nodular trébol blanco fue  $4,3 \times 10^1$  rizobios/g de suelo. Esta diferencia puede deberse a distintas razones, las poblaciones de rizobios fluctúan en diferentes momentos año, y el pH del suelo donde Yates *et al.* (2005) hicieron la evaluación era 4,8 mientras que en nuestro caso el pH es 5,7, de manera que el primero es marcadamente ácido y el segundo moderadamente ácido, según el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (Soil Survey Division Staff, 1993).

La competitividad de la cepa 317 se evaluó en suelos de La Estanzuela, Tambores y de la UEPP, en sitios CH y SH (Batista, 2013). En La Estanzuela (CH), la cepa 317 ocupó el 52% de los nódulos mientras que la cepa U204 ocupó el 26%, con diferencias estadísticamente significativas. En La Carolina y Tambores (SH) y

en Paso de la Laguna (CH), no hubo diferencia en la cantidad de nódulos ocupados por estas cepas. Los resultados sugieren que en suelos donde cultivó trébol estarían bacterizados con cepas específicas para esa leguminosa, más competitivas que los inoculantes. De todas formas, en la medida que se realizan estudios con marcadores moleculares del tipo de los usados en este proyecto, surgen más evidencias de que las cepas usadas como inoculantes comerciales no ocupan mayormente los nódulos (Mauchline *et al.*, 2014, Nagul *et al.*, 2014, Batista *et al.*, 2015).

### 2.2.3 Eficiencia de las cepas en otros tréboles de uso agronómico

Dado que hay otros tréboles de uso agronómico en nuestro país, se evaluaron las nuevas cepas a efectos de conocer si ocurre alguna incompatibilidad con alguno de ellos. La biomasa total de plantas de 45 días crecidas en condiciones controladas, expresadas como mg de peso seco por planta, figura en el cuadro 6. Las cepas son Fix+ en *T. resupinatum* y *T. alexandrinum* y Fix- en *T. vesiculosum*. El actual inoculante comercial es Fix- en este trébol y se usó como control en este ensayo. De esta forma, las cepas evaluadas no implican inconvenientes derivados de su uso en la mayoría de los tréboles de uso agronómico en nuestro país.

**Cuadro 5.** Eficiencia simbiótica de las cepas en diferentes especies de trébol. De cada tratamiento se hicieron 5 repeticiones en arena vermiculita. Fix-- corresponde a PS igual al control sin inocular ( $p < 0,05$ ).

Tratamiento	<i>T. resupinatum</i>	<i>T. alexandrinum</i>	<i>T. vesiculosum</i>
	<b>mg PS/planta</b>		
<b>N2</b>	0,09 Fix+	0,18 Fix+	0,01 Fix-
<b>249</b>	0,10 Fix+	0,17 Fix+	0,02 Fix-
<b>317</b>	0,09 Fix+	0,09 Fix+	0,01 Fix-
<b>U204</b>	0,012 Fix+	0,22 Fix+	0,01 Fix-
<b>Sin inocular</b>	0,03	0,03	0,02



### 3. Bibliografía

- Batista L.** 2013. Prospección y evaluación de cepas de rizobios: una aproximación para el desarrollo de inoculantes para *Lotus uliginosus* y *Trifolium pratense*. Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias. Facultad de Agronomía, Udelar. 140 pp.
- Batista L, Irisarri P, Rebuffo M, Cuitiño M J and Sanjuán J and Monza J** 2015. Nodulation competitiveness as a requisite for improved rhizobial inoculants of *Trifolium pratense*. *Biology and Fertility Soils*, 51:11-20. DOI 10.1007/s00374-014-0946-3.
- Dutto P.** 2002. Recomendaciones para situaciones con problemas: Inoculación de Leguminosas. *Revista del Plan Agropecuario*, 102: 54 - 57.
- Denton M, Coventry D, Murphy P, Howieson J, Bellotti W. 2002. Competition between inoculant and naturalized *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* for nodulation of annual clovers in alkaline soils. *Crop and Pasture Science*, 53(9): 1019 - 1026.
- Denton M, Reeve W, Howieson J, Coventry D.** 2003. Competitive abilities of common field isolates and a commercial strain of *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* for clover nodule occupancy. *Soil Biology and Biochemistry*. 35(8): 1039-1048.
- Hernández L.** 2011. Identificación y selección de cepas nativas de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*. Tesis de fin de Licenciatura en Bioquímica, Facultad de Ciencias, Udelar. 76 pp.
- Gutiérrez P.** 2017. Evaluación de cepas nativas para el desarrollo de un inoculante rizobiano para trébol blanco. Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias. Facultad de Agronomía, Udelar. 123 pp.
- Kaschuk G, Hungria M., Andrade D S, Campo R.** 2006. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. *Applied Soil Ecology*, 32, 210-220.
- Labandera C, Vincent J.** 1975. Competition between an introduced strain and native Uruguayan strains of *Rhizobium trifolii*. *Plant and Soil*, 42(2): 327-347.
- Lindström K, Mousavi S.** 2010. *Rhizobium* and Other N-fixing Symbioses. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
- Loreau M, Naeem S, Inchausti P, Bengtsson J, Grime J, Hector A, Hooper D, Huston M, Raffaelli D, Schmid B, Tilman D, Wardle D.** 2001. Biodiversity and Ecosystem Functioning: Current Knowledge and Future Challenges. *Science* 294, 804. DOI: 10.1126/science.1064088
- Macdonald C, Clark I, Hirsch P, Zhao F, McGrath S.** 2011. Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Rhizobium leguminosarum* bacteria and discrimination between different biovars in zinc contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(13): 4626-4633.
- MGAP** (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca). 2008. Departamento de Microbiología de Suelos. Colección Nacional de Cepas de *Rhizobium spp.*
- Martyniuk S, Oron, J.** 2008. Populations of rhizobia in some Polish soils not planted with legumes. *EKologija*, 54: 165-168.
- Mauchline T, Hayat R, Roberts S, Powers and Hirsch P.** 2014. Assessment of core and accessory genetic variation in *Rhizobium leguminosarum* symbiovar *trifolii* strains from diverse locations and host plants using PCR-based methods. *Letters Applied Microbiology*. doi:10.1111/lam.12270.
- Nangul A, Moot D, Brown D and Ridgway H.** 2013. Nodule occupancy by *Rhizobium leguminosarum* strain WSM1325 following inoculation of four annual *Trifolium* species in Canterbury, New Zealand. *New Zealand Journal of Agriculture Research*. Vol. 56, No. 3, 215-223, <http://dx.doi.org/10.1080/00288233.2013.815637>.
- Sprent J I.** 2007. Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. *New Phytologist*, 174(1): 11-25.
- Schneider F and de Bruijn F.** 1996. Rep-PCR mediated genomic *fingerprinting* of rhizobia and computer-assisted phylogenetic pattern analysis. *Word Journal of Microbiology Biotechnology*, 12:163-174.

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

**Yates R, di Mattia E, O'Hara G, Real D, Howieson J.** 2003. The role of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* in extending (or restricting) the adaptation of *Trifolium* spp. in natural and managed ecosystems. En S. J. Bennett (Ed.), *New Perennial Legumes for Sustainable Agriculture*. Perth: University of Western Australia Press, 116-130.



Gutiérrez P.<sup>1</sup>, Cardozo G.<sup>2</sup>, Tartaglia C.<sup>1</sup>, Irisarri P.<sup>1</sup>, Sabatini O.<sup>1</sup>, Armesto F.<sup>1</sup>, Reyno R.<sup>2</sup>, Rebuffo M.<sup>2</sup> y Monza J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Uruguay.

<sup>2</sup> Programa Nacional Pasturas y Forrajes, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA La Estanzuela, INIA Tacuarembó, INIA Treinta y Tres).

## Capítulo 2. Evaluación en campo de las cepas promisorias como inoculantes

### 1. Criterios para evaluar las cepas en campo

La evaluación agronómica de un par simbiótico debe realizarse en condiciones de campo, en particular en las regiones donde se siembra la leguminosa. En esta evaluación, dos criterios son relevantes: la eficiencia y la competitividad. La eficiencia se evalúa a través de parámetros como productividad, N total, N procedente de la fijación biológica (FBN) y actividad de la enzima nitrogenasa. Estos parámetros pueden estimarse de diferentes formas: la productividad, como el peso de materia seca de partes aéreas en un determinado corte o acumulado de varios cortes, la FBN a través de la actividad nitrogenasa, con la limitación de ser una aproximación indirecta de la capacidad de reducir N<sub>2</sub> en un momento dado (Anderson *et al.*, 2004), o a través de técnicas isotópicas (Högberg, 1997).

La competitividad de una cepa se determina como la cantidad de nódulos ocupados por el inoculante respecto a los ocupados por cepas del suelo. Históricamente, esta característica ha sido escasamente considerada debido a las dificultades para evaluarla. Sin embargo, el advenimiento de técnicas moleculares, como por ejemplo los perfiles genómicos, ha permitido identificar a las cepas de manera confiable, y relacionar la presencia del inoculante con la implantación de la leguminosa, su productividad y su capacidad de fijar N.

Hay evidencias que indican que las cepas usadas como inoculantes no ocupan la mayoría de los nódulos (Yates *et al.*, 2005; Denton *et al.*, 2003;

Nangul *et al.*, 2013). Por ejemplo, en Australia, Denton *et al.* (2003) observaron en *Trifolium alexandrinum* que el inoculante formó nódulos principalmente en los primeros 5 cm de las raíces, ocupando muy pocos en raíces alejadas de la corona, y postularon que el potencial de FBN puede ser significativamente reducido en condiciones de campo si los nódulos formados en las secciones inferiores están ocupados por cepas poco eficientes. Resultados similares se observaron localmente en trébol rojo (Batista *et al.*, 2014), trébol blanco (Gutiérrez, 2017) y *Lotus corniculatus* (Sotelo *et al.*, 2011).

La estrategia utilizada en este proyecto para desarrollar un inoculante para trébol blanco fue seleccionar cepas competitivas entre aquellas más eficientes (Capítulo 2). Este capítulo comunica los resultados de la evaluación a campo de esas cepas.

### 2. Estrategia y metodología

La figura 1 resume la estrategia seguida para evaluar a campo la eficiencia simbiótica y competitividad de los inoculantes. Se realizaron ensayos en *Trifolium repens* cv. ‘Estanzuela Zapicán’ con las cepas N2, 249 y 317, seleccionadas por su alta eficiencia y competitividad (Capítulo 2), en dos sitios contrastantes: suelos profundos de basalto (Vertisol Háplico, 32°01’S, 57°09’O) de la Unidad Experimental Glencoe (Paysandú), de ahora en adelante Glencoe, y en Lomadas del Este (Argisol Subéutrico, 33°15’S, 54°28’O) en la Unidad Experimental Palo a Pique (Treinta y Tres, de ahora en adelante UEPP).



**Figura 1.** Pasos seguidos en la evaluación de los inoculantes en campo. (1) Se obtuvieron cultivos puros de rizobios a partir de nódulos de los diferentes tratamientos, se aisló y amplificó ADN con cebadores ERIC y los perfiles se resolvieron en gels. (2) Se evaluó la implantación y biomasa aérea en el campo. (3) El N fijado se estimó por enriquecimiento isotópico de  $^{15}\text{N}$  por espectrometría de masa.

Las semillas inoculadas con las cepas N2, 317, 249 y U204, más un testigo sin inocular, se sembraron entre Abril y Mayo a razón de  $5 \text{ kg. ha}^{-1}$ . La concentración de rizobios en turba se determinó según Mayans y Barlocco (2017) y la inoculación se realizó según las instrucciones del fabricante. En Glencoe se practicó siembra convencional sobre tierra laboreada, y en la UEPP se realizó siembra en cobertura sobre campo natural, previo acondicionamiento, simulando un mejoramiento de campo. El diseño fue bloques completos al azar con cuatro repeticiones, y la unidad experimental fue la parcela ( $6\text{-}10\text{m}^2$ ), separada 1 m de la parcela vecina en todos sus lados.

Al instalarse cada ensayo se determinó el número más probable (NMP) de rizobios capaces de nodular trébol blanco. Se determinaron: el número de plantas implantadas por  $\text{m}^2$ , la producción de biomasa aérea ( $\text{kg MS.ha}^{-1}$ ) mediante cortes mecánicos, la ocupación de los nódulos por perfiles ERIC de los aislamientos, y la FBN por abundancia isotópica de  $^{15}\text{N}$  según Batista *et al.* (2015).

### 3. Resultados

#### 3.1 Implantación y competitividad de la cepa 317 en la UEPP

La cepa 317, promisorio como inoculante por su competencia en trébol rojo (Batista *et al.*, 2014; Batista, 2013), se evaluó en campo en trébol blanco en la UEPP en un sitio sin historia de

inoculación de trébol (SH), con 60 rizobios por g de suelo determinados antes de la siembra. El ensayo se instaló en abril de 2014 y la ocupación de nódulos se evaluó en noviembre.

El número de plantas por  $\text{m}^2$  a los 30, 60 y 90 días después de la siembra se resume en el cuadro 1. Todos los tratamientos tuvieron una buena implantación inicial (8 a 30 días), con una ligera superioridad ( $p < 0,05$ ) para los tratamientos inoculados respecto al testigo sin inocular (8 y 14% para las cepas 317 y U204, respectivamente). El número de plantas logradas inicialmente disminuyó con el tiempo, pero la pérdida se produjo de manera diferente entre tratamientos. A los 60 y 90 días el número de plantas por  $\text{m}^2$  en el tratamiento inoculado con la cepa 317 fue mayoral inoculado con la cepa U204 (21 y 29%, respectivamente) y al tratamiento sin inocular (20 y 34%, respectivamente).

La disminución de plantas de trébol blanco con la edad de las pasturas mejoradas ha sido comprobada en diferentes ambientes (Olmos López, 2004), y se ha atribuido a factores biológicos como la competencia del tapiz natural, enfermedades, plagas, pero el presente estudio de campo agrega otro factor biológico a tener en cuenta en la persistencia del trébol blanco que es la cepa usada como inoculante. En este ensayo no se evaluó la producción de forraje por la rápida pérdida de plantas del testigo sin inocular.

**Cuadro 1.** Implantación de trébol blanco inoculado con las cepas 317 y U204 sobre campo natural en la UEPP. Se incluyó un testigo sin inocular.

Momento de conteo (días)	Tratamiento	Plantas.m <sup>-2</sup>
30	Sin inocular	179 b
	317	193 a
	U204	204 a
60	Sin inocular	121 b
	317	145 a
	U204	120 b
90	Sin inocular	23 c
	317	93 a
	U204	72 b

\*Letras diferentes indican diferencias significativas según DGC p<0,05 para cada conteo.

A los 7 meses después de la siembra se evaluó la ocupación de nódulos de raíces principales (RP), raíces secundarias (RS) y raíces de estolones (RE). Se analizaron 10 nódulos de cada tipo de raíz para cada tratamiento y repetición. Con los aislamientos obtenidos se generaron 362 perfiles ERIC. Las cepas 317 y U204 ocuparon más del 95% de los nódulos de RP y RS, sin diferencias significativas entre ellas (Cuadro 2). En las RE la cepa 317 ocupó 8 veces más nódulos que la cepa U204 (p<0,05). El número de aislamientos de nódulos analizados por sus perfiles ERIC le da solidez a estos resultados, porque surgen del estudio de aproximadamente 40 aislamientos de cada zona radicular, provenientes de unas 50 plantas de cada tratamiento.

**Cuadro 2.** Ocupación de nódulos por las cepas 317 y U204 a los 7 meses sobre campo natural en la UEPP.

Cepa	Raíz principal	Raíz secundaria	Raíz estolón
317	1,00 a*	1,00 a	0,96 a
U204	0,98 a	0,95 a	0,12 b

\*Letras diferentes indican diferencias significativas según DGC con p<0,05 para cada tipo de raíz.

El trébol blanco tiene propagación vegetativa por estolones que se desarrollan en la primavera del primer año (Olmos López, 2004). La cepa 317

ocupó mayor número de nódulos que la cepa U204 en raíces de estolones, lo que evidencia que esa cepa persiste más en el suelo porque los nódulos en raíces de estolón se forman aproximadamente 4 meses después de la siembra, cuando se desarrollan estos tallos rastreros y sus raíces. Estos nódulos aportarán N a las plantas provenientes de los estolones. Por tanto, la ocupación de nódulos formados con posterioridad a la implantación por cepas persistentes y competitivas en una característica deseable para los inoculantes. Un aspecto a considerar es que no se encontraron estudios sobre la ocupación de nódulos en raíces de estolones de trébol blanco a nivel nacional ni internacional.

### 3.2 Evaluación de las cepas N2, 249 y 317 en Glencoe y en la UEPP

La performance de las cepas N2, 249 y 317, seleccionadas por su eficiencia y competitividad en trébol blanco, se evaluó respecto a la cepa U204 y a un control sin inocular en dos ensayos instalados en 2015 y 2016 en Glencoe y en la UEPP. En el momento en el que se instalaron los ensayos se determinó en los suelos la cantidad de rizobios que nodulan trébol, a los 60 días se estimó la implantación y la producción posterior de biomasa aérea, el nitrógeno procedente de la FBN y la proporción de nódulos ocupados por las cepas del suelo y por el inoculante.

#### 3.2.1 Implantación

La implantación se determinó a través de conteos de plantas a los 60 días después de la siembra (DPS), en 0,2 m<sup>2</sup> por parcela en Glencoe (8 cuadros de 0,1 x 0,25 m) y la UEPP (2 cuadros de 0,2 x 0,5 m). Si bien se observa variabilidad entre años y sitios, las cepas 317 y 249 alcanzaron una mayor densidad de plantas respecto a la cepa U204 en tres de los cuatro ensayos realizados (Cuadro 3). La implantación del tratamiento con la cepa U204 fue solo superior a las cepas 317, 249 y N2 en el ensayo UEPP 2015. La implantación con las cepas N2 y U204 fue similar en Glencoe 2016. El número de plantas logrado en los tratamientos inoculados en comparación con los sin inocular fue superior, excepto en el ensayo Glencoe 2016 donde la implantación de trébol blanco fue mayor (Cuadro 3).



**Cuadro 3.** Implantación de trébol blanco inoculado con las cepas 317, N2 y 249 a los 60 días después de la siembra. La implantación se expresa como el número de plantas por m<sup>2</sup>. Se incluyó un testigo sin inocular.

Tratamientos	UEPP		Glencoe	
	2015	2016	2015	2016
<b>317</b>	118 b*	85 a	107 b	301 c
<b>N2</b>	115 b	80 a	123 b	234 d
<b>249</b>	67 c	77 a	166 a	406 a
<b>U204</b>	141 a	44 b	82 c	213 d
<b>Sin inocular</b>	76 c	30 c	70 c	346 b

\* Letras diferentes indican diferencias significativas según MLGMix(Poisson)-DGC con  $p < 0,05$ , para cada sitio y año.

### 3.2.2 Ocupación de nódulos por los inoculantes y cepas del suelo

A los 7 meses después de la siembra, en cuatro ensayos independientes (siembras 2015 y 2016) realizados en Glencoe y en la UEPP, se determinó la ocupación de nódulos en las RP, RS y RE. El análisis de 1.200 perfiles ERIC con GelCompar permitió determinar la ocupación por el inoculante utilizado o por las cepas del suelo, en relación al número total de nódulos. Los resultados se analizaron con un modelo lineal generalizado mixto, usando como variable de respuesta los nódulos ocupados por cada cepa y como covariable los nódulos totales.

La ocupación de nódulos en RP por las cepas en evaluación fue similar o superior a la cepa

U204 en los cuatro ensayos (Cuadro 4), excepto para la cepa 249 en UEPP en 2015, con una ocupación inferior. También en RS la ocupación de nódulos por las cepas en evaluación fue superior o similar al inoculante comercial U204. Estas diferencias fueron mayores en RE, donde siempre las cepas N2, 249 y 317 ocuparon al menos 5 veces más nódulos que la cepa U204. La ocupación de nódulos por las cepas 249 y U204 en Glencoe en 2015 fue similar, e inferior a las cepas 317 y N2. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos con la cepa 317 en el ensayo sembrado en la UEPP en 2014 (Cuadro 2). Estos resultados evidencian la mayor persistencia y competitividad de las cepas N2, 249 y 317 en los distintos escenarios, tanto sin historia de trébol blanco (UEPP) como con historia (Glencoe).

