

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**DIVERSIDAD Y EFECTIVIDAD SIMBIÓTICA DE RIZOBIOS ASOCIADOS A  
ALFALFA (*Medicago sativa* L.) EN LA REGIÓN DE ARICA Y PARINACOTA**

**POR**

**CRISTIAN ESTEBAN CERDA NÚÑEZ**

**MEMORIA PRESENTADA A LA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA  
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
INGENIERO AGRÓNOMO.**

**CHILLÁN – CHILE  
2020**

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**DIVERSIDAD Y EFECTIVIDAD SIMBIÓTICA DE RIZOBIOS ASOCIADOS A  
ALFALFA (*Medicago sativa* L.) EN LA REGIÓN DE ARICA Y PARINACOTA**

**POR**

**CRISTIAN ESTEBAN CERDA NÚÑEZ**

**MEMORIA PRESENTADA A LA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA  
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
INGENIERO AGRÓNOMO.**

**CHILLÁN – CHILE  
2020**

Aprobada por:

Profesor Asociado, Macarena Gerding G.  
Ing. Agrónomo, Ph. D.

---

Guía

Profesor Asociado, Marisol Vargas C.  
Ing. Agrónomo, Dr. Cs.

---

Asesor

Profesor Instructor, Christian Guajardo F.  
Ing. Agrónomo.

---

Asesor

Profesor Asociado, Guillermo Wells M.  
Ing. Agrónomo, Mg. Cs.

---

Decano

## RECONOCIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por el proyecto Fondecyt n° 1180821:  
“Landraces of alfalfa as a source of germplasm tolerant to abiotic stresses:  
selecting plant-rhizobia genotypes for a harsh future environment”

## TABLA DE CONTENIDOS

	<b>Página</b>
Resumen.....	1
Summary.....	1
Introducción.....	2
Materiales y Métodos.....	5
Resultados y Discusión.....	13
Conclusiones.....	22
Referencias.....	23
Anexos.....	29
Apéndices.....	30

## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Página
Figura 1 Cladograma de las relaciones genéticas entre aislados bacterianos de <i>Medicago sativa</i> , de acuerdo al producto de RAPDs - PCR con el partidor RPO1.....	15
Figura 2 Árbol filogenético del gen ribosómico 16S rRNA de las cepas de rizobios asociadas a <i>Medicago sativa</i> .....	16
Figura 3 Cladograma comparativo de cepas de <i>Ensifer meliloti</i> con testigo N+ y N- en base al peso seco aéreo en alfalfa, generado por análisis de conglomerados de acuerdo a la distancia euclídea.....	19
Figura 4 Producción de materia seca aérea en relación al peso seco aéreo del tratamiento N+ para <i>Medicago sativa</i> ...	20
Figura 5 Índice de nodulación y efectividad de nódulos en <i>Medicago sativa</i> inoculadas con distintas cepas de rizobios.....	21
Tabla 1 Origen geográfico de muestras de suelos y nódulos en alfalfares de la región de Arica y Parinacota.....	5
Tabla 2 Mezcla de reactivos para la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPDs) de los aislados, para un volumen final de 20 µL.....	8
Tabla 3 Programa utilizado para la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPDs) de los aislados asociados a <i>Medicago sativa</i> .....	9
Tabla 4 Partidores utilizados para la amplificación del gen parcial 16S rRNA de las cepas asociadas a <i>Medicago sativa</i> ....	10
Tabla 5 Programa utilizado para la amplificación del DNA Ribosomal 16s de las cepas asociadas a <i>Medicago sativa</i> .....	10
Tabla 6 Cepas bacterianas aisladas desde nódulos radiculares de alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> ) desde plantas en terreno o en sistema cultivo-trampa con suelos colectados desde la Región de Arica y Parinacota.....	14

## DIVERSIDAD Y EFECTIVIDAD SIMBIÓTICA DE RIZOBIOS ASOCIADOS A ALFALFA (*MEDICAGO SATIVA*) EN LA REGIÓN DE ARICA Y PARINACOTA

DIVERSITY AND SYMBIOTIC EFFECTIVITY OF RHIZOBIA ASSOCIATED TO ALFALFA (*MEDICAGO SATIVA*) IN ARICA Y PARINACOTA REGION

**Palabras índice adicionales:** *Ensifer meliloti*, *Sinorhizobium*, *Rhizobium*.

### RESUMEN

La alfalfa (*Medicago sativa*) es una especie forrajera que puede adaptarse a condiciones de estrés hídrico y baja fertilidad. Además, fija nitrógeno atmosférico en asociación con bacterias de la especie *Ensifer* (*Sinorhizobium*) *meliloti*. El objetivo de este trabajo fue evaluar la diversidad y efectividad simbiótica de rizobios aislados desde alfalfares en la Región de Arica y Parinacota. Se recolectaron nódulos de alfalfa y muestras de suelo desde 10 sitios de la Región de Arica y Parinacota, obteniéndose 45 aislados bacterianos. A través de la determinación de la huella genética mediante RAPDs PCR con el partidor RPO1, se identificaron 33 cepas genéticamente distintas. Mediante secuenciación del gen parcial 16S rRNA se identificaron cepas de los géneros *Ensifer*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Curtobacterium*, *Klebsiella*, *Ochrobactrum*, *Escherichia* y *Serratia*. Se realizó un ensayo bajo condiciones controladas para evaluar la capacidad de nodular alfalfa de las 13 cepas identificadas como *Ensifer meliloti*. Luego de seis semanas se determinó materia seca, nodulación e índice de nodulación. Las cepas 9, 15, 24, 25, 26, 27, 28 y 29 fueron las que lograron mayor producción de materia seca en alfalfa siendo clasificadas como efectivas. Las cepas 27 y 24 fueron las que lograron mejores resultados en índice de nodulación, destacando la cepa 27 que obtuvo un 100 % de efectividad de nódulos.

### SUMMARY

Alfalfa (*Medicago sativa*) is a forage species that can adapt to water stress and low fertility. In addition, it fixes atmospheric nitrogen in association with bacteria of the

species *Ensifer (Sinorhizobium) meliloti*. The aim of this thesis was to evaluate the diversity and symbiotic effectiveness of rhizobia isolated from alfalfa from Arica y Parinacota region. Alfalfa nodules and soil samples were collected from 10 sites of Arica and Parinacota region, obtaining 43 bacterial isolates. Through RAPD-PCR genetic fingerprint with the primer RPO1, 33 genetically distinct strains were identified. These were later identified at genus and species level, by sequencing the 16S rRNA partial gene. Strains of the genera *Ensifer*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Curtobacterium*, *Klebsiella*, *Ochrobactrum*, *Escherichia* and *Serratia* were identified. An assay was conducted under controlled conditions to evaluate the ability of the 13 strains identified as *Ensifer meliloti* to nodulate with alfalfa. After 6 weeks, dry matter, nodulation and nodulation index were determined. Strains 9, 15, 24, 25, 26, 27, 28 and 29 reached the higher dry matter in Alfalfa and were classified as effective. Strains 27 and 24 were the ones that reached higher nodulation scores, and strain 27 stood out for showing 100 % effective nodules.

## INTRODUCCIÓN

La Familia Leguminosae (Fabaceae), comprende de 17.000 a 19.000 especies incluyendo hierbas, arbustos y árboles, con representantes en casi todos los biomas terrestres (Lemus *et al.*, 2003). Se subdivide en tres subfamilias en donde la subfamilia Faboideae es de gran relevancia ya que pertenecen diversas leguminosas de importancia económica, como algunas utilizadas en la alimentación humana por su alto contenido de proteína, almidón, vitaminas y minerales (Rebello *et al.*, 2014), y algunas de las principales leguminosas de uso forrajero (Doyle y Luckow, 2003). La alfalfa (*Medicago sativa* L.) es desde hace más de 2.000 años, uno de los cultivos forrajeros más apreciados, no sólo por sus excelentes cualidades nutricionales, sino por sus altos rendimientos en cantidad y calidad (Lemus *et al.*, 2003). Además, presenta una rápida recuperación después del corte, longevidad y tolerancia al medio ambiente adverso (McCulley *et al.*, 2004). La alfalfa es una leguminosa forrajera perenne, vigorosa y de crecimiento erecto, la raíz principal es pivotante, robusta, de hasta 5m de longitud y con

numerosas raíces secundarias, posee hojas trifoliadas y ubicadas alternadamente en el tallo (Amato *et al.*, 2008).

Registros históricos en Chile, indican que la alfalfa fue la primera forrajera introducida desde España en el siglo XVII (Lemus *et al.*, 2003). Actualmente, se estima que en Chile existen 60.000 hectáreas de alfalfa, concentrándose el 70 % de la superficie entre la Región de Valparaíso y la del Biobío (Ovalle *et al.*, 2015). Particularmente en la Zona Central de Chile, la alfalfa es parte integral de las raciones para alimentar ganado lechero (Moreno *et al.*, 2008). En la Región de Arica y Parinacota, en particular en los Valles de Lluta y de Camarones, la alfalfa fue introducida como cultivo forrajero hace más de 300 años adaptándose a condiciones de sequía, salinidad y de pastoreo intenso, pudiendo encontrarse algunas poblaciones de alfalfa hasta a 2.000 msnm en el Valle de Camarones (Faúndez *et al.*, 2014). El ecotipo de alfalfa conocido como Alta Sierra ha evolucionado naturalmente en la zona, constituyendo el material genético de mayor importancia económica en el Valle de Lluta, principalmente por su capacidad de adaptación a las condiciones de salinidad (Fuentes *et al.*, 2009).

