UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA

Facultad de Ingeniería, Ciencias y Administración
Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales
Instituto de Agroindustria

DIVERSIDAD GENÉTICA, TOLERANCIA A LA ACIDEZ Y EFECTIVIDAD SIMBIÓTICA DE CEPAS NATURALIZADAS DE *Sinorhizobium meliloti* EN SUELOS DE LA ZONA CENTRO-SUR DE CHILE.

TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADEMICO DE DOCTOR EN CIENCIAS DE RECURSOS NATURALES

HOWARD PATRICIO LANGER ULLOA

TEMUCO – CHILE
2007

“Diversidad genética, tolerancia a la acidez y efectividad simbiótica de cepas naturalizadas de *Sinorhizobium meliloti* en suelos de la zona centro-sur de Chile.”

Esta tesis fue realizada bajo la supervisión del Director de Tesis, Dr. FERNANDO BORIE BORIE, del Departamento de Ciencias Químicas y ha sido aprobada por los miembros de la comisión examinadora.

HOWARD PATRICIO LANGER ULLOA

Dr. FERNANDO BORIE B.

DIRECTOR PROGRAMA DE POSTGRADO EN CIENCIAS DE RECURSOS NATURALES

Dr. HELLMUTH LEAL L.

Dr. ROBERTO GODOY B.

DIRECCIÓN DE POSTGRADO UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA

Dr. IVAN VIDAL P.

Dr. HUGO ZUNINO V.

Esta tesis está dedicada a
la memoria de mi abuelo
Antonio Ulloa Flood

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más profunda gratitud con todas aquellas personas que me ayudaron y me acompañaron durante el doctorado.

En primer lugar, agradezco a mi profesor guía, Dr. Fernando Borie quien me entregó todo su apoyo y confianza a lo largo de todos estos años y que constituyó un aporte fundamental para la realización de esta tesis. Agradezco a la Dra. María de la Luz Mora, Directora del Programa, por haberme dado la confianza de aceptar mi ingreso al Programa y por alentarme a trabajar y esforzarme para ser un mejor profesional.

Hago extensivo este agradecimiento al Dr. Horacio Urzúa, quien me guió en los primeros pasos de esta Tesis, por compartir sus amplios conocimientos y experiencia y por ayudarme a planificar el proyecto que hoy termina. Al Dr. Itilier Salazar por su gran amistad y por alentarme a ingresar al Programa de Doctorado.

También quisiera agradecer a los profesores del Programa de Doctorado, especialmente al Dr. Juan Luis Rouanet, quienes me entregaron sus conocimientos y experiencia que, sin duda, contribuyeron significativamente a mi formación profesional y humana. También agradezco a mis compañeros, por brindarme su amistad, una útil metodología o un sabio consejo.

A los miembros del Centre for *Rhizobium* Studies, especialmente al Dr. John Howieson y la Dra. Kemanthie Nandasena quienes me apoyaron inmensamente durante mi estadía de investigación, a Ron, Wayne, Lambert, Jason, Heidi y Ertug por su amistad y apoyo.

También agradezco al personal del Departamento de Ciencias Químicas y del Instituto de Agroindustria, su personal técnico, secretarias y auxiliares. Agradezco de manera especial a Ana Videla, Lorena Leal y Fresia Cantero, por su infinita paciencia y constante ayuda y preocupación.

Agradezco a los proyectos Fundación Andes C-13755(28) y DIUFRO 160602, por el financiamiento y recursos aportados para el desarrollo de esta Tesis y la Estadía de Investigación.

Le doy gracias a Dios por haberme iluminado, por brindarme salud y la fuerza necesaria para alcanzar este importante hito.

Finalmente, quisiera agradecer de manera muy especial a Mara, mis padres y mis hermanos por haber estado siempre conmigo y alentado a seguir adelante. Su amor, comprensión y apoyo son invaluables para mí.

RESUMEN

La alfalfa es una leguminosa forrajera perenne que tiene un excelente valor nutritivo, elevada digestibilidad y alta producción de biomasa. Esta especie contribuye a la incorporación de N en los sistemas pratenses, ayudando a reducir la aplicación de fertilizantes sintéticos. Esta especie forma simbiosis con *Sinorhizobium meliloti*, la cual es responsable de suministrar la mayor parte del N requerido por esta planta para su crecimiento. Sin embargo, esta simbiosis es altamente sensible a los efectos producidos por la acidez del suelo, la que reduce la sobrevivencia de los rizobios y la nodulación en las raíces de las plantas, traduciéndose en una reducción de la productividad y persistencia de la pradera.

Dado que la alfalfa se establece mayoritariamente en suelos ácidos (pH<5,5) de la zona centro-sur de Chile, se plantea como hipótesis que la presencia de una población genéticamente diversa de rizobios asociados a alfalfa, permitirá seleccionar cepas simbióticamente eficientes y tolerantes a la acidez, las cuales establecerán una simbiosis efectiva con alfalfa en suelos moderadamente ácidos. El objetivo del presente estudio consistió en evaluar la diversidad genética y el grado de tolerancia a la acidez de cepas naturalizadas de *S. meliloti* y su efecto sobre la fijación simbiótica de N en alfalfa, bajo condiciones moderadas de acidez.

El número de rizobios fue afectado por la acidez del suelo. Así, praderas recientemente establecidas donde se observaron mayores niveles de pH, presentaron un mayor número de rizobios. También se observó que la acidez redujo significativamente el crecimiento *in vitro* de las cepas naturalizadas de *S. meliloti*, observándose una respuesta diferencial en las cepas sometidas a niveles de pH entre 5,0 y 5,5. Por su parte, un incremento de la concentración celular inicial de los rizobios indujo un mayor crecimiento de las colonias incluso bajo condiciones de elevada acidez (pH 5,0).

El estudio de la identidad genética basado en la identificación y amplificación parcial del gen 16S rDNA reveló que las cepas naturalizadas correspondieron en su totalidad a la especie *Sinorhizobium meliloti*. Se observó una alta diversidad genética entre las cepas aisladas así como una relación entre ésta y el pH. Suelos con mayores valores de pH mostraron una menor diversidad a diferencia de suelos más ácidos que presentaron una mayor diversidad.

El estudio de la efectividad simbiótica mostró que la acidez del suelo redujo significativamente la nodulación, contenido de materia seca y capacidad simbiótica en alfalfa inoculada con cepas de *S. meliloti*, siendo la magnitud de dicha reducción dependiente del cultivar de alfalfa y el nivel de acidez. Sin embargo, la existencia de algunas cepas naturalizadas (por ej. NS11) con un adecuado potencial de fijación de N_2 bajo condiciones de moderada acidez, sugiere su posible utilidad como inoculante de la alfalfa en suelos de la zona centro-sur donde la acidez constituye el factor limitante.

Respecto del efecto de Al sobre los cultivares de alfalfa estudiados se observó que un incremento en la concentración de Al en solución disminuyó el contenido de materia seca tanto en la parte aérea como radical en alfalfa, así como una acumulación de Al a nivel radical, la cual fue dependiente del pH.

Los cultivares de alfalfa respondieron al estrés por Al a través de un aumento de la exudación de ácidos orgánicos como citrato y succinato. No obstante, de acuerdo a la especiación química realizada sólo citrato fue capaz de complejar Al.

El mayor contenido de P y Al en raíces de plantas de alfalfa sometidas a Al sugieren la existencia de un mecanismo de exclusión basado en la precipitación de Al con P a nivel radical.

SUMMARY

Alfalfa is a perennial forage legume that has excellent nutritional value, high digestibility and a high biomass yield. This species contributes to the incorporation of N in pasture systems, helping to reduce the application of synthetic fertilizers. This species forms a symbiotic association with *Sinorhizobium meliloti* which is responsible for supply most of the N required for plant growth. However, this symbiosis is highly sensitive to soil acidity factors, which decreases rhizobia survival and plant nodulation, leading to a reduction in the productivity and persistence of the pasture.

Due to the alfalfa is mostly established in acidic soils (pH<5.5) in central-southern Chile, the present hypothesis suggest that the presence of a wide and genetically diverse population of alfalfa-associated rhizobia, will eventually lead to the selection of acid-tolerant rhizobia which might establish an effective symbiosis with alfalfa in moderately acid soils. The major aim of this work was to assess the genetic diversity and the acid tolerance of naturalized *S. meliloti* strains associated to alfalfa and their effect on the symbiotic N_2-fixation with alfalfa under moderately acidic conditions.

Rhizobial numbers were affected by soil acidity. Thus, pastures recently established showed higher pH levels and rhizobial counts. The acidity also reduced the growth *in vitro* of naturalized *S. meliloti* strains which showed a differential response among isolates when pH varied from 5.0 to 5.5. By the other hand, higher cell concentration of rhizobia leads to a higher colony growth in plates even under highly acidic conditions (pH 5.0).

The genetic identity of isolates based on the identification and partial sequencing of 16S rDNA gene revealed that naturalized strains belonged to *Sinorhizobium meliloti*. It was observed a high genetic diversity among isolates and a relationship with soil pH. Soils with higher pH levels showed a low diversity compared to the higher genetic diversity observed in the more acidic soils.

Assessment of symbiotic effectiveness of rhizobia showed that soil acidity reduced significantly the nodulation, dry matter yield and symbiotic capacity in alfalfa inoculated with *S. meliloti*. The reduction in symbiotic parameters depended on the alfalfa cultivar and acidity level. However, some naturalized strains (i.e. NS11) with an adequate N_2-fixing potential, suggest to be suitable as an inoculant for alfalfa in acidic soils of central-southern Chile, where the acidity constitutes the major constraint for plant growth.

In relation to the effect of Al in alfalfa cultivars, an increase in the concentration of Al in nutrient solutions reduced the dry matter content in both shoots and roots, but increased the Al levels in roots. In both cases, the magnitude of this effect depend on the pH level.

Alfalfa cultivars responded to Al by an increase of the exudation of organic acids as citrate and succinate. However, results from chemical speciation indicates that only citrate was capable to complex Al.

Higher contents of P and Al in roots of alfalfa plants exposed to Al suggest the existence of an exclusion mechanism of Al based on its precipitation with P in roots.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN 1

1.1. Antecedentes Generales 1

1.2. Hipótesis de Trabajo 3

1.3. Objetivos 4

1.3.1. General 4

1.3.2 Específicos 4

2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS 5

2.1 La simbiosis *Rhizobium*-leguminosa 5

2.1.1 Leguminosas y su importancia en la agricultura 5

2.1.2 Alfalfa 6

2.1.3 *Rhizobium* 6

2.1.4 Género *Sinorhizobium* 7

2.2 La diversidad de rizobios y su importancia en la agricultura 8

2.3 Métodos utilizados para el estudio de la diversidad de *Rhizobium* 9

2.4 Aplicación de métodos basados en biología molecular en estudios de diversidad y taxonomía de rizobios 9

2.5 Métodos utilizados para el estudio de la efectividad simbiótica en rizobios 11

2.6 La acidez del suelo: Implicancias para la agricultura 12

2.7 Factores que afectan el crecimiento de *Rhizobium* 15

2.7.1 Efecto de la acidez en la simbiosis 16

2.7.2 Tolerancia a acidez en *Rhizobium* 17

2.7.3 Toxicidad por Al en plantas 18

2.8 Mecanismos de resistencia a Al en plantas superiores 20

2.9 Estrategias para mejorar la productividad de la simbiosis 22

2.10 Contribución de la planta y el rizobio a la tolerancia a acidez durante la nodulación 23

2.11 Utilización de cepas nativas en suelos: Experiencias y Proyecciones 24

3. MATERIALES Y MÉTODOS 26

3.1. Muestreo y aislamiento de rizobios 26

3.2 Poblaciones de rizobios en suelos 26

3.3 Identificación molecular de aislados mediante amplificación del gen 16S rDNA 28

3.4 Identificación molecular mediante secuenciación parcial del gen 16S rDNA 30

3.5 Diversidad genética en aislados de *S. meliloti* 31

3.6 Tolerancia a la acidez en cepas de *S. meliloti* 31

3.7 Amplificación del gen sensor-regulador *fsr*R 32

3.8 Efectividad simbiótica en cepas de *S. meliloti* 33

3.8.1 Diseño experimental 33

3.8.2 Condiciones de crecimiento en cepas y plantas 34

3.8.3 Evaluaciones 35

3.9 Efecto de Al en el contenido de materia seca y la exudación de ácidos orgánicos en *M. sativa* 36

3.9.1 Diseño experimental 36

3.9.2 Condiciones de crecimiento 36

3.9.3 Colección y análisis de los exudados radicales 37

3.9.4 Especiación química de la solución nutritiva 38

3.9.5 Peso seco y análisis químico de las plantas 38

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 39

4.1 Muestreo y aislamiento de rizobios 39

4.2 Poblaciones de rizobios en suelos 41

4.3 Autenticación de las cepas 43

4.4 Identificación molecular mediante amplificación del gen 16S rDNA 44

4.5 Identificación molecular mediante secuenciación parcial del gen 16S rDNA 45

4.6 Diversidad genética de aislados de *S. meliloti* 46

4.7 Tolerancia a la acidez en cepas de *S. meliloti* 50

4.8 Amplificación del gen *fsr*R como posible mecanismo de tolerancia a la acidez en *S. meliloti* 51

4.9 Efectividad simbiótica en cepas de *S. meliloti* 52

4.10 Efecto de Al sobre el contenido de materia seca y la exudación de ácidos orgánicos en *M. sativa* 55

5. CONCLUSIONES 66

6. PROYECCIONES 68

7. REFERENCIAS 69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Contenido	Página
1	Recuento de rizobios mediante el método de diluciones seriadas combinado con una técnica de inoculación en planta (Brockwell 1963)	27
2	Disposición de diluciones celulares en placas para ensayo de tolerancia a acidez	32
3	Morfología de (a) nódulos de *M. sativa* y (b) cepa *S. meliloti* NS21 aislada en placas conteniendo medio agar YEM-rojo Congo	40
4	Morfología de cepas naturalizadas de *S. meliloti* aisladas desde suelos de la zona centro-sur de Chile, mostrando (a) bajo y (b, c) alto nivel de producción de exopolisacáridos	41
5	Relación entre el pH del suelo y las poblaciones de rizobios asociadas a *M. sativa* en suelos ácidos de la zona centro-sur de Chile	42
6	Amplificación del gen 16S rDNA mediante partidores 16SmWr F913 y 16SmWr R1330 en cepas naturalizadas de rizobios asociados a *M. sativa* en suelos ácidos de la zona centro-sur de Chile	44
7	Amplificación por PCR de ADN genómico mediante diferentes combinaciones de partidores en cepas NS4 (columnas 1-4) y NS26 (columnas 5-8)	45
8	Relaciones genéticas entre cepas de *S. meliloti* aisladas de suelos ácidos de la zona centro-sur de Chile, mediante PCR-*fingerprinting* con el partidor RPO1	47
9	Efecto de Al sobre la acumulación de materia seca (g MS maceta^{-1}) en la parte aérea y radical de cuatro cultivares de *M. sativa* en solución nutritiva a dos niveles de pH	56

10	Efecto de la concentración de Al sobre la exudación de citrato (µmol g^{-1} MS raíz h^{-1}) en cuatro cultivares de *M. sativa* en solución nutritiva a pH 4,5	59
11	Efecto de la concentración de Al sobre la exudación de succinato (µmol g^{-1} MS raíz h^{-1}) en cuatro cultivares de *M. sativa* en solución nutritiva a pH 4,5	60
12	Concentración de citrato (µmol L^{-1}) en solución nutritiva a pH 4,5 en cuatro cultivares de *M. sativa* sometidos a diferentes niveles de Al	61
13	Concentración de citrato (µmol L^{-1}) en solución nutritiva a pH 6,0 en cuatro cultivares de *M. sativa* sometidos a diferentes niveles de Al	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Contenido	Página
1	Reacciones de equilibrio de Al a 25ºC	14
2	Partidores utilizados para identificación molecular de *S. meliloti* y *S. medicae,* mediante amplificación del gen 16S rDNA por PCR	29
3	Partidores utilizados en la amplificación por PCR del gen 16S rDNA en cepas NS4 y NS26	30
4	Buffers utilizados en el presente estudio	32
5	Propiedades físicas y químicas del suelo utilizado en ensayo de invernadero	34
6	Características de los suelos establecidos con *M. sativa*	39
7	Efecto de la acidez sobre el crecimiento de cepas naturalizadas de *Sinorhizobium meliloti* en medio YMA a diferentes concentraciones celulares	50
8	Efecto de la inoculación con cepas naturalizadas de *S. meliloti* y cepas de referencia sobre la nodulación, producción de materia seca y capacidad simbiótica en *M. sativa* cv. Sceptre en suelo Merredin a dos niveles de pH en condiciones de invernadero	52
9	Contenido de P (%) y Al (mg kg^{-1}) en la parte aérea y radical en cuatro cultivares de *M. sativa* sometidos a estrés por Al en solución nutritiva a pH 4,5 y 6,0	57
10	Distribución porcentual de especies de Al en solución nutritiva y su interacción con la exudación de citrato desde raíces de *M. sativa* de acuerdo a la especiación realizada mediante el programa GEOCHEM	63

11 Reducción relativa del crecimiento, expresada como porcentaje respecto del control sin Al, en plantas de *M. sativa* sometidas a estrés por Al en solución nutritiva a pH 4,5 y 6,0 64

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes Generales

La alfalfa (*Medicago sativa* L.) es una leguminosa forrajera perenne que presenta un elevado valor nutritivo, excelente palatabilidad y digestibilidad. También contribuye a la incorporación de nitrógeno (N) en los agroecosistemas ganaderos, con un consecuente beneficio tanto económico como ambiental (Campillo *et al.*, 2003; Jensen y Hauggaard-Nielsen, 2003), ya que permite reducir significativamente la aplicación de fertilizantes sintéticos.

Esta especie forma una asociación simbiótica con *Sinorhizobium meliloti* [(Dangeard 1926) De Lajudie *et al***.** 1994, comb. nov.], el cual es responsable de entregar la mayor parte del N que la planta necesita. Sin embargo, ambas especies son muy sensibles a la acidez y especialmente a Al en solución (Howieson *et al.*, 1992; Segundo *et al.*, 1999), lo cual incide en una menor fijación de N_2 y una disminución en la productividad y persistencia de la pradera (Cheng *et al.*, 2002).

En el centro-sur de Chile, las praderas destinadas a la producción de carne y leche son establecidas mayoritariamente en suelos ácidos derivados de cenizas volcánicas (pH≤5,5). Dichos suelos se caracterizan por poseer características tales como alto contenido de materia orgánica, elevados niveles de Al y Mn extractable y baja disponibilidad de P, Ca y Mg. Bajo esas condiciones, la efectividad de la simbiosis depende de la capacidad del rizobio de sobrevivir, competir con la biota del suelo y fijar N_2.

Debido a que la acidez del suelo representa una de las principales limitantes para el establecimiento de la alfalfa en el centro-sur de Chile, la corrección de la acidez mediante la aplicación de enmiendas calcáreas en cobertera constituye la alternativa económicamente más viable (Scott *et al.*, 2001; Mora *et al.*, 2002). Sin embargo, ésta generalmente no tiene un mayor efecto en reducir la acidez del subsuelo, lo cual es requerido para asegurar una adecuada fijación de N_2 por parte del cultivo (Evans *et al.*, 2005a). Si bien es cierto, diversos estudios han demostrado que la aplicación de yeso en cobertera permitiría incrementar el

contenido de Ca del subsuelo y así mejorar la sobrevivencia de los rizobios en suelos ácidos, esta práctica no es considerada actualmente dentro del manejo de la alfalfa en nuestro país. En este sentido, una estrategia promisoria que permitiría mejorar la efectividad de la simbiosis en suelos ácidos la constituye la selección de cepas con características mejoradas tales como: alto potencial de fijación de N_2, capacidad de sobrevivir en el suelo bajo condiciones de estrés y gran habilidad competitiva (Segundo *et al.*, 1999; O'Hara *et al.*, 2002; Hardarson y Atkins, 2003).

El presente estudio se fundamenta en el bajo conocimiento que existe sobre la diversidad genética, tolerancia a la acidez y efectividad simbiótica de las poblaciones naturalizadas de rizobios asociadas a alfalfa en suelos de Chile, conocimiento que resulta esencial a la hora de diseñar posibles estrategias para mejorar la productividad y persistencia de la alfalfa en este tipo de suelos.

1.2. Hipótesis de Trabajo

En los suelos de la zona centro-sur de Chile, la presencia de una población genéticamente diversa de rizobios asociados a alfalfa, permitirá seleccionar cepas eficientes y tolerantes a la acidez, las cuales establecerán una interacción simbiótica productiva con alfalfa bajo condiciones de acidez moderada.

Un aumento en la concentración de Al en la solución del suelo disminuirá el rendimiento de materia seca tanto de la parte aérea como radical en plantas de alfalfa, actualmente cultivadas en la zona centro-sur, especialmente bajo condiciones de alta acidez (pH 4,5). Dicha respuesta será dependiente de la concentración de Al y el cultivar de alfalfa. Las plantas responderán al estrés por Al mediante la exudación de ácidos orgánicos así como la precipitación de Al con P en raíces, lo que permitirá reducir los efectos tóxicos de Al.

1.3. Objetivos

1.3.1. General

- Evaluar la diversidad genética y el grado de tolerancia a la acidez de cepas naturalizadas de *S. meliloti* asociadas a alfalfa sobre la fijación simbiótica de nitrógeno en *M. sativa*, bajo condiciones moderadas de acidez.

1.3.2 Específicos

- Evaluar el efecto de la acidez sobre el número de rizobios asociados a alfalfa en suelos de la IX y X regiones.

- Evaluar el efecto de la acidez y la concentración celular inicial sobre el crecimiento de cepas de rizobios naturalizados, aislados a partir de plantas de alfalfa noduladas presentes en suelos de la IX y X regiones.

- Determinar la identidad genética de las cepas mediante la identificación y la secuenciación parcial del gen 16S rDNA y su diversidad genética mediante el uso de PCR-*fingerprinting*.

- Evaluar la aplicación de técnicas moleculares como una herramienta para diagnosticar el grado de tolerancia de *S. meliloti* a la acidez (gen *fsr*R).

- Evaluar el efecto de la concentración de Al y el pH sobre el rendimiento de materia seca en cuatro cultivares de alfalfa y posibles mecanismos asociados a la tolerancia a este elemento en solución nutritiva.

- Seleccionar cepas tolerantes a la acidez y evaluar su capacidad de establecer una simbiosis efectiva con alfalfa bajo diferentes condiciones de acidez.

2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1 La simbiosis *Rhizobium*-leguminosa

2.1.1 Leguminosas y su importancia en la agricultura

Las leguminosas corresponden a un gran número de especies pertenecientes a la familia *Leguminosae* la cual contiene aproximadamente 18.000 especies, que se dividen en tres subfamilias: *Mimosoideae*, *Caesalpinioideae* y *Papilionoideae* (Royal Botanic Gardens, 2007). Las leguminosas presentan una amplia distribución geográfica y se utilizan como fuente de alimento y forraje. Muchas leguminosas tienen la habilidad de formar nódulos fijadores de N_2 con ciertas bacterias de suelo, llamadas comúnmente rizobios, las cuales contribuyen a la Fijación Simbiótica de Nitrógeno (FSN). Esta asociación simbiótica es más común en las subfamilias *Papilionoideae* y *Mimosoideae*, mientras que sólo algunos miembros de *Caesalpinioideae* pueden formar esta simbiosis.

La asociación simbiótica entre rizobio y leguminosa juega un rol importante en la productividad agrícola mundial, ya que fija anualmente 120 millones de toneladas de N_2 atmosférico en amonio (Freiberg *et al.*, 1997). Las leguminosas y sus rizobios son utilizados en los agroecosistemas con el fin de mejorar la fertilidad del suelo y diversificar los sistemas productivos (Sessitsch *et al.*, 2002).

Las especies leguminosas de importancia agrícola pueden incluirse dentro de dos categorías: leguminosas de grano (anuales y oleaginosas) y leguminosas forrajeras. Mientras que las leguminosas de grano entregan elevados niveles de proteínas, tanto las leguminosas de grano como las forrajeras además de constituir un alimento de alta calidad en alimentación animal, incrementan el contenido de N del suelo, mejoran su estructura en aspectos tales como porosidad, estabilidad de agregados y retención de agua, rompe el ciclo de enfermedades y ayudan al control de malezas (Howieson, 1999; Marenco y Bastos, 1999). Adicionalmente, las forrajeras perennes de raíces profundas como la alfalfa, permiten controlar el nivel de la napas freáticas, evitando la aparición de salinidad secundaria (Howieson *et al.*, 2000c).

2.1.2 Alfalfa

La alfalfa (*Medicago sativa* L.) es una especie de la tribu *Trifolieae*, perteneciente a la subfamilia *Papilionoideae*. Dentro de las leguminosas forrajeras, ésta destaca por poseer un alto potencial productivo, alta palatabilidad y digestibilidad. Además, ésta es probablemente una de las especies forrajeras más utilizadas en la agricultura. En nuestro país, la alfalfa presenta una amplia distribución, encontrándosela asociada a sistemas de producción ganaderos de carne y leche, especialmente de la zona centro-sur donde se utiliza tanto en pastoreo directo como *soiling* (Ruiz, 1996).

2.1.3 *Rhizobium*

Las bacterias fijadoras de N_2, conocidas colectivamente como rizobios, son microsimbiontes facultativos que pueden infectar las raíces de la mayoría de las leguminosas y así reducir el N_2 atmosférico en N utilizable para la planta (Sessitsch *et al.*, 2002) a través de la acción de la enzima nitrogenasa. Estas bacterias son consideradas de gran importancia por su capacidad de fijar N_2 en asociación con las leguminosas. Los rizobios son bacterias Gram negativas, móviles, cilíndricas, pudiendo presentar polimorfismo bajo condiciones de estrés. Son aeróbicas y poseen un mecanismo respiratorio donde el oxígeno actúa como aceptor final de electrones. También pueden utilizar una amplia gama de compuestos orgánicos (carbohidratos, azúcares, aminoácidos, etc.) como fuente de C.

Esta simbiosis es de gran importancia en el flujo global de N_2 atmosférico fijado a la forma de amonio, nitratos y compuestos orgánicos (Kahindi *et al.*, 1997). En presencia de su hospedero, los rizobios pueden formar nódulos radicales, que corresponden a estructuras especializadas donde el N_2 molecular es reducido a amonio.

Existen 44 especies de bacterias fijadoras de N_2 distribuidas en 12 géneros principalmente en la clase α-proteobacteria (Sawada *et al.*, 2003). También se ha reportado la nodulación de leguminosas por especies de la clase β-proteobacteria, las cuales incluyen los géneros *Burkholderia* y *Wautersia*, pertenecientes a la familia *Burkholderiaceae* (Sawada *et al.*, 2003). Las bacterias fijadoras de N_2 en α-proteobacteria comprenden cinco familias: *Rhizobiaceae* (que incluye los géneros *Allorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*), *Phyllobacteriaceae* (que

incluye el género *Mesorhizobium*), *Bradyrhizobiaceae* (con el género *Bradyrhizobium*), *Hyphomicrobiaceae* (que incluyen los géneros *Azorhizobium* y *Devosia*) y *Methylobacteriaceae* (género *Methylobacterium*), según lo indicado por los análisis de secuencia de genes 16S rDNA (Sawada *et al.*, 2003).