**Cuadro 4.** Ocupación de nódulos de trébol blanco en Glencoe y UEPP a los 7 meses después de la siembra. RP raíz principal, RS raíz secundaria, RE raíces de estolón y P promedio de nódulos ocupados en RP, RS y RE.

Tratamientos	UEPP				Glencoe			
	RP	RS	RE	P	RP	RS	RE	P
<b>2015</b>								
<b>317</b>	0,87 a	0,58 a	0,47 a	0,63 a	0,60 a	0,42 a	0,73 a	0,58 a
<b>N2</b>	0,91 a	0,73 a	0,68 a	0,77 a	0,80 a	0,51 a	0,51 a	0,69 a
<b>249</b>	0,39 b	0,71 a	0,79 a	0,63 a	0,78 a	0,68 a	0,77 a	0,74 a
<b>U204</b>	0,61 a	0,17 b	0,09 b	0,30 b	0,58 a	0,53 a	0,13 b	0,42 a
<b>2016</b>								
<b>317</b>	1,00 a	1,00 a	0,77 a	0,91 a	0,56 b	0,57 b	0,76 a	0,64 a
<b>N2</b>	1,00 a	1,00 a	0,84 a	0,93 a	0,59 b	0,80 a	0,76 a	0,69 a
<b>249</b>	0,83 a	0,67 b	0,38 b	0,53 b	0,69 a	0,87 a	0,53 b	0,62 a
<b>U204</b>	0,58 b	0,55 b	0,05 c	0,36 c	0,50 b	0,32 b	0,57 b	0,49 b

\* Letras diferentes indican diferencias significativas según DGC con  $p < 0,05$  dentro de cada año, sitio y región radicular.

### 3.2.3 Producción de biomasa

La producción de biomasa se determinó en ensayos realizados en la UEPP y en Glencoe en función de la disponibilidad de forraje para cada tipo de pastura. Los resultados de producción de forraje se presentan de manera separada por sitio, debido a las diferencias entre los ambientes. En la UEPP se estableció como pastura mejorada con siembra en cobertura y sin historia de trébol blanco, y en Glencoe como cultivo puro con siembra convencional con historia de inoculación. En ambos casos la evaluación implicó el corte de forraje en cuadros de 20 x 50 cm dejando un remanente de 2-3 cm de altura, con posterior uniformización de la parcela con pastera rotativa. Las muestras se procesaron con composición botánica para conocer el aporte específico del trébol blanco en cada tipo de pastura.

La producción de forraje para UEPP pudo ser medida en el primer año de implantación del ensayo sembrado en 2015, pero no en el segundo año, por limitantes hídricas en el primer verano que condicionaron la supervivencia del trébol blanco (Cuadro 5). Lo contrario sucedió en el ensayo sembrado en 2016, del que se reporta la producción del segundo año (Cuadro 6 y Figura 2), dada las limitantes presentes en el primer año de vida para todos los tratamientos. En ambos casos se reporta la producción de biomasa de trébol

blanco y su contribución respecto a la producción total de la pastura.

Los resultados evidencian que la producción de biomasa del tratamiento con la cepa N2 fue similar al tratamiento con la cepa U204 y un 70% superiores al resto (Cuadro 5). En contraste, en el segundo año la biomasa producida por los tratamientos con las cepas N2 y 317 fue 18 veces superior al tratamiento inoculado con la cepa U204 (Cuadro 6). Es de destacar la baja contribución de trébol en el tratamiento con la cepa U204, similar al testigo sin inocular (Cuadro 6). La ventaja observada en el segundo año sugiere el potencial de las cepas N2 y 317 para la mejora de la persistencia de trébol blanco.

**Cuadro 5.** Biomasa y contribución de trébol blanco en el primer año de la siembra 2015 en la UEPP.

Tratamiento	Biomasa (kg MS.ha <sup>-1</sup> )	Trébol %
<b>N2</b>	1.264 a*	37 a
<b>317</b>	734 b	24 a
<b>249</b>	745 b	29 a
<b>U204</b>	1.237 a	40 a
<b>Sin inocular</b>	705 b	26 a

\* Letras diferentes indican diferencias significativas según MLMix-DGC con  $p < 0,05$  para cada variable.



**Figura 2.** Ensayo a campo de la evaluación de cepas de trébol blanco en la UEPP en el segundo año de la siembra 2016.



**Cuadro 6.** Biomasa y contribución de trébol blanco en la UEPP en el segundo año de la siembra 2016.

Tratamiento	Biomasa $\ddagger$ (kg MS.ha <sup>-1</sup> )	Trébol%
<b>N2</b>	1.877 a*	61 a
<b>317</b>	1.766 a	48 a
<b>249</b>	198 b	8 b
<b>U204</b>	101 b	5 b
<b>Sin inocular</b>	32 b	1 b

$\ddagger$  periodo parcial (197 días).

\* Letras diferentes indican diferencias significativas según MLMix-DGC con  $p < 0,05$  para cada variable.

La biomasa producida en el primer y segundo año para los ensayos sembrados en 2015 y 2016 en Glencoe, se muestra en el Cuadro 7. Si bien los tratamientos inoculados con las cepas N2, 317 y 249 produjeron 29-60% más respecto a la cepa U204 en el primer año y 12-16% más en el segundo año del ensayo sembrado en 2015, las diferencias no son significativas al 5% por ANAVA. La única cepa superior al testigo U204 fue 317 cuando se realiza la comparación de medias por contrastes ( $p < 0,1$ ). La producción de biomasa de los tratamientos inoculados con las cepas N2, 249 y 317 fue 29-42% superior (ANAVA al 5%) respecto al tratamiento inoculado con la cepa U204 en el primer año de la siembra 2016. Si bien la cepa U204 presentó un desempeño peor que el resto de los tratamientos, cuando se analizó por contrastes no hubo diferencia entre esta cepa y el tratamiento sin inocular ( $p < 0,1$ ). En el segundo año de ambas siembras no se detectaron diferencias en la producción de biomasa entre los tratamientos.

### 3.2.4 Biomasa acumulada en diferentes órganos de trébol blanco

La persistencia productiva del trébol blanco depende en gran medida de las características morfológicas como el tamaño de los órganos, hoja, raíz y sobre todo de los estolones, que determinan las reservas con que cuentan la planta para sobrevivir el verano, el periodo de mayor estrés (Olmos López, 2004). Junto con la extracción de nódulos a los 7 meses de vida, fueron caracterizados algunos de los componentes morfológicos de las plantas, a través del peso seco (Cuadros 8 y 9).

La cepa 317 mostró ventajas respecto a la cepa comercial U204 en el peso de los estolones, significativo para ambas localidades, mientras que el comportamiento de las cepas N2 y 249 fue disímil entre localidades. El peso seco de los estolones del tratamiento inoculado con la cepa N2 fue 76% mayor en comparación con el tratamiento U204 en la UEPP (Cuadro 8), mientras que en Glencoe la cepa 249 fue 15% superior (Cuadro 9). Estos resultados muestran el impacto potencial de la mayor ocupación de nódulos por cepas efectivas en los nódulos de las raíces de los estolones. Además, los tratamientos inoculados mostraron ventajas también en raíz y hoja respecto al tratamiento sin inocular en la UEPP (Cuadro 8), diferencias no observadas en Glencoe, el sitio con historia de inoculación (Cuadro 9).

**Cuadro 7.** Biomasa de trébol blanco en Glencoe para las siembras realizadas en 2015 y 2016.

Tratamiento	Siembra 2015		Siembra 2016	
	1° año	2° año	1° año	2° año
	kg MS.ha <sup>-1</sup>			
<b>N2</b>	1.298 a*	5.040 a	6.098 a	6.624 a
<b>317</b>	1.422 a $\ddagger$	4.989 a	5.743 a	6.761 a
<b>249</b>	1.145 a	4.863 a	6.302 a	6.718 a
<b>U204</b>	890 a	4.326 a	4.453 b	5.871 a
<b>Sin inocular</b>	847 a	4.302 a	5.758 a $\ddagger$	6.276 a

\* Letras diferentes indican diferencias significativas según DGC con  $p < 0,05$  para cada siembra y año de evaluación.

$\ddagger$  Diferencia por contraste respecto U204 ( $p < 0,1$ ).

$\ddagger$  Sin diferencia por contraste respecto U204 ( $p < 0,1$ ).

**Cuadro 8.** Componentes morfológicos de trébol blanco a los 7 meses en la UEPP en 2016. Los resultados se expresan en peso seco (g) de 10 plantas.

Tratamiento	Raíz	Hoja	Estolón
<b>N2</b>	0,94 a*	0,49 a	1,20 a
<b>317</b>	1,15 a	0,53 a	1,28 a
<b>249</b>	0,76 a	0,31 a	0,87 b
<b>U204</b>	0,68 a	0,36 a	0,68 b
<b>Sin inocular</b>	0,31 b	0,15 b	0,81 b

\*Letras diferentes indican diferencias significativas según DGC con  $p < 0,1$  para cada componente.

**Cuadro 9.** Componentes morfológicos de trébol blanco a los 7 meses en Glencoe en 2016. Los resultados se expresan en peso seco (g) de 10 plantas.

Tratamiento	Raíz	Hoja	Estolón
<b>N2</b>	3,22 a*	1,56 a	5,35 b
<b>317</b>	4,27 a	2,38 a	7,05 a
<b>249</b>	4,33 a	2,01 a	7,26 a
<b>U204</b>	3,73 a	2,43 a	6,29 b
<b>Sin inocular</b>	3,55 a	2,24 a	6,13 b

\*Letras diferentes indican diferencias significativas según DGC con  $p < 0,1$ .

### 3.2.5 Nitrógeno proveniente de la fijación

El N proveniente de la fijación se pudo estimaren ensayos instalados en campo mediante técnicas isotópicas en leguminosas forrajeras (Unkovich

*et al.* 1998) y en la leguminosa de grano soja (Di Ciocco *et al.*, 2013). En particular, la técnica de enriquecimiento isotópico tiene como ventaja principal que no es necesario añadir una fuente enriquecida con  $^{15}\text{N}$  (Unkovich y Pate, 2000). Ambas técnicas permiten estimar durante todo el período en el que creció la planta el N incorporado por la FBN.

A pesar de la potencia de la técnica, sólo se pudo establecer que el N fijado es menor ( $p=0,0037$ ) en Glencoe que en la UEPP,  $83.98 \pm 3.90$  vs.  $94.97 \pm 1.93$  (Cuadro 10). El suelo de Glencoe es un vertisol háplico con alta fertilidad natural y alto contenido de materia orgánica (6-7%), lo que podría explicar una mayor abundancia de N en el suelo y en parte los menores % de N fijados. El % de N fijado por los diferentes pares simbióticos fue similar ( $p < 0,05$ ), a pesar de las ventajas comparativas observadas en la producción de biomasa (Cuadros 5 y 7). En este trabajo la determinación del N fijado se realizó en hojas, órgano que presenta un menor contenido de N, lo que podría haber impedido la detección de diferencias entre tratamientos. Varin *et al.* (2010) determinaron que el contenido de N total fue 37, 32, 20 y 17  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$  de nódulos, estolones, hojas y raíces, respectivamente. En el momento en que se determinó el % N fijado por los distintos pares simbióticos, ya se habían desarrollado los estolones, por lo que se debió haber incluido este órgano en la muestra.

**Cuadro 10.** Nitrógeno fijado por enriquecimiento natural de  $^{15}\text{N}$  por diferentes cepas de rizobios en simbiosis con trébol blanco a los 7 meses pos-siembra. Los ensayos se sembraron en 2015 y 2016 en la UEPP y en Glencoe y se usó raigrás como gramínea de referencia.

	Glencoe		UEPP	
	2015	2016	2015	2016
	<b>% N fijado</b>			
<b>N2</b>	78,98	89,6	94,54	96,77
<b>249</b>	84,37	88,63	96,72	100
<b>317</b>	70,48	88,9	97,4	86,56
<b>U204</b>	60,63	89,19	94,54	99,8
<b>Sin inocular</b>	62,56	88,9	95,5	95,3

#### 4. Bibliografía

- Anderson M, Ruess R, Uliassi D, Mitchell J.** 2004. Estimating N<sub>2</sub> fixation in two species of *Alnus* in interior Alaska using acetylene reduction and <sup>15</sup>N<sub>2</sub> uptake. *Ecoscience*, 11(1): 102-112.
- Batista L, Irisarri P, Rebuffo M, Coitiño M, Sanjuán J, Monza J.** 2015. Nodulation competitiveness as a requisite for improved rhizobial inoculants of *Trifolium pratense*. *Biology and Fertility of Soils*, 51(1):11-20.
- Camargo D.** 2011. Desarrollo de un inoculante rizobiano para un nuevo cultivar de *Lotus uliginosus*. Tesis, Maestría en Biotecnología, Montevideo, Uruguay. Universidad de la República, Facultad de Ciencias Universidad de la República.
- Denton M, Reeve W, Howieson J, Coventry D.** 2003. Competitive abilities of common field isolates and a commercial strain of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* for clover nodule occupancy. *Soil Biology and Biochemistry*, 35(8): 1039-1048.
- Di Ciocco C, Coviella C, Penón E, Díaz-Zorita M, López S.** 2013. Short communication. Biological fixation of nitrogen and N balance in soybean crops in the pampas region. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 6(1): 114-119.
- Gutiérrez P.** 2017. Evaluación de rizobios para el desarrollo de un inoculante eficiente y competitivo de *Trifolium repens*. Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República, Facultad de Agronomía. 36-46.
- Högberg P.** 1997. 15N natural abundance in soil-plant systems. *New Phytologist*. 137: 179-203.
- Mayans M y Barlocco C.** 2017. Protocolo técnico para el control de calidad de inoculantes para leguminosas. DGSA-MGAP. <http://www.mgap.gub.uy/dgsainoculantesweb/PublicTempStorage/Procedimientos%20de%20Control%20de%20Calidad%2020176521702.pdf>
- Olmos López F.** 2004. Factores que afectan la persistencia y productividad de pasturas mejoradas con trébol blanco (*Trifolium repens* L.). INIA Serie Técnica 145.
- Nangul A, Moot D, Brown D, Ridgway H.** 2013. Nodule occupancy by *Rhizobium leguminosarum* strain WSM1325 following inoculation of four annual *Trifolium* species in Canterbury, New Zealand. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 56(3): 215-223.
- Unkovich M, Pate J.** 1998. Symbiotic effectiveness and tolerance to early season nitrate in indigenous populations of subterranean clover rhizobia from S.W. Australian pastures. *Soil Biology & Biochemistry*, 30: 1435–1443.
- Unkovich M, Pate J.** 2000. An appraisal of recent field measurements of symbiotic N<sub>2</sub> fixation by annual legumes. *Field Crops Res* 65: 211-228.
- Yates R, Howieson J, Real D, Reeve W, Vivas-Marfisi A, O'Hara G.** 2005. Evidence of selection for effective nodulation in the *Trifolium* spp. symbiosis with *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Animal Production Science*, 45(3): 189-198.

Sabatini O.<sup>1</sup>, Cardozo G.<sup>2</sup>, Arrospide G.<sup>3</sup>, Lage M.<sup>4</sup>, Lage P.<sup>4</sup>, Mayans M.<sup>5</sup>, Novoa N.<sup>1</sup> y Reyno R.<sup>2</sup>, M. Rebuffo<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Uruguay.

<sup>2</sup> Programa Nacional Pasturas y Forrajes, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA Tacuarembó, INIA Treinta y Tres).

<sup>3</sup> Calister S.A.

<sup>4</sup> Lage y Cía. S.A.

<sup>5</sup> Laboratorio de Microbiología, Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca y Forrajes, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA La Estanzuela, INIA Tacuarembó, INIA Treinta y Tres).

## 1. Inoculación de leguminosas forrajeras en Uruguay

A partir de 1960 en Uruguay se implementó una política de Estado que promovió el uso de la fijación biológica de nitrógeno (FBN) por la simbiosis rizobio - leguminosa, como una alternativa al uso de fertilizantes nitrogenados de síntesis (Lindström *et al.*, 2010). La legislación sobre inoculantes para leguminosas en base a rizobios (Decretos 546/981 y 7/99) no permite la venta de inoculantes y semillas pre-inoculadas que no hayan sido registrados y aceptados por el MGAP y exige los siguientes requisitos: i) llegar a >2.000 millones de ufc/g o mL en la elaboración y > 1.000 millones de ufc/g o mL al vencimiento, ii) estar libre de contaminantes y iii) ser formulados con la/s cepas recomendadas suministradas por el MGAP. Esta normativa hace que, junto a Nueva Zelanda y Canadá, Uruguay sea un referente a nivel mundial en la producción y uso de inoculantes (Date, 2000).

En nuestros suelos, no siempre hay cepas que establezcan simbiosis con eficiencia adecuada en *Trifolium pratense* (trébol rojo) y *Trifolium repens* (trébol blanco) (Dutto, 2002, Batista *et al.*, 2015). Por esta razón, los tréboles se inoculan desde el año 1964 (Labandera, 2007) con *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* cepa U204 (=CIAT 2445) introducida de Estados Unidos (MGAP, 2017). La inoculación consiste en incorporar a la semilla o al suelo un alto número de rizobios. El método más utilizado es la inoculación a la semilla, que se realiza en el momento previo a la siembra (inoculación convencional). Los inoculantes pueden

## Capítulo 3. Ocupación de nódulos por el inoculante en semillas preinoculadas

presentarse en soporte turba, que se obtiene impregnando el soporte estéril con un cultivo con alta concentración bacteriana, o inoculantes líquidos diseñados en base a la obtención de caldos con alta concentración de bacterias. Otro método de aplicación del inoculante consiste en tratar a las semillas mediante un procedimiento industrial (preinoculadas). La viabilidad de los rizobios sobre las semillas preinoculadas debe ser conocida para garantizar que su uso no constituye un riesgo económico para el productor.

### 2. Preinoculación de semillas de trébol

Las semillas de trébol son más pequeñas que las semillas de otras forrajeras, lo que constituye una dificultad para lograr cumplir con el requerimiento del mínimo de rizobios por semilla (Dutto, 2002). Para esta leguminosa el MGAP exige una carga mínima de 1.000 ufc/semilla. Otro aspecto a considerar es que la siembra de trébol en praderas naturales por lo general es en cobertura, lo que implica mayor exposición del inoculante a condiciones medioambientales que pueden generar una pérdida de la efectividad.

La práctica de preinoculado comenzó en la década del 70, pero en ese momento no se obtuvieron resultados exitosos (Thompson *et al.*, 1975, Brockwell y Bottomley, 1995). Brockwell *et al.* (1975) y Gemmell *et al.* (2002) realizaron evaluaciones del procedimiento de preinoculación. Ambos ensayos revelaron baja sobrevivencia de los rizobios, lo que genera la polémica sobre el valor de la tecnología de preinoculado. Actualmente

existen alternativas tecnológicas que incluyen el uso de aditivos, bioprotectores, polímeros y el uso del coating para mejorar la sobrevivencia (Deaker *et al.*, 2004).

Para hacer posible la comercialización de semillas preinoculadas, el MGAP a través de la DGSA realiza los registros de estos insumos monitoreando el número de células por semilla en el tiempo así como el mantenimiento de las capacidades de nodulación y FBN. Para esto es necesario determinar:

1. Rizobios viables sobre la semilla en función del tiempo. Para la obtención del registro de semilla pre-inoculada se deben obtener recuentos de ufc/semilla iguales o superiores a los referentes dependiendo del tamaño de semilla; para el trébol 1.000 ufc/semilla.
2. La cepa usada como inoculante identificada mediante técnicas moleculares.
3. Validar la capacidad de nodulación.
4. Parámetros de nodulación y producción de biomasa aérea en condiciones controladas.
5. La eficiencia agronómica a campo.

En los ensayos de eficiencia agronómica en campo las tecnologías a validar deberán presentar respuesta igual o superior a la inoculación convencional u otras tecnologías ya recomendadas, (<http://sc-web-01/dgsainoculantes/inicioweb.aspx>. Protocolo de registro de semilla pre-inoculada, DGSA-MGAP).

