

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA



**SELECCIÓN DE RIZOBIOS ÁCIDO-TOLERANTES PARA LA INOCULACIÓN
DE ALFALFA (*MEDICAGO SATIVA* L.) EN SUELOS ÁCIDOS**

POR

CYNTHIA DEL PILAR ARANA MONSALVE

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

**CHILLÁN – CHILE
2025**

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA

**SELECCIÓN DE RIZOBIOS ÁCIDO-TOLERANTES PARA LA INOCULACIÓN
DE ALFALFA (*MEDICAGO SATIVA* L.) EN SUELOS ÁCIDOS**

POR

CYNTHIA DEL PILAR ARANA MONSALVE

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

CHILLÁN – CHILE
2025

Aprobada por:

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

Guía

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

Asesor

Profesor Asociado, Valeria Velasco P.
Ing. en Alimentos, Ph.D.

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

	Página
Resumen	1
Summary.....	1
Introducción	2
Materiales y Métodos.....	7
Resultados y Discusión.....	13
Conclusiones.....	19
Referencias.....	20

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Página
Figura 1 Cladograma de las relaciones genéticas entre rizobios aislados desde <i>Medicago sativa</i> de acuerdo con el producto de RAPDs – PCR con el partidor RPO1	14
Figura 2 Crecimiento de cepas ácido-tolerantes de rizobios aislados desde alfalfa colectada en distintas regiones de Chile a dos niveles de pH.....	16
Figura 3 Curvas de crecimiento a diferentes pH de rizobios ácido-tolerantes aislados desde alfalfa.....	17
Figura 4 Correlación entre el pH de suelo de origen de rizobios asociados a alfalfa y el pH mínimo de crecimiento en medio de cultivo.....	19
Tabla 1 Mezcla de reactivos para la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPDs) de los aislados, para un volumen final de 20 µL.....	9
Tabla 2 Programa utilizado para la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPDs) de los aislados asociados a <i>Medicago sativa</i>	10
Tabla 3 Cepas de rizobio aisladas desde alfalfa (<i>Medicago sativa</i>) en la región de Magallanes.....	11
Tabla 4 Crecimiento en densidad óptica (600nm) para diferentes cepas de rizobios en medio líquido ajustado a diferentes pH	15

SELECCIÓN DE RIZOBIOS ÁCIDO-TOLERANTES PARA LA INOCULACIÓN DE ALFALFA (*MEDICAGO SATIVA* L.) EN SUELOS ÁCIDOS

SELECTION OF ACID TOLERANT RHIZOBIA FOR ALFALFA (*MEDICAGO SATIVA* L.) INOCULATION IN ACIDIC SOILS

Palabras índice adicionales: *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium*, pH suelo

RESUMEN

Los rizobios son bacterias fijadoras de nitrógeno que se asocian simbióticamente a plantas de la familia leguminosa. Estos pueden variar en su tolerancia a distintos pH por lo que su efectividad puede verse afectada en suelos ácidos. El objetivo de esta investigación fue evaluar la capacidad de cepas de *Sinorhizobium meliloti* y *Rhizobium* spp. aislados desde alfalfa en diferentes condiciones edafoclimáticas de Chile, de desarrollarse a distintos niveles de pH y caracterizar a aquellas capaces de crecer a pH ácido. Se aislaron rizobios de 31 plantas de alfalfa, desde cinco puntos diferentes en Cañete, Región del Bio-Bío, y el análisis de su huella genética determinó que correspondían a cinco cepas bacterianas genéticamente distintas entre sí, descartándose ocho aislados que tuvieron un patrón genético idéntico. La evaluación *in vitro* de estas cepas más la colección de rizobios asociados a alfalfa en distintas regiones de Chile, mostró que el crecimiento de colonias tendió a ser más lento a medida que el pH era más bajo y la mayoría de las cepas no logró formar colonias a pH 4 y 5, a excepción de las cepas bacterianas provenientes de la zona de Cañete, algunas de las cuales tuvieron un crecimiento abundante a pH 4. Las cepas de *Sinorhizobium meliloti* y *Rhizobium* spp aislados desde alfalfa en diferentes lugares de Chile variaron en su tolerancia a pH ácido. Existe una correlación significativa entre el pH de suelo de origen de la bacteria y su tolerancia a pH bajo.

SUMMARY

Rhizobia are nitrogen-fixing bacteria that form a symbiotic association with plants from the family Fabaceae. These bacteria can vary in their tolerance to different pH levels, so their effectiveness may be affected in acidic soils. The objective of this research was to evaluate the ability of *Sinorhizobium meliloti* and *Rhizobium* spp. strains, isolated from alfalfa under different edaphoclimatic conditions in Chile, to grow at various pH levels and to characterize those capable of growing at acidic pH. Rhizobia were isolated from 31 alfalfa plants collected from five different locations in Cañete, Bio-Bío Region. The analysis of their genetic fingerprint determined that they belonged to five genetically distinct bacterial strains, with eight isolates being discarded due to identical genetic patterns. The *in vitro* evaluation of these strains plus the rhizobial collection from alfalfa from different regions of Chile, showed that colony growth was slower as the pH decreased. Most strains failed to form colonies at pH 4 and 5, except for strains from the Cañete area, some of which showed abundant growth at pH 4. The *Sinorhizobium meliloti* and *Rhizobium* spp. strains isolated from alfalfa in different locations in Chile varied in their tolerance to acidic pH. A significant correlation was found between the soil pH of the bacterial origin and its tolerance to low pH.

INTRODUCCIÓN

El pH de suelo corresponde a una medida de la acidez o alcalinidad de la solución de suelo, y corresponde al logaritmo negativo de la concentración de iones H^+ (McCauley *et al.*, 2009). Los suelos de Chile varían en niveles de pH, tendiendo a acidificarse desde las regiones de Bío-Bío a Los Lagos llegando a niveles cercanos a 5,3 (INIA, 2006).

Las plantas poseen un rango óptimo de pH de suelo para su crecimiento y desarrollo, de manera que, si está bajo de los rangos óptimos, la planta no puede desarrollar su sistema radicular normalmente, reduciendo el crecimiento y rendimiento del cultivo o pradera (INIA, 2006). Por otro lado, niveles de pH sobre el rango de 6,5 a 8 afectan la disponibilidad de macronutrientes como nitrógeno, potasio, calcio magnesio y azufre (McCauley *et al.*, 2009).

El pH de suelo influencia una serie de reacciones que dependen de la actividad microbiana del suelo. En general, los microorganismos benéficos y las plantas se adaptan mejor a pH cercanos al neutro (rango de 6 a 7), y un cambio en el pH puede acarrear cambios drásticos en las poblaciones microbianas del suelo y en sus reacciones asociadas (Sullivan *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2019). Dentro de los microorganismos del suelo, los rizobios son reconocidos por su habilidad de fijar nitrógeno atmosférico en asociación con plantas de la familia Fabaceae. Los rizobios son bacterias que pueden variar en su tolerancia a distintos pH de suelo, tendiendo a preferir pH cercano al neutro (Sullivan *et al.*, 2017).