2.1.4 Género *Sinorhizobium*

El género *Sinorhizobium* fue originalmente propuesto para los rizobios de crecimiento rápido (*R. fredii*) aislados a partir de raíces de soya (*Glycine max* L. Merr*)* (Chen *et al.*, 1988). Sin embargo, dicha proposición fue rechazada debido a que las secuencias de genes 16S rDNA indicaban que esa especie se encontraba estrechamente relacionada a *R. meliloti* (Jarvis *et al.*, 1992). Posteriormente, se concluyó que *R. meliloti* debía ser incluido en el género *Sinorhizobium* (*S. meliloti*) al igual que *R. fredii* (*S. fredii*), así como dos nuevas especies aisladas desde suelos de Senegal, *Sinorhizobium teranga* y *Sinorhizobium saheli* (de Lajudie *et al.*, 1994). Posteriormente, una nueva especie fue descrita dentro de este género, *S. medicae* (Rome *et al.*, 1996), el cual es denominado el tipo B de *S. meliloti*. Recientemente, se ha reportado que los géneros *Sinorhizobium* y *Ensifer* corresponden a un mismo taxón. Por lo tanto, dado que *Ensifer* fue el primer sinónimo heterotípico, debe tomar prioridad, lo que significa que las especies de *Sinorhizobium* spp. deben ser renombradas como *Ensifer* spp (Young *et al.*, 2003).

Simbióticamente, tanto *S. meliloti* como *S. medicae* son capaces de nodular raíces de alfalfa. A nivel molecular, tanto el gen *lpi*A, el cual confiere tolerancia a la acidez como su regulador, *fsr*R, están presentes en *S. medicae*, mientras que sólo el gen *lpi*A está presente en *S. meliloti* (Reeve *et al.*, 2006). Entre los rizobios de crecimiento rápido, *Sinorhizobium* es considerado el género más sensible a la acidez (Dilworth *et al.*, 2000).

2.2 La diversidad de rizobios y su importancia en la agricultura

Las cepas de rizobios que habitan en el suelo pueden ser diversos tanto en términos simbióticos como en sus características genéticas y fenotípicas (McInnes *et al.*, 2004).

Desde principios del siglo XX, ha existido conciencia de la presencia de cepas de rizobios nativos en el suelo que limitan la nodulación de las leguminosas por los inoculantes comerciales. Las poblaciones de rizobios presentes en un suelo puede variar entre <10-10^7 rizobios g^{-1} suelo (Bottomley, 1992). Existen diversas condiciones de estrés que pueden reducir el número de rizobios en un suelo. Estos factores son mayormente abióticos, entre los que se encuentran la acidez (pH<5,0) o alcalinidad (pH>8,5), bajo contenido de arcilla (<15 %) y baja capacidad de intercambio catiónico (<10 meq 100 g^{-1}). Otros factores de estrés secundario son la aridez (combinación de baja pluviometría con una baja capacidad de retención de agua), alta concentración de N, salinidad y temperaturas extremas (Howieson y Ballard, 2004). El historial de manejo también puede afectar el tamaño de la población existente (Brockwell y Bottomley, 1995).

La diversidad de rizobios en muchos suelos agrícolas puede estar restringida a una diversidad intra-específica debido al monocultivo de la misma especie leguminosa sobre un largo período de tiempo (Howieson y Ballard, 2004). Sin embargo, aquellos suelos de ambientes no intervenidos pueden contener un amplio rango de leguminosas que soportan una amplia diversidad de rizobios. Odee *et al*. (2002) aisló rizobios de los géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Bradyrhizobium* desde un suelo de Kenya donde no se había reportado la presencia de leguminosas introducidas.

La determinación de la diversidad de rizobios de un suelo puede verse afectada por el método usado para aislar el rizobio. La diversidad determinada a través de potes trampa sólo considerará aquella diversidad de rizobios capaz de nodular dicho hospedero y no la diversidad total de rizobios residentes. Es así como se han desarrollado diversos métodos para aislar rizobios directamente del suelo (Tong y Sadowsky, 1994; Bromfield *et al.*, 1995). La evaluación de la diversidad genética es fuertemente afectada por el método usado para

discriminar entre cepas (McInnes *et al.*, 2004). Es así como el poder de discriminación de los diversos métodos puede conducir a diferentes resultados de diversidad para un mismo sitio (Bottomley, 1992). A nivel edáfico, factores tales como el pH, influenciarán el grado de variación genética de las poblaciones de rizobios (Harrison *et al.*, 1989; Laranjo *et al.*, 2002). En la actualidad existe un gran número de técnicas usadas para evaluar la diversidad en rizobios, las cuales son analizadas brevemente.

2.3 Métodos utilizados para el estudio de la diversidad de *Rhizobium*

Los estudios taxonómicos y filogenéticos son necesarios para estructurar la biodiversidad de los rizobios presentes en el suelo. La correcta identificación de un microorganismo, de acuerdo con sus relaciones filogenéticas ayuda a predecir sus propiedades genotípicas y fenotípicas para cada especie. Asimismo, el análisis de la diversidad en rizobios es importante ya que permite develar las complejas relaciones ecológicas y evolutivas, predecir el comportamiento de los inoculantes comerciales y seleccionar cepas mejor adaptadas a distintos tipos de estrés ambiental, lo que contribuirá a mejorar la eficiencia simbiótica de la asociación leguminosa-rizobio. Es importante destacar que a la fecha sólo se han identificado unos 50 simbiontes de un total de 750 géneros de leguminosas (Sy *et al.*, 2001).

2.4 Aplicación de métodos basados en biología molecular en estudios de diversidad y taxonomía de rizobios

Previo a la aparición de los métodos moleculares, los estudios de diversidad estaban basados principalmente en función de características fenotípicas tales como rango de hospedero, crecimiento en medios de cultivo, relaciones serológicas, análisis de isoenzimas, proteínas totales (SDS-PAGE), pirólisis, producción de bacteriocinas, resistencia intrínseca a antibióticos y resistencia a bacteriófagos. Posteriormente, métodos tales como la utilización de sustratos, perfiles proteicos, electroforesis de enzimas (MLEE) y perfiles lipídicos (FAMEs) mostraron su utilidad en estudios de diversidad en rizobios. A pesar de que los métodos fenotípicos fueron útiles para analizar la diversidad de cepas y la estructura de las comunidades de rizobios, éstos poseían un bajo poder resolutivo comparado a los métodos

moleculares (Barnet, 1991). Los métodos fenotípicos pueden variar según sean las condiciones de cultivo y el estado fisiológico de las bacterias al momento del ensayo (van Rossum *et al.*, 1995). Mediante la utilización de los métodos moleculares basados en el estudio del genoma bacteriano, se puede contar con una gran cantidad de datos, fácilmente reproducibles y generados sin la influencia de factores tales como las condiciones de cultivo o el estado fisiológico, entre otros.

Las técnicas moleculares confieren un mayor grado de sensibilidad respecto de las técnicas convencionales (Babalola, 2003). Un aspecto práctico de estas metodologías lo constituye la redefinición de la taxonomía de los rizobios, la cual se basa en la capacidad de la cepa de inocular una determinada especie de leguminosa, de acuerdo con los llamados "grupos de inoculación cruzada" (Baldwin y Fred, 1929), la cual fue finalmente abandonada debido al alto número de excepciones dentro de estos grupos (Graham, 1964). Posteriormente, se demostró que los genes responsables de la nodulación, especificidad del hospedero y FSN en rizobios de crecimiento rápido están codificados en plásmidos simbióticos los cuales pueden ser transmitidos entre las diferentes especies (Prakash *et al.*, 1981). De acuerdo con esta clasificación inicial fueron reconocidas seis especies: *Rhizobium leguminosarum* (nodula *Lathyrus*, *Pisum*, *Vicia* y *Lens*), *R. trifolii* (*Trifolium*), *R. phaseoli* (*Phaseolus*), *R. meliloti* (*Melilotus*, *Medicago* y *Trigonella*), *R. japonicum* (*Glycine max*) y *R. lupini* (*Lupinus*).

La taxonomía de las bacterias fijadoras de N_2 ha sufrido una significativa revisión producto de la utilización de los métodos moleculares de análisis filogenéticos (Young, 1994).

Los métodos moleculares usados en los estudios de diversidad se han constituido en una herramienta útil en el estudio de una amplia variedad de rizobios asociados a *Phaseolus* spp. (Grange y Hungria, 2004), alfalfa (Gandee *et al.*, 1999; Carelli *et al.*, 2000; Roumiantseva *et al.*, 2002), *Medicago* (Jebara *et al.*, 2001), *Hedysarum* (Kishinevsky *et al.*, 2003) y *Leucaena* (Wang *et al.*, 1999), ya que ha estimulado el desarrollo de métodos rápidos y simples para caracterizar las poblaciones de microorganismos, los cuales son necesarios para determinar la diversidad genética de las comunidades de rizobios del suelo, ya que son éstas las que pueden ofrecer alternativas como inoculantes mejorados (del Papa *et al.*, 1999; Carelli *et al.*, 2000;

Slattery y Pearce, 2002).

Los métodos genotípicos más usados actualmente en los estudios de diversidad en rizobios son los perfiles de plásmidos (Wernegreen *et al.*, 1997), polimorfismo de los fragmentos de restricción de ADN (RFLP) (Bromfield *et al.*, 1995; Odee *et al.*, 2002; Grange y Hungria, 2004), perfiles de lipopolisacáridos (Wegener *et al.*, 2001) y técnicas basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, Polymerase Chain Reaction) (Richardson *et al.*, 1995; Gandee *et al.*, 1999; Laranjo *et al.*, 2002; Vachot-Griffin y Thies, 2005). Dentro de estas últimas, la comparación de secuencias de los genes 16S rDNA se ha utilizado exitosamente para evaluar las relaciones filogenéticas entre las diferentes especies de rizobios (Kishinevsky *et al.*, 2003; Young *et al.*, 2004). La región que codifica estos genes es altamente conservada entre las bacterias y al mismo tiempo, lo suficientemente variable y con la suficiente información como para revelar eficazmente las relaciones filogenéticas entre las distintas especies (Willems y Collins, 1993). Por otra parte, los métodos basados en PCR mediante el uso de partidores aleatorios (RAPD, Random Amplified Polymorphic DNA) o dirigidos (DAPD, Directed Amplified Polymorphic DNA), han sido exitosamente usados para estudiar la estructura genética en varias especies de rizobios (Carelli *et al.*, 2000; Thies *et al.*, 2001). Entre estos últimos, el partidor *nif* RPO1 se lo ha descrito como un partidor adecuado para el estudio de la diversidad genética en rizobios (Richardson *et al.*, 1995), el cual incluye un promotor con una secuencia consenso altamente conservada y reiterada en genomas bacterianos (Schofield y Watson, 1985). Recientemente, el uso del partidor RPO1 ha permitido la caracterización genética de los principales inoculantes comerciales utilizados en Australia (Vachot-Griffin y Thies, 2005).

2.5 Métodos utilizados para el estudio de la efectividad simbiótica en rizobios

La efectividad simbiótica puede ser definida como la capacidad del rizobio de asociarse a la planta, a través de la formación de nódulos y fijar N_2 atmosférico. La capacidad simbiótica de las cepas puede determinarse mediante la medición de parámetros como contenido de N, acumulación de materia seca (MS), nodulación y reducción de acetileno a etileno (medida indirecta de la fijación de N_2).

2.6 La acidez del suelo: Implicancias para la agricultura

Los suelos derivados de cenizas volcánicas ocupan en Chile una superficie de $4{,}89 \times 10^6$ ha (Santander et al., 1993), lo que constituye entre el 50 al 60 % de los suelos arables del país (Besoaín, 1985). Dentro de éstos, los Andisoles, suelos derivados de cenizas volcánicas recientes, presentan propiedades físicas adecuadas tales como baja densidad aparente y elevada capacidad de retención de agua, lo cual favorece el establecimiento de una gran variedad de cultivos anuales y perennes. Sin embargo, su productividad se ve afectada por algunas propiedades químicas como bajo pH, baja suma de bases, alto contenido de alofán, altos niveles de Al de intercambio y elevado poder de fijación de P.

El alofán corresponde a alumino-silicatos asociados a suelos derivados de cenizas volcánicas y vítreos. Son arcillas de bajo grado de cristalinidad y carga variable dependiente del pH y la fuerza iónica del medio químico. Así, a pH ácido, estos suelos presentan una alta capacidad de retención y fijación de aniones como fosfato. La presencia de alofán en Andisoles chilenos conduce a la acumulación de materia orgánica en el suelo mediante la formación de complejos estables con óxidos de Fe y Al (Zunino y Borie, 1985). Asimismo, la solubilización de Al en la solución del suelo conduce a la formación de complejos estables con la materia orgánica, lo que contribuye al aumento del contenido de materia orgánica en Andisoles.

Los Andisoles de la zona centro-sur de Chile son suelos mayoritariamente ácidos (pH<5,5). A nivel mundial, la superficie afectada por la acidez alcanzaría a $3{,}19 \times 10^9$ ha (von Uexküll y Mutert, 1995).

La acidificación del suelo es un proceso natural que ocurre como consecuencia de la lenta pero constante pérdida de cationes básicos (Ca, Mg, K y Na) y una acumulación de cationes ácidos, H y Al (Sadzawka y Campillo, 1993). De esta forma, los cationes básicos son desplazados desde los sitios de intercambio y lixiviados a través del perfil del suelo y los cationes H^+ intercambiables toman su lugar en los minerales de arcilla y en la materia orgánica. Por otra parte, la acidez y Al intercambiable presente en estos suelos, hacen que ciertos iones tales como el fosfato sean fuertemente adsorbidos y la actividad microbiana se

vea disminuida. Varios factores químicos están asociados con la acidificación del suelo, estando relacionados principalmente al aumento o disminución de la solubilidad y disponibilidad de ciertos elementos (Mn, Fe, Al^{+3} y P), los cuales afectan la nutrición vegetal y la biología del suelo. La disminución en el pH se traduce en un aumento en la proporción de Al intercambiable y ligado a la materia orgánica. La presencia de Al disuelto en la solución del suelo proviene principalmente del *pool* de Al amorfo, mediante la sustitución con cationes básicos del suelo o complejados por la materia orgánica (Baba y Okazaki, 2000).

Los procesos naturales de intemperización ocasionan que los suelos se vayan acidificando y hacen que la intensidad de esta acidificación, determinada a través del pH del suelo, sea afectada por el tipo de minerales y el material parental, clima y vegetación. Otros procesos naturales como la mineralización de la materia orgánica en Andisoles generan la liberación de protones, lo cual contribuye a aumentar la acidificación de estos suelos (Zunino y Borie, 1985).

Sin embargo, ha sido el hombre quien mayor influencia ha tenido en acelerar este proceso, al practicar una agricultura intensiva y muy extractiva, que no ha ido aparejada con una adecuada reposición de nutrientes y bases al suelo. Por otra parte, la utilización indiscriminada de fertilizantes de reacción ácida, especialmente los amoniacales, sin considerar sus limitaciones de uso y la necesidad de neutralizar sus efectos acidificantes y las características de los suelos, ha derivado en una paulatina acidificación de los suelos sometidos a este manejo (Sadzawka y Campillo, 1993).

La acidez del suelo es un problema complejo, debido en parte, a concentraciones elevadas de iones H^{+}, Al y Mn, y disponibilidad limitada de P, Ca, Mg y Mo (Flis *et al.*, 1993). Debido a que la FSN es un proceso altamente demandante de P y energía, la simbiosis tripartita leguminosa-rizobio-micorriza adquiere una especial importancia en Andisoles donde la disponibilidad de P está regulada por el pH y la composición coloidal del suelo.

Entre los factores que condicionan la magnitud de intensidad del proceso de acidificación de los suelos, destacan la hidrólisis de Al, el intercambio catiónico entre la raíz y los coloides del

suelo, entre otros (Baba y Okazaki, 2000).

La química de Al en la solución de suelo es compleja. La disponibilidad de Al en suelos ácidos está sujeto a diversas reacciones de hidrólisis dependientes del pH, las que se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Reacciones de equilibrio de Al a 25 ºC.

Reacciones de Equilibrio	**log K^{oa}**
Hidrólisis	
$Al^{3+} + H_2O = AlOH^{2+} + H^+$	-5,00
$Al^{3+} + 2H_2O = Al(OH)_2^+ + 2H^+$	10,1
$Al^{3+} + 3H_2O = Al(OH)_3^o + 3H^+$	16,8
$Al^{3+} + 4H_2O = Al(OH)_4 + 4H^+$	22,99
Otros complejos	
$Al^{3+} + H_2PO_4^- = AlH_2PO_4^{2+}$	3
$Al^{3+} + HPO_4^{2-} = AlHPO_4^+$	7

[a] Constantes de formación de especies y complejos de Al (Nordstrom y May, 1996).

Cooper *et al*. (1983) sostienen que si bien es cierto, la deficiencia de Ca y toxicidad por Al y Mn, junto con deficiencias de P y Mo son factores importantes en suelos con bajo pH, sin embargo, el factor más limitante de la productividad de los cultivos en estos suelos es la movilización de Al en la solución (Mossor-Pietraszewska, 2001), el cual puede alcanzar niveles tóxicos para las plantas y microorganismos, ya que afecta la captación de ciertos nutrientes y especialmente P (Mora *et al.*, 1999).

Es así como los suelos ácidos limitan tanto el tipo de cultivo utilizado como su productividad (Flis *et al.*, 1993; Barrientos *et al.*, 1994). Recientemente, Mora *et al*. (2006) observaron que la acidez del suelo (pH 5,1; Al_{sat} 24 %) redujo la productividad de una pradera en un 36 % comparado con una pradera establecida en un suelo previamente encalado (pH 5,6, Al_{sat} 2 %).

La acidez afecta la productividad de praderas y leguminosas de grano, los cuales, mediante el mecanismo de FSN, realizan una contribución importante al balance de N de los sistemas agrícolas (Flis *et al.*, 1993). Dicha magnitud dependerá básicamente de la leguminosa y del tipo de rotación (Peoples *et al.*, 2001). Otros factores que afectan este proceso son la nutrición vegetal, cantidad y efectividad de rizobios, plagas y enfermedades, compuestos fitotóxicos y manejo de pastoreo, entre otros (Riffkin *et al.*, 1999).

Dentro de las leguminosas forrajeras, la alfalfa es probablemente la especie más utilizada en el mundo (Baligar *et al.*, 1993). Esta se caracteriza por presentar un alto potencial de rendimiento y una excelente calidad como forraje. Las leguminosas forrajeras, especialmente alfalfa, contribuyen a la incorporación de N en los agroecosistemas ganaderos, con un consecuente beneficio tanto económico como ambiental (Campillo *et al.*, 2003; Jensen y Hauggaard-Nielsen, 2003).

2.7 Factores que afectan el crecimiento de *Rhizobium*

La acidez del suelo reduce drásticamente las poblaciones de *Rhizobium* (Robson y Loneragan, 1970b; Carter *et al.*, 1995) y *Sinorhizobium* (Pijnenborg *et al.*, 1990; Brockwell *et al.*, 1991; Ballard *et al.*, 2003). En cultivos *in vitro*, se ha observado que el bajo pH reduce la tasa de crecimiento de *S. meliloti* (Howieson *et al*., 1992), *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Watkin *et al.*, 1997) y *B. japonicum* (Hartel y Alexander, 1983). Así, bajas tasas de crecimiento se traducen en una reducción en la población de rizobios en suelos ácidos (Pijnenborg *et al.*, 1990).

Por su parte, la toxicidad por Al y Mn en suelos ácidos, afectan el crecimiento de los rizobios (Keyser y Munns, 1979). Al igual que en las plantas, la tolerancia a la acidez en rizobios no se relaciona necesariamente a la tolerancia por Al. Es así como alrededor de un 60 % de las cepas de *R. leguminosarum* y *B. japonicum* que sobrevivieron a pH 4,5, pudieron tolerar un nivel de 50 µM Al, que corresponde a un nivel de Al factible de encontrar en suelos ácidos (Keyser y Munns, 1979).

Por otra parte, el Ca es un elemento esencial para la estabilidad de la pared celular, su deficiencia origina una absorción aumentada de antibióticos y pérdida de la integridad celular (Ballen *et al*., 1988). El crecimiento de rizobios en suelos ácidos depende significativamente de la concentración de Ca extracelular. A bajo pH, un incremento en la concentración extracelular de Ca resulta en un aumento en el crecimiento y la sobrevivencia de *S. meliloti* (Howieson *et al*., 1992; Dilworth *et al*., 1999). La exposición a la acidez (pH 4,6-4,7) en cepas de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, origina un eflujo repentino de Ca desde la célula con una consiguiente reducción del contenido de Ca intracelular (Aarons y Graham, 1991). O'Hara *et al*. (1989) encontraron que las cepas de *R. meliloti* tolerantes a la acidez requerían menos Ca que aquellas cepas sensibles.

2.7.1 Efecto de la acidez en la simbiosis

Alfalfa es una de las leguminosas más susceptibles a la acidez y la toxicidad por Al (Baligar *et al.*, 1993), ya que bastan pequeñas cantidades de Al activo en la solución del suelo para limitar el crecimiento de las raíces.

Especies del género *Medicago* spp. tales como *M. sativa*, *M. truncatula*, *M. scutellata* y *Glycine weightii* son extremadamente sensibles a la acidez del suelo (Robson y Loneragan, 1970a; Andrew, 1976), *Desmodium uncinatum* y *Trifolium repens* son sensibles a la acidez (Andrew, 1976). En una categoría semi-tolerante se presentan *Stylosanthes humilis*, *Trifolium semipilosum* y *Trifolium rueppellianum* (Andrew, 1976), mientras que en la categoría de tolerantes se encuentran *Biserrula pelecinus* y *Ornithopus compressus* (Howieson *et al.*, 1995), así como *Macroptylium lathyroides* y *Lotononis bainesii* (Andrew, 1976). En general, aquellas especies menos sensibles a la acidez que su rizobio, pueden crecer a niveles de pH y Ca inferiores a los requeridos para la nodulación, si éstas son fertilizadas con N mineral.

2.7.2 Tolerancia a acidez en *Rhizobium*

La acidez del suelo constituye el factor determinante sobre la sobrevivencia y el crecimiento de los rizobios (Brockwell *et al.*, 1991; Roesner *et al.*, 2005). En el caso particular de *S. meliloti*, una disminución en 0,1 unidades de pH puede disminuir fuertemente la sobrevivencia del rizobio (Reeve *et al.*, 1993). Brockwell *et al*., (1991) encontraron una relación altamente significativa (P<0,001, n = 84) entre el nivel de pH y el recuento de *R. meliloti* presentes en diversos suelos no cultivados en Australia. También observaron que el rizobio fue marcadamente más sensible a la acidez que su hospedero (pH 5,35-5,49). En dichos suelos se verificó la presencia de medicagos, mientras que el rizobio no fue detectado en ninguno de ellos. Sin embargo, un incremento en la concentración de Ca puede mejorar significativamente la sobrevivencia del rizobio a bajo pH (Reeve *et al.*, 1993; Watkin *et al*., 1997; Dilworth *et al*., 1999). Asimismo, la presencia del hospedero (*Medicago* anuales) parece influenciar positivamente la cantidad de *R. meliloti* en el suelo (Young y Brockwell, 1992).

Existen diferencias en cuanto a la capacidad de distintas especies de rizobios de sobrevivir bajo condiciones de estrés ácido. Las especies pertenecientes a *Bradyrhizobium* son relativamente tolerantes a la acidez. Entre los rizobios de crecimiento rápido, *Sinorhizobium* spp. es el menos tolerante mientras que *R. tropici* es el más tolerante (Dilworth *et al*., 2000). La tolerancia a la acidez también varía entre especies de un mismo género. Así, *R. tropici* es más tolerante a la acidez que *R. leguminosarum*. También existen diferencias a nivel de cepa, lo cual ha sido reportado en *B. japonicum* (Keyser y Munns, 1979), *R. phaseoli* (Aarons y Graham, 1991), *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Watkin *et al.*, 2000) y *S. meliloti* (Howieson y Ewing, 1986).

Respecto de la morfología, aquellas cepas de *Rhizobium* que forman colonias secas, pequeñas y bien definidas son más sensibles a la acidez que aquellas que forman colonias grandes y gomosas (Ayanaba *et al*., 1983).

La variabilidad en la tolerancia a la acidez por parte de *Rhizobium* es un mecanismo controlado genéticamente, el cual se ha utilizado para la construcción de cepas tolerantes a la acidez (Dilworth *et al*., 2000).

Se han desarrollado diversos métodos para evaluar tolerancia a la acidez en cepas de *Rhizobium* (Ayanaba *et al.*, 1983; Howieson *et al.*, 1988). Las cepas son sembradas en el medio acidificado, incubadas y examinadas mediante turbidez. En algunos casos, se monitorea la densidad celular en los cultivos incubados antes que se detecten cambios en el pH. Debido a que la tolerancia a la acidez-Al podría deberse a cambios en el pH, se ha vuelto necesaria la utilización de buffer biológicos con el objeto de mantener el pH del medio y así evitar que se produzca una neutralización de la acidez en el punto de inoculación (Howieson *et al.*, 1988). El uso de indicadores tales como verde de bromocresol y púrpura de bromocresol permite detectar cambios tempranos en el pH producto del crecimiento del rizobio en un medio sólido.

La Respuesta Adaptativa de Tolerancia a la Acidez (Adaptive Acid Response, ATR) ha sido ampliamente reportada en bacterias, incluyendo cepas de *Bradyrhizobium*, *R. leguminosarum* y *R. tropici* (O'Hara y Glenn, 1994; Rickert *et al.*, 2000). Esta respuesta se produce cuando células que han crecido bajo condiciones de moderada acidez, se vuelven más tolerantes a una determinada condición de acidez que aquellas células que se han desarrollado a un pH neutro (Dilworth *et al*., 2000). Desde el punto de vista ecológico, la ATR puede contribuir a la sobrevivencia y persistencia de rizobios en suelos ácidos (Dilworth *et al*., 2000).

La ATR involucra una serie de genes regulatorios y estructurales esenciales para el crecimiento de las células a bajo pH. Genes regulatorios tales como el sistema sensor-regulador *act*RS en *S. meliloti*, confiere tolerancia a estrés acido (Tiwari *et al*., 1996). Dichos genes son esenciales para el crecimiento a bajo pH y la ATR. Sin embargo, se desconoce que proteínas son requeridas para la ATR en esta especie (Dilworth *et al*., 2000). Otro gen, *exo*R, controla la producción de exopolisacáridos en *R. leguminosarum* bv. *viciae*, y en algunas cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* puede conferir tolerancia a estrés ácido (Reeve *et al*., 1997).

2.7.3 Toxicidad por Al en plantas

Las especies monoméricas de Al, Al^{+3}, $AlOH^{2+}$, $Al(OH)_2^{+}$ y $Al(OH)_4^{-}$ son consideradas como fitotóxicas. A pesar de que no existe consenso acerca de cuales especies son más tóxicas para las plantas, estudios realizados en soya por Noble *et al*. (1988) sostienen que la toxicidad de

estas especies decrece en este orden: Al^{+3} > $AlOH^{2+}$ > $Al(OH)_2^+$. Por el contrario, otros resultados sugieren que $AlOH^{2+}$ y $Al(OH)_2^+$ son mucho más tóxicos para soya que Al^{+3} (Alva *et al.*, 1986). El trigo, así como otras monocotiledóneas, parecen ser sensibles a Al^{+3}, no así a especies de Al monomérico Al-OH (Kinraide, 1991). Por el contrario, las dicotiledóneas parecen ser sensibles a monómeros de Al-OH, al igual que a Al^{+3}.

El efecto principal de la toxicidad por Al en las plantas es la restricción del desarrollo radical, por lo cual, las raíces reducen el volumen de suelo que pueden explorar y son ineficientes en la absorción de agua y nutrientes. Asimismo, el efecto fitotóxico de Al es mucho más pronunciado en raíces que sobre la parte aérea (Kochian, 1995; Ginting *et al.*, 1998). Un exceso de Al en solución interfiere en la absorción de nutrientes esenciales para la planta como N, P, K, Ca, Mg y Zn (Baligar *et al.*, 1993), e inhibe los procesos microbianos que suministran nutrientes a las plantas. A nivel celular, la toxicidad de Al afecta la estructura y el funcionamiento de la membrana, la síntesis de ADN, la mitosis, elongación celular, la nutrición mineral y el metabolismo (Kochian *et al.*, 2004).

