

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**SELECCIÓN DE RIZOBIOS PARA LA INOCULACIÓN EN *SOPHORA  
CASSIODES PHIL.*, ESPECIE NATIVA DE LA ZONA CENTRO SUR DE CHILE**

**POR**

**PAOLA ANDREA HERNÁNDEZ GALDAMES**

**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 PARA LA INOCULACIÓN EN *SOPHORA  
CASSIODES* PHIL., ESPECIE NATIVA DE LA ZONA CENTRO SUR DE CHILE**

**POR**

**PAOLA ANDREA HERNÁNDEZ GALDAMES**

**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, Leandro Paulino.  
Ing. Forestal, Dr.

---

Asesor

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

---

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 .....	11
Conclusiones .....	18
Referencias .....	18

## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

		<b>Página</b>
Figura 1	Escala de valoración de la nodulación en sistemas radiculares jóvenes.....	10
Figura 2	Índice de nodulación en <i>Sophora cassioides</i> inoculada con distintas cepas de rizobios aislados desde nódulos radiculares de <i>Sophora</i> spp. en Chile y Nueva Zelanda.....	12
Figura 3	Cladograma comparativo de cepas bacterianas en base al peso seco en <i>Sophora cassioides</i> . Generado por análisis de conglomerados de acuerdo con la distancia euclídea.....	13
Figura 4	Comparación entre conglomerados de cepas de rizobios evaluada en cuanto a producción de peso seco en <i>Sophora cassioides</i> .....	14
Figura 5	Producción de materia seca aérea en relación al peso seco aéreo del tratamiento con nitrógeno (N+) en <i>Sophora cassioides</i> .....	16
Tabla 1	Cepas de rizobios aisladas desde nódulos radiculares de <i>Sophora</i> spp. En Chile continental, insular y desde Nueva Zelanda.....	6

## **SELECCIÓN DE RIZOBIOS, PARA LA INOCULACIÓN DE *SOPHORA CASSIOIDES* PHIL., ESPECIE NATIVA DE LA ZONA CENTRO SUR DE CHILE**

SELECTION OF RHIZOBIA, FOR THE INOCULATION OF *SOPHORA CASSIOIDES* PHIL., A NATIVE SPECIES OF THE CENTRAL SOUTH AREA OF CHILE

**Palabras índice adicionales: Índice de nodulación, Fijación biológica de nitrógeno, especificidad, leguminosas**

### **RESUMEN**

La especie *Sophora cassioides*, perteneciente a la familia de las leguminosas y a la sección *Edwardsia*, en el hemisferio sur, dicha sección se divide en alrededor de 20 especies, las cuales han despertado interés científico por su afinidad filogenética, capacidad de nodulación y hábitats en islas oceánicas. El objetivo de esta memoria fue evaluar la capacidad de nodulación y fijación de nitrógeno a través de la inoculación con diversas cepas de rizobios de especies de la sección *Edwardsia*. Se realizaron ensayos de inoculación con 23 cepas, de las cuales 12 lograron inducir nodulación. Las cepas AG-260, AG-261 y AG-252 destacaron por su índice de nodulación superior. En algunos de los tratamientos, a pesar de la ausencia de leg-hemoglobina en los nódulos, cepas como AG-264 promovieron una mayor biomasa aérea, sugiriendo mecanismos alternativos de estimulación del crecimiento. El análisis de conglomerados reveló que la cepa AG-274 fue la más efectiva en producción de biomasa, mientras que las cepas de Nueva Zelandia, aunque indujeron nódulos, no mostraron beneficios significativos en relación con el peso seco. Esto realza la importancia de la especificidad entre rizobios y su planta hospedadora para la fijación efectiva de nitrógeno. Sin embargo, es esencial realizar más estudios en ambientes no intervenidos y evaluar las condiciones ambientales que afectan esta interacción.

### **SUMMARY**

The species *Sophora cassioides*, belong to the legume family and section

Edwardsia, in the southern hemisphere, this section is divided into about 20 species, which have aroused scientific interest due to their phylogenetic affinity, nodulation capacity and habitats on oceanic islands. The aim of this report was to evaluate the nodulation and nitrogen fixation capacity by inoculation with different rhizobial strains of species of the section Edwardsia. Inoculation trials were carried out with 23 strains, of which 12 were successful in inducing nodulation. Strains AG-260, AG-261 and AG-252 stood out for their superior nodulation rate. In some treatments, despite the absence of leg haemoglobin in the nodules, strains such as AG-264 promoted higher aerial biomass, suggesting alternative growth stimulation mechanisms. Cluster analysis revealed that strain AG-274 was the most effective in biomass production, while the New Zealand strains, although inducing nodules, did not show significant benefits in terms of dry weight. This highlights the importance of specificity between rhizobia and their host plant for effective nitrogen fixation. However, it is essential to carry out further studies in undisturbed environments and to assess the environmental conditions that affect this interaction.

## INTRODUCCIÓN

*Sophora* es un género que pertenece a la familia Fabaceae y que comprende 45 a 50 especies que están distribuidas a nivel mundial (Peña *et al.*, 2000). En el hemisferio sur, se agrupan aproximadamente 20 especies de género *Sophora* pertenecientes a la sección denominada Edwardsia. Estas especies han captado el interés científico, debido a su cercana afinidad filogenética y a que habitan principalmente islas oceánicas, levantando una serie de hipótesis y teorías biogeográficas y de especiación (Peña *et al.*, 2000; Hurr *et al.*, 2002; Mitchell y Heenan, 2002).

Dentro de la sección Edwardsia existen tres especies endémicas de Chile insular: *S. toromiro* (Phil.) Skottsb., representante emblemática de la flora nativa y actualmente declarada extinta en la Isla de Pascua (Dannemann, 2013), y las especies *S. fernandeziana* (Phil.) Skottsb. y *S. masafuerana* (Phil.) Skottsb., especies en peligro de extinción del Archipiélago de Juan Fernández (Bernardello *et al.*, 2004; Ricci *et al.*, 2008; Soto, 2020).

La zona continental de Chile cuenta con dos especies nativas de esta sección; *S. macrocarpa* Sm. cuyo nombre común es mayo o mayú y *S. cassioides* Phil. Sparre, nombre común Pelú o Pilo (Martínez, 1990; Peña *et al.* 2000; Rodríguez *et al.*, 2001).

*S. cassioides* (Phil.) Sparre, es un árbol endémico y frecuente en los bosques del sur de Chile, su distribución abarca desde el río Maule hasta la provincia de Aysén (Martínez, 1990; Peña *et al.*, 2000; Rodríguez *et al.*, 2001). Alcanza unos 10 metros de altura, con un hábito de crecimiento erguido y extendido, troncos robustos, y ramas principales que se desarrollan muy por encima del nivel del suelo, las ramillas de estas especies suelen ser marrón o marrón verdoso (Heenan *et al.*, 2001), de crecimiento vertical en su juventud. Flores amarillas, con estandarte más cortos que las alas y quillas, filamentos libres y un cáliz cupulado, agrupadas en racimos cortos. Fruto legumbre con 4 alas (de borde irregular), estrangulada, con 1 a 10 semillas alargadas de color amarillo a castaño amarillento, de 7 mm x 5 - 6 mm (Heenan *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 2001).

Una de las características de la familia Fabaceae es la capacidad de establecer simbiosis con bacterias del suelo comúnmente llamadas “rizobios”, los cuales se establecen en nódulos en la raíz desde donde aportan nitrógeno (N) a la planta. La fijación biológica de nitrógeno (FBN) es un proceso enzimático donde se reduce el N atmosférico (N<sub>2</sub>) hasta amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) dejándolo disponible en una forma asimilable para la planta (Sanjuán, 2001).