Otros requisitos para la obtención del registro es que el inoculante y el cura semillas utilizado en el tratamiento de las semillas estén registrados en el MGAP, así como que el registrante esté asociado a una planta de tratamiento de semillas con el fin de garantizar el proceso.

## 2.1 Estrategia

Se realizaron dos ensayos en campo en los que se determinó la ocupación de nódulos por el inoculante, cepa U204, en semillas preinoculadas suministradas por las fábricas de inoculantes (Calister y Cía. y Lage y Cía. S.A.) que definieron una metodología de preinoculación. Las semillas preinoculadas se conservaron durante 15 y 30 días y se sembraron en 4 parcelas de 1,25 x 5 m en Glencoe sobre suelos Subeutricos Melánicos

Abrupticos y en La Estanzuela sobre Brunosol éutrico típico de la unidad Ecilda Paullier-Las Brujas. Antes de la siembra se determinó el número de rizobios viables sobre semilla según el MGAP (2013). La inoculación convencional se realizó según las instrucciones de los fabricantes, una hora antes de la siembra. A los 6 meses se cosecharon 10 plantas de cada parcela, los nódulos se esterilizaron superficialmente y conservaron a -20°C (Gutiérrez, 2017). Se aislaron rizobios de 80 nódulos de cada tratamiento, de cada sitio. A partir de cultivos puros de rizobios se aisló el ADN, se amplificó con *primers* ERIC, los fragmentos se resolvieron en geles de agarosa, que se analizaron con el programa GelCompar II versión 6.5, siguiendo el procedimiento descrito por Gutiérrez (2017). De cada tratamiento y sitio se resolvieron entre 25 y 40 perfiles.

## 2.2 Resultados

Las semillas se sembraron 15 y 30 días después de la preinoculación en La Estanzuela, un sitio con historia de inoculación de trébol, y en Glencoe, un suelo con historia de inoculación de trébol más acotada, pero donde hay cepas nativas parásitas (Labandera y Vicente, 1975).

### 2.3 Ensayo 1: Semillas sembradas 30 días después de preinoculadas

#### 2.3.1 La Estanzuela

El NMP de rizobios que nodulan trébol en ese sitio se sitúa en el orden de  $5 \times 10^4$  rizobios/g de suelo y la cantidad de rizobios viables fue 4.833 ufc/semilla. El análisis de los perfiles ERIC de 37 aislamientos obtenidos de nódulos de raíz principal del tratamiento semillas preinoculadas, evidenció 10 perfiles iguales al del inoculante, cepa U204. En el tratamiento inoculación convencional, de 45 aislamientos analizados, 43 perfiles eran iguales al inoculante (Fig. 1).

Estos resultados evidencian que si las semillas preinoculadas permanecen 30 días antes de ser sembradas, la ocupación de nódulos por el inoculante es tres veces menor (27%) respecto a cuando se inocula convencionalmente (95%) (Cuadro 1).



**Cuadro 1.** Ocupación de nódulos por el inoculante U204 en plantas provenientes de semillas preinoculadas. Se evaluaron 37 nódulos del tratamiento preinoculado y 45 para el tratamiento inoculación convencional. Los datos se analizaron con un modelo lineal general mixto, letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos mediante LSD Fisher con  $p < 0,05$ .

Tratamientos	Media de ocupación
Inoculado convencional	0,95 a
Preinoculado	0,27 b

### 2.3.2 Tacuarembó

El NMP de rizobios que nodulan trébol en este sitio se situó en el orden de  $7 \times 10^1$  rizobios/g de suelo, en aquellos suelos con historia de trébol y la cantidad de rizobios viables fue 4.833 ufc/semilla. El análisis de los perfiles ERIC de 32 aislamientos de nódulos de raíz principal del tratamiento semillas preinoculadas, evidenció 5 perfiles iguales al del inoculante, cepa U204. En el tratamiento inoculación convencional, de 32 aislamientos analizados, 16 perfiles eran iguales al inoculante. Estos resultados evidencian que si las semillas preinoculadas permanecen 30 días sin ser sembradas, la ocupación de nódulos por el inoculante es 3 veces menor (15%) respecto a cuándo se inocula convencionalmente (50%) (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Ocupación de nódulos por el inoculante U204 en plantas provenientes de semillas preinoculadas. Se analizaron 64 nódulos, 32 para cada tratamiento. Los datos se analizaron mediante un modelo lineal general mixto, letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos mediante LSD Fisher con  $p < 0,05$ .

Tratamientos	Media de ocupación
Inoculado convencional	0,50 a
Preinoculado	0,15 b

## 2.4 Ensayo 2: Semillas sembradas 15 días después de preinoculadas

### 2.4.1. La Estanzuela

La cantidad de rizobios viables fue 10.233 ufc/semilla, a los 15 días de preinoculadas. Se evaluaron 37 perfiles ERIC de aislamientos de nódulos de raíz principal desarrollados en plantas de semillas preinoculadas, sembradas 15 días después de la preinoculación. La cepa comercial estaba presente en 13 nódulos. En el control, correspondiente al tratamiento inoculación convencional, de 40 aislamientos analizados, 33 perfiles ERIC eran iguales al inoculante.

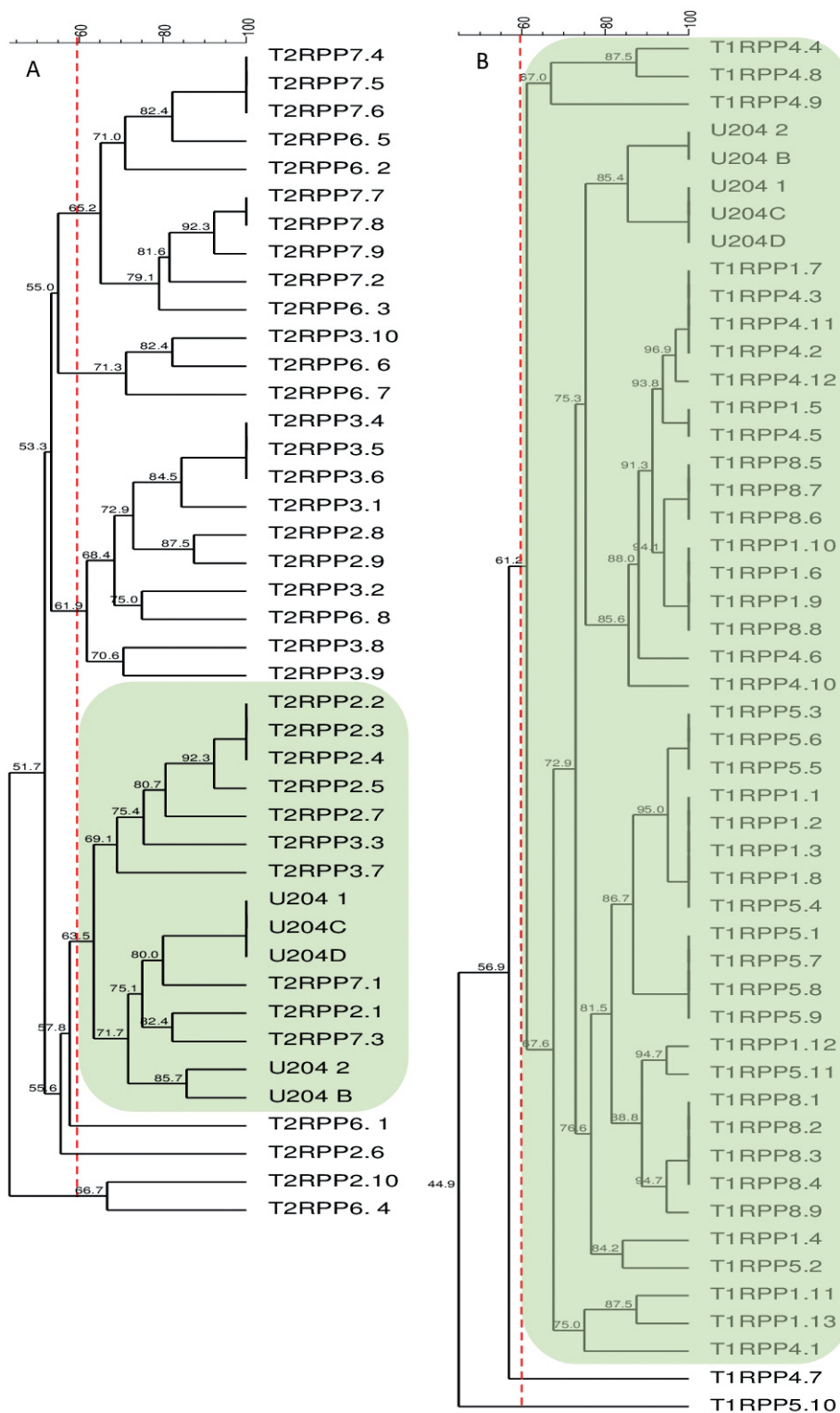
Estos resultados evidencian que si las semillas preinoculadas permanecen 15 días sin ser sembradas, la ocupación de nódulos por el inoculante es 2 veces menor (35%) respecto a cuando se inocula convencionalmente (83%) (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Ocupación de nódulos por el inoculante U204 en plantas provenientes de semillas preinoculadas. Se evaluaron 37 nódulos del tratamiento preinoculado y 40 del tratamiento inoculación convencional. Los datos se analizaron con un modelo lineal general mixto, letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos mediante LSD Fisher con  $p < 0,05$ .

Tratamientos	Media de ocupación
Inoculado convencional	0,83 a
Preinoculado	0,35 b

### 2.4.2. Glencoe

La cantidad de rizobios viables a los 15 días de preinoculadas las semillas, fue 10.233 ufc/semilla. Se evaluaron 27 perfiles ERIC de aislamientos de nódulos de raíz principal desarrollados en plantas de semillas preinoculadas, sembradas 15 días después de la preinoculación. La cepa comercial estaba presente en 9 nódulos. En el control, correspondiente al tratamiento inoculación convencional, de 25 aislamientos analizados, 15 perfiles ERIC eran iguales al inoculante.



**Figura 1.** Dendrograma representativo de perfiles ERIC de aislamientos de nódulos obtenidos en La Estanzuela. A. Semillas preinoculadas. B. Semillas inoculadas convencionalmente. Se consideran iguales entre sí a los perfiles con una similitud del 60% o más (identificados dentro de recuadros verde). Los perfiles se analizaron con el software Gel Compare.

Estos resultados evidencian que si las semillas preinoculadas permanecen 15 días sin ser sembradas, la ocupación de nódulos por el inoculante es 1,7 veces menor (33%) respecto a cuando se inocula convencionalmente (60%) (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Ocupación de nódulos por el inoculante U204 en plantas provenientes de semillas preinoculadas. Se evaluaron 27 nódulos del tratamiento preinoculado y 25 del tratamiento inoculación convencional 25. Los datos se analizaron con un modelo lineal general mixto, letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos mediante LSD Fisher con  $p < 0,05$ .

Tratamientos	Media de ocupación
Inoculado convencional	0,60 a
Preinoculado	0,33 b

De esta forma, el número de rizobios viables por semilla a los 15 días de preinoculadas es el doble respecto al número de viables a los 30 días y, en ambos tiempos, la cantidad de rizobios viables

por semilla fue superior al mínimo exigido por el MGAP.

En estudios realizados en condiciones de laboratorio, se obtuvo el doble de ufc/semilla cuando las semillas fueron inoculadas de manera convencional respecto a las semillas 15 días después de preinoculadas. En ambos casos el número de rizobios cultivable por semilla superó ampliamente el requerimiento establecido por el MGAP. Sin embargo, la ocupación de nódulos en plantas desarrolladas de semillas preinoculadas fue menor en plantas desarrolladas de semillas inoculadas convencionalmente. Sin embargo, en condiciones de laboratorio con semillas sembradas en macetas, crecidas a 23°C y regadas a capacidad de campo, se obtuvo igual número de nódulos por planta, independientemente del tipo de inoculación practicada (Sabattini, 2018 tesis en prensa). Es posible que la infectividad de los rizobios sea menor en las semillas preinoculadas en condición de campo, debido a condiciones medioambientales principalmente humedad y temperatura.



### 3. Bibliografía

**Batista L, Irisarri P, Rebuffo M, Coitiño MJ, Sanjuán J, Monza J.** 2015. Nodulation competitiveness as a requisite for improved rhizobial inoculants of *Trifolium pratense*. *Biology and Fertility of Soils*, 51(1):11-20.

**Brockwell J, Herridge D F, Roughley R J, Thompson J A, Gault R R.** 1975. Studies on seed pelleting as an aid to legume seed inoculation.4. Examination of preinoculated seed. *Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb.*, 15,780-78.

**Brockwell J, Bottomley P J, Thies J.** 1995. Manipulation of rhizobial microflora for improving legume productivity and soil fertility: aential assessment *Plant and Soil* 174.

**Date R.** 2000. Inoculated legumes in cropping systems of the tropics. *Field Crops Research*, 65(2): 123-136.

**Deaker R, Roughley R, Kennedy I.** 2004. Legume seed inoculation technology—a review. *Soil Biology & Biochemistry* 36 (2004) 1275–1288.

**Dutto P.** 2002. Recomendaciones para situaciones con problemas: Inoculación de Leguminosas. *Revista del Plan Agropecuario*, 102: 54-57.

**Gemmell F, Varjo J, Strandstrom M, Kuusk A.** 2002 Comparison of measured boreal forest characteristics with estimates from TM data and limited ancillary information using reflectance model inversion. *Remote Sens. Environ.*, 81.

**Gutiérrez P.** 2017. Evaluación de rizobios para el desarrollo de un inoculante eficiente y competitivo de *Trifolium repens*. Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 36-46.

**Labandera C.** 2007. Actividades en fijación biológica de nitrógeno: situación actual y perspectivas en Uruguay. En: Izaguirre-Mayoral ML, Labandera C, y Sanjuán J (Eds). *Biofertilizantes en Iberoamérica una visión técnica, científica y empresarial*. Red Iberoamericana de Biofertilizantes Microbianos para la Agricultura. Montevideo, Denad Internacional S A. 75-78 p.

**Labandera C, Vincent J.** 1975. Competition between an introduced strain and native Uruguayan strains of *Rhizobium trifolii*. *Plant and Soil*, 42(2): 327- 347.

**Lindström K, Mousavi S.** 2010. *Rhizobium* and Other N-fixing Symbioses. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.

**MGAP** (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca). 2017. Dirección General de Servicios Agrícolas [En línea]. En: Sistema de control de calidad de inoculantes: Catálogo de la Colección Nacional de cepas de rizobios de Uruguay. Montevideo. Consultado 10 marzo 2017. Disponible en: <http://sc-web-01/dgsainoculantes/inicioweb.aspx>

**Thompson R, Battarbee R, O'Sullivan P, Oldfield F.** 1975: Magnetic susceptibility of lake sediments. *Limnol. Oceanogr.* 20. 687-698.

Tartaglia C. <sup>1</sup>, Gutiérrez P. <sup>1</sup>, Sabatini O. <sup>1</sup>, Irisarri P. <sup>2</sup>, Signorelli S. <sup>1</sup>, Rebuffo M. <sup>3</sup> y Monza J. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Uruguay.

<sup>2</sup> Laboratorio de Microbiología de Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Uruguay.

<sup>3</sup> Programa Nacional Pasturas y Forrajes, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA La Estanzuela, INIA Tacuarembó, INIA Treinta y Tres).

## Capítulo 4. Caracterización de rizobios que nodulan *Trifolium polymorphum*

### 1. Diversidad y eficiencia simbiótica de rizobios que nodulan *Trifolium polymorphum*

El trébol perenne nativo *Trifolium polymorphum* Poir., comúnmente llamado polimorfo o subterráneo, está presente en diferentes regiones de Uruguay. Las cepas indígenas que lo nodulan se consideran incompatibles con tréboles mediterráneos introducidos (Yates *et al.*, 2005) y según varios autores estos rizobios establecen relaciones de tipo parásita con *T. repens* y *T. pratense* (Labandera y Vincent, 1975; Dutto, 2002; Reeve *et al.*, 2010, 2013). De todas formas, las observaciones realizadas a lo largo de muchos años, no siempre documentadas, evidencian una situación problema poco estudiada a pesar de su importancia agronómica.

Un aporte reciente se ha hecho con la secuenciación de los genomas completos de las cepas WSM 597 aislada del trébol anual *Trifolium pallidum* (Reeve *et al.*, 2010) y WSM 2032 aislada de *T. polymorphum* (Reeve *et al.*, 2013), ambas colectadas en suelo de la Estación Experimental Glencoe de INIA Tacuarembó. En este proyecto se generó y caracterizó una colección de cepas

aisladas de *T. polymorphum* de diferentes sitios de Uruguay.

#### 1.1 Estrategia

Para conocer el efecto de la nodulación de trébol blanco por cepas aisladas de nódulos de *T. polymorphum* se generó una colección de cepas a partir de plantas colectadas en diferentes suelos sin historia de trébol blanco (cuadro 1). Los aislamientos se realizaron a partir de 2-3 nódulos por planta, tomados de diferentes zonas de la raíz y se identificaron a partir de perfiles ERIC, generados y analizados según Batista *et al.* (2015). Con las cepas con diferente perfil se generó una colección que se conserva a -80°C. La eficiencia simbiótica de todas las cepas de la colección y las cepas eficientes U204, N2 y 317 se evaluó en trébol blanco, mientras que en *T. polymorphum* se incluyeron las cepas P3 y P18 (aisladas de ese hospedero) y la cepa U204. El ensayo se hizo en condiciones controladas, en arena vermiculita, con 3 plantas por maceta y 5 repeticiones por tratamiento según Gutiérrez (2017). Los resultados se analizaron mediante un modelo lineal general y mixto, con corrección de la heterocedasticidad de varianzas.

**Cuadro 1.** Sitios de colecta de los aislamientos de *Trifolium polymorphum*. Todas las plantas se colectaron en sitios sin historia de pradera.

Sitio	Región	Tipo de suelo
Glencoe, Paysandú, INIA Tacuarembó 32°01'S, 57°09'O	Basalto	Profundidad y fertilidad medias
La Magnolia, INIA Tacuarembó 31°41'S, 55°48'O	Areniscas de Tacuarembó	Profundos y fertilidad media
Unidad Experimental Palo a Pique, INIA Treinta y Tres 33°15'S, 54°28'O	Lomadas del Este	Profundidad y fertilidad media
Cuchilla de los Ladrones, Treinta y Tres 33°0'S, 54°36'O	Lomadas del Este	Profundidad y fertilidad media
Arequita, Lavalleja 34°17'S, 55°16'O	Cristalino del Este	Profundidad y fertilidad media
Canelones 34°44'S, 55°38'O	Sedimentos cuaternarios	Profundidad y fertilidad elevada

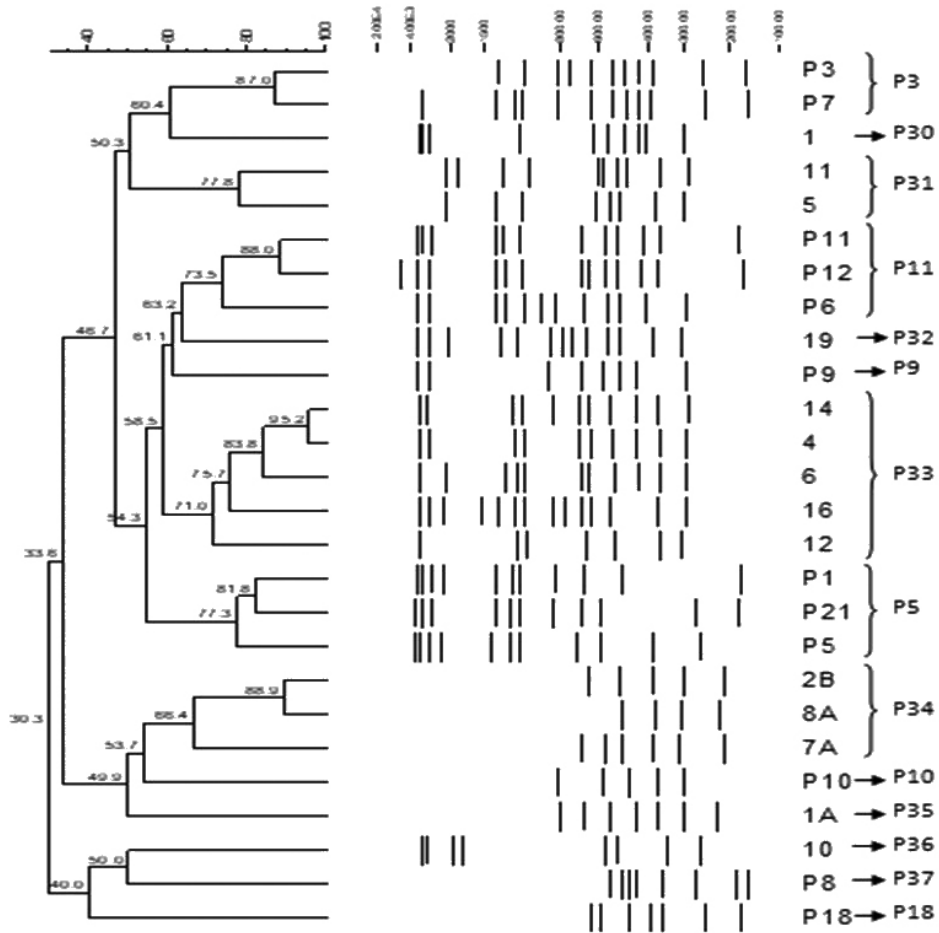
La cinética de nodulación y número total de nódulos inducidos en trébol blanco por cepas aisladas de *T. polymorphum* (P3 y P18) se comparó con las cepas eficientes U204 y 317. El ensayo se realizó en tubo con medio Jensen a diferentes pH (4,5 y 5,5) según Gutiérrez (2017).