La alfalfa (*Medicago sativa*) es una leguminosa forrajera cultivada en una amplia variedad de suelos y climas, se adapta muy bien en suelos profundos bien drenados y alcalinos, tiene una tolerancia moderada a la salinidad, sin embargo, es sensible en suelos con pH ácido, debido a las limitaciones que la acidez provoca en la supervivencia y multiplicación del rizobio específico (López, 1998). El pH óptimo para un buen crecimiento y desarrollo de alfalfa se encuentra entre 6,0 y 6,5 (Morón, 2021). Como toda leguminosa, la alfalfa se caracteriza por aportar nitrógeno a los sistemas agrícolas, habilidad que depende de su asociación con rizobios (Rogel *et al.*, 2011). La relación que existe entre rizobios y leguminosas es la simbiosis mutualista mejor conocida y entendida entre un procarionte y eucarionte, donde los rizobios aportan nitrógeno disponible a la planta y la leguminosa otorga energía y protección (Iyer *et al.*, 2019; Rogel *et al.*, 2011). Los rizobios o diazótrofos simbióticos incluyen diversas especies pertenecientes a las alfa proteobacterias Gram negativas presentes en el suelo (Kumar y Kanti, 2016). Éstas pueden formar nódulos radiculares y también en los tallos de plantas leguminosas, para así poder establecer, una simbiosis con una planta huésped, de tal manera, que se pueda reducir el nitrógeno atmosférico en amonio (Verma *et al.*, 2020), proceso que es considerado el segundo más importante e influyente en la actividad primaria, después de la fotosíntesis, siendo la base de la vida en la tierra (Iyer *et al.*, 2019).

Los rizobios ayudan a estimular la germinación de semillas, pueden influir en el desarrollo y crecimiento de las plantas, mejorar los rendimientos en granos y a su vez, aumentar la tasa fotosintética en plantas. Por otra parte, los rizobios también

son conocidos por favorecer en la supresión de la población de patógenos del suelo. (Zhiqiang *et al.*, 2016). Es por esto, que existe un claro beneficio en las leguminosas, ya que les permite crecimiento vigoroso en suelos, donde el nitrógeno es deficiente. Las leguminosas agregan 45 T N al año, ahorrando así, la utilización de fertilizantes nitrogenados (Noel, 2009). Debido a todos estos beneficios, es que se han convertido en un elemento clave para las funciones económicas y ecológicas en los suelos agrícolas (Verma *et al.*, 2020).

El establecimiento de esta simbiosis es un proceso de mucha complejidad, en el cual, existe una combinación de señales entre la planta y el simbionte (Kumar y Kanti, 2016). Estas bacterias penetran la raíz de la planta, ya sea por invasión de pelos radiculares o a través de heridas superficiales, que se encuentren en la base de raíces laterales (Eldor, 2007). El proceso de establecimiento de la relación simbiótica es altamente selectivo, es decir, una especie bacteriana tendrá un número limitado de especies de leguminosas con las cuales relacionarse. Este proceso simbiótico, consta de varias etapas, donde existen señales químicas entre planta y bacteria que desencadenan la formación del nódulo (FAO, 1995). Los tres principales eventos durante el desarrollo de esta simbiosis son los siguientes: (i) La infección intracelular de las células de la planta huésped por el microsimbionte; (ii) el proceso de la organogénesis del nódulo; y por último (iii) el proceso de fijación de nitrógeno atmosférico (N_2). Las dos primeras etapas ocurren al mismo tiempo, sin embargo, la fijación de N_2 ocurre después de haberse completado la organogénesis del nódulo y únicamente si la infección bacteriana se realiza con éxito (Dilworth *et al.*, 2008).

Para que se lleve a cabo el desarrollo del nódulo, las raíces de las plantas liberan diversos tipos de flavonoides, los cuales atraen a rizobios específicos e inducen la activación de los genes bacterianos *nod* y la síntesis de un glicolípido que se conoce como el factor Nod y así dar comienzo a todo el proceso de simbiosis (Kumar y Kanti, 2016). Este compuesto luego de ser secretado provocará dos respuestas que son importantes en la planta: el rizado de pelos radiculares y el inicio de división de células presentes en la corteza de la raíz, para formar el primordio del nódulo (Noel, 2009). Cuando se produce la infección del pelo radical, este se riza y se dobla hacia

el cuerpo principal de la célula pilosa de la raíz, los rizobios atrapados en los pliegues de los rizos, se adhieren a la pared celular de éste, para desencadenar una serie de reacciones tanto morfológicas como fisiológicas (FAO, 1995).

Los rizobios ingresan a las células corticales de la raíz a través de una estructura conocida como hilo o tubo infeccioso, el cual es una invaginación de la pared del pelo de la raíz y puede ser visible a los dos días de haber sido expuesta la plántula a los rizobios (FAO, 1995). Seguido de esto, comienza la etapa de formación de la zona bacteriana y la maduración del nódulo, en donde el hilo infeccioso comienza a ramificarse para llegar a la pared celular de una célula cortical y penetrarla, a fin de propagar y llegar a la última etapa de la infección, donde se producirá la liberación de bacterias en algunas células de la raíz que se llenarán con rizobios (Iyer *et al.*, 2019). Estas bacterias liberadas del hilo infeccioso se diferenciarán en células fijadoras de nitrógeno conocidas como bacteroides y estarán encerradas dentro de una membrana especializada derivada de la planta llamada peribacteroide (Noel, 2009). En la zona cortical las células se dividirán y se infectarán para formar la estructura del nódulo, así las raíces de la planta con los nódulos ya formados se extenderán para permitir el intercambio de nutrientes. En la última etapa de esta simbiosis, los rizobios experimentarán más cambios morfológicos y bioquímicos en el simbiosoma, y los nódulos de las raíces se diferenciarán en estructura y apariencia dependiendo la especie de la planta que lo hospede (FAO, 1995). Luego que todo este proceso se lleve a cabo con éxito, comienza a realizarse la fijación de nitrógeno y absorción de nutrientes en la planta. En muchas situaciones la producción de nódulos no significará necesariamente que se realice una efectiva fijación de nitrógeno, ya que pueden darse casos en esta simbiosis, donde la fijación puede ser completamente efectiva, así como también, casos en donde las bacterias estén viviendo parasitariamente en la planta sin llevar a cabo ninguna fijación (Tang, 1986).

El proceso de crecimiento y fijación de nitrógeno explicado anteriormente también puede verse limitado por diversas condiciones ambientales, en mayor o menor grado y la mayoría de las veces son los responsables que se obtengan resultados

satisfactorios o no deseados, lo cual se verá reflejado en el desarrollo y producción de leguminosas.