En Chile y en la mayoría de los países de América Latina, existen leguminosas nativas con la capacidad de establecer simbiosis con “rizobios”, que aún no han sido estudiadas en su hábitat natural, y que podrían ser utilizadas en zonas del país propensas a la desertificación o cumplir un rol importante como la conservación y reforestación de zonas desértica (Bianco y Cenzano, 2018).

Un factor primordial en el éxito de esta interacción es la especificidad de las cepas bacterianas con su hospedante, donde la ausencia de un número suficiente de rizobios efectivos y compatibles para la especie, constituye uno de los elementos limitantes en la fijación de N<sub>2</sub> y por ende para el establecimiento de la planta (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2000).

La especificidad está determinada por una serie de señales químicas de reconocimiento entre ambos simbios. Los rizobios son capaces de notar la presencia de la raíz de la leguminosa por medio de moléculas de bajo peso molecular flavonoides, derivadas de 2-fenil-1,4-benzopirona, isoflavonoides y betaínas, secretadas por la raíz. En respuesta a la señal de la planta, los rizobios sintetizan otras señales específicas, los factores Nod (nodulación), dirigidos hacia la planta hospedadora, lo que le permiten al rizobio, entre otras cosas, ingresar a los tejidos de la raíz (Perret *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001; Oldroyd y Downie, 2008; Bianco, 2020). Los rizobios invaden las raíces de las leguminosas utilizando tres mecanismos: hilos de infección en los pelos radicales, a través de la entrada por grietas o a través de las células epidérmicas de la raíz. El mecanismo más común de ingreso de las bacterias a los tejidos internos de la raíz ocurre a través de los pelos radicales, los cuales se curvan para formar así un canal interno de infección (hilo de infección). Luego se induce la formación de nódulos y colonización interna de las células por los rizobios, proceso que puede tardar alrededor de 15 días, para luego dar lugar a la fijación N<sub>2</sub> (Oldroyd y Downie, 2008; Bianco, 2020).

Especies del género *Sophora* han sido reportadas como capaces de establecer simbiosis con rizobios, predominantemente con bacterias del género *Mesorhizobium* (Tan *et al.*, 2015; Olave, 2020). Las especies de *Sophora* de Nueva Zelanda han sido las más estudiadas en cuanto a sus asociaciones simbióticas. Tan *et al.* (2015) reportaron nodulación y fijación de N<sub>2</sub> en *S. microphylla*, *S. longicarinata*, *S. prostrata* y *S. tetraptera*, y demostraron que algunas de estas especies interactuaban con la misma especie de rizobio. De Meyer *et al.* (2015) describió las especies de rizobio *M. waimense* asociado a *S. longicarinata* y *M. cantuariense*, aislado desde *S. microphylla*. Además, se describieron otras especies de *Mesorhizobium* actuando como simbios de *S. microphylla*, *S. prostrata* y *S. longicarinata*, demostrando con ello que algunas especies de *Sophora* pueden compartir el mismo simbiote rizobiano (De Meyer *et al.*, 2016).

A la fecha no existe mucha información acerca de los rizobios asociados a especies chilenas de *Sophora*. Al respecto se ha logrado avanzar particularmente en la especie *S. toromiro* a través de un convenio de investigación entre la

Universidad de Concepción, CONAF (Corporación nacional forestal), Isla de Pascua y CMPC (Compañía manufacturera de papeles y cartones), donde también se logró aislar bacterias asociadas a *S. macrocarpa* y *S. cassioides* (Olave, 2020). La importancia de estudiar los rizobios asociados a las especies de leguminosas forestales nativas de Chile, radica en que, al momento de establecerlas en otro sitio, estas se puedan desarrollar y fijar N de la misma manera en que lo harían en su hábitat natural. El objetivo de este trabajo de tesis fue determinar la especificidad y efectividad simbiótica de diferentes cepas de rizobios aislados de *Sophora* spp. en *S. cassioides*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de microbiología del Departamento de Producción Vegetal de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Concepción.

### **Material Vegetal**

Se utilizaron semillas de *S. cassioides* obtenidas en colaboración con Vivero Carlos Douglas, CMPC y CONAF.

### **Material bacteriano**

Se utilizaron cepas de rizobios aislados desde nódulos radiculares de distintas especies del género *Sophora* de Chile y 10 cepas aisladas desde especies de *Sophora* en Nueva Zelandia, obtenidas en colaboración con la Universidad de Lincoln (Tabla 1). Las cepas se encontraban mantenidas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  en 20% glicerol en la colección de microorganismos de la Facultad de Agronomía. Para su reactivación, se inoculó una alícuota obtenida desde el criotubo congelado, en una placa Petri con agar manitol levadura (AML) las que se incubaron a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 5 días (Matos *et al.*, 2002; Hernández *et al.*, 2012).

Para la preparación de inóculo para los ensayos en planta, las cepas bacterianas fueron multiplicadas en matraces con 100 mL de medio líquido manitol levadura y se incubaron a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  con agitación por 5 días. Se normalizó la densidad óptica de cada cepa a un valor de 0,1 mediante medición en un espectrofotómetro a 600 nm.

Tabla 1. Cepas de rizobios aisladas desde nódulos radiculares de *Sophora* spp. en Chile continental, insular y desde Nueva Zelandia.

N° cepa	Identificación	Origen geográfico	Especie hospedera	Fuente
AG-262	<i>Rhizobium</i> sp.	Vivero Carlos Douglas, Yumbel, Región del Biobío	<i>S. macrocarpa</i>	Olave, 2020
AG-263	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	Vivero Carlos Douglas, Yumbel, Región del Biobío	<i>S. cassioides</i>	Olave, 2020
AG-264	<i>Mesorhizobium</i> sp.	Vivero Carlos Douglas, Yumbel, Región del Biobío	<i>S. toromiro</i>	Olave, 2020
AG-269	<i>Rhizobium</i> sp.	Vivero Carlos Douglas, Yumbel, Región del Biobío	<i>S. toromiro</i>	Olave, 2020
AG-274	<i>Mesorhizobium</i> sp.	Quilaco, Altos del Biobío, Región del Biobío	<i>S. macrocarpa</i>	Olave, 2020
AG-275	<i>Mesorhizobium</i> sp.	Quilaco, Altos del Biobío, Región del Biobío	<i>S. macrocarpa</i>	Olave, 2020
AG-277	<i>Mesorhizobium</i> sp.	Quilaco, Altos del Biobío, Región del Biobío	<i>S. macrocarpa</i>	Olave, 2020
AG-288	<i>Mesorhizobium</i> sp.	Quilaco, Altos del Biobío, Región del Biobío	<i>S. macrocarpa</i>	Olave, 2020
AG-285	<i>Mesorhizobium</i> sp.	Quilaco, Altos del Biobío, Región del Biobío	<i>S. macrocarpa</i>	Olave, 2020

Tabla 1 (cont). Cepas de rizobios aisladas desde nódulos radiculares de *Sophora* spp. En Chile continental, insular y desde Nueva Zelanda (continuación).