Para estimar la competitividad en trébol blanco de cepas ineficientes respecto a eficientes se realizó un ensayo de coinoculación, en el que se evaluó a la cepa ineficiente P3 respecto a las cepas eficientes U204 y 317 marcadas con el gen delator *gusA* (U204::*gusA* y 317::*gusA* respectivamente, Capítulo 2). Para esto se siguió el procedimiento descrito por Gutiérrez (2017).

## 1.2 Resultados

### 1.2.1 Generación de una colección de aislamientos de *Trifolium polymorphum*

Se obtuvieron aislamientos de rizobios de nódulos de *T. polymorphum* de plantas colectadas de Glencoe (Paysandú), La Magnolia (Tacuarembó), Cuchilla de los Ladrones (Treinta y Tres), Palo a Pique (Treinta y Tres), Arequita (Lavalleja) y Canelones. El análisis de conglomerados con los perfiles ERIC generados a partir de los aislamientos colectados en estos sitios (Cuadro 1) permitió distinguir 14 cepas diferentes (Fig. 1).



**Figura 1.** Dendrograma con perfiles ERIC de aislamiento de *T. polymorphum*. Se consideran perfiles iguales con más del 65% de similitud según el coeficiente de Dice (1945).

Como se observa en la figura 1, una cepa puede corresponder a un aislamiento o a un grupo de aislamientos, procedente de diferentes sitios

(Cuadro 2). De cada cepa se conservó un aislamiento de un origen geográfico, que figura en negrita en el cuadro 2.

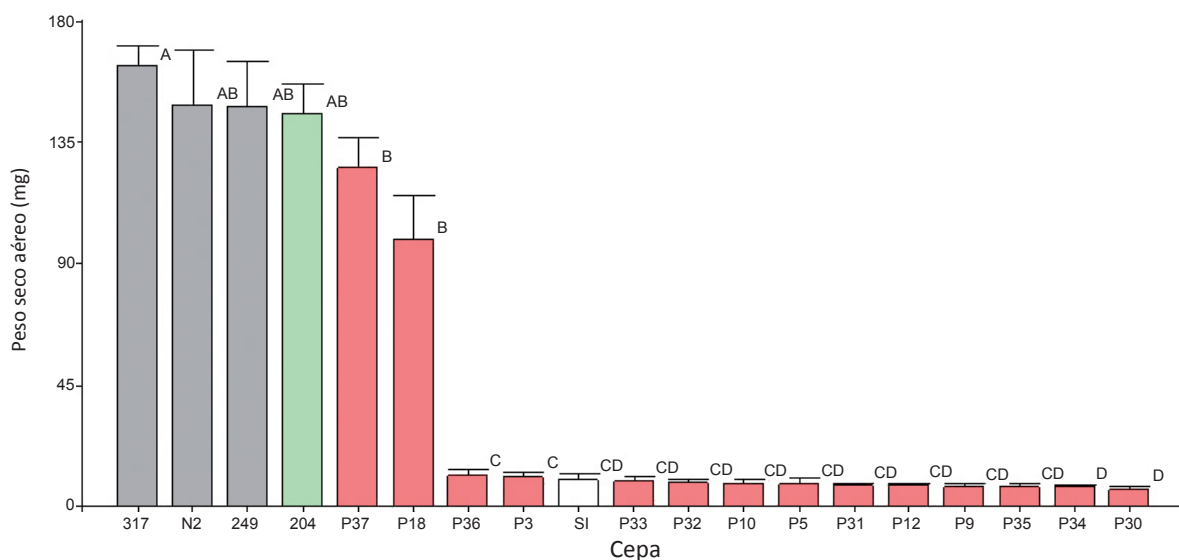
**Cuadro 2.** Origen de las cepas de *T. polymorphum* conservadas en el cepario. En negrita se indica la procedencia de la cepa conservada en la colección.

Cepa	Sitios
P3	<b>Palo a Pique</b> , Cuchilla de los Ladrones y Arequita
P5	<b>Palo a Pique</b> y Glencoe
P9	<b>Palo a Pique</b>
P10	<b>Glencoe</b> y La Magnolia
P11	<b>La Magnolia</b> y Cuchilla de los Ladrones
P18	<b>Glencoe</b>
P30-P36	<b>Canelones</b>
P37	<b>Cuchilla de los Ladrones</b>

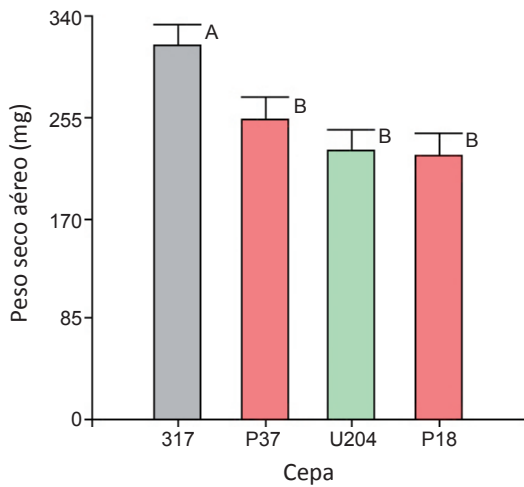
### 1.2.2 Eficiencia simbiótica y nodulación de cepas aisladas de *T. polymorphum* en *T. repens*

La eficiencia simbiótica en condiciones controladas de las 14 cepas aisladas de *T. polymorphum* se evaluó en trébol blanco, en plantas crecidas a pH 6,5. Un grupo de cepas, incluyendo las cepas P37 y P18, estableció simbiosis eficiente, es decir produjo más materia seca que el control sin inocular e igual al inoculante comercial U204; sin embargo, las cepas P37 y P18 produjeron menos que el tratamiento inoculado con la cepa 317 (Fig.2). El otro grupo de cepas (P3, P36, P33, P32, P10, P5, P31, P12, P9, P35, P34 y P30) es ineficiente en trébol blanco, con la misma producción de biomasa que el control sin inocular (Fig. 2).

A los 30 días de instalado el ensayo, las plantas inoculadas con las cepas ineficientes presentaron síntomas de clorosis, por lo que el ensayo se levantó en un tiempo inferior al previsto. Sólo se determinó el crecimiento en los tratamientos inoculados con las cepas eficientes 15 días después del primer corte (Fig. 3). Por otro lado, las demás cepas son ineficientes. La cepa P18 y P37 pertenecen al grupo que produjo más biomasa que el tratamiento sin inocular pero igual al inoculante comercial. La producción de biomasa de trébol blanco inoculado con aislamientos de *T. polymorphum* evidencia que no todas las cepas aisladas de este trébol nativo establecen relaciones ineficientes – parásitas, dado que las cepas P18 y P37 tienen la misma eficiencia simbiótica que la cepa U204, aunque inferior a la cepa 317 aislada por Batista *et al.* (2015).



**Figura 2.** Biomasa de la parte aérea producida por trébol blanco en el primer corte. Se usaron como inoculantes cepas aisladas de *T. polymorphum* (rojo), de *T. pratense* (gris) y al inoculante comercial (verde); se incluyó un control sin inocular, SI (blanco). La materia seca de la parte aérea se determinó a los 30 días. La unidad experimental fue la maceta con tres plantas cada una y 5 repeticiones por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas según Tukey con  $p < 0,05$ .



**Figura 3.** Biomasa de la parte aérea producida por trébol blanco en el segundo corte. Como inoculantes se usaron cepas aisladas de *T. polymorphum* (rojo), de *T. pratense* (gris) y al inoculante comercial (verde). La unidad experimental fue la maceta con tres plantas cada una. Se realizaron 5 repeticiones de cada tratamiento y el segundo corte se hizo 15 días después del primero, realizado a los 30 días de la siembra. Letras diferentes indican diferencias significativas según Tukey con  $p < 0,05$ .

La nodulación de trébol blanco por las cepas P3, P18 se comparó con la cepa U204 en medio Jensen, y se evaluó el tiempo de aparición del

primer nódulo, la cinética de nodulación durante 21 días y el número total de nódulos por planta a los 30 días (Cuadro 3). La cepa P3 induce la aparición del primer nódulo antes que las cepas P18 y U204 y también alcanzó la mayor cantidad de nódulos totales, ambas características de cepas ineficientes – parásitas.

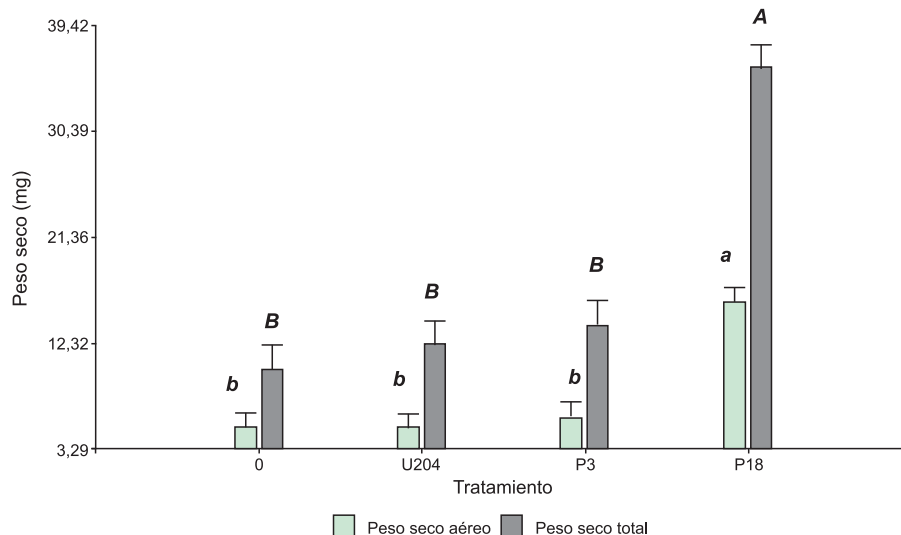
**Cuadro 3.** Nodulación de trébol blanco por cepas aisladas de trébol polimorfo. El ensayo se realizó en medio Jensen (pH 7).  $\beta$  corresponde al valor de la pendiente del número de nódulos en función del tiempo en días y nódulos totales a la media del número de nódulos por planta a los 30 días. Letras diferentes indican diferencias significativas en cada variable según DGC con  $p < 0,05$ .

CEPA	$\beta$	Aparición del 1 <sup>er</sup> nódulo en días	Nódulos totales
P3	0,35 a	8 b	20 a
P18	0,17 b	11:00 A	6 b
U204	0,18 b	10:00 A	2 b

La nodulación de trébol blanco por las cepas eficientes (P18, N2, 317 y U204) e ineficiente (P3) se evaluó en medio Jensen a pH 4,5 y 5,5. Se consideró el tiempo de aparición del primer nódulo y el número total de nódulos por planta a los 30 días (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Nodulación de trébol blanco por cepas eficientes e ineficientes a diferentes pH. El ensayo se realizó en medio Jensen a pH 4,5 y 5,5. Nódulos totales corresponden a la media del número de nódulos por planta a los 30 días. Letras diferentes indican diferencias significativas en cada variable según LSD Fischer con  $p < 0,05$ .

Cepa	Aparición del 1 <sup>er</sup> nódulo en días		Nódulos totales	
	pH 4,5	pH 5,5	pH 4,5	pH 5,5
P3	18 a	18 a	2,4 c	6,9 a
P18	12 b	12 b	4,5 ab	2,2 cd
N2	12 b	11 b	4,8 ab	4,8 ab
U204	11 b	11 b	1,4 d	2,1 cd
317	11 b	13 b	3,4 bc	2,7 bc



**Figura 4.** Eficiencia simbiótica en *T. polymorphum*. Las cepas P3 y P18 se aislaron de nódulos de *T. polymorphum* y la cepa U204 es el inoculante para trébol blanco. 0 corresponde al control sin inocular. Letras diferentes indican diferencias significativas para medias de peso seco aéreo (minúsculas) y total (mayúsculas) según Tukey con  $p < 0,05$ . (Tomado de Gutiérrez, 2017).

Las cepas ineficientes producen abundante nodulación (Melino *et al.* 2012). El tiempo de aparición del primer nódulo fue el mismo para las cepas U204, P18, N2 y 317 a pH 4,5 y 5,5. Sin embargo, en ambos pH, la cepa P3 indujo el primer nódulo 6 días después que las otras. El número total de nódulos en las raíces de las plantas inoculadas con la cepa P3 y P18 fue diferente a los dos pH (Cuadro 4). La cepa eficiente N2 formó más nódulos en ambos pH, mientras que la cepa ineficiente P3 logró un alto número sólo a pH 5,5. Las cepas ineficientes forman un alto número de nódulos por planta, aunque en esta investigación se ha demostrado que el comportamiento es dependiente de la acidez del medio de cultivo.

### 1.2.3 Eficiencia simbiótica y nodulación de aislamientos de *T. polymorphum* en ese hospedero

En plantas crecidas 60 días se determinó la producción de la biomasa aérea, de raíz y total. Se estimó el peso de raíz porque *T. polymorphum* acumula reserva en el sistema radicular. La cepa P18 tuvo la mayor eficiencia simbiótica en *T. polymorphum*, tanto en la producción de biomasa aérea como de la planta total (Fig. 4). La cepa

P3 es también ineficiente en trébol polimorfo. Estos resultados evidencian que no todos los aislamientos de *T. polymorphum* son eficientes en ese hospedero, ni que son ineficientes-parásitos en trébol blanco.

La nodulación se estimó según el tiempo de aparición del primer nódulo y el número de nódulos totales por planta. La cepa P3 indujo la formación de nódulos 2 días antes que la cepa U204 (Cuadro 5) y su tasa de nodulación fue mayor a la de las cepas U204 y P18. El número total de nódulos en raíces de plantas inoculadas con la cepa P3 fue 6 veces mayor que el inducido por la cepa U204 y 3 veces mayor que por la cepa P18.

**Cuadro 5.** Nodulación de *T. polymorphum*. Las cepas P3 y P18 se aislaron de *T. polymorphum* y la cepa U204 es el inoculante comercial para trébol blanco. Cada tratamiento incluyó 5 macetas con 5 plantas cada una. Letras diferentes indican diferencias significativas según DGC con  $p < 0,05$ .

Cepa	Nódulos totales
P3	17 a
P18	11 b
U204	13 b



En *T. polymorphum* y en *T. repens* la cepa P3 formó la mayor cantidad de nódulos (Cuadro 5) e indujo la menor producción de biomasa (Fig. 4). Las cepas P18 y U204 no se diferenciaron en el número de nódulos inducidos en cada trébol (Cuadros 3 y 5). Melino *et al.* (2012) obtuvieron resultados similares con la cepa WSM2304 aislada de *T. polymorphum* cuando se inoculaba en *T. subterraneum* y *T. purpureum*. Esa cepa indujo la menor cantidad de biomasa en esos genotipos, pero ocupó el doble de nódulos que la cepa eficiente WSM1325.

#### 1.2.4 Competitividad en *T. repens* de la cepa ineficiente P3 vs. cepas eficientes

Para estimar la competitividad de la cepa P3 ineficiente en trébol blanco, respecto a las cepas eficientes U204 y 317, se usaron clones marcados con el gen *gusA* (U204::*gusA* y 317::*gusA*), para el ensayo de coinoculación. Las semillas pregerminadas sembradas en tubos con medio Jensen se inocularon con las cepas P3 y U204::*gusA* y P3 y 317::*gusA* crecidas entre 2,6 y 4,0 x 10<sup>7</sup> ufc/mL. La relación entre la cantidad de nódulos azules respecto al total de nódulos se determinó 30 días después de inoculadas las plantas.

Cuando se inoculó con 317::*gusA* y P3 en relación 1:1 y 1:2 la cepa 317 ocupó el 100 % de los nódulos. Cuando se inoculó con las cepas U204::*gusA* y P3 en relación 1:1 la cepa U204 ocupó el 72 % de los nódulos, mientras que cuando se inoculó con una relación 1:2 la cepa U204 ocupó 60 % de los nódulos, en ambos casos con diferencias significativas respecto a la cepa 317. Los resultados evidencian que la cepa 317 es más competitiva que la cepa U204. Si bien este resultado surge de la evaluación de una cepa parásita – ineficiente en condiciones in vitro, la competitividad de la cepa P3 es muy baja respecto a la de las cepas usadas como inoculantes, de manera que no supondrían una amenaza para trébol blanco si este se inocula.

Cuando las cepas no son efectivas pueden no infectar a la raíz por aborto del canal de infección, fallos en la ontogenia del nódulo, no diferenciación de bacteroides, o porque no fijan de nitrógeno (Schumpp y Deakin, 2010; Gamas *et al.*, 1998; Vasse *et al.*, 1993). Desde hace décadas se ha propuesto que las leguminosas pueden “distinguir” entre cepas efectivas e inefectivas de rizobios (Jones y Hardarson, 1979). Si bien hay evidencias de que algunas leguminosas son noduladas

preferencialmente por simbiontes efectivos, lo que se denomina nodulación selectiva (Howieson *et al.*, 2005), también se ha reportado la nodulación de leguminosas con simbiontes inefectivos en condiciones de laboratorio y en campo (Reeve *et al.*, 2010, 2013; Melino *et al.*, 2012; Drew y Ballard, 2010; Howieson *et al.* 2005; Yates *et al.* 2003, 2005; Ballard *et al.* 2004; Denton *et al.* 2000; Pryor y Lawther, 2004; Sadowsky y Graham, 1998). De ocurrir nodulación selectiva, las cepas provenientes de *T. polymorphum* y parásitas en trébol blanco ocuparían pocos nódulos y no serían responsables del fracaso de los mejoramientos de campo natural. De todas formas, esta hipótesis no ha sido demostrada. Denton *et al.* (2003) analizaron la ocupación de nódulos de *T. alexandrinum* y el inoculante comercial no compitió con las cepas naturalizadas. Lo mismo observaron Wielbo *et al.* (2010) en trébol rojo, donde las cepas menos eficientes ocuparon más nódulos que las más eficientes, que solo ocuparon un 2,5 %.

Nuestros resultados en trébol rojo (Batista *et al.*, 2015) y trébol blanco (Gutiérrez, 2017) obtenidos en laboratorio y campo, no evidencian que la planta seleccione a favor de las cepas eficientes si consideramos como tal sólo al inoculante comercial U204 usado en los ensayos. Cuando en diferentes suelos se inoculó con cepas marcadas, en plantas de 60 días los inoculantes U204 y 317 ocuparon más nódulos, pero desconocemos la eficiencia de las cepas presentes en esos suelos (Capítulo 2).

