

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**IDENTIFICACIÓN GENÉTICA DE BACTERIAS AISLADAS DE *SOPHORA* SPP.  
EN CHILE Y ASOCIADAS A *SOPHORA TOROMIRO* (PHIL.) SKOTTSB.  
ESPECIE EXTINTA EN SU HÁBITAT NATURAL.**

**POR**

**MARÍA TERESA ALVARADO IBÁÑEZ**

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

**CHILLÁN – CHILE  
2025**

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**IDENTIFICACIÓN GENÉTICA DE BACTERIAS AISLADAS DE *SOPHORA*  
SPP. EN CHILE Y ASOCIADAS A *SOPHORA TOROMIRO* (PHIL.) SKOTTSB.  
ESPECIE EXTINTA EN SU HÁBITAT NATURAL**

**POR**

**MARÍA TERESA ALVARADO IBÁÑEZ**

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

**CHILLÁN – CHILE  
2025**

Aprobada por:

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

---

Guía

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

---

Asesor

Profesor Asociado, Valeria Velasco P.  
Ing. Agrónomo, Ph.D.

---

Asesor

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

---

Decano

**TABLA DE CONTENIDOS**

	<b>Página</b>
Resumen.....	1
Summary.....	2
Introducción.....	2
Materiales y Métodos.....	5
Resultados y Discusión.....	9
Conclusiones.....	21
Referencias.....	21

**ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS**

		<b>Página</b>
Figura 1	Árbol filogenético Máxima verosimilitud basado en el gen 16S rRNA Y clasificación de según efectividad simbiótica.	10
Figura 2	Árbol filogenético Máxima verosimilitud basado en los genes concatenados 16S rRNA, <i>glnII</i> , <i>recA</i> y <i>rpoB</i> .	16
Figura 3	Árbol filogenético Máxima verosimilitud del gen parcial <i>nodA</i>	18
Tabla 1	Cepas bacterianas para identificar a nivel de especie y evaluación de la formación de nódulos y efectividad de la fijación de Nitrógeno en <i>S. toromiro</i>	6

## **IDENTIFICACIÓN GENÉTICA DE BACTERIAS AISLADAS DE *SOPHORA* SPP. EN CHILE Y ASOCIADAS A *SOPHORA TOROMIRO* (PHIL.) SKOTTSB. ESPECIE EXTINTA EN SU HÁBITAT NATURAL**

GENETIC IDENTIFICATION OF BACTERIA ISOLATED FROM *SOPHORA* SPP. IN CHILE AND ASSOCIATED WITH *SOPHORA TOROMIRO* (PHIL.) SKOTTSB. AN EXTINCT SPECIES IN ITS NATURAL HABITAT

**Palabras índice adicionales: fijación biológica de nitrógeno, rizobios, *Mesorhizobium*, Análisis Multilocus de Secuencia (MLSA).**

### **RESUMEN**

*Sophora toromiro* es un arbusto endémico de Rapa Nui, extinto en estado silvestre, y que actualmente está en vías de re inserción a su hábitat natural. Pertenece a la familia Fabaceae. Estudios previos han inoculado la planta con bacterias extraídas de nódulos de ejemplares de *Sophora spp.*, provenientes de Nueva Zelanda y Chile continental e insular, algunas de ellas resultando ser simbioses efectivos. En la presente investigación se analizaron las relaciones filogenéticas de las cepas chilenas, amplificando los genes 16S rRNA y *nodA* y realizando un árbol de máxima verosimilitud para cada gen. También se realizó un Análisis de Secuencia Multilocus (MLSA), de los genes conservados 16S rRNA, *glnII*, *recA*, *rpoB*, a través de un árbol concatenado de máxima verosimilitud. Los resultados arrojaron que los géneros de las bacterias encontradas en los nódulos de *Sophora spp.*, fueron *Mesorhizobium*, *Brucella*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Paraburkholderia*, *Pseudomonas*, *Dyella* y *Collimonas*. Estos tres últimos no han sido descritos como rizobios, pero al menos *Dyella* podría resultar ser una Rizobacteria Promotora del Crecimiento Vegetal (PGPR). Además, tres de las cepas que habían presentado mejores resultados en la nodulación y fijación de nitrógeno, se agrupan como la misma especie bacteriana, perteneciente al género *Mesorhizobium* y no se encontraron secuencias de bacterias descritas anteriormente con las que pudiese ser identificada.

## SUMMARY

*Sophora toromiro* is a shrub endemic to Rapa Nui, extinct in the wild and currently in the process of being reintroduced into its natural habitat. It belongs to the Fabaceae family. Previous studies have inoculated the plant with bacteria isolated from nodules of *Sophora* spp. specimens from New Zealand and continental and insular Chile. Some of these bacteria turned out to be effective symbionts. In this research work, the phylogenetic relationships of the Chilean strains were analyzed, amplifying the 16S rRNA and *nodA* genes and constructing a maximum likelihood tree for each gene. A Multilocus Sequence Analysis (MLSA) of the housekeeping genes 16S rRNA, *glnII*, *recA*, *rpoB* was also performed through a concatenated maximum likelihood tree. Results showed that the genera of the bacteria found in the nodules of *Sophora* spp. were *Mesorhizobium*, *Brucella*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Paraburkholderia*, *Pseudomonas*, *Dyella* and *Collimonas*. These last three have not been described as rhizobia, but at least *Dyella* could be a Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). In addition, three of the strains that had best results in nodulation and in nitrogen fixation, were grouped as the same bacterial species within the genus *Mesorhizobium*, and different to previously described bacterial species.

