

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**EFFECTIVIDAD SIMBIÓTICA DE RIZOBIOS ASOCIADOS A *VICIA* SPP. Y  
*LATHYRUS* SPP. EN MAGALLANES**

**POR**

**FRANCISCA LORENA RIVERA NÚÑEZ**

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

**CHILLÁN – CHILE  
2023**

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**EFFECTIVIDAD SIMBIÓTICA DE RIZOBIOS ASOCIADOS A *VICIA* SPP. Y  
*LATHYRUS* SPP. EN MAGALLANES**

**POR**

**FRANCISCA LORENA RIVERA NÚÑEZ**

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

**CHILLÁN – CHILE  
2023**

Aprobada por:

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

---

Guía

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

---

Asesor

Profesor Asistente, Christian Guajardo F.  
Ing. Agrónomo, Dr.

---

Asesor

Jorge Ivelic.  
Ing. Agrónomo, Mg. Cs.  
Instituto de Investigaciones Agropecuarias.

---

Asesor

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

---

Decano

**TABLA DE CONTENIDOS**

	<b>Página</b>
Resumen .....	1
Summary.....	1
Introducción .....	2
Materiales y Métodos .....	5
Resultados y Discusión .....	10
Conclusiones .....	18
Referencias .....	19
Anexos.....	24

## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

		<b>Página</b>
Figura 1	Cladograma de las relaciones genéticas entre rizobios aislados desde <i>Lathyrus magellanicus</i> y <i>Vicia magellanica</i> , de acuerdo al producto de RAPDs–PCR con el partidor RPO1 .....	11
Figura 2	Índice de nodulación en <i>Lathyrus sativus</i> inoculado con distintas de rizobios aislados desde nódulos radicales de leguminosas en praderas de Magallanes .....	12
Figura 3	Biomasa aérea de <i>Lathyrus sativus</i> inoculado con distintas cepas de rizobios aislados desde nódulos radicales de leguminosas en praderas de Magallanes .....	13
Figura 4	Índice de nodulación en <i>Vicia atropurpurea</i> , inoculado con distintas cepas de rizobios aislados desde nódulos radicales de leguminosas en praderas de Magallanes .....	14
Figura 5	Biomasa aérea de <i>Vicia atropurpurea</i> inoculada con distintas cepas de rizobios aislados desde nódulos radicales de leguminosas en praderas de Magallanes .....	15
Tabla 1	Mezcla de reactivos para amplificación aleatoria de ADN palimórfico (RAPDs) de los aislados, para volumen final de 20 $\mu$ L .....	7
Tabla 2	Programa utilizado para la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPDs) de los aislados obtenidos de <i>Vicia</i> spp. y <i>Lathyrus magellanicus</i> .....	8

## **EFFECTIVIDAD SIMBIÓTICA DE RIZOBIOS ASOCIADOS A *VICIA* SPP. Y *LATHYRUS* SPP. EN MAGALLANES**

SYMBIOTIC EFFECTIVENESS OF RHIZOBIA ASSOCIATED WITH FORAGE LEGUMES OF THE GENERA *VICIA* AND *LATHYRUS* IN THE MAGALLANES REGION

**Palabras índice adicionales: Praderas, Patagonia, Fijación de nitrógeno atmosférico, *Vicia atropurpurea*, *Lathyrus sativus*.**

### **RESUMEN**

Las especies *Vicia magellanica*, *V. nigricans* y *Lathyrus magellanicus* son parte de las pasturas naturales de la región de Magallanes, aportando nitrógeno por medio de la fijación biológica de nitrógeno atmosférico. El objetivo de esta investigación fue evaluar la formación de nódulos radiculares y determinar la especificidad y efectividad simbiótica de rizobios aislados desde plantas de los géneros *Vicia* y *Lathyrus*. Se recolectaron nódulos de tres sitios de la región de Magallanes, obteniéndose 13 aislados bacterianos. A través de la determinación de la huella genética, se identificaron cinco cepas genéticamente distintas. En un ensayo bajo condiciones controladas se evaluó la capacidad de las cepas de formar nódulos en vicia (*Vicia atropurpurea*) y chícharo (*Lathyrus sativus*). En chícharo, todas las cepas formaron nódulos y obtuvieron un resultado similar en materia seca siendo clasificadas como inefectivas. Las cepas AG-298, AG-299 y AG-300 fueron las que presentaron mejores resultados en índice de nodulación. En el ensayo en vicia las cepas AG-298, AG-299 y AG-300 fueron las únicas que formaron nódulos radicales alcanzando materia seca similar al testigo sin nitrógeno, siendo clasificadas como inefectivas. Esta investigación confirma la capacidad de formar nódulos de los rizobios aislados desde *Vicia* y *Lathyrus* en Magallanes, siendo inefectivos en fijar nitrógeno en *V. atropurpurea* y *L. sativus*.

### **SUMMARY**

The species *Vicia magellanica*, *V. nigricans* and *Lathyrus magellanicus* are part of the natural pastures of the Magallanes region. These belong to the Fabaceae family and therefore can form symbiotic associations with soil bacteria and thus fix atmospheric nitrogen. The objective of this research was to evaluate root nodules formation and to determine the specificity and symbiotic effectiveness of rhizobia isolated from *Vicia* and *Lathyrus*. Nodules from three sites in the Magallanes region were collected, obtaining 13 isolates. Through genetic fingerprinting, five genetically distinct strains were identified. In a trial under controlled conditions, the ability of the strains to form nodules in vetch (*Vicia atropurpurea*) and grass pea (*Lathyrus sativus*) was evaluated. Every strain formed nodules in grass pea and were classified as ineffective. The strains AG-298, AG-299 and AG-300 reached highest nodulation index in grass pea. The strains AG-298, AG-299 and AG-300 were the only ones able to form root nodules in vetch, reaching dry matter levels like the uninoculated control, and were therefore classified as ineffective. Rhizobia isolated from *Vicia* and *Lathyrus* in Magallanes, can induce nodulation but are ineffective in fixing nitrogen in *V. atropurpurea* and *L. sativus*.

## INTRODUCCIÓN

La región de Magallanes se ubica en el extremo austral de Chile en la parte sur de la Patagonia. Esta se encuentra dividida en cuatro provincias: Nueva Esperanza, Magallanes, Tierra del Fuego y Antártica Chilena, y limita con la Región de Aysén y al sur con Cabo de Hornos. El clima de la región se caracteriza por fuertes vientos y bajas temperaturas a lo largo del año que varían desde los 0 °C a 14 °C y rara vez desciende a -5 °C o aumenta a más de 18 °C. Los tipos de climas que más se distinguen son: clima estepa frío semiárido, clima húmedo de tundra, clima templado frío y clima trasandino. En inviernos las precipitaciones se caracterizan por ser casi exclusivamente sólidas que pueden ser en un promedio de 2000 mm al año (nieve) (BCN, 2020). En los suelos, las bajas temperaturas que se registran en las épocas de primavera y verano hacen que la velocidad de mineralización se vea disminuida provocando un mayor almacenamiento de materia orgánica a lo que es previsto para la pluviometría de la zona, lo que lleva a tener una deficiencia crónica en la

acumulación de nitrógeno en la mayoría de los suelos de esta zona (Covacevich y Ruz, 1996)

La actividad agrícola más importante en la Región de Magallanes es la ganadería, la cual, está basada principalmente en el uso de praderas naturales, que representan un 96 % de las praderas de la región y que son utilizadas en invernadas y veranadas para el uso de pastoreo (ODEPA, 2018). Sin embargo, se ha observado una disminución en la capacidad de carga de las praderas que se debe a dos factores: sobrepastoreo con ovejería extensiva, lo que conlleva el deterioro de la vegetación y fauna; y la escasez hídrica en verano por bajo nivel pluviométrico (Covacevich, 2006).

Las praderas naturales se caracterizan por su corto periodo de crecimiento, el que comienza de manera activa a fines de octubre y que disminuye a fines de diciembre, esto por las fuertes disminuciones hídricas que se producen en esta estación, luego tiene una pequeña alza en los últimos meses del verano y principios de otoño (Covacevich y Ruz, 1996). Las praderas naturales, en su mayoría, no son fertilizadas y pueden presentar grandes deficiencias nutricionales. Uno de los nutrientes que tiene mayor importancia para las praderas de las zonas húmedas de Magallanes es el nitrógeno, y es aquí donde juega un papel importante la presencia de leguminosas forrajeras, que permiten mejorar el déficit de nitrógeno en el suelo y aumentar el rendimiento de la pradera (Radic y McAdam, 2012; Elizalde, 2002).