Se han realizado diversos estudios con el objeto de analizar el efecto de Al sobre el crecimiento, nodulación y composición química en especies de importancia agrícola, tanto en solución nutritiva (Andrew *et al.*, 1973; Alva *et al.*, 1990; Baligar *et al.*, 2001) como en suelos (Baligar *et al.*, 1993). Se ha observado que P y Ca pueden reducir los efectos tóxicos de Al, por una reducción en la actividad de Al^{+3} libre (Alva *et al.*, 1990).

Los suelos ácidos afectan el crecimiento y la captación de nutrientes en alfalfa. Se han observado diferencias en la composición mineral y el rendimiento de MS entre cultivares, genotipos y líneas de alfalfa, debido a la presencia de Al (Baligar *et al.*, 1993). Altos niveles de Al en el suelo se traducen en un mayor contenido de Al foliar y una reducción del rendimiento y el contenido de nutrientes de la parte aérea (Baligar *et al.*, 1993).

La adición de materiales encalantes (calcita, dolomita) puede reducir la acidez del suelo, incrementando la persistencia de los rizobios (Slattery *et al.*, 2001), mejorando el crecimiento radical, nodulación, rendimiento de MS y el contenido de proteína y Ca en alfalfa (Grewal y

Williams, 2003). Ballard *et al*. (2005) observaron que la adición de 5 ton cal ha^{-1} a un suelo ácido se tradujo en un aumento en la nodulación de alfalfa, lo que se debería a un aumento en la sobrevivencia y colonización del rizobio.

2.8 Mecanismos de resistencia a Al en plantas superiores

Diversos mecanismos se han propuesto para explicar la tolerancia a Al, los que pueden ser agrupados en mecanismos de exclusión y de tolerancia interna o protoplásmica (Kochian, 1995; Ma *et al.*, 2001; Kochian *et al.*, 2004). Las plantas que se desarrollan en presencia de concentraciones potencialmente tóxicas de Al deben ser capaces de evitar el contacto directo entre las estructuras vitales y sus procesos metabólicos con altos niveles de Al^{+3}, considerada la forma de Al más tóxica. Los procesos de precipitación extracelular y detoxificación de Al por complejación con exudados radicales quelantes se consideran dentro de los mecanismos de exclusión. Asimismo, la formación de complejos menos tóxicos, parece ser una condición necesaria para la tolerancia a altos niveles de Al en aquellas plantas que tienden a acumular el Al en su parte aérea, como es el té (*Camellia sinensis* L.) o *Hydrangea macrophylla* (Ma *et al.*, 1997).

Se han conducido diversos estudios con el objeto de estudiar la exudación de ácidos orgánicos como respuesta a Al en diversas especies entre las que se destacan el trigo (Zheng *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2003), maíz (Kollmeier *et al.*, 2001), centeno (Li *et al.*, 2000), cebada (Zhao *et al.*, 2003), arroz (Watanabe y Okada, 2005), triticale (Zhang *et al.*, 2003), poroto (Shen *et al.*, 2004), soya (Dong *et al.*, 2004) y alfalfa (Lipton *et al.*, 1987). Tanto la calidad como la cantidad de ácidos orgánicos secretados difieren entre especies y entre cultivares dentro de una especie cuando son expuestos a Al (Zheng *et al.*, 1998). Por ejemplo, Dong *et al*. (2004) observaron que la exposición a Al en plantas de soya estimuló la exudación de citrato, mientras que una deficiencia de P indujo una exudación de malato y oxalato, no viéndose afectada la exudación de citrato. Otros estudios también han reportado la exudación de citrato en leguminosas como soya (Silva *et al.*, 2001) y poroto (Miyasaka *et al.*, 1991) en respuesta a Al. Por su parte, la exudación de succinato en alfalfa se ha reportado en plantas sometidas a déficit de P (Lipton *et al.*, 1987) o como resultado de la sobreexpresión de la enzima malato

dehidrogenasa que resultó en un incremento en la exudación de citrato, oxalato, malato, succinato y acetato (Tesfaye *et al.*, 2001).

Los ácidos orgánicos pueden ser clasificados de acuerdo a su capacidad para detoxificar Al en fuertes: cítrico, oxálico y tartárico; moderados: málico, malónico y salicílico; y débiles: succínico, láctico, fórmico, acético y ftálico (Ginting *et al.*, 1998), lo cual está determinado por sus diferentes constantes de estabilidad con Al (por ej. Al-citrato > Al-oxalato > Al-malato), resultando en diferentes actividades de Al^{+3} libre.

La tolerancia a Al en una determinada especie o cultivar puede ser evaluada a través de la magnitud de la inhibición del peso de la raíz (Zheng *et al.*, 1998). Asimismo, una baja acumulación de Al y la exudación continua de una relativamente alta cantidad de ácidos orgánicos serían necesarias para conferir tolerancia a Al (Silva *et al.*, 2001). Recientemente, se ha reportado que la inmovilización de Al con P en raíces de *Fygopyrum esculentum* está asociada a resistencia a Al (Zheng *et al.*, 2005). La exudación de ácidos orgánicos constituye también una importante estrategia para la adquisición de nutrientes tales como el P en suelos deficitarios en este elemento (Drouillon y Merckx, 2003).

Cuando persisten el bajo pH y un elevado nivel de Al en el suelo, el desarrollo radical se inhibe drásticamente. Esto es esperable, debido a que la producción máxima de la alfalfa se alcanza en un rango comprendido entre 6,5-7,5 (Baligar *et al.*, 1993). Sin embargo, tanto a nivel de especie como de variedades existen grandes diferencias en la susceptibilidad a la toxicidad por Al. Así por ejemplo, las leguminosas que dependen de la FSN aparentemente son más susceptibles a la toxicidad por Al que las leguminosas fertilizadas con N combinado. Esto se debe a que la toxicidad por Al tiene un efecto detrimental sobre la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, lo cual se traduciría en una menor sobrevivencia, multiplicación y colonización por parte de los rizobios, ocasionando una menor nodulación y por ende, una menor fijación de N_2 (Holding y Lowe, 1971).

Deficiencias de elementos minerales reducen la fijación de N_2 en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa en muchos suelos agrícolas y como resultado de esto, disminuye su productividad

por debajo de su potencial de rendimiento (Urzúa *et al.*, 1995). Dichas limitaciones nutricionales no sólo son producto de la deficiencia de macroelementos como el P, K y S, sino de microelementos como Fe, Mo, B y otros (O'Hara *et al.*, 1988).

La asociación entre alfalfa (*Medicago sativa* L.) y su microsimbionte (*Sinorhizobium meliloti*) permiten que esta leguminosa sea capaz de fijar su propio N_2, pudiendo desarrollarse en suelos con bajo contenido de este nutriente con una consecuente reducción en el uso de fertilizantes nitrogenados.

En el caso del microsimbionte de la alfalfa, *Sinorhizobium meliloti*, éste es particularmente sensible a la acidez del suelo y especialmente a Al, donde su bajo crecimiento y sobrevivencia limita la productividad de la alfalfa en suelos ácidos (Howieson *et al.*, 1992; Segundo *et al.*, 1999), lo que hace necesario manejar la FSN con el objeto de mejorar el rendimiento de este cultivo (del Papa *et al.*, 1999). La combinación acidez-Al es detrimental para el rizobio, lo que se traduce en largos tiempos de replicación y disminución de la tasa de crecimiento celular (Keyser y Munns, 1979). Sin embargo, se ha observado que *S. meliloti* puede crecer bajo condiciones de acidez, siempre que exista en el suelo un alto nivel de Ca (Howieson *et al.*, 1992). Esto se podría observar luego de aplicar dolomita al suelo, ya que el Ca y Mg suministrado son antagonistas de Al a nivel celular. En trabajos realizados por Andrade *et al*. (2002) se reportó que la sobrevivencia de rizobios asociados a *Leucaena* disminuyó entre un 93-97% en suelos conteniendo entre 27 y 36% de saturación de Al, respectivamente. También observaron que en ausencia del hospedero, un nivel de saturación de Al>20%, resultaba crítico para la sobrevivencia de rizobios asociados a *Phaseolus*.

2.9 Estrategias para mejorar la productividad de la simbiosis

La formación de una simbiosis efectiva es esencial en la mayoría de las leguminosas. Esto obliga a que en la práctica, la inoculación con cepas de *Rhizobium* simbióticamente efectivas sea necesaria para maximizar el rendimiento del cultivo (O'Hara *et al.*, 2002). En suelos ácidos, uno de los atributos que se persigue en las cepas, además de su efectividad, es que éstas sean tolerantes a la acidez (Segundo *et al.*, 1999).

Otros requisitos que deben cumplir los rizobios con potencial para la preparación de inoculantes, es una alta capacidad de fijación de N_2, capacidad de sobrevivir en el suelo bajo condiciones de estrés y gran capacidad competitiva, las cuales permitirán mejorar la productividad de la leguminosa (Segundo *et al.*, 1999; O'Hara *et al.*, 2002; Hardarson y Atkins, 2003). Para identificar dichas cualidades es necesario realizar, primeramente, una minuciosa caracterización de las cepas en términos de efectividad y tolerancia a la acidez (del Papa *et al.*, 1999). Debido a que la baja productividad de alfalfa en muchos suelos, es debida a una baja población de rizobios nativos, más que a una baja efectividad de éstos, el estudio de aquellos rizobios que sean capaces de persistir y nodular en suelos ácidos, debiera ser considerado en la selección de nuevos inoculantes para alfalfa (Ballard *et al.*, 2003).

2.10 Contribución de la planta y el rizobio a la tolerancia a acidez durante la nodulación

La tolerancia a la acidez tanto en la planta hospedera como en el rizobio contribuyen a una simbiosis productiva bajo condiciones de estrés ácido. Bajas poblaciones de rizobios presentes en suelos ácidos constituyen uno de los factores más importantes responsables de la baja nodulación en *M. sativa* (Pijnenborg *et al.*, 1990), *M. truncatula*, *Vigna unguiculata* (Hartel y Alexander, 1983), *P. sativum* (Evans *et al.*, 1993) y *Vicia faba* (Carter *et al*., 1995).

Existe una amplia variación en la nodulación a bajo pH, tanto entre especies de un mismo género como entre cultivares de una misma especie. Estas diferencias se han observado en el crecimiento y nodulación de poroto (Vargas y Graham, 1988), soya (Hungria y Vargas, 2000), *Medicago* anuales (Bounejmate y Robson, 1992) y alfalfa (Urzúa *et al.*, 1995). Una mayor reducción en la nodulación y el crecimiento vegetal se producirá en el caso de que ambos simbiontes sean sensibles a la acidez. Andrew (1976) evaluó el efecto del pH, Ca y N sobre la nodulación y crecimiento de diversas leguminosas forrajeras, observando que la nodulación de alfalfa se veía fuertemente afectada por la acidez, alcanzando su máxima expresión a pH 6,0 y 2 mM Ca.

En las últimas décadas, se ha reportado la presencia de diversas cepas tolerantes a la acidez (Barber, 1980; Howieson *et al.*, 1988; Vargas y Graham, 1988), las que en algunos casos, han mostrado su efectividad bajo condiciones de campo (Howieson y Ewing, 1986; Howieson *et al*., 1988).

2.11 Utilización de cepas nativas en suelos: Experiencias y Proyecciones

La introducción de cepas tolerantes a la acidez representa un importante avance a la hora de mejorar la productividad de la simbiosis en suelos ácidos. Se han realizado diversos estudios conducentes a introducir especies de rizobios para mejorar la productividad de diversas simbiosis. Cepas de *S. meliloti* aisladas desde suelos ácidos en Cerdeña, Italia, fueron introducidas en Australia, donde mostraron una mayor capacidad que los inoculantes comerciales para nodular diversas especies de *Medicago* (Howieson y Ewing, 1986). Lo anterior, junto a la utilización de cultivares tolerantes a la acidez, han permitido aumentar el área de siembra para estas forrajeras. También destaca la introducción de *R. tropici*, simbionte tolerante a la acidez para *P. vulgaris* (Graham y Vance, 2000; Hungria *et al.*, 2000), que ha permitido la expansión de este importante cultivo en Brasil y Africa.

Generalmente, los inoculantes tienen que competir con los rizobios residentes. Cuando la inoculación es deficiente, las condiciones para la sobrevivencia del inoculante serán desfavorables y su impacto sobre la productividad será limitado. Incluso, aunque el inoculante sea exitoso en el año de establecimiento, su eficiencia se verá aminorada debido a la disminución de su persistencia (Slattery y Coventry, 1993) o por deriva genética producto del intercambio de material genético entre el inoculante y otras bacterias del suelo (Sullivan y Ronson, 1998).

Diversos estudios han evaluado la capacidad de las cepas nativas de rizobios de formar una simbiosis efectiva en diversas especies de *Medicago* (Barber, 1980; Ballard y Charman, 2000; Ballard *et al.*, 2003; Bradic *et al.*, 2003; Ballard *et al.*, 2005) y soya (Hungria *et al.*, 2001). Las distintas especies de leguminosas difieren en su capacidad de formar una simbiosis efectiva con las poblaciones de rizobios nativos (Ballard y Charman, 2000). Ballard *et al*. (2003)

reportaron una alta efectividad de los rizobios nativos aislados desde suelos de Australia, ya que 35 de los 50 suelos estudiados contenían cepas que permitieron alcanzar el 70 % de rendimiento de MS respecto de la cepa comercial WSM826. Por otra parte, los bajos rendimientos alcanzados por algunas cepas fueron explicados por el bajo número de rizobios presentes en el suelo más que por una baja efectividad simbiótica de los mismos. Se observó que en algunos suelos ácidos (pH 5,0) se mantuvo una adecuada productividad del cultivo durante 28 años, lo cual se atribuiría a la presencia de cepas simbióticamente efectivas y tolerantes a la acidez.

En Chile, los trabajos realizados en rizobios se han centrado en la determinación de la efectividad simbiótica de cepas asociadas a especies tales como lotera (Ruíz *et al.*, 1999; Barrientos *et al.*, 2002), trébol rosado (Borie *et al.*, 1988), trébol blanco (Urzúa y Torres, 1985), poroto (Longeri *et al.*, 1990), alfalfa (Opazo y Veloso, 1988); hualputra (Herrera *et al.*, 1996), vicia (Urzúa *et al.*, 2001) y especies arbóreas como acacia, algarrobo y tagasaste (Aronson *et al.*, 2002). En el país se han realizado algunos estudios conducentes a evaluar la efectividad simbiótica en cepas nativas de rizobios (Barrientos y Méndez, 1994; Urzúa *et al.*, 2001; Campillo *et al.*, 2003). Sin embargo, aspectos tales como su diversidad genética o su grado de adaptación a la acidez del suelo no han sido suficientemente investigados. Aspectos tales como la introducción de ciertas leguminosas anuales tales como serradela amarilla (*Ornithopus compressus* L.) y biserrula (*Biserrula pelecinus* L.) en suelos del centro-sur de Chile, requerirán la evaluación del potencial simbiótico y la diversidad genética de los rizobios asociados a dichas especies, debido al alto aporte de N que éstas pueden realizar en suelos ácidos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Muestreo y aislamiento de rizobios

Los rizobios fueron aislados a partir de nódulos de plantas de alfalfa creciendo en diferentes sitios en el valle central de la IX y X Regiones de Chile. Parámetros tales como edad del cultivo, población de plantas y localización geográfica fueron considerados en la elección de los sitios de muestreo. Las raíces fueron descubiertas por excavación, sus nódulos fueron cuidadosamente extraídos, limpiados de restos de suelo y almacenados en tubos con tapa (10 mL) conteniendo $CaCl_2$ o sílica gel y transportados al laboratorio, donde se mantuvieron temporalmente a 4ºC. Adicionalmente, se obtuvo una muestra de suelo (1 Kg aprox.) para evaluar algunos parámetros químicos y biológicos. Los nódulos deshidratados fueron rehidratados con agua destilada estéril en placas Petri durante 12 h. Posteriormente, fueron desinfectados superficialmente mediante inmersión en etanol (70 % v/v) por 1 min seguido por una inmersión en hiploclorito de sodio (4 % v/v) por 3 min y enjuagados exhaustivamente con agua destilada estéril. Posteriormente, el contenido de cada nódulo fue cuidadosamente extraído y homogeneizado en una gota de solución salina estéril (SSE; 0,89 % NaCl), el cual fue sembrado en una placa Petri conteniendo medio agar-extracto de levadura-manitol (YEM) con rojo Congo (Vincent, 1970). El medio de cultivo contenía (g/L): K_2HPO_4, 0,5; $MgSO_4$, 0,2; NaCl, 0,1; $CaCl_2$ $2H_2O$, 0,05; manitol, 10; extracto de levadura, 1; agar, 15; $CaCO_3$, 0,3 y adicionado con 2,5 mL rojo Congo (solución 1 % p/v). Las placas fueron incubadas a 25ºC durante 14 días. Posterior a la incubación, se obtuvieron un total de 46 aislados, los cuales fueron conservados en crioviales conteniendo glicerol (20 % v/v) a -80ºC para posteriores análisis.

3.2 Poblaciones de rizobios en suelos

Para estimar el tamaño de las poblaciones de rizobios asociadas a alfalfa, se utilizó la metodología del número más probable (NMP) de rizobios combinado con una técnica de infección en planta descrita por Brockwell (1963). Plántulas de alfalfa cv. WL326HQ fueron utilizadas como planta hospedera. La desinfección de las semillas se realizó de similar forma

que para los nódulos y sembradas en placas con agar-agua (1 % p/v) (Grado J3, Leiner Davis Gelatin, Australia), las cuales se incubaron en una estufa de cultivo a 22ºC durante 48 h en oscuridad. Las plántulas con un largo de raíz de aproximadamente 1 cm fueron transferidas asépticamente a tubos de vidrio (25 × 200 mm) conteniendo medio agar Jensen libre de nitrógeno (N), ajustado a pH 6,6 (Zhao *et al.*, 1997) (Figura 1).

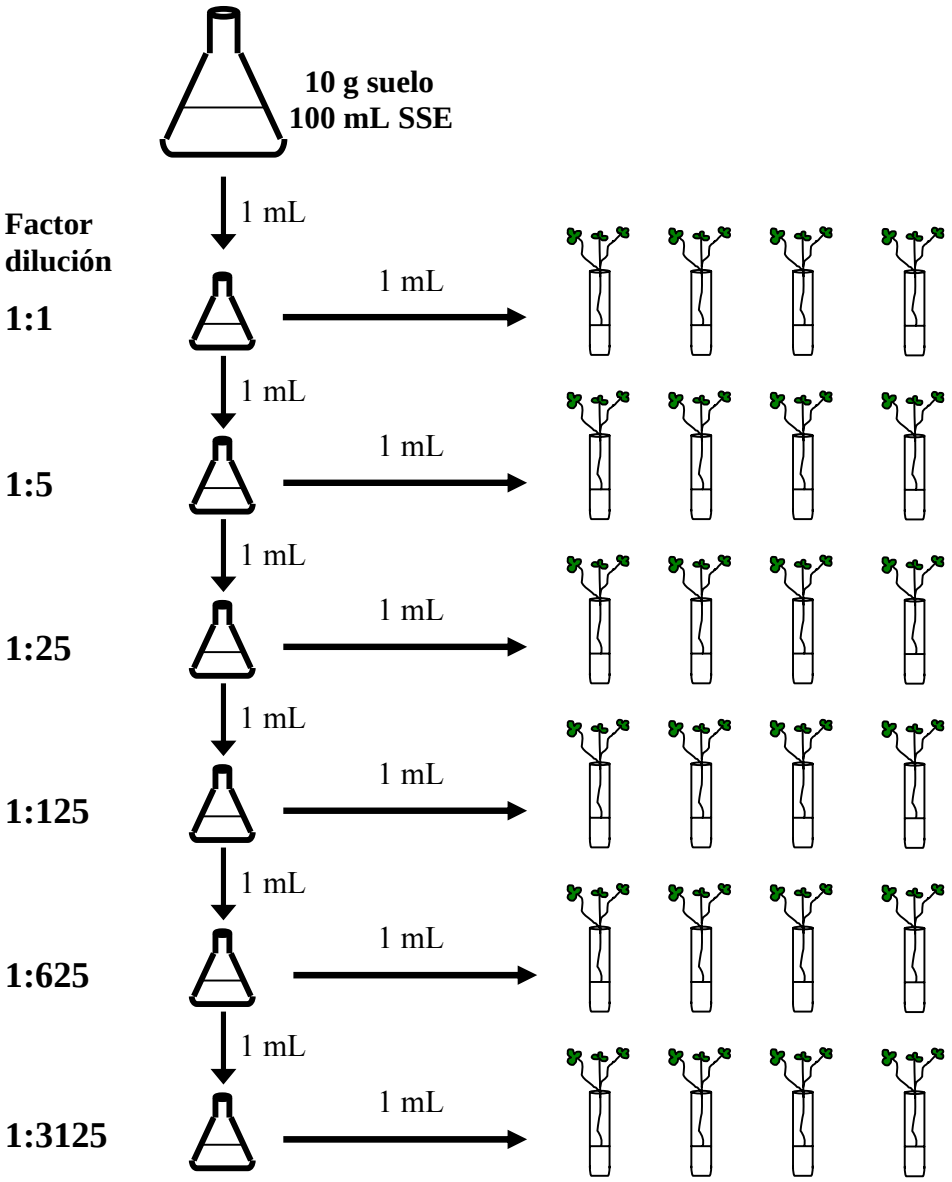

Figura 1. Recuento de rizobios mediante el método de diluciones seriadas combinado con una técnica de inoculación en planta (Brockwell, 1963).

El suelo (10 g) fue suspendido en 100 mL de solución salina (dilución 1), a partir de la cual se realizaron cinco diluciones sucesivas (1 mL de alícuota en 4 mL de solución salina). De esta forma se obtuvieron seis diluciones (1, 1:5, 1:25, 1:125, 1:625 y 1:3125). En cada dilución, tres alícuotas de 1 mL se usaron para inocular tres tubos con planta, otra alícuota de 1 mL se utilizó para realizar la siguiente dilución. De esta forma se utilizaron un total de 18 plantas por suelo. Los tubos se dispusieron en un diseño de bloques al azar y se mantuvieron en una cámara de crecimiento a 22 ± 2°C y 16 h luz. Se incluyeron controles sin rizobio, los cuales fueron inoculados con 1 mL de SSE. Se evaluó visualmente la nodulación de las plantas en los distintos tratamientos y se calcularon las poblaciones de rizobios asociadas a cada suelo. El análisis de correlación entre el pH del suelo y el recuento de rizobios fue realizado con el programa estadístico SPSS 11.

3.3 Identificación molecular de aislados mediante amplificación del gen 16S rDNA

Una rápida identificación de los aislados se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando partidores específicos para la amplificación del gen 16S rDNA, lo que permite discriminar entre cepas de *S. meliloti* y *S. medicae*.

Los aislados inicialmente se inocularon en botellas McCartney (30 mL) conteniendo 5 mL de medio Lupin Agar (LA) (Howieson *et al.*, 1988) y se mantuvieron a 25ºC por 24 h con agitación constante (200 rpm). Como control se utilizaron las cepas *S. meliloti* WSM2114 (cepa tipo) y *S. medicae* WSM419. Una alícuota de 1 mL de cada suspensión se centrifugó a 5000 rpm por 2 min. El sobrenadante se eliminó y el pellet se resuspendió en 1 mL de SSE. Este paso se repitió varias veces con el objeto de lavar el pellet y así eliminar exopolisacáridos o medio nutritivo desde el cultivo celular. Finalmente, las células fueron lavadas y resuspendidas en 100 µL de SSE a una concentración de seis unidades de densidad óptica ($OD_{600\ nm}$). Las células concentradas se utilizaron como templado de ADN en la reacción por PCR.

Cada mezcla de reacción contenía 1 µL de células concentradas, 2,5 U de Amplitaq® ADN polimerasa (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA), 50 µM de cada partidor (Geneworks,

Adelaide, Australia), 1,5 mM $MgCl_2$, buffer de polimerización 5× [67 mM Tris-HCl (pH 8,8 a 25°C) y 16 mM $[NH_4]_2SO_4$, 0,45 % Triton X-100, 0,2 mg mL^{-1} gelatina, 0,2 mM dNTPs (Fisher Biotech Int., Perth, WA, Australia)], en un volumen final de 20 µL. Los partidores 16SmWr F913 y SmedWr F913 fueron utilizados para reconocer y unirse específicamente a regiones del gen 16S rDNA de *S. meliloti* y *S. medicae*, respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2. Partidores utilizados para identificación molecular de *S. meliloti* y *S. medicae*, mediante amplificación del gen 16S rDNA por PCR.

Partidor	Secuencia
16SmWr F913	5'-GAT CGC GGA TA**C** GAG AGA TC**G**-3'
SmedWr F913	5'-GAT CGC GGA TA**G** GAG AGA TC**C**-3'
16SmWr R1330	5'-ATG GTG TGA CGG GCG GTG TG-3'

También se utilizó el partidor 16SmWr R1330, el cual fue utilizado para unirse al gen 16S rDNA en ambas especies (Garau *et al.*, 2005). La reacción por PCR se realizó en un termociclador GeneAmp modelo 9600 (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA).

Las condiciones de amplificación con PCR fueron: un ciclo de 5 min a 94ºC, seguido por 35 ciclos de 30 s a 94ºC, 30 s a 53ºC, 1 min a 72ºC y mantención final a 15ºC. La carga de las mezclas de reacción en el gel de agarosa se realizó agregando 3 µL de tinción de carga azúl/naranjo 6× (Promega, Madison, WI, USA) a cada tubo de PCR. Los productos de PCR amplificados fueron comparados con un marcador de peso molecular de 1 kb (Promega, Madison, WI, USA) y visualizados después de electroforesis en gel de agarosa (1,5 % en buffer TBE 1×, 125 Volts) mediante tinción con bromuro de etidio (0,5 µg mL^{-1}). La visualización de las bandas se realizó mediante un transiluminador UV conectado a una cámara digital. La amplificación del gen 16S rDNA se verificó mediante la presencia de una banda de aproximadamente 417 pb en el gel. Las imágenes fueron obtenidas y analizadas con el software Quantity One (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

3.4 Identificación molecular mediante secuenciación parcial del gen 16S rDNA

Para corroborar la identidad de las cepas de *S. meliloti*, la cepa SN4 fue aleatoriamente seleccionada entre aquellas que amplificaron a 417 pb. Se realizó una primera amplificación total del gen 16S rDNA con los partidores 20F y 1540R, así como diferentes combinaciones de partidores (Genetech Pty, Adelaide, Australia) a una concentración de 50 nM, según la metodología propuesta por Yanagi y Yamasato (1993) (Tabla 3).

Tabla 3. Partidores utilizados en la amplificación por PCR del gen 16S rDNA en cepas NS4 y NS26.

Partidor [1]	**Secuencia (5'---> 3')**	**Referencia**
20 F[a]	AGT TTG ATC CTG GCT CA	(Yanagi y Yamasato, 1993)
420 F[b]	GAT GAA GGC CTT AGG GTT GT	(Yanagi y Yamasato, 1993)
1190 R[c]	GAC GTC ATC CCC ACC TTC CT	(Yanagi y Yamasato, 1993)
1540 R[d]	AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA	(Yanagi y Yamasato, 1993)
FGPS 1490[e]	TGC GGC TGG ATC ACC TCC TT	(Laguerre *et al.*, 1996)
FGPS 132[f]	CCG GGT TTC CCC ATT CGG	(Normand *et al.*, 1992)

[1] Combinaciones de partidores: a+c, b+c, b+d, e+f.