## INTRODUCCIÓN

*Sophora toromiro* (Phil.) Skottsberg. es una especie arbustiva endémica de Rapa Nui (Skottsberg, 1920), declarada extinta en estado silvestre durante la década de 1960, y que ha sobrevivido en algunos jardines botánicos de Europa y Chile (Maunder, 1992; Ricci *et al.*, 1997). Fue identificado por primera vez en 1873 por Philippi quien la reconoció como especie distinta de *Edwardsia tetraptera*, nombrándola como *Edwardsia toromiro*, el cual era uno de los tres arbustos presentes en la isla (Philippi, 1873). En 1922 Skottsberg la trasladó al género *Sophora*. En esa época, el pequeño arbusto observado en la ladera del volcán Rano Kau se encontraba en peligro de extinción, y se vaticinaba su pronta desaparición (Skottsberg, 1920).

A inicios del siglo XX, Skottsberg describió a *S. toromiro* como un arbusto o árbol pequeño de hasta 5 m de altura, con un tronco de 10 a 20 cm de diámetro, y una

corteza de color marrón rojizo, con fisuras longitudinales. La especie pertenece a la sección *Edwardsia* del género *Sophora*, cuyas flores se caracterizan, entre otras cosas, por poseer un estandarte extendido que se proyecta hacia adelante y por un fruto que suele poseer cuatro alas (Mackinder *et al.*, 1997). Las hojas son compuestas, imparipinnadas, miden entre 4,2 y 7,4 cm de largo, cuyo peciolo blanco y seríceo tiene una longitud entre 0,5 y 0,9 cm. Las flores son solitarias y alcanzan entre 1,5 a 3 cm de largo. La corola es amarilla, el estandarte es oboval, y la flor cuenta con 10 estambres libres y un ovario linear oblongo (Mackinder *et al.*, 1997).

El género *Sophora* pertenece a la familia Fabaceae, cuyas especies tienen la capacidad de establecer una relación simbiótica con bacterias del suelo. Se han descrito bacterias simbiotas de la clase alfa-proteobacteria, cuyos géneros más conocidos son *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer* (*Sinorhizobium*), y *Azorhizobium*; o bien pertenecientes a la clase beta-proteobacteria, que incluye a *Paraburkholderia*, *Cupriavidus* y *Trinickia* (Vasconcelos *et al.*, 2020). Cabe destacar que estas bacterias no conforman un taxón, sino más bien corresponde a la denominación a un grupo polifilético de linajes bacterianos dentro de las proteobacterias (De Lajudie *et al.* 2019).

El nombre comúnmente utilizado para las bacterias que forman asociación simbiótica con leguminosas es rizobios, las cuales al colonizar la raíz efectúan una reducción de nitrógeno atmosférico a amoníaco, una forma biodisponible de nitrógeno para las plantas, por acción del complejo enzimático nitrogenasa (Ferguson *et al.*, 2013). A cambio la planta, en su proceso de fotosíntesis reduce Dióxido de Carbono y moviliza a las raíces los fotosintatos que la bacteria utilizará como combustible (Long, 1989). Esta simbiosis se establece en unos órganos llamados nódulos, que se forman en la planta por acción de la bacteria, generalmente ubicados en la raíz, tal como demostró Beyerinck en 1888 (Perret *et al.*, 2000).

El proceso simbiótico se inicia por la secreción de flavonoides desde las raíces de las leguminosas (Peters *et al.*, 1986), los cuales activan en los rizobios las proteínas Nod, estimulando los genes *nod* que son parte activa en la síntesis de factores Nod (Del cerro, 2017). Estos factores, son lipoquitooligosacáridos, que al

ser detectados por la leguminosa inducen la división celular en el córtex, lo que produce el rizado de los pelos radiculares y la consecuente formación de hilos o cordones infecciosos (Murray, 2011). Una vez establecida la bacteria dentro de las células del nódulo, adopta una forma simbiótica denominada bacteroide (Vasconcelos *et al.*, 2020).

Dada la amplia gama de especies de rizobios y leguminosas, ambas partes han desarrollado diversos mecanismos para seleccionar a sus compañeros simbióticos, principalmente a través de la síntesis y reconocimiento de flavonoides y factores Nod (Walker *et al.*, 2020). Algunos ejemplos de relaciones específicas en el género *Sophora* son entre *Rhizobium leguminosarum* y *S. chathamica*; mientras que *Mesorhizobium ciceri* y *M. loti* se vinculan con *S. microphylla* y *S. tetrapera* (Weir *et al.*, 2004), y *S. longicarinata* se asocia con *M. amorphae*, *M. huakuii*, *M. loti* y *M. septentrionale* (De Meyer *et al.*, 2015).

Respecto a *S. toromiro*, a inicios de siglo se inoculó en cultivos *in vitro* con *Rhizobium leguminosarum*, sin lograr una infección efectiva (Jordan *et al.*, 2001). Además, se ha reportado en los suelos de Rapa Nui una alta relación Carbono/Nitrógeno, lo que perjudica la vida microbiológica (Benni, 2017), y que a la vez explica la baja sobrevivencia de los ejemplares de toromiro que se han intentado establecer en la zona. Esto refuerza la necesidad de identificar a los mejores simbiontes para inocularlos en los sitios de establecimiento de la especie (Benni, 2017).

Más reciente es el estudio realizado por Olave (2020), en el cual se aislaron cepas bacterianas de nódulos de distintas especies del género *Sophora* en Chile continental e insular, para luego ser identificadas preliminarmente a través de la amplificación del gen ribosomal 16S rRNA. Posteriormente se incluyeron cepas provenientes de ejemplares de género *Sophora* de Nueva Zelanda, las cuales en conjunto con las cepas chilenas fueron inoculadas en *S. toromiro*, donde se clasificaron según el peso seco alcanzado en comparación con el control nitrogenado. Se consideraron efectivas aquellas cepas que alcanzaron un peso seco mayor o igual al 75%; parcialmente efectivas cuando su peso fluctuó entre mayor o igual a 20%, pero menor al 75%; e inefectivas las que pesaron menos del

20%. Además, se registraron las cepas que no generaron nódulos (Yates, 2008). Bajo este criterio, se consideraron simbioses efectivos tres cepas extraídas de *S. microphylla*, y una de *S. macrocarpa*, todas del género *Mesorhizobium*. Mientras que cepas provenientes de *S. toromiro* del Jardín Carlos Douglas en Yumbel, no formaron nódulos o no fueron efectivas en la fijación de Nitrógeno, lo que indica que estos ejemplares formaron nódulos con las bacterias que tenían al alcance, pero no las más eficientes en la nodulación y fijación (Olave, 2020).