La familia de las leguminosas (Fabaceae), considerada la tercera familia más grande de las angiospermas, abarca una gran extensión en el mundo desde el trópico hasta las regiones árticas, e incluyendo arbustos, hierbas, hasta árboles que suman alrededor de 19.000 especies (Lewis *et al.*, 2005). Debido a la gran diversidad de especies y de lugares donde se puede encontrar, esta familia se subdivide en tres subfamilias: Mimosoideae, que corresponden mayormente a árboles y arbustos, con hojas alternas bipinnado compuestas, flores agrupadas en panoja densa, Caesalpinoideae, en su mayoría árboles y arbustos, hojas alternas pinnado-compuesta, flores de tamaño variable, agrupadas en racimo o espiga ligera y Faboideae, que son en su mayoría especies herbáceas y trepadoras, hojas

alternas, en general compuestas, flores agrupadas en racimos o espigas (Llamas y Acevedo, 2018).

Dentro de la subfamilia Faboideae se encuentran las leguminosas forrajeras nativas que podemos hallar en las praderas naturales de la Patagonia, que incluyen a las vicias, particularmente a las especies *Vicia nigricans* y *Vicia magellanica*, que se caracterizan por su gran potencial para la protección y restitución de terrenos degradados. Las especies de vicias pueden ser herbáceas anual o bianual, poseen un sistema radicular con un gran desarrollo, con raíces finas bastante ramificadas (Blackhall *et al.*, 2020). También destaca el género *Lathyrus* que, de acuerdo con Ortiz (1956), incluye más de 120 especies, de las cuales en Chile se cuenta con alrededor de 17 a 20 especies autóctonas, denominadas “arvejillas”. Las arvejillas pueden ser hierbas “delicadas o robustas” con un comportamiento anual, con rizomas de alta exploración o un eje leñoso. La especie que se encuentra en la zona Austral del país es *Lathyrus magellanicus*, que es perenne, de coloración oscura comúnmente negra a causa de la desecación, glabra, con inflorescencias de tres a cuatro flores con una corola púrpura-azulada, con tallos tetrágonos. Se puede encontrar desde Rancagua hasta Tierra del Fuego. Y se subdivide en dos variedades: *var. ovalifolius* y *var. heterocirrhus* (Lara y Cruz, 1987).

Una de las características más particulares y llamativas de las leguminosas es su capacidad de establecer una relación simbiótica con bacterias del suelo, comúnmente llamadas rizobios, las cuales inducen la formación de nódulos en las raíces, donde fijan nitrógeno atmosférico, haciéndolo disponible para la planta. El aporte de nitrógeno al suelo por parte de leguminosas forrajeras, justamente se debe a esta asociación simbiótica, interacción que además es sustentable para la agricultura, ya que puede generar una disminución en costos en cuanto al uso de fertilizantes nitrogenados que son elaborados a partir de petróleo (Ivanov *et al.*, 2012). La mayoría de los rizobios pertenecen al reino de las proteobacterias, al orden Rhizobiaceae y a la subdivisión de  $\alpha$ - Proteobacterias (Hernández *et al.*, 2012), las cuales son capaces de asociarse exclusivamente con plantas de la familia de leguminosas (Garabato, 2018).

El establecimiento de la simbiosis entre rizobios y leguminosas, se debe al intercambio de señales químicas y moleculares específicas entre planta y bacteria, que comienzan con la liberación de los flavonoides a través de las raíces de la planta que activan los genes *Nod* de las bacterias para que éstas secreten los lipo-quitooligosacáridos bien conocidos como factores *Nod*. Ya ocurrido el reconocimiento entre rizobio-leguminosa se produce la invasión de la raíz por parte de la bacteria, y la planta en respuesta activa la formación del nódulo, órgano especializado de la raíz, que hospedará a la bacteria (Gourion *et al.*, 2015; León, 2019). En los nódulos, se produce un intercambio de nutrientes, que se basa en que las bacterias dan suministro de nitrógeno asimilable en forma de amonio ( $\text{NH}_4$ ) a la leguminosa, a partir de la molécula de  $\text{N}_2$ , y la planta da energía en forma de hidratos de carbono a los rizobios. Cabe mencionar que la interacción entre rizobios y especies de leguminosas es altamente específica, ya que depende de señalizaciones químicas entre planta y bacteria, y por esto cada leguminosa puede asociarse sólo a una o unas pocas especies de rizobios (Garabato, 2018; Dary, 2015). Hasta ahora no se han realizado estudios con respecto a las interacciones simbióticas que puede haber en las leguminosas de los géneros *Vicia* y *Lathyrus* presentes en la Región de Magallanes, aunque se sabe que existe diferencias en especificidad y efectividad simbiótica entre ambos géneros (Covacevich y Ruz, 1996). Es por esto que el objetivo de esta investigación es determinar la especificidad y la efectividad simbiótica de rizobios aislados desde *Vicia spp.* y *Lathyrus spp.* en praderas de Magallanes, en *Vicia atropurpurea* y *Lathyrus sativus*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Colecta de plantas**

Se extrajeron plantas con raíz de los géneros *Vicia* y *Lathyrus* desde tres sectores de la Región de Magallanes: Los Cisnes (C10), La Leona (C19) y Portada (C21) (Apéndice 1). Desde cada planta se extrajeron nódulos radiculares, que fueron almacenados en tubos Eppendorf con silica gel y algodón hidrófilo para su preservación. Las muestras deshidratadas fueron transportadas al Campus Chillán de la Universidad de Concepción donde se realizó el aislamiento de bacterias y los

experimentos en planta. El aislamiento y multiplicación bacteriana se realizaron en el laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Agronomía y el experimento de efectividad simbiótica en planta se realizó en el Fitotrón del edificio Humberto Serri Gallegos en la estación experimental El Nogal.

### **Aislamiento de rizobios**

En laboratorio, los nódulos radicales preservados en silica gel, se hidrataron por inmersión en agua destilada estéril durante 1 hora. Luego fueron desinfectados superficialmente en una solución de 70 % etanol por 30 segundos, se continuó con hipoclorito de sodio al 4 % durante 90 segundos y seis enjuagues en agua destilada estéril para la eliminación de desinfectantes. Los nódulos esterilizados se prensaron con una pinza que fue previamente esterilizada, donde se depositó el contenido interior en una placa con el medio de cultivo agar manitol levadura (YMA del inglés *yeast manitol agar*) más rojo congo como indicador (Anexo1).

El contenido interno del nódulo se distribuyó a través de siembra en estrías para obtener cultivos puros. Los cultivos fueron incubados a 25 °C por dos a seis días, dependiendo de la tasa de crecimiento de cada rizobio.

De estas placas se seleccionaron las colonias obtenidas que presentaran las características descritas para rizobios en YMA y estas se repicaron en YMA + rojo congo hasta obtener colonias puras (Matos *et al.*, 2002; Hernández *et al.*, 2012). Los aislados obtenidos fueron criopreservados en glicerol al 20 % en un ultrafreezer a -80 °C. Todos los procedimientos antes descritos fueron realizados en una cámara de flujo laminar.

### **Diversidad de cepas de rizobios asociados a *Vicia* y *Lathyrus***

A partir de los aislados que fueron multiplicados en YMA se efectuó un preparado celular para PCR. Para ello, se suspendieron tres asadas de colonias puras, en 1 mL de solución salina (NaCl al 0,89 % p v<sup>-1</sup>) estéril en tubos Eppendorf. Cada suspensión se centrifugó a 9000 rpm durante tres minutos en micro centrifuga, se retiró el sobrenadante y luego se resuspendió en solución salina estéril, el proceso fue repetido en tres oportunidades. Cada suspensión de células fue estandarizada a una densidad óptica (OD) de 6,0 a 600 nm de longitud de onda (Modificado de Gerding *et al.*, 2012).