Algunos de los factores ambientales que pueden influir son: salinidad y sequía, dos factores muy importantes que son una amenaza para la agricultura, en zonas con climas áridos o semiáridos (Hussein, 2001). La salinidad puede alterar el crecimiento de leguminosas y el metabolismo del nitrógeno mediante una reducción de la capacidad para fijar N_2 en el nódulo (Bertrand *et al.*, 2016). La temperatura es otro factor limitante, ya que variaciones de ésta, perjudican en gran medida el proceso simbiótico y pueden existir alteraciones en el desarrollo individual de los nódulos y en la cantidad de estos. La luz también ejerce un gran efecto sobre el proceso de fijación simbiótica del nitrógeno, debido a que está relacionada con el proceso de fotosíntesis y en presencia de ésta, las plantas obtendrán las sustancias necesarias para un desarrollo eficiente de dicho proceso, por lo que, el peso de los nódulos y el tiempo de nodulación se verán afectados por la variación de la intensidad de la luz y la duración del día (Tang, 1986).

Por otro lado, la acidez del suelo es uno de los factores que más limitan el establecimiento de una simbiosis eficaz y crecimiento de leguminosas en gran parte del mundo, ya que la formación de nódulos en muchas leguminosas se retrasa o incluso se ve inhibido por el efecto del pH bajo, y la falta de calcio (Cooper, 1988). También se ha visto una baja persistencia en una especie en particular como lo es alfalfa (*Medicago sativa* L.) (Berenji *et al.*, 2017). El pH ácido a su vez resultó en una reducción del número de nódulos formados en las raíces de alfalfa (Segundo *et al.*, 1999), esto debido a que en suelos ácidos disminuye el número de rizobios y no todas las plantas se nodulan en cantidad suficiente para que haya una fijación biológica de nitrógeno adecuada para el buen crecimiento vegetal (López, 1998). Por otro lado, se ha descrito que también hay un aumento de la proporción de nódulos inefectivos, no fijadores de N_2 , en suelos ácidos, a la vez se especula que inducen a la pérdida de la diversidad de población eficiente o que los rizobios pierden su capacidad simbiótica (López, 1998).

Tres etapas de la simbiosis rizobio-leguminosa se han visto afectadas por el pH: (i) el crecimiento de las bacterias, (ii) la unión de los rizobios a las raíces, y (iii) la

inducción de la expresión genética. En la última etapa se ha informado que la inducción de la expresión del gen *nod* es la que se ha visto afectada (Soto *et al.*, 2004). Por lo que es importante poder encontrar especies de rizobios que puedan ser resistentes a condiciones de acidez, para así seguir teniendo un buen establecimiento de esta simbiosis y que los rendimientos de los cultivos no se sigan viendo afectados por este factor.

El objetivo de esta investigación fue evaluar la capacidad de las cepas de *Sinorhizobium meliloti* y *Rhizobium* spp. aislados desde alfalfa en diferentes condiciones edafoclimáticas de Chile, de desarrollarse a distintos niveles de pH y comparar el desarrollo de las cepas ácido-tolerantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Antecedentes generales

La colecta de nódulos de alfalfa se realizó desde el sector Reputo, Fundo Farellón en Cañete, Región del Bio-Bío en suelos con pH desde 5,6 a 5,9. El aislamiento de rizobios y la caracterización de las bacterias aisladas y de la colección, fueron realizados en el Laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción, Chillán.

Aislamiento de rizobios desde alfalfas de suelo ácido

Se extrajeron plantas completas de Alfalfa (*Medicago sativa*) desde cinco puntos diferentes en el Fundo farellón, en el sector Reputo en Cañete, Región del Bio-Bío. Los nódulos fueron removidos desde las raíces de la planta y depositados en tubos Eppendorf con sílica gel y algodón hidrófobo para su deshidratación y conservación. Se obtuvieron muestras de nódulos desde 31 plantas.

Aislamiento de bacterias desde nódulos

En laboratorio, los nódulos fueron rehidratados en agua destilada estéril durante una hora, previo a la desinfección. Todos los nódulos fueron desinfectados superficialmente depositándolos 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 (Langer, 2007).

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 exopolisacárido 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 (Matos *et al.*, 2002).

Los aislamientos obtenidos fueron criopreservados a -80 °C en un ultrafreezer (Panasonic), previo acondicionamiento en glicerol al 20 % (Langer, 2007). Todos los procedimientos descritos se realizaron en una cámara de flujo laminar.

Determinación de huella genética (PCR fingerprint)

Los cultivos puros obtenidos en la etapa de aislamiento fueron reactivados desde crio preservación a -80°C, en placas Petri con agar manitol levadura (AML) que fueron luego mantenidas a 25°C por 3 a 5 días. Una vez desarrolladas las colonias, se extrajeron tres asadas de células de cada aislado en 1 mL de solución salina (NaCl al 0,89% P V⁻¹) estéril en tubos Eppendorf.

Las células fueron homogenizadas en un agitador vortex (mrc) y luego centrifugadas a 5.000 rpm durante dos minutos en una microcentrífuga (Force micro 1624.) para luego extraer el sobrenadante y resuspender las células en solución salina estéril. Este proceso se realizó en tres oportunidades.

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 partidor RPO1 (Richardson *et al.*, 1995). Donde 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 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 mezcla de reacción para cada muestra estuvo compuesta de los reactivos y concentraciones indicados en la Tabla 1.

Tabla 1. Mezcla de reactivos para la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPDs) de los aislados, para un volumen final de 20 μ L.

Reactivo	Volumen (μ L)
Preparado celular	1,0
Cloruro de magnesio [25Mm]	2,4
Solución tampón (5x)	4,0
Taq Polimerasa Go tag [50/ μ M]	0,5
Desoxirribonucleótidos trifosfato [1mM]	4,0
Partidor RP01 [50 μ M]	1,0
Agua ultrapura	7,1

Las condiciones de PCR para la amplificación del DNA se encuentran descritas en la Tabla 2. 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⁻¹) previamente teñidos con 10.000 X en Gel Red™ Nucleic Acid Stain (Biotium). El producto de la PCR de cada aislamiento se mezcló con 4 μ L de buffer de carga 6x (Winkler), depositándolo en cada celdilla dejando una libre al comienzo para depositar 18 μ L de marcador KAPA Universal Ladder. La electroforesis se realizó a 100 Volts por 3 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 el aplicación NEIGHBOR del programa PHYLIP (the Phylogeny Inference Package) que calcula las matrices de distancia genética entre las poblaciones (Vekemans, 2007), luego se utilizó el software MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007) para visualizar los cladogramas. Desde este punto sólo se siguió

evaluando aquellos aislados que presentaban un patrón de bandas amplificadas único y que por tanto constituían una cepa.