La alfalfa es considerada una planta mejoradora de suelo, por su capacidad de captar grandes cantidades de nitrógeno atmosférico vía fijación simbiótica (Coba de la Peña y Pueyo, 2012). Esta propiedad de las leguminosas se debe a su capacidad de establecer una simbiosis mutualista con bacterias del suelo comúnmente llamadas rizobios (Coba de la Peña y Pueyo, 2012). El rizobio específico descrito para alfalfa corresponde a la especie *Ensifer (Sinorhizobium) meliloti* (Yan *et al.*, 2000), el cual coloniza las raíces a través de los pelos radicales (Dénarie *et al.*, 1992). Esta interacción comienza en el suelo, donde la leguminosa y los rizobios intercambian moléculas de señal difusibles, esencialmente flavonoides liberados por la planta y lipo-quito-oligosacáridos, o también conocidos como factores *Nod*, secretados por la bacteria. Una vez que se logra el reconocimiento recíproco, se produce una interacción y la planta desarrolla nódulos, que son nuevos órganos de la raíz que alojan a la bacteria (Gourion *et al.*, 2015). En los nódulos, la asociación simbiótica se basa en un intercambio de nutrientes, las bacterias proporcionan nitrógeno asimilable a la planta en forma de

amonio y la planta suministra energía a las bacterias en forma de hidratos de carbono (White *et al.*, 2007). En este proceso, la alfalfa puede llegar a fijar de 200 a 250 kg de N por hectárea al año (Dénarie *et al.*, 1992).

El secano interior de la Zona Centro Sur de Chile es un área geográfica que se encuentra en las laderas de la cordillera de la costa, con condiciones de clima mediterráneo que comparte con cuatro regiones del mundo, las cuales son: el sur de Australia, el sur de California (EE.UU.), el extremo sur de Sudáfrica y los países alrededor del mar mediterráneo (Brunel *et al.*, 2013).

En ambientes mediterráneos de secano, la productividad de leguminosas anuales es baja durante el otoño y el invierno, y la senescencia comienza a mediados de la primavera debido a la baja disponibilidad de agua en el suelo. Por otro lado, la labranza intensiva de los suelos de secano ha causado un alto nivel de erosión, degradación física y menor fertilidad en los suelos, disminuyendo la productividad agrícola (Brunel *et al.*, 2013). El uso de leguminosas perennes con raíces pivotantes profundas y con capacidad de extender la temporada de crecimiento, puede proporcionar una alternativa para los sistemas de producción de secano en las regiones con un déficit de humedad del suelo (Dear *et al.*, 2003), además contribuyen a mejorar las características fisicoquímicas del suelo (Moreno *et al.*, 2008) y tienen una mayor eficiencia de uso del agua en comparación con las leguminosas anuales, y son más resistentes a las condiciones climáticas adversas (Howieson *et al.*, 2008). Es por ello que Ovalle *et al.* (2015) introdujeron y estudiaron el establecimiento y productividad de especies de leguminosas perennes, donde la alfalfa y en particular el ecotipo Altasierra-Illapata destacó como una de las opciones forrajeras para las regiones de secano del Centro Sur de Chile. Sin embargo, el inoculante utilizado para alfalfa en estos ensayos (Cepa WSM2141, Australia) no logró persistir de una temporada a otra. Por esto, se planteó la hipótesis de que los alfalfares en la Región de Arica y Parinacota constituyen una fuente de posibles rizobios que se pueden adaptar a las condiciones edafoclimáticas del secano interior, los que podrían ser de interés en el desarrollo de inoculantes específicos para el establecimiento de ecotipos de alfalfa en la zona y también para la inoculación de alfalfa en los valles de Arica y

Parinacota. El objetivo de esta investigación fue identificar cepas de rizobios asociadas a *M. sativa* L. (Alta sierra Illapata) en la Región de Arica y Parinacota y determinar su efectividad simbiótica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Antecedentes generales

La colecta de material vegetal y recolección de suelos se realizó desde distintas zonas de la Región de Arica y Parinacota. El aislamiento, la caracterización e identificación molecular de las bacterias fueron realizados en el Laboratorio de Bacteriología del Departamento de producción vegetal, Universidad de Concepción, Campus Chillán, Región de Ñuble, Chile.

### Colecta de material vegetal y de suelos

La colecta se realizó en noviembre 2018. Los sitios de colecta correspondieron a praderas de alfalfa Alta Sierra-Illapata del Valle de Lluta y Camarones de la Región de Arica y Parinacota (Tabla 1).

Tabla 1. Origen geográfico de muestras de suelos y nódulos en alfalfares de la región de Arica y Parinacota.

Sitio de colecta	Sector	Coordenadas
M1	Quebrada Camarones	19°01'07.5" S, 69°54'59.2" W
M2	Quebrada Camarones	19°00'14.8" S, 69°51'03.3" W
M3	Taltape	19°00'27.8" S, 69°49'02.8" W
M4	Huancarane	18°57'50.2" S, 69°41'19.7" W
M5	Pachica	19°00'27.8" S, 69°49'02.8" W
M6	Illapata	18°56'46.8" S, 69°30'17.5" W
M7	Illapata	18°57'02.5" S, 69°30'12.1" W
M8	Valle de Lluta	18 24'29.0" S, 69°59'21.0" W
M9	Putre	18°11'34.7" S, 69°32'53.7" W
M10	Putre Bajo	19°00'27.8" S, 69°49'02.8" W

En cada sitio, se colectaron muestras de cuatro plantas de alfalfa, realizándose excavaciones a un costado de cada planta para obtener nódulos radiculares desde las raíces laterales. En el caso de encontrarse nódulos, estos fueron depositados en tubos Eppendorf con silica gel y algodón hidrófilo, para ser deshidratados y

preservados hasta su uso en laboratorio. Desde cada orificio de excavación se removió una porción de suelo para luego conformar una muestra compuesta que fue depositada en una bolsa de polietileno y mantenida en una caja refrigerante.

### **Sistema de cultivo trampa**

En los sitios en que no se consiguió encontrar nódulos (M2, M5, M6, M7 y M9), se utilizó una parte de la muestra de suelo para establecer un cultivo trampa con el fin de capturar rizobios para alfalfa. Para ello, se utilizaron macetas de 500 cc desinfectadas con etanol al 70 %, en las cuales se depositó una capa de 6 cm de sustrato arena-perlita estéril, sobre esta, una capa de 2 cm de suelo recolectado y finalmente se cubrió con 1 cm de sustrato arena-perlita (Hungria *et al.*, 2016).

Se utilizaron semillas de alfalfa de la línea comercial Q31, las cuales fueron desinfectadas sumergiéndolas durante tres minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 4 %, posteriormente en etanol al 70 % durante un minuto para finalmente realizar seis lavados en agua destilada estéril, esto con el fin de eliminar residuos de hipoclorito o etanol. Las semillas fueron pre-germinadas en cuatro placas Petri con agar agua al 15 % a una temperatura de 25 °C durante 7 días en una cámara de incubación (Memmert).

En cada maceta se plantaron cuatro semillas pre-germinadas. Con una espátula, previamente esterilizada, se realizaron agujeros en los cuales se depositaron las semillas pre-germinadas utilizando la pinza estéril, cuidando de no dañar la raíz. Finalmente, las plántulas fueron cubiertas y apisonadas utilizando la espátula. Todos los implementos fueron desinfectados con etanol al 70 % al pasar de una maceta a la otra, para evitar contaminación cruzada de microorganismos. Las macetas ya plantadas se mantuvieron en un fitotrón con luz artificial, regulado a 24 °C y bajo condiciones asépticas durante 60 días. Por cada muestra de suelo se realizó tres repeticiones, las cuales fueron dispuestas en un diseño completamente al azar sobre el mesón. Las plantas fueron suplementadas una vez iniciado el ensayo con 20 mL de una solución nutritiva carente de nitrógeno (Howieson, 1995) (Anexo 1).

### **Aislamiento de bacterias desde nódulos**

A partir de los nódulos colectados en terreno y los obtenidos desde las plantas del

cultivo trampa se realizó el aislamiento de rizobios. En el caso de las plantas trampa, se seleccionó aquellos nódulos de mayor tamaño y de coloración rojiza interna, la cual es indicadora de fijación de  $N_2$  (Bottomley y Myrold, 2007), los que fueron removidos junto a un trozo de raíz para así evitar dañarlos y exponer los rizobios. Los nódulos colectados en terreno fueron rehidratados en agua destilada estéril durante una hora, previo a la desinfección.

Los nódulos fueron depositados en un infusor y desinfectados mediante inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 3 % por 90 segundos seguido de 30 segundos en etanol al 70 % y seis lavados en agua destilada estéril para remover los desinfectantes (Hungria *et al.*, 2016). Los nódulos desinfectados fueron prensados con una pinza estéril sobre una placa Petri también estéril, para extraer su contenido. El contenido interior de los nódulos fue sembrado en estrías utilizando un asa bacteriológica esterilizada, en placas Petri con el medio de cultivo agar manitol levadura (YMA del inglés *yeast manitol agar*) más rojo congo como indicador. Los cultivos fueron incubados a 25 °C por 2 a 6 días, dependiendo del crecimiento de cada rizobio. De cada placa se seleccionaron las colonias que presentaron las características típicas de rizobios: colonias pálidas, con abundante exopolisacáridos y que no absorben el rojo congo (Hernández *et al.*, 2012). Las colonias seleccionadas obtenidas de la primera aislación fueron sembradas en nuevas placas con YMA + rojo congo hasta obtener colonias puras (Howieson *et al.*, 2008). Los aislamientos obtenidos fueron criopreservados a -80 °C en un ultrafreezer (Panasonic), previo acondicionamiento en glicerol al 20 % en tubos Eppendorf. Todos los procedimientos descritos se realizaron en una cámara de flujo laminar.

#### **Preparación de células para PCR**

De cada aislamiento multiplicado en YMA, se suspendieron tres asadas de células en tubos Eppendorf con 1 mL de solución salina ( $NaCl$  al 0,89 % P V<sup>-1</sup>) estéril y cada suspensión se centrifugó a 5.000 rpm durante tres minutos, se retiró el sobrenadante para eliminar los exopolisacáridos y luego se resuspendió en solución salina estéril. Cada suspensión de células se estandarizó a una densidad óptica (DO) de 6,0 a 600 nm de longitud de onda. Este proceso se realizó en tres

oportunidades (Gerding, 2011).

### **Determinación de la huella genética de los aislados**

La diversidad genética de los aislados se evaluó a nivel de cepa a través de la amplificación de la huella genética de cada aislado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés Polymerase Chain Reaction) utilizando el partidador RPO1 (Richardson *et al.*, 1995). Cada muestra fue sometida a amplificación aleatoria de ADN polimórfico, técnica conocida como RAPDs (del inglés Random Amplified Polymorphic DNA) (Alberti *et al.*, 2011).