La diversidad genética de los aislados se evaluó a nivel de cepa a través de la amplificación de la huella genética de cada aislado por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*) (Richardson *et al.*, 1995). Cada una de las muestras se sometió a amplificación aleatoria de ADN polimórfico, esta técnica es conocida como RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Alberti *et al.*, 2011), utilizando el partidor 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 muestra de reacción utilizada para cada aislado se compuso de reactivos y concentraciones que se indican en la Tabla 1.

Tabla 1. Mezcla de reactivos para amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPDs) de los aislados, para volumen final de 20  $\mu$ L.

Reactivo	Volumen $\mu$ L
Preparado de células	1,0
Taq polimerasa	0,5
Partidor RPO1 [10 $\mu$ M]	5,0
Cloruro de magnesio (MgCl <sub>2</sub> ) [25mM]	2,4
Buffer (10x)	2,0
dNTP [0,8mM]	0,4
Agua ultrapura	8,7

El programa para la amplificación del ADN por PCR se encuentra descrito en la Tabla 2. Para poder comprobar 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). Se utilizó la escalada universal Kappa (Kappa) como marcador. La electroforesis se llevó a cabo en tanques tamponados con 1xTAE (Tris-acetato 40mM, EDTA 1mM, pH 8,0) a 100V durante tres horas (Gerding, 2011). Las bandas se visualizaron en un transiluminador UV conectado a una cámara digital. Para identificar las cepas genéticamente distintas, se analizaron los patrones de banda obtenidos.

Tabla 2. Programa utilizado para la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPDs) de los aislados obtenidos de *Vicia magellanica* y *Lathyrus magellanicus*.

Tiempo (segundos)	Temperatura (°C)	N° Ciclos
300	95	1
30	94	
10	50	5
90	72	
30	94	
25	55	35
90	72	
300	72	1

Para determinar las cepas genéticamente distintas se construyó un cladograma en base a la distancia genética entre aislamientos utilizando la aplicación NEIGHBOR del programa Phylips y luego se utilizó el software MEGA 5.2 (Tamura *et al.*, 2007) para visualizar los cladogramas.

Sólo se continuó evaluando aquellos aislados que tuviesen un patrón de bandas amplificadas único y que por lo tanto constituyan una cepa.

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

Se evaluó la efectividad de fijación biológica de nitrógeno de cepas de rizobios obtenidas desde *Vicia* spp. y *Lathyrus* spp. Las cepas bacterianas fueron multiplicadas en medio líquido manitol levadura e incubadas a 25 °C y en agitación por cinco días.

Los ensayos en planta fueron realizados en un fitotrón desde el 23 de noviembre de 2021 utilizando como hospedero *Lathyrus sativus* (chícharo) y desde el 01 de diciembre 2021 el ensayo con *Vicia atropurpurea* (vicia forrajera). El fitotrón se encontraba regulado a  $24 \pm 2$  °C, con luz LED para crecimiento vegetativo y bajo condiciones asépticas.

Las semillas de *V. atropurpurea* y *L. sativus* fueron desinfectadas superficialmente por inmersión en etanol al 70 % (v/v) durante un minuto, en hipoclorito de sodio al 3 % (v/v) durante tres minutos y luego lavadas seis veces en agua destilada estéril. Una vez desinfectadas se sembraron en macetas de 500 mL, previamente desinfectadas en hipoclorito de sodio (3 %), con sustrato arena:perlita

en proporción 1:1, previamente pasteurizado en autoclave. La siembra fue realizada en cámara de flujo laminar para evitar contaminación, depositando dos semillas por cada maceta más 20 mL de solución nutritiva exenta de nitrógeno (Anexo 1). Cuatro días después de la siembra se realizó un raleo y se dejó una planta por maceta y cada planta se inoculó con 1 mL de cultivo bacteriano a una DO600nm de 0,1 (equivalente a  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>).

Los tratamientos correspondieron a la inoculación de cinco cepas bacterianas obtenidas desde Magallanes y se incluyó además un testigo sin inocular (N-) y un tratamiento sin inocular pero con nitrógeno (N+), al cual se le adicionó 10 mL de KNO<sub>3</sub> 0,1M. El diseño experimental fue completamente al azar con cuatro repeticiones por tratamiento. Transcurridas seis a ocho semanas, los parámetros que se evaluaron fueron los siguientes:

**Nodulación.** Se realizó un conteo del número total de nódulos por sistema radicular y fue verificado el porcentaje de nódulos activos mediante disección y observación de la coloración rojiza interior. Además, se registró el tamaño y ubicación de los nódulos en el sistema radicular para obtener el índice de nodulación de acuerdo con la escala propuesta por el Center for *Rhizobium* Studies (CRS, 2012) (Anexo 2) con la fórmula: Índice de nodulación = (nódulos grandes corona x 6) + (nódulos medianos corona x 4) + (nódulos pequeños corona x 2) + (nódulos grandes laterales x 3) + (Nódulos medianos laterales x 2) + nódulos pequeños laterales

**Peso seco aéreo y de raíces.** Una vez evaluada la nodulación se separó la parte aérea de la radical, las cuales fueron depositadas en bolsas de papel y secadas a 60 °C hasta peso constante, para luego determinar peso seco para cada unidad experimental.

#### **Análisis de datos de ensayo de efectividad simbiótica**

Los datos obtenidos de peso seco fueron tabulados y sometidos a análisis de varianza (ANDEVA) ( $P \leq 0,05$ ), previa comprobación de los supuestos. Los datos de peso seco aéreo fueron comparados mediante test de Tukey, con un nivel de confianza del 95 %.

Para las variables índice de nodulación y número de nódulos se realizó un análisis no paramétrico de Kruskal Wallis y las medias fueron comparadas a través del test

propuesto por Conover. Todos los análisis se realizaron en el programa estadístico infostat (Di Rienzo *et al.*, 2016).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Aislamiento de rizobios**

A partir de la prospección realizada en la Región de Magallanes se colectaron 13 nódulos radiculares desde *Vicia* spp. y *Lathyrus* spp. Los nódulos colectados fueron de tipo indeterminado por su morfología elongada. La clasificación de los nódulos determinados e indeterminados se basa en la presencia o ausencia de meristema. Un nódulo determinado se caracteriza porque se origina a partir de división celular de la corteza externa, aquella que no posee meristema persistente. El nódulo indeterminado es originado a partir de división celular en la corteza interna la cual tiene meristema apical persistente (Lima, 2012 y Wang *et al.*, 2002).

De los 13 nódulos se logró obtener 13 aislados bacterianos. Todos estos presentaron una coloración rosa pálido de las colonias y aspecto mucilaginoso con un crecimiento rápido, donde no se observó absorción del colorante rojo del medio YMA + rojo congo, una de las características más representativa de los rizobios de las alfa-proteobacterias y que también da la facultad de reconocer de los contaminantes (Hungria *et al.*, 2016).

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

A través de la metodología para la obtención de la huella genética mediante RAPDs PCR utilizando el partidor RPO1, se verificó la amplificación de diversos fragmentos en los 13 aislados bacterianos desde los nódulos radiculares. A partir del análisis de los patrones de bandas detectados en el gel se logró construir un cladograma (Figura 1) que permitió individualizar cinco cepas bacterianas genéticamente distintas entre sí, descartándose ocho aislados que tuvieron un patrón genético idéntico a alguna de las muestras. Se les asignaron los siguientes códigos a las cepas las que fueron ingresadas a la colección bacteriana de la Facultad de Agronomía: AG-298, AG-299, AG-300, AG-301 y AG-302.