Tabla 2. 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	
72	90	
94	30	
55	25	35
72	90	
72	300	1
4	indefinido	

Determinación de tolerancia a distintos pH

Se caracterizó las cepas de rizobio aisladas desde alfalfa, tanto en este trabajo como desde otras zonas de Chile (Tabla 3). Las cepas de colectas previas fueron reactivadas desde criopreservación a -80°C , en placas Petri con agar manitol levadura (AML) que fueron luego mantenidas a 25°C por 3 a 5 días. Una vez desarrolladas las colonias, fueron sembradas en caldo de cultivo manitol levadura en tubos Eppendorf de 1 mL para aumentar la población bacteriana, se incubaron en agitación por 24 horas. Transcurridas las 24 horas los tubos fueron centrifugados en una microcentrífuga, luego en una cámara de flujo se extrajo el sobrenadante, para luego enraizar los tubos con 1 mL de medio proteasa peptona al 1%. Los tubos fueron agitados en un agitador vórtex, para ser centrifugados nuevamente, este proceso se repitió tres veces.

Tras realizarse los tres lavados, se midió la absorbancia de la suspensión bacteriana a una longitud de onda de 600nm en un espectrofotómetro. Se estandarizaron estas soluciones a una densidad óptica (DO) de 0,8. Una vez ajustada la DO se inocularon las cepas en microplacas (8 x 12) con caldo de cultivo manitol levadura regulado a pH 7, 6, 5 y 4. Las microplacas fueron incubadas por 48 horas, realizando mediciones de absorbancia a 600 nm a las 0 horas, 24 horas y 48 horas posteriores a la siembra.

Tabla 3. Cepas de rizobio utilizadas en esta investigación, aisladas desde alfalfa (*Medicago sativa*) desde distintas regiones de Chile

Cepa	Especie	Origen geográfico	Fuente
AG-110	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Sucesión Hernández, Región de Magallanes 51°14'07.15" S 72°25'56.93" O	Galaz, 2019
AG-112	<i>Sinorhizobium</i>	Cerro Guido, Región de Magallanes 51°06'27.99" S 72°33'35.42" O	Galaz, 2019
AG-115	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Serena, Región de Magallanes 53°18'11,64" S 68°53'39.78" O	Galaz, 2019
AG-118	<i>Rhizobium</i>	Ruta CH-257, frente a Manantiales, Región de Magallanes 52°32'07.78" S 69°25'17.83" O	Galaz, 2019
AG-119	<i>Rhizobium galegae</i>	Luz Aurora, Región de Magallanes 52°23'33.03" S 70°25'36.23" O	Galaz, 2019
AG-130	<i>Rhizobium sp.</i>	Kampenaïke, playa, Región de Magallanes 52°42'39.06" S 70°55'33" O	Galaz, 2019
AG-133	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Kampenaïke, playa, Región de Magallanes 52°42'44.20" S 70°55'32.54" O	Galaz, 2019
AG-219	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Armonía, Región de Magallanes 53°19'59.28" S 69°45'36.03" O	Galaz, 2019
AG-220	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Cerro Guido, Región de Magallanes 51°06'37.41" S 72°33'32.94" O	Galaz, 2019
AG-223	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Ruta CH-255, Región de Magallanes	Galaz, 2019
AG-224	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Kampenaïke, Región de Magallanes 52°42'24.92" S 70°55'06.72" O	Galaz, 2019
AG-225	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Ruta CH-255, Región de Magallanes	Galaz, 2019
AG-226	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Kampenaïke, Región de Magallanes 52°42'18.36" S 70°55'01.58" O	Galaz, 2019

Tabla 3 (cont.). Cepas de rizobio utilizadas en esta investigación, aisladas desde alfalfa (*Medicago sativa*) desde distintas regiones de Chile

Cepa	Especie	Origen geográfico	Fuente
AG-227	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Kampenaiké, Región de Magallanes 52°42'18.36" S 70°55'01.58" O	Galaz, 2019
AG-230	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Putre, Región de Arica y Parinacota 18°11'34.7" S, 69°32'53.7" O	Cerda, 2020
AG-232	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	INIA La Platina, Región Metropolitana	Colección UdeC
AG-233	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	INIA La Platina, Región Metropolitana	Colección UdeC
AG-234	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	La Cruz, Región de Valparaíso	Colección UdeC
AG-235	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	La Cruz, Región de Valparaíso	Colección UdeC
AG-236	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	La Cruz, Región de Valparaíso	Colección UdeC
AG-242	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Angol, Sector Itraque -378138; -726264	Colección UdeC
AG-243	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Angol, Sector Itraque, Región de La Araucanía -378138; -726264	Colección UdeC
AG-244	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Lonquimay, Sector bella Vista, Región de La Araucanía -383021; -712255	Colección UdeC
AG-245	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Lonquimay, Sector bella Vista, Región de La Araucanía -383021; -712255	Colección UdeC

Recuento de colonias

Desde cada tratamiento con pH menor a 7 se tomó una alícuota de cada microplaca, realizando diluciones en serie de 10 hasta 10⁻³. Cada una de estas diluciones fue sembrada en medio AML realizando siembra de 10 µL en placa para luego

contabilizar las colonias. Con los datos de la dilución y el número de colonias generadas se estimó la población de UFC x mL de suspensión a las 24 h y posteriormente a las 48 h de incubación.

Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar con tres repeticiones por cepa bacteriana. Los datos de densidad óptica de las cepas ácido-tolerantes en medio de cultivo a pH 4 y 5, fueron sometidos a análisis de varianza ($P \leq 0,05$) previa comprobación de los supuestos. Las diferencias entre tratamientos fueron determinadas mediante test de Tukey. Los datos de pH mínimo de crecimiento de cada cepa fueron graficados en función del pH del suelo de origen, realizando luego una regresión lineal y análisis de la correlación. El software estadístico utilizado en todos los análisis fue Infostat.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