Se utilizó el partidador RPO1 (5' AATTTTCAAGCGTCGTGCCA 3') el cual amplifica regiones conservadas y regiones variables del gen *nif* (Richardson *et al.*, 1995; Gerding *et al.*, 2012), de bacterias fijadoras de nitrógeno. La mezcla de reacción para cada muestra estuvo compuesta de los reactivos y concentraciones indicados en la Tabla 2.

Tabla 2. Mezcla de reactivos para la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPDs) de los aislados, para un volumen final de 20  $\mu$ L.

Reactivo	Volumen ( $\mu$ L)
Preparado celular	1,0
Cloruro de magnesio [50Mm]	2,4
Buffer (5x)	4,0
<i>Taq</i> Polimerasa Go tag	0,5
Desoxirribonucleótidos trifosfatos [10mM]	0,4
Partidor RP01 [100 uM]	0,5
Agua ultrapura	11,2

Las condiciones de PCR para la amplificación del DNA se encuentran descritas en la Tabla 3. Para verificar la amplificación de los fragmentos se realizó una electroforesis con los productos de la PCR en geles de agarosa al 2 % (p v<sup>-1</sup>) previamente teñidos con 10.000 X en Gel Red <sup>TM</sup> Nucleic Acid Stain (Biotium). El producto de la PCR de cada aislamiento se mezcló con 2  $\mu$ L de buffer de carga 6x (Winkler), depositándolo en cada celdilla dejando una libre al comienzo para depositar 18  $\mu$ L de marcador KAPA Universal Ladder. La electroforesis se realizó a 100 Volts por tres horas (Gerding, 2011) y las bandas se visualizaron en un

transiluminador UV conectado a una cámara digital. Para identificar las cepas genéticamente distintas, se analizó los patrones de bandas obtenidos y se construyó una matriz binaria indicando ausencia o presencia de bandas a cada tamaño de fragmento. Para la construcción del cladograma de las relaciones genéticas de los aislados se utilizó la aplicación NEIGHBOR del programa PHYLIP (the Phylogeny Inference Package) que calcula las matrices de distancia genética entre las poblaciones, luego se utilizó el software MEGA 7.0 (Tamura *et al.*, 2007) para visualizar los cladogramas. Sólo se siguió evaluando aquellos aislados que presentaban un patrón de bandas amplificadas único y que por tanto constituían una cepa.

Tabla 3. Programa utilizado para la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPDs) de los aislados asociados a *Medicago sativa*.

Temperatura (°c)	Tiempo (segundos)	N° ciclos
95	300	1
94	30	5
50	10	5
72	90	5
94	30	35
55	25	35
72	90	35
72	300	1
4	indefinido	

### Identificación de especies por amplificación del gen parcial 16S rRNA

Para poder identificar cada cepa a nivel de especie, se amplificó un fragmento del gen parcial 16s rRNA. Las células de cada cepa fueron preparadas siguiendo el protocolo descrito para el RAPDs PCR, ajustando a una densidad óptica de 6,0 a 600 nm.

La amplificación del ADN Ribosomal 16s rRNA se llevó a cabo con 2 µL de células concentradas, 6,0 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 20,0 µL de buffer GoTaq® 5X, 0,5 µL de Taq polimerasa, 2 µL dntp [10 mM], 0,5 µL de partidor 27 F, 0,5 µL de partidor 1492 R a [50 mM] respectivamente (Tabla 4), y 68,5 µL de agua ultra pura para PCR para completar 100 µL por reacción. Las condiciones de PCR se

encuentran descritas en la Tabla 5. La PCR se llevó a cabo en un termociclador (Tempora Model MG96G).

Tabla 4. Partidores utilizados para la amplificación del gen parcial 16S rRNA de las cepas asociadas a *Medicago sativa*.

Partidor	Concentración [mM]	Secuencia
27 F	50	5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'
1492 R	50	5' GGCTACCTTGTTACGACTT 3'

Tabla 5. Programa utilizado para la amplificación del DNA Ribosomal 16s de las cepas asociadas a *Medicago sativa*.

Temperatura (°C)	Tiempo (s)	N° ciclos
95	300	1
94	30	30
55	30	30
72	90	30
72	420	1
4	indefinido	

Los productos de PCR se analizaron en electroforesis en gel de agarosa al 1,2 % (p v<sup>-1</sup>) teñida con GelRed Nucleic Acid Gel Stain™ (Biotium, Hayward, CA). Una vez confirmada la amplificación de la región parcial de 16s rRNA, las muestras de ADN amplificado fueron enviadas a secuenciar a Macrogen Korea. Los cromatogramas de las secuencias obtenidas fueron revisados y ensamblados, manualmente con el programa GeneTool 1.0.

Para la construcción del árbol filogenético se utilizó el método de reconstrucción a distancia Neighbor Joining con el programa MEGA 7.0. Las "cepas tipo" utilizadas en la construcción del árbol filogenético fueron obtenidas desde el National Center for Biotechnology Information (NCBI). El árbol filogenético incluyó cepas de este trabajo que fueron identificadas como rizobios, cepas tipo de los géneros *Ensifer* y *Rhizobium* y cepas aisladas de alfalfa en Magallanes del trabajo realizado por Galaz (2019). Se incluyó genes de dos cepas

del género *Burkholderia* como outgroup del árbol.

### **Ensayo de efectividad simbiótica en planta**

Este experimento fue llevado a cabo en el fitotrón de la Estación Experimental El Nogal, Campus Chillán, durante los meses de junio a agosto de 2019, con el objetivo de evaluar la efectividad de fijación de nitrógeno de las cepas que fueron identificadas como rizobios.

**Preparación de frascos para cultivo y sustratos.** Los frascos para cultivo (Incutissue ®) de 250 cc fueron lavados con una solución detergente, se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 1 % por un periodo de 24 h y posteriormente se lavaron con agua destilada. Cada frasco incluyó una pieza conectora que fue desinfectada siguiendo el protocolo anterior. Se utilizó arena-perlita como sustrato en proporción 1:1, la cual fue esterilizada por 30 min en autoclave (121 °C).

**Preparación del inoculante.** Se reactivaron los aislamientos desde glicerol y se incubaron en medio YMA durante 7 días. Se extrajeron asadas de inóculo, se depositaron en tubos con sacarosa al 1 % y se estandarizaron a densidad óptica de 0,1 a longitud de onda de 600 nm.

**Siembra e inoculación de plántulas.** Previo a la inoculación se realizó la desinfección de las semillas de alfalfa de la línea Altasierra-Illapata, en una solución de etanol al 70 % v/v agitando durante 30 s y posteriormente en hipoclorito de sodio al 4 % por 90 s. Para finalizar se lavaron seis veces con agua destilada estéril. Una vez desinfectadas fueron sembradas en frascos para cultivo (Incutissue ®) con un volumen de 250 cc de sustrato arena-perlita en proporción 1:1 y 250 cc para el desarrollo aéreo, más una pieza conectora. La siembra se realizó en cámara de flujo laminar para evitar contaminación depositando seis semillas por cada frasco más 20 mL de solución nutritiva exenta de nitrógeno (Anexo 1). Siete días después de la siembra se realizó un raleo y se dejaron dos plantas por frasco y se inoculó cada planta con 1 mL de cultivo bacteriano con una densidad óptica de 0,1 a longitud de onda de 600 nm.

**Diseño experimental y evaluaciones.** El diseño experimental fue completamente al azar, con cuatro repeticiones por tratamiento. Los tratamientos correspondieron

a la inoculación con 13 cepas identificadas como *Ensifer meliloti* desde los distintos sectores de la Región de Arica y Parinacota (Apendice 1), se incluyó además un testigo sin inocular y sin nitrógeno y un testigo sin inocular y con nitrógeno, al cual se le adicionó 10 mL de  $\text{KNO}_3$ . Fueron 15 tratamientos en total. Transcurridas 5 semanas, se abrieron los frascos, se lavó el sistema radicular y se evaluaron los siguientes parámetros:

**Peso seco aéreo.** Se separó la parte aérea de la radicular, las cuales fueron depositadas en bolsas de papel y secadas a 60 °C hasta peso constante, para luego determinar peso seco de cada unidad experimental.

**Número y efectividad de nódulos e índice de nodulación.** Se contabilizó el número de nódulos, se registró la posición del nódulo en el sistema radicular (ya sea si se encontraba en la raíz principal o en las raíces secundarias), se midió la longitud de cada nódulo y se clasificó en pequeño (menor que 2 mm), mediano (mayor o igual que 2 mm y menor que 4 mm) y grande (mayor o igual que 4 mm). Se diseccionó cada nódulo para poder ver su coloración interna (blanca, rosada o roja) y así determinar su efectividad, si la coloración es roja o rosada el nódulo se consideró efectivo y si fue blanca, inefectivo. Para evaluar el índice de nodulación, se utilizó los datos de ubicación en la raíz y tamaño de nódulos basándose en la escala de nodulación propuesta por el Centre for *Rhizobium* Studies (Tiwari y Kulasooriya, 2012) (Anexo 2), donde a los nódulos de mayor tamaño y ubicados en la raíz principal más cercanos a la corona, se les asignó un valor mayor y a los nódulos de menor tamaño, ubicados en las raíces laterales más alejados de la corona, se les asignó un valor menor.

#### **Análisis de datos**

Los datos de peso seco aéreo fueron tabulados y sometidos a análisis de conglomerados de acuerdo a la distancia Euclídea, agrupando los datos en tres conglomerados. Las variables: número de nódulos totales e índice de nodulación, fueron sometidas a análisis de varianza no paramétrica de Kruskal Wallis ( $P \leq 0,05$ ) y en caso de encontrarse diferencias significativas la separación de medias se realizó con el test de Conover. Todos los análisis fueron realizados en el programa estadístico Infostat versión 2008 (Balzarini *et al.*, 2008).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Colecta de material y aislamiento bacteriano

En la prospección realizada en la Región de Arica y Parinacota fue posible encontrar nódulos radiculares en alfalfa en los siguientes sectores: M1, M3, M4, M8, obteniéndose 39 aislados. Desde las muestras de suelo en los sitios M2, M5, M6, M7 y M9, utilizadas en sistema cultivo-trampa, se logró inducir nodulación en alfalfa en todos los casos, obteniéndose 6 aislados bacterianos. Las colonias para todos los aislados fueron mucilaginosas y de color blanquecino con un crecimiento rápido en medio YMA, lo que coincide con lo descrito para *E. meliloti*, el simbiote asociado a alfalfa (Hungria *et al.*, 2016). Además, las colonias no absorbieron el colorante rojo del medio YMA, característica que es típica de los rizobios y que permite reconocerlos de los contaminantes (Hungria *et al.*, 2016). Algunos aislados de los sitios M1, M2, M4, M8, M10, no presentaron ningún tipo de crecimiento bacteriano o las bacterias obtenidas no presentaron las características descritas para rizobios en el medio de cultivo YMA más rojo congo, por lo que fueron excluidas de los análisis.