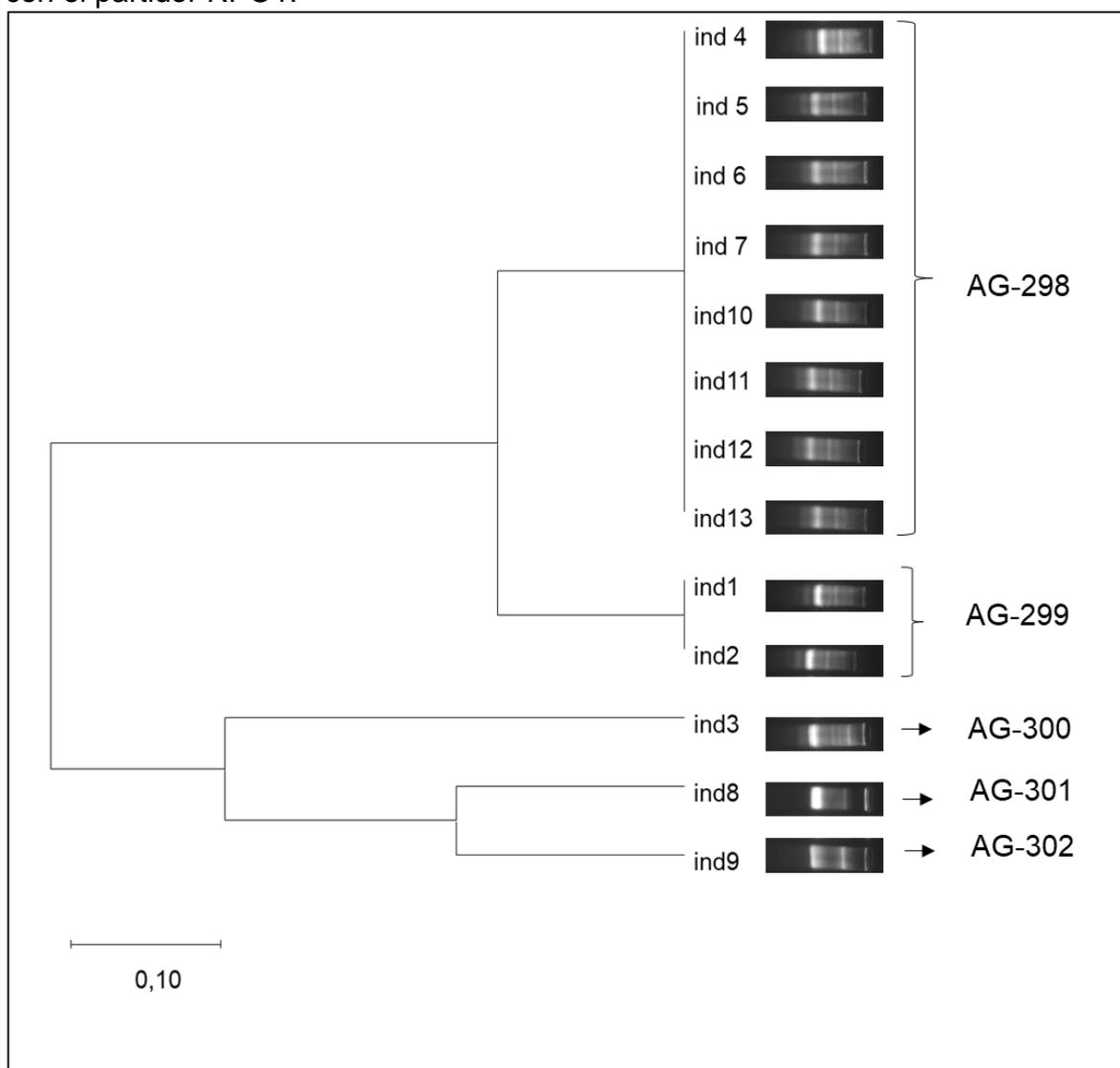
Este estudio muestra una baja diversidad de cepas de rizobios, en comparación a lo determinado por Galaz (2019) con rizobios asociados a alfalfares en Magallanes

en donde se encontraron una mayor variedad de cepas, las cuales fueron 25 cepas genéticamente distintas obtenidas desde 13 sectores mientras que en este estudio se obtuvieron 5 cepas desde 3 sectores.

### Ensayo de efectividad simbiótica en planta

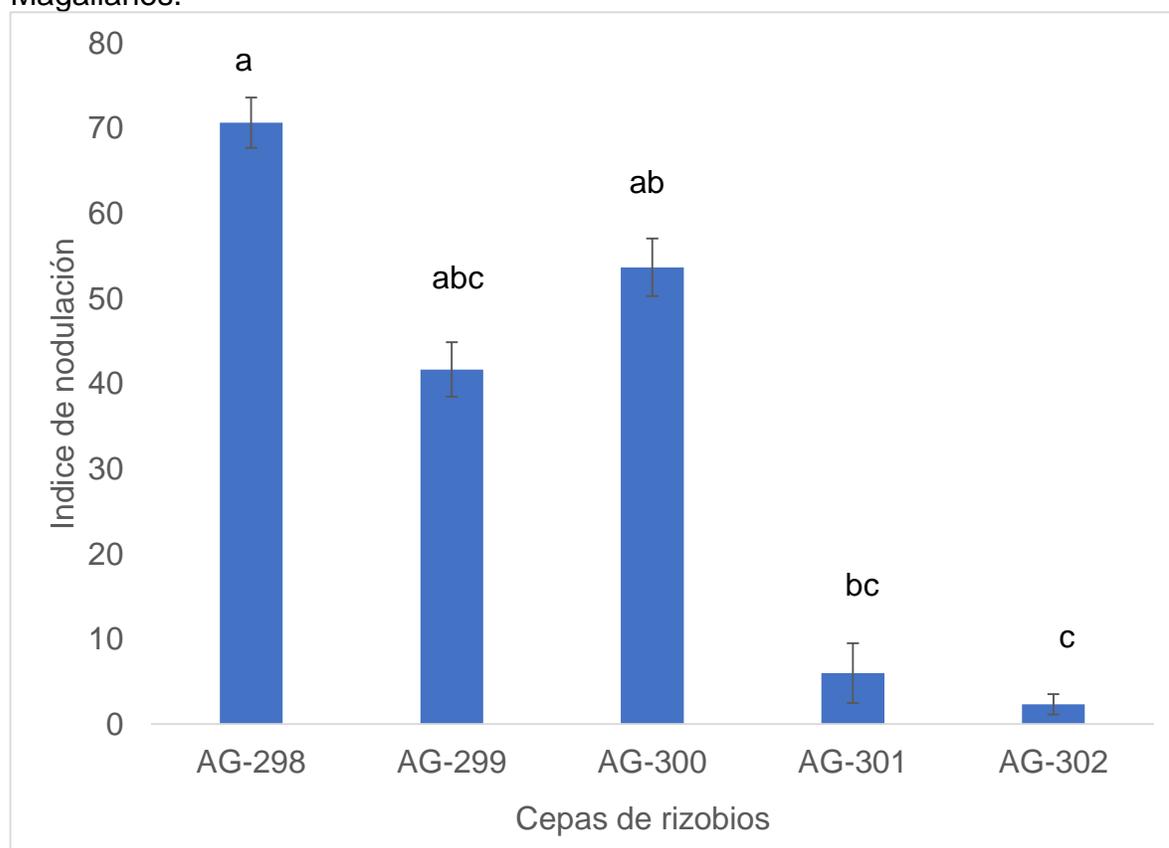
En el ensayo con *Lathyrus sativus*, se determinó que las cinco cepas de rizobios evaluadas generaron la formación de nódulos en las raíces. En los tratamientos que no fueron inoculados, N- y N+, no se observó nodulación.

Figura 1. Cladograma de las relaciones genéticas entre rizobios aislados desde *Lathyrus magellanicus* y *Vicia spp.*, de acuerdo con el producto de RAPDs – PCR con el partidor RPO1.



Las cepas AG-298, AG-299 y AG-300 lograron el mayor índice de nodulación en la raíz de chícharo y las cepas AG-301 y AG-302 obtuvieron un índice de nodulación significativamente menor a AG-298 (Figura 2). El índice de nodulación, además de considerar el número de nódulos, da valor a la ubicación de estos en la raíz y también al tamaño que tengan (Anexo 2). Un mayor índice de nodulación indica que los rizobios formaron tempranamente nódulos en la raíz principal (Yates *et al.*, 2016). Cabe mencionar que la velocidad de nodulación es relevante para las inoculaciones en terreno, puesto que la cepa que tiene mayor rapidez en nodular es la más competitiva respecto a los demás rizobios presentes en el suelo, evitando que cepas inefectivas utilicen los sitios de infección (Gerding *et al.*, 2014).

Figura 2. Índice de nodulación en *Lathyrus sativus* inoculado con distintas cepas de rizobios aislados desde nódulos radicales de leguminosas en praderas de Magallanes.