Debido a que el gen 16S rRNA es muy conservado para permitir la separación taxonómica a nivel de especies (Martens *et al.*, 2007; De Lajudie *et al.*, 2019; Klepa *et al.*, 2024), las cepas bacterianas antes mencionadas sólo han sido identificadas a nivel de género y se requiere secuenciar un número mayor de genes. El análisis de secuencias multilocus (MLSA, del inglés *multilocus sequence analysis*), ha sido utilizado para el estudio de las relaciones genómicas entre especies y permiten conocer la diversidad de un grupo bacteriano particular (Martens *et al.*, 2008; Mousavi *et al.*, 2014; De Lajudie *et al.*, 2019; Klepa *et al.*, 2024). Esta consiste en la concatenación de al menos tres genes conservados codificantes de proteínas, logrando de esa forma un análisis filogenético robusto (Mousavi *et al.*, 2014; Klepa *et al.*, 2024).

La identificación de los rizobios asociados a especies del género *Sophora* en Chile, permite la comparación con otras especies descritas asociadas al género *Sophora* en el mundo (De Meyer *et al.*, 2015; De Meyer *et al.*, 2016; Tan *et al.*, 2015), pues se desconoce si las cepas encontradas corresponden a especies bacterianas ya descritas y asociadas a otras especies de *Sophora* o especies nativas no descritas aún. Este trabajo tuvo por objetivo identificar cepas bacterianas asociadas a plantas del género *Sophora* en Chile mediante el análisis de las relaciones filogenéticas individuales y de secuencias de genes conservados concatenados.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Reactivación de bacterias.**

Se emplearon bacterias aisladas desde diferentes especies de *Sophora* en Chile continental e insular (Tabla 1), y que presentaron interacción con *S. toromiro* (Olave,

2020). Estas se mantienen criopreservadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  y pertenecen a la colección del Laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Concepción, Campus Chillán. Se pusieron a crecer en medio YMA (*Yeast mannitol agar*) estéril durante 5 días, a una temperatura de  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Tabla 1. Cepas bacterianas para analizar filogenéticamente y resultados de evaluación en la formación de nódulos y efectividad de la fijación de nitrógeno en *Sophora toromiro*.

Cepa	Origen	Efectividad <sup>1</sup>
AG-247	<i>Sophora fernandeziana</i> (Juan Fernández)	I
AG-250	<i>Sophora fernandeziana</i> (Juan Fernández)	I
AG-251	<i>Sophora fernandeziana</i> (Juan Fernández)	I
AG-252	<i>Sophora fernandeziana</i> (Juan Fernández)	PE
AG-262	<i>Sophora macrocarpa</i> (Chile continental, vivero)	X
AG-263	<i>Sophora cassioides</i> (Chile continental, vivero)	I
AG-264	<i>Sophora toromiro</i> (Chile continental, vivero)	X
AG-269	<i>Sophora toromiro</i> (Chile continental, vivero)	I
AG-274	<i>Sophora macrocarpa</i> (Chile continental)	PE
AG-275	<i>Sophora macrocarpa</i> (Chile continental)	E
AG-277	<i>Sophora macrocarpa</i> (Chile continental)	X
AG-278	<i>Sophora macrocarpa</i> (Chile continental)	X
AG-285	<i>Sophora macrocarpa</i> (Chile continental)	I
AG-289	<i>Sophora macrocarpa</i> (Chile continental)	PE
AG-294	<i>Sophora macrocarpa</i> (Chile continental)	X

(Olave, 2020) <sup>1</sup> E: Efectiva; PE: Parcialmente efectiva; I: Inefectiva, X: No hay formación de nódulos.

### **Amplificación de los genes conservados y de nodulación.**

La identificación a nivel de especie se realizó a través de la amplificación, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los genes conservados 16S rRNA, *glnII*, *recA* y *rpoB*. Además, se secuenció el gen parcial de nodulación *nodA*.

Para el lavado celular, se suspendieron y lavaron colonias puras de cada aislado, en 1 mL de solución salina estéril (0,89% p/v de NaCl) en tubos Eppendorf.

Cada uno de estos fue centrifugado a 3.200 g por 2 min, se extrajo el sobrenadante y volvió a ser suspendido en solución salina estéril. Todas las muestras fueron estandarizadas a una densidad óptica de 6,0 a 600 nm de longitud de onda (Modificado de Gerding *et al.*, 2012).

La extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN) se realizó con el kit de purificación de ADN Genómico Wizard, Promega, para bacterias gram negativas. Se depositaron 500 µL de suspensión celular en un tubo de microcentrifugado de 1,5 mL los cuales se centrifugaron a 14.000 g x 2 min. Se retiró el sobrenadante y se añadió 600 µL de Nuclei lysis solution, y se pipeteó para mezclar. Las muestras fueron incubadas a 80 °C por 5 min, y luego se enfriaron a temperatura ambiente. Se incorporó 3 µL de RNase solution y se realizaron 5 inversiones manuales, para posteriormente incubar a 37 °C durante 40 min, y luego se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se continuó añadiendo 200 µL de protein precipitation solution y se agitó en vortex durante 20 s. Lo siguiente fue una incubación en hielo durante 5 min, y un posterior centrifugado a 16.000 g por 3 min. Se transfirió el sobrenadante del centrifugado a tubos de microcentrifugado con 600 µL de isopropanol a temperatura ambiente. Se invirtieron manualmente y se centrifugó a 16,000 g por 2 min. Se eliminó el sobrenadante y se añadieron 600 µL de etanol al 70% a temperatura ambiente, y con el objetivo de lavar el ADN, se invirtió suavemente. Posteriormente se sometieron a un centrifugado a 16.000 g por 2 min y se aspiró el etanol. Se dejó secar por 3 horas. Luego, se adicionó 100 µL de ADN solución rehidratante, y se incubó a 65 °C por 1 hora. Finalmente, se mantuvo en enfriamiento a temperatura ambiente.