## 2. Respuesta de la planta frente a la infección por cepas ineficientes – parásitas

La baja eficiencia de algunos inoculantes se ha relacionado con la presencia de una microflora nativa o introducida, competitiva pero poco eficiente. Esta situación es común cuando se usan tréboles perennes y anuales en la agricultura (Yates *et al.*, 2003; Dutto, 2002; Patrick y Lowther, 1995; Thornton y Davey, 1983). En Uruguay, en chacras donde se sembró trébol blanco (perenne) la siembra de *T. vesiculosum* (anual) fracasa, lo que se atribuye a una población remanente de la cepa U204, que establece una relación ineficiente con ese trébol (Dutto, 2002). Sin embargo, la cepa U204 no persiste en nuestros suelos (Batista *et al.*, 2015; Gutiérrez, 2017). Una situación similar es reportada para trébol blanco sembrado en regiones donde hay cepas nativas que nodulan *T. polymorphum* (Labandera y Vincent, 1975; Dutto, 2002).



Las causas de estas situaciones no se conocen. Pero se sabe que en la interacción leguminosa - rizobios, la planta produce especies reactivas del oxígeno (ERO) desde el inicio de la infección y durante la ontogenia del nódulo y que los rizobios, además de inducir la expresión de factores de nodulación, también inducen la expresión de genes que codifican peroxirredoxinas clase III en pelos radiculares (Breakspear *et al.*, 2014; Damiani *et al.*, 2016). Esto indica que las ROS juegan un papel en la interacción leguminosa-rizobio y que la raíz controla los niveles de peróxido de hidrógeno.

Las bacterias, frente al incremento de ROS producen enzimas como la superóxido dismutasa, glutatión S-transferasa y catalasa, con actividades que pueden ser imprescindibles para el establecimiento y mantenimiento de la simbiosis (Jamet *et al.*, 2007). También el rizobio produce cantidades de exopolisacáridos que actúan como barrera para protegerse de las ROS generadas en la interacción planta bacteria (Jaszek *et al.* 2014). Además es conocido que la funcionalidad subóptima de los nódulos está relacionada con la senescencia temprana de los bacteroides (Melino *et al.*, 2012) y que las ERO desencadenan senescencia en diferentes órganos de la planta. Así, la ineficiencia de una cepa puede deberse a la cantidad de ERO producidas por la planta, a su producción prolongada en el tiempo, o a insuficientes exopolisacáridos que protegen a los rizobios. De esta forma, la baja funcionalidad de los nódulos puede estar relacionada a un desbalance en la producción de ROS, que es la hipótesis de esta actividad. Por esto, para conocer la respuesta de la planta frente a cepas eficientes e ineficientes se evaluó la producción de ERO por raíces y nódulos de trébol blanco.

## 2.1 Estrategia

La anatomía de nódulos de trébol blanco inducidos por las cepas P3, P18 y U204 se analizó en plantas crecidas 30 días en arena-vermiculita. Los nódulos se cortaron con micrótopo y se colorearon con azul de toluidina (Gutiérrez, 2017).

La detección de superóxido, peróxido de hidrógeno y óxido nítrico se realizó a los 10, 30 y 60 min y 72

h post inoculación, en raíces de plantas crecidas 2 días en medio Jensen – agar 0.8% en placas de Petri. El superóxido se determinó con NBT (*nitro bluetetrazolium*), el peróxido de hidrógeno con DAB (*diaminobenzidine*) y el óxido nítrico con sonda DAF según Signorelli *et al.* (2016). Los lípidos peroxidados en nódulos de trébol blanco luego de 60 días de inoculados se determinaron a través de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), según Signorelli *et al.* (2015).

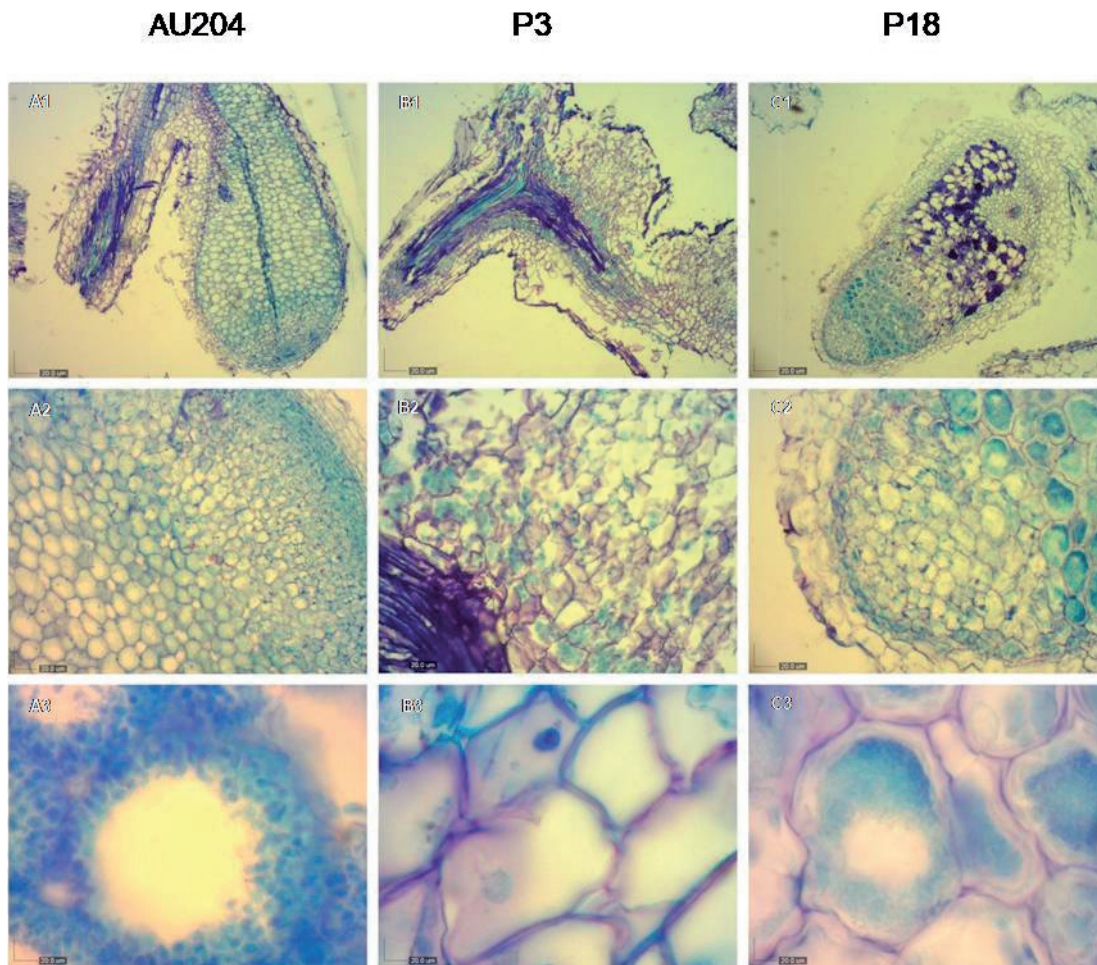
## 2.2 Resultados

### 2.2.1 Anatomía de nódulos de *T. repens* inducidos por cepas aisladas de *T. polymorphum*

La observación de raíces de trébol blanco de plantas de campo puso en evidencia una diversidad de tamaño, forma, color y cantidad de nódulos presentes en ellas (Gutiérrez, 2017). Los nódulos inducidos por la cepa P3 son pequeños y blancos, y el análisis microscópico mostró estructuras sin forma definida (Fig. 5 B1 – B3) con células sin bacteroides. Melino *et al.* (2012) denominaron nódulos vegetativos inefectivos a un fenotipo similar de nódulos inducidos por cepas de *R. leguminosarum trifolii* en *T. subterraneum* y *T. polymorphum*.

La anatomía microscópica de nódulos inducidos por la cepa U204 evidenció tres zonas definidas (Fig. 5); la zona I corresponde al meristemo apical, la zona II a la de infección y la zona III, con células llenas de bacteroides y almidón, es donde ocurre la FBN (Gutiérrez, 2017).

Los nódulos inducidos por las cepas P18 y U204 son de tamaño similar, pero la zona senescente es marcadamente más extensa cuando están ocupados por la cepa P3 (Fig. 5, C1 – C3). Esto permite suponer que más allá de los 30 días estos nódulos puedan ser no funcionales y presenten senescencia total. En nódulos de *T. subterraneum* y *T. purpureum* inducidos por dos cepas de *R. leguminosarum* bv *trifolii* Melino *et al.* (2012) observaron que fijan poco N y que los bacteroides tienen senescencia temprana, probablemente debida a la respuesta de defensas de la planta.

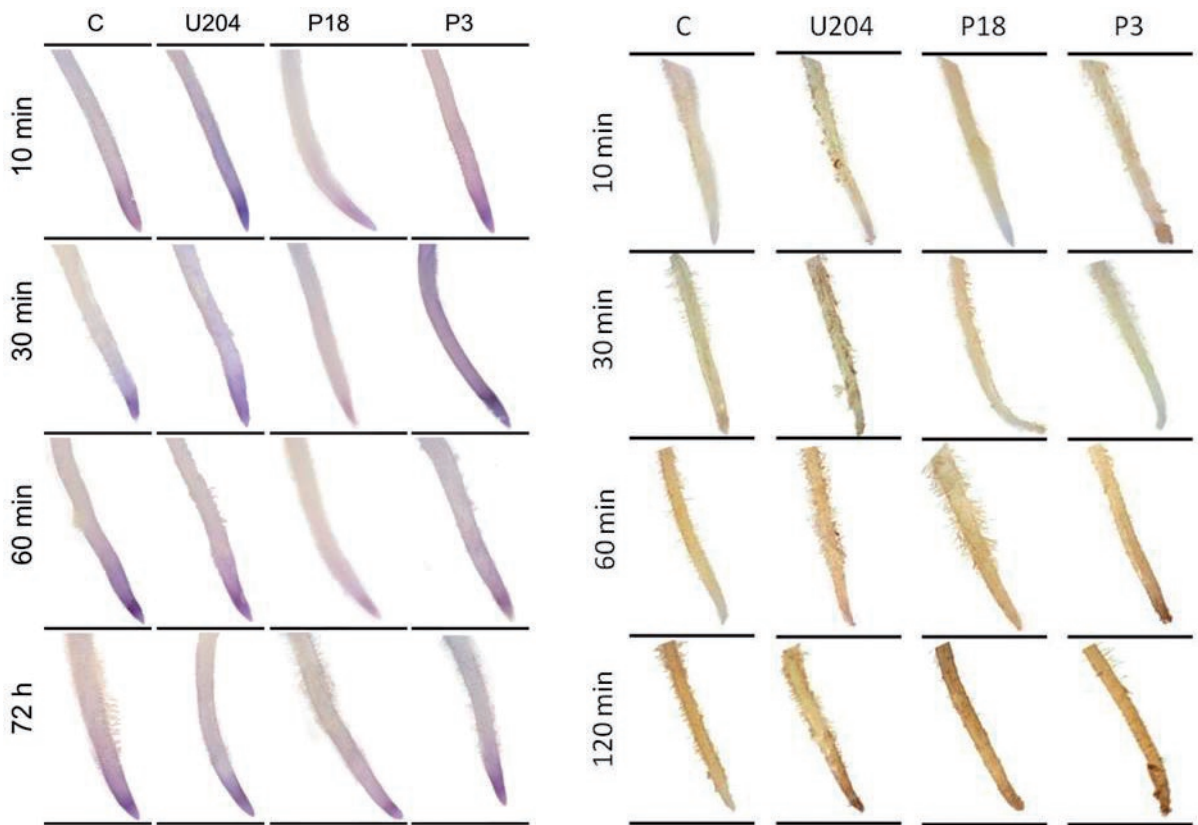


**Figura 5.** Microscopía de nódulos de trébol blanco ocupados por cepas con distinta eficiencia simbiótica. A. Nódulos inducidos por la cepa U204, B. por la cepa P3 y C. por la cepa P18. 1, 2 y 3 corresponden a aumentos de 4X, 20X y 100X respectivamente, a excepción de A2 (aumento 10X). Las imágenes se obtuvieron con el programa DinoCapture 2.0. (Gutiérrez, 2017).

### 2.2.2 Respuesta de la planta medida por la producción de ROS

La producción de superóxido se determinó *in vivo* en raíces incubadas con las cepas P3, P18 y U204, con eficiencia simbiótica en trébol blanco baja, media y alta, respectivamente. En los tiempos ensayados no se detectó diferencia en la producción de superóxido entre las raíces en presencia de las distintas cepas ni con el control sin inocular (Fig. 6 A). Solo en las raíces incubadas con la cepa P3 30 min se observó mayor producción de superóxido respecto al control pero esta diferencia no es concluyente.

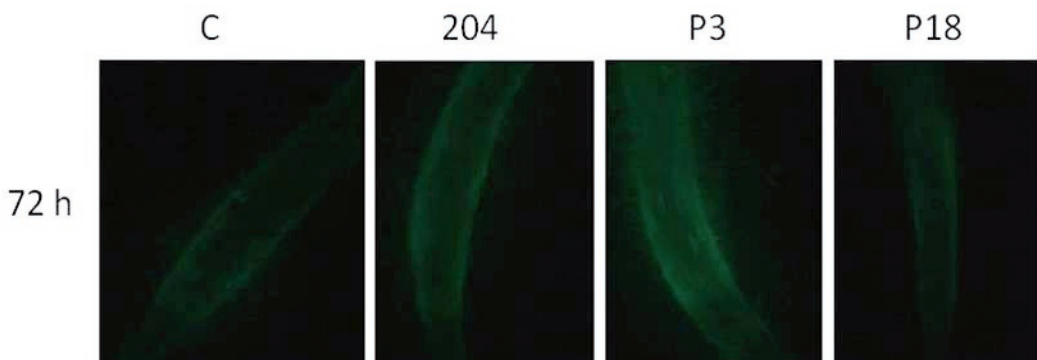
La máxima acumulación de  $H_2O_2$  tuvo lugar a los 120 min, si bien su acumulación empezó a partir de los 10 min de incubación frente a cada cepa. A las 72 h de incubación la cantidad de  $H_2O_2$  fue inferior respecto a los 10 min, y las diferencias más evidentes se observaron a los 30 min (Fig, 6 B). Es posible que el pico inicial a los 10 min corresponda a una señal necesaria para el inicio del establecimiento de la simbiosis, y que la acumulación de  $H_2O_2$  posterior tenga que ver con un efecto de respuesta-daño.



**Figura 6.** Detección de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  en raíces de trébol expuestas a cepas con diferente eficiencia simbiótica. A.  $O_2^-$  detectado con NBT en raíces inoculadas con la cepa U204, P18 y P3. B.  $H_2O_2$  detectado con DAB. El control se incubó con agua destilada estéril. Las imágenes se obtuvieron con DinoEye Digital Eye Piece, aumento 1X.

La acumulación de NO en los tiempos establecidos no permite evidenciar diferencias claras entre los tratamientos, aunque las raíces incubadas con la cepa

P3 durante 72 h parecen haber acumulado más que los tratamientos control y con la cepa P18, y menos que el tratamiento con la cepa U204 (Fig. 7).



**Figura 7.** Detección de óxido nítrico (NO) con DAF-2 en raíces de trébol blanco. Las raíces permanecieron 72 h en presencia de cepas eficientes U204 y P18 e ineficiente P3. Como control (C) se usaron raíces sin inocular. La observación se realizó con microscopio de epifluorescencia.

Cuando se evaluó el daño oxidativo en nódulos provenientes de plantas inoculadas con la cepa ineficiente P3, se observó que la concentración de TBARS fue aproximadamente el doble que en nódulos inducidos por las cepas con eficiencia simbiótica alta U204 y media P18 (Cuadro 6). Si bien no se logró detectar en el tiempo inicial diferencias en la acumulación de ROS en raíces incubadas frente a cepas con diferente eficiencia, la concentración de TBARS puso en evidencia mayor daño oxidativo en nódulos inducidos por la cepa ineficiente P3. De esta forma, es necesario profundizar en la evaluación de la respuesta oxidativa de la planta en nódulos y

buscar indicadores tempranos de respuesta a la infección.

**Cuadro 6.** Cuantificación espectrofotométrica de TBARS en nódulos de trébol blanco. Los nódulos se obtuvieron de plantas crecidas 60 días en arena: vermiculita. Letras diferentes indican diferencias significativas en cada variable según Tukey con  $p < 0,05$ .

Cepa	TBARS (ng/mg)
P3	1.55 a
P18	0.60 b
204	0.67 b



### 3. Bibliografía

- Ballard RA, Charman N, McInnes A, Davidson JA.** 2004. Size, symbiotic effectiveness and genetic diversity of field pea rhizobia (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*) populations in South Australian soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(8): 1347-1355.
- Batista L, Irisarri P, Rebuffo M, Coitiño MJ, Sanjuán J, Monza J.** 2015. Nodulation competitiveness as a requisite for improved rhizobial inoculants of *Trifolium pratense*. *Biology and Fertility of Soils*, 51(1):11-20.
- Breakspear A, Liu C, Roy S, Stacey N, Rogers C, Trick M, Morieri G, Mysore KS, Wen J, Oldroyd GE, Downie JA, Murray JD.** 2014. The root hair 'infectome' of *Medicago truncatula* uncovers changes in cell cycle genes and reveals a requirement for auxin signaling in rhizobial infection. *Plant Cell*, 26(12):4680-4701.
- Damiani I, Pauly N, Puppo A, Brouquisse R, Boscarì A.** 2016. Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide Control Early Steps of the Legume-*Rhizobium* Symbiotic Interaction. *Front Plant Sci*, 7:454.
- Denton M, Reeve W, Howieson J, Coventry D.** 2003. Competitive abilities of common field isolates and a commercial strain of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* for clover nodule occupancy. *Soil Biology and Biochemistry*, 35(8): 1039-1048.
- Denton MD, Coventry DR, Bellotti WD, Howieson JG.** 2000. Distribution, abundance and symbiotic effectiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* from alkaline pasture soils in South Australia. *Animal Production Science*, 40(1): 25-35.
- Dice LR.** 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26:297-302.
- Drew EA, Ballard RA.** 2010. Improving N<sub>2</sub> fixation from the plant down: Compatibility of *Trifolium subterraneum* L. cultivars with soil rhizobia can influence symbiotic performance. *Plant and Soil*, 327(1-2): 261-277.
- Dutto P.** 2002. Recomendaciones para situaciones con problemas: Inoculación de Leguminosas. *Revista del Plan Agropecuario*, 102: 54-57.
- Gamas P, de Billy F, Truchet G.** 1998. Symbiosis-specific expression of two *Medicago truncatula* nodulin genes, MtN1 and MtN13, encoding products homologous to plant defense proteins. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11(5): 393-403.
- Gutiérrez P.** 2017. Evaluación de rizobios para el desarrollo de un inoculante eficiente y competitivo de *Trifolium repens*. Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía.
- Howieson JG, Yates RJ, O'Hara GW, Ryder M, Real D.** 2005. The interactions of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* in nodulation of annual and perennial *Trifolium* spp. from diverse centres of origin. *Animal Production Science*, 45(3): 199-207.
- Jamet A, Mandon K, Puppo A, Hérouart D.** 2007. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is required for optimal establishment of the *Medicago sativa*/*SinoRhizobium meliloti* symbiosis. *Journal of bacteriology*, 189(23): 8741-8745.
- Jaszek M, Janczarek M, Kuczynski K, Piersiak T, Grzywnowicz K.** 2014. The response of the *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* wild-type and exopolysaccharide-deficient mutants of oxidative stress. *Plant and Soil*, 376: 75-94.
- Jones DG, Hardarson G.** 1979. Variation within and between white clover varieties in their preference for strains of *Rhizobium trifolii*. *Annals of applied biology*, 92(2): 221-228.
- Labandera CA, Vincent JM.** 1975. Competition between an introduced strain and native Uruguayan strains of *Rhizobium trifolii*. *Plant and Soil*, 42(2): 327-347.
- Melino VJ, Drew EA, Ballard RA, Reeve WG, Thomson G, White RG, O'Hara GW.** 2012. Identifying abnormalities in symbiotic development between *Trifolium* spp. and *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* leading to sub-optimal and ineffective nodule phenotypes. *Annals of botany*, 110(8): 1559-1572.
- Patrick HN, Lowther WL.** 1995. Influence of the number of rhizobia on the nodulation and establishment of *Trifolium ambiguum*. *Soil Biology and Biochemistry*, 27(4-5): 717-720.