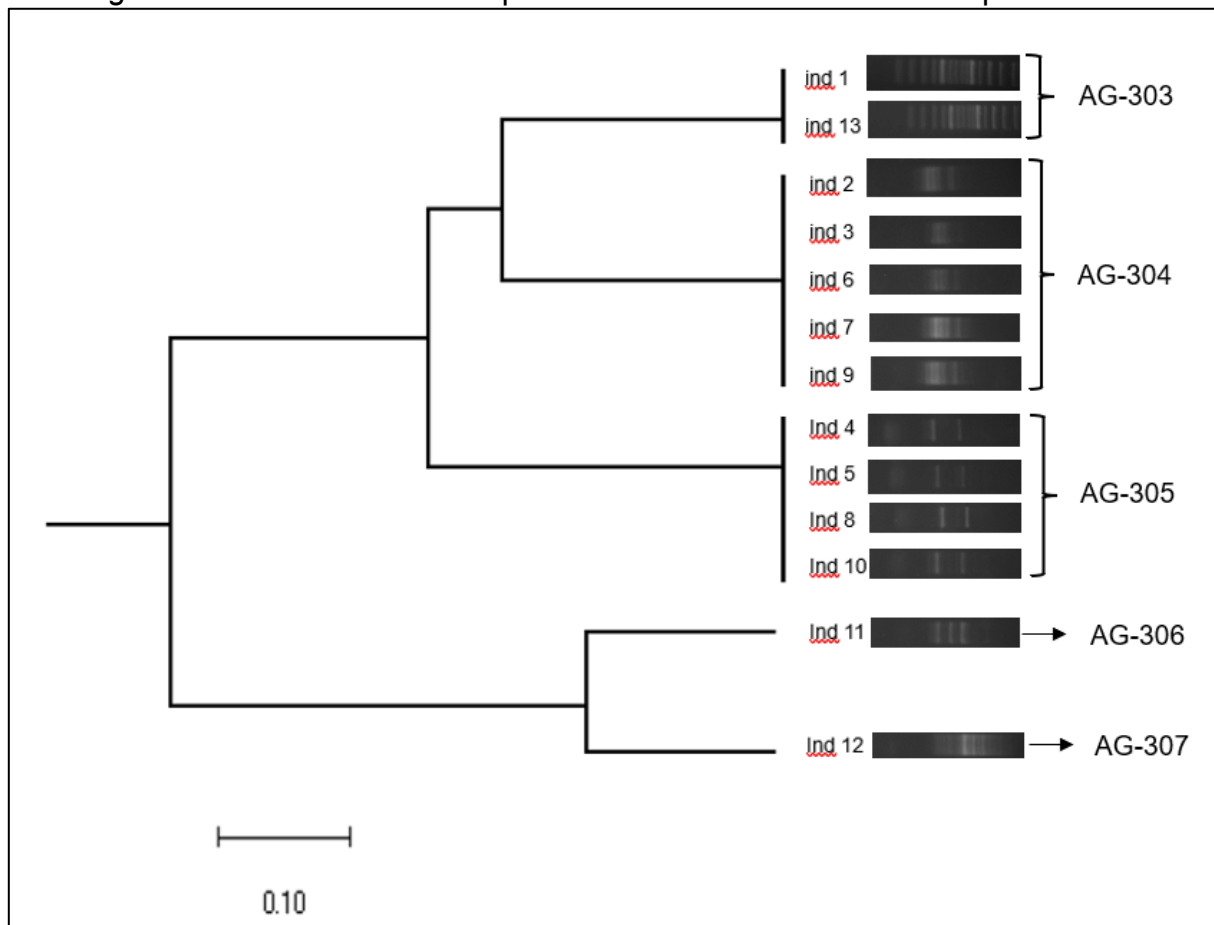
Aislamiento de rizobios

Se obtuvo 13 aislados viables de rizobios desde los nódulos colectados en el sector de Cañete. 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 posibilidad de reconocerlos de los contaminantes (Hungria *et al.*, 2016).

Determinación de la huella genética de los aislados

Con la metodología del RAPDs PCR para la obtención de la huella genética utilizando el partidor RPO1, se pudo observar amplificación de los fragmentos de genes en los 13 aislados. El análisis del patrón de bandas permitió construir un cladograma (Figura 1) e individualizar cinco cepas genéticamente distintas en más de un 20%, descartándose ocho aislados que tuvieron un patrón genético idéntico a alguna de las muestras. A las cepas obtenidas se les asignaron los siguientes códigos, los cuales fueron ingresados a la colección bacteriana de la Facultad de Agronomía: AG-303, AG-304, AG-305, AG-306, AG-307.

Figura 1. Cladograma de las relaciones genéticas entre rizobios aislados desde *Medicago sativa* de acuerdo con el producto de RAPDs – PCR con el partidor RPO1



Crecimiento *in vitro* de rizobios a distinto pH

No todas las cepas fueron capaces de reproducirse en medio líquido, por lo tanto, no se pudo determinar crecimiento en los pH evaluados para las cepas AG-122 y AG-246. Las cepas que pudieron ser determinadas mediante el espectrofotómetro se presentan en la Tabla 4, donde se observa que las cepas del género *Rhizobium* AG-118 y AG-130 fueron del tipo acidófilas, ya que lograron crecer a pH 4 y pH 5. Dentro de las que corresponden a la especie *Sinorhizobium meliloti* sólo se determinó crecimiento a pH ácido de las cepas AG-242, AG-304, AG-306 y AG-307, el resto de las cepas que logró desarrollarse en medio líquido tendieron a crecer de forma más abundante en los pH cercanos al neutro. Las cepas AG-110, AG-118, AG-130 y AG-230 crecieron solo y exclusivamente a pH 7 y en forma parcial a pH 8, lo que coincide con lo reportado para la mayoría de las especies de rizobios

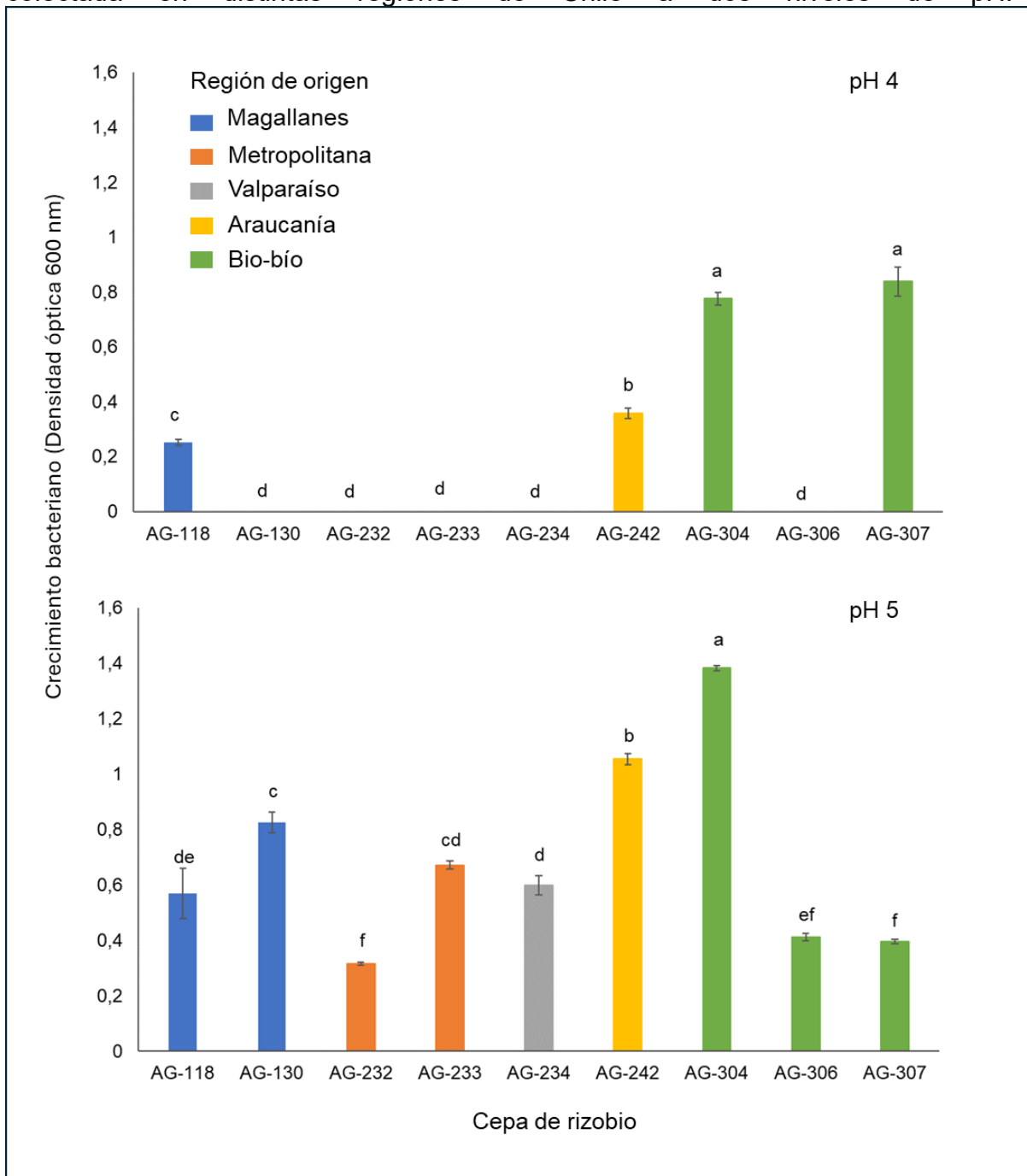
(López, 1998). En particular para la especie *Sinorhizobium meliloti*, se ha descrito que no puede crecer a pH inferior a 5,5 (Hawkins *et al.*, 2017).