Los productos de PCR amplificados fueron purificados utilizando el kit de purificación de ADN QIAquick (Qiagen, Victoria, Australia) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Posteriormente, los productos de PCR obtenidos fueron re-amplificados con los partidores 420F y 1190R.

Las mezclas de reacción fueron mantenidas a 94ºC por 5 min, seguido por 35 ciclos a 94ºC por 30 s, 55°C por 30 s, 72°C por 30 s, extensión final a 72°C por 7 min y mantención a 15ºC. La secuenciación parcial fue realizada utilizando un kit se reacción de secuenciación ABI PRISM^{TM} en un secuenciador automático (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA). Finalmente, se realizó una búsqueda mediante la opción ENTREZ proporcionada por NCBI (National

Centre for Biotechnological Information) con el objeto de encontrar aislados genéticamente relacionados y valores de similaridad de secuencia.

3.5 Diversidad genética en aislados de *S. meliloti*

Se estudió la diversidad de los aislados de *S. meliloti* a nivel de cepa, mediante la técnica de PCR-*fingerprinting* utilizando el partidor RPO1, el cual amplifica regiones conservadas y variables del gen *nif* según la metodología propuesta por Richardson *et al*. (1995). Como templado de ADN se utilizaron células concentradas de cada cepa. Cada reacción de PCR fue realizada en un volumen de 20 µL similar a lo descrito en la Sección 3.3. Como controles se incluyeron dos cepas de *S. meliloti*: WSM826 (cepa precursora de inoculantes en Australia) y WSM 2114 (cepa tipo), además de la cepa *S. medicae* WSM419. Las condiciones de reacción por PCR fueron: 5 min a 94ºC, seguido por 40 ciclos de 94ºC por 30 s, 50ºC por 20 s y 72ºC por 90 s y una extensión final a 72ºC por 5 min. Los productos amplificados por PCR fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa (1,5 %), comparados con un marcador de peso molecular de 1 kb (Promega, Madison, WI, USA) y visualizados en un transiluminador UV mediante tinción con bromuro de etidio (0,5 µg mL^{-1}). El análisis cluster de los perfiles de PCR se realizó usando el programa SPSS 11 (SPSS, Chicago, IL, USA).

3.6 Tolerancia a la acidez en cepas de *S. meliloti*

Se evaluó la capacidad de las cepas de crecer y formar colonias en medio LA a diferentes niveles de pH (4,5; 5,0; 5,5; 6,0 y 7,0) según lo propuesto por Howieson *et al*. (1988). Con el propósito de mantener constante el pH del medio, se utilizaron los buffer biológicos HEPES, MES y HOMOPIPES (Tabla 4). Los buffers fueron adquiridos a Sigma Chemical Co. (St. Louis, MI, USA), con la excepción de HOMOPIPES (Research Organics, Cleveland, OH, USA).

Tabla 4. Buffers utilizados en el presente estudio.

Buffer	Conc. mM	pH	Descripción
HOMOPIPES	20	4,5-5,0	homopiperazina *N*,*N*′-bis-2-[ácido etanosulfónico]
MES	20	5,5-6,0	2-[*N*-morfolino] ácido etanosulfónico
HEPES	20	7,0	*N*-[2-hidroxietil] piperazina-*N*′-[2-ácido etanosulfónico]

Las cepas fueron sub-cultivadas en botellas McCartney conteniendo 5 mL de caldo YMA, con una densidad óptica inicial de 0,1, las que se incubaron a 28ºC durante 3 d bajo agitación constante (200 rpm). Cada placa con medio LA se sembró con cuatro cepas distintas mediante alícuotas de 10 µL de suspensión conteniendo 10^6, 10^7 y 10^8 células mL^{-1}, según lo muestra la Figura 2, las cuales se incubaron a 28ºC por 4 d.

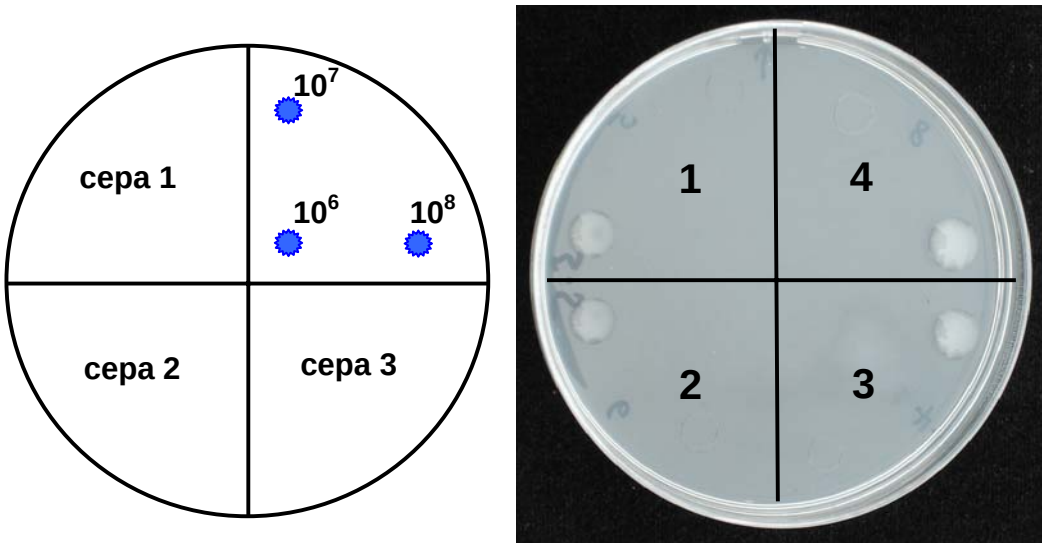

Figura 2. Disposición de diluciones celulares en placas para ensayo de tolerancia a acidez.

3.7 Amplificación del gen sensor-regulador *fsr*R

Con el objeto de analizar si las diferencias registradas en términos de tolerancia a la acidez entre las cepas estudiadas se debió a la presencia del gen regulador *fsr*R, se realizó la

amplificación de este gen mediante el uso de los partidores fsrR-82F (5'-AGG GTG CTC TAC ATT GAC G-3') y lpiA-1556R (5'-GAC GGC GGT GAG ATA GCT C-3') según la metodología propuesta por Reeve *et al*. (2006). Cabe destacar que tanto el gen *lpi*A, el cual confiere tolerancia a la acidez, como su regulador *fsr*R, están presentes en *S*. *medicae*, mientras que sólo el gen *lpi*A está presente en *S*. *meliloti*. La mezcla de reacción para PCR contenía 1 µL de suspensión celular saturada, 2,5 µL de 10 mM $MgCl_2$, 5 µL buffer de polimerización 5× (Fisher-Biotec, Australia), 0,5 µL de cada partidor, 0,5 µL Taq DNA polimerasa (5 U μL^{-1}, Invitrogen Life Technologies) y 15 µL agua grado PCR. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 94ºC por 5 min, 30 ciclos de denaturación a 94ºC por 30 s, alineamiento a 57ºC por 30 s y extensión a 72ºC por 2 min, seguido por mantención de temperatura a 14ºC. Los productos de PCR amplificados fueron comparados con un marcador de peso molecular de 1 kb (Promega, Madison, WI, USA) y visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa (1 % p/v). El análisis se realizó de manera similar a lo descrito previamente en la Sección 3.3.

3.8 Efectividad simbiótica en cepas de *S. meliloti*

3.8.1 Diseño experimental

La efectividad simbiótica de las cepas de *S*. *meliloti* fue evaluada bajo condiciones de invernadero, con luz natural y temperatura controlada según lo descrito por Howieson *et al*. (2000b). El experimento consistió en un arreglo de parcelas divididas completamente al azar con 9 aislados naturalizados de *S*. *meliloti*, las cepas *S*. *meliloti* WSM2114 (cepa tipo) y WSM522, la cepa *S*. *medicae* WSM419 y controles no inoculados con N (+N) y sin N (-N). Las cepas fueron inoculadas en plántulas de alfalfa, las cuales se hicieron crecer en macetas conteniendo una mezcla suelo: arena (1:1 v/v) (pH 5,0) y una mezcla suelo: arena (1:2 v/v) (pH 5,5), con tres repeticiones. El suelo utilizado correspondió a un suelo ácido (acid yellow Kandosol), perfil 0-15 cm, con bajo contenido de Al, colectado en la localidad de Merredin, WA, cuya caracterización fisico-química se muestra en la Tabla 5. Este suelo presenta un bajo contenido de Al en el perfil 0-15 cm, pese a que el contenido de Al en el subsuelo (15-25 cm) es lo suficientemente alto como para afectar el crecimiento vegetal (Carr y Ritchie, 1993).

Tabla 5. Propiedades físicas y químicas del suelo utilizado en ensayo de invernadero.

Parámetros [a]	Suelo Merredin
% arena (0,02-2 mm)	80,5
% limo (0,002-0,02 mm)	3,0
% arcilla (<0,002 mm)	16,5
$N\text{-}NO_3^-$ (mg Kg^{-1})	3
$N\text{-}NH_4^+$ (mg Kg^{-1})	6
P (mg Kg^{-1})	12
K (mg Kg^{-1})	32
S (mg Kg^{-1})	32
Carbono orgánico (%)	0,51
Fe (mg Kg^{-1})	598
Conductividad (dS m^{-1})	0,043
pH (0,01 M $CaCl_2$)	4,1
pH (H_2O)	4,5

[a] Análisis realizados de acuerdo a la metodología descrita por (Rayment y Higginson, 1992).

3.8.2 Condiciones de crecimiento en cepas y plantas

Las plantas se hicieron crecer en macetas de polietileno conteniendo aproximadamente 2,5 Kg de suelo. Se realizaron reiteradas aplicaciones de agua destilada a 100ºC a las macetas con suelo, con el propósito de eliminar el N del suelo.

Las semillas de alfalfa (*Medicago sativa* cv. Sceptre) se esterilizaron superficialmente mediante inmersión en etanol (70 % v/v) por 1 min, seguido por una inmersión en hipoclorito de sodio (4 % v/v) durante 3 min y se enjuagaron exhaustivamente con agua destilada estéril. Las semillas fueron germinadas en placas con agar (1,5 % p/v) (Grado J3, Leiner Davis Gelatin, Australia), incubadas a 20ºC en oscuridad y trasplantadas asépticamente a las macetas con suelo cuando las radículas alcanzaron aproximadamente 1 cm de longitud. Se incluyó un total de seis semillas por maceta. Las cepas seleccionadas se hicieron crecer en placas con medio LA a 28ºC durante 4 d, siendo posteriormente suspendidas en una solución de sacarosa

(1 % p/v), la cual se utilizó para inocular cada plántula (1 mL, 10^8 rizobios mL^{-1}, aproximadamente). Se prefirió usar este método de inoculación dada la facilidad de comprobar la pureza de la cepa al poder observar las colonias en la placa. Cada maceta fue cubierta con pellets de polietileno (Alkathene^{MR}) estériles para prevenir la contaminación con rizobios transportados por el aire.

Las macetas fueron irrigadas regularmente con agua destilada estéril y solución nutritiva sin N a través de un tubo de PVC con tapa, inserto en el centro de la maceta. La solución nutritiva contenía los siguiente macronutrientes (g L^{-1}): $MgSO_4$ $7H_2O$, 0,31; KH_2PO_4, 0,21; K_2SO_4, 0,44; Fe-EDTA, 0,06; $CaSO_4$, 0,04; y micronutrientes (mg L^{-1}): H_3BO_3, 0,116; $Na_2MoO_4 \times 2H_2O$, 0,0045; $ZnSO_4 \times 7H_2O$, 0,134; $MnSO_4 \times H_2O$, 0,01; $CoSO_4 \times 7H_2O$, 0,03; $CuSO_4 \times 5H_2O$, 0,03. A los tratamientos con N (+N) se les agregó 5 mL KNO_3 (10 g L^{-1}) por semana.

3.8.3 Evaluaciones

Las plantas se hicieron crecer durante 35 días a temperatura constante (22 ± 1ºC). Transcurrido ese período, las plantas se cortaron y se separaron. La parte aérea de cada maceta se secó (60°C por 48 h) y pesó, mientras que las raíces se cortaron y limpiaron con el objeto de evaluar la nodulación en base al número y color (blanco = inefectivo, rojo = efectivo) de los nódulos de cada planta, según la metodología propuesta por Ballard *et al*. (2003), con lo cual se asignó un puntaje entre 0 y 4, donde:

0, sin nódulos;
1, <5 nódulos blancos;
2, ≥5 nódulos blancos;
3, <5 nódulos rojos y
4, ≥5 nódulos rojos.

Además, se calculó la efectividad simbiótica del rizobio, expresada como capacidad simbiótica (*Sc*) a través de una escala arbitraria a través de la siguiente ecuación:

$$Sc = (I - U) / (N - U),$$

donde I correspondió a la MS aérea tratamiento inoculado, U a la MS aérea testigo sin inocular y N a la MS aérea control con N (+N). Así, de acuerdo a Brockwell *et al*. (1966) se calcularon los índices de efectividad, donde $Sc \geq 0{,}67$ (altamente efectiva), $0{,}33 \leq Sc < 0{,}67$ (efectiva), $Sc < 0{,}33$ (levemente efectiva) y sin nodulación (inefectiva).

Los resultados de MS aérea, efectividad simbiótica y nodulación a un mismo nivel de pH fueron analizados mediante test de ANOVA y la Prueba de Comparación Múltiple de Tukey ($P \leq 0{,}05$). Comparación de promedios en función del pH se analizaron mediante la prueba *t*-student para 2 muestras independientes con el programa SPSS 11 (SPSS, Chicago, IL, USA).

3.9 Efecto de Al en el contenido de materia seca y la exudación de ácidos orgánicos en *M. sativa*

3.9.1 Diseño experimental

Se diseñó un ensayo con el objeto de evaluar la respuesta diferencial de diferentes cultivares de alfalfa como respuesta a Al, sobre la acumulación de MS en la parte aérea, así como la exudación de ácidos orgánicos como un posible mecanismo de tolerancia a Al. El diseño experimental consistió en un arreglo de parcelas divididas con bloques al azar, con tres niveles de Al (0, 50 y 100 μM) en la forma de $AlCl_3$ y dos niveles de pH (4,5 y 6,0) en triplicado.

3.9.2 Condiciones de crecimiento

Semillas de cuatro cultivares de alfalfa (California-55, Robust, Sceptre y Aquarius) se seleccionaron por color, forma y tamaño. Las semillas se desinfectaron superficialmente mediante inmersión en etanol (70 % v/v) por 1 min seguido por una inmersión en hiploclorito de sodio (4 % v/v) por 3 min, enjuagadas exhaustivamente con agua destilada estéril y germinadas sobre papel filtro húmedo en oscuridad por 4 d. Posteriormente, las plántulas fueron montadas en soportes de poliestireno expandido sobre macetas de polipropileno de 1 L.

Un total de 8 plantas se incluyó en cada maceta conteniendo 1 L de solución nutritiva de Taylor y Foy (Taylor y Foy, 1985), con la siguiente composición en macro y micro nutrientes (mM): NH_4NO_3, 120; NaCl, 150; $MgCl_2 \times 6H_2O$, 162; KH_2PO_4, 120; NH_4Cl, 66; $NaNO_3$, 252; $Na_2SO_4 \times 10H_2O$, 72; KNO_3, 330; $Ca(NO_3)_2 \times 4H_2O$, 762; H_3BO_3, 3,96; $ZnSO_4 \times 7H_2O$, 0,36; $MnSO_4 \times H_2O$, 1,44; $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4H_2O$, 0,06; Fe-EDTA, 10,74; $CuSO_4 \times 5H_2O$, 0,12. La solución nutritiva fue renovada cada 5 d. El pH de la solución se mantuvo constante, ajustándose diariamente con NaOH o HCl 0,1 M. El experimento se realizó en una cámara de crecimiento a 22ºC, 50-60 % de humedad relativa y fotoperíodo de 16 h luz durante 31 d.

3.9.3 Colección y análisis de los exudados radicales

Los exudados fueron colectados a los 15 días de comenzado el experimento según la metodología propuesta por Rosas *et al*. (2007) con algunas modificaciones. Las plantas con sus raíces intactas, las cuales habían sido expuestas a los distintos tratamientos con 0 a 100 μM Al fueron enjuagadas con agua desionizada y posteriormente sumergidas en agua desionizada (50 mL) bajo aireación constante durante 1 h. La solución resultante fue filtrada (0,45 μM) y almacenada a -20ºC para su posterior análisis. Este corto período de elución fue escogido con el objeto de minimizar la degradación de ácidos orgánicos por la acción microbiana, la cual aumenta a períodos de elución más prolongados (Jones y Darrah, 1994). Para cuantificar la concentración de aniones orgánicos (citrato y succinato), los exudados fueron liofilizados, el residuo redisuelto en 5 mL de agua desionizada y utilizado para su análisis por HPLC. La separación fue realizada en una columna de fase reversa LiChrospher 100 RP-18, de 250 × 4 mm con 5 μm de tamaño de partícula (Merck, Darmstadt, Alemania). Alícuotas de 20 μL fueron inyectadas en la columna, donde como fase móvil se usó una solución de 200 mM de ácido ortofosfórico (pH 2,1) en elución isocrática con un flujo de 1 mL min^{-1} y detección UV a 210 nm. Observaciones preliminares realizadas con estándares de ácidos orgánicos mostraron que los niveles de recuperación de dichos aniones orgánicos fueron cercanos al 98 %.

3.9.4 Especiación química de la solución nutritiva

La especiación de Al y la formación de complejos Al-carboxilatos en la solución nutritiva fue realizada con el programa GEOCHEM versión 2,0 (Parker *et al.*, 1987). La cantidad total de ácidos orgánicos exudados en 1 L fue considerada para la especiación química.

3.9.5 Peso seco y análisis químico de las plantas

Al final del período de crecimiento, las plantas fueron cortadas y separadas en parte aérea y radical, secadas (60°C por 48 h) y pesadas. Las muestras fueron incineradas a 500 ºC por 8 h en una mufla y digeridas con HCl 2M para determinar Al y P foliar y radical. Al se determinó mediante espectrofotometría de absorción atómica y P se determinó colorimétricamente mediante el método del vanado-fósforo-molibdato de acuerdo a la metodología propuesta por Sadzawka *et al*. (2004).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Muestreo y aislamiento de rizobios

Los suelos establecidos con alfalfa desde los cuales se aislaron los rizobios, mostraron un amplio rango de pH, con valores que fluctuaron entre 4,9 y 6,7 (Tabla 6). Aunque habitualmente el establecimiento de la alfalfa se realiza en suelos con pH sobre 6,2, se observó que alrededor del 56 % de los suelos exhibieron niveles de pH≤6,0, el cual es considerado el nivel crítico de pH para el establecimiento de la alfalfa en Andisoles ácidos (Suárez, 1995, http://www.tattersall.cl/revista/rev179/agricola.htm). La progresiva acidificación de estos suelos se debe en gran medida a la disminución de bases intercambiables causada por la lixiviación producto de la alta pluviosidad, así como la absorción de éstas por parte de las plantas (Mora *et al.*, 2004).

Tabla 6. Características de los suelos establecidos con *M. sativa*.

Suelo	Lat. (S) Long. (E)	NMP[c] rizobios (rizobios g^{-1} suelo)	Número sitios	pH suelo	Edad pastura (años)
Carillanca[a]	38º41' - 72º23'	4.100 - 35.300	2	5,8 - 6,5	4
Las Encinas[a]	38º44' - 72º37'	283 - 18.800	7	6,3 - 6,7	2
Caivico[b]	38º49' - 72º24'	72 - 2.820	3	5,9 - 6,2	2 - 6
Río Bueno[b]	40º19' - 72º52'	0 - 750	9	4,9 - 5,9	3 - 10
Imperial[b]	38º44' - 72º59'	436 - 1.080	1	5,8	2

[a] Praderas establecidas con fines de investigación (manejo óptimo).

[b] Praderas establecidas para producción animal (bajo nivel de manejo).

[c] NMP, Número Mas Probable

Aquellos suelos que habían sido establecidos más recientemente con alfalfa, presentaron una mayor población de plantas, así como una mayor nodulación (datos no mostrados). Sin embargo, la nodulación se redujo significativamente en aquellos suelos más ácidos. Por lo anterior, se consideraron aspectos tales como pH del suelo, historial de manejo y cobertura vegetal para la elección de los sitios de muestreo.

A partir de nódulos de plantas de alfalfa se aislaron un total de 46 cepas de rizobios (Figura 3a). El aislamiento de las cepas mediante la utilización de medio YEM-rojo Congo resultó en una fácil y rápida diferenciación y aislamiento de rizobios sobre otras bacterias acompañantes (Figura 3b). Aquellas colonias formadas por rizobios mostraron una coloración rosado pálido (lo cual indica una baja absorción de colorante) mientras que otras bacterias asociadas a los nódulos exhibieron un color rojo intenso.

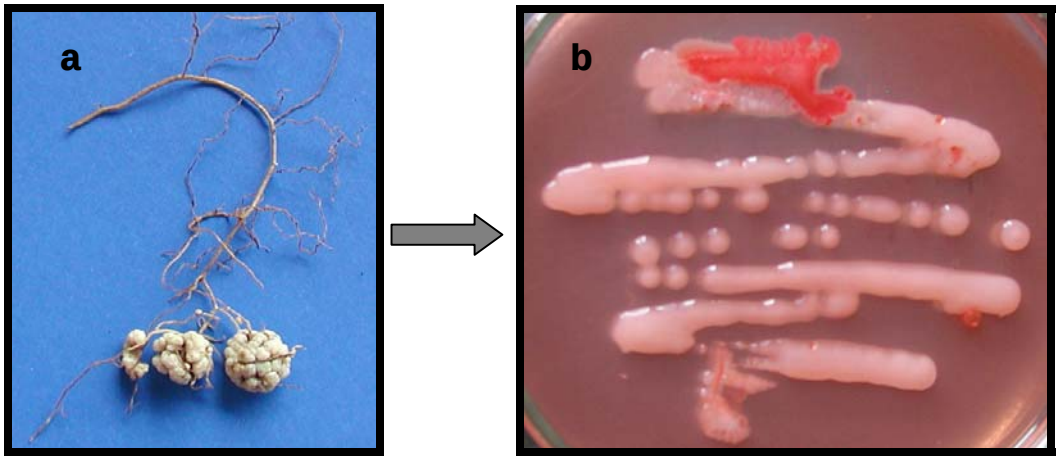

Figura 3. Morfología de (a) nódulos de *M. sativa* y (b) cepa *S. meliloti* NS21 aislada en placas conteniendo medio agar YEM-rojo Congo.

La mayoría de las colonias aisladas sobre medio YEM generaron una importante cantidad de exopolisacáridos (EPS), presentando una apariencia gomosa, característico en cepas de *Sinorhizobium* (Figura 4), mientras que otras cepas presentaron un fenotipo "seco" y con colonias más pequeñas y definidas. En un estudio previo, Cunningham y Munns (1984) reportaron que cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* tolerantes a la acidez produjeron más EPS que aquellas sensibles, sugiriendo la posible existencia de una correlación entre la cantidad de EPS producida y la tolerancia a la acidez en rizobios. Sin embargo, Howieson *et al*. (1988) observaron que ciertas cepas de fenotipo "seco" pudieron crecer adecuadamente a pH 5,6-5,8. Por otra parte, en un estudio realizado con la cepa *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* CIAT899, no se encontró una correlación entre estas dos variables (Kingsley y Bohlool, 1992). A pesar de esto, diversas proteínas inducidas por pH han sido identificadas en *R. tropici* y *R. etli*, las cuales han mostrado una alta similitud con enzimas involucradas en la síntesis de exopolisacáridos (Peick *et al.*, 1999). Por el contrario, otro estudio reportó que el

gen *exoR* en *R. leguminosarum* bv. *viciae*, controla la producción de EPS (Reeve *et al.*, 1997); así, un mutante deficiente del gen *exo*R produjo más EPS que el tipo salvaje, pero resultó ser más sensible a la acidez.

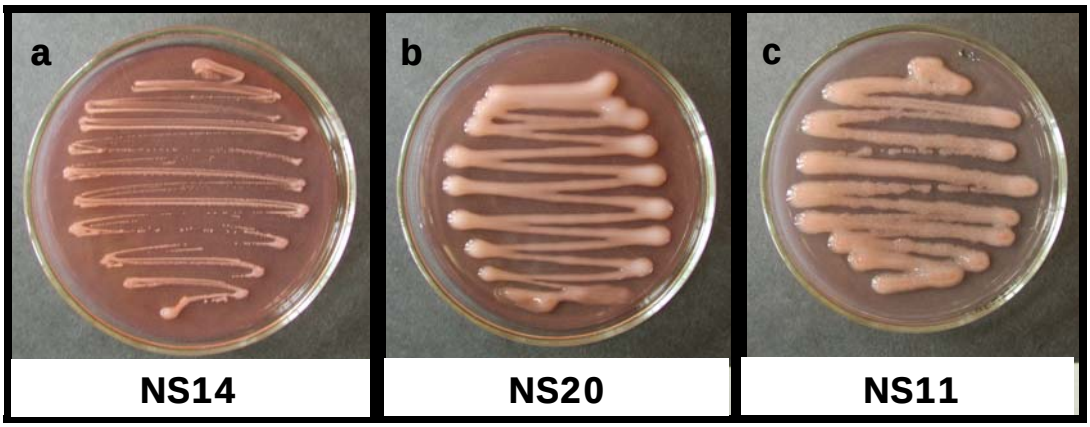

Figura 4. Morfología de cepas naturalizadas de *S. meliloti* aisladas desde suelos de la zona centro-sur de Chile, mostrando (a) bajo y (b, c) alto nivel de producción de exopolisacáridos.

4.2 Poblaciones de rizobios en suelos

La magnitud de las poblaciones de rizobios asociados a alfalfa, se estimaron a través del método del Número Más Probable (NMP) combinado con una técnica de inoculación en planta (Brockwell, 1963). Se observó una amplia variación en el número de rizobios presentes en los distintos suelos, con valores que fluctuaron entre 0 y $3{,}5\times10^4$ rizobios por g de suelo (Tabla 5). Estos resultados son consistentes con las observaciones de Young y Brockwell (1992) quienes encontraron que las poblaciones de *R. meliloti* asociadas a especies de *Medicago* anuales fluctuaron entre 3 y 1×10^5 rizobios g^{-1} en suelos con niveles de pH entre 4,7 y 7,25. La presencia de bajas poblaciones de *R. meliloti* (<100 rizobios g^{-1}) se asociaron a suelos con pH<6,5 (Brockwell *et al.*, 1991) (Figura 5).