Cada mezcla de reacción PCR consistió en 40 µL compuesta por 2 µL de preparado de ADN bacteriano a una concentración de 10 ng µL<sup>-1</sup>; 0,3 µL de enzima Taq polimerasa (1,25U); 0,8 µL de cada partidador Forward y Reverse (0,2 µM); 0,8 µL de cada dNTPs (0,2 mM); 1,6 µL de MgCl<sub>2</sub> (2mM); 4 µL de reactivo buffer (1x); 29,7 µL de agua.

Los partidores utilizados para el gen 16S rRNA fueron 27F (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG) y 1492R (5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT) (Xiang *et al.*, 2005), y las condiciones de PCR fueron 5 min a 95 °C, 30 ciclos de (94 °C por

40 s, 55 °C por 40 s, 72 °C por 1 min 30 s) y una elongación final a 72 °C por 7 min. Para el gen *glnII* se emplearon los amplificadores *gslI1* (AACGCAGATCAAGGAATTCG) y *gslI4* (GCGAACGATCTGGTAGGGGT) (Mutch *et al.*, 2003) y los ciclos fueron los mismos que para el gen 16S rRNA. En el caso del gen *recA* los amplificadores fueron *recA 41F* (TTCGGCAAGGGMTGRTSATG) y *recA 640R* (ACATSACRCCGATCTTCATGC) (Vinuesa *et al.*, 2005). Se ejecutaron dos protocolos PCR. El primero fue de 3 min 30 s a 95 °C, 30 ciclos de (94 °C por 1 min, 58 °C por 40 s, 72 °C por 1 min) y una elongación final 72 °C por 5 min. En el segundo protocolo la temperatura de hibridación fue de 60 °C. Para *rpoB* se usaron los partidores *rpoB83F* (CCTSATCGAGGTTACAGAAGGC), y *rpoB1061R* (AGCGTGTGCGGATATAGGCG) (Martens *et al.*, 2008). Las condiciones de PCR fueron 5 min a 95 °C, 3 ciclos de (94 °C por 2 min, 55 °C por 2 min, 72 °C por 1 min), luego 30 ciclos de (94 °C por 30 s, 55 °C por 1 min, 72 °C por 1 min) y extensión final 72 °C por 5 min (Modificado de Martens *et al.*, 2008). La amplificación de *nodA* empleó los partidores (*nodA1* TGCRGTGGAARNTRNNCTGGGAAA) y (*nodA2* GGNCCGTCRTCRAAWGTCARGTA) (Haukka *et al.*, 1998), y sus ciclos fueron 95 °C por 4 min, 35 ciclos de (95 °C por 45 s, 49 °C por 1 min, 72 °C por 2 min) y una extensión final de 72 °C por 7 min.

La amplificación de todos los genes fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,5%, en TBE (tris, borato y EDTA). Se dispuso en la cámara de electroforesis a 80 V durante 45 min y fue revisada bajo luz ultravioleta.

Las muestras se enviaron a secuenciar a AUSTRAL-Omics, Valdivia, Región de los Ríos, Chile.

### **Análisis de secuencias y construcción de árbol filogenético.**

Se utilizó el programa Geneious Prime para revisar los cromatogramas de las secuencias de nucleótidos recibidos desde AUSTRAL-Omics. Una vez ensambladas las secuencias forward y reverse, se establecieron las secuencias de consenso para cada cepa en estudio. Con ellas se recurrió a la base de datos de la página web de Centro Nacional de Información Biotecnológica NCBI (del inglés *National center of Biotechnology Information*) para encontrar especies con un porcentaje entre 95 y 100% de similitud en homología de secuencias y así compilar

las secuencias de sus cepas tipo. Con ellas se realizaron los árboles filogenéticos para los genes 16S rRNA, y *nodA*, así como también un árbol concatenado de 16S rRNA, *glnII*, *recA*, *rpoB*. Todos fueron alineados y construidos con el criterio de Máxima verosimilitud ML (Maximum Likelihood) en el software MEGA7. Se empleó el método de análisis Bootstrap 500. El proceso de edición gráfica de los árboles se realizó a través de la página web iTol y en ellos se incorporan los datos de efectividad simbiótica obtenidos por Olave (2020) para cepas chilenas, nomenclatura AG, y agregando las cepas provenientes de Nueva Zelanda que ya han sido publicadas como especie nueva previamente.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

### **Amplificación de secuencias.**

Se logró amplificar el gen 16S rRNA para todas las cepas, logrando secuencias de 720 pares de bases que se analizaron con secuencias descargadas desde genbank. La amplificación del gen ribosomal 16S rRNA fue exitosa en todos los casos, pese a la variedad de especies encontradas. Por esta cualidad es usado en la sistemática de bacterias (Weir, 2006), y ha sido considerado como médula espinal de la taxonomía de procariontes (Woese, 1987).

La amplificación del gen *glnII* logró secuencias de 476 pares de bases, excepto para las cepas AG-247, AG-269, AG-278, AG-285. De acuerdo con el árbol 16S rRNA (Figura 1), las cepas que no pudieron ser amplificadas para el gen *glnII* corresponden a los géneros, *Brucella*, *Dyella*, *Collimonas*, y *Pseudomonas*. Este gen es el encargado de la síntesis de glutamina sintetasa, una enzima esencial en la asimilación del Nitrógeno (Carvalho *et al.*, 2021).