N° cepa	Identificación	Origen geográfico	Especie hospedera	Fuente
AG-257	<i>M. plurifarum</i>	Isla Robinson Crusoe, Vaquería, Región de Valparaíso.	<i>S. fernandeziana</i>	Olave, 2020
AG-260	<i>M. plurifarum</i>	Isla Robinson Crusoe, Vaquería, Región de Valparaíso.	<i>S. fernandeziana</i>	Olave, 2020
AG-261	<i>Paraburkholderia</i> sp.	Isla Robinson Crusoe, Jardín Conaf, Región de Valparaíso	<i>S. fernandeziana</i>	Olave, 2020
AG-252	<i>Paraburkholderia</i> sp.	Isla Robinson Crusoe, Región de Valparaíso	<i>S. fernandeziana</i>	Olave, 2020
AG-105	<i>M. cantuariense</i>	Canterbury, Terraza de río Rakaia, Nueva Zelandia	<i>S. microphylla</i>	de Meyer <i>et al.</i> , 2015
AG-107	<i>M. waitakense</i>	Otago, Rivera de río Waitaki, Nueva Zelandia	<i>S. microphylla</i>	de Meyer <i>et al.</i> , 2015
AG-106	<i>M. waimense</i>	Marborough, Terraza de río Waima, Nueva Zelandia	<i>S. longicarinata</i>	de Meyer <i>et al.</i> , 2015
AG-103	<i>M. mewzealandense</i>	Marborough, Terraza de río Waima, Nueva Zelandia	<i>S. prostrata</i>	de Meyer <i>et al.</i> , 2015

Tabla 1 (cont). Cepas de rizobios aisladas desde nódulos radiculares de *Sophora* spp. En Chile continental, insular y desde Nueva Zelanda (continuación).

N° cepa	Identificación	Origen geográfico	Especie hospedera	Fuente
AG-100	<i>M. calcicola</i>	Marborough, Terraza de río Waima, Nueva Zelanda	<i>S. longicarinata</i>	de Meyer <i>et al.</i> , 2015
AG-104	<i>M. kowhainii</i>	Canterbury, Terraza de río Rakaia, Nueva Zelanda	<i>S. microphylla</i>	de Meyer <i>et al.</i> , 2015
AG-101	<i>M. sophorae</i>	Westland, Río Pororari, Nueva Zelanda	<i>S. microphylla</i>	de Meyer <i>et al.</i> , 2015
AG-99	Desconocido	Wellington, Río Oroua, Nueva Zelanda	<i>S. godleyi</i>	Tan <i>et al.</i> , 2015
AG-102	Desconocido	Taurpo, Terraza del lago Taupo, Nueva Zelanda	<i>S. tetráptera</i>	Tan <i>et al.</i> , 2015
AG-108	Desconocido	Canterbury, Puerto Hills, Nueva Zelanda	<i>S. microphylla</i>	Tan <i>et al.</i> , 2015

### Diseño experimental

El diseño experimental fue completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento. Los tratamientos constaron de la inoculación de 23 cepas bacterianas, diez de éstas obtenidas en colaboración con la Universidad de Lincoln, Nueva

Zelandia (de Meyer *et al.*, 2015; Tan *et al.*, 2015) y 13 cepas aisladas desde *Sophora* spp. en Chile por Olave (2020). Además, se utilizó un testigo inoculado y con nitrógeno (N+) y un testigo sin inocular y sin nitrógeno (N-), a los cuales se les adicionó semanalmente 10 mL de nitrato de potasio (KNO<sub>3</sub>) 0,1 M.

### **Ensayo de efectividad simbiótica en *Sophora cassioides***

Se evaluó la capacidad de inducir formación de nódulos y la efectividad de fijación biológica de nitrógeno de rizobios en *S. cassioides*, para ello se evaluó paralelamente la capacidad de inducir formación de nódulos y efectividad de fijación biológica, utilizando cepas bacterianas obtenidas desde el género *Sophora* spp., división Edwardsia (Tabla 1). El ensayo se realizó, bajo condiciones asépticas en un fitotrón con luz artificial y temperatura regulada a 22 °C.

**Preparación y germinación de semillas.** Las semillas de *S. cassioides* se escarificaron en ácido sulfúrico y luego fueron desinfectadas superficialmente por inmersión en etanol al 70% (v/v) durante 1 min, en hipoclorito de sodio al 3% (v/v) durante 3 minutos y luego lavadas 6 veces en agua destilada estéril. Las semillas desinfectadas se depositaron en placas Petri con agar agua (1,5%) y fueron llevadas a incubación a 25 °C en oscuridad hasta observar la aparición de la radícula.

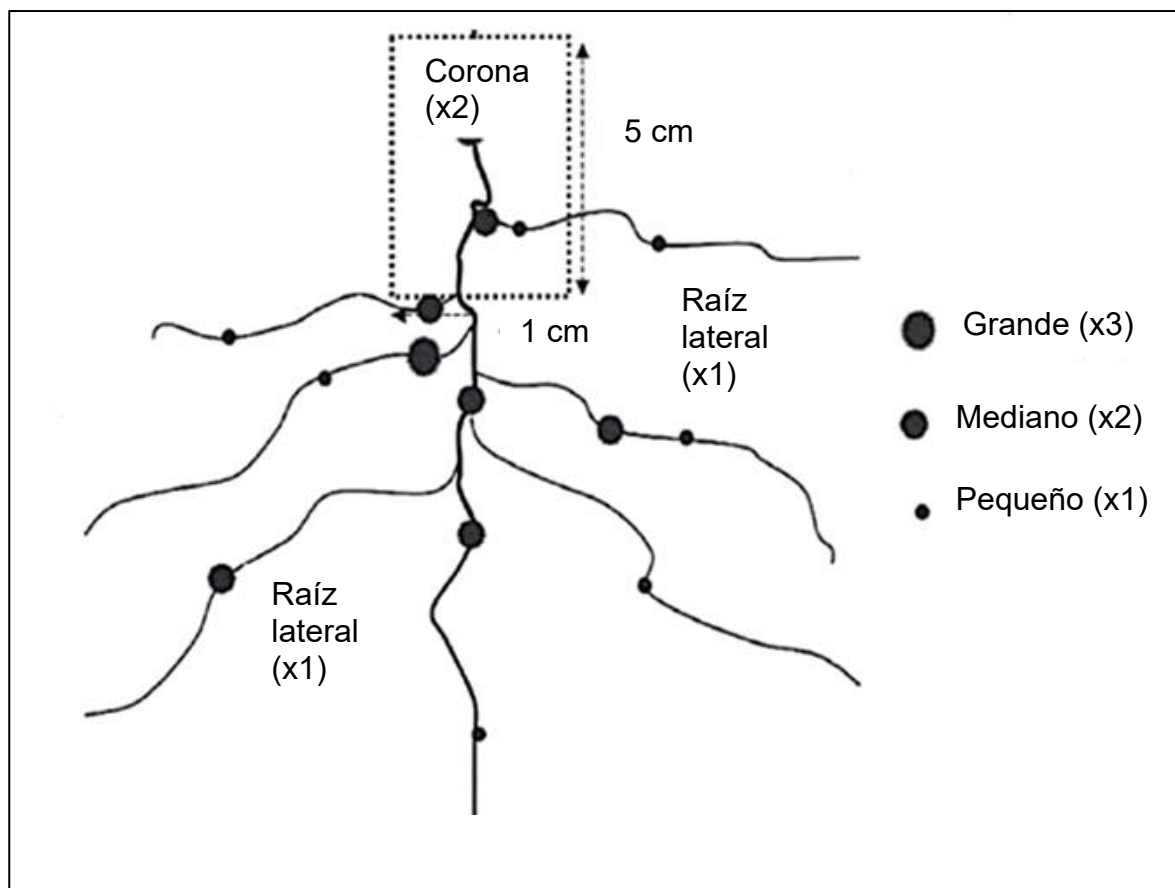
**Establecimiento del ensayo.** El sustrato utilizado estaba compuesto por arena: perlita en relación 1:1. Este se esterilizó en autoclave (120 °C a 1,5 atm por 20 min) y luego fue depositado en macetas de 250 mL previamente desinfectadas con etanol al 70%. En cámara de flujo laminar, se depositó una semilla germinada por maceta con 20 mL de solución nutritiva sin nitrógeno. Transcurridos 4 días se inoculó cada maceta con 1 mL de cultivo bacteriano a una densidad óptica (DO) (600 nm) de 0,1, equivalentes a 10<sup>7</sup> UFC (Unidades formadoras de colonias) mL<sup>-1</sup>. Luego de 50 días se evaluaron las variables nodulación y peso seco aéreo de follaje.