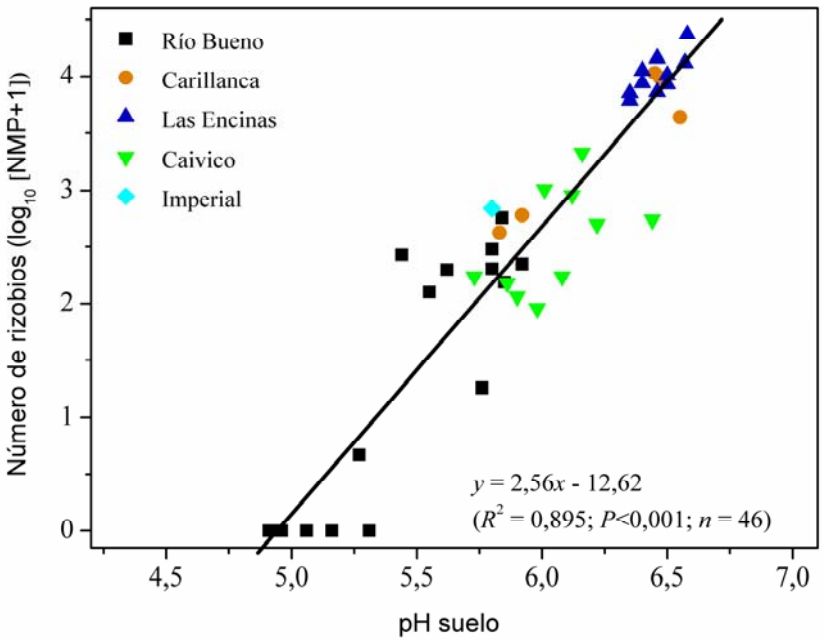

Figura 5. Relación entre el pH del suelo y las poblaciones de rizobios asociadas a *M. sativa* en suelos ácidos de la zona centro-sur de Chile.

Los mayores recuentos de rizobios se obtuvieron en suelos de pH neutro, como es el caso de Las Encinas y Carillanca, mientras que las menores poblaciones se registraron en aquellos suelos más ácidos. El pH del suelo (pH<6,5) es considerado un factor determinante sobre el número de rizobios asociados a *Medicago* en suelos (Howieson y Ewing, 1986; Brockwell *et al.*, 1991). Estudios previos han evidenciado el efecto detrimental de la acidez del suelo sobre la colonización y persistencia de *S. meliloti* en sistemas pratenses (Barber, 1980; Brockwell *et al.*, 1991; Ballard y Charman, 2000; Ballard *et al.*, 2003). Ballard *et al.* (2003) demostraron que la acidez redujo la sobrevivencia de rizobios asociados a alfalfa en suelos de Australia. Es así como no se detectaron rizobios en algunos suelos (pH 4,9-5,3) en Río Bueno, que habían sido establecidos con alfalfa hace 6 a 8 años, mientras que alrededor de un 20% del total de sitios estudiados presentaron poblaciones de rizobios menores a 100 rizobios g^{-1}. Estos bajos recuentos de rizobios pueden ser explicados según lo propuesto por Barber (1980), quien observó que el número de *R. meliloti* disminuía en la medida que aumentaba la acidez del suelo y la edad de las praderas de alfalfa. Existe consenso respecto a que poblaciones menores a 100 rizobios g^{-1} pueden producir una baja acumulación de MS en plantas de alfalfa debido a

una nodulación insuficiente (Brockwell *et al.*, 1988). Diversos estudios realizados en diferentes asociaciones rizobio-leguminosa concluyen que es poco probable que poblaciones de rizobios menores que 100 rizobios g^{-1} de suelo sean suficientes para inducir una nodulación adecuada en su hospedero (Brockwell *et al.*, 1987; Howieson y Ballard, 2004). Es probable que la presencia de arcillas de alta superficie específica (ej. alofán) favorezca la estabilización de los rizobios como ha sido recientemente reportado para *Pseudomonas putida*, donde las propiedades electrostáticas tanto de bacterias como de arcillas, parecieron gobernar la magnitud de la adsorción de las bacterias a las superficies minerales (Jiang *et al.*, 2007).

Por otra parte, los resultados revelaron una relación altamente significativa (P<0,001) entre el pH del suelo y el número de rizobios (Figura 5), lo que concuerda con otros estudios que han reportado la existencia de una relación altamente significativa entre el pH del suelo y la magnitud de las poblaciones de *S. meliloti*, indicando que el pH es el factor que determina la presencia de dichas poblaciones, a pesar que otros factores como es la presencia del hospedero también ejercería un efecto sobre el número de rizobios presentes en un suelo (Brockwell *et al.*, 1991; Young y Brockwell, 1992). Más aún, Palmer y Young (2000), encontraron una correlación positiva entre el pH y la diversidad de *R. leguminosarum* bv. *viciae* en suelos con un rango de pH entre 5,8 a 6,8. Sin embargo, otro estudio realizado por Ballard y Charman (2000) no encontró una relación entre ambas variables, probablemente porque los suelos estudiados excedían dicho valor de pH.

4.3 Autenticación de las cepas

El ensayo de autenticación de las cepas *in vitro*, mostró que la totalidad de éstas, con la sola excepción de la cepa NS26, fueron capaces de nodular las raíces de alfalfa. En general, las cepas produjeron pocos nódulos, pero de una coloración rojiza, lo cual es indicativo de la presencia de rizobios simbióticamente efectivos. Posteriores análisis deberían confirmar la identidad de las cepas aisladas como pertenecientes al genero *Sinorhizobium*.

4.4 Identificación molecular mediante amplificación del gen 16S rDNA

La técnica de amplificación del gen 16S rDNA realizada sobre los aislados, permitió la rápida discriminación entre cepas de *S. meliloti y S. medicae*. Asimismo, se observó una alta reproducibilidad en esta técnica, debido a la especificidad de la secuencia junto a una alta temperatura de alineación. En este caso, se evidenció que la totalidad de las cepas correspondían a *S. meliloti* (Figura 6). Por el contrario, la prueba de amplificación para *S. medicae* resultó negativa para todas las cepas, excepto las cepas NS26 y WSM 419.

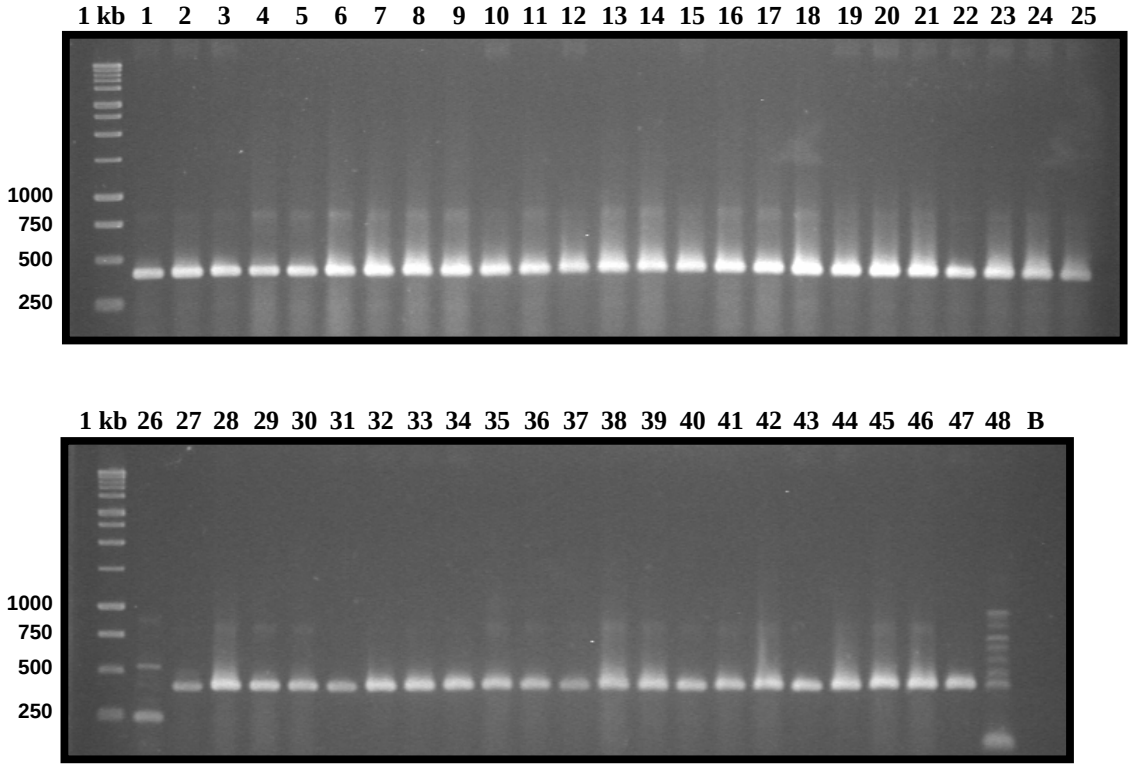

Figura 6. Amplificación del gen 16S rDNA mediante partidores 16SmWr F913 y 16SmWr R1330 en cepas naturalizadas de rizobios asociados a *M. sativa* en suelos ácidos de la zona centro-sur de Chile. (1 kb: marcador de peso molecular; 1-46: cepas naturalizadas; 47: *S. meliloti* WSM826; 48: *S. medicae* WSM419; B: blanco).

Resulta necesario indicar que las poblaciones de *S. meliloti* se obtuvieron únicamente a partir de nódulos y debido a que éstas representan sólo a una fracción de los rizobios, estos aislados

no serían necesariamente representativos de la población total presente en el suelo (Bromfield *et al.*, 1995). Sin embargo, al no existir evidencia de la presencia de cepas de *S. medicae* entre los aislados, cabría suponer que dicha especie no se encontraría en estos suelos, o al menos, no estaría nodulando la alfalfa presente en los sitios estudiados. Este hallazgo, junto con el hecho que *S. medicae* es capaz de nodular efectivamente la alfalfa y dado que es una especie más tolerante a la acidez que *S. meliloti*, sugiere que la productividad de la alfalfa podría verse mejorada con la incorporación de *S. medicae*, o al menos, justificaría la necesidad de evaluar su comportamiento simbiótico con alfalfa bajo condiciones de acidez, como una posible estrategia para mejorar la productividad y persistencia de esta especie en suelos ácidos.

4.5 Identificación molecular mediante secuenciación parcial del gen 16S rDNA

La amplificación de ADN con distintas combinaciones de partidores se muestra en la Figura 7.

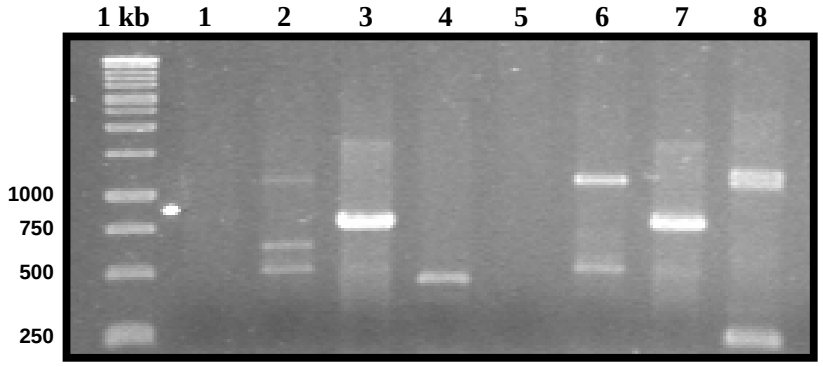

Figura 7. Amplificación por PCR de ADN genómico mediante diferentes combinaciones de partidores en cepas NS4 (columnas 1-4) y NS26 (columnas 5-8).

Partidores utilizados por reacción: 1 kb (marcador de peso molecular), 1 y 5 (20F + 1190R), 2 y 6 (420F + 1540R), 3 y 7 (420F + 1190R), 4 y 8 (FGPS).

Es posible observar que solamente la combinación de partidores 420F y 1190R permitió la amplificación del ADN en ambas cepas, la que se puso en evidencia mediante la visualización de una banda de 770 pb. Es por esta razón, que se realizó la secuenciación parcial (y no completa) del gen 16S rDNA.

La amplificación parcial por PCR corroboró que todos los aislados correspondieron a *S. meliloti*, no detectándose cepas de *S. medicae*. La identidad de la cepa NS4 fue confirmada mediante la secuenciación parcial del gen 16S rDNA, el cual mostró que dicha cepa presenta una homología de un 100 % con las cepas *S. meliloti* CC2013 y *S. meliloti* S33, aisladas en suelos de Australia y Estados Unidos, respectivamente. Es interesante mencionar que la cepa *S. meliloti* CC2013 es ecológicamente peculiar en cuanto a su rango de hospedero, siendo capaz de nodular efectivamente a la especie *Trigonella suavissima* (una especie endémica de Australia), la cual presenta una alta selectividad por el rizobio. Este aislado podría representar una línea filogenética antigua, o bien, puede haberse originado por reiteradas recombinaciones cromosomales (Eardly *et al.*, 1990).

Los resultados aquí expuestos son similares a aquellos obtenidos por Yan *et al*. (2000) quienes reportaron la presencia casi exclusiva de cepas de *S. meliloti* asociados a *Medicago sativa* y *Melilotus* spp. en suelos de China. Asimismo, diversos autores destacan la gran capacidad de este rizobio de asociarse y nodular efectivamente la alfalfa (Jebara *et al.*, 2001; Biondi *et al.*, 2003).

4.6 Diversidad genética de aislados de *S. meliloti*

El análisis de PCR-*fingerprinting* mediante el partidor *nif* RPO1, mostró una alta diversidad genética entre los aislados (Figura 8).

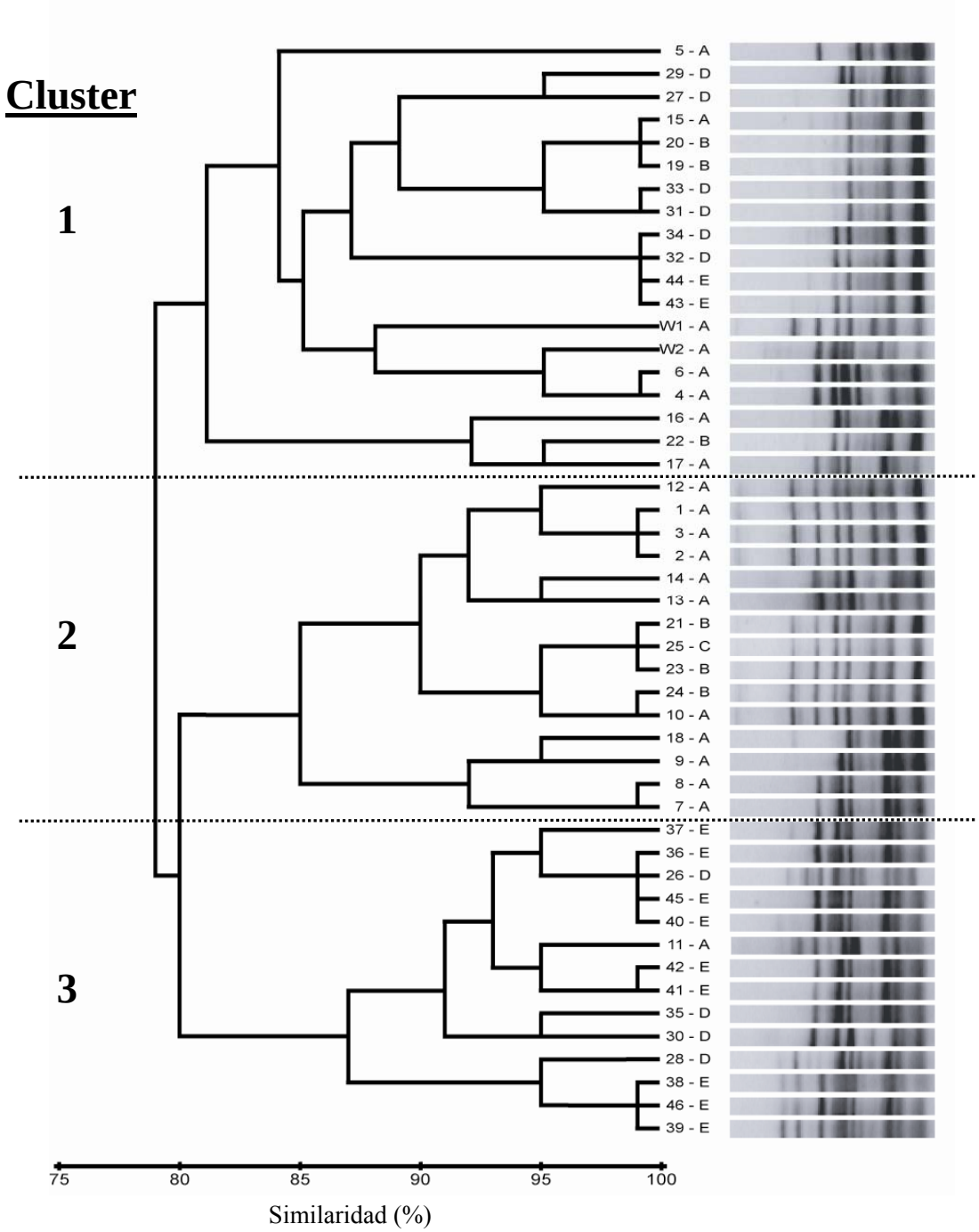

Figura 8. Relaciones genéticas entre cepas de *S. meliloti* aisladas de suelos ácidos de la zona centro-sur de Chile, mediante PCR-*fingerprinting* con el partidor RPO1.

Cepa: 1-46: cepas naturalizadas; W1: *S. meliloti* WSM2116; 48: *S. meliloti* WSM826. Suelos: A: Río Bueno; B: Carillanca; C: Imperial; D: Caivico; E: Las Encinas; F: Colección WSM Murdoch University, Perth, Australia.

La utilización de la técnica de PCR-*fingerprinting* con el partidor RPO1 permitió, en una sola reacción, la obtención de numerosas bandas, permitiendo la detección de polimorfismo lo suficientemente alto para el análisis genético de los rizobios, lo cual representó una ventaja sobre los métodos basados en el uso de partidores no específicos (Chueire *et al.*, 2000). Asimismo, la alta reproducibilidad obtenida por esta técnica, se debió probablemente a la especificidad de la secuencia de 20 pb del partidor, junto a una alta temperatura de alineamiento (Laranjo *et al.*, 2002). Cabe destacar que la secuencia del partidor RPO1 corresponde a una región conservada dentro de la región del promotor *nif*HDK en *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* ANU843, la cual está repetida entre 5-10 veces dentro del plásmido simbiótico en esta especie. Dentro de la secuencia (primeros 9 nucleótidos del extremo 3') también se encuentra el elemento consenso del promotor del gen *nif*, altamente conservado y presente en especies de rizobios de crecimiento rápido.

En relación al análisis filogenético, el análisis cluster reveló la presencia de una alta diversidad genética, separada en tres grandes grupos. En relación a estos resultados, diversos estudios han reportado una amplia diversidad genética a nivel de cepa en *S. meliloti* (Paffetti *et al.*, 1996; Gandee *et al.*, 1999; Carelli *et al.*, 2000; Jebara *et al.*, 2001; Roumiantseva *et al.*, 2002; Zribi *et al.*, 2005). Paffetti *et al*. (1996) analizaron la diversidad genética de cepas de *R. meliloti* aisladas a partir de nódulos de diferentes cultivares de alfalfa establecidas en dos suelos en Italia. Dichos autores encontraron que el tipo de suelo y el cultivar de alfalfa fueron responsables de una alta variación genética entre los distintos aislados. Sin embargo, las diferencias químicas y físicas del suelo también ejercerían un cierto efecto sobre la variación genética encontrada. De hecho, varios autores sostienen que el tipo de suelo constituye un factor determinante sobre la diversidad genética de poblaciones de *R. leguminosarum* (Strain *et al.*, 1994) y *Sinorhizobium* spp. (Zribi *et al.*, 2005).

El análisis filogenético reveló una relación entre la diversidad genética de las cepas y el pH del suelo desde el cual éstas fueron aisladas. Por ejemplo, salvo sólo algunas excepciones, las cepas pertenecientes al grupo 1 provenian de los suelos Carillanca, Río Bueno y Caivico, los cuales presentaron valores de pH entre 4,9 y 6,5. Las cepas pertenecientes al grupo 2 fueron aisladas desde los suelos Carillanca, Río Bueno e Imperial que registraron valores de pH más

ácidos (5,0-5,8), mientras que las cepas pertenecientes al grupo 3 se encontraron en los suelos Las Encinas y Caivico, con valores de pH entre 6,1 y 6,6. Asimismo, se observó que praderas establecidas más recientemente, como Las Encinas (2 años) presentaron un mayor valor de pH, una menor diversidad genética y un alto número de rizobios (283-18.800 rizobios g^{-1}) a diferencia de praderas establecidas en Río Bueno (3-10 años) que mostraron menores valores de pH, una mayor diversidad genética y bajo recuento de rizobios (0-750 rizobios g^{-1}). Estos resultados difieren a los reportados por Harrison *et al*. (1989) quienes encontraron una menor diversidad de *R. leguminosarum* biovar *trifolii* en suelos ácidos (pH 4,2-4,4), asociados a bajos recuentos de rizobios (<100 rizobios g^{-1}), mientras que Dughri y Bottomley (1983) reportaron un efecto de la acidez sobre la dominancia de distintos serogrupos en *R. trifolii*. Roumiantseva *et al*. (2002) concluyeron que la alta variación genética observada entre cepas de *S. meliloti* aisladas en Asia Central, se debería a los efectos conjuntos de la mutación, recombinación y selección. Específicamente, se ha observado que el contenido de materia orgánica y arcilla, junto al pH, tienen un efecto significativo en la transferencia de plásmidos entre cepas de *R. fredii* (Richaume *et al.*, 1989).

Por otra parte, los resultados sugieren que la diversidad genética de los aislados puede ser atribuida a un efecto combinado entre el tipo de suelo, su origen geográfico y/o un efecto del cultivar de alfalfa, a pesar que estudios realizados previamente por Carelli *et al*. (2000) mostraron que el efecto del cultivar de alfalfa o del tipo de suelo no fue mayormente responsable de la presencia de una población de rizobios genéticamente heterogénea.

Es importante destacar que la amplia diversidad genética observada en estos suelos muestra la complejidad de la población de estos rizobios y pone de manifiesto la dificultad de predecir su interacción con aquellas cepas que puedan ser eventualmente introducidas como inoculantes comerciales (Handley *et al.*, 1998). También se ha observado que la diversidad de rizobios puede determinar la capacidad de ciertas especies de leguminosas de habitar un determinado ecosistema. Es así como recientes estudios filogenéticos realizados sobre *S. medicae* y *S. meliloti* indican que la distribución geográfica de los rizobios, genéticamente diversos, ejerce una fuerte influencia sobre la distribución de especies de *Medicago*, así como su capacidad para colonizar nuevas áreas (Béna *et al.*, 2005). Lo anterior reafirma la importancia del estudio

de la diversidad en cepas naturalizadas de *S. meliloti*, no sólo por su rol como microsimbionte de la alfalfa, sino también como un factor determinante de la presencia de especies de *Medicago* en nuestros suelos.

4.7 Tolerancia a la acidez en cepas de *S. meliloti*

La Tabla 7 muestra el efecto del bajo pH el crecimiento de *S. meliloti* en placas con medio YMA, evaluado a distintas densidades celulares.

Tabla 7. Efecto de la acidez sobre el crecimiento de cepas naturalizadas de *Sinorhizobium meliloti* en medio YMA a diferentes concentraciones celulares.

Cepa	Concentración celular (células mL^{-1})					
	10^6		10^7		10^8	
	pH 5,0	pH 5,5	pH 5,0	pH 5,5	pH 5,0	pH 5,5
NS5	-	+	-	+	+	++
NS11	-	+	+	+++	++	+++
NS13	-	++	-	+++	++	+++
NS15	-	++	-	++	+	+++
NS18	-	+	-	++	+	+++
NS21	-	++	-	+++	++	+++
NS34	-	++	+	+++	++	+++
NS45	-	+	+	++	++	+++
NS46	-	+	+	++	++	+++
WSM826	-	+	+	++	++	+++
WSM2114	-	+	-	++	++	+++

Rangos de crecimiento: (-) sin crecimiento, (+) mínimo, (++) bajo, (+++) alto.

Ninguna de las cepas creció a pH 4,5. Por el contrario, la totalidad de las cepas mostró un alto nivel de crecimiento a pH 6,0 comparado con su control a pH 7,0 (datos no mostrados). Se observó un alto crecimiento de colonias a altos niveles de pH y altas densidades celulares. Si bien es cierto no se observaron diferencias significativas en el grado de tolerancia a la acidez

entre los aislados, sin embargo, es interesante indicar que algunas cepas mostraron un mayor crecimiento de colonias a pH 5,5 con una concentración de 10^6 células mL^{-1} (NS13, NS15, NS21 y NS34) y 10^7 células mL^{-1} a pH 5,0 (NS11, NS34, NS45 y NS46).

Diversos estudios han evaluado la tolerancia a la acidez en rizobios bajo condiciones de laboratorio e invernadero (Dilworth *et al.*, 2000; Watkin *et al.*, 2000). Se ha demostrado que la acidez incrementa el tiempo de replicación y disminuye la tasa de crecimiento en rizobios asociados a alfalfa en medios de cultivo, solución nutritiva y suelos (Segundo *et al.*, 1999). El mayor crecimiento en rizobios evaluados a altas densidades celulares puede asociarse a una respuesta adaptativa a la acidez (ATR) previamente reportada en rizobios (Dilworth *et al.*, 2000; Rickert *et al.*, 2000). Al parecer, las células en contacto directo con el medio sólido actuarían como una barrera protectora contra el estrés ácido, protegiendo a aquellas situadas a mayor distancia de la superficie del medio de cultivo, lo que les permitiría desarrollarse adecuadamente.

Cabe destacar que no se observó una relación entre el origen geográfico de la cepa y su grado de tolerancia a la acidez. Sin embargo, algunos autores sostienen que cabría esperar diferencias en el grado de tolerancia a la acidez a nivel de cepa en suelos ácidos (Gemmel y Roughley, 1993).

4.8 Amplificación del gen *fsr*R como posible mecanismo de tolerancia a la acidez en *S. meliloti*

La amplificación del gen *fsr*R no arrojó resultados positivos en las cepas naturalizadas de *S. meliloti*, lo cual indicaría la ausencia de este mecanismo como posible explicación a las diferencias observadas en el grado de tolerancia a la acidez. A pesar que la presencia de variaciones significativas en el grado de tolerancia a la acidez confirma la teoría de la existencia de una base genética para dicha variación, ésta no ha sido encontrada hasta ahora para *S. meliloti*, a diferencia de lo que ocurre en *S. medicae* WSM419, donde la presencia del gen *fsr*R, activa transcripcionalmente al gen *lpi*A, lo cual le confiere tolerancia a la acidez (Reeve *et al.*, 2006).

4.9 Efectividad simbiótica en cepas de *S. meliloti*

Se observaron diferencias significativas en cuanto a nodulación, contenido de MS y capacidad simbiótica en los tratamientos inoculados con las distintas cepas analizadas (Tabla 8).

Tabla 8. Efecto de la inoculación con cepas naturalizadas de *S. meliloti* y cepas de referencia sobre la nodulación, producción de materia seca y capacidad simbiótica en *M. sativa* cv. Sceptre en suelo Merredin a dos niveles de pH en condiciones de invernadero.

Cepas	Nodulación (0 - 4)		Rendimiento (mg MS maceta^{-1})		Capacidad Simbiótica[b] (§)	
	pH 5,0	pH 5,5	pH 5,0	pH 5,5	pH 5,0	pH 5,5
Naturalizadas						
NS5	0,0 c	3,0 bc	29 bcd	58 cd	0,26 e-	0,28 e-
NS11	0,2 c	3,4 abc	20 d	93 abc	-0,13 i	0,73 E
NS13	0,3 bc	3,2 bc	25 cd	85 bc	0,09 e-	0,63 e
NS15	0,5 bc	3,5 ab	35 abc	75 c	1,17 E	0,53 e
NS18	0,6 bc	3,3 abc	29 bcd	73 c	0,26 e-	0,47 e
NS21	0,8 ab	3,4 abc	35 abc	77 c	0,52 e	0,53 e
NS34	0,6 bc	3,4 abc	36 abc	83 c	0,57 e	0,60 e
NS45	0,2 c	1,6 d	37 abc	86 bc	0,61 e	0,64 e
NS46	0,4 bc	3,1 bc	41 ab	86 bc	0,78 E	0,64 e
Promedio	0,4 bc	3,1 bc	32 bc	80 c	0,46 e	0,56 e
Referencia						
WSM419	0,8 ab	2,6 bcd	32 bc	67 de	0,39 e	0,40 e
WSM2114	1,3 a	3,8 a	33 bc	64 c	0,43 e	0,36 e
WSM826	0,0 c	3,4 abc	27 cd	122 a	0,17 e-	1,10 E
Control						
-N[a]			23 cd	36 d		
+N[a]			46 a	114 ab		
DMS ($P \leq 0,05$)	0,6	0,6	11	26		

[a] Controles no inoculados con (+N) y sin (-N) nitrógeno.