Luego de que la enzima nitrogenasa reduce el nitrógeno atmosférico a amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), es transportado por las células vegetales, donde es asimilado como aminoácidos en la ruta glutamina sintetasa/glutamato sintetasa (GS/GOGAT) (Andrews *et al.*, 2018).

Existen al menos tres tipos de genes que codifican esta enzima, GSI codificada por *glnA* o *GlnI*, GSII codificada por el gen *glnII*, y GSIII cuyo gen es *glnN*.

Figura 1. Árbol filogenético Máxima verosimilitud basado en el gen 16S rRNA, y clasificación según efectividad simbiótica.

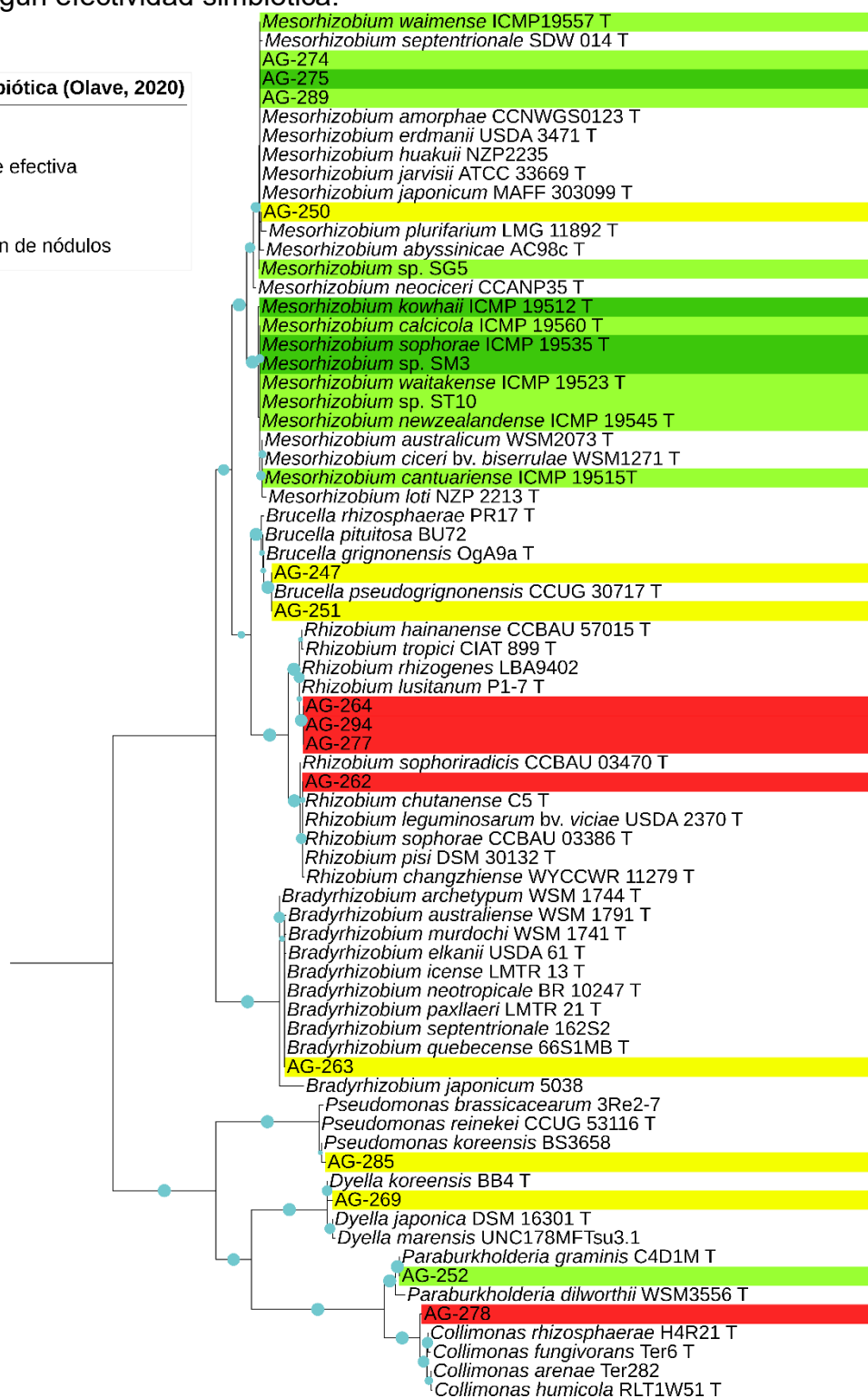
Tree scale: 0.1

**Efectividad simbiótica (Olave, 2020)**

- Efectiva
- Parcialmente efectiva
- Inefectiva
- Sin formación de nódulos

**bootstrap**

- 0.5
- 0.63
- 0.75
- 0.88
- 1



Secuencias de aproximadamente 720 pares de base. Valor Bootstrap 500 repeticiones, expresadas en porcentajes, valores inferiores a 50% no se muestran. Resultados de Efectividad obtenidos por Olave (2020).

El primero está presente en bacterias y arqueas (Carlson y Chelm, 1986), pero también ha sido encontrado en eucariotas (Carvalho *et al.*, 2021). El segundo en células eucarióticas y algunas bacterias como los rizobios (Turner and Young, 2000), y el tercero en algunos ejemplares de bacterias, arqueas y eucariotas, como señala Carvalho (2021). En este último trabajo, a través del análisis de múltiples secuencias se demostró que sólo las especies pertenecientes al género *Rhizobium* mostraron la proteína tipo II, el resto de los géneros de procariontes, dentro de ellos el género *Pseudomonas*, solo mostró tipo I. Esto podría explicar el que no se amplificara *glnII* para varias cepas, ya que, salvo el caso de *Brucella*, los demás géneros no han sido descritos como rizobios, (Klepa *et al.*, 2024; Wang *et al.*, 2019; De Lajudie *et al.*, 2019; Giller *et al.*, 2016; Andrews *et al.*, 2018).