Tabla 4. Crecimiento de diferentes cepas de rizobios en medio líquido ajustado a diferentes pH

Cepa	Especie	pH				
		4	5	6	7	8
AG-110	<i>Sinorhizobium meliloti</i>				x	
AG-112	<i>Sinorhizobium meliloti</i>			x	x	x
AG-118	<i>Rhizobium</i> sp.		x	x	x	x
AG-122	<i>Sinorhizobium meliloti</i>		x	x	x	x
AG-130	<i>Rhizobium</i> sp.	x	x	x	x	x
AG-133	<i>Sinorhizobium meliloti</i>				x	x
AG-220	<i>Sinorhizobium meliloti</i>				x	x
AG-223	<i>Sinorhizobium meliloti</i>				x	x
AG-226	<i>Sinorhizobium meliloti</i>			x	x	
AG-230	<i>Sinorhizobium meliloti</i>				x	
AG-232	<i>Sinorhizobium meliloti</i>		x	x	x	x
AG-233	<i>Sinorhizobium meliloti</i>		x	x	x	x
AG-234	<i>Sinorhizobium meliloti</i>		x	x	x	x
AG-242	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	x	x	x	x	x
AG-245	<i>Sinorhizobium meliloti</i>				x	
AG-304	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	x	x	x	x	x
AG-305	<i>Sinorhizobium meliloti</i>			x	x	
AG-306	<i>Sinorhizobium meliloti</i>		x	x	x	x
AG-307	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	x	x	x	x	x

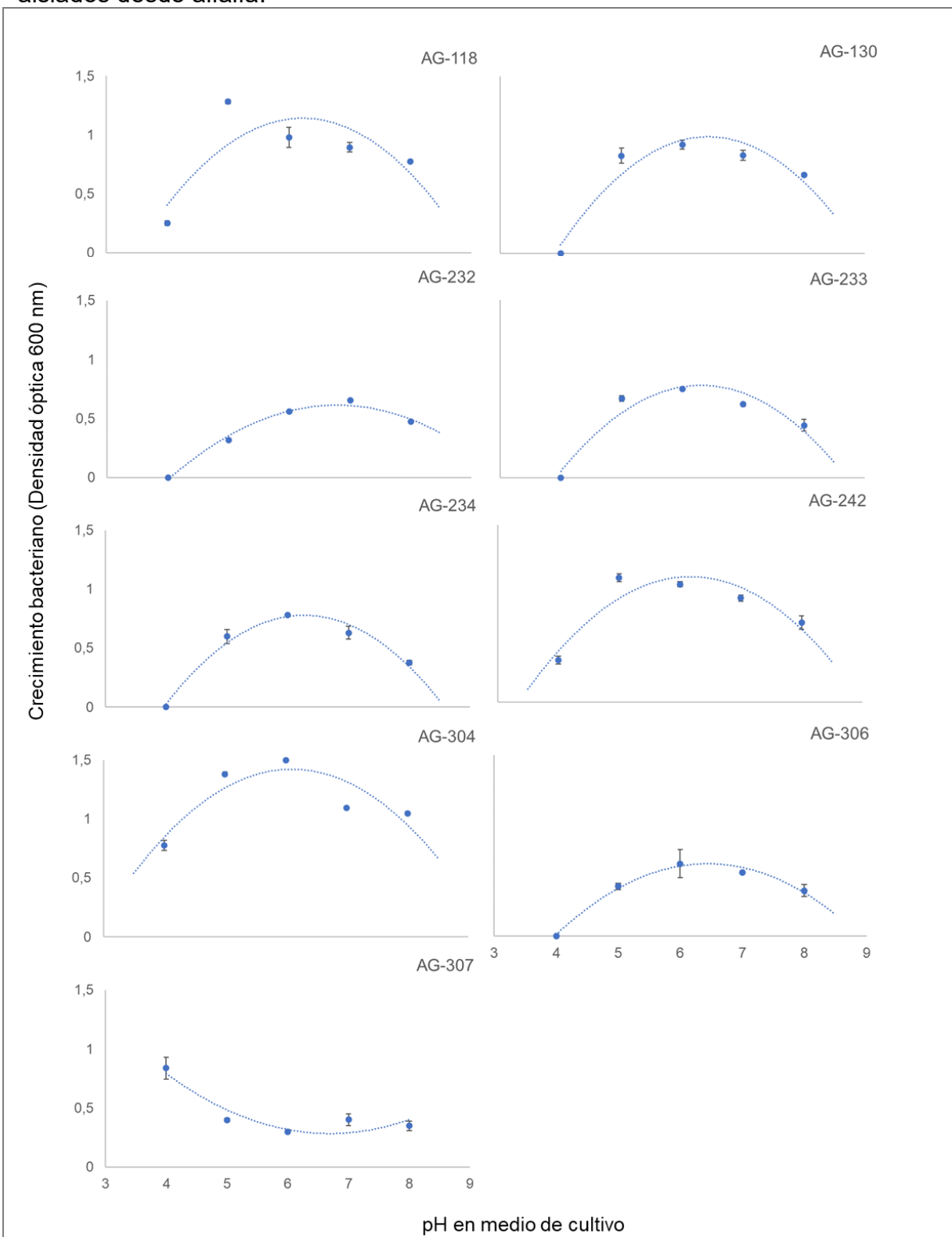
Al comparar el crecimiento de las bacterias que fueron tolerantes a pH bajo, se observa que a pH 4 solo fueron capaces de desarrollar crecimiento bacteriano las cepas AG-118 originaria de Magallanes, AG-242 desde la Araucanía, y las cepas AG-304 y AG-307 de Bio-Bío, las cuales alcanzaron un crecimiento significativamente mayor a las otras cepas. Las últimas dos cepas mencionadas fueron aisladas desde suelo ácido de Cañete, lo cual podría estar indicando una adaptación al origen edáfico de estas cepas. En el pH 5 las cepas tendieron en general a crecer de forma más abundante, destacando al igual que en el pH 4 la cepa AG-304 originaria de Cañete, la cual formó la mayor cantidad de células bacterianas a ese pH.