**Pryor HN, Lowther WL.** 2004. Caucasian clover rhizobia are not a threat to nitrogen fixation by White clover. Proceedings of the New Zealand Grassland Association, 66:285-289.

**Reeve W, Terpolilli J, Melino V, Ardley J, Tian R, De Meyer S, Tiwari R, Yates R, O'Hara G, Howieson J, Ninawi M, Held B, Bruce D, Detter C, Tapia R, Han C, Wei C, Huntemann M, Han J, Chen I, Mavromatis K, Markowitz V, Ivanova N, Ovchinnikova G, Pagani I, Pati A, Goodwin L, Woyke T, Kripides N.** 2013. Genome sequence of the South American clover-nodulating *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain WSM597. Standards in Genomic Sciences, 9:264-272.

**Reeve W, O'Hara G, Chain P, Ardley J, Bräu L, Nandesena K, Copeland A.** 2010. Complete genome sequence of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain WSM2304, an effective microsymbiont of the South American clover *Trifolium polymorphum*. Standards in genomic sciences, 2(1): 66.

**Sadowsky MJ, Graham PH.** 1998. Soil biology of the Rhizobiaceae. En: Spaink HP, Kondorosi A, Hooykaas PJJ (Eds.). The Rhizobiaceae. Molecular Biology of Plant Associated Bacteria. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. 155-172.

**Schumpp O, Deakin WJ.** 2010. How inefficient rhizobia prolong their existence within nodules. Trends in plant science, 15(4): 189-195.

**Signorelli S, Imparatta C, Rodríguez-Ruiz M, Borsani O, Corpas FJ, Monza J.** 2016. In vivo and in vitro approaches demonstrate proline is not directly involved in the protection against superoxide, nitric oxide, nitrogen dioxide and peroxynitrite. Functional Plant Biology, 43: 870-879.

**Signorelli S, Dans PD, Coitiño EL, Borsani O, Monza J.** 2015. Connecting proline and -aminobutyric acid in stressed plants through non-enzymatic reactions. PLoS One 10, e0115349.

**Thornton FC, Davey CB.** 1983. Response of the clover-*Rhizobium* symbiosis to soil acidity and *Rhizobium* strain. Agronomy Journal, 75(3): 557-560.

**Vasse J, Billy F, Truchet G.** 1993. Abortion of infection during the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiotic interaction is accompanied by a hypersensitive reaction. The Plant Journal, 4(3): 555-566.

**Wielbo J, Marek-Kozaczuk M, Mazur A, Kubik-Komar A, Skorupska A.** 2010. Genetic and metabolic divergence within a *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* population recovered from clover nodules. Applied and environmental microbiology, 76(14): 4593-4600.

**Yates RJ, di Mattia E, O'Hara GW, Real D, Howieson JG.** 2003. The role of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* in extending (or restricting) the adaptation of *Trifolium* spp. in natural and managed ecosystems. En: Bennett SJ (Ed.), New Perennial Legumes for Sustainable Agriculture. Perth: University of Western Australia Press, 116-130.

**Yates RJ, Howieson JG, Real D, Reeve WG, Vivas-Marfisi A, O'Hara GW.** 2005. Evidence of selection for effective nodulation in the *Trifolium* spp. Symbiosis with *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. Animal Production Science, 45(3): 189-198.





Tartaglia C.<sup>1</sup>, Azziz G.<sup>1</sup>, Lorite M.<sup>2</sup>, Sanjuán J.<sup>2</sup>  
y Monza J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Bioquímica, Facultad de Agronomía, Universidad de la República

<sup>2</sup> Laboratorio de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Granada, España.

## Capítulo 5. Relaciones filogenéticas de rizobios que nodulan tréboles presentes en suelos de Uruguay

### 1. Rizobios que nodulan tréboles en suelos de Uruguay

El trébol nativo *T. polymorphum* (trébol polimorfo) es nodulado por cepas indígenas a las que se les atribuye el establecimiento de relaciones de tipo parasítico con tréboles perennes de origen Mediterráneo (Labandera y Vincent, 1975; Yates *et al.*, 2005). También hay en nuestros suelos cepas nativas o naturalizadas que establecen relaciones con diferente eficiencia con los tréboles introducidos (Reeve *et al.*, 2010; Reeve *et al.*, 2013; Batista *et al.*, 2014; Gutiérrez 2017). Esos rizobios podrían provenir de leguminosas nativas como el trébol polimorfo, aunque se ha supuesto que las poblaciones presentes en los suelos derivan de la cepa usada como inoculante, o de otras cepas introducidas inadvertidamente con las semillas o en ensayos en los que se evaluaron inoculantes.

En la década de 1960 se introdujo en nuestro país la cepa U204 procedente de EEUU, que se usa desde 1967 (Labandera *et al.*, 1982) hasta la actualidad como inoculante comercial para trébol rojo y trébol blanco. También se evaluó a la cepa TA1 originaria de Tasmania (Labandera y Vincent, 1975) y entre 1999 y 2001 se evaluaron en la estación Glencoe a las cepas WSM1325, WSM1327 y WSM1328 (Grecia), WSM409 (Italia), CC2483g (Macedonia) y las cepas usadas como inoculantes comerciales en Australia WU95, NA3039 y CC299b (Yates *et al.*, 2005).

Para establecer relaciones filogenéticas entre cepas se suelen analizar las secuencias de genes

codificantes del ARN ribosomal 16S (16S rRNA), lo que permite asignar género y en algunos casos diferenciar especies. Pero este gen está altamente conservado y por eso no es útil para distinguir entre cepas de la misma especie (Efrosa *et al.*, 2017) por lo que también se recurre a la secuencia del espacio intergénico 16S-23S rRNA (ITS) Para el estudio de la filogenia entre cepas y para establecer patrones biogeográficos es necesario analizar otros genes conservados e igualmente importantes para las bacterias llamados colectivamente *housekeeping*, que codifican para proteínas como *atpD*, *glnII*, *recA*, *rpoB* y *gyrB* (Gaunt *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2005; Efrosa *et al.*, 2017; Vinuesa *et al.*, 2005). Estos genes han sido usados ampliamente en estudios de diversidad y filogenia de cepas de *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (Sotelo *et al.*, 2011, Batista *et al.*, 2013, Vinuesa *et al.*, 2005). En estudios filogenéticos de rizobios es necesario incluir el análisis de genes simbióticos como *nifH*, *nodA*, *nodC*, y *nodD* (Laguerre *et al.*, 2001; Shah *et al.*, 2017) que están sujetos a transferencia lateral (Mousavi *et al.*, 2015) y explican otra parte de su historia evolutiva.

### 2. Estrategia

Se usaron las cepas P3 y P33 aisladas de *T. polymorphum* y con diferente eficiencia simbiótica en *T. repens*, las cepas eficientes en ese trébol N2, 249 y 317 aisladas de suelos de Uruguay de nódulos de *T. pratense* y a la cepa U204 introducida de EEUU, usada como inoculante en Uruguay desde 1967. El ADN se extrajo según Sotelo *et al.* (2011), los amplificadores se resolvieron en geles de agarosa 1,2% y cuando se purificaron

bandas se hizo con el kit QIAquick (Gel extraction). El gen 16SrRNA se amplificó con los *primers* y condiciones descritas por Herrera-Cervera (1999) y el ITS según Itean *et al.* (2000). Para establecer las relaciones filogenéticas entre las cepas se analizaron secuencias core de genes que codifican proteínas. Para los genes *housekeeping atpD*, *glnII* y *recA* se usaron los *primers* que figuran en Batista *et al.* (2013), y para *rpoB* los descritos por Martens *et al.* (2008). Los genes simbióticos *nifH* y *nodC* se amplificaron con los *primers* usados por Laguerre *et al.* (2001) y *nodA* por Maucheline *et al.* (2014).

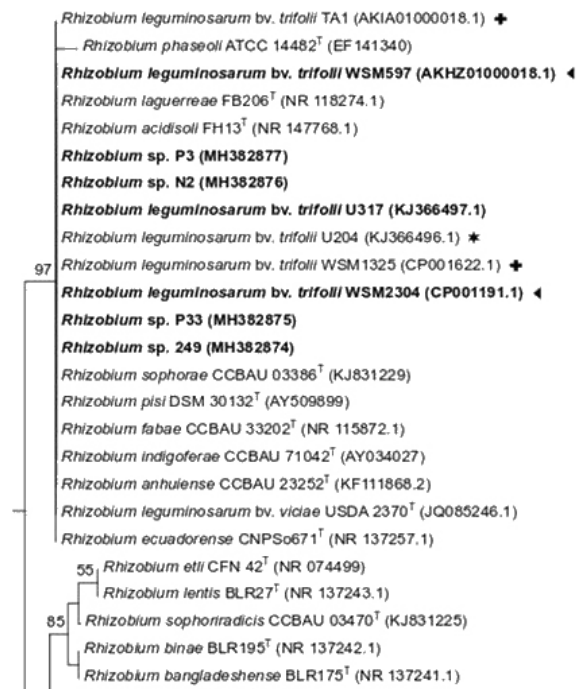
### 3. Resultados

#### 3.1 Análisis de las secuencias del gen 16S rRNA y del ITS 16S-23S rRNA

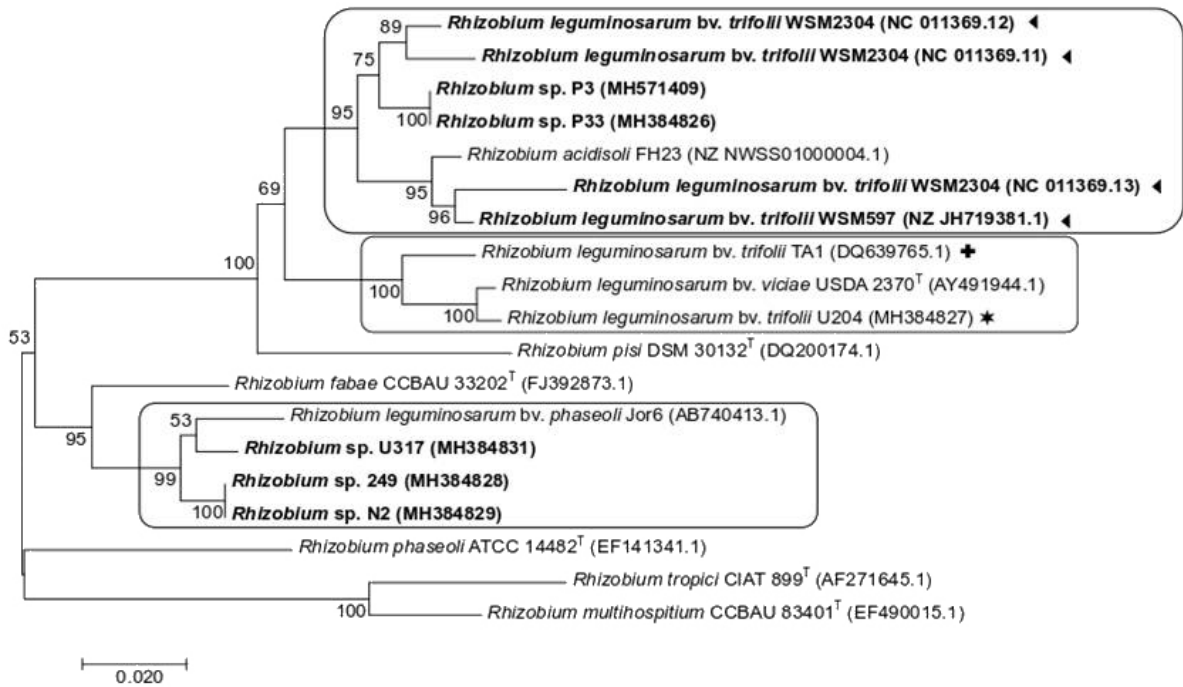
La secuencia de genes 16S rRNA de las cepas U204 (Labandera y Vincent, 1975), P3 (Gutiérrez, 2017), 317 (Batista *et al.*, 2014), N2, 249 (Hernández, 2011), WSM 2304 (Reeve *et al.*, 2010) y WSM 597 (Reeve *et al.* 2013) y P33 tienen en los 1.152 nt comparados, una identidad entre 99.9% y 100% entre ellas y con cepas de diferentes especies de *Rhizobium* (Figura 1).

La secuencia de genes 16S rRNA es muy conservada y se usa en la identificación de género y especie, pero las filogenias basadas únicamente en este gen no reflejan la evolución del genoma como un todo (Gaunt *et al.*, 2001). Los resultados acumulados sugieren que la secuencia del gen 16S rRNA permite identificar el género para un 90% de los casos y para un 65 a 83% asignación de especie (Janda y Abbot, 2007). Las 5 cepas aisladas de suelos de Uruguay de nódulos de *T. repens* y *T. polymorphum* y la cepa introducida U204 pertenecen al género *Rhizobium*, y agrupan mayormente con *R. leguminosarum* y especies filogenéticamente cercanas (Figura 1).

El análisis de las secuencias ITS (Figura 2) distingue a las cepas en tres grupos, uno incluye a las cepas aisladas de suelos de Uruguay eficientes en trébol rojo y blanco N2, 249 y 317, junto a *R. leguminosarum* sv. *phaseoli*. El segundo grupo reúne a las cepas ineficientes en trébol blanco aisladas de Glencoe (P3, WSM2304 y WSM597) y Canelones (P33), junto a *R. acidisoli*. El tercer grupo incluye, junto a *R. leguminosarum* sv. *viceae*, a las cepas introducidas U204 y TA1, la primera de ellas el inoculante comercial para tréboles y la segunda como inoculante experimental.



**Figura 1.** Muestra parcial del árbol construido con secuencias de 1.152 nt del gen 16S rRNA. Las cepas P3 y P33 se aislaron de trébol polimorfo, 249, 317 y N2 de trébol rojo. Las cepas aisladas de suelos de Uruguay se indican con letra negrita. Con flechas macizas se indican cepas aisladas en Glencoe por Reeve *et al.* (2010 y 2013), con + cepas introducidas ensayadas como inoculantes en Uruguay y con asterisco al inoculante comercial U204. El árbol fue construido usando el método de Neighbor-Joining, con el programa MEGA 7.



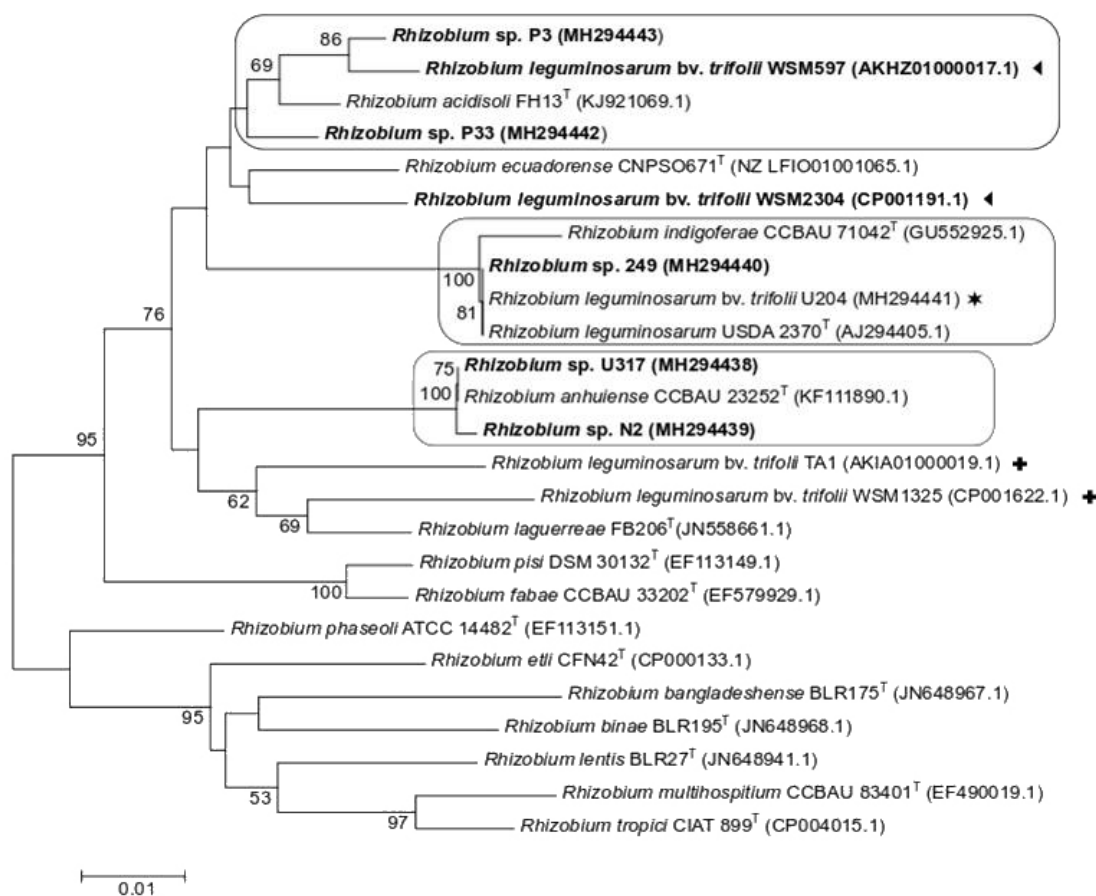
**Figura 2.** Árbol construido con las secuencias (963 nt) la región ITS. Las cepas P3 y P33 se aislaron de trébol polimorfo, 249, 317 y N2 de trébol rojo. Las cepas aisladas de suelos de Uruguay se indican con letra negrita. Con flechas macizas se indican cepas aisladas en Glencoe por Reeve *et al.* (2010 y 2013), con + cepas introducidas ensayadas como inoculantes en Uruguay y con asterisco al inoculante comercial U204. Los clados se identifican con un recuadro. El árbol fue construido usando el método de Neighbor-Joining, con el programa MEGA 7.

### 3.2 Relaciones filogenéticas a través de secuencias de los genes *atpD*, *glnII*, *recA* y *rpoB*

Para superar la limitación que tiene la comparación de secuencias de genes 16S rRNA en estudios filogenéticos que buscan relaciones entre cepas, se compararon secuencias parciales de los genes *atpD* (que codifica para la subunidad  $\beta$  de la ATP sintetasa), *glnII* (glutamina sintetasa), *recA* (recombinasa A) y *rpoB* (subunidad  $\beta$  de la RNA polimerasa). Estos genes han sido ampliamente usados para establecer relaciones filogenéticas entre rizobios (Gaunt *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2005; Efrosa *et al.*, 2018; Vinuesa *et al.*, 2005).

#### 3.2.1 Filogenia basada en el gen *atpD*

El alineamiento de secuencias parciales (405 nt) de genes *atpD* (Figura 3) generó un clado que incluye a las cepas P3 y P33 aisladas de *T. polymorphum* en la UEPP y Canelones, respectivamente. Al mismo clado pertenecen las cepas WSM2304 aislada de *T. polymorphum* (Reeve *et al.*, 2010) y WSM597 aislada de *T. pallidum* (Reeve *et al.*, 2010) en Glencoe. Las cuatro cepas agrupan con *R. acidisoli*. El segundo clado agrupa a las cepas 249 aislada de *T. pratense* y U204 junto a *R. leguminosarum* USDA 2370, y el tercero a las cepas N2 y 317 aisladas de *T. pratense* junto a *R. anhuiense* CCBAU 23252.