Pese a lo señalado anteriormente, de las cepas no amplificadas, solo la correspondiente a *Collimonas* spp. no logró formar nódulos en *S. toromiro* (Olave, 2020). En el caso de *Brucella* y *Pseudomonas*, formaron nódulos, pero no lograron fijar nitrógeno en *S. toromiro* según la investigación de Olave (2020). En el caso de la cepa del género *Dyella*, fue extraída de un ejemplar de *S. toromiro* ubicado en Yumbel, Región del Bío-Bío, y resultó capaz de formar nódulos (Olave, 2020).

Si bien el gen *glnI* está ampliamente presente en los procariontes y pudiese haber sido una alternativa más fácil de amplificar, se ha descrito como poco variable entre las distintas especies, lo que dificulta la identificación (Taboada *et al.*, 1996). A diferencia de *glnII*, el cual es ampliamente usado para el Análisis Multilocus de Secuencia (MLSA) en el grupo de los rizobios (De Lajudie *et al.*, 2019).

Las secuencias del gen *recA* alcanzaron un tamaño de 412 pares de bases y fue un proceso infructífero para las bacterias AG-252, AG-277, y AG-285, identificadas dentro de los géneros *Paraburkholderia*, *Rhizobium*, y *Pseudomonas* respectivamente, de acuerdo con la secuenciación de 16S rRNA.

En el caso de *rpoB* se obtuvieron 407 pares de bases de longitud y no se logró este para AG-278 y AG-285 que corresponden a especies de los géneros *Collimonas* y *Pseudomonas* respectivamente, según la identificación por secuenciación del gen 16S rRNA.

Finalmente, *nodA* sólo fue amplificado en las cepas AG-274, AG-275, AG-289 y AG-250; con secuencias de 470 pares de base, las cuales correspondieron al género *Mesorhizobium* de acuerdo con la secuenciación de 16S rRNA.

### **Relaciones filogenéticas del gen 16S rRNA.**

El árbol del gen 16S rRNA (Figura 1) muestra la ubicación de las cepas analizadas en relación con otras cepas bacterianas tipo. Debido al alto nivel de conservación del gen 16S rRNA, en general su análisis permite la identificación del género, sin lograr diferenciar especies dentro de él (Klepa *et al.*, 2024). Se muestra además la clasificación de efectividad de nodulación presentada por Olave (2020).

La cepa AG-250 pertenece al género *Mesorhizobium* y es cercana a *M. plurifarum*. Dentro del mismo género se ubican las bacterias AG-274, AG-275 y AG-289, las cuales son consideradas idénticas en este gen, y se agrupan junto con las especies *M. amorphae*, *M. erdmanii*, *M. huakuii*, *M. japonicum*, *M. waimense*, *M. jarvisii*, *M. septentrionale*, y *M. abyssinicae*, en el mismo clado. Trabajos anteriores señalan que las especies *M. loti*, *M. jarvisii*, *M. huakuii*, *M. erdmanii* y *M. japonicum* son genéticamente muy similares (Martínez-Hidalgo *et al.*, 2016).

Las cepas AG-247 y AG-251 se muestran idénticas a la especie *Brucella pseudogrignonensis*, la cual ha sido reportada por causar infecciones en humanos, encontrada habitualmente en suelos y cuerpos de agua (Kampfer *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2021). El género *Brucella*, antes llamado *Ochrobactrum* (Hördt *et al.*, 2020), fue conocido por contener especies patógenas zoonóticas del ganado tales como *B. abortus*, *B. milletensis*, y *B. suis*. (Whatmore *et al.*, 2021). En 2005 y 2007 (Trujillo *et al.*, Zurdo-Piñeiro *et al.*,) se hicieron las primeras descripciones de especies nuevas dentro del género que tenían la capacidad de nodular con fabáceas. El primer caso fue en *Lupinus albus*, y el segundo en *Phaseolus vulgaris*. En ambos, se presume que dichos genes fueron obtenidos de otras especies bacterianas con capacidad de nodular desde la rizosfera de la fabácea hospedera, debido a que los genes de nodulación *nodD* y *nifH* se encuentran en plásmidos, lo que facilita la transferencia horizontal; y al alto porcentaje de similitud con las secuencias de genes simbióticos de otros géneros asociados a leguminosas como *Ensifer* y *Rhizobium*. Las cepas aquí trabajadas, fueron extraídas desde *S. fernandeziana*, en la Isla Robinson

Crusoe. Formaron nódulos que resultaron ser inefectivos (Olave, 2020). Por lo que se puede presumir que los genes de nodulación fueron transferidos desde otras bacterias.

Las cepas AG-264, AG-277 y AG-294 pertenecen al género *Rhizobium* y, además podrían corresponder a la misma especie o ser muy cercanas entre sí. Se ubican en el mismo clado con *R. rhizogenes* y *R. lusitanum*.

Continuando con el mismo género se encuentra la cepa AG-262, cuyas características no permiten separarla de una especie distinta a *R. chutanense*, *R. leguminosarum*, *R. sophorae*, *R. pisi*, *R. changzhiense*. Young y colaboradores (2021), tras un análisis de ciento veinte (120) genes conservados, mostraron que estas especies se encuentran en lo que se llama *Rhizobium leguminosarum* complex (Rlc), el cual incluye 18 especies y 7 cepas únicas adicionales que no han sido descritas aún.