Todos los nódulos, tanto los colectados en terreno como del cultivo trampa, fueron del tipo indeterminado con morfología elongada o ramificada. La clasificación de los nódulos como determinados o indeterminados se basa en la ubicación del meristema. El nódulo indeterminado se origina a partir de divisiones celulares en la corteza interna y tiene un meristema apical persistente. El nódulo determinado se origina a partir de divisiones de células de la corteza externa el cual no tiene un meristema persistente (Lima, 2012). Los rizobios asociados a alfalfa se caracterizan por formar nódulos indeterminados cuya morfología puede variar entre una elongación a varias ramificaciones (Tejera *et al.*, 2007).

### Determinación de la huella genética de los aislados

De acuerdo a la huella genética obtenida con el partidor RPO1 mediante RAPDs PCR, se pudo observar amplificación de los fragmentos en los 45 aislados bacterianos de *Medicago sativa*. El análisis del patrón de bandas permitió construir un cladograma e individualizar cepas genéticamente distintas entre sí y eliminar copias idénticas. La Figura 1 muestra el cladograma generado con las huellas genéticas de los distintos aislados, distinguiéndose 33 cepas genéticamente

únicas, cuyo origen geográfico se detalla en la Tabla 6.

Tabla 6. Cepas bacterianas aisladas desde nódulos radiculares de alfalfa (*Medicago sativa*) desde plantas en terreno o en sistema cultivo-trampa con suelos colectados desde la Región de Arica y Parinacota.

Cepa	Sitio de colecta	Origen
1,2,3,4,5,6,7	M1, Quebrada Camarones	Nódulos de terreno
8,9,10,11,12,32	M3, Taltape	Nódulos de terreno
13,14	M4, Huancarane	Nódulos de terreno
15,16,17,18,19,20,21,30 31,33	M8, Valle de Lluta	Nódulos de terreno
22,23	M10, Putre bajo	Nódulos de terreno
24	M2, Quebrada Camarones	Sistema cultivo-trampa
25	M5, Pachica	Sistema cultivo-trampa
26,27	M6, Illapata	Sistema cultivo-trampa
28	M7, Illapata	Sistema cultivo-trampa
29	M9, Putre	Sistema cultivo-trampa

### Identificación por secuenciación de 16S rRNA

La secuenciación y análisis filogenético del gen parcial 16S rRNA de las diferentes cepas permitió identificar ocho géneros: *Ensifer*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Curtobacterium*, *Klebsiella*, *Ochrobactrum*, *Escherichia* y *Serratia*. En donde trece de las cepas, (4, 9, 11, 14, 15, 16, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30), se encontraron dentro del género *Ensifer*, en el clado de la especie *Ensifer meliloti* (Figura 2). *E. meliloti* es el microsimbionte dominante asociado a leguminosas del género *Medicago*, se asocia predominantemente con especies del género *Medicago* adaptadas a suelos alcalinos o neutros (Garau *et al.*, 2005), características que son similares al sector de colecta de las muestras de nódulos en la Región de Arica y Parinacota (Apéndice 2). *Ensifer* ha sido descrito como el simbiote específico para alfalfa (Yan *et al.*, 2000) y es el rizobio utilizado en inoculantes comerciales para alfalfa (Bromfield *et al.*, 2010; Redondo *et al.*, 2012).

Figura 1. Cladograma de las relaciones genéticas entre 45 aislados bacterianos de *Medicago sativa*, de acuerdo al producto de RAPDs - PCR con el partidor RPO1.

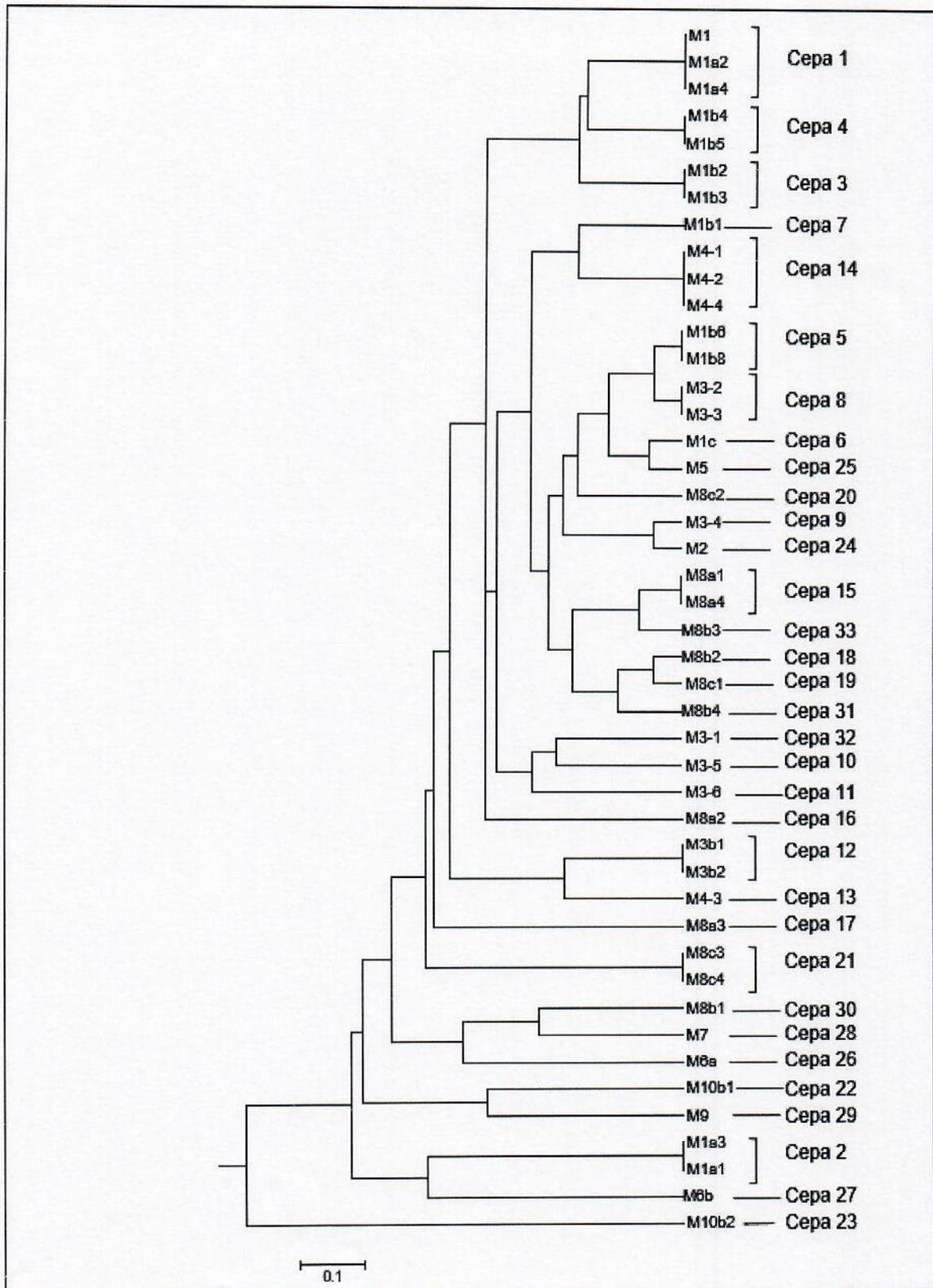
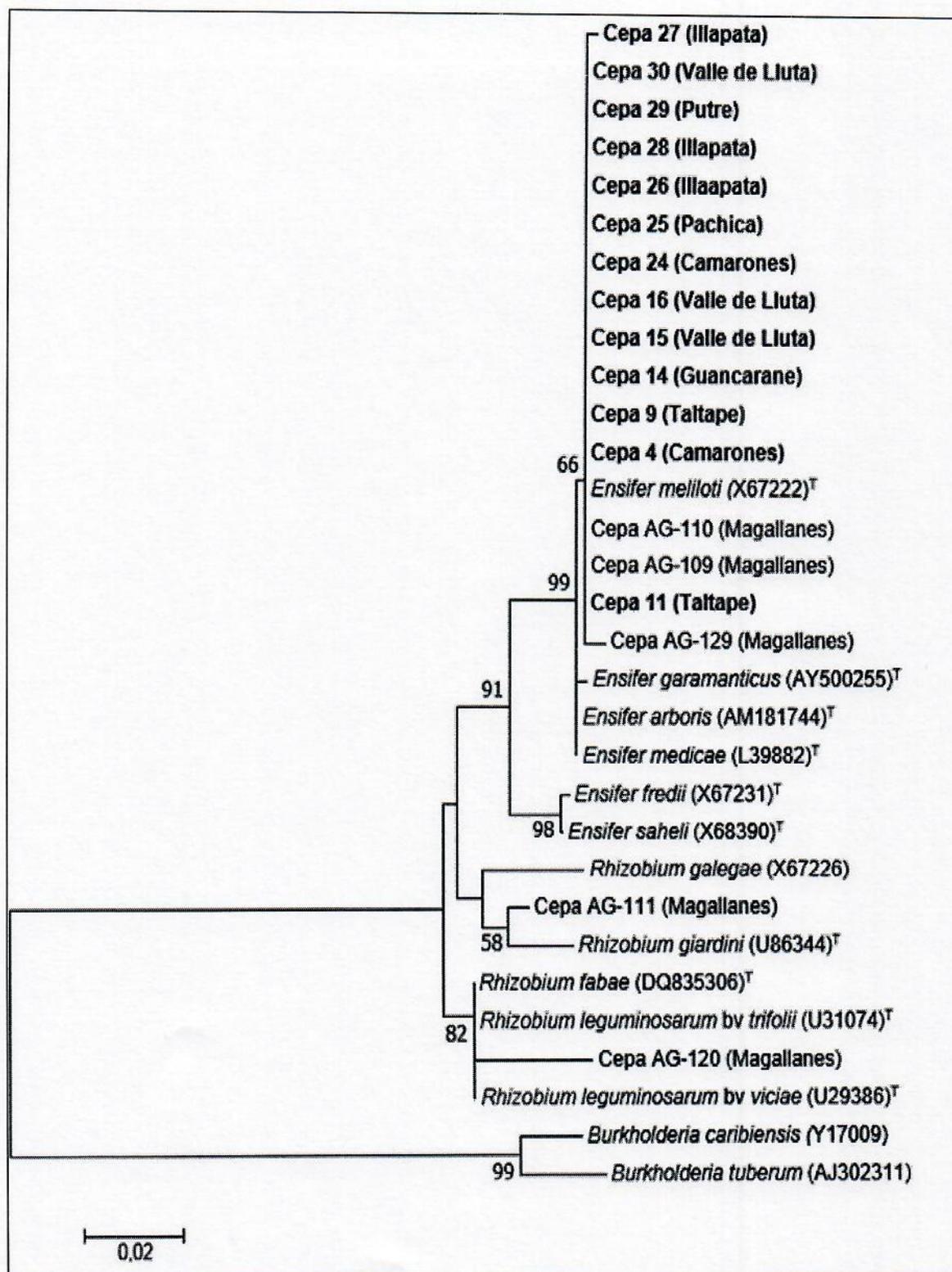