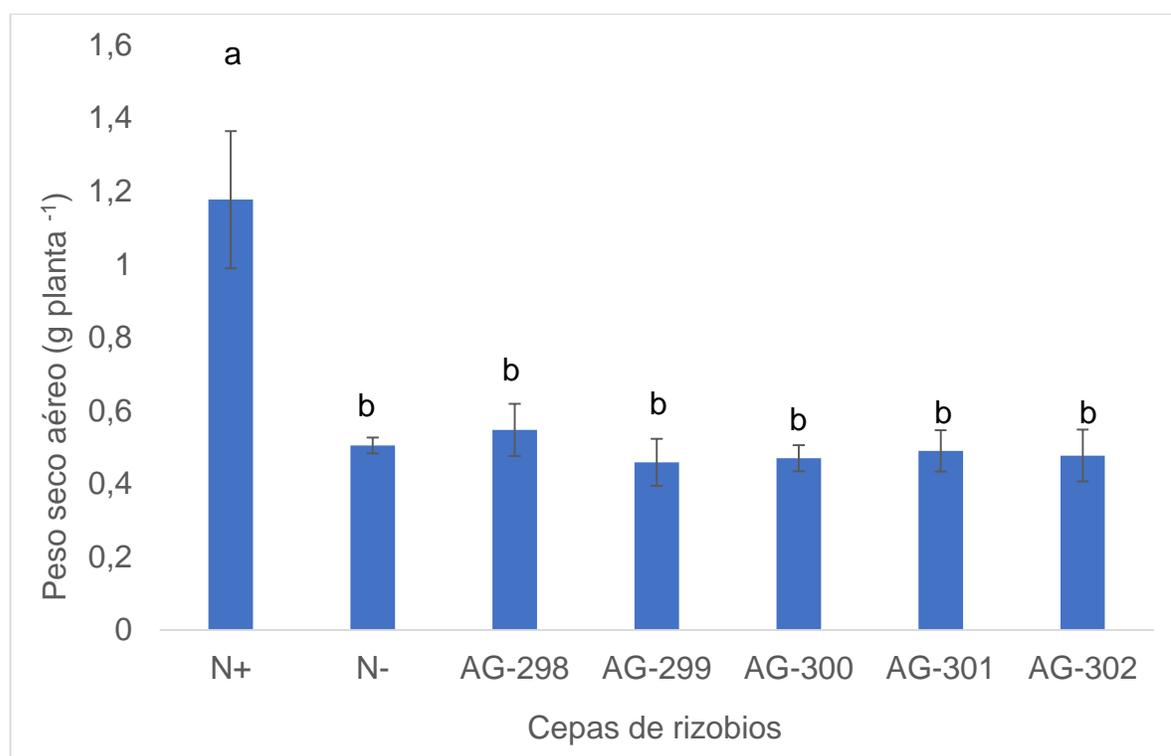


\* Letras diferentes entre tratamientos indican diferencias significativas de acuerdo a test de Conover ( $P \leq 0,05$ ).

En relación al peso seco aéreo (PSA) del chícharo se observaron diferencias

significativas entre los distintos tratamientos y el tratamiento con nitrógeno mineral (N+) siendo este último superior a todos los demás tratamientos de inoculación ( $P \leq 0,05$ ). Los tratamientos inoculados con rizobios mostraron un peso seco aéreo igual al testigo exento de nitrógeno (N-) (Figura 3), indicando que todas las cepas fueron inefectivas para *Lathyrus sativus* y que además no lograron superar el 50 % del peso seco del tratamiento N+ que corresponde al límite para ser consideradas parcialmente efectivas (Yates, 2016).

Figura 3. Biomasa aérea de *Lathyrus sativus* inoculado con distintas cepas de rizobios aislados desde nódulos radicales de leguminosas en praderas de Magallanes.



\* Letras diferentes entre tratamientos indican diferencias significativas de acuerdo a test de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

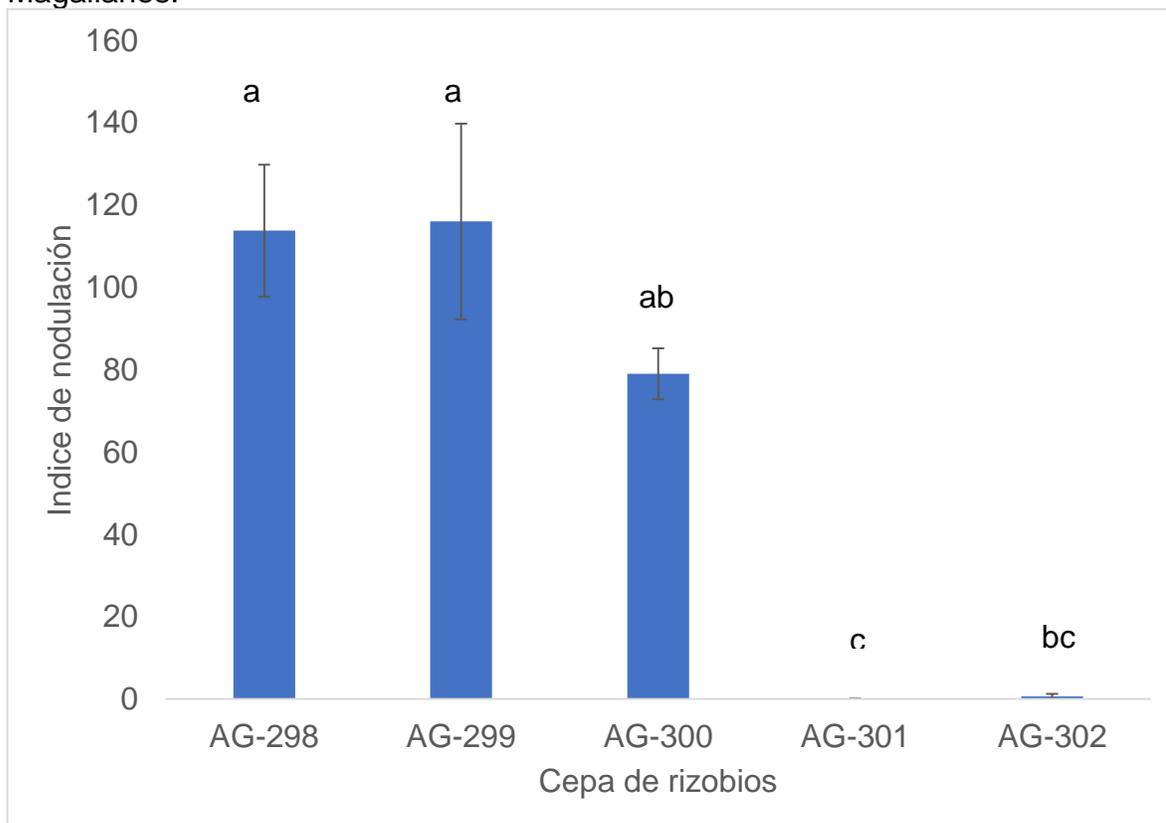
En el ensayo con plantas de *Vicia atropurpurea*, se determinó que las cinco cepas fueron capaces de inducir nódulos en las raíces, pero en las cepas AG-301 y AG-302 el índice de nodulación fue menor en comparación a las demás cepas. Los nódulos presentaron una coloración interna blanquecina por la ausencia de

leghemoglobina, lo que es indicador de inactividad del complejo enzimático nitrogenasa y por lo tanto ausencia de fijación biológica de nitrógeno (Calvo, 2011).

El complejo enzimático nitrogenasa cataliza la reacción principal para la fijación de nitrógeno convirtiendo el nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) en amonio ( $NH_3$ ) en los nódulos (Fourmond y Léger, 2017), pero es inactivado cuando es expuesto a oxígeno. Y es aquí donde la leghemoglobina juega un papel muy importante, ya que es una proteína reguladora que controla los niveles de concentración de oxígeno al interior del nódulo. La leghemoglobina contiene hierro y funciona como tampón, por lo tanto aumenta o disminuye la concentración de oxígeno existente en el nódulo (Calvo, 2011).

Las cepas AG-298, AG-299 lograron un mayor índice de nodulación al alcanzado en *vicia* inoculada con AG-301 y AG-302 (Figura 4). La cepa AG-301 no logró formar nódulos radicales en *vicia*.