En el caso de la nodulación, se contaron los nódulos presentes en el sistema radicular y cuántos de ellos estaban activos mediante una disección y observación subjetiva de coloración rojiza presente en el interior del nódulo, lo que demostraba la presencia de leg-hemoglobina, mientras que, si no existe coloración blanquecina, se asume que el nódulo no ha logrado la efectividad esperada.

A partir de la observación del tamaño del nódulo y su ubicación en el sistema

radicular, se obtuvo un índice de nodulación de acuerdo con la escala propuesta por el Centre for Rhizobium Studies (2012) (Figura 1) formulada de la siguiente manera: 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.

Figura1. Escala de valoración de la nodulación en sistemas radiculares jóvenes.



Fuente: Centre for Rhizobium Studies (2012).

Posteriormente a la evaluación de la nodulación, se midió el peso seco aéreo, para lo cual se separó la parte aérea de la raíz, y fueron depositadas en bolsas de papel para luego ser secadas a 60 °C hasta obtener un peso constante, y se obtuvo peso seco para cada unidad experimental.

### Análisis de datos

Los datos de peso seco fueron evaluados a través de una prueba no paramétrica,

tabulados y analizados mediante análisis de conglomerados, utilizando la distancia euclídea. Los conglomerados fueron comparados por medio de análisis de varianza (ANDEVA) para determinar diferencias entre tratamientos, previa comprobación de supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas.

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 de prueba propuesta por Conover. Todos los análisis se realizaron en el programa estadístico Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2016).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

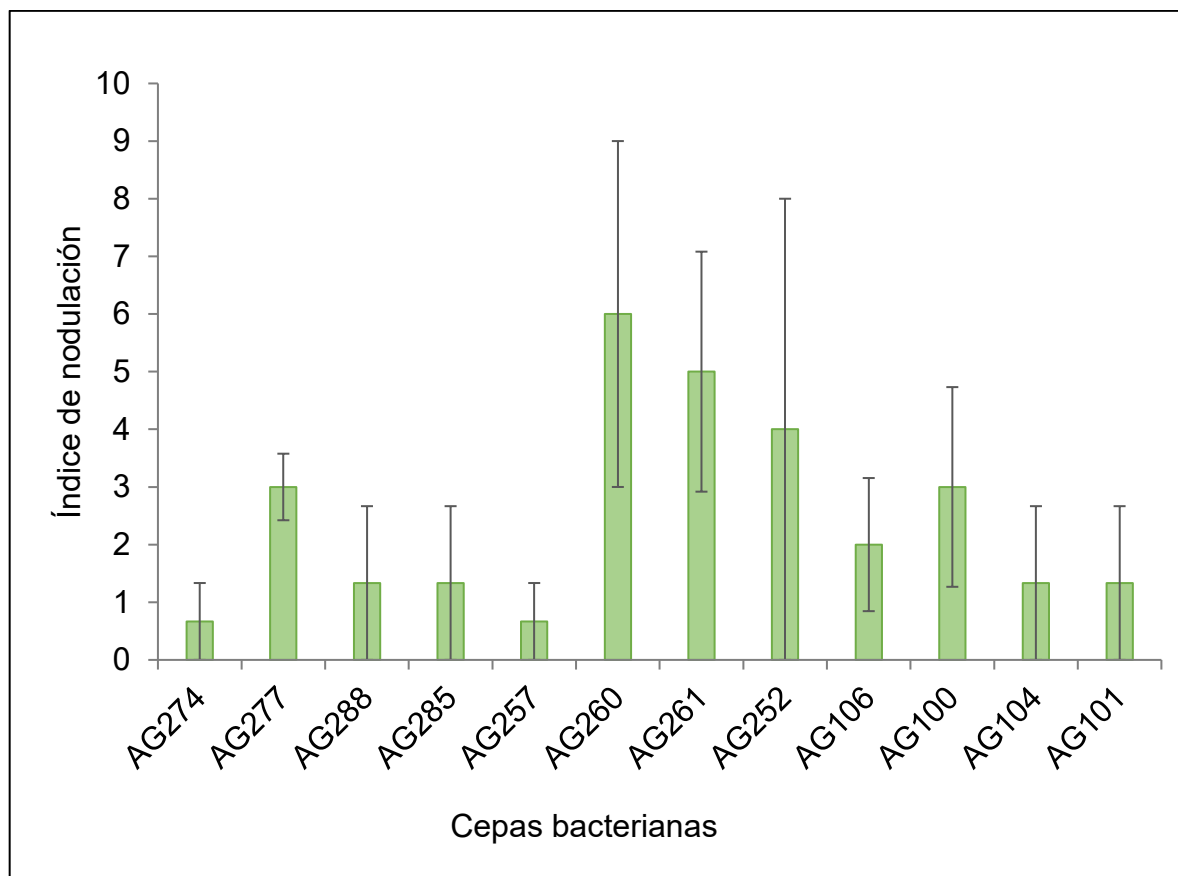
### **Efectividad simbiótica en plantas**

En el ensayo de inoculación en plantas de *S. cassioides* se determinó que 12 de las 23 cepas evaluadas fueron capaces de inducir nodulación en las raíces, las cuales se incluyen en la figura 2. Las cepas que no lograron formar nódulos fueron AG-262, AG-263, AG-264, AG-269, AG-275, AG-105, AG-107, AG-103, AG-99, AG-102 y AG-108. Los tratamientos que no fueron inoculados (N- y N+), no presentaron nodulación.

El índice de nodulación otorga diferentes puntajes a los nódulos, dependiendo de su ubicación en la raíz. Los nódulos ubicados cerca de la raíz principal tienden a contribuir a la planta con mayor cantidad de N, además, son nódulos formados en los primeros estadios de la planta, por esta razón aportan N por más tiempo (Yates *et al.*, 2016). Por otro lado, la velocidad de nodulación es un factor considerable al momento de realizar las inoculaciones en terreno, debido a que la cepa que tiene mayor rapidez en nodular es la más competitiva respecto a los demás rizobios presentes en el suelo, de esta manera se evita que cepas inefectivas utilicen los sitios de infección (Gerding *et al.*, 2014). Utilizando dicho índice se obtuvo que, no hubo diferencia estadística significativa entre los índices de nodulación. Sin embargo, destacan las cepas AG-260 (*M. plurifarium*, *S. fernandeziana*), AG-261 (*Paraburkholderia* sp., *S. fernandeziana*) y la cepa AG-252 (*Paraburkholderia* sp., *S. fernandeziana*) las que obtuvieron valores promedio de índice de nodulación superiores, pero no significativos, debido a la gran dispersión de los datos, como se

observa en la Figura 2.