Figura 2. Árbol filogenético del gen ribosómico 16S rRNA de las cepas de rizobios asociadas a *Medicago sativa*.



Secuencias tipo (T) obtenidas en el National Center for Biotechnology information (NCBI) con su respectivo número de acceso al GenBank. La barra indica 1% sustituciones de nucleótidos.

En este trabajo se obtuvo un 70% de bacterias no identificadas como rizobios, coincidiendo con los resultados de Galaz (2019) en alfalfares de Magallanes.

La cepa 1 fue identificada como *Pseudomonas* spp., que es un género que, a pesar de que no induce nodulación, ha logrado incrementos en nodulación por rizobios ya que, al producir hormonas, promueve el crecimiento de pelos radicales permitiendo una interacción más efectiva por rizobios (Fox *et al.*, 2011).

Las cepas 13, 19, 20, 21, 31 y 33, pertenecen al género *Stenotrophomonas*, las especies de este género, especialmente *S. maltophilia* y *S. rhizophila*, a menudo se encuentran en asociación con plantas. Estas bacterias se pueden aislar de la rizósfera, o de los tejidos internos de las plantas, particularmente de los tejidos vasculares de la raíz y el tallo. Se han aislado cepas endofíticas de *S. maltophilia* de las raíces de muchas especies de plantas, incluyendo, papa (*Solanum tuberosum*), alfalfa (*Medicago sativa*), maíz (*Zea mays*) (Schwieger y Tebbe, 2000). Ninguno de estos géneros ha sido reportado como bacterias capaces de formar nódulos en leguminosas, pero se encuentran dentro de las bacterias consideradas endófitos no rizobiales (NRE) (de Meyer *et al.*, 2015). Las bacterias NRE tienen efectos benéficos sobre las plantas hospedadoras como la promoción del crecimiento de las plantas y la fijación de nitrógeno (Andrews *et al.*, 2010). Todos los estudios mencionados anteriormente sugieren que además de rizobios, los NRE están presentes dentro de los nódulos de la raíz. Un estudio realizado por de Meyer *et al.* (2015) pudo concluir que *E. meliloti* puede establecer una relación simbiótica con bacterias de vida libre, permitiéndoles la entrada al nódulo. Wigley *et al.* (2017) descubrieron que en nódulos de alfalfa pueden encontrarse bacterias endófitas no nodulares, como *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Mycobacterium*, aparte del rizobio *E. meliloti* y concluyeron que esta interacción podría hacer más eficiente la simbiosis de *E. meliloti* con alfalfa y aumentar la producción.

En los sectores de muestreo de nódulos, en particular los suelos del sector M1 (Tabla 6), se identificaron los géneros *Curtobacterium*, *Klebsiella*, *Escherichia* y *Serratia* donde están incluidas las cepas 2, 3, 6, 7 y 32. La presencia de estos géneros bacterianos podría evidenciar la existencia de contaminación por aguas

servidas (Van der Kooij, 1992). Knobelsdorf y Mujeriego (1997), demostraron que bacterias de estos géneros proliferan en las aguas de riego contaminadas y en los sistemas de almacenamiento y distribución de agua potable constituyendo un ambiente propicio para el desarrollo bacteriano. Es muy probable que estas cepas de bacterias entéricas se hayan adaptado a la rizósfera, incluso pudiendo establecerse como endófitos y promover el crecimiento de las plantas, como ha sido reportado por diversos autores (Taghavi *et al.*, 2010; Wright *et al.*, 2013; Yousaf *et al.* 2011).

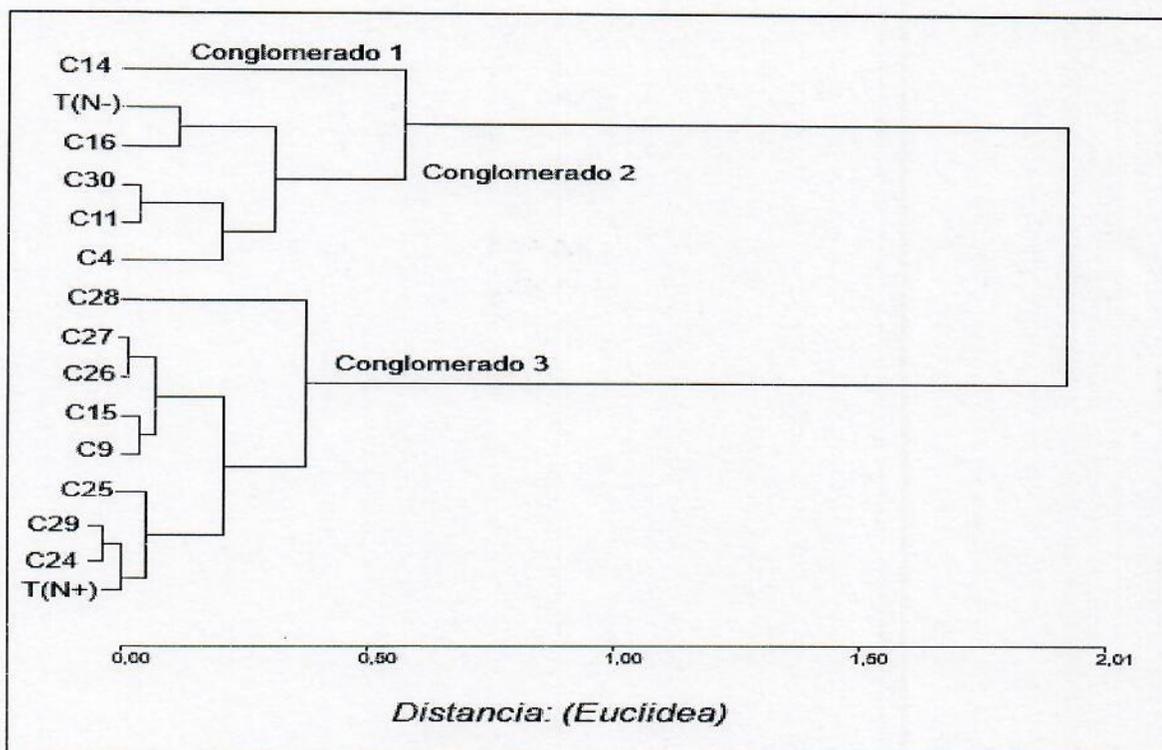
Las cepas 10 y 12 aisladas de suelos del sector Taltape (Tabla 6), pertenecen al género *Ochrobactrum*, género que incluye bacterias de la rizósfera que juegan un papel vital en el crecimiento de las plantas, control de patógenos, biodegradación y la señalización de la rizósfera, cualidades descritas por Imram *et al.* (2014), quien realizó un estudio en el cual se inocularon plantas de frejol con bacterias de este género, resultando un aumento significativo en la altura de la planta, peso fresco y la absorción de nitrógeno en comparación con plantas no inoculadas.

### **Ensayo de efectividad simbiótica en planta**

Las plantas inoculadas con las trece cepas de *Ensifer meliloti* presentaron nódulos en sus raíces, estos fueron del tipo indeterminado con morfología elongada o ramificada y los tratamientos sin inoculación no presentaron nodulación. A partir del análisis de conglomerados en base al peso seco aéreo de alfalfa (Figura 3), se logró identificar tres grupos. El conglomerado 2 incluyó las cepas 4, 11, 16, 30, que obtuvieron un peso seco aéreo inferior al testigo con nitrógeno (N+), las cuales quedaron agrupadas cercanas al testigo sin nitrógeno (N-) y por lo tanto son cepas que no son de interés para futuros ensayos de fijación biológica de N. El conglomerado 1 incluyó sólo a la cepa 14 al tener un peso seco aéreo superior al testigo sin nitrógeno (N-), pero inferior al testigo con nitrógeno (N+), además de ser parcialmente efectiva (Figura 4). El conglomerado 3 incluyó a las cepas 9, 15, 24, 25, 26, 27, 28 y 29, que obtuvieron un peso seco aéreo similar al testigo con nitrógeno (N+) y que además fueron categorizadas como efectivas (Yates, 2008) (Figura 4), siendo de interés para el futuro desarrollo de inoculantes específicos

para alfalfa.

Figura 3. Cladograma comparativo de cepas de *Ensifer meliloti* con testigo N+ y N- en base al peso seco aéreo en alfalfa, generado por análisis de conglomerados de acuerdo con la distancia euclídea.