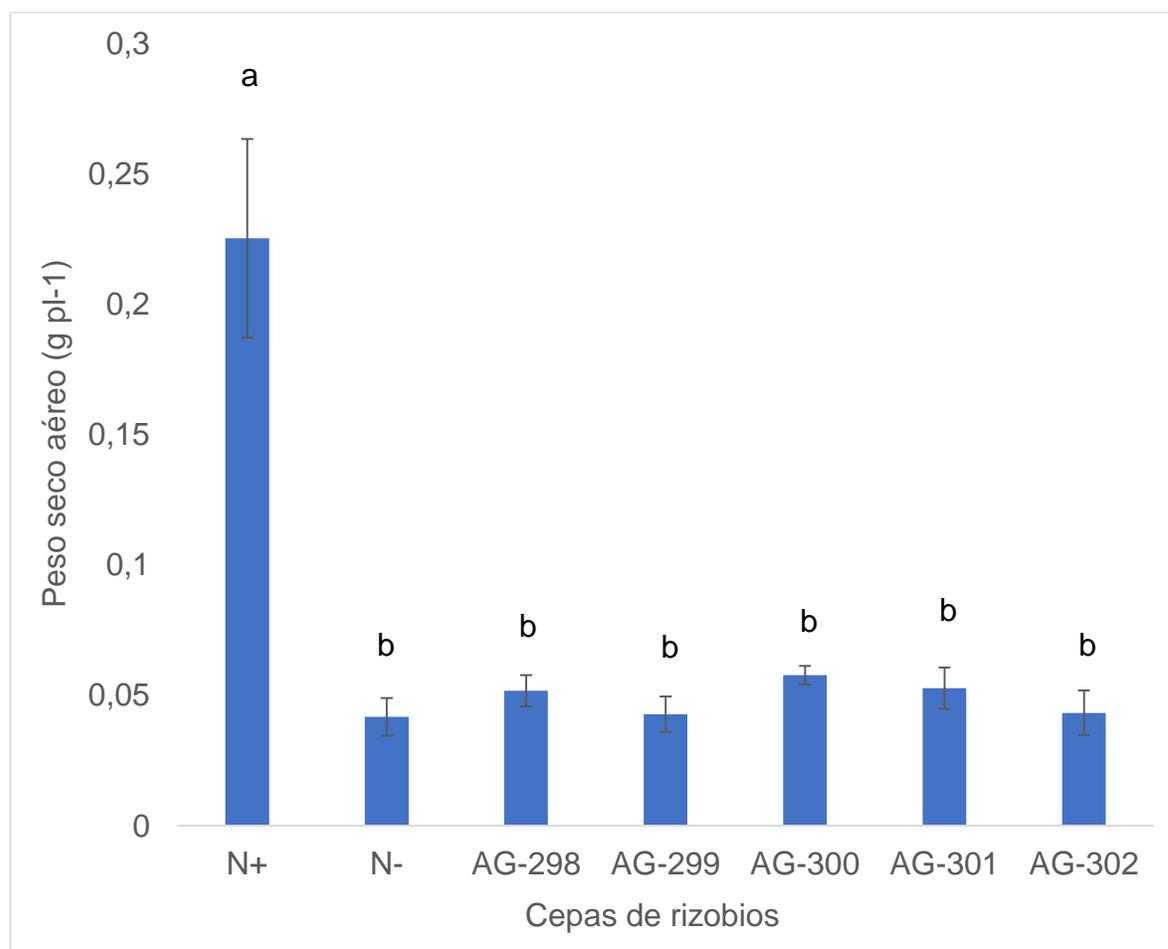
Figura 4. Índice de nodulación en *Vicia atropurpurea*, inoculado con distintas cepas de rizobios aislados desde nódulos radicales de leguminosas en praderas de Magallanes.



\* Letras diferentes entre tratamientos indican diferencias significativas de acuerdo a test de Conover ( $P \leq 0,05$ ).

Con respecto al PSA de vicia se encontraron diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre los distintos tratamientos. Donde las plantas inoculadas con las cepas bacterianas AG-298, AG-299, AG-300, AG-301 y AG-302 fueron estadísticamente iguales entre sí y al testigo sin nitrógeno y sin inoculación (N-), y diferentes al testigo con nitrógeno (N+) que logró un peso seco aéreo mayor ( $P \leq 0,05$ ) (Figura 5). Ninguna de las cepas logró superar el 50 % del peso seco del tratamiento N+, de hecho, se obtuvo un porcentaje inferior al 20 % para la mayoría. Por lo tanto, las cepas fueron categorizadas como inefectivas (Yates *et al.*, 2016).

Figura 1. Biomasa aérea de *Vicia atropurpurea* inoculado con distintas cepas de rizobios aislados desde nódulos radicales de leguminosas en praderas de Magallanes.



\* Letras diferentes entre tratamientos indican diferencias significativas de acuerdo a test de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

El bajo PSA registrado para ambas especies inoculadas puede deberse, en parte, a que la nodulación implica un gasto energético para la planta, ya que la planta es la responsable de formar el hilo infeccioso y de las divisiones celulares en el cortex para formar la estructura nodular y también porque existen interacciones en que no se activa el set de genes de fijación biológica de nitrógeno (Wang *et al.*, 2021; Bianco, 2020). Por otro lado, el que se produzca nodulación pero no un incremento de biomasa en la planta, es decir una nodulación inefectiva, está relacionado con la activación de genes en la bacteria. Los rizobios contienen un conjunto de genes que determinarán la infección, especificidad y finalmente la fijación biológica de nitrógeno. Los genes *nodABC* están involucrados en el proceso de infección, y los genes *nodFE*, *noddH* y *nodPQ* son aquellos responsables de la especificidad de la bacteria con el huésped. Los flavonoides son las moléculas primarias de comunicación secretados por las leguminosas y son reconocidas por los rizobios a través de sus receptores que son los genes *NodD* que gatillarán la formación de una molécula de señal, factor Nod, que son reconocidos por la leguminosa, en una interacción descrita como un sistema de “llave y cerradura” (Parniske y Downie, 2003). Por lo tanto, si la cepa de rizobio no sintetiza el factor Nod compatible para la planta huésped, no serán desarrollados los nódulos. Existe otro conjunto de genes *nif* que determinan que ocurra la fijación biológica de nitrógeno en un hospedero determinado, además estos genes permiten una ocupación más eficiente del nódulo e infección de un tipo determinado de genotipo de la planta (Paredes, 2013). Es así como una cepa de rizobio puede ser capaz de inducir formación de nódulos en un hospedero, pero carecer de los genes *nif* específicos o bien que estos genes no pudiesen ser activados, como probablemente ocurrió en este estudio.

Las condiciones climáticas de igual modo pueden afectar la interacción entre el rizobio y la planta hospedera, pero esto normalmente incide en la nodulación. Por ejemplo, la acidez del suelo, la sequía, la disponibilidad de P y N, y las altas y bajas temperaturas, son factores que pueden afectar las interacciones entre huésped y rizobio, lo que se ve traducido en una menor formación de nódulos y por ende en una menor fijación simbiótica de nitrógeno (Howieson y Ballard, 2004), ya que

muchas veces afectan el intercambio de señales moleculares entre los socios simbióticos (Sadowsky, 2005). En esta investigación, varias de las cepas bacterianas lograron formar nódulos en ambas especies lo que es evidencia de que la interacción e intercambio de señales si ocurrieron y el factor ambiental no tuvo un efecto negativo. Sin embargo, tanto en *Lathyrus sativus* como en *Vicia atropurpurea* los nódulos fueron inefectivos. Esto probablemente sea atribuible a que éstas no corresponden al hospedero original de los rizobios, sino que a otras especies del mismo género. Existen casos en los que una misma especie de rizobio puede formar nódulos efectivos en varias especies de leguminosas dentro de un mismo género. Un caso reconocido es el género *Trifolium*, donde especies como el trébol rosado (*Trifolium pratense*), trébol frutilla (*Trifolium fragiferum*) y trébol blanco (*Trifolium repens*) son noduladas efectivamente con la misma cepa y especie de rizobio. Al igual que en las especies como trébol subterráneo (*Trifolium subterraneum*) y trébol púrpura (*Trifolium purpureum*) que comparten el mismo simbionte (Drew *et al.*, 2012).