[b] Indice de efectividad simbiótica: (E: alta; e: moderada; e-: baja; i: nula)

Valores seguidos con la misma letra en una columna no son significativamente distintos ($P \leq 0,05$) según análisis de Diferencia Mínima Significativa (DMS).

Se evidenció que las variaciones observadas en los parámetros simbióticos fueron dependientes del genotipo de rizobio y el nivel de acidez.

La nodulación fue significativamente afectada a pH 5,0, mostrando valores entre 0 y 1,3. Por el contrario, ésta aumentó a pH 5,5, donde algunas cepas naturalizadas (NS11, NS15, NS21 y NS34) no mostraron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) con las cepas de referencia WSM2114 y WSM826. Esto resulta particularmente interesante debido a que estudios previos han destacado la capacidad de la cepa WSM826 de nodular efectivamente varias especies de *Medicago* anuales y alfalfa (Howieson *et al.*, 2000b). Lo anterior sugiere que dichas cepas podrían presentar un comportamiento simbiótico similar o incluso superior a las cepas comerciales, debido a que estarían mejor adaptadas a las condiciones edafoclimáticas locales. A pesar que la mayoría de esas cepas fueron las mismas que exhibieron mayor tolerancia a la acidez en medio YMA, sin embargo, es posible concluir que no existe una relación directa entre el grado de tolerancia a la acidez y la efectividad simbiótica.

A pesar que las cepas NS5 y WSM826 mostraron una adecuada nodulación a pH 5,5, ambas fueron más sensibles a pH 5,0, donde no presentaron nodulación. Resultados similares han sido reportados por Cheng *et al*. (2002), quienes observaron un retraso en el desarrollo de nódulos en plantas de alfalfa creciendo en suelos a pH_{ca} 4,3. Asimismo, otro estudio conducido por Munns (1965) concluyó que las cepas de *S. meliloti* diferían considerablemente en su capacidad para nodular alfalfa en suelos ácidos. Estudios realizados en suelos del centro-sur de Chile indican que la acidez constituye el principal factor limitante del desarrollo de la alfalfa, afectando la nodulación y por ende, la producción de MS en alfalfa (Urzúa *et al.*, 1995). En promedio, el aumento de la acidez produjo una disminución de la nodulación en un 84 %, lo cual se debería principalmente al efecto detrimental de la acidez en la sobrevivencia y el crecimiento de los rizobios, lo cual afectaría el desarrollo y funcionamiento de los nódulos (Munns, 1968).

Por otra parte, la producción de MS en las plantas también se vio afectada por la acidez, alcanzando valores promedio de 83 y 34 mg MS por maceta, a pH 5,5 y 5,0, respectivamente, lo que representa una disminución cercana al 60 %. En general, las plantas fertilizadas con N

mineral (+N) acumularon más MS que los tratamientos inoculados con rizobios o aquellos que no fueron ni inoculados ni fertilizados con N (-N). Esto es debido a que el contenido de N en el suelo fue lo suficientemente bajo como para observarse una respuesta a la fertilización nitrogenada. A pesar que la recomendación de fertilización en alfalfa indica que no es necesario aplicar N al cutlivo, ya que el mayor suministro proviene de la FSN, las plantas podrán extraer el N desde el suelo si éste se encuentra disponible (Hannaway y Shuler, 1993).

Algunas cepas naturalizadas mostraron valores similares a aquellos obtenidos por las cepas de referencia a ambos niveles de pH. Sin embargo, las cepas NS15 y NS46 fueron simbióticamente más efectivas que las cepas de referencia bajo condiciones de mayor acidez (pH 5,0). Por otra parte, las cepas NS11 y WSM826 mostraron una mayor efectividad a pH 5,5. Estos resultados son congruentes con aquellos reportados por Delavechia *et al*. (2003), quienes observaron que una baja nodulación se tradujo en una menor acumulación de MS en alfalfa en un suelo ácido (pH 5,5).

Si bien es cierto, ninguna cepa naturalizada mostró parámetros simbióticos significativamente mayores que las cepas de referencia, es interesante mencionar que la cepa NS11 fue la única cepa (incluidas las cepas de referencia) que mostró los mayores valores en los tres parámetros simbióticos analizados, lo cual es considerado una característica esencial del rizobio para su utilización como inoculante de elite (Howieson *et al.*, 2000a).

Los resultados obtenidos concuerdan con diversos estudios que han demostrado la amplia variación existente en términos de efectividad simbiótica en cepas nativas de *S. meliloti*, destacando su alta capacidad de formar una simbiosis efectiva con la alfalfa (Ballard y Charman, 2000; Bradic *et al.*, 2003; Evans *et al.*, 2005b). En un estudio realizado por Bradic *et al*. (2003), se observó una gran variación en el rendimiento de MS (12-26 g^{-1} por maceta) en plantas de alfalfa inoculadas con varias cepas nativas de *S. meliloti*. Asimismo, se reportaron diferencias significativas en la efectividad simbiótica de rizobios asociados a alfalfa aislados desde suelos ácidos de Argentina y Uruguay, concluyendo que la cepa LPU63 puede ser utilizada como un inoculante efectivo para alfalfa en suelos ácidos (Segundo *et al.*, 1999). Asimismo, Gandee *et al*. (1999) observaron que la presencia de rizobios nativos en un suelo,

adaptados a las condiciones locales, fueron capaces de formar una simbiosis efectiva con alfalfa. Claramente, dichos estudios destacan la importancia que tienen los rizobios nativos como una fuente de nuevos inoculantes para alfalfa.

Debido a que es común la presencia de suelos moderadamente ácidos en el centro-sur de Chile, la presencia de cepas naturalizadas con un adecuado potencial de fijación de N bajo condiciones de acidez podría incrementar la productividad y persistencia de esta especie forrajera en dichos suelos. A pesar que resulta evidente la inexistencia de una relación entre el grado de tolerancia a la acidez y la eficiencia simbiótica en las cepas estudiadas, lo cual ha sido demostrado por varios autores (Howieson *et al.*, 1988), los resultados sugieren que la cepa NS11 es una buena alternativa a ser considerada en el desarrollo de nuevos inoculantes para alfalfa. La utilización de estas cepas también podría contribuir a la incorporación de N en agroecosistemas de la zona centro-sur del país, reduciendo así la necesidad de incorporar altos volúmenes de fertilizantes nitrogenados, necesarios para mantener la productividad vegetal y animal.

4.10 Efecto de Al sobre el contenido de materia seca y la exudación de ácidos orgánicos en *M. sativa*

Al en solución ejerció un efecto detrimental significativo sobre la acumulación de MS de la parte aérea y radical en plantas de diferentes cultivares de alfalfa (Figura 9).

A pesar que las raíces de plantas sometidas a estrés por Al mostraron claros signos de toxicidad, el mayor efecto de Al se evidenció en la acumulación de MS en la parte aérea de dichas plantas. Esto claramente indica que Al afectó la absorción de nutrientes, repercutiendo en un menor crecimiento aéreo de las plantas. Por otra parte, los resultados mostraron que la magnitud de dicho efecto fue dependiente del cultivar de alfalfa.

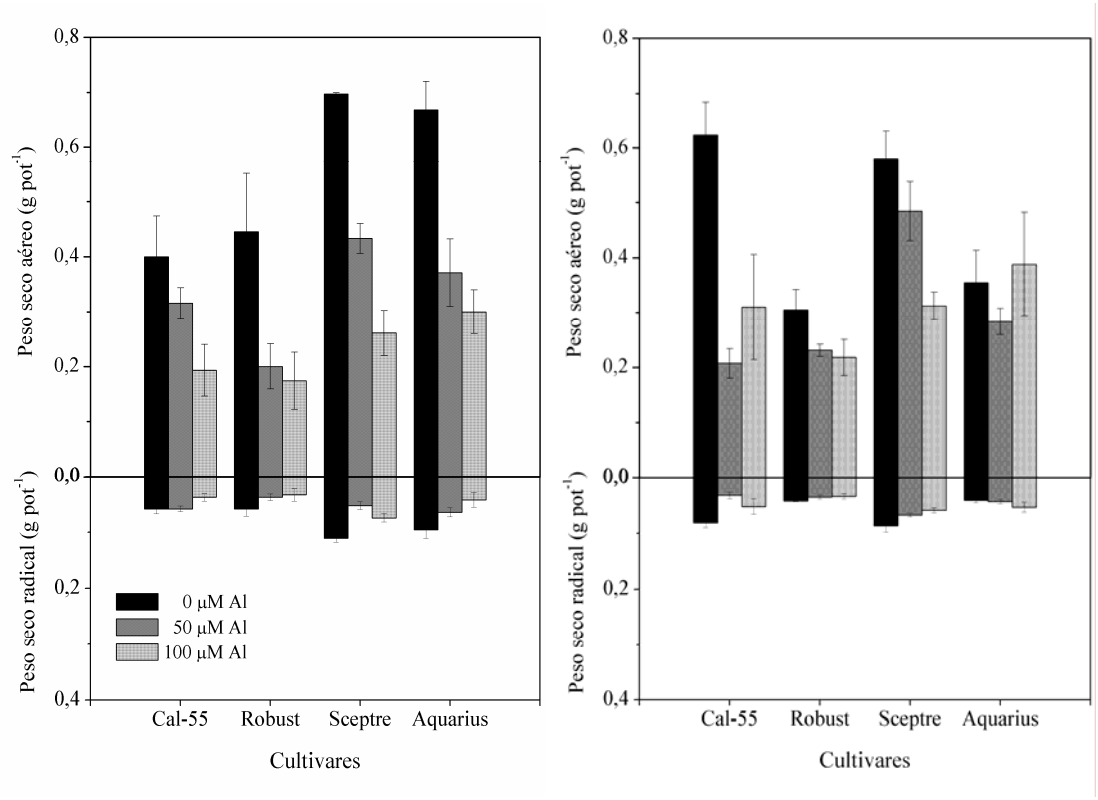

Figura 9. Efecto de Al sobre la acumulación de materia seca (g MS maceta^{-1}) en la parte aérea y radical de cuatro cultivares de *M. sativa* en solución nutritiva a dos niveles de pH.

Valores promedio de tres repeticiones. Barras en columnas representan error estándar.

Cuando las plantas se expusieron a 50 µM Al en solución, se observó una reducción del contenido de MS entre 21 y 55 %, respecto del tratamiento sin Al y que correspondió a los cultivares California 55 y Robust, respectivamente. Por otra parte, niveles de 100 µM Al en solución ocasionaron una reducción entre 52 y 63 % respecto del tratamiento sin Al en los cultivares California 55 y Sceptre, respectivamente. Las diferencias registradas en el contenido de MS de los cultivares estudiados muestran la existencia de diferentes potenciales de producción bajo condiciones óptimas (sin Al), así como una respuesta diferencial de los cultivares de alfalfa frente a la toxicidad por Al, lo cual se tradujo en distintos niveles de crecimiento de las plantas. La presencia de una respuesta diferencial a Al tanto a nivel de especie como de cultivares en una misma especie ha sido previamente reportado por Foy (1988). Por lo tanto, resulta lógico suponer que aquellos cultivares que muestren un mayor

grado de tolerancia a Al en solución nutritiva podrán exhibirla también en condiciones de campo.

Los niveles de P y Al foliar y radical en alfalfa en función del nivel de Al y pH en solución nutritiva se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Contenido de P (%) y Al (g kg^{-1}) en la parte aérea y radical en cuatro cultivares de *M. sativa* sometidos a estrés por Al en solución nutritiva a pH 4,5 y 6,0.

	pH 4,5				**pH 6,0**			
	Parte aérea		**Raíz**		**Parte aérea**		**Raíz**	
Al (µM)	P (%)	Al (g kg^{-1})	P (%)	Al (g kg^{-1})	P (%)	Al (g kg^{-1})	P (%)	Al (g kg^{-1})
				California 55				
0	0,14 abA	0,05 abA	0,23	0,23	0,13 abA	0,03 cdB	0,29	0,08
50	0,15 abA	0,09 aA	0,32	6,08	0,13 abA	0,06 abB	0,36	3,70
100	0,14 abA	0,10 aA	0,32	7,84	0,14 abA	0,07 aB	0,30	3,04
				Robust				
0	0,17 abA	0,03 cA	0,29	0,30	0,16 abA	0,02 dA	0,35	0,04
50	0,15 abA	0,03 cA	0,31	6,83	0,16 abA	0,06 abcA	0,40	3,66
100	0,18 aA	0,05 abA	0,30	7,03	0,15 abA	0,07 aA	0,35	3,10
				Sceptre				
0	0,13 abA	0,04 abA	0,27	0,27	0,11 abA	0,03 dA	0,27	0,02
50	0,17 abA	0,05 abA	0,32	7,08	0,17 aA	0,03 cdB	0,31	2,48
100	0,15 abA	0,09 aA	0,38	7,20	0,15 abA	0,03 cdB	0,29	2,21
				Aquarius				
0	0,12 bA	0,04 abA	0,23	0,28	0,10 bA	0,02 dA	0,32	0,05
50	0,14 abA	0,06 bA	0,26	5,46	0,13 abA	0,03 dB	0,34	2,96
100	0,14 abA	0,06 bA	0,28	6,35	0,13 abA	0,04 bcdA	0,27	2,32

Promedios seguidos con distintas letras minúsculas o mayúsculas en columnas o filas, repectivamente, indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$) según la Prueba de Comparación Múltiple de Tukey o prueba *t*-student para dos muestras independientes. Datos correspondientes a P y Al en parte aérea fueron calculados en triplicado, mientras que el contenido de P y Al en raíces corresponden a un único valor.

Respecto al contenido de P foliar, no se registraron diferencias significativas en los diferentes cultivares a ambos niveles de pH. Sin embargo, se observó un aumento en el contenido de Al foliar en los cultivares California 55 y Robust a ambos niveles de pH. En cambio, el contenido de P y Al radical aumentó considerablemente en aquellas plantas expuestas a Al. Los mayores niveles de Al radical se registraron en plantas sometidas a pH 4,5 y 100 µM Al, los cuales fueron desde 6,35 a 7,84 g Al kg^{-1} en los cultivares Aquarius y California 55, respectivamente. Por su parte, los niveles de P en raíces fueron entre 0,28 y 0,38 % en los cultivares Aquarius y Sceptre, respectivamente.

Estos resultados concuerdan con los reportados por Zheng *et al*. (2005), quienes estudiaron la inmovilización de Al con P en dos cultivares de *Fygopyrum esculentum* con diferente grado de tolerancia a Al, reportando altas concentraciones de P y Al en raíces del cultivar resistente, lo que sugiere que la inmovilización de Al mediante la precipitación con P en la raíz puede haber contribuido a aliviar los efectos tóxicos de Al. Esta hipótesis se reafirma con el hecho que los niveles de P radical aumentaron en la medida que se incrementó la concentración de Al en solución. La precipitación de Al con P (como fosfatos de Al) a nivel radical ha sido descrita como un mecanismo de tolerancia a Al en plantas tolerantes (Gaume *et al.*, 2001). En estudios realizados en maiz, Gaume *et al*. (2001) reportaron que junto a una mayor precipitación de Al, el cultivar resistente tuvo una mayor capacidad de utilizar el P, gracias a un mecanismo activo de transporte del complejo Al-P desde la pared celular hacia la vacuola (Vásquez *et al.*, 1999).

La exudación de ácidos orgánicos dependiente de Al ha sido ampliamente descrita como un importante mecanismo mediante el cual, algunas especies vegetales pueden minimizar los efectos tóxicos de Al presente en suelos ácidos (Ma *et al.*, 2001; Ryan *et al.*, 2001; Barceló y Poschenrieder, 2002; Kochian *et al.*, 2004). Los resultados obtenidos muestran que la exudación de ácido cítrico aumentó significativamente en respuesta a Al, siendo la magnitud de dicha respuesta dependiente del cultivar de alfalfa (Figura 10).

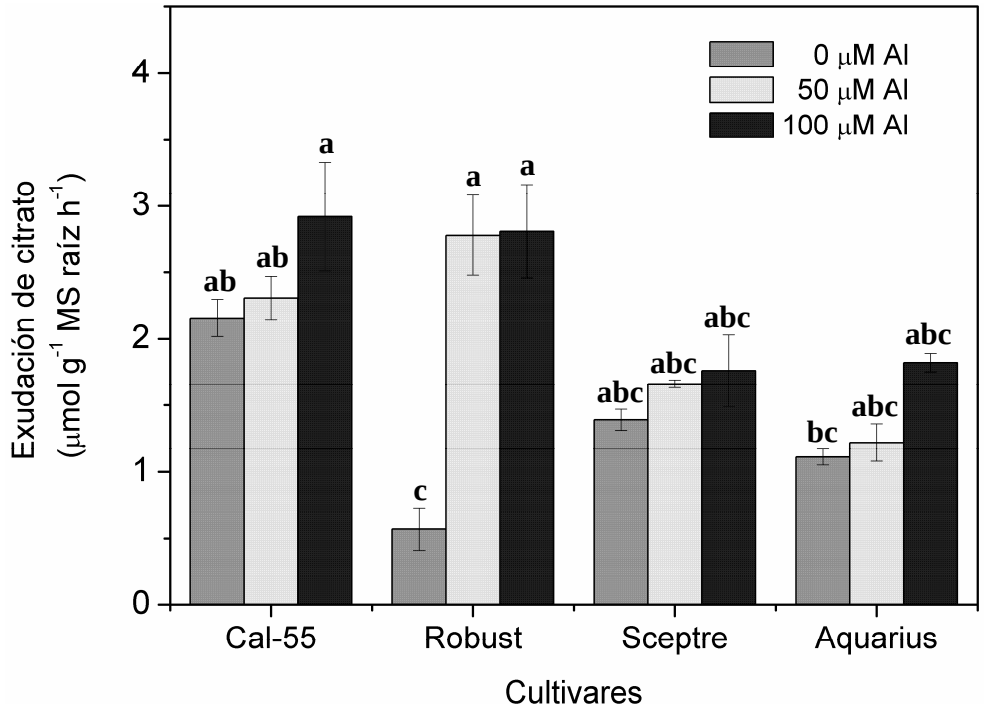

Figura 10. Efecto de la concentración de Al sobre la exudación de citrato (μmol g^{-1} MS raíz h^{-1}) en cuatro cultivares de *M. sativa* en solución nutritiva a pH 4,5.

Columnas con letras distintas para cada cultivar indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$) según la Prueba de Comparación Múltiple de Tukey. Valores promedio de tres repeticiones. Barras en columnas representan error estándar.

La exudación de citrato fue mayor en los cultivares California 55 y Robust sometidos a estrés por Al, en comparación al testigo sin Al. A pesar que los niveles de exudación de citrato en estos cultivares fueron mayores a los cultivares Sceptre y Aquarius, dichas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Ginting *et al*. (1998) en un estudio realizado con soya en solución nutritiva a pH 4,25, observaron que el citrato fue el ligando que presentó la mayor capacidad de complejar Al. Previamente, Lipton *et al*., (1987) reportaron una mayor exudación de citrato en plantas de alfalfa expuestas a déficit de P comparado con plantas que recibieron un suministro adecuado de P. Por otra parte, la exposición de plantas de soya a Al se tradujo en un aumento en la exudación de citrato, la cual fue dependiente del cultivar utilizado (Silva *et al.*, 2001).

Respecto de la exudación de succinato por parte de las plantas, se observó una tendencia similar a la registrada con el citrato, esto es, una mayor exudación a niveles crecientes de Al, con un rango de exudación entre 0,57 y 3,07 μmol g^{-1} MS raíz h^{-1} (Figura 11).

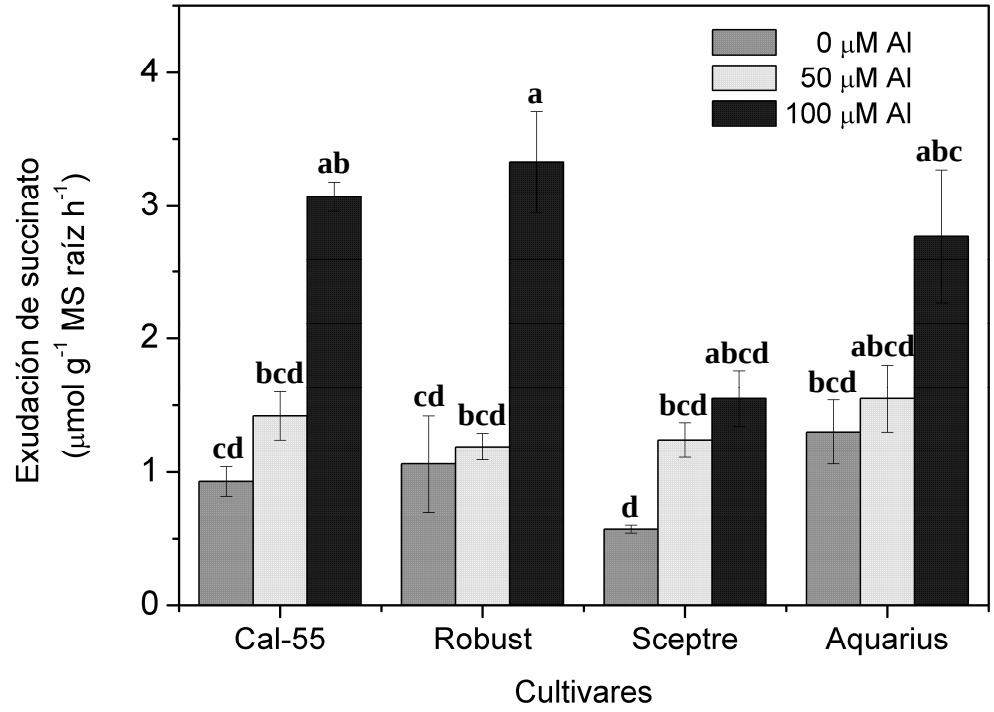

Figura 11. Efecto de la concentración de Al sobre la exudación de succinato (μmol g^{-1} MS raíz h^{-1}) en cuatro cultivares de *M. sativa* en solución nutritiva a pH 4,5.

Columnas con letras distintas para cada cultivar indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$) según la Prueba de Comparación Múltiple de Tukey. Valores promedio de tres repeticiones. Barras en columnas representan error estándar.

Sin embargo, los resultados de la especiación química indican que no existe complejación de Al por el succinato, por lo que su rol como mecanismo de tolerancia a Al resultaría poco probable (Tabla 10). Esto concuerda con lo informado por ciertos autores quienes sostienen que el succinato corresponde a un ligando de carácter débil, con una baja capacidad para detoxificar Al (Hue *et al.*, 1986). Estudios previos han demostrado que la exudación de succinato en plantas de alfalfa se produce preferentemente en condiciones de baja disponibilidad de P (Lipton *et al.*, 1987). Dichos autores también detectaron la presencia de altos niveles de citrato y malato en los exudados de plantas que crecieron en una solución

nutritiva completa, mientras que una concentración de citrato significativamente mayor fue observada en los exudados de plantas sometidas a deficiencia de P. En ambos casos, el succinato constituyó una pequeña fracción de los ácidos orgánicos presentes en los exudados.

Si bien es cierto, se observó que los cultivares de alfalfa incrementaron la tasa de exudación de citrato y succinato en respuesta a Al, la concentración de estos ácidos orgánicos en la solución nutritiva estuvo directamente relacionada a la fitomasa radical total de cada tratamiento. Es así como una alta tasa de exudación (µmol g^{-1} MS raíz h^{-1}) se tradujo en una mayor concentración de ácido exudado, solamente en aquellos tratamientos que alcanzaron una adecuada fitomasa radical lo suficientemente grande para asegurar una concentración apropiada de citrato en solución, que permita aliviar (aunque sea de manera parcial) el efecto fitotóxico de Al. De esta forma se obtuvieron diferentes concentraciones de citrato en solución nutritiva, lo cual se muestra en las Figuras 12 y 13.

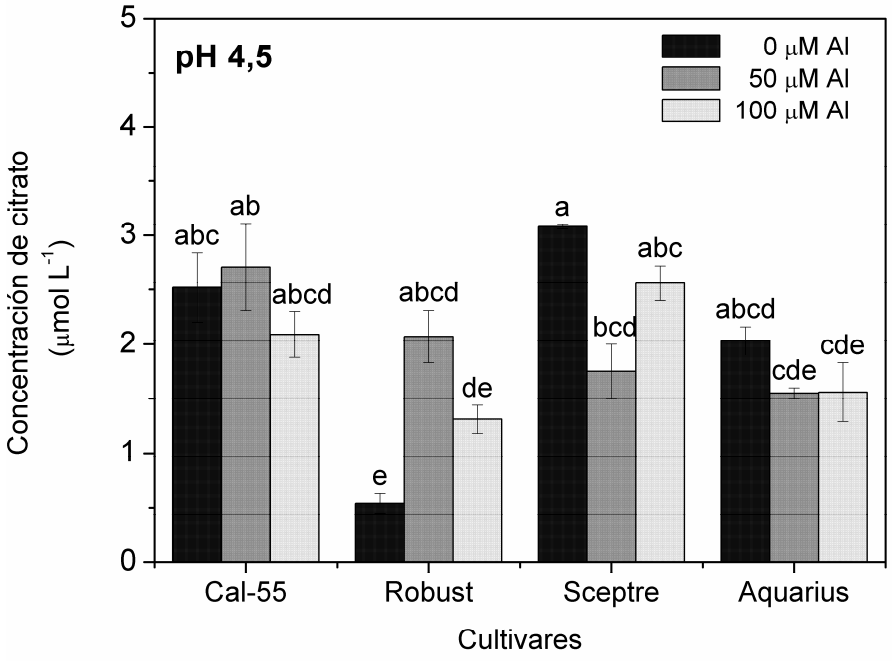

Figura 12. Concentración de citrato (µmol L^{-1}) en solución nutritiva a pH 4,5 en cuatro cultivares de *M. sativa* sometidos a diferentes niveles de Al.

Columnas con letras distintas para cada cultivar indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$) según la Prueba de Comparación Múltiple de Tukey. Valores promedio de tres repeticiones. Barras en columnas representan error estándar.

De esta forma, la concentración de citrato en solución (µmol L^{-1}) fue responsable de reducir los efectos tóxicos de Al.