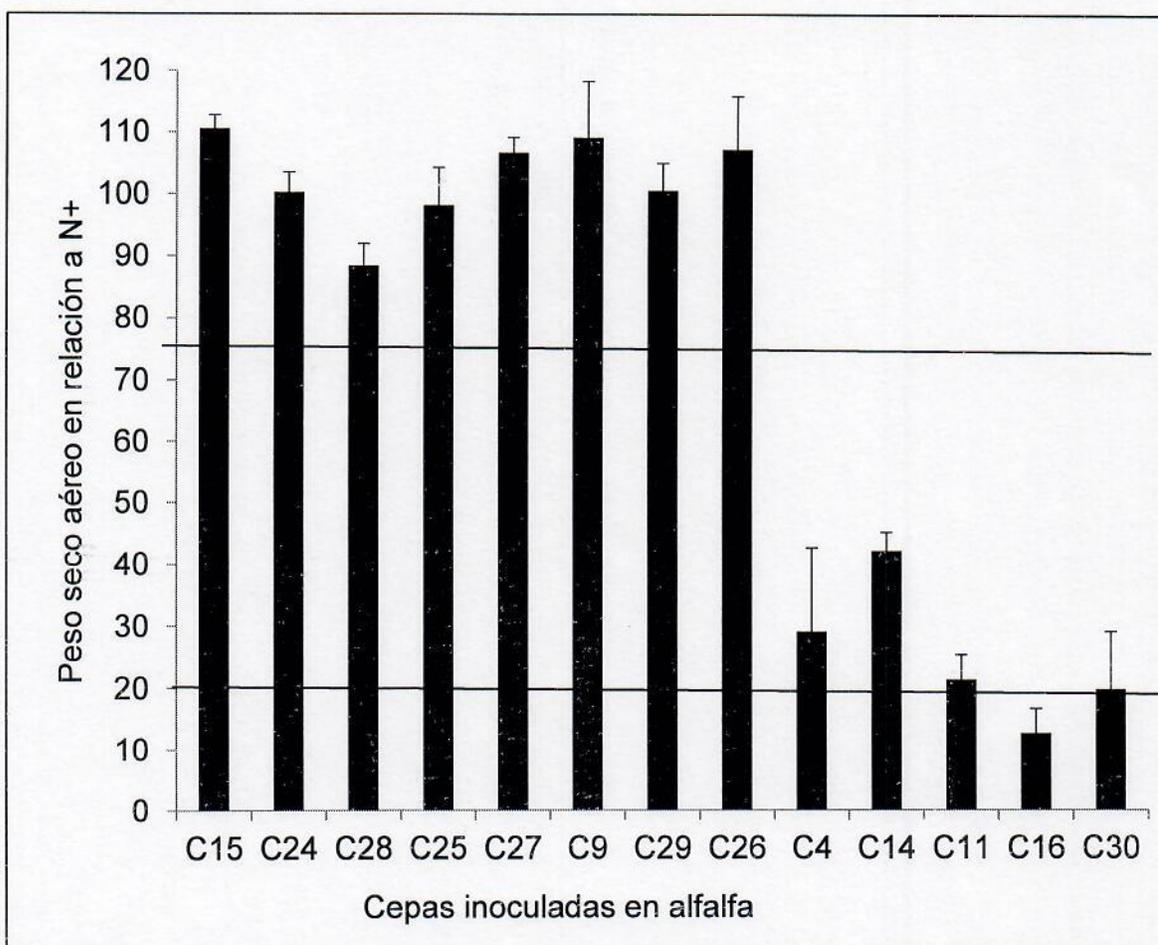


T(N+): Testigo con fertilización nitrogenada; T(N-): Testigo sin fertilización nitrogenada  
C: Cepas de rizobios

La figura 4 presenta la respuesta de *Medicago sativa* a la inoculación con las distintas cepas de *E. meliloti*, expresado en porcentaje de peso seco aéreo con relación al testigo con nitrógeno (N+). Las cepas 9, 15, 24, 25, 26, 27, 28 y 29, lograron alcanzar los porcentajes más altos, considerándose como cepas efectivas de acuerdo a Yates (2008), ya que superaron el 75 % del peso seco del testigo (N+). Las cepas 4, 14, 11 y 30 son consideradas parcialmente efectivas ya que tienen un porcentaje superior al 20 % y menor al 75 % (Yates, 2008). La única cepa inefectiva fue la cepa 16 que se encuentra por debajo del 20 % del peso aéreo del testigo con nitrógeno (N+), cabe destacar que corresponde al mismo sector de muestreo de la Cepa 15 (Tabla 6), la cual es efectiva y logró el mayor porcentaje de peso seco aéreo, por lo tanto se puede demostrar que aunque sean

bacterias del mismo género (*Ensifer*), al ser individuos diferentes tienen capacidades distintas como el ser capaces de nodular con alta efectividad o nodular pero sin ser efectivas.

Figura 4. Producción de materia seca aérea en relación al peso seco aéreo del tratamiento N+ para *Medicago sativa*.

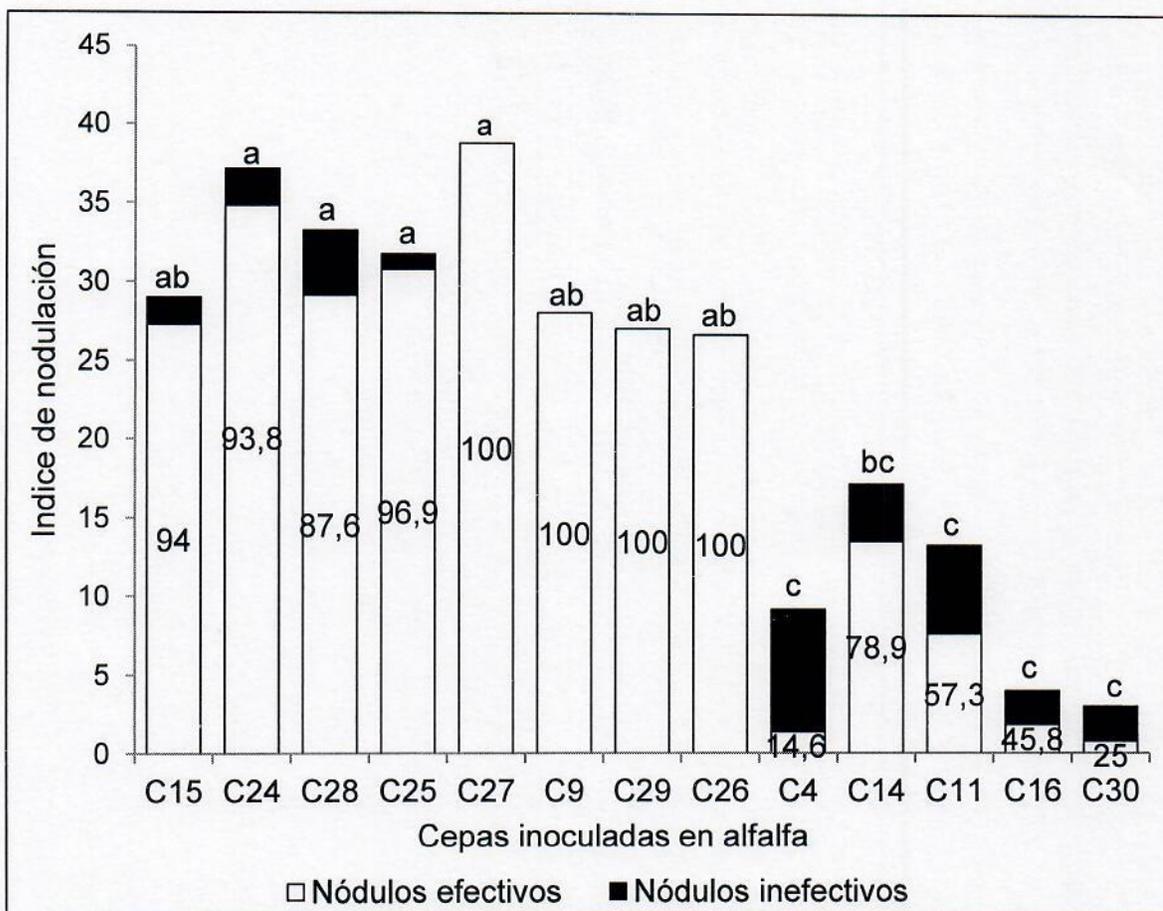


N+: Testigo con fertilización nitrogenada; C: Cepas de rizobios

La cantidad de nódulos por sistema radicular suele ser un buen indicador de la habilidad del rizobio para colonizar la raíz (Franco y Vincent, 1976), sin embargo, a diferencia del índice de nodulación no muestra si estos se encuentran efectivamente fijando nitrógeno, ni tampoco la distribución de los nódulos en la raíz. En la Figura 5 se observa el índice de nodulación alcanzado por las distintas cepas y el respectivo porcentaje de efectividad de los nódulos determinado en base al color interno de estos. Las cepas 4, 11, 14, 16 y 30, si bien no fueron de

las que lograron mayor índice de nodulación ni el mayor número de nódulos totales (Apéndice 2), si fueron capaces de nodular y fijar nitrógeno con *Medicago sativa*.

Figura 5. Índice de nodulación y efectividad de nódulos en *Medicago sativa* inoculadas con distintas cepas de rizobios



Letras distintas entre tratamientos indican diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ), según prueba de Kruskal Wallis. Nódulos efectivos se detallan en porcentaje (%) al interior de la barra; C: Cepas de rizobios

Las cepas 9, 15, 24, 25, 26, 27, 28, 29 fueron de las que lograron mayor índice de nodulación y coincidentemente, estas cepas fueron las que alcanzaron mayor número de nódulos totales (Apéndice 2), indicando que estas cepas no solo inducen la formación de una alta cantidad de nódulos, si no que estos son de un mayor tamaño y ubicados en la raíz principal (Anexo 2) y en su mayoría, efectivos en fijación de nitrógeno. Es importante destacar a las cepas 9, 26, 27 y 29 ya que

además alcanzaron un 100 % de efectividad de nódulos en alfalfa.