De acuerdo con los resultados obtenidos, la nodulación dentro del género *Lathyrus* y el género *Vicia* es de alta especificidad y los rizobios nodulan efectivamente sólo con ciertas especies dentro del género e inefectivamente con otras, tal como se ha descrito en literatura para géneros como *Lotus* (Howieson *et al.*, 2011) y también para algunas especies de *Lathyrus* y *Vicia* (Gritli *et al.*, 2020; Villadas *et al.*, 2017). En el trabajo de Gritli y colaboradores (2020) se describe a la especie *Rhizobium laguerrae* como efectiva en *Lathyrus cicera* y *Vicia sativa*, pero obtuvieron resultados erráticos en cuanto a efectividad en ambas especies al ser inoculadas con cepas de *Rhizobium leguminosarum*. Esta última especie había sido previamente descrita como el simbionte más frecuente en *Lathyrus* spp. en Canadá (Drouin *et al.*, 1996) y también en *Lathyrus* spp. y *Vicia* spp. en praderas de España (Villadas *et al.*, 2017).

Si bien en este trabajo de investigación no se determinó la especie a la que corresponden las bacterias aisladas, sí se puede avanzar en la identificación a nivel de género por las características de la colonia. La diferenciación clásica de géneros de rizobios se basa en el tiempo de crecimiento y tamaño que poseen las colonias.

El género *Allorhizobium* corresponden a bacterias de rápido crecimiento debido a que uno o dos días después de incubación tiene un diámetro de 0,5 a 3 mm, *Azorhizobium* que forman colonias translúcidas, de aspecto gomosas, circulares y con un color cremoso y de rápido crecimiento (al menos 2mm a los 2 días de incubación), *Bradyrhizobium* forma colonias circulares de lento crecimiento (al menos 7 días de incubación), *Mesorhizobium* colonias circulares, semitranslúcidas y con aspecto mucilaginoso, su diámetro alcanza de 2 a 4 mm en incubación durante 5 días, y *Rhizobium* que posee colonias de color blanco o beige con forma circular con un diámetro de 2 a 4 mm luego de 3 a 5 días de incubación (Delgado *et al.*, 2007). Las bacterias que fueron aisladas desde *L. magallanicus* y *Vicia* spp. formaron colonia luego de 4 a 5 días de incubación lo que las categorizaría dentro del género *Rhizobium* sumado a su coloración blanquecina. Esto concuerda con lo descrito para los géneros *Vicia* y *Lathyrus* y su interacción con bacterias del género *Rhizobium* (Gritli *et al.*, 2020).

Aunque este trabajo de investigación confirma la habilidad de las bacterias aisladas desde *Lathyrus magallanicus* y *Vicia* spp., de promover la formación de nódulos radicales, queda aún pendiente evaluar su efectividad en estas especies. De ser confirmada su efectividad, estas cepas de rizobios serán de suma importancia para el restablecimiento de praderas a base de leguminosas en la Región de Magallanes, ya que probablemente estén adaptadas a las condiciones edafoclimáticas predominantes en esa zona. Esto cobra gran relevancia considerando que la baja temperatura de suelo es una restricción ambiental muy importante para la nodulación ya que retrasa la iniciación de nódulos y la contribución de la simbiosis al desarrollo de la planta (Fernández, 2003; Jimenez, 2007).

## CONCLUSIONES

- Las bacterias obtenidas desde nódulos radicales de *Lathyrus* spp. y *Vicia* spp. en praderas naturales de la Región de Magallanes son capaces de inducir nódulos en las leguminosas *Lathyrus sativus* y *Vicia atropurpurea*.

- La nodulación lograda en *Vicia atropurpurea* y *Lathyrus sativus* con cepas aisladas de Magallanes fue simbióticamente inefectiva al no estimular la producción de biomasa en ambas especies

## 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. BCN. 2020. Clima y vegetación Región de Magallanes [en línea]. Biblioteca del Congreso Nacional de Chile. <https://www.bcn.cl/siit/nuestropais/region12/clima.htm>. [Consulta:04 mayo 2021].
3. Bianco, L. 2020. Principales aspectos de la nodulación y fijación biológica de nitrógeno en fabáceas. IDEASIA. 38(2) : 21-29
4. Blackhall, M., A. Villán, M. E. Gobbi. 2020. Germinación y crecimiento de *Vicia magellanica*: Implicancias para la restauración de áreas incendiadas en el norte de la Patagonia andina. pp: 30-42. Ecología Austral 31. Universidad Nacional del Comahue. Bariloche, Argentina.
5. Calvo, S.G. 2011. Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. CT 3(2011) : 173-186.
6. Centre for *Rhizobium* Studies. 2012. Master class in rhizobial technology. Murdoch University. Kandy, Sri Lanka
7. Covacevich, N. and E, Ruz. 1996. Praderas en la zona Austral: XII Región (Magallanes). pp: 639.654. En: I. Ruiz (Ed.). Praderas para Chile (2a. ed.). INIA Ministerio de Agricultura. Santiago, Chile.
8. Covacevich, N. 2006. Manejo sustentable de las praderas naturales de Magallanes. INIA Tierra Adentro. pp: 4-100. [en línea].
9. Dary, M. 2015. La simbiosis rizobio-leguminosa como bioherramienta para la fitorremediación de suelos contaminados con metales pesados. Memoria, Doctor en Biología. Universidad de Sevilla. Facultad de Farmacia. Sevilla, España.

10. Delgado, M.J., S. Casella, E.J. Bedmar. 2007. Denitrification in Rhizobia-Legume Symbiosis. Pp:83-91. In. Hermann Bothe, Stuart J. Ferguson and William E. Newton (Eds.). Biology of the Nitrogen Cycle. Elsevier. USA.
11. Di Rienzo J.A., F. Casanoves, M.G. Balzarini, L. Gonzalez, M. Tablada and C.W. Robledo. 2016. InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
12. Drew, Elizabeth., D. Herridge, R. Ballard, G. O'Hara, R. Deaker, M. Denton, R. Yates, G. Gemell, E. Hartley, L. Phillips, N. Seymour, J. Howieson, N. Ballard. 2012. Inoculating legumes: A practical guide. GRDC. Australia.
13. Drouin, P., D. Prevost, H. Antoun. 1996. Classification of bacteria nodulating *Lathyrus japonicus* and *Lathyrus pratensis* in northern Quebec as strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. Int. J. Syst. Bacteriol. 46(4): 1016-1024.
14. Elizalde, H. 2002. Producción y utilización intensiva de forrajes en Aisen y su posible aplicación a la zona húmeda de Magallanes. pp: 33-52. Serie Actas – Instituto de investigaciones agropecuarias N°19. Centro regional de investigación Tamelaike. Coyhaique, Chile.
15. Fernández, C. 2003. Manual de nodulación. Buenos Aires, Argentina. <<http://www.nitragin.com.ar/Manual%20%de%20nodulacion-Sept03.pdf>>. [Consulta: Enero 2021].
16. Fourmond, V. and C. Léger. 2017. Dinitrogen reduction: interfacing the enzyme nitrogenase with electrodes. Angew. Chem. Int. Educ. 56(16): 4388-4390.
17. 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.
18. Garabato, F. 2018. Descripción de nuevos rizobios asociados a leguminosas nativas. Tesina, Licenciado en Bioquímica. Universidad de la Republica de Uruguay, Facultad de ciencias. Montevideo, Uruguay.
19. 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.
20. 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: 385-401.