Dentro del género *Bradyrhizobium* se localiza la bacteria denominada AG-263, y se encuentra en el mismo clado junto con *B. australiense*, *B. elkanii*, *B. icense*, *B. neotropicale*, y *B. paxllaeri*. Ormeño-Orrillo y Martínez-Romero (2019) luego de hacer un análisis con 180 secuencias de 16S rRNA pertenecientes a este género, mencionaron dos principales super-clados, entre varios otros, uno donde se ubica *B. japonicum*, y el segundo donde se ubica *B. elkanii*. El mismo resultado obtuvo Avontuur *et al.*, (2019), luego de un análisis multilocus. Aquella forma también se encuentra en el árbol aquí presentado.

La cepa AG-285 pertenece al género *Pseudomonas*, sin agruparse con ninguna especie presente en el árbol. Es un género que pertenece al filo de las gammaproteobacterias. En este grupo, ha habido sospechas de encontrar bacterias simbiotes de leguminosas; debido a que se comprobó la capacidad de nodular de *Pseudomonas* sp. Ch0048 con *Robinia pseudoacacia*, pero no se pudo comprobar la capacidad de fijar nitrógeno de la cepa, ni que estos genes (*nod* y *nif*) no hayan sido adquiridos por transferencia horizontal, desde otras bacterias que viven en los nódulos. Por lo que el hecho de que existan gammaproteobacterias con capacidad de ser rizobios sigue siendo dudoso (Wang *et al.*, 2019).

La cepa AG-252 es idéntica a *Paraburkholderia graminis*. Esta especie fue descrita en primera instancia como *Burkholderia graminis*, en referencia a su hallazgo en la rizosfera de gramíneas (Viallard *et al.*, 1998; Sawana *et al.*, 2014). Luego de un análisis del género, mostró cómo éste se dividía en dos super clados, donde uno contenía especies fitopatógenas, y el segundo, especies ambientales, que además se distinguen por dos indels de secuencia conservada y carecen de las firmas moleculares que son específicas de *Burkholderia*. Así trasladó esta especie al naciente género *Paraburkholderia*.

La cepa AG-269 pertenece al género *Dyella* el cual no ha sido descrita dentro de las familias de rizobios (Klepa *et al.*, 2024; De Lajudie *et al.*, 2019; Giller *et al.*, 2016; Andrews *et al.*, 2018; Weir, 2006; O'Hara *et al.*, 2016). En otros estudios, *Dyella* no mostró habilidades para la fijación de nitrógeno (Takada *et al.*, 2019). Pese a lo anterior, si se ha reportado la posibilidad de que *Dyella* sea una bacteria PGPR (Rizobacteria promotora del crecimiento vegetal, del inglés *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*), luego de una correlación positiva entre ella y la biomasa nodular (masa y cantidad), y la actividad nitrogenasa en cultivos de soja (Wang *et al.*, 2020). Palaniappan *et al.*, (2010), aislaron cepas bacterianas desde nódulos de *Lespedeza* sp., encontrando cinco cepas que resultaron ser *Dyella*. De ellas, ninguna presentó el *gennodA*, ni noduló con *Vigna unguiculata* L., pero sí, al menos cuatro presentaron producción de ácido indol acético y de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxilo (ACC deaminasa). Dos de ellas además solubilizaron fósforo. La ACC deaminasa, disminuye la concentración del etileno, esta molécula inhibe la formación de nódulos (Hernández *et al.*, 2015), por lo que su accionar tendría un efecto sinérgico en la simbiosis rizobio-leguminosa. Finalmente, la bacteria AG-278 es cercana al género *Collimonas*.

Se pueden dividir los géneros entre aquellos que han sido descritos como simbioses de leguminosas de la rizosfera con actividad fijadora de N<sub>2</sub> y aquellas que no. En el primer grupo se encuentra a *Mesorhizobium*, con las cepas: AG-250, AG-275, AG-275 y AG-289; *Brucella*, que incluye a: AG-247 y AG-251; *Rhizobium*: AG-262, AG-264, AG-277 y AG-294; *Bradyrhizobium*: AG-263 y *Paraburkholderia*: AG-252. Mientras que el segundo grupo está compuesto por *Pseudomonas*: AG-

285; *Dyella*: AG-269 y *Collimonas*: AG-278 (Klepa *et al.*, 2024; Wang *et al.*, 2019; De Lajudie *et al.*, 2019; Giller *et al.*, 2016; Andrews *et al.*, 2018).