El análisis de datos de efectividad arrojó diferencias estadísticas significativas entre distintas cepas, variando entre 25 % a 100 % de efectividad ( $P \leq 0,05$ ). La efectividad entrega información de la cantidad de nódulos que se encuentran fijando nitrógeno, parámetro relevante de analizar pues existe la posibilidad de que la planta forme nódulos incapaces de sintetizar amonio. La coloración rojiza de los nódulos indica que están realizando fijación de dinitrogeno atmosférico ( $N_2$ ), ya que se debe a la presencia de leg-hemoglobina, hemoproteína que es producida en las raíces de las leguminosas colonizadas por rizobios (Mathieu *et al.*, 1998) y que es un componente esencial para la fijación de  $N_2$  (Becana y Klucas, 1992). La enzima nitrogenasa es la encargada de convertir el nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) en amonio ( $NH_3$ ) en los nódulos (Fourmond y Léger, 2017) y pierde su actividad si es expuesta a niveles atmosféricos de oxígeno, es por ello que la leg-hemoglobina facilita la difusión del  $O_2$  y junto con las altas tasas de respiración de los bacteroides, se asegura un flujo rápido de  $O_2$ , evitando cambios repentinos del gas que podrían ser perjudiciales para la nitrogenasa (Becana y Klucas, 1992).

Este trabajo de investigación permite contar con cepas de rizobio que se podrían adaptar a suelos con diferentes niveles de pH y a las condiciones edafoclimáticas del secano interior de la zona Centro Sur de Chile y probablemente capaces de sobrevivir y realizar simbiosis con praderas de alfalfa en condiciones bajas de humedad y erosión de los suelos.

## CONCLUSIONES

1. Entre las bacterias aisladas desde nódulos de *Medicago sativa* (Ecotipo Alta Sierra Illapata) de la Región de Arica y Parinacota, se logró identificar los géneros *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Curtobacterium*, *Klebsiella*, *Ochrobactrum*, *Escherichia*, *Serratia* y solo a la especie *Ensifer meliloti* dentro de la familia Rhizobiaceae.
2. *Medicago sativa* (Ecotipo Alta Sierra Illapata) en la Región de Arica y Parinacota es capaz de realizar simbiosis principalmente con bacterias de la especie *Ensifer meliloti*.

3. De las 13 cepas de *Ensifer meliloti* aisladas de la región de Arica y Parinacota, 8 cepas fueron categorizadas como simbióticamente efectivas en *Medicago sativa*.
4. Las cepas 9, 26, 27 y 29 lograron 100 % de nódulos efectivos en *Medicago sativa*, destacando la cepa 27 que obtuvo el mayor índice de nodulación.

## REFERENCIAS

1. Alberti, E., J. Fraga, R. García, E. Hernández, K. de la Cuetara, L. Castillo y T. Serrano. 2011. Estudio del polimorfismo genético de las células de la médula ósea y del sistema nervioso central de ratas mediante de técnica de RAPD. Rev. Colomb. Biotecnol. 13(1): 42-51.
2. Amato, M., B. Basso, G. Celano, G. Bitella, G. Morelli and R. Rossi. 2008. *In situ* detection of tree root distribution and biomass by multielectrode resistivity imaging. Tree Physiol. 28(10): 1441-1448.
3. Andrews, M., S. Hodge and J.A. Raven. 2010. Positive plant microbial interactions. Ann. Appl. Biol. 157(3): 317-320.
4. Balzarini, M.G., L.A González, E.M. Tablada, F. Casanoves, J.A. Di Rienzo y C.W. Robledo. 2008. InfoStat: software estadístico. Manual del usuario. Versión 2008. Córdoba, Argentina: Brujas.
5. Becana, M. and R.V. Klucas. 1992. Oxidation and reduction of leghemoglobin in root nodules of leguminous plants. Plant Physiol. 98(4): 1217-1221.
6. Bottomley, P.J. and D.D. Myrold. 2007. Biological N inputs. pp: 365-388. In: E.A. Paul (Ed.). Soil microbiology, ecology, and biochemistry. (3rd. ed.). Academic Press. Burlington, USA.
7. Bromfield, E.S.P., J.T. Tambong, S. Cloutier, D. Prévost, G. Laguerre, P. van Berkum, T.V. Tran Thi, R. Assabgui and L.R. Barran. 2010. *Ensifer*, *Phyllobacterium* and *Rhizobium* species occupy nodules of *Medicago sativa* (alfalfa) and *Melilotus alba* (sweet clover) grown at a Canadian site without a history of cultivation. Microbiology 156(Pt. 2): 505-520.
8. Brunel, N., O. Seguel and E. Acevedo. 2013. Conservation tillage and water availability for wheat in the dryland of central Chile. J. Soil Sci. Plant Nutr. 13(3): 622-637.

9. Coba de la Peña, T. and J.J. Pueyo. 2012. Legumes in the reclamation of marginal soils, from cultivar and inoculant selection to transgenic approaches. *Agron. Sustain. Dev.* 32(1): 65-91.
10. Dear, B.S., G.A. Moore and S.J. Hughes. 2003. Adaptation and potential contribution of temperate perennial legumes to the southern Australian wheatbelt: a review. *Aust. J. Exp. Agric.* 43(1): 1-18.
11. De Meyer, S.E., K. De Beuf, B. Vekeman and A. Willems. 2015. A large diversity of non-rhizobial endophytes found in legume root nodules in Flanders (Belgium). *Soil Biol. Biochem.* 83: 1-11.
12. Dénarié, J., F. Debellé and C. Rosenberg. 1992. Signaling and host range variation in nodulation. *Annu. Rev. Microbiol.* 46: 497-531.
13. Doyle, J.J. and M.A. Luckow. 2003. The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol.* 131(3): 900–910.
14. Faúndez, L., R. Flores, A. Faúndez y M. Trumún. 2014. Reino Plantae. pp: 164-168. En: J. Hernández, C. Estades, L. Faúndez y J. Herreros (Eds.). Biodiversidad terrestre de la Región de Arica y Parinacota. Universidad de Chile. Santiago, Chile.
15. Fourmond, V. and C. Léger. 2017. Dinitrogen reduction: interfacing the enzyme nitrogenase with electrodes. *Angew. Chem. Int. Educ.* 56(16): 4388-4390.
16. Fox, S.L., G.W. O'Hara and L. Bräu. 2011. Enhanced nodulation and symbiotic effectiveness of *Medicago truncatula* when co-inoculated with *Pseudomonas fluorescens* WSM3457 and *Ensifer (Sinorhizobium) medicae* WSM419. *Plant Soil* 348(1-2): 245-254.
17. Franco, A.A. and J.M. Vincent. 1976. Competition amongst rhizobial strains for the colonization and nodulation of two tropical legumes. *Plant Soil* 45(1): 27-48.
18. Fuentes, F., H. Subiabre y R. Ladrix. 2009. Producción de forrajes Valle de Lluta. Informativo N°6. INIA Ururi. Arica, Chile.
19. Galaz, L.F. 2019. Diversidad de rizobios asociados a praderas de alfalfa (*Medicago sativa*) en la Región de Magallanes. Memoria de título, Ingeniero Agrónomo. Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía. Chillán, Chile.

20. Garau, G., W.G. Reeve, L. Brau, P. Deiana, R.J. Yates, D. James, R. Tiwari, G.W. O'Hara and J.G. Howieson. 2005. The symbiotic requirements of different *Medicago* spp. suggest the evolution of *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* with hosts differentially adapted to soil pH. *Plant Soil* 176(1-2): 263–277.
21. Gerding, M. 2011. Phylogenetic and ecological characterisation of the root nodule bacteria from legumes in the African genus *Lessertia*. Thesis, Doctor of Philosophy. Murdoch University. Perth, Australia.
22. Gerding, M., G.W. O'Hara, L. Bräu, K. Nandasena and J.G. Howieson. 2012. Diverse *Mesorhizobium* spp. with unique *nodA* nodulating the South African legume species of the genus *Lessertia*. *Plant Soil* 358(1-2): 385-401.
23. Gourion, B., K. Bonaldi and E. Giraud. 2015. Metabolism of photosynthetic bradyrhizobia during root and stem symbiosis with *Aeschynomene* legumes. pp: 283-291. In: F.J. de Bruijn (Ed.). *Biological nitrogen fixation*. Volume 1. Wiley Blackwell. Hoboken, USA.
24. Hernández, J.L., J.G. Cubillos-Hinojosa y P.E. Milian. 2012. Aislamiento de cepas de *Rhizobium* spp., asociados a dos leguminosas forrajeras en el Centro Biotecnológico del Caribe. *Rev. Colomb. Microbiol. Trop.* 2(2): 51-62.
25. Howieson, J.G. 1995. Characteristics of an ideotype acid tolerant pasture legume symbiosis in Mediterranean agriculture. *Plant Soil* 171(1): 71-76.
26. Howieson, J.G., R.J. Yates, K.J. Foster, D. Real and R.B. Besier. 2008. Prospects for the future use of legumes. pp: 363-393. In: M.J. Dilworth, E.K. James, J.I. Sprent and W.E. Newton (Eds.). *Nitrogen-fixing leguminous symbioses*. Springer Science+Business Media B.V. Dordrecht, The Netherlands.
27. Hungria, M., G.W. O'Hara, J.E. Zilli, R.S. Araujo, R. Deaker and J.G. Howieson. 2016. Isolation and growth of rhizobia pp: 39-60. In: J.G. Howieson and M.J. Dilworth (Eds.). *Working with rhizobia*. Australian Centre for International Agricultural Research. Canberra, Australia.
28. Imran, A., M.J.A. Saadalla, S.-U. Khan, M.S. Mirza, K.A. Malik and F.Y. Hafeez. 2014. *Ochrobactrum* sp. Pv2Z2 exhibits multiple traits of plant growth promotion, biodegradation and *N*-acyl-homoserine-lactone quorum sensing. *Ann. Microbiol.* 64(4): 1797–1806.