21. Gerding, M., G. W. O'Hara, J.G. Howieson and L. Brau. 2014. Overcoming non-selective nodulation of *Lessertia* by soil-borne rhizobium in the presence of inoculant mesorhizobium. *Plant Soil* 380(1-2): 117-132.
22. 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.
23. Griffi, T., W. Ellouze, S. Chihaoui, F. Barhoumi, R. Mhamdi. 2020. Genotypic and symbiotic diversity of native rhizobia nodulating red pea (*Lathyrus cicera* L.) in Tunisia. *Syst. appl. Microbiol.* 43(1): 1-8.
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. and R. Ballard. 2004. Optimising the legume symbiosis in stressful and competitive environments within southern Australia - some contemporary thoughts. *Soil Biol. Biochem.* 36(8): 1261-1273.
26. Howieson, J.G., R.A. Ballard, R.J. Yates and N. Charman. 2011. Selecting improved *Lotus* nodulating rhizobia to expedite the development of new forage species. *Plant Soil* 348(1): 231-243.
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: 39-610. In: J.G. Howieson and M.J. Dilworth (Eds.). *Working with rhizobia*. Australian Centre for International Agricultural Research. Canberra, Australia.
28. Ivanov, S., E. Fedorova, E. Limpens, S. De Mita, A. Genre, P. Bonfante, T. Bisseling. 2012. Rhizobium-legume symbiosis shares an exocytotic pathway required for arbuscule formation. *PNAS.* 109(21): 8316-8321 [en línea].
29. Jiménez, M. 2007. Fijación biológica de nitrógeno por leguminosas arbóreas para la sombra de café en Puerto Rico. Tesis Maestría. Universidad de Puerto Rico. Fac. de Cs en Agronomía. Mayagüez, Puerto Rico.
30. León, M. 2019. La simbiosis rizobio-leguminosa. Árboles fijadores de nitrógeno y su importancia en los ecosistemas. pp: 6-8. XIX Jornadas forestales de Gran Canaria. Universidad de la Laguna. Gran Canaria.
31. Lewis, G.P, B. Schrire, B. Mackinder and M. Lock. 2005. *Legumes of the world*. Richmond Royal Botanic Gardens, Kew. London, England.
32. 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.

33. Llamas, F., C. Acevedo. 2018. Las leguminosas (Leguminosae o Fabaceae): una síntesis de las clasificaciones, taxonomía y filogenia de la familia a lo largo del tiempo. *Amb. Rev. Div. Cient.* 14(1): 5-18 [en línea].
34. Matos, G. and D. Zúñiga. 2002. Comportamiento de cepas nativas de *Rhizobium* aisladas de la costa del Perú en dos cultivares del pallar (*Phaseolus lunatus* L.). *Ecología Aplicada.* 1(1): 19-24. 201 [en línea].
35. Odepa (Chile). 2018. Región de Magallanes y la Antártica Chilena. pp: 3-14. Información regional 2018. Odepa. Santiago, Chile.
36. Ortiz, J. 1956. *Lathyrus subandinus* Phil. Y sus promisoras cualidades forrajeras. pp: 107-110. Comunicación Científica N°2. Biblioteca INIA. Illapel, Chile.
37. Paredes, M.C. 2013. Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas y gramíneas. Trabajo final de graduación, Ingeniero en Producción Agropecuaria. Pontificia Universidad Católica Argentina, Facultad de Ciencias Agrarias. Buenos Aires, Argentina.
38. Parniske, M and J.A. Downie. 2003. Locks, keys and symbioses. *Nature.* 425(6958) : 569-570.
39. Radic, S., J. McAdam. 2012. Estimación de la fijación del nitrógeno en una vega de Tierra del Fuego por el método de la diferencia de nitrógeno. *SciELO* 40(2):95-102.
40. 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 Biology and Biochemistry.* 27(4-5): 515-524 [en línea].
41. Sadowsky, M.J. 2005. Soil stress factors influencing symbiotic nitrogen fixation. pp. 89-102. In: Werner, D. and Newton, W.E. (Eds). *Nitrogen Fixation Research in Agriculture, Forestry, Ecol. Environ.* Springer. Dordrecht, The Netherlands.
42. Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution.* 24 (8): 1596-1599.
43. Villadas, P.J., A. V. Lasa, P. Martinez, J.D. Flores, E. Martínez, N. Toro, E. Velázquez. 2017. Analysis of rhizobial endosymbionts of *Vicia*, *Lathyrus* and

*Trifolium* species used to maintain mountain firewalls in Sierra Nevada National Park (south Spain). Syst. Appl. Microbiol. 40(1): 92-101.

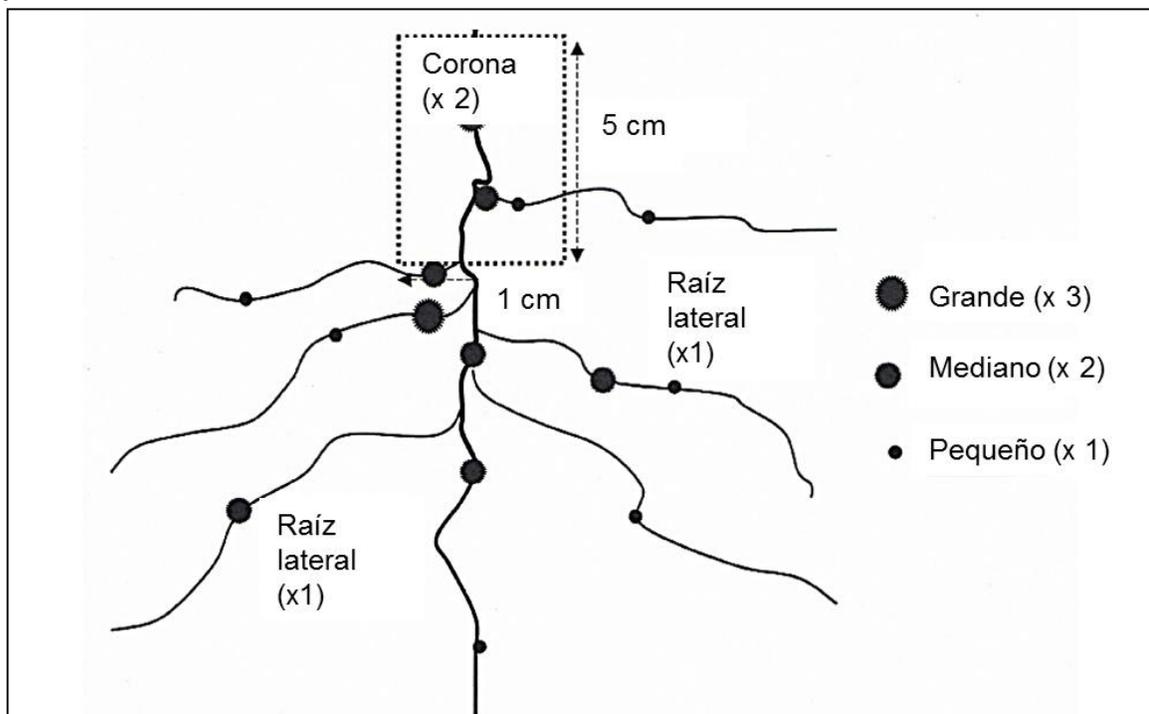
44. Wang, T., J. Martínez R., I. López L. 2002. *Rhizobium* y su destacada simbiosis con plantas. Laboratorio microbiología agrícola. México.
45. Wang, X., H. Feng, Y. Wang, M. Xie, X., Chang, H., Wang, L., Qu, J., Sun, K, He W., Wang, C., Dai, C., Chu, Z., Tian, C., Yu, N., Zhan, X., Liu, H. and Wang, E. 2021. Mycorrhizal symbiosis modulates the rhizosphere microbiota to promote rhizobia-legume symbiosis. Mol. Plant. 14: 503-516.
46. 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.
47. Yates, R.J., J.G. Howieson, M. Hungria, A. Bala, G.W. O'Hara and J. Terpolilli. 2016. Authentication of rhizobia and assessment of the legume symbiosis in controlled plant systems. pp. 73-108. In: J.G. Howieson and M.J. Dilworth (Eds.). Working with rhizobia. ACIAR. Canberra, Australia.

## Anexo 1. Solución nutritiva exenta de nitrógeno.

Dosis	Descripción
0,31 gL <sup>-1</sup>	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O
0,21 gL <sup>-1</sup>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,44 gL <sup>-1</sup>	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
0,06 gL <sup>-1</sup>	FeEDTA
1,2 gL <sup>-1</sup>	CaSO <sub>4</sub>
0,464 gL <sup>-1</sup>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
0,018 gL <sup>-1</sup>	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O
0,539 gL <sup>-1</sup>	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O
0,042 gL <sup>-1</sup>	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O
0,141 gL <sup>-1</sup>	CoSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O
0,125 gL <sup>-1</sup>	CuSO <sub>4</sub>

Fuente: Howieson, 1995.

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



Centre for *Rhizobium* Studies (2012)

Apéndice 1. Imagen satelital. Lugar colecta de muestras.



Fuente: Google earth 2021.