Figura 2. Crecimiento de cepas ácido-tolerantes de rizobios aislados desde alfalfa colectada en distintas regiones de Chile a dos niveles de pH.



La Figura 3 muestra las curvas de crecimiento de las cepas de rizobio que crecieron a pH 4 y 5, en los distintos pH medidos, donde se puede observar que todas las cepas tendieron a crecer mejor a pH cercanos a 6.

Figura 3. Curvas de crecimiento a diferentes pH de rizobios ácido-tolerantes aislados desde alfalfa.

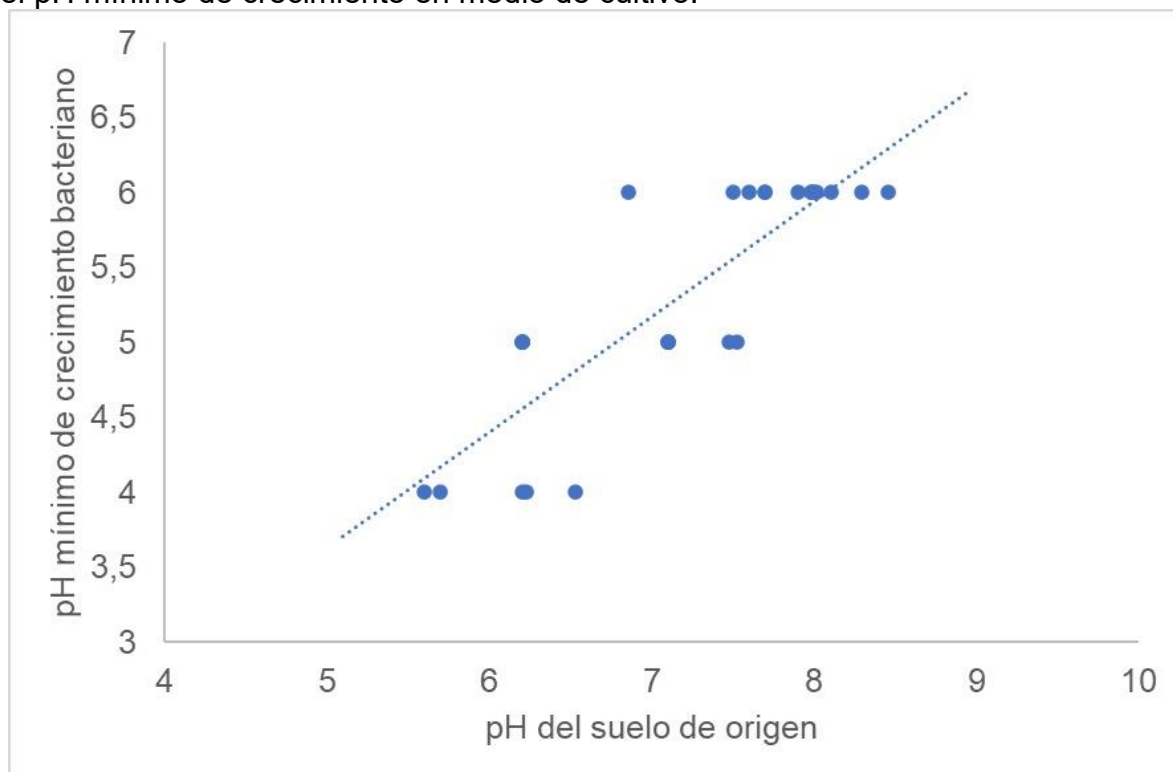


El mayor crecimiento a pH 6 o 7 estaría indicando que se trata de cepas que son ácido-tolerantes, pero no acidófilas, ya que si bien toleran pH bajo su pH preferente de desarrollo tiende al neutro. Esto no se ve reflejado en el crecimiento registrado para la cepa AG-307 proveniente de Cañete, cuyo crecimiento fue mayor a pH 4 y tendió a disminuir a medida que el pH incrementó, en este caso particular podría tratarse de una bacteria acidófila. Sin embargo, para poder confirmar esta tendencia debería extenderse el margen de evaluación. La cepa que logró crecimiento más abundante a pH ácido fue la AG-304 que logró llegar a una densidad óptica equivalente entre 1 a 1,5, lo cual fue más alto en los pH cercanos al neutro.

Los autores Jin y Kirk (2018) indican que para que una bacteria sea considerada acidófila debe crecer abundantemente a un pH inferior a 5, y las neutrófilas normalmente logran un crecimiento mayor entre pH 5 y 9. En base a los datos obtenidos se puede indicar que las bacterias en estudio corresponden a neutrófilas y algunas de ellas mostrando tolerancia a pH ácido, a excepción de la cepa AG-307 que tendió a crecer más abundantemente a pH 4, por lo cual se puede considerar acidófila. Si bien *S. meliloti*, se describe como una de las especies de rizobio con mayor sensibilidad al estrés ácido, estudios han demostrado que existen variaciones complejas en la respuesta celular de esta especie en la adaptación a condiciones de acidez (Nilsson, 2018). Esto último explicaría la diferencia en la respuesta a distintos pH para distintas cepas de la misma especie.

La tolerancia de los rizobios a la acidez es variada y depende de la especie y/o cepa, por lo cual, la respuesta fisiológica de los rizobios a la acidez también puede ser muy variada, es decir, un pH lo suficientemente bajo puede conducir a los rizobios a la muerte, detener su metabolismo o generar cambios mucho más moderados dependiendo el nivel de acidez (Nilsson, 2018). En este caso la mayoría de las cepas evaluadas corresponden a la especie *Sinorhizobium meliloti* con sólo dos cepas del género *Rhizobium* (AG-118 y AG-130), siendo ésta última dos cepas capaces de crecer a pH inferior a 5.

Figura 4. Correlación entre el pH de suelo de origen de rizobios asociados a alfalfa y el pH mínimo de crecimiento en medio de cultivo.