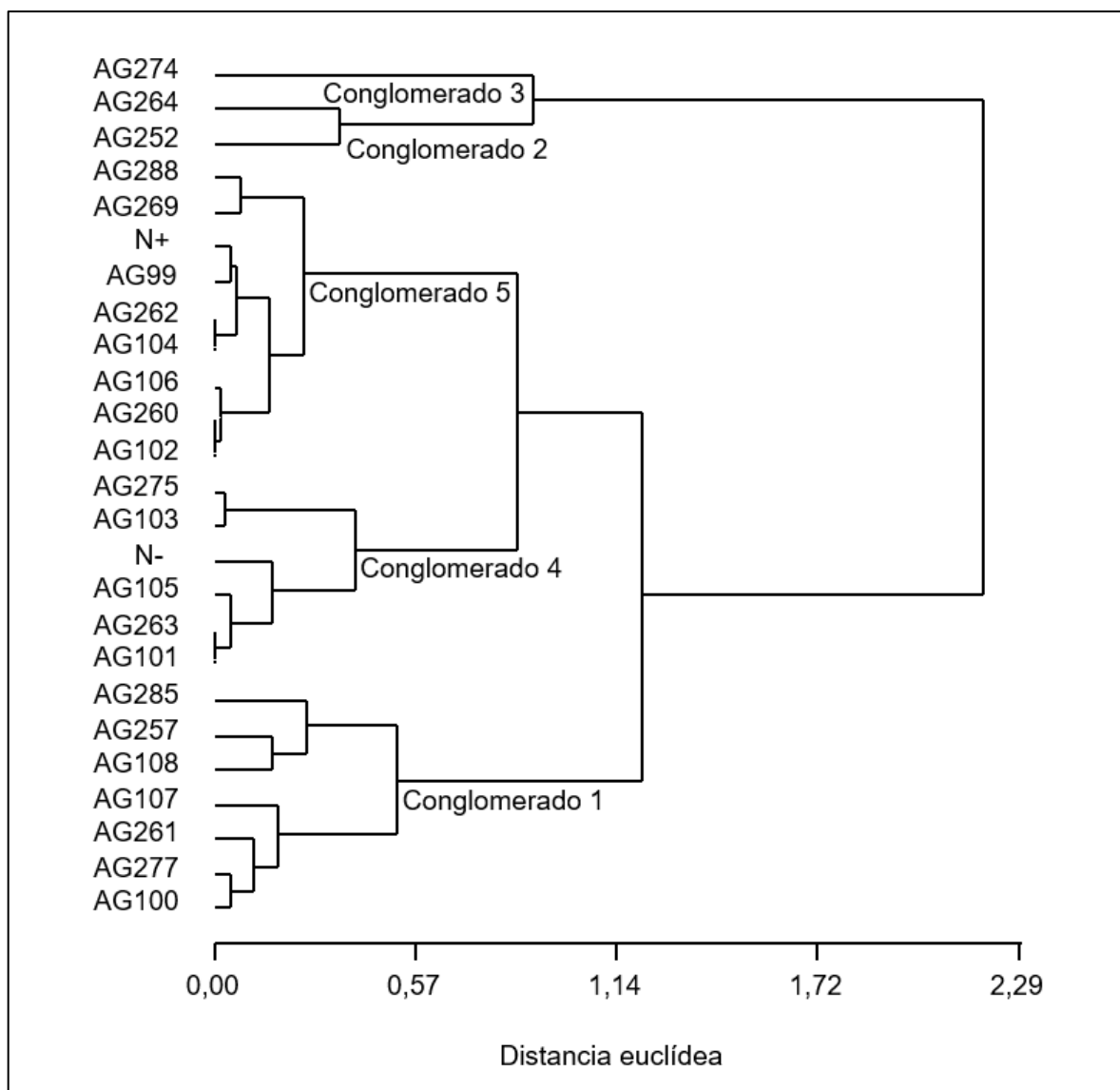
Figura 2. Índice de nodulación en *Sophora cassioides* inoculada con distintas cepas de rizobios aislados desde nódulos radiculares de *Sophora* spp. en Chile y Nueva Zelanda.



El análisis de conglomerado de los datos de materia seca en *S. cassioides* inoculados con diferentes cepas de rizobios, agrupó a las cepas en cinco grupos (Figura 3). En el conglomerado dos, se agruparon dos especies bacterianas, AG-264 (*Mesorhizobium* sp.) y AG-252 (*Paraburkholderia* sp.), las cuales comparten valores similares que no tienen los demás grupos. En el caso del conglomerado tres, en este se encuentra la bacteria AG-274 (*Mesorhizobium* sp.), con valores significativamente mayores que el conglomerado número dos, pero al unirse entre ellos, existe alguna similitud en cuanto a sus características, pero el conglomerado dos esta más estrechamente relacionado entre sí que con el conglomerado tres. Los conglomerados se miden según la distancia euclídea entre ellos, esta es una

medida de distancia directa entre dos puntos en un espacio multidimensional y se utiliza para medir la similitud o disimilitud entre individuos (Gallego *et al.*, 2019).

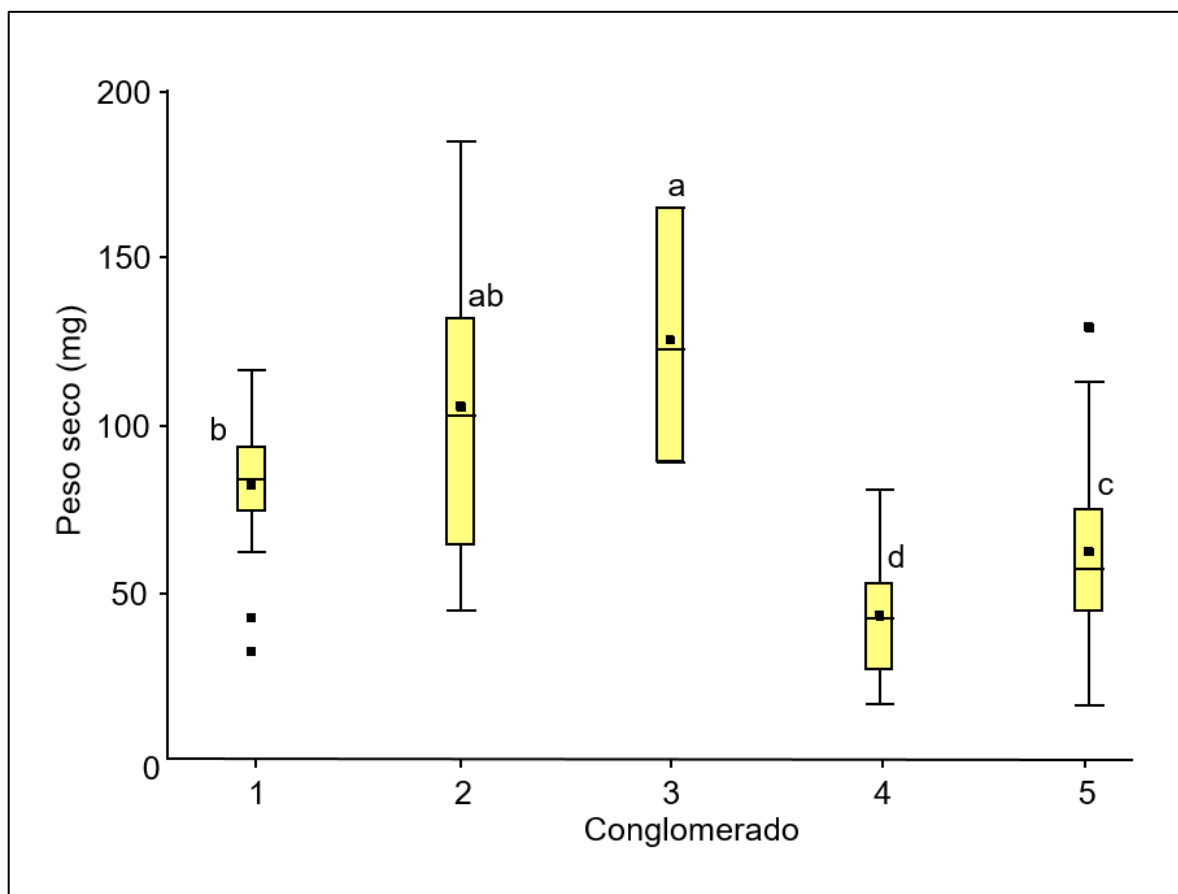
Figura 3. Cladograma comparativo de cepas bacterianas en base al peso seco en *Sophora cassioides*. Generado por análisis de conglomerados de acuerdo con la distancia euclídea.



