

"Desarrollo de un inoculante rizobiano para un nuevo cultivar de *Lotus uliginosus*".

Director de Tesis: Dr. Jorge Monza

Tribunal: Ing. Agr. Msc. Pilar Irisarri , Ing. Agr. Msc. Mónica Rebuffo y Ing. Agr. Msc. Omar Borsani

La defensa se llevará a cabo el miércoles 15 de Febrero de 2012 a las 14:00 hrs. en el salón de conferencias de Facultad de Agronomía.

Resumen de Tesis

"Grasslands Maku", el cultivar tetraploide de *Lotus uliginosus* Schkuhr, es usado en Uruguay para el mejoramiento de campo natural por su capacidad para producir forraje con alto aporte de proteína. Parte del nitrógeno de la proteína proviene de la fijación biológica, realizada por bacterias del género *Bradyrhizobium* asociadas a las raíces de esta leguminosa. Para aumentar la expansión de esta especie, restringida por la disponibilidad de semilla, INIA ha desarrollado la línea diploide LE306 con alto potencial de semilla. En el entendido que la introducción de una leguminosa debe acompañarse de la evaluación del microsimbionte, se analizó la performance simbiótica y habilidad industrial de 14 aislados de *Bradyrhizobium* sp. nativos, seleccionados de una colección de 75 aislados establecidos por perfiles generados por ERIC-PCR, y el inoculante comercial (U526) en el cultivar LE306. La comparación del cebador BOX, usado para monitorear cepas de *Bradyrhizobium*, con los aislados establecidos con ERIC en la colección original, determinó que BOX diferenció más aislados, por lo que para el monitoreo de ocupación de nódulos en campo se definió este cebador. Las cepas LuL17, CNP22, LuLit19, LuP13, LuP30, CNL8 y la cepa comercial U526 se destacaron por la producción de biomasa aérea obtenida en plantas crecidas en macetas, en condiciones controladas. A estas cepas promisorias, a efectos de conocer la incidencia del momento de siembra sobre la nodulación, se las evaluó respecto a su capacidad de nodular in vitro a diferentes temperaturas, correspondientes al promedio en suelo en marzo, abril y mayo (22°, 18° y 15°C, respectivamente). A los 21 días, todas las cepas indujeron el mismo número de nódulos cuando las plantas estaban a 22°C, mientras que a 18°C se destacó la cepa LuP13, y a 15°C sólo la cepa LuP30 indujo nódulos. Dadas las derivaciones económicas y ambientales no deseadas de la emisión de N₂O, las mismas cepas se analizaron en lo que hace a la capacidad de producir este gas. Para esto se determinó en vida libre y en condiciones microaeróbicas la acumulación de N₂O en presencia y ausencia de acetileno, un inhibidor de la óxido nítrico reductasa, y sólo el aislado CNP22 acumuló N₂O en ausencia del inhibidor, lo que implica la vía de desnitrificación incompleta. Dada la eficiencia simbiótica de las cepas LuL17, LuP30 y LuP13 y la capacidad de nodular a las temperaturas de 15° y 18°C de las dos últimas, estas fueron evaluadas en la industria. Los ensayos de habilidad industrial se hicieron en la empresa CALISTER y sólo LuP13 mostró adecuadas características para ser multiplicada como inoculante en medio de crecimiento para el inoculante comercial de 'Grasslands Maku' y el de soja.

Con las cepas LuP13 y la cepa comercial U526 se prepararon inoculantes para las siembras en campo, en la que se usó como hospedero el cultivar LE306, realizadas en los meses marzo abril y mayo de 2011 en INIA La Estanzuela (Colonia, Uruguay). A partir de este ensayo se determinó la ocupación de nódulos, mediante perfiles genómicos generados por BOX-PCR, que evidenciaron que más del 90% de los nódulos estaba ocupado por el inoculante comercial, inclusive en los tratamientos inoculados con la cepa LuP13 y el testigo sin inocular. De todas

formas, la cantidad de nódulos por planta fue mayor en el tratamiento en el que se usó la cepa U526. Este resultado permite suponer que se encontraban poblaciones de esta cepa en el suelo debido a siembras anteriores. La producción de biomasa no dio diferencias entre los tratamientos en la siembra realizada en marzo, mientras que en la realizada en abril la producción fue mayor con la cepa U526. En la siembra de mayo no se encontraron nódulos, y no hubo diferencias en la producción de biomasa. El estudio de competitividad entre cepas nativas presentes en suelo de 5 localidades respecto al inoculante, se realizó con la cepa U526 marcada con el gen delator *gusA*. El suelo de cada región de interés agropecuario, se colocó en cilindros plásticos que se usaron para sembrar semillas de los cultivares de *L. uliginosus* LE306 y 'Grasslands Maku'. Las semillas se inocularon con U526::*gusA* y a los 50 días se determinó el número de nódulos ocupados respecto al total, lo que permitió establecer la competencia entre el inoculante y las nativas. La ocupación por la cepa comercial fue superior en Paso de la Laguna, mientras que en suelos de las localidades de La Estanzuela y Palo e Pique el número de nódulos ocupados por el inoculante fue superior a los encontrados en los suelos de las localidades de Tambores y La Carolina. El uso del gen *gusA* como marcador en esta leguminosa, tiene como restricción que el color rojizo del nódulo interfiere con la visualización del producto de la reacción. De todas formas fue útil para determinar la competencia del inoculante comercial en diferentes suelos, en condición controlada. Finalmente, la cepa nativa LuP13 no tuvo la competitividad deseable en condición de campo, mientras que la cepa U526 recomendada para el cultivar Maku, tuvo un desempeño adecuado en el nuevo cultivar diploide LE306 en las siembras de marzo y abril. "