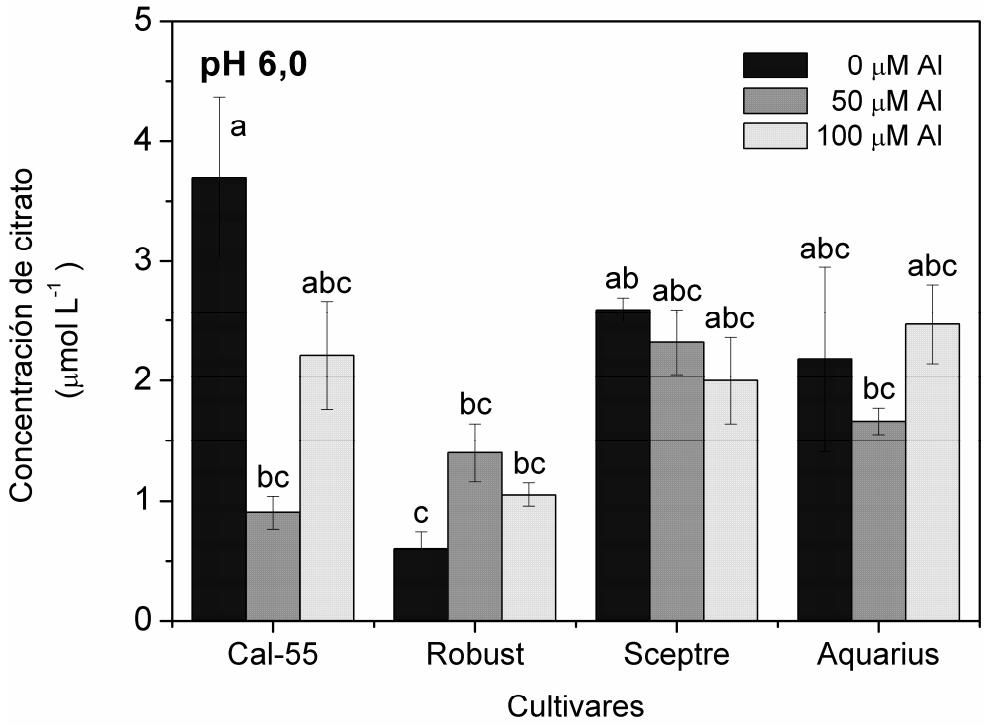

Figura 13. Concentración de citrato (µmol L^{-1}) en solución nutritiva a pH 6,0 en cuatro cultivares de *M. sativa* sometidos a diferentes niveles de Al.

Columnas con letras distintas para cada cultivar indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$) según la Prueba de Comparación Múltiple de Tukey. Valores promedio de tres repeticiones. Barras en columnas representan error estándar.

La especiación química de Al está directamente relacionada al pH. Esto fue confirmado por los resultados de la especiación química realizada mediante el programa GEOCHEM, los cuales mostraron que los niveles de Al^{+3} fluctuaron entre 8,8 y 17,5 µM a pH 4,5, mientras que a pH 6,0 no se observó Al^{+3}, encontrándose éste mayoritamente precipitado como complejos Al-OH (Tabla 10). Estos resultados coinciden con las observaciones de Nair y Prenzel (1978), quienes sostienen que la actividad de Al puede disminuir como resultado del aumento del pH, formación de complejos con el fosfato y ácidos orgánicos.

Tabla 10. Distribución porcentual de especies de Al en solución nutritiva y su interacción con la exudación de citrato desde raíces de *M. sativa* de acuerdo a la especiación realizada mediante el programa GEOCHEM.

	pH 4,5		pH 6,0	
	Aluminio (µM)		Aluminio (µM)	
Complejos	**50**	**100**	**50**	**100**
		California 55		
Al^{+3}	17,5	8,8	---	---
Al - PO_4^{-3}	30,4	15,2	0,03	0,02
Al - citrato	43,1	8,5	7,8	19,7
Al - OH[a]	7,0	66,6	92,2	80,3
		Robust		
Al^{+3}	13,1	8,8	---	---
Al - PO_4^{-3}	23,8	15,2	0,03	0,02
Al - citrato	58,3	4,3	16,4	1,63
Al - OH[a]	3,2	70,8	83,5	98,3
		Sceptre		
Al^{+3}	17,5	8,8	---	---
Al - PO_4^{-3}	30,3	15,2	0,03	0,02
Al - citrato	22,1	20,4	18,9	11,8
Al - OH[a]	28,0	54,7	81,0	88,2
		Aquarius		
Al^{+3}	17,5	8,8	---	---
Al - PO_4^{-3}	30,3	15,2	0,03	0,02
Al - citrato	24,5	9,4	19,9	11,0
Al - OH[a]	25,5	65,7	80,1	89,0

[a] Al complejado en solución y precipitado

La presencia de citrato permitió complejar una fracción importante de Al, especialmente a pH 4,5, la cual fluctuó entre 22 y 58% del total de Al presente en la solución.

Altas concentraciones de Al en solución se tradujeron en una mayor formación de complejos Al-OH, especialmente a pH 6,0. Sin embargo, la presencia de mayores concentraciones de

citrato en la solución (ej. cultivar Sceptre, 50 µM a pH 4,5), al complejar una mayor cantidad de Al, se tradujo en una menor formación de complejos Al-OH.

Elevadas concentraciones de Al se tradujeron en una mayor reducción del crecimiento en plantas de alfalfa, especialmente a pH 4,5 (Tabla 11).

Tabla 11. Reducción relativa del crecimiento, expresada como porcentaje respecto del control sin Al, en plantas de *M. sativa* sometidas a estrés por Al en solución nutritiva a pH 4,5 y 6,0.

	pH 4,5		pH 6,0	
Cultivar	**50 µM Al**	**100 µM Al**	**50 µM Al**	**100 µM Al**
California 55	21 ± 6	52 ± 10	67 ± 7	50 ± 9
Robust	55 ± 9	61 ± 10	24 ± 7	29 ± 9
Sceptre	38 ± 10	63 ± 14	17 ± 6	46 ± 7
Aquarius	44 ± 8	55 ± 6	20 ± 6	-9 ± 8

Si bien es cierto, el Al^{+3} fue la forma de Al predominante a pH 4,5, la presencia de otras especies químicas de Al como los hidróxidos mononucleares, $AlOH^{2+}$, $Al(OH)_2^{+}$ y $Al(OH)_4^{-}$ o el polímero Al_{13}, pueden haber contribuido a la toxicidad por Al (Kinraide, 1991).Estas formas químicas podrían ser responsables de la reducción del contenido de MS en plantas sometidas a Al a pH 6,0, debido a la inexistencia de Al libre a este nivel de pH. Cabe destacar que el contenido de nutrientes se mantuvo dentro de rangos normales y no fueron mayormente afectados por la adición de Al a la solución (datos no mostrados), lo cual reafirmaría la teoría de toxicidad por especies de Al-OH a pH 6,0.

Debido a que tanto la cantidad como el tipo de ácido orgánico exudado son responsables de disminuir la toxicidad por Al, se ha estimado que una concentración equimolar de citrato (respecto de Al) es necesaria para evitar la elongación en raíces de maíz, criterio utilizado para estimar la toxicidad por Al (Zheng *et al.*, 1998). Esto significa que la concentración de citrato requerido en la solución nutritiva para contrarrestar los efectos de Al debiera ser equivalente a la de Al (50 y 100 µM).

Es posible concluir que la exudación de citrato dependiente de Al podría constituir un mecanismo mediante el cual la alfalfa disminuiría la disponibilidad de Al en suelos y asi reducir su fitotoxicidad. Sin embargo, considerando que la exudación de citrato no siempre se tradujo en un mayor desarrollo de las plantas expuestas a Al, la existencia de múltiples mecanismos de tolerancia han sido propuestos como responsables de inducir tolerancia a este elemento (Pellet *et al.*, 1995). Otra posible explicación a este fenómeno radica en que la determinación de ácidos orgánicos presentes en la raíz completa no es indicativa de la concentración presente en el ápice de la raíz, el cual corresponde al sitio primario de toxicidad por Al en la planta, y donde la expresión de los mecanismos de resistencia a Al debieran estar localizados (Sivaguru y Horst, 1998).

Considerando que un alto nivel de Al en suelos está comúnmente asociado a una baja disponibilidad de P, la liberación de diversos ácidos orgánicos por parte de la alfalfa, especialmente el citrato, podría constituir un mecanismo adaptativo mediante el cual las plantas podrían modificar su microambiente rizosférico y asi mejorar la disponibilidad de ciertos nutrientes como el P.

5. CONCLUSIONES

- El número de rizobios fue afectado por la acidez del suelo. Así, praderas recientemente establecidas donde se observaron mayores niveles de pH, presentaron un mayor número de rizobios.

- La acidez redujo significativamente el crecimiento *in vitro* de las cepas naturalizadas aisladas a partir de plantas de alfalfa noduladas presentes en suelos de la IX y X regiones, observándose una respuesta diferencial en las cepas sometidas a un rango de valores de pH entre 5,0 y 5,5. Por su parte, un incremento de la concentración celular inicial de los rizobios indujo un mayor crecimiento de las colonias incluso bajo condiciones de elevada acidez (pH 5,0).

- El estudio de la identidad genética basado en la identificación y secuenciación parcial del gen 16S rDNA reveló que las cepas naturalizadas correspondieron en su totalidad a la especie *Sinorhizobium meliloti*.

- El análisis filogenético reveló una alta diversidad genética entre las cepas aisladas así como una relación entre ésta y el pH. Suelos con mayores valores de pH mostraron una menor diversidad a diferencia de suelos más ácidos que presentaron una mayor diversidad.

- La acidez del suelo redujo significativamente la nodulación, contenido de materia seca y capacidad simbiótica en alfalfa inoculada con cepas de *S. meliloti*, siendo la magnitud de dicha reducción dependiente del cultivar de alfalfa y el nivel de acidez. Sin embargo, la existencia de algunas cepas naturalizadas (por ej. NS11) con un adecuado potencial de fijación de nitrógeno bajo condiciones de moderada acidez, sugiere su posible utilidad como inoculante de la alfalfa en suelos de la zona centro-sur donde la acidez constituye el factor limitante.

- Un incremento en la concentración de aluminio en solución disminuyó el contenido de materia seca tanto en la parte aérea como radical en alfalfa. A su vez se observó una acumulación de aluminio a nivel radical, la cual fue dependiente del pH.

- Los cultivares de alfalfa respondieron al estrés por aluminio a través de un aumento de la exudación de ácidos orgánicos como citrato y succinato. No obstante, de acuerdo a la especiación química realizada solo citrato fue capaz de complejar aluminio.

- El aumento de la concentración de aluminio en solución condujo a una acumulación de P a nivel radical, lo que sugiere la existencia de un mecanismo de tolerancia a aluminio por exclusión, basado en la precipitación de aluminio con fósforo a nivel radical.

6. PROYECCIONES

- Dado que la simbiosis rizobio-leguminosa es una interacción donde existe una alta especificidad y que las cepas naturalizadas mostraron distintos potenciales de fijación de N bajo condiciones de acidez, deberían realizarse estudios para evaluar la compatibilidad funcional entre las cepas nativas y los cultivares de alfalfa disponibles, a objeto de establecer aquellas combinaciones cepa-cultivar que muestren una mayor productividad, de modo que puedan ser consideradas dentro de los sistemas de producción de forraje.

- Debido a que las cepas naturalizadas presentaron un grado de tolerancia relativamente mayor que las cepas comerciales, debería estudiarse el efecto de la acidez del suelo sobre la evolución del número de rizobios en el tiempo, debido a que la progresiva acidificación de los suelos va ocasionando una menor sobrevivencia del rizobio, lo que repercutirá en una menor nodulación y por ende, en una menor producción y persistencia de la alfalfa.

- Debido a que los resultados mostraron que la amplia diversidad genética de las cepas dependería, en parte, al pH del suelo, sería deseable evaluar su efecto sobre la transferencia lateral de genes en suelos chilenos como un mecanismo que contribuye a aumentar la diversidad genética de *S. meliloti*.

- Las plantas de alfalfa mostraron un aumento en la exudación de ácidos orgánicos, especialmente cítrico, al ser sometidas a estrés por Al en solución nutritiva. Sin embargo, la validación de estos resultados debería contemplar ensayos de invernadero o campo, en donde puedan utilizarse suelos ácidos elevados en Al. Además, debería contemplarse la evaluación de los cultivares de alfalfa que están actualmente disponibles en el mercado.

7. REFERENCIAS

Aarons S. R. y Graham P. H. (1991) Response of *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* to acidity. *Plant and Soil* **134**: 145−151.

Alva A. K., Asher C. J. y Edwards D. G. (1990) Effect of solution pH, external calcium concentration, and aluminium activity on nodulation of early growth of cowpea. *Australian Journal of Agricultural Research* **41**: 359−365.

Alva A. K., Edwards D. G., Asher C. J. y Blamey F. P. C. (1986) Effects of phosphorus/aluminum molar ratio and calcium concentration on plant response to aluminum toxicity. *Soil Science Society of America Journal* **50**: 133−137.

Andrade D. S., Murphy P. J. y Giller K. E. (2002) Effects of liming and legume/cereal cropping on populations of indigenous rhizobia in an acid Brazilian Oxisol. *Soil Biology and Biochemistry* **34**: 477−485.

Andrew C. S. (1976) Effect of calcium, pH and nitrogen on the growth and chemical composition of some tropical and temperate pasture legumes. I. Nodulation and growth. *Australian Journal of Agricultural Research* **27**: 611−623.

Andrew C. S., Johnson A. D. y Sandland R. L. (1973) Effect of aluminium on the growth and chemical composition of some tropical and temperate pasture legumes. *Australian Journal of Agricultural Research* **24**: 325−339.

Aronson J., Ovalle C., Avendaño J., Longeri L. y del Pozo A. (2002) Agroforestry tree selection in central Chile: biological nitrogen fixation and early plant growth in six dryland species. *Agroforestry Systems* **56**: 155−166.

Ayanaba A., Asanuma S. y Munns D. N. (1983) An agar plate method for rapid screening of *Rhizobium* for tolerance to acid-aluminum stress. *Soil Science Society of America Journal* **47**: 256−258.

Baba M. y Okazaki M. (2000) Changes in aluminum pools of Andisols due to soil acidification. *Soil Science and Plant Nutrition* **46**: 797−805.

Babalola O. O. (2003) Molecular techniques: An overview of methods for the detection of bacteria. *African Journal of Biotechnology* **2**: 710−713.

Baldwin I. L. y Fred E. B. (1929) Nomenclature of the root nodule bacteria of the Leguminosae. *Journal of Bacteriology* **17**: 141−150.

Baligar V. C., Campbell T. A. y Wright R. J. (1993) Differential responses of alfalfa clones to aluminum-toxic acid soil. *Journal of Plant Nutrition* **16**: 219−233.

Baligar V. C., Grunes D. L., Belesky D. P. y Clark R. B. (2001) Mineral composition of forage legumes as influenced by aluminum. *Journal of Plant Nutrition* **24**: 215−227.

Ballard R. A. y Charman A. (2000) Nodulation and growth of pasture legumes with naturalised soil rhizobia. 1. Annual *Medicago* spp. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **40**: 939−948.

Ballard R. A., Shepherd B. R. y Charman A. (2003) Nodulation and growth of pasture legumes with naturalised soil rhizobia. 3. Lucerne (*Medicago sativa* L.). *Australian Journal of Experimental Agriculture* **43**: 135−140.

Ballard R. A., Slattery J. F. y Charman N. (2005) Host range and saprophytic competence of *Sinorhizobium meliloti* - a comparison of strains for the inoculation of lucerne, strand and disc medics. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **45**: 209−216.

Ballen K. G., Graham P. H., Jones R. K. y Bowers J. H. (1988) Acidity and calcium interaction affecting cell envelope stability in *Rhizobium*. *Canadian Journal of Microbiology* **44**: 582−587.

Barber L. E. (1980) Enumeration, effectiveness, and pH resistance of *Rhizobium meliloti* populations in Oregon Soils. *Soil Science Society of America Journal* **44**: 537−539.

Barceló J. y Poschenrieder C. (2002) Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. *Environmental and Experimental Botany* **48**: 75−92.

Barnet Y. M. (1991) Ecology of legume root nodule bacteria. En: Dilworth, M. J. y Glenn, A. R. (Eds). *Biology and biochemistry of nitrogen fixation*. 199−228 p. Elsevier, Amsterdam.

Barrientos L., Campillo R. y Méndez E. (1994) La acidez del suelo y su efecto sobre la fijación simbiótica de nitrógeno en leguminosas forrajeras. *Agricultura Técnica* **54**: 118−123.

Barrientos L., Higuera M., Acuña H., Guerrero J., Ortega F. y Seguel I. (2002) Efectividad simbiótica de cepas naturalizadas de *Mesorhizobium loti* y *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) en plantas de tres especies del género *Lotus*. *Agricultura Técnica* **62**: 226−236.

Barrientos L. y Méndez E. (1994) Rizobios nativos para tréboles en la IX región. *IPA Carillanca* **13**: 16.

Béna G., Lyet A., Huguet T. y Olivieri I. (2005) *Medicago* − *Sinorhizobium* symbiotic specificity evolution and the geographic expansion of *Medicago*. *Journal of Evolutionary Biology* **18**: 1547−1558.

Besoaín J. (1985) Los suelos. En: Tosso, J. (Eds). *Suelos Volcánicos de Chile*. 25−106 p. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Santiago, Chile.

Biondi E. G., Pilli E., Giuntini E., Roumiantseva M. L., Andronov E. E., Onichtchouk O. P., Kurchak O. N., Simarov B. V., Dzyubenko N. I., Mengoni A. y Bazzicalupo M. (2003) Genetic relationship of *Sinorhizobium meliloti* and *Sinorhizobium medicae* strains isolated from Caucasian region. *FEMS Microbiology Letters* **220**: 207−213.

Borie F., Naour E., Antilef J. y Méndez E. (1988) Aislamiento de cepas de *Rhizobium trifolii* en la IX Región de Chile. *Ciencia e Investigación Agraria* **15**: 186.

Bottomley P. J. (1992) Ecology of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium*. En: Stacy, G., Burris, R. H. y Evans, H. J. (Eds). *Biological Nitrogen Fixation*. 293−347 p. Chapman and Hall, New York.

Bounejmate M. y Robson A. D. (1992) Differential tolerance of genotypes of *Medicago truncatula* to low pH. *Australian Journal of Agricultural Research* **43**: 731−737.

Bradic M., Sikora S., Redzepovic S. y Stafa Z. (2003) Genetic identification and symbiotic efficiency of an indigenous *Sinorhizobium meliloti* field population. *Food Technology and Biotechnology* **41**: 69−75.

Brockwell J. (1963) Accuracy of a plant-infection technique for counting populations of *Rhizobium trifolii*. *Applied Microbiology* **11**: 377−383.

Brockwell J. y Bottomley P. J. (1995) Recent advances in inoculant technology and prospects for the future. *Soil Biology and Biochemistry* **27**: 683−697.

Brockwell J., Hely F. W. y Neal-Smith C. A. (1966) Some symbiotic characteristics of rhizobia responsible for spontaneous, effective field nodulation of *Lotus hispidus*. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry* **6**: 365−370.

Brockwell J., Holliday R. A. y Pilka A. (1988) Evaluation of the symbiotic nitrogen-fixing potential of soils by direct microbiological means. *Plant and Soil* **108**: 163−170.

Brockwell J., Pilka A. y Holliday R. A. (1991) Soil pH is a major determinant of the numbers of naturally ocurring *Rhizobium meliloti* in non-cultivated soils in central New South Wales. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **31**: 211−219.

Brockwell J., Roughley R. J. y Herridge D. F. (1987) Population dynamics of *Rhizobium japonicum* strains used to inoculate three successive crops of soybean. *Australian Journal of Agricultural Research* **38**: 61−74.

Bromfield E. S. P., Barran L. R. y Wheatcroft R. (1995) Relative genetic structure of a population of *Rhizobium meliloti* isolated directly from soil and from nodules of alfalfa (*Medicago sativa*). *Molecular Ecology* **4**: 183−188.

Campillo R., Urquiaga S., Pino I. y Montenegro A. (2003) Estimación de la fijación biológica de nitrógeno mediante la metodología de ^{15}N. *Agricultura Técnica* **63**: 169−179.

Carelli M., Gnocchi S., Fancelli S., Mengoni A., Paffetti D., Scotti C. y Bazzicalupo M. (2000) Genetic diversity and dynamics of *Sinorhizobium meliloti* populations nodulating different alfalfa cultivars in italian soils. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 4785−4789.

Carr S. J. y Ritchie G. S. P. (1993) Al toxicity of wheat grown in acidic subsoils in relation to soil solution properties and exchangeable cations. *Australian Journal of Soil Research* **31**: 583−596.

Carter J. M., Tieman J. S. y Gibson A. H. (1995) Competitiveness and persistence of strains of rhizobia for faba bean in acid and alkaline soils. *Soil Biology and Biochemistry* **27**: 617−623.

Cooper J. E., Wood M. y Holding A. J. (1983) The influence of soil acidity factors on rhizobia. En: Jones, D. G. y Davies, D. R. (Eds). *Temperate legumes: Physiology, Genetics and nodulation.* 319−335 p.

Cunningham S. D. y Munns D. N. (1984) The correlation between extracellular polysaccharide production and acid tolerance in Rhizobium. *Soil Science Society of America Journal* **48**: 1273−1276.

Chen W. X., Yan G. H. y Li J. L. (1988) Numerical taxonomy study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **38**: 392−397.

Cheng Y., Watkin E. L. J., O'Hara G. W. y Howieson J. G. (2002) *Medicago sativa* and *Medicago murex* differ in the nodulation response to soil acidity. *Plant and Soil* **238**: 31−39.

Chueire L. M. O., Nishi C. Y. M., Loureiro M. F. y Hungria M. (2000) Identificacao das estirpes de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* utilizadas em inoculantes comerciais para as culturas da soja e do feijoeiro pela técnica de PCR com "primers" aleatórios ou específicos. *Agricultura Tropical* **4**: 80−95.

de Lajudie P., Willems A., Pot B., Dewettinck D., Maestrojuan G., Neyra M., Collins M. D., Dreyfus B., Kersters K. y Gillis M. (1994) Polyphasic taxonomy of rhizobia: Emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**: 715−733.

del Papa M. F., Balague L. J., Sowinski S. C., Wegener C., Segundo E., Abarca F. M., Toro N., Niehaus K., Puhler A., Aguilar O. M., Martinez-Drets G. y Lagares A. (1999) Isolation and characterization of alfalfa-nodulating rhizobia present in acidic soils of Central Argentina and Uruguay. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 1420−1427.

Delavechia C., Hampp E., Fabra A. y Castro S. (2003) Influence of pH and calcium on the growth, polysaccharide production and symbiotic association of *Sinorhizobium meliloti* SEMIA 116 with alfalfa roots. *Biology and Fertility of Soils* **38**: 110−114.

Dilworth M. J., Rynne F. G., Castelli J. M., Vivas-Marfisi A. I. y Glenn A. R. (1999) Survival and exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti* WSM419 are affected by calcium and low pH. *Microbiology* **145**: 1589−1593.

Dilworth M. J., Tiwari R. P., Reeve W. G. y Glenn A. R. (2000) Legume root nodule bacteria and acid pH. *Science Progress* **83**: 357−389.

Dong D., Peng X. y Yan X. (2004) Organic acid exudation induced by phosphorus deficiency and/or aluminium toxicity in two contrasting soybean genotypes. *Physiologia Plantarum* **122**: 190−199.

Drouillon M. y Merckx R. (2003) The role of citric acid as phosphorus mobilization mechanism in highly P-fixing soils. *Gayana Botanica* **60**: 55−62.

Dughri M. H. y Bottomley P. J. (1983) Effect of acidity on the composition of an indigenous soil population of *Rhizobium trifolii* found in nodules of *Trifolium subterraneum* L. *Applied and Environmental Microbiology* **46**: 1207−1213.

Eardly B. D., Materon L. A., Smith N. H., Johnson D. A., Rumbaugh M. D. y Selander R. K. (1990) Genetic structure of natural populations of the nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium meliloti*. *Applied and Environmental Microbiology* **56**: 187−194.

Evans C. M., Fettell N. A. y Brockwell J. (2005a) Populations of *Sinorhizobium meliloti* congregate in the 30-60 cm section of the soil profile in a stand of dryland lucerne (*Medicago sativa*): is this where lucerne fixes its nitrogen? *Australian Journal of Experimental Agriculture* **45**: 225−230.

Evans J., Wallace C., Dobrowolski N., Pritchard I. y Sullivan B. (1993) Requirement of field pea for inoculation with *Rhizobium* and lime pelleting in soils of Western Australia. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **33**: 767−773.

Evans P. M., Howieson J. G. y Nutt B. J. (2005b) Increased yield and persistence of several annual medic species and *Medicago sativa* by inoculation with selected strains of *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae*. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **45**: 217−224.

Flis S. E., Glenn A. R. y Dilworth M. J. (1993) The interaction between aluminium and root nodule bacteria. *Soil Biology and Biochemistry* **25**: 403−417.

Foy C. D. (1988) Plant adaptation to acid, aluminium-toxic soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **19**: 959−987.

Freiberg C., Rémy F., Bairoch A., Broughton W. J., Rosenthal A. y Perret X. (1997) Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature* **387**: 394−401.

Gandee C. M., Harrison S. P. y Davies W. P. (1999) Genetic characterization of naturally ocurring *Rhizobium meliloti* populations and their potential to form effective symbioses with lucerne. *Letters in Applied Microbiology* **28**: 169−174.

Garau G., Reeve W. G., Brau L., Deiana P., Yates R. J., James D., Tiwari R., O'Hara G. W. y Howieson J. G. (2005) The symbiotic requirements of different *Medicago* spp. suggest the evolution of *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* with hosts differentially adapted to soil pH. *Plant and Soil* **176**: 263−277.

Gaume A., Mächler F. y Frossard E. (2001) Aluminum resistance in two cultivars of *Zea mays* L.: root exudation of organic acids and influence of phosphorous nutrition. *Plant and Soil* **234**: 73−81.

Gemmel L. G. y Roughley R. J. (1993) Field evaluation in acid soils of strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* selected for their tolerance or sensitivity to acid soil factors in agar medium. *Soil Biology and Biochemistry* **25**: 1447−1452.

Ginting S., Johnson B. B. y Wilkens S. (1998) Alleviation of aluminium phytotoxicity on soybean growth by organic anions in nutrient solutions. *Australian Journal of Plant Physiology* **25**: 901−908.

Graham P. H. (1964) The application of computer techniques to the taxonomy of the root-nodule bacteria of legumes. *Journal of General Microbiology* **35**: 511−517.

Graham P. H. y Vance C. P. (2000) Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. *Field Crops Research* **65**: 93−106.

Grange L. y Hungria M. (2004) Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry* **36**: 1389−1398.

Grewal H. S. y Williams R. (2003) Liming and cultivars affect root growth, nodulation, leaf to stem ratio, herbage yield, and elemental composition of alfalfa on an acid soil. *Journal of Plant Nutrition* **26**: 1683−1696.

Handley B. A., Hedges A. J. y Beringer J. E. (1998) Importance of host plants for detecting the population diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* in soil *Soil Biology and Biochemistry* **30**.

Hannaway D. B. y Shuler P. E. (1993) Nitrogen fertilization in alfalfa production. *Journal of Production Agriculture* **6**: 80−85.

Hardarson G. y Atkins C. (2003) Optimising biological N_2 fixation by legumes in farming systems. *Plant and Soil* **252**: 41−54.

Harrison S. P., Jones D. G. y Young J. P. W. (1989) *Rhizobium* population genetics: genetic variation within and between populations from diverse locations. *Journal of General Microbiology* **135**: 1061−1069.

Hartel P. G. y Alexander M. (1983) Growth and survival of cowpea rhizobia in acid, aluminium-rich soils. *Soil Science Society of America Journal* **47**: 502−506.

Herrera A., Longeri L., Ovalle C. y Avendaño J. (1996) Estudio de la efectividad de cepas chilenas, nativas de *Rhizobium meliloti* en simbiosis con *Medicago polymorpha*. *Agricultura Técnica* **56**: 36−42.

Holding A. J. y Lowe J. F. (1971) Some effects of acidity and heavy metals on the *Rhizobium*-leguminous plant association. *Plant and Soil* **Special Volume**: 153−166.

Howieson J. G. (1999) The host-rhizobia relationship. En: Bennett, S. J. y Cocks, P. S. (Eds). *Genetic Resources of Mediterranean Pasture and Forage Legumes*. 96−106 p. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

Howieson J. G. y Ballard R. (2004) Optimising the legume symbiosis in stressful and competitive environments within southern Australia - some contemporary thoughts. *Soil Biology and Biochemistry* **36**: 1261−1273.