La comparación de medias de peso seco de las plantas de *S. cassioides* se observan en la figura 4, donde el conglomerado número 3, que incluye solo a la cepa AG-274 fue superior a los conglomerados 1, 4 y 5; seguido del conglomerado 2 que fue superior a los conglomerados 4 y 5, donde se encontraron las cepas AG-

264 y AG-252, siendo dos de estas tres cepas, las que a su vez lograron mayores índices de nodulación. Por otro lado, los conglomerados número 4 y 5 fueron los que presentaron menor porcentaje de peso seco, los cuales incluyeron los testigos sin inoculación (N- y N+). Esto sugiere que el índice de nodulación estaría siendo un predictor efectivo de fijación de N<sub>2</sub> y de producción de biomasa aérea.

Figura 4. Comparación entre conglomerados de cepas de rizobios evaluadas en cuanto a producción de peso seco en *Sophora cassioides*.



\*Letras iguales indican que no existen diferencias significativas entre los conglomerados de acuerdo con la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

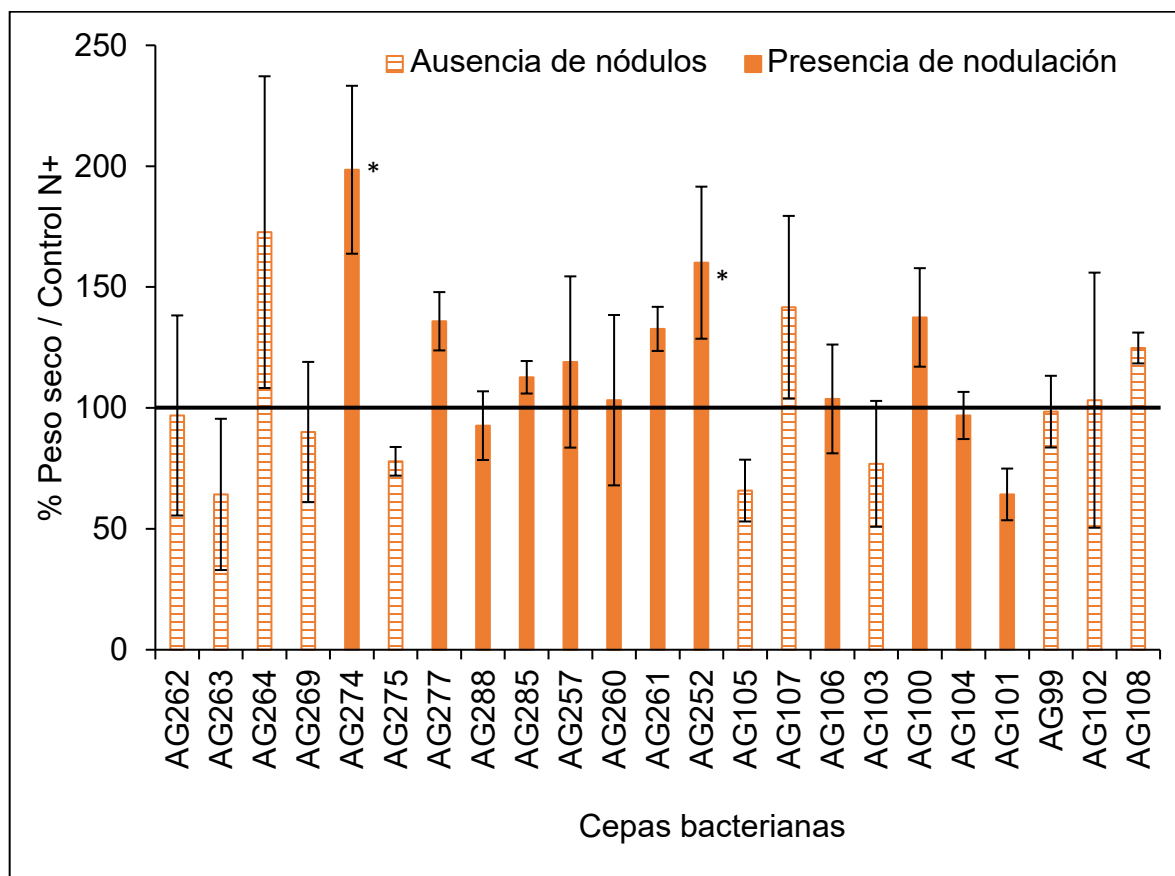
El peso seco de las plantas es un parámetro clave para evaluar el crecimiento y desarrollo de las especies vegetales, y en el contexto de la simbiosis planta-rizobio, este factor depende en gran medida de la afinidad y especificidad entre la planta y la cepa de rizobio que la infecta. Esta relación simbiótica es fundamental para el proceso de FBN. La afinidad y especificidad, a su vez, están determinadas por

factores genéticos tanto de la planta como de la cepa rizobiana. Esto significa que la efectividad de la simbiosis no es homogénea para todas las plantas y rizobios, sino que varía dependiendo de las especies involucradas y sus capacidades para establecer una relación efectiva.

En ensayos en invernadero es posible determinar esta especificidad, calculando la efectividad simbiótica (Yates *et al.*, 2016). En la Figura 5, se muestran los datos porcentuales del peso seco en referencia al testigo con nitrógeno N+ (%). De acuerdo con Yates *et al.* (2008), se considera que una cepa de rizobio es efectiva si logra producir al menos el 75% del peso seco en comparación con el testigo con fertilización nitrogenada (N+). Este umbral del 75% es utilizado como referencia para clasificar a las cepas como "efectivas", lo que significa que son capaces de proporcionar una cantidad significativa de N a la planta, lo cual es comparable a la fertilización nitrogenada tradicional. Las cepas que no alcanzan este umbral se consideran de baja efectividad, lo que indica que su capacidad para fijar N<sub>2</sub> y, por ende, para promover el crecimiento de la planta es limitada.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este ensayo las cepas AG-264, AG-274, AG-252, AG-107, AG-100 y AG-108 lograron porcentajes de peso seco elevados con respecto al control con N, de esta manera serían consideradas simbiosis efectivas para *S. cassioides*. Sin embargo, solo dos (AG-274, AG-252) de estas seis cepas fueron capaces de inducir la formación de nódulos en la raíz de *S. cassioides*. Los nódulos, en general, presentaron una coloración interna blanquecina, sugiriendo ausencia de leg-hemoglobina, lo que es indicador de inactividad del complejo enzimático nitrogenasa y por lo tanto ausencia de FBN (Calvo, 2011). Según Fourmond y Liger (2017) el complejo enzimático nitrogenasa cataliza la reacción principal para la fijación de N<sub>2</sub>, convirtiendo el nitrógeno N<sub>2</sub> en NH<sub>3</sub> en los nódulos, pero es inactivado cuando es expuesto a oxígeno. Por lo tanto, para conocer su efectividad, la leg-hemoglobina juega un papel muy importante, ya que es una proteína reguladora que controla los niveles de concentración de oxígeno al interior del nódulo. La leg-hemoglobina contiene hierro y funciona como tampón, por lo tanto, aumenta o disminuye la concentración de oxígeno existente en el nódulo (Calvo, 2011).