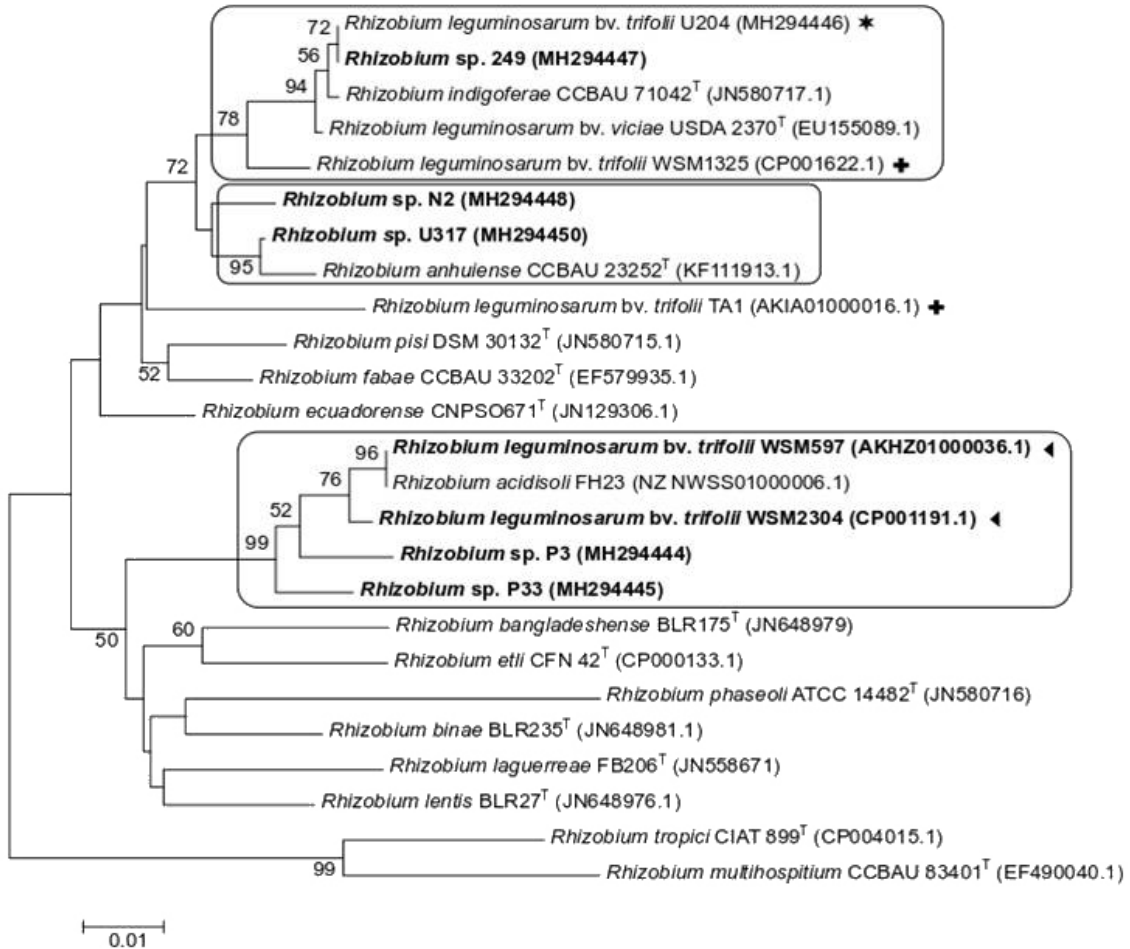


**Figura 3.** Árbol filogenético construido con secuencias parciales (405 nt) de genes *atpD*. La comparación de alineamientos de este gen permite establecer tres clados. Las cepas aisladas de suelos de Uruguay se indican con letra negrita. Con flechas macizas se indican cepas aisladas en Glencoe por Reeve *et al.* (2010 y 2013), con + cepas introducidas ensayadas como inoculantes en Uruguay y con asterisco al inoculante comercial U204. Los clados se identifican con un recuadro. El árbol fue construido usando el método de Neighbor-Joining, con el programa MEGA 7. Los números en las ramas indican el soporte del *bootstrap* en base a 1000 réplicas, los valores por debajo de 50 no se muestran.

### 3.2.2 Filogenia basada en el gen *glnII*

La comparación de secuencias parciales del gen *glnII* (416 nt) generó tres clados (Figura 4), los mismos que generó la comparación de secuencias del gen *atpD* (Figura 3). Un clado agrupa a las

cepas 249, U204 junto a *R. indigoferae* y a la cepa tipo *R. leguminosarum*. Otro clado incluye a las cepas N2 y 317 junto a *R. anhuiense* y el tercero a las cepas P3 y P33 junto a las cepas WSM597 y WSM2304 y a *R. acidisoli*.



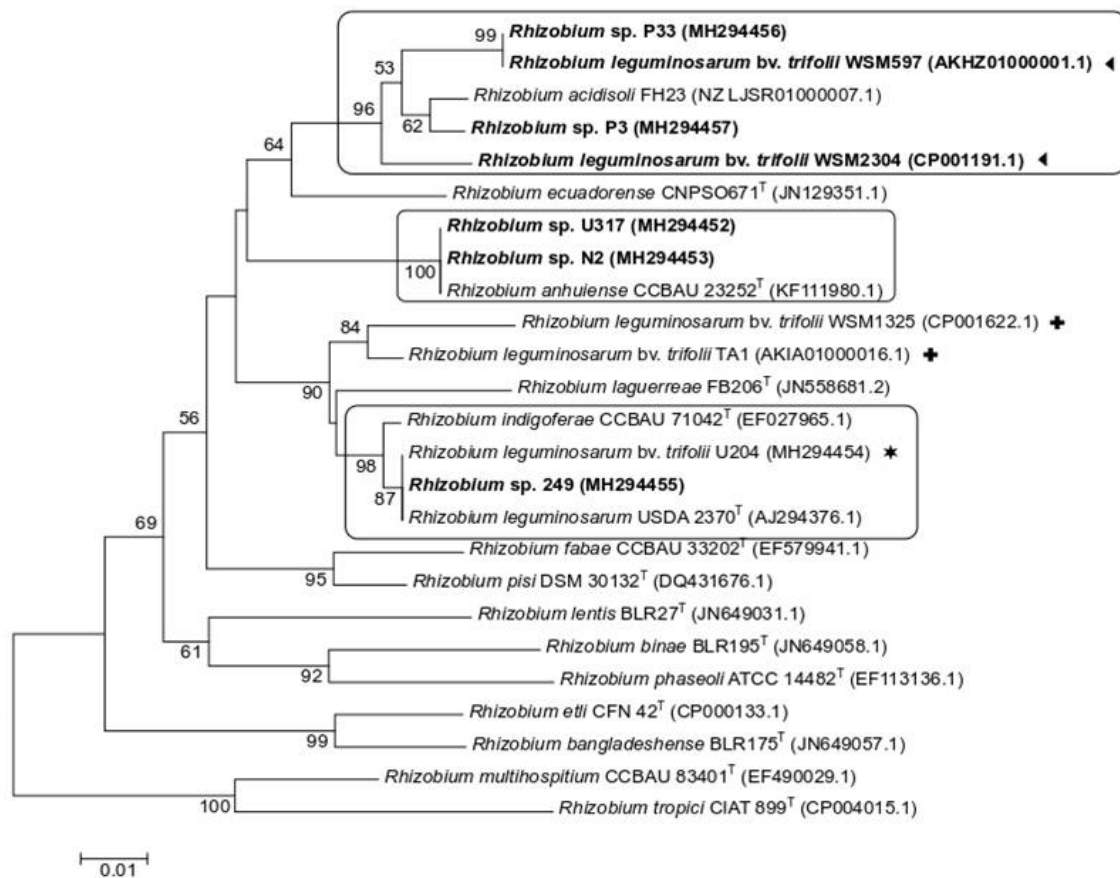
**Figura 4.** Árbol filogenético construido con secuencias parciales (416 nt) de genes *glnII*. La comparación de alineamientos de este gen permite establecer tres clados. Las cepas aisladas de suelos de Uruguay se indican con letra negrita. Con flechas macizas se indican cepas aisladas en Glencoe por Reeves *et al.* (2010 y 2013), con + cepas introducidas ensayadas como inoculantes en Uruguay y con asterisco al inoculante comercial U204. Los clados se identifican con un recuadro. Las secuencias fueron alineadas con MUSCLE y el árbol fue construido con el algoritmo Neighbor-Joining. Los números en las ramas indican el soporte del *bootstrap* en base a 1000 réplicas, los valores por debajo de 50 no se muestran.



### 3.2.3 Filogenia basada en el gen *recA*

La comparación de secuencias parciales (375 nt) del gen *recA* de las 6 cepas en estudio (Figura 5) también generó los mismos tres clados que los obtenidos por comparación de secuencias de

los genes *atpD* y *glnII* (Figuras 3 y 4). La cepa nativa P3 y P33 forman un clado que incluye a las cepas WSM597 y WSM2304 junto a *R. acidisoli*. El segundo clado lo forman las cepas N2 y 317 junto a *R. anhuiense*, y al tercero lo integran las cepas 249 y U204 junto a *R. leguminosarum* USDA 2370.

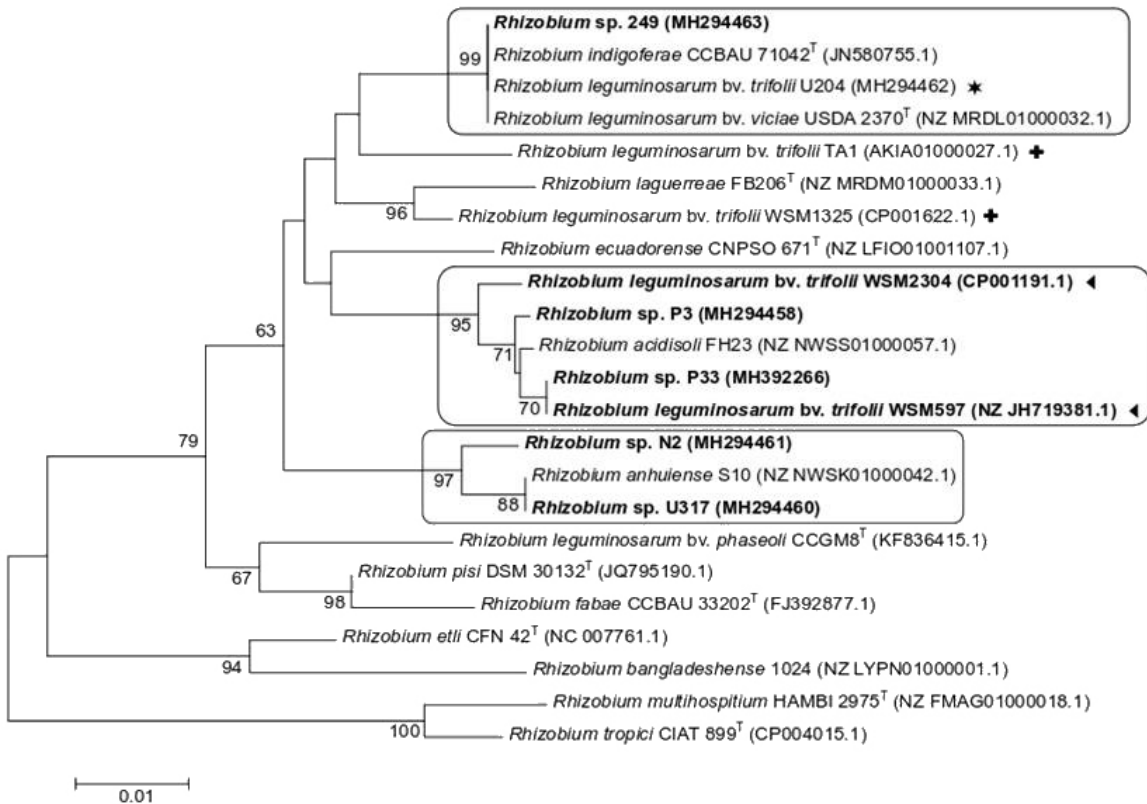


**Figura 5.** Árbol construido con secuencias parciales (375 nt) de genes *recA*. La comparación de alineamientos de este gen permite establecer tres clados. Las cepas aisladas de suelos de Uruguay se indican con letra negrita. Con flechas macizas se indican cepas aisladas en Glencoe por Reeve *et al.* (2010 y 2013), con + cepas introducidas ensayadas como inoculantes en Uruguay y con asterisco al inoculante comercial U204. Las secuencias fueron alineadas con MUSCLE y el árbol fue construido con el algoritmo Neighbor-Joining. Los clados se identifican con un recuadro. Los números en las ramas indican el soporte del *bootstrap* en base a 1000 réplicas, los valores por debajo de 50 no se muestran.

### 3.2.4 Filogenia basada en el gen *rpoB*

La comparación de secuencias parciales (287 nt) del gen *rpoB* de 6 cepas (Figura 6) generó los mismos clados que los obtenidos con las secuencias *atpD*, *glnII* y *recA* (Figura 3, 4 y 5). Un

clado agrupa a las cepas P3, WSM595 y WSM2304 junto a *R. acidisoli*, un segundo clado a las cepas N2 y 317 junto a *R. anhuiense*, y el tercero a las cepas U204 y 249 junto a *R. leguminosarum* USDA 2370 y *R. indigoferae*.

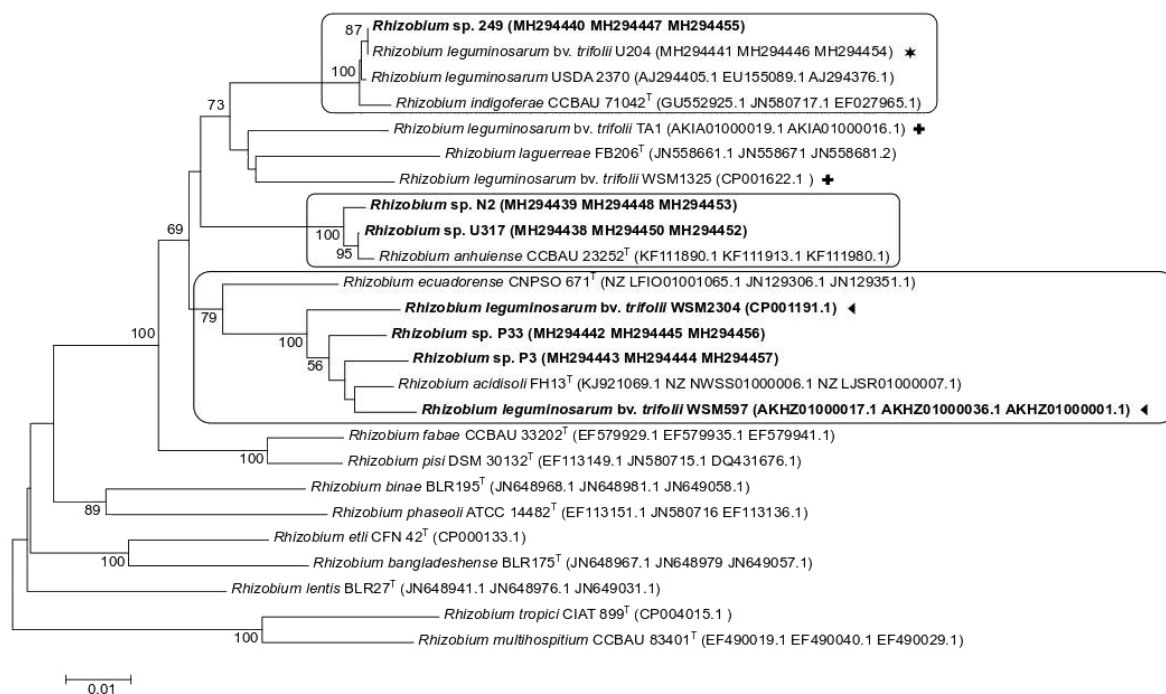


**Figura 6.** Árbol construido con secuencias parciales (287 nt) de genes *rpoB*. La comparación de alineamientos de este gen permite establecer tres clados. Las cepas aisladas de suelos de Uruguay se indican con letra negrita. Con flechas macizas se indican cepas aisladas en Glencoe por Reeve *et al.* (2010 y 2013), con + cepas introducidas ensayadas como inoculante en Uruguay y con asterisco al inoculante comercial U204. Las secuencias fueron alineadas con MUSCLE y el árbol fue construido con el algoritmo Neighbor-Joining. Los clados se identifican con un recuadro. Los números en las ramas indican el soporte del *bootstrap* en base a 1000 réplicas, los valores por debajo de 50 no se muestran.

### 3.2.5. Comparación de secuencias del conjunto de genes housekeeping

La comparación de secuencias de tres genes *housekeeping* de 6 cepas aisladas de suelos de Uruguay, 4 en este trabajo y 2 por Reeve *et al.* (2010 y 2013) y de la cepa U204 introducida de EEUU, generó en todos los casos 3 clados, que incluye cada uno a las mismas cepas (Figura 7). No se incluyó en el concatenado el gene *rpoB* porque no están disponibles en la base de datos en todos los casos las cepas tipo.

A un clado pertenecen las cepas aisladas de *T. polymorphum* P3 y P33 en UEPP y Canelones, respectivamente, y la cepa WSM2304 aislada del mismo hospedero en Glencoe (Reeve *et al.*, 2013). A este clado también pertenece la cepa WSM597 aislada de *T. pallidum*, también en Glencoe (Reeve *et al.*, 2010). Las secuencias de genes *atpD*, *glnII* y *recA* agrupan a estas cuatro cepas aisladas de suelos de Uruguay junto a cepas de *R. acidisoli*, especie a la cual seguramente pertenecen (Figuras 3 a 5). Las cepas FH13 y FH23 de *R. acidisoli* fueron aisladas de *Phaseolus vulgaris* en México (Román – Ponce *et al.*, 2016). A otro clado pertenecen las cepas N2 y 317 aisladas



**Figura 7.** Árbol filogenético construido con secuencias parciales concatenadas de 1,196 nt de genes *atpD*, *glnII* y *recA*. La comparación de alineamientos de este gen permite establecer tres clados. Las cepas aisladas de suelos de Uruguay se indican con letra negrita. Con flechas macizas se indican cepas aisladas en Glencoe por Reeve *et al.* (2010 y 2013), con + cepas introducidas ensayadas como inoculantes en Uruguay y con asterisco al inoculante comercial U204. Los clados se identifican con un recuadro. El árbol fue construido usando el método de Neighbor-Joining, con el programa MEGA 7. Los números en las ramas indican el soporte del *bootstrap* en base a 1000 réplicas, los valores por debajo de 50 no se muestran.

de *T. pratense* (Hernández, 2011 y Batista *et al.*, 2014 respectivamente). Estas cepas, con las tres secuencias de genes *housekeeping* siempre agruparon con la cepa CCBAU23252 de *R. anhuiense*, especie a la que es altamente probable que pertenezcan (Figuras 3 a 5). El tercer clado, siempre incluyó a la cepa 249 aislada de *T. repens* (Gutiérrez, 2017) y la cepa introducida U204, junto a la cepa USDA2370 de *R. leguminosarum* aislada de Vicia faba en EEUU (Van Berkum *et al.*, 1995). Con las secuencias parciales de los genes *rpoB*, con la salvedad que en algunos casos no se usaron las cepas tipo, el agrupamiento coincide con el concatenado (Figuras 6 y 7).