Howieson J. G. y Ewing M. A. (1986) Acid tolerance in the *Rhizobium meliloti* - *Medicago* symbiosis. *Australian Journal of Agricultural Research* **37**: 55−64.

Howieson J. G., Ewing M. A. y D'Antuono M. F. (1988) Selection for acid tolerance in *Rhizobium meliloti*. *Plant and Soil* **105**: 179−188.

Howieson J. G., Loi A. y Carr S. J. (1995) *Biserrula pelecinus* L - a legume pasture species with potential for acid, duplex soils which is nodulated by unique root-nodule bacteria. *Australian Journal of Agricultural Research* **46**: 997−1009.

Howieson J. G., Malden J., Yates R. J. y O'Hara G. W. (2000a) Techniques for the selection and development of elite inoculant strains of *Rhizobium leguminosarum* in Southern Australia. *Symbiosis* **28**: 33−48.

Howieson J. G., Nutt B. y Evans P. (2000b) Estimation of host-strain compatibility for symbiotic N-fixation between *Rhizobium meliloti*, several annual species of *Medicago* and *Medicago sativa*. *Plant and Soil* **219**: 49−55.

Howieson J. G., O'Hara G. W. y Carr S. J. (2000c) Changing roles for legumes in Mediterranean agriculture: developments from an Australian perspective. *Field Crops Research* **65**: 107−122.

Howieson J. G., Robson A. D. y Abbott L. K. (1992) Calcium modifies pH effects on the growth of acid-tolerant and acid-sensitive *Rhizobium meliloti*. *Australian Journal of Agricultural Research* **43**: 765−772.

Hue N. V., Craddock G. R. y Adams F. (1986) Effect of organic acids on aluminium toxicity in subsoils. *Soil Science Society of America Journal* **50**: 28−34.

Hungria M., Andrade D. S., Chueire L. M. O., Probanza A., Gutiérrez-Mañero F. J. y Megías M. (2000) Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biology and Biochemistry* **32**: 1515−1528.

Hungria M., Campo R. J., Chueire L. M. O., Grange L. y Megías M. (2001) Symbiotic effectiveness of fast-growing rhizobial strains isolated from soybean nodules in Brazil. *Biology and Fertility of Soils* **33**: 387−394.

Hungria M. y Vargas M. A. T. (2000) Environmental factors affecting N_2 fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crops Research* **65**: 151−164.

Jarvis B. D. W., Downer J. L. y Young J. P. W. (1992) Phylogeny of fast-growing soybean-nodulating rhizobia supports synonymy of *Sinorhizobium* and *Bradyrhizobium* and assignment to *Rhizobium fredii*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **42**: 93−96.

Jebara M., Mhamdi R., Aouani M. E., Ghrir R. y Mars M. (2001) Genetic diversity of *Sinorhizobium* populations recovered from different *Medicago* varieties cultivated in Tunisian soils. *Canadian Journal of Microbiology* **47**: 139−147.

Jensen E. S. y Hauggaard-Nielsen H. (2003) How can increased use of biological N_2 fixation in agriculture benefit the environment? *Plant and Soil* **252**: 41−54.

Jiang D., Huang Q., Cai P., Rong X. y Chen W. (2007) Adsorption of *Pseudomonas putida* on clay minerals and iron oxide. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **54**: 217−221.

Jones D. L. y Darrah P. R. (1994) Role of root derived organic acids in the mobilization of nutrients from the rhizosphere. *Plant and Soil* **166**: 247−257.

Kahindi J. H. F., Woomer P., George T., Moreira F. D. M., Karanja N. K. y Giller K. E. (1997) Agricultural intensification, soil biodiversity and ecosystem function in the tropics: the role of nitrogen-fixing bacteria. *Applied Soil Ecology* **6**: 55−76.

Keyser H. H. y Munns D. N. (1979) Tolerance to rhizobia to acidity, aluminum, and phosphate. *Soil Science Society of America Journal* **43**: 519−523.

Kingsley M. T. y Bohlool B. B. (1992) Extracellular polysaccharide is not responsible for aluminium tolerance of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* CIAT899. *Applied and Environmental Microbiology* **4**: 1095−1101.

Kinraide T. B. (1991) Identity of the rhizotoxic aluminum species. *Plant and Soil* **134**: 167−178.

Kishinevsky B. D., Nandasena K. G., Yates R. J., Nemas C. y Howieson J. G. (2003) Phenotypic and genetic diversity among rhizobia isolated from three *Hedysarum* species: *H. spinosissimum*, *H. coronarium* and *H. flexuosum*. *Plant and Soil* **251**: 143−153.

Kochian L. V. (1995) Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annual Reviews Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **46**: 237−260.

Kochian L. V., Hoekenga O. A. y Pineros M. A. (2004) How do crop plants tolerate acid soils? - Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annual Review of Plant Biology* **55**: 459−493.

Kollmeier M., Dietrich P., Bauer C. S., Horst W. J. y Hedrich R. (2001) Aluminum activates a citrate-permeable anion channel in the aluminum-sensitive zone of the maize root apex. A comparison between an aluminum-sensitive and an aluminum-resistant cultivar. *Plant Physiology* **126**: 397−410.

Laguerre G., Mavingui P., Allard M. R., Charnay M. P., Louvrier P., Mazurier S. I., Rigottier-Gois L. y Amarger N. (1996) Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 2029−2036.

Laranjo M., Branco C., Soares R., Alho L., Carvalho M. D. E. y Oliveira S. (2002) Comparison of chickpea rhizobia isolates from diverse Portuguese natural populations based on symbiotic effectiveness and DNA fingerprint. *Journal of Applied Microbiology* **92**: 1043−1050.

Li X. F., Ma J. F. y Matsumoto H. (2000) Pattern of aluminum-induced secretion of organic acids differs between rye and wheat. *Plant Physiology* **123**: 1537−1543.

Lipton D. S., Blanchar R. W. y Blevins D. G. (1987) Citrate, malate and succinate concentration in exudates from P-sufficient and P-stressed *Medicago sativa* L. seedlings. *Plant Physiology* **85**: 315−317.

Longeri L., Vidal H. y Herrera A. (1990) Fijación de N en cultivares de frejol utilizando la técnica de N_{15} y respuesta a la fertilización nitrogenada. En: Urzúa, H. (Eds). *Proceedings VI Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo*. Temuco, Chile. 227−232 p.

Ma J. F., Hiradate S., Nomoto K., Iwashita T. y Matsumoto H. (1997) Internal detoxification mechanism of Al in hydrangea - Identification of Al form in the leaves. *Plant Physiology* **113**: 1033−1039.

Ma J. F., Ryan P. R. y Delhaize E. (2001) Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends in Plant Science* **6**: 273−278.

Marenco R. A. y Bastos A. M. (1999) Crop rotation reduces weed competition and increases chlorophyll concentration and yield of rice. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* **34**: 1881−1887.

McInnes A., Thies J. E., Abbott L. K. y Howieson J. G. (2004) Structure and diversity among rhizobial strains, populations and communities − a review. *Soil Biology and Biochemistry* **36**: 1295−1308.

Miyasaka S. C., Buta J. G., Howell R. K. y Foy C. D. (1991) Mechanism of aluminum tolerance in snapbeans. Root exudation of citric acid. *Plant Physiology* **96**: 737−743.

Mora M. L., Alfaro M., Williams P., Stehr W. y Demanet R. (2004) Effect of fertilizer input on soil acidification in relation to growth and chemical composition of a pasture, and animal production. *Revista de la Ciencia del Suelo y Nutrición Vegetal* **4**: 29−40.

Mora M. L., Alfaro M. A., Jarvis S. C., Demanet R. y Cartes P. (2006) Soil aluminium availability in Andisols of southern Chile and its effect on forage production and animal metabolism. *Soil Use and Management* **22**: 95−101.

Mora M. L., Cartes P., Demanet R. y Cornforth I. S. (2002) Effects of lime and gypsum on pasture growth and composition on an acid Andisol in Chile, South America. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **33**: 2069−2081.

Mora M. L., Schnettler B. y Demanet R. (1999) Effect of liming and gypsum on soil chemistry, yield, and mineral composition of ryegrass grown in an acidic Andisol. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **30**: 1251−1266.

Mossor-Pietraszewska T. (2001) Effect of aluminium on plant growth and metabolism. *Acta Biochimica Polonica* **48**: 673−686.

Munns D. N. (1968) Nodulation of *Medicago sativa* in solution culture. I. Acid-sensitive steps. *Plant and Soil* **28**: 129−146.

Munns D. N. (1965) Soil acidity and growth of a legume. I. Interaction of lime with nitrogen and phosphate on growth of *Medicago sativa* L. and *Trifolium subterraneum* L. *Australian Journal of Agricultural Research* **16**: 733−741.

Nair V. D. y Prenzel J. (1978) Calculations of equilibrium concentration of mono- and polynuclear hydroxyaluminium species at different pH hydrogen-ion concentration and total aluminium concentrations in soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **141**: 741−751.

Noble A. D., Fey M. V. y Summer M. E. (1988) Calcium-aluminum balance and the growth of soybean roots in nutrient solutions. *Soil Science Society of America Journal* **52**: 1651−1656.

Nordstrom D. K. y May H. M. (1996) Aqueous equilibrium data for mononuclear aluminum species. En: Sposito, G. (Eds). *The Environmental Chemistry of Aluminum*. 39−80 p. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Normand P., Cournoyer P., Simonet P. y Nazaret S. (1992) Analysis of the ribosomal RNA operon in the actinomycete *Frankia*. *Gene* **111**: 119−124.

O'Hara G. W., Boonkerd N. y Dilworth M. J. (1988) Mineral constraints to nitrogen fixation. *Plant and Soil* **108**: 93−110.

O'Hara G. W. y Glenn A. R. (1994) The adaptive acid tolerance response in root nodule bacteria and *Escherichia coli*. *Archives of Microbiology* **161**: 286−292.

O'Hara G. W., Goss T. J., Dilworth M. J. y Glenn A. R. (1989) Maintenance of intracellular pH and acid tolerance in *Rhizobium meliloti*. *Applied and Environmental Microbiology* **55**: 1870−1876.

O'Hara G. W., Yates R. J. y Howieson J. G. (2002) Selection of strains of root nodule bacteria to improve inoculant performance and increase legume productivity in stressful environments. En: Herridge, D. (Eds). *Inoculants and nitrogen fixation of legumes in Vietnam*. 75−80 p. ACIAR Proceedings 109e, Canberra.

Odee D. W., Haukka K., McInroy S. G., Sprent J. I., Sutherland J. M. y Young J. P. W. (2002) Genetic and symbiotic characterization of rhizobia isolated from tree and herbaceous legumes grown in soils from ecologically diverse sites in Kenya. *Soil Biology and Biochemistry* **34**: 801−811.

Opazo J. D. y Veloso G. (1988) Efectos nutricionales en la producción de materia seca y en la fijación de nitrógeno de alfalfa establecida en suelos de origen granítico. *Ciencia e Investigación Agraria* **15**: 198−199.

Paffetti D., Scotti C., Gnocchi S., Fancelli S. y Bazzicalupo M. (1996) Genetic diversity of an Italian *Rhizobium meliloti* population from different *Medicago sativa* varieties. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 2279−2285.

Palmer K. M. y Young J. P. (2000) Higher diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* populations in arable soils than in grass soils. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 2445−2450.

Parker D. R., Zelazny L. W. y Kinraide T. B. (1987) Improvements to the program GEOCHEM. *Soil Science Society of America Journal* **52**: 438−444.

Peick B., Graumann P., Schmid R., Marahiel M. y Werner D. (1999) Differential pH-induced proteins in *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *Rhizobium etli* CIAT 611. *Soil Biology and Biochemistry* **31**: 189−194.

Pellet D. M., Grunes D. L. y Kochian L. V. (1995) Organic acid exudation as an aluminum-tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.). *Planta* **196**: 788−795.

Peoples M. B., Bowman A. M., Gault A. M., Herridge D. F., McCallum M. H., McCormick K. M., Norton R. M., Rochester I. J., Scammell G. J. y Schwenke G. D. (2001) Factors regulating the contributions of fixed nitrogen by pasture and crop legumes to different farming systems of eastern Australia. *Plant and Soil* **228**: 29−41.

Pijnenborg J. W. M., Lie T. A. y Zehnder A. J. B. (1990) Nodulation of lucerne (*Medicago sativa* L.) in an acid soil: pH dynamics in the rhizosphere of seedlings growing in rhizotrons. *Plant and Soil* **126**: 161−168.

Prakash R. K., Schilperoot R. A. y Nuti M. P. (1981) Large plasmid of fast-growing rhizobia: homology studies and location of structural nitrogen fixation (nif) genes. *Journal of Bacteriology* **145**: 1129−1136.

Rayment G. E. y Higginson F. R. (1992) *Australian laboratory handbook of soil and water chemical methods*. Inkata Press. Melbourne, Australia. 330 p.

Reeve W. G., Bräu L., Castelli J., Garau G., Sohlenkamp C., Geiger O., Dilworth M. J., Glenn A. R., Howieson J. G. y Tiwari R. P. (2006) The *Sinorhizobium medicae* WSM419 *lpiA* gene is transcriptionally activated by FsrR and required to enhance survival in lethal acid conditions. *Microbiology* **152**: 3049−3059.

Reeve W. G., Dilworth M. J., Tiwari R. P. y Glenn A. R. (1997) Regulation of exopolysaccharide production in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* WSM710 involves *exoR*. *Microbiology* **143**: 1951−1958.

Reeve W. G., Tiwari R. P., Dilworth M. J. y Glenn A. R. (1993) Calcium affects the growth and survival of *Rhizobium meliloti*. *Soil Biology and Biochemistry* **25**: 581−586.

Rickert A. A., Soria M. A. y Correa O. S. (2000) The adaptive acid response in *Mesorhizobium* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **16**: 475−480.

Richardson A. E., Viccars L. A., Watson J. M. y Gibson A. H. (1995) Differentiation of *Rhizobium* strains using the polymerase chain reaction with random and directed primers. *Soil Biology and Biochemistry* **27**: 515−524.

Richaume A., Angle J. S. y Sadowsky M. J. (1989) Influence of soil variables on in situ plasmid transfer from *Escherichia coli* to *Rhizobium fredii*. *Applied and Environmental Microbiology* **55**: 1730−1734.

Riffkin P. A., Quigley P. E., Kearney G. A., Cameron F. J., Gault R. R., Peoples M. B. y Thies J. E. (1999) Factors associated with biological nitrogen fixation in dairy pastures in south-western Victoria. *Australian Journal of Agricultural Research* **50**: 261−272.

Robson A. D. y Loneragan J. F. (1970a) Nodulation and growth of *Medicago truncatula* on acid soils. I. Effect of calcium carbonate and inoculation level on the nodulation of *Medicago truncatula* on a moderately acid soil. *Australian Journal of Agricultural Research* **21**: 427−434.

Robson A. D. y Loneragan J. F. (1970b) Nodulation and growth of *Medicago truncatula* on acid soils. II. Colonization of acid soils by *Rhizobium meliloti*. *Australian Journal of Agricultural Research* **21**: 435−445.

Roesner E. A., Fettell N. A. y Brockwell J. (2005) Liming and choice of pasture species improve rhizobial persistence in a acidic chromosol (red-brown earth). *Australian Journal of Experimental Agriculture* **45**: 247−256.

Rome S., Fernández M. P., Brunel B., Normand P. y Cleyet-Marel J. C. (1996) *Sinorhizobium medicae* sp. nov., isolated from annual *Medicago* spp. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**: 972−980.

Rosas A., Rengel Z. y Mora M. L. (2007) Manganese supply and pH influence growth, carboxylate exudation and peroxidase activity on ryegrass and white clover. *Journal of Plant Nutrition* **30**: 253-270.

Roumiantseva M. L., Andronov E. E., Sharypova L. A., Dammann-Kalinowski T., Keller M., Young J. P. W. y Simarov B. (2002) Diversity of *Sinorhizobium meliloti* from the central asian alfalfa gene center. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 4694−4697.

Royal Botanic Gardens K. (2007) *Vascular plant families and genera.* Disponible online: http://www.rbgkew.org.uk/data/genlist.html [26 Marzo de 2007]

Ruíz E., Acuña E., Zagal E., Barrientos L. y Pincheira A. (1999) Variación en las tasas de fijación de nitrógeno en tres especies del género *Lotus* por efecto del corte y del pastoreo. *Agricultura Técnica* **59**: 35−44.

Ruiz I. (1996) Soiling. En: Ruiz, I. (Eds). *Praderas para Chile*. 387−394 p. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Ministerio de Agricultura, Santiago, Chile.

Ryan P. R., Delhaize E. y Jones D. L. (2001) Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**: 527−560.

Sadzawka A. y Campillo R. (1993) Problemática de la acidez de los suelos de la IX Región. I. Génesis y características del proceso. *IPA Carillanca* **12**: 3−7.

Sadzawka A., Grez R., Carrasco M. A. y Mora M. L. (2004) *Métodos de análisis de tejidos vegetales.* Comisión de Normalización y Acreditación Sociedad Chilena de la Ciencia del Suelo. Santiago-Chile. 53 p.

Santander J., Koebrich A. y Mora M. L. (1993) Alternativas de fertilización en suelos acidificados. Uso de enmiendas calcáreas. *Frontera Agrícola* **1**: 28−33.

Sawada H., Kuykendall L. D. y Young J. M. (2003) Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *Journal of General and Applied Microbiology* **49**: 155−179.

Scott B. J., Fisher J. A. y Cullis B. R. (2001) Aluminium tolerance and lime increase wheat yield on the acidic soils of central and southern New South Wales. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **41**: 523−532.

Schofield P. R. y Watson J. M. (1985) Conservation of *nif*- and species-specific domains within repeated promoter sequences from fast-growing *Rhizobium* species. *Nucleic Acid Research* **13**: 3407−3418.

Segundo E., Martínez-Abarca F., van Dillewijn P., Fernández-Lopez M., Lagares A., Martínez-Drets G., Niehaus K., Pühler A. y Toro N. (1999) Characterisation of symbiotically efficient alfalfa-nodulating rhizobia isolated from acid soils of Argentina and Uruguay. *Fems Microbiology Ecology* **28**: 169−176.

Sessitsch A., Howieson J. G., Perret X., Antoun H. y Martínez-Romero E. (2002) Advances in *Rhizobium* research. *Critical Reviews in Plant Sciences* **21**: 323−378.

Shen H., Yan X., Cai K. y Matsumoto H. (2004) Differential Al resistance and citrate secretion in the tap and basal roots of common bean seedlings. *Physiologia Plantarum* **121**: 595−603.

Silva I. R., Smyth T. J., Raper D., Carter T. E. y Rufty T. W. (2001) Differential aluminum tolerance in soybean: An evaluation of the role of organic acids. *Physiologia Plantarum* **112**: 200−210.

Sivaguru M. y Horst W. J. (1998) The distal part of the transition zone is the most aluminum-sensitive apical root zone of maize. *Plant Physiology* **116**: 155−163.

Slattery J. F. y Coventry D. R. (1993) Variation of soil populations of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and the ocurrence of inoculant rhizobia in the nodules of subterranean clover after pasture renovation in north-eastern Victoria. *Soil Biology and Biochemistry* **25**: 1725−1730.

Slattery J. F., Coventry D. R. y Slattery W. J. (2001) Rhizobial ecology as affected by the soil environment. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **41**: 289−298.

Slattery J. F. y Pearce D. J. (2002) The impact of background rhizobial populations on inoculation response. En: Herridge, D. (Eds). *Inoculants and nitrogen fixation of legumes in Vietnam*. 37−44 p, ACIAR Publications 109e.

Strain S. R., Leung K., Whittam T. S., de Bruijn F. J. y Bottomley P. J. (1994) Genetic structure of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* and *viciae* population found in two Oregon soils under different plant communities. *Applied and Environmental Microbiology* **60**: 2772−2778.

Sullivan J. T. y Ronson C. W. (1998) Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **95**: 5145−5149.

Sy A., Giraud E., Jourand P., Garcia N., Willems A., de Lajudie P., Prin Y., Neyra M., Gillis M., Boivin-Masson C. y Dreyfus B. (2001) Methylotrophic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *Journal of Bacteriology* **183**: 214−220.

Taylor G. J. y Foy C. D. (1985) Mechanisms of aluminium tolerance in *Triticum aestivum* L. (Wheat). II Differential pH induced by spring cultivars in nutrient solutions. *American Journal of Botany* **72**: 702−706.

Tesfaye M., Temple S. J., Allan D. L., Vance C. P. y Samac D. A. (2001) Overexpression of malate dehydrogenase in transgenic alfalfa enhances organic acid synthesis and confers tolerance to aluminum. *Plant Physiology* **127**: 1836−1844.

Thies J. E., Holmes E. M. y Vachot A. (2001) Application of molecular techniques to studies in *Rhizobium* ecology: A review. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **41**: 299−319.

Tiwari R. P., Reeve W. G., Dilworth M. J. y Glenn A. R. (1996) Acid tolerance in *Rhizobium meliloti* strain WSM419 involves a two-component sensor-regulator system. *Microbiology* **142**: 1693−1704.

Tong Z. y Sadowsky M. J. (1994) A selective medium for the isolation and quantification of *Bradyrhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium elkanii* strains from soils and inoculants. *Applied and Environmental Microbiology* **60**: 581−586.

Urzúa H. y Torres M. E. (1985) Fijación simbiótica de nitrógeno en praderas de la zona sur de Chile. II. Respuesta del trébol blanco y rosado a la inoculación con *Rhizobium trifolii* en suelos derivados de cenizas volcánicas. *Ciencia e Investigación Agraria* **12**: 21−25.

Urzúa H., Urzúa J. M. y Pizarro R. (2001) Pre-selección de cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* en vicia forrajera, para abonos verdes. *Ciencia e Investigación Agraria* **28**: 3−6.

Urzúa H., Zurita A., Longeri L. y Herrera A. (1995) Factores de suelo limitantes del crecimiento de la alfalfa en cuatro suelos de la X Región. II. Acidez del suelo. *Ciencia e Investigación Agraria* **22**: 49−56.

Vachot-Griffin A. M. y Thies J. E. (2005) Fingerprinting the Australian rhizobial inoculant mother cultures using refined PCR protocols yields beneficial inoculant management applications. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **45**: 141−150.

van Rossum D., Schuurmans F. P., Gillis M., Muyotcha A., van Verseveld H. W., Stouthamer A. H. y Boogerd F. C. (1995) Genetic and phenetic analyses of *Bradyrhizobium* strains nodulating peanut (*Arachis hypogaea* L.) roots. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 1599−1609.

Vargas A. A. T. y Graham P. H. (1988) *Phaseolus vulgaris* cultivar and *Rhizobium* strain variation in acid-pH tolerance and nodulation under acidic conditions. *Field Crops Research* **19**: 91−101.

Vásquez M., Poschenrieder C., Corrales I. y Barceló J. (1999) Changes in apoplastic aluminum during the initial growth response to aluminum by roots of tolerant maize variety. *Plant Physiology* **119**: 435−444.

Vincent J. M. (1970) *A manual for the practical study of root-nodule bacteria*. Blackwell. Oxford. 164 p.

von Uexküll H. R. y Mutert E. (1995) Global extent, development and economic impact of acid soils. En: Date, R. A., Grundon, N. J., Rayment, G. E. y Probert, M. E. (Eds). *Plant-Soil interactions at low pH: Principles and Management*. 1−19 p. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.

Wang E. T., Martínez-Romero J. y Martínez-Romero E. (1999) Genetic diversity of rhizobia from *Leucaena leucocephala* nodules in Mexican soils. *Molecular Ecology* **8**: 711−724.

Watanabe T. y Okada K. (2005) Interactive effects of Al, Ca and other cations on root elongation of rice cultivars under low pH. *Annals of Botany* **95**: 379−385.

Watkin E. L. J., O'Hara G. W. y Glenn A. R. (1997) Calcium and stress interact to affect the growth of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Soil Biology and Biochemistry* **29**: 1427−1432.

Watkin E. L. J., O'Hara G. W., Howieson J. G. y Glenn A. R. (2000) Identification of tolerance to soil acidity in inoculant strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Soil Biology and Biochemistry* **32**: 1393−1403.

Wegener C., Schröder S., Kapp D., Pühler A., Lopez E. S., Martinez-Abarca F., Toro N., Del Papa M. F., Balagué L. J., Lagares A., Martinez-Drets G. y Niehaus K. (2001) Genetic uniformity and symbiotic properties of acid-tolerant alfalfa nodulating rhizobia isolated from dispersed locations throughout Argentina. *Symbiosis* **30**: 141−162.

Wernegreen J. J., Harding E. E. y Riley M. A. (1997) *Rhizobium* gone native: Unexpected plasmid stability of indigenous *Rhizobium leguminosarum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **94**: 5483−5488.

Willems A. y Collins M. D. (1993) Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* **43**: 305−313.

Yan A. M., Wang E. T., Kan F. L., Tan Z. Y., Sui X. H., Reinhold-Hurek B. y Chen W. X. (2000) *Sinorhizobium meliloti* associated with *Medicago sativa* and *Melilotus* spp. in arid saline soils in Xinjiang, China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**: 1887−1891.

Yanagi M. y Yamasato K. (1993) Phylogenetic analysis of the family *Rhizobiaceae* and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer. *FEMS Microbiology Letters* **107**: 115−120.

Young J. M., Kuykendall L. D., Martinez-Romero E., Kerr A. y Sawada H. (2003) Classification and nomenclature of *Agrobacterium* and *Rhizobium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**: 1689−1695.

Young J. M., Park D. C. y Weir B. S. (2004) Diversity of 16S rDNA sequences of *Rhizobium* spp. implications for species determination. *FEMS Microbiology Letters* **238**: 125−131.

Young J. P. W. (1994) All those new names: an overview of the molecular phylogeny of plant-associated bacteria. En: Daniels, M. J., Downie, J. A. y Osbourn, A. E. (Eds). *Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions*. 73−80 p. Kluwer, Dordrecht.

Young R. R. y Brockwell J. (1992) Influence of soil pH on the development of symbiosis in field-grown acid-sensitive and acid-tolerant annual medics. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **32**: 167−173.

Zhang X. G., Jessop R. S. y Alter D. (2003) Organic acid exudation associated with aluminium stress tolerance in triticale and wheat. *Australian Journal of Agricultural Research* **54**: 979−985.

Zhao Z., Williams S. E. y Schuman G. E. (1997) Renodulation and characterization of *Rhizobium* isolates from cicer milkvetch (*Astragalus cicer* L.). *Biology and Fertility of Soils* **25**: 169−174.

Zhao Z. Q., Ma J. F. y Takeda K. (2003) Differential Al resistance and citrate secretion in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Planta* **217**: 794−800.

Zheng S. J., Ma J. F. y Matsumoto H. (1998) Continous secretion of organic acids is related to aluminium resistance during relatively long-term exposure to aluminium stress. *Physiologia Plantarum* **103**: 209−214.

Zheng S. J., Yang J. L., He Y. F., Yu X. H., Zhang L., You J. F., Shen R. F. y Matsumoto H. (2005) Immobilization of aluminum with phosphorus in roots is associated with high aluminum resistance in buckwheat. *Plant Physiology* **138**: 297−303.

Zribi K., Mhamdi R., Huguet T. y Aouani M. (2005) Diversity of *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* nodulating *Medicago truncatula* according to host and soil origins. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **21**: 1009−1015.

Zunino H. y Borie F. (1985) Materia orgánica y procesos biológicos en suelos alofánicos. En: Tosso, J. (Eds). *Suelos volcánicos de Chile*. 341−425 p. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Santiago, Chile.