29. Knobelsdorf, J. y R. Mujeriego. 1997. Crecimiento bacteriano en las redes de distribución de agua potable: una revisión bibliográfica. *Ing. Agua* 4(2): 17-28.
30. Lemus, Z., M.E. García, M.M. García y A. Chong. 2003. La alfalfa: Un remineralizante de excelencia en el mundo vegetal. *MEDISAN* 7(4): 2-6.
31. Lima, D. 2012. Análisis del mecanismo involucrado en el fenotipo Succ+ de un mutante *dctB* de *Rhizobium tropici* CIAT899. Tesis de grado, Licenciatura en Biología. Universidad de la República, Facultad de Ciencias. Montevideo, Uruguay.
32. Mathieu, C., S. Moreau, P. Frenedo, A. Puppo and M.J. Davies. 1998. Direct detection of radicals in intact soybean nodules: presence of nitric oxide-leghemoglobin complexes. *Free Radic. Biol. Med.* 24(7-8): 1242-1249.
33. McCulley, R.L., E.G. Jobbágy, W.T. Pockman and R.B. Jackson. 2004. Nutrient uptake as a contributing explanation for deep rooting in arid and semi-arid ecosystems. *Oecologia* 141(4): 620-628.
34. Moreno, M., J. Gulías, M. Lazaridou, H. Medrano and J. Cifre. 2008. Ecophysiological strategies to overcome water deficit in herbaceous species under Mediterranean conditions. *Options Méditerranéennes. Serie A. Séminaires Méditerranéens* (79): 247-257.
35. Ovalle, C., S. Espinoza, V. Barahona, M. Gerding, A. Humphries and A. del Pozo. 2015. Lucerne and other perennial legumes provide new options for rain fed livestock production in the Mediterranean-climate region of Chile. *Cienc. Investig. Agrar.* 42(3): 461-474.
36. Rebello, C.J., F.L. Greenway and J.W. Finley. 2014. A review of the nutritional value of legumes and their effects on obesity and its related co-morbidities. *Obes. Rev.* 15(5): 392-407.
37. Redondo, F.J., T. Coba de la Peña, M.M. Lucas and J.J. Pueyo. 2012. Alfalfa nodules elicited by a flavodoxin-overexpressing *Ensifer meliloti* strain display nitrogen-fixing activity with enhanced tolerance to salinity stress. *Planta* 236(6): 1687-1700.
38. Richardson, A.E., L.A. Viccars, J.M. Watson and A.H. Gibson. 1995. Differentiation of *Rhizobium* strains using the polymerase chain reaction with random and directed primers. *Soil Biol. Biochem.* 27(4-5): 515-524.

39. Schwieger, F. and C.C. Tebbe. 2000. Effect of field inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33 on the composition of bacterial communities in rhizospheres of a target plant (*Medicago sativa*) and a non-target plant (*Chenopodium album*)-Linking of 16S rRNA gene-based single-strand conformation polymorphism community profiles to the diversity of cultivated bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(8): 3556-3565.
40. Taghavi S., D. van der Lelie, A. Hoffman, Y.-B. Zhang, M.D. Walla, J. Vangronsveld, L. Newman and S. Monchy. 2010. Genome sequence of the plant growth promoting endophytic bacterium *Enterobacter* sp. 638. *PLoS Genet* 6(5) doi.org/10.1371/journal.pgen.1000943 [en línea].
41. Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar. 2007. Mega4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA). Software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24(8): 1596-1599.
42. Tejera, N.A., C. Iribarne, F. Palma and C. Lluch. 2007. Inhibition of the catalase activity from *Phaseolus vulgaris* and *Medicago sativa* by sodium chloride. *Plant Physiol. Biochem.* 45(8): 535–541.
43. Tiwari, R. and S.A. Kulasooriya. 2012. Master class in rhizobial technology. The isolation, identification and utilization of root nodule bacteria (rhizobia) in promoting sustainable agricultural productivity. December 01-13, 2012. Institute of Fundamental Studies. Kandy, Sri Lanka.
44. Van der Kooij, D. 1992. Assimilable organic carbon as an indicator of bacterial regrowth. *J. AWWA* 84(2):57-65.
45. White, J., J. Prell, E.K. James and P. Poole. 2007. Nutrient sharing between symbionts. *Plant Physiol.* 144(2): 604-614.
46. Wigley, K., D. Moot, S.A. Wakelin, A. Laugraud, C. Blond, K. Seth and H. Ridgway. 2017. Diverse bacterial taxa inhabit root nodules of lucerne (*Medicago sativa* L.) in New Zealand pastoral soils. *Plant Soil* 420(1-2): 253-262.
47. Wright, K.M., S. Chapman, K. McGeachy, S. Humphris, E. Campbell, I.K. Toth and N.J. Holden. 2013. The endophytic lifestyle of *Escherichia coli* O157:H7: quantification and internal localization in roots. *Phytopathology* 103(4): 333-340.
48. Yan, A.M., E.T. Wang, F.L. Kan, Z.Y. Tan, X.H. Sui, B. Reinhold-Hurek and W.X. Chen. 2000. *Sinorhizobium meliloti* associated with *Medicago sativa* and *Melilotus* spp. in arid saline soils in Xinjiang, China. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 50(5): 1887-1891.

49. Yates, R.J. 2008. Symbiotic interactions of geographically diverse annual and perennial *Trifolium* spp. with *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Thesis, Doctor of Philosophy. Murdoch University. Perth, Australia.
50. Yousaf, S., M. Afzal, T.G. Reichenauer, C.L. Brady and A. Sessitsch. 2011. Hydrocarbon degradation, plant colonization and gene expression of alkane degradation genes by endophytic *Enterobacter ludwigii* strains. Environ. Pollut. 159(10): 2675-2683.

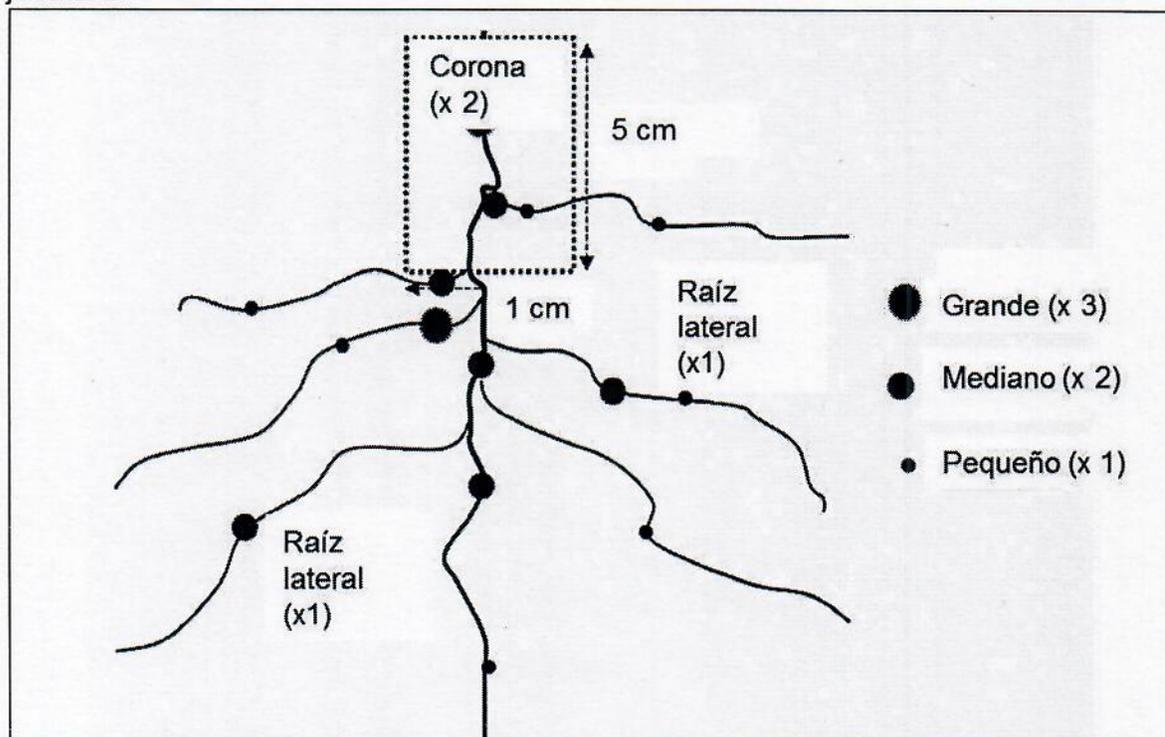
## ANEXOS

**Anexo 1.** Solución nutritiva para el crecimiento de plantas leguminosas carente de nitrógeno.

Nutrientes	Concentración (g L <sup>-1</sup> )
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	12,30
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,80
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	17,50
Fe-EDTA	2,50
Elementos Traza	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,464
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,018
ZnSO <sub>4</sub>	0,539
MnSO <sub>4</sub>	0,042
CoSO <sub>4</sub>	0,141
CuSO <sub>4</sub>	0,125
CaSO <sub>4</sub>	1,2

Fuente: Howieson (1995)

**Anexo 2.** Sistema de clasificación de la nodulación para sistemas radiculares jóvenes.



Tiwari y Kulasooriya (2012)

## APÉNDICES

Apéndice 1. Análisis de suelo, sitios de colecta.

Sector colecta	pH	%M.O.	CICE
M1	8,29	2,35	28,32
M2	8,17	2,19	25,64
M3	8,46	1,09	19,11
M4	8,11	1,25	32,15
M5	8,11	1,58	22,56
M6	7,98	2,09	14,86
M7	8,02	4,20	27,80
M8	6,42	1,72	11,83
M9	6,86	1,53	5,78
M10	6,90	4,51	13,32

Apéndice 2. Número de nódulos totales y peso seco aéreo alcanzado por los tratamientos inoculados con las cepas de *Ensifer meliloti*.

Cepas	Lugar de origen	Sector	Índice de nodulación	Nódulos totales	Peso seco (g)
C4	Quebrada Camarones	M1	9	2	0,06
C9	Taltape	M3	28	11	0,21
C11	Taltape	M3	13	4	0,04
C14	Guancarane	M4	17	5	0,09
C15	Valle de Lluta	M8	29	8	0,23
C16	Valle de Lluta	M8	4	1	0,03
C24	Rizosfera Camarones	M2	37	8	0,21
C25	Pachica	M5	32	8	0,21
C26	Illapata	M6	27	7	0,22
C27	Illapata	M6	39	9	0,23
C28	Illapata	M7	33	10	0,19
C29	Putre	M9	27	10	0,21
C30	Valle de Lluta	M8	3	1	0,04