De esta forma, el análisis filogenético realizado a partir de secuencias parciales de genes *atpD*, *glnII*, *recA* y *rpoB* nos permite proponer que en nuestros suelos hay cepas nativas y cepas naturalizadas que nodulan tréboles. Las cepas nativas pertenecen a dos grupos, uno que incluye a las cepas P3, P33, WSM597 y WSM2304 ineficientes en tréboles mediterráneos, relacionadas a la especie *R. acidisoli* y otro que incluye a las cepas N2 y 317 eficientes en esos tréboles, relacionadas a la nueva especie *R. anhuiense*, cepa

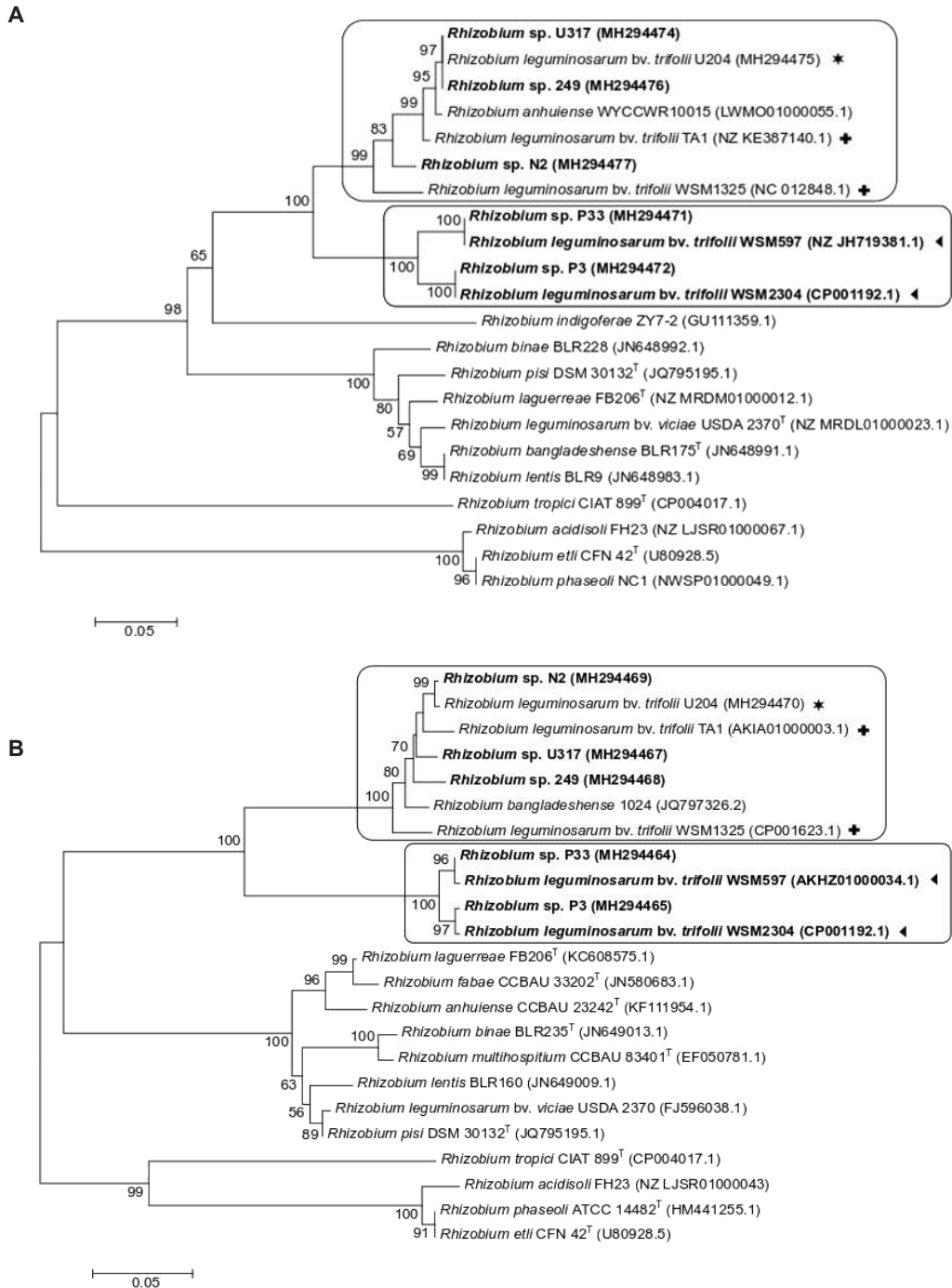
tipo CCBAU23252 aislada en China de nódulo de Vicia faba (Zhang *et al.*, 2015). Las secuencias de la región ITS también agrupan a las cepas N2 y 317, siempre alejadas de U204 (Figura 2).

La cepa 249 agrupa con la cepa U204, el inoculante comercial introducido de EEUU, lo que sugiere que es una cepa naturalizada. Ambas cepas están relacionadas con *R. leguminosarum* USDA2370 originaria de EEUU. El uso prolongado de una cepa como inoculante pudo haber generado poblaciones naturalizadas con diferente eficiencia, mediante la presión de selección ejercida por el hospedero y por el medio, como se ha evidenciado para rizobios de Lotus (Sotelo *et al.*, 2011; Batista *et al.*, 2013). Es posible que poblaciones de rizobios eficientes sean las responsables de que en algunos sitios pase inadvertido o no se observe respuesta al uso del inoculante. Sin embargo, y en particular en trébol blanco, el desuso o mal uso de inoculante en algunas zonas conduce a la baja implantación o a la pérdida de la pradera. Por otra parte, esas poblaciones eficientes son interesantes para seleccionar cepas persistentes y competitivas a efectos de desarrollar inoculantes.

### 3.4 Relaciones filogenéticas basadas en secuencias de genes simbióticos

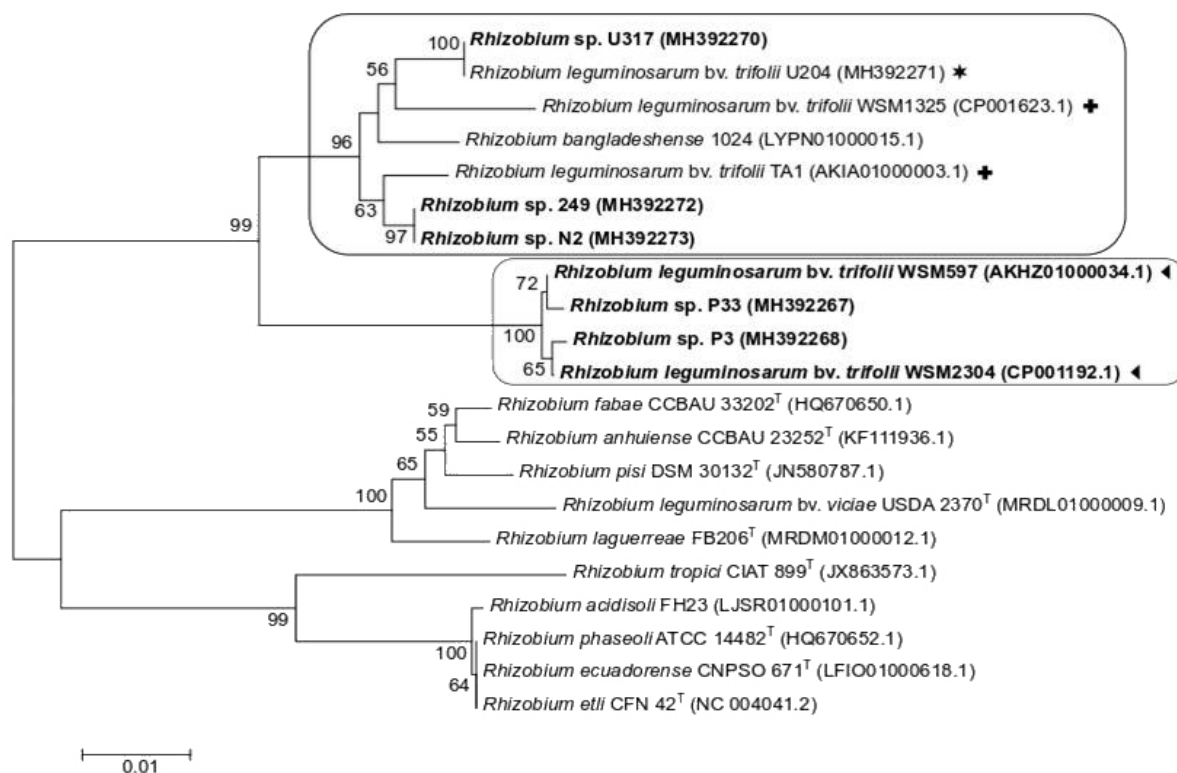
La comparación de secuencias parciales de genes

*nodA* (387 nt), *nodC* (482 nt) y *nifH* (317 nt) generó dos cladogramas (Figuras 8 y 9), uno que incluye a las cepas P3 y P33 y otro a las cepas N2, 249, 317 y U204.



**Figura 8.** Dendrogramas contruidos a partir de secuencias de genes *nodA* y *nodC*. A. árbol construido secuencias parciales del gen *nodA* (387 nt). B. árbol construido con secuencias parciales del gen *nodC* (482 nt). Las cepas aisladas de suelos de Uruguay se indican con letra negrita. Con flechas macizas se indican cepas aisladas en Glencoe por Reeve *et al.* (2010 y 2013), con + cepas introducidas ensayadas como inoculantes en Uruguay y con asterisco al inoculante comercial U204. Los cladogramas se identifican con recuadros. Las secuencias se alinearon con MUSCLE y el árbol fue construido con el algoritmo Neighbor-joining. Los números en las ramas indican el soporte del *bootstrap* en base a 1000 réplicas, los valores por debajo de 50 no se muestran.





**Figura 9.** Dendrograma construido a partir de secuencias del gen *nifH* (317 nt). Las cepas aisladas de suelos de Uruguay se indican con letra negrita. Con flechas macizas se indican cepas aisladas en Glencoe por Reeve *et al.* (2010 y 2013), con + cepas introducidas ensayadas como inoculantes en Uruguay y con asterisco al inoculante comercial U204. Los clados se identifican con recuadros. Las secuencias parciales se alinearon con MUSCLE y el árbol fue construido con el algoritmo Neighbor-joining. Los números en las ramas indican el soporte del *bootstrap* en base a 1000 réplicas, los valores por debajo de 50 no se muestran.

Las cepas P3, P33, WSM597 y WSM2304 agrupan en el mismo clado y son ineficientes en tréboles mediterráneos. Al otro clado lo integran las cepas N2, 249, 317 y U204 eficientes en *T. repens* y *T. pratense*, junto a las cepas de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* TA1 y WSM1325. La cepa TA1, inefectiva en tréboles anuales y perennes originarios de África y América, fue aislada en Tasmania de *T. subterraneum* en la década del 50 y se usa como inoculante para trébol en Australia (Reeve *et al.*, 2013). Estos autores proponen que la cepa TA1 es originaria de Europa y que llegó a Tasmania en el siglo XIX, donde se naturalizó. La cepa TA1 se introdujo en Uruguay en la década del 70 (Labandera y Vincent, 1975) y con ella se hicieron evaluaciones en campo en la localidad de Glencoe entre 1999 y 2001 junto a otras cepas, entre ellas WSM1325 originaria de Grecia (Yates *et al.*, 2005).

Las relaciones filogenéticas establecidas con genes simbióticos como el operón *nodABC* y el gen *nifH* pueden diferir de las establecidas con los genes cromosomales, principalmente debido a la distinta historia evolutiva y a la transferencia lateral de genes (Laguerre *et al.*, 2001). El análisis filogenético basado en las secuencias de los genes *nodA*, *nodC* y *nifH* evidencia que las cepas que son eficientes en trébol rojo y blanco (U204, 249, N2, 317) poseen genes simbióticos (*nodC*, *nodA*, *nifH*) muy parecidos entre sí y filogenéticamente distinguibles de los que poseen las cepas ineficientes (P3, P33, WSM2304 y WSM597). Con independencia de la afiliación taxonómica, existe una relación directa entre genes simbióticos y el rango de hospedero o eficiencia simbiótica, algo que ha visto para casi todos los rizobios (Laguerre *et al.*, 2001). Esto es particularmente aplicable a los genes de nodulación (*nod*) que son los que

determinan el rango de hospedero, pero también a los genes de fijación de nitrógeno (*nif*, *fix*) que están implicados en la eficiencia fijadora. El tipo de genes simbióticos y por tanto el rango de hospedero determina los llamados simbiovares (Rogel *et al.*, 2011). Nuestros estudios filogenéticos muestran que las cepas que no son efectivas en *T. repens* y *T. pratense* portan alelos de genes *nodA*, *nodC* y *nifH* diferentes a los alelos génicos que poseen las cepas eficientes en esos hospederos. Por tanto, la presencia de uno u otro tipo de genes simbióticos puede ser indicativa por un lado de la eficiencia simbiótica de las cepas en un tipo u otro de trébol, y por otro de la existencia de distintas simbiovares entre las cepas nativas uruguayas.

Además, esta característica podría ser utilizada para predecir la eficiencia de las cepas, como metodología alternativa a los ensayos con plantas que son mucho más largos y laboriosos.

El conjunto de análisis filogenéticos indican que hay: i) cepas nativas (P3, P33, WSM597 y WSM2304) que no evidencian intercambio de material genético con cepas introducidas como el inoculante comercial U204, ii) cepas nativas (N2 y 317) que adquirieron genes simbióticos de esta última o de otras cepas introducidas posteriormente (TA1 y WSM1325) y iii) una cepa naturalizada (249) derivada de la cepa U204 que agrupa con las nativas del grupo ii) en los ITS.



#### 4. Bibliografía

- Batista L, Irisarri P, Rebuffo M, Coitiño MJ, Sanjuán J, Monza J.** 2015. Nodulation competitiveness as a requisite for improved rhizobial inoculants of *Trifolium pratense*. *Biology and Fertility of Soils*, 51(1):11-20.
- Batista L, Tomasco I, Lorite MJ, 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.
- Efrose RC, Rosu CM, Stedel C, Stedel C, Stefan A, Sirbu C, Gorgan LD, Labrou NE, Fletmetakis E.** 2018. Molecular diversity and phylogeny of indigenous *Rhizobium leguminosarum* strains associated with *Trifolium repens* plants in Romania. *Antonie van Leeuwenhoek*, 111: 135-153.
- Gaunt MW, Turner SL, Rigottier-Gois L, Lloyd-Macgilp SA, Young JP.** 2001. Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51(6): 2037-2048.
- Gutiérrez P.** 2017. Evaluación de rizobios para el desarrollo de un inoculante eficiente y competitivo de *Trifolium repens*. Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía.
- Hernández L.** 2011. Identificación y selección de cepas nativas de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*. Tesis de grado, Montevideo, Facultad de Ciencias, 76.
- Herrera-Cervera J A, Caballero-Mellado J, Laguerre G, Tichy HV, Requena N, Amarger N, Martínez-Romero E, Olivares J, Sanjuán J.** 1999. At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 30: 87-97.
- Iteman I, Rippka R, De Marsac NT, Herdman M.** 2000. Comparison of conserved structural and regulatory domains within divergent 16S rRNA-23S rRNA spacer sequences of cyanobacteria. *Microbiology* 146, 1275–1286.
- Janda J M, Abbott S L.** 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol*, 45(9):2761-4.
- Labandera C, Baraibar A, Milian A.** 1982. Tecnología de *Rhizobium*. In: MAP, Comisión Honoraria Plan Agropecuario. Trabajos Técnicos III: Anuario 1982. MAP, 4m, Montevideo, Uruguay. p.11-15.
- Labandera CA, Vincent JM.** 1975. Competition between an introduced strain and native Uruguayan strains of *Rhizobium trifolii*. *Plant and Soil*, 42(2): 327- 347.
- 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.
- Lorite M, Videira e Castro I, Muñoz S, Sanjuán J.** 2012. Phylogenetic relationship of *Lotus uliginosus* symbionts with bradyrhizobia nodulating genistoid legumes. *FEMS Microbiology Ecology*, 79: 454-474.
- Martens M, Dawyndt P, Coopman R, Gillis M, De Vos P, Willems A.** 2008. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 *housekeeping* genes in the genus *Ensifer* (including former *SinoRhizobium*). *Int J Syst Evol Microbiol*, 58(1), 200-214.
- Mauchline T H, Hayat R, Roberts R, Powers S J, Hirsch P R.** 2014. Assessment of core and accessory genetic variation in *Rhizobium leguminosarum* symbiovar *trifolii* strains from diverse locations and host plants using PCR-based methods. *Letters in applied microbiology*, 59(2): 238-246.
- Mousavi S A, Willems A, Nesme X, De Lajudie P, Lindström K.** 2015. Revised phylogeny of Rhizobiaceae: proposal of the delineation of *ParaRhizobium* gen. nov., and 13 new species combinations. *Sys App Microbiol*, 38(2), 84-90.

Reeve W, Terpolilli J, Melino V, Ardley J, Tian R, De Meyer S, Tiwari R, Yates R, O'Hara G, Howieson J, Ninawi M, Held B, Bruce D, Detter C, Tapia R, Han C, Wei C, Huntemann M, Han J, Chen I, Mavromatis K, Markowitz V, Ivanova N, Ovchinnikova G, Pagani I, Pati A, Goodwin L, Woyke T, Kripides N. 2013. Genome sequence of the South American clover-nodulating *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain WSM597. *Standards in Genomic Sciences*, 9:264-272.

Reeve W, O'Hara G, Chain P, Ardley J, Bräu L, Nandesena K, Copeland A. 2010. Complete genome sequence of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain WSM2304, an effective microsymbiont of the South American clover *Trifolium polymorphum*. *Standards in genomic sciences*, 2(1): 66.

Rogel M A, Ormeño-Orillo E, Martínez-Romero E. 2011. Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. *Syst Appl Microbiol*, 34(2): 96-104.

Román-Ponce B, Zhang Y J, Vásquez-Murrieta M S, Sui XH, Chen W F, Padilla J C, Guo X W, Gao J L, Yan J, Wei G H, Wang ET. 2016. *Rhizobium acidisoli* sp. nov., isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* in acid soils. *Int J Syst Evol Microbiol*, 66: 398–406.

Shah A, Wakelin S A, Moot D, Laugraud A, Ridgway H J. 2017. Metabolic and Phylogenetic Profiling of *Rhizobium leguminosarum* Strains Isolated from NZ Soils of Varying pH. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, International Journal of Bioengineering and Life Sciences, 11(6).

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

Silva C, Vinuesa P, Eguiarte L E, Souza V, Martínez-Romero E. 2005. Evolutionary genetics and biogeographic structure of *Rhizobium gallicum* sensu lato, a widely distributed bacterial symbiont of diverse legumes. *Mol ecol*, 14(13): 4033-4050. Van Berkum P, Beyene D, Vera F T, Keyser H H. 1995. Variability among *Rhizobium* strains originating from nodules of *Vicia faba*. *Appl Environ Microbiol*, 61(7):2649-53.

Vinuesa P, Silva C, Lorite M J, Izaguirre-Mayoral M L, Bedmar E J, Martínez-Romero E. 2005. Molecular systematics of rhizobia based on maximum likelihood and Bayesian phylogenies inferred from *rrs*, *atpD*, *recA* and *nifH* sequences, and their use in the classification of *Sesbania* microsymbionts from Venezuelan wetlands. *Systematic and Applied Microbiology*, 28(8): 702-716.

Yates R J, Howieson J G, Real D, Reeve W G, Vivas-Marfisi A, O'Hara GW. 2005. Evidence of selection for effective nodulation in the *Trifolium* spp. symbiosis with *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Animal Production Science*, 45(3): 189-198.

Zhang Y J, Zheng W T, Overall I, Young J P, Zhang X X, Tian C F, Sui X H, Wang E T, Chen W X. 2015. *Rhizobium anhuiense* sp. nov., isolated from effective nodules of *Vicia faba* and *Pisum sativum*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 65:2960-2967.



**INIA Dirección Nacional**  
Andes 1365 P. 12  
Montevideo  
Tel.: ++598 2902 0550  
Fax: ++598 2902 3633  
[iniadn@inia.org.uy](mailto:iniadn@inia.org.uy)

**INIA La Estanzuela**  
Ruta 50 Km. 11  
Colonia  
Tel.: ++598 4574 8000  
Fax: ++598 4574 8012  
[iniale@le.inia.org.uy](mailto:iniale@le.inia.org.uy)

**INIA Las Brujas**  
Ruta 48 Km. 10  
Canelones  
Tel.: ++598 2367 7641  
Fax: ++598 2367 7609  
[inia\\_lb@lb.inia.org.uy](mailto:inia_lb@lb.inia.org.uy)

**INIA Salto Grande**  
Camino al Terrible  
Salto  
Tel.: ++598 4733 5156  
Fax: ++598 4732 9624  
[inia\\_sg@sg.inia.org.uy](mailto:inia_sg@sg.inia.org.uy)

**INIA Tacuarembó**  
Ruta 5 Km. 386  
Tacuarembó  
Tel.: ++598 4632 2407  
Fax: ++598 4632 3969  
[iniatbo@tb.inia.org.uy](mailto:iniatbo@tb.inia.org.uy)

**INIA Treinta y Tres**  
Ruta 8 Km. 281  
Treinta y Tres  
Tel.: ++598 4452 2023  
Fax: ++598 4452 5701  
[iniatt@tyt.inia.org.uy](mailto:iniatt@tyt.inia.org.uy)