Figura 5. Producción de materia seca aérea en relación con el peso seco aéreo del tratamiento con nitrógeno (N+) en *Sophora cassioides*.



\* Bacterias incluidas en conglomerado con mejores resultados.

El hecho de que se haya logrado un mayor peso seco de planta, incluso cuando los nódulos no presentaron coloración interna rojiza, indica que los rizobios pudiesen estar promoviendo crecimiento a través de algún otro mecanismo más allá de la fijación biológica de N. Existen antecedentes de que los rizobios no solo estimulan el crecimiento de las plantas a través de la fijación de N<sub>2</sub> dentro de los nódulos, sino que de igual forma pueden actuar como bacterias rizosféricas promotoras de crecimiento, siendo capaces de estimular el crecimiento incluso de especies que no están dentro de las familias de las leguminosas (Santillana *et al.*, 2012; Hernández *et al.*, 2015; Hernández *et al.*, 2017). Esto puede haber sucedido con cepas como AG-264 que, si bien no logró inducir nódulos e introducirse en la raíz, sí logró estimular una mayor biomasa aérea en las plantas de *S. cassioides* en comparación con los controles sin inoculación.

Por otro lado, al producirse nodulación, pero sin un incremento de biomasa en la planta, se relaciona con la activación de genes en la bacteria (nodulación inefectiva). Los rizobios contienen un conjunto de genes que determinarán la infección, especificidad y la FBN. Los genes *nodABC* están involucrados en el proceso de infección, y los genes, *noddH*, *nodPQ* y *nodFE* 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*, los que gatillan la formación de una molécula de señal, conocida como factor Nod. Estos últimos 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 se desarrollan los nódulos. Existe otro conjunto de genes, llamados genes *nif*, los que determinan que ocurra la FBN en un hospedero determinado. Además, estos genes permiten una ocupación más eficiente del nódulo e infección de un genotipo determinado de 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 puedan ser activados, como probablemente ocurrió con algunas cepas de este estudio (Tao *et al.*, 2021).

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 disponibilidad de fósforo (P) y N, la sequía, la acidez del suelo, las altas y bajas temperaturas, son factores que pueden afectar las interacciones entre huésped y rizobio, lo que genera una menor formación de nódulos y, por lo tanto, una menor fijación simbiótica de N (Howieson y Ballard, 2004), ya que en muchos casos se ve afectado el intercambio de señales moleculares entre los socios simbióticos (Sadowsky, 2005). En este estudio, varias de las cepas bacterianas, como AG-274, AG-277, AG-252, entre otras, lograron formar nódulos, lo que evidencia su interacción e intercambio de señales, mientras que el factor ambiental no produjo un efecto negativo. Sin embargo, algunos de estos nódulos fueron inefectivos. Esto, probablemente sea atribuible a que las cepas fueron aisladas

desde un hospedero del género *Sophora*, pero distinto de *S. cassioides*.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la cepa AG-274 proveniente de Quilaco fue la que obtuvo mejores resultados a nivel de producción de biomasa aérea. Por otro lado, las cepas aisladas de diferentes zonas de Nueva Zelandia, si bien indujeron nódulos en cuatro tratamientos, estos no mostraron efectos positivos en el peso seco de las plantas, debido a su ineffectividad simbiótica. Llama la atención que la única cepa que fue aislada desde *S. cassioides* (AG-263) en vivero, no indujo nodulación en esta especie. Esto sugiere que las plantas en vivero están interactuando con las bacterias que encuentran disponibles en ese ambiente o en sustrato, y que no necesariamente corresponden a las cepas más efectivas y de preferencia en su ambiente natural.

Si bien en esta investigación se logró confirmar la habilidad de algunas bacterias para inducir nódulos radiculares en la especie *S. cassioides*, es necesario realizar más colectas, específicamente en *S. cassioides*, desde ambientes no intervenidos. También sería beneficioso explorar el efecto de diferentes condiciones ambientales sobre la interacción rizobio-planta, así como realizar ensayos en campo para validar los resultados obtenidos en condiciones controladas. Esto permitirá contar con inoculantes bacterianos para mejorar el establecimiento y desarrollo de *S. cassioides* en bosques nativos de Chile y de esta manera combatir la desertificación, proteger quebradas y conservar la flora nativa existente (Pérez, 2020).

## CONCLUSIONES

- La especie *S. cassioides* es capaz de formar nódulos en simbiosis con algunas cepas de *Mesorhizobium* sp. y *Paraburkholderia* sp. aisladas de plantas del género *Sophora* y lograr mayor desarrollo de biomasa y de nódulos.
- Este trabajo demuestra que existe especificidad simbiótica para *Sophora cassioides*, ya que solo dos cepas de las 23 estudiadas fueron capaces de inducir nodulación efectiva.

## REFERENCIAS

1. Bernardello, G., Aguilar, R., & Anderson, G. J. (2004). The reproductive biology of *Sophora fernandeziana* (Leguminosae), a vulnerable endemic species from isla Robinson Crusoe. *American Journal of Botany*, 91(2), 198–206. <https://doi.org/10.3732/ajb.91.2.198>
2. Bianco, L., & Cenzano, A. M. (2018). Leguminosas nativas: estrategias adaptativas y capacidad para la fijación biológica de nitrógeno. Implicancia ecológica. *Idesia (Arica)*, 36(4), 71–80. <https://doi.org/10.4067/s0718-34292018005002601>
3. Bianco, L. (2020). Principales aspectos de la nodulación y fijación biológica de nitrógeno en Fabáceas. *Idesia (Arica)*, 38(2), 21–29. <https://doi.org/10.4067/s0718-34292020000200021>
4. Centre for Rhizobium Studies. (2012). *Master class in rhizobial technology*. Sri Lanka: Murdoch University.
5. Dannemann, V. (11 de noviembre 2013). Isla de Pascua: un árbol extinto vuelve a florecer. Deutsche Welle. Recuperado de <https://www.dw.com/es/isla-de-pascua-un-%C3%A1rbol-extinto-vuelve-a-florecer/a-17219260>
6. De Meyer, S. E., Tan, H. W., Andrews, M., Heenan, P. B., & Willems, A. (2016). *Mesorhizobium calcicola* sp. nov., *Mesorhizobium waitakense* sp. nov., *Mesorhizobium sophorae* sp. nov., *Mesorhizobium newzealandense* sp. nov. and *Mesorhizobium kowhahi* sp. nov. isolated from *Sophora* root nodules. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(2), 786–795. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000796>
7. De Meyer, S., Tan, H. W., Heenan, P. B., Andrews, M., & Willems, A. (2015). *Mesorhizobium waimense* sp. nov. isolated from *Sophora longicarinata* root nodules and *Mesorhizobium cantuariense* sp. nov. isolated from *Sophora microphylla* root nodules. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(Pt\_10), 3419–3426. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000430>
8. Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M. & Robledo, C. W. (2016). InfoStat versión 2016. Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba.
9. Forte, I. H., Nápoles, M. C., & Mena, B. M. (2015). Caracterización de aislados de rizobios provenientes de nódulos de soya (*Glycine max* L.) Merrill) con potencialidades en la promoción del crecimiento vegetal. *Cultivos*

*Tropicales*, 36(1), 65–72.