El análisis de la correlación entre el pH del suelo desde donde originalmente fue aislado el rizobio y el pH mínimo de crecimiento *in vitro* del rizobio, mostró una correlación significativa con un R de 0,71, lo cual indica que el pH del suelo original está fuertemente correlacionado con el desempeño de estas bacterias a distintos pH. Esto puede deberse a adaptaciones que adquieren las bacterias al estar viviendo en esta condición, ya que, los rizobios expuestos a condiciones de acidez moderada muestran ser más resistentes a un estrés ácido severo (Nilsson, 2018).

CONCLUSIONES

- Las cepas de *Sinorhizobium meliloti* y *Rhizobium* spp aislados desde alfalfa en diferentes lugares de Chile variaron en su tolerancia a pH ácido.
- De las cepas evaluadas 9 lograron crecer a pH 5 o inferior, de las cuales destacan las cepas aisladas desde suelos de Cañete, que fueron capaces de crecer a pH 4.

- Existe una correlación significativa entre el pH de suelo de origen de la bacteria y su tolerancia a pH bajo.

REFERENCIAS

- Berenji, S., D.J. Moot., H. Ridgway. And A. Rafat. 2017. Dry matter yield, root traits, and nodule occupancy of lucerne and Caucasian clover when grown in acidic soil with high aluminium concentrations. *Plant Soil*. 416, 227–241.
- Bernier, R. And M. Alfaro. 2006. Acidez de los suelos y efecto del encalado. Pp: 17-19. Boletín INIA N° 151. INIA. Osorno, Chile.
- Bertrand, A., M. Bipfubusa., C. Dhont., F.P. Chalifour., P. Drouin. And C.J. Beauchamp. 2016. Rhizobial strains exert a major effect on the amino acid composition of alfalfa nodules under NaCl stress. *Plant Physiology and Biochemistry*. 108, 344-352.
- Cooper, J.E. 1988. Nodulation of Legumes by Rhizobia in Acid Soils. *Developments in Soil Science*. 18, 57-61.
- Dilworth, M.J., E.K. James., J.I. Sprent. And W.E. Newton. 2008. Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses. Published by Springer. Western, Australia.
- Eldor, A.P. 2007. Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry. (3a. ed.). Academic Press. Chennai, India.
- FAO (USA). 1995. Manual Técnico de la Fijación Simbiótica Del Nitrógeno: Leguminosa/Rhizobium. FAO. Roma, Italia.
- 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.
- Hawkins, J.P., B.A. Geddes And J. Oresnik. 2017. Succinoglycan Production Contributes to Acidic pH Tolerance in *Sinorhizobium meliloti* Rm1021. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 30(12): 1010-1017.
- 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.
- 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.

- Hussein, H. 2001. Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. *Journal of Biotechnology*. 91, 143-153.
- Iyer, B. and S. Rajkumar. 2019. Rhizobia. pp: 125-146. In: Schmidt, T.M. (Ed.). *Encyclopedia of Microbiology*. (4a. ed.). Academic Press. Estados Unidos.
- Kumar, P. and T. Kanti. 2016. Structure of Extracellular Polysaccharides (EPS) Produced by Rhizobia and their Functions in Legume–Bacteria Symbiosis. *Achievements in the Life Sciences*. 10, 136-143.
- Langer, H.P. 2007. Diversidad genética, tolerancia a las acidez y efectividad simbiótica de cepas naturalizadas de *Sinorhizobium meliloti* en suelos de la zona centro-sur de Chile. Tesis, Doctor en Ciencias de Recursos Naturales. Universidad de La Frontera, Facultad de Ciencias y Administración. Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales. Temuco, Chile.
- López, E. S. 1998. Caracterización de bacterias del género (*Sino*)*Rhizobium* que nodulan alfalfa en suelos ácidos de Argentina y Uruguay. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, Facultad de ciencias. Granada, España
- 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.). *Ecol. Apl.* 1(1): 19-24.
- Mc Cauley, A., C. Jones and J. Jacobsen. 2009. Soil pH and organic matter. In: *Nutrient Management*. Montana State University Extension
- Morón, A. 2021. Alfalfa: Fertilidad de suelos y estado nutricional en sistemas agropecuarios de Uruguay [Página web]. Sección Suelos - INIA La Estanzuela. <<https://fertilizar.org.ar/wpcontent/uploads/2021/08/AlfalfaUruguay.pdf>>. [Consulta: 19 enero 2024].
- Nilsson, J.F. 2018. Identificación de determinantes involucrados en la tolerancia a la acidez de *Rhizobium favelukesii* LPU83. Trabajo de tesis doctoral. Universidad Nacional de la plata, Facultad de Ciencias exactas, departamento de Ciencias Biológicas. Buenos Aires, Argentina.
- Noel, K.D. 2009. Rhizobia. pp: 307-322. In: Walter, H. and B. Piechulla. (Eds.). *Encyclopedia of Microbiology*. (3a. Ed.). Academic Press. Alemania.
- Prell, J. and P. Poole. 2006. Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. *TRENDS in Microbiology*. 14(4): 1-8.
- Rogel, M., E. Ormeño y E. Martinez. 2011. Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. *Systematic and Applied Microbiology*. 34, 96-104.

- Segundo, E., F. Martinez., P. van., M. Fernández., A. Lagares., G. Martinez., K. Niehaus., A. Pühler. and N. Toro. 1999. Characterisation of symbiotically efficient alfalfa-nodulating rhizobia isolated from acid soils of Argentina and Uruguay. *FEMS Microbiology Ecology*. 28, 169-176.
- Soto, M.J., P. van., F. Martínez., J.I. Jiménez. And N. Toro. 2004. Attachment to plant roots and nod gene expression are not affected by pH or calcium in the acid-tolerant alfalfa-nodulating bacteria *Rhizobium* sp. LPU83. *FEMS Microbiology Ecology*. 48, 71-77.
- Sullivan, T.S., V. Barth and R. W. Lewis. 2017. Soil acidity impacts beneficial soil microorganisms. Washington State University Extension FS247E.
- Tang, M. 1986. Factores que afectan la simbiosis leguminosa-rhizobium. *Pastos y Forrajes*. 9(3): 1-17.
- Verma, R., H. Annapragada., N. Katiyar., N. Shrutika., K. Das and S. Murugesan. 2020. *Rhizobium*. pp: 37-54. In: Amaresan, N., K. Annapurna., A. Sankaranarayanan., M. Senthil and K. Kumar. (Eds.). *Beneficial Microbes in Agro-Ecology*. Academic Press. India.
- Wang, C., X. Zhou, D. Guo, J. Zhao, G. Feng, Q. Gao, H. Yu and L. Zhao. 2019. Soil pH is the primary factor driving the distribution and function of microorganisms in farmland soils in northeastern China. *Annals of Microbiology* 69: 1461-1473.
- Zhiqiang, Z., S. Linhui., C. Leqin., C. Yuman., Z. Tong., W. Yafang., L. Yushi., Z. Pan., S. Xiaoqin., W. Yajun., H. Tianming and Y. Peizhi. 2016. Effect of rhizobia symbiosis on lignin levels and forage quality in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 233, 55-59.