10. Forte, I. H., & Nápoles, C. (2017). Rizobios residentes en la rizosfera de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) cultivar inca LP-5. *Cultivos Tropicales*, 38(1), 39–49. <https://doi.org/10.1234/ct.v38i1.1333>
11. Fourmond, V., & Léger, C. (2017). Dinitrogen reduction: interfacing the enzyme nitrogenase with electrodes. *Angewandte Chemie International Edition*, 56(16), 4388–4390. <https://doi.org/10.1002/anie.201701179>
12. Gallego, L., & Araque, O. (2019). Variables de influencia en la capacidad de aprendizaje. un análisis por conglomerados y componentes principales. *Información Tecnológica*, 30(2), 257–264. <https://doi.org/10.4067/s0718-07642019000200257>
13. García, S. C. (2011). Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. *Cuadernos Del Tomás*, 3(3), 173–186.
14. Gerding, M., O'Hara, G. W., Howieson, J. G., & Bräu, L. (2014). Overcoming non-selective nodulation of *Lessertia* by soil-borne rhizobium in the presence of inoculant mesorhizobium. *Plant and Soil*, 380(1-2), 117–132. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2081-1>
15. Heenan, P. B., de Lange, P. J., & Wilton, A. D. (2001). Sophora (Fabaceae) in New Zealand: Taxonomy, distribution, and biogeography. *New Zealand Journal of Botany*, 39(1), 17–53. <https://doi.org/10.1080/0028825x.2001.9512715>
16. Hernández, J. L., Cubillos-Hinojosa, J. G. & Milian P. E. (2012). Aislamiento de cepas de *Rhizobium* spp., asociados a dos leguminosas forrajeras en el Centro Biotecnológico del Caribe. *Revista Colombiana de Microbiología Tropical*, 2(2), 51–62.
17. Howieson, J. (2004). Optimising the legume symbiosis in stressful and competitive environments within southern Australia? some contemporary thoughts. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(8). [https://doi.org/10.1016/s0038-0717\(04\)00125-7](https://doi.org/10.1016/s0038-0717(04)00125-7)
18. Hurr, K. A., Lockhart, P. B., Heenan, P. B., & Penny, D. (1999). Evidence for the recent dispersal of *Sophora* (Leguminosae) around the Southern Oceans: molecular data. *Journal of Biogeography*, 26(3), 565–577. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2699.1999.00302.x>

19. Martínez, O. M. (1990). Nuevo límite de área de distribución de *Sophora macrocarpa* J.E.Sm. (Papilionaceae). *Bosque (Valdivia)*, 11(2), 73–74.
20. San Juan, J. M. (2001). Importancia de la biosíntesis bacteriana de leucina para el establecimiento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. *Digibug.ugr.es*, 1(34–36). <http://hdl.handle.net/10481/2416>
21. Mitchell, A., & Heenan, P. B. (2002). *Sophora* sect. *Edwardsia* (Fabaceae): further evidence from nrDNA sequence data of a recent and rapid radiation around the Southern Oceans. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 140(4), 435–441. <https://doi.org/10.1046/j.1095-8339.2002.00101.x>
22. Matos, G., & Zúñiga, D. (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.
23. Olave, I. (2020). *Selección de rizobios asociados a Sophora para la inoculación y establecimiento de plantas de Sophora toromiro (Phil.) Skottsbo. especie extinta en su hábitat natural*. Tesis, Ingeniero Agrónomo. Universidad de Concepción, Chillán.
24. Oldroyd, G. E. D., & Downie, J. A. (2008). Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), 519–546. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092839>
25. Paredes, M.C. (2013). *Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas y gramíneas*. Trabajo final de graduación, Ingeniero en Producción Agropecuaria. Pontificia Universidad Católica Argentina, Buenos Aires, Argentina.
26. Parniske, M., & Downie, J. A. (2003). Locks, keys and symbioses. *Nature*, 425(6958), 569–570. <https://doi.org/10.1038/425569a>
27. Peña, R., Iturriaga, L., Montenegro, G., & Cassels, B. (2000). Phylogenetic and biogeographic aspects of *Sophora* Sect. *Edwardsia* (Papilionaceae). *Pacific Science*, 54(2), 159–167.
28. Perret, X., Staehelin, C., & Broughton, W. J. (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(1), 180–201. <https://doi.org/10.1128/mubr.64.1.180-201.2000>

29. Ricci, M., Ramirez, C., & Ramirez, J. (2008). Análisis cuantitativo de la flora de bosques y matorrales de la isla Robinson Crusoe (archipiélago de Juan Fernández, Chile). *Revista Geográfica de Valparaíso*, (41), 62–67.
30. Rodriguez-Navarro, D. N., Buendia, A. M., Camacho, M., Lucas, M. M., & Santamaria, C. (2000). Characterization of *Rhizobium* spp. bean isolates from south-west Spain. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(11), 1601–1613. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00074-2](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00074-2)
31. Rodríguez, R., & Marticolena, A. (2001). Nota sobre la nomenclatura del "pilo", *Sophora cassioides* (Fabaceae) de Chile. *Chloris Chilensis*, 4(2), 5–9.
32. Santillana, N., Zúñiga, D., & Arellano, C. (2012). Capacidad promotora del crecimiento en cebada (*Hordeum vulgare*) y potencial antagónico de *Rhizobium leguminosarum* y *Rhizobium etli*. *Agrociencia*, 16(2), 11–17. <https://doi.org/10.2477/agrociencia.v16i2.641>
33. Sadowsky, M. J. (2005). Soil stress factors influencing symbiotic nitrogen fixation. En D. Werner & W. E. Newton (Eds), *Nitrogen fixation research in agriculture, forestry, ecology, and environment* (pp. 89-102). The Netherlands: Springer.
34. Sanjuán, J. (2001). Importancia de la biosíntesis bacteriana de leucina para el establecimiento de la simbiosis *Rhizobium*-Leguminosa. Tesis, Doctor. Universidad de Granada, Granada.
35. Sequía y desertificación: ¿Qué podemos hacer? (2020). *Sequía y desertificación: ¿Qué podemos hacer?* Facultad de Ciencias Biológicas. <https://biologia.uc.cl/sequia-y-desertificacion-que-podemos-hacer>
36. Soto, M. (2020). *Selección de rizobios efectivos para la inoculación de Sophora ferandeziana y Sophora masafurana (Phil.) Skotts. Especies en Peligro de Extinción en su Hábitat Natural*. Tesis, Ingeniero Agrónomo. Universidad de Concepción, Chillán.
37. Tan, B., Ng, C., Nshimyimana, J. P., Loh, L. L., Gin, K. Y.-H., & Thompson, J. R. (2015). Next-generation sequencing (NGS) for assessment of microbial water quality: current progress, challenges, and future opportunities. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01027>
38. Tao, J., Wang, S., Liao, T., & Luo, H. (2021). Evolutionary origin and ecological

implication of a unique nif island in free-living Bradyrhizobium lineages. *The ISME Journal*, 15(11), 3195–3206. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-01002-z>

39. Yates, R. J. (2008). *Symbiotic interactions of geographically diverse annual and perennial Trifolium spp. with Rhizobium leguminosarum bv. trifolii*. Tesis, Doctor en Filosofía. Murdoch University, Perth.
40. Yates, R. J., Howieson, J. G., Hungria, M., Bala, A., G.W. O'Hara, & J. Terpolilli. (2016). Authentication of rhizobia and assessment of the legume symbiosis in controlled plant growth systems. En G. Howieson & M. J. Dilworth (Eds.), *Working with rhizobia* (pp. 73–108). Australia: ACIAR.
41. Wang, T., Martínez-Romero, J., & López, I. (2001). *Rhizobium* y su destacada simbiosis con plantas. En E. Martínez-Romero & J. Martínez-Romero (Eds.), *Microbios* (pp. 344–386). México: UNAM.