### **Relaciones filogenéticas de los genes concatenados 16S rRNA, *glnII*, *recA* y *rpoB*.**

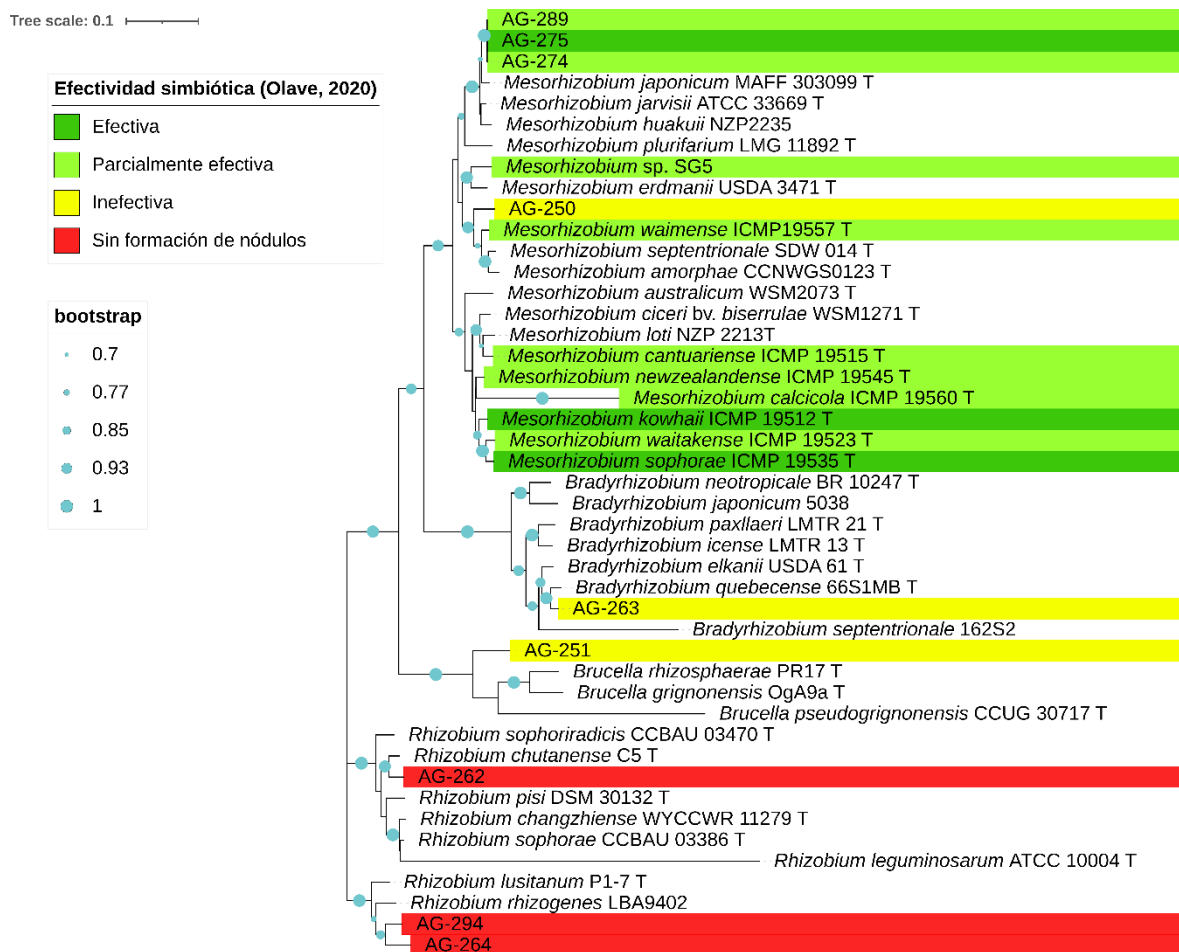
Para dilucidar de manera más clara la taxonomía de los rizobios se ha empleado la técnica de Análisis Multilocus de Secuencias (MLSA) (Stackebrandt *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2013; Hungria *et al.*, 2015; Helene *et al.*, 2020; Klepa *et al.*, 2024). Las cepas mostradas en el árbol concatenado corresponden a ejemplares bacterianos a los cuales todos sus genes conservados en estudio; 16S rRNA, *glnII*, *recA*, *rpoB*; lograron ser amplificados.

El árbol concatenado (Figura 2) muestra que las cepas AG-275, AG-274 y AG-289 se agrupan como una misma especie. Pertenecen al género *Mesorhizobium* y la especie más cercana es *M. japonicum*. Además, presentaron resultados similares de nodulación y fijación de nitrógeno cuando se inoculó ejemplares de *S. toromiro* con dichas bacterias, siendo las mejores simbioses para el árbol de Rapa Nui (Olave, 2020). En particular, la cepa AG-275 tuvo resultados de nodulación y fijación de nitrógeno que la caracterizaron como una cepa efectiva, mientras que las otras dos fueron categorizadas como parcialmente efectivas. Todas ellas fueron extraídas de *S. macrocarpa*, en Quilaco, Altos del Biobío, Región del Biobío (Olave, 2020). Mientras que en el trabajo de Gerding y colaboradores (2023), AG-274 y AG-275 nodularon con *S. toromiro*, *S. fernandeziana*, y solo AG-274 con *S. cassioides*. Dentro del mismo género también se encuentra la cepa AG-250, la cual está en un clado diferenciado de otras especies. En la investigación de Olave, se observó la presencia de nódulos, pero estos no fijaron nitrógeno, por lo que se consideró una cepa inefectiva. Mientras que la información presentada por Gerding y colaboradores (2023) indica que se produjo nodulación con *S. toromiro*, y *S. fernandeziana*.

Además, se observa que las otras especies que han sido indicados como simbioses efectivos de toromiro, *M. kowhaii* y *M. sophorae* (Olave, 2020) se ubican en clados distintos de las cepas de origen chileno.

La cepa AG-263 se agrupa junto a *Bradyrhizobium*, siendo cercana a *B. quebecense*. Fue aislada de *S. cassioides* del Vivero Carlos Douglas, y se consideró infectiva por el autor, es decir que formó nódulos, pero no fijó Nitrógeno. (Olave, 2020). En Gerding *et al.*, (2023), también logró nodular con *S. toromiro*, pero no con otros árboles del género *Sophora*.

Figura 2. Árbol filogenético Máxima verosimilitud basado en los genes concatenados 16S rRNA, *glnII*, *recA* y *rpoB*, y clasificación según efectividad simbiótica.



Secuencias de aproximadamente 1992 pares de base. Valor Bootstrap 500 repeticiones, expresadas en porcentajes, valores inferiores a 70% no se muestran. Resultados de Efectividad obtenidos por Olave (2020).

La cepa AG-251 se posicionó dentro del género *Brucella*. Sin embargo, se distancia de *Brucella pseudogrignonensis*, especie a la que había resultado idéntica

en la amplificación del gen 16S rRNA. Olave (2020), al evaluar su fijación con *S. toromiro*, consideró que era inefectiva, es decir, hubo formación de nódulos mas no fijación de nitrógeno. Mientras que en el trabajo de Gerding, esta cepa noduló con *S. toromiro*, *S. cassioides*, y *S. fernandeziana*. Este género, anteriormente llamado *Ochrobactrum*, ha sido descrito como rizobio (De Lajudie *et al.*, 2019), pero sus hospederos suelen pertenecer a los géneros *Acacia* y *Lupinus* (Andrews *et al.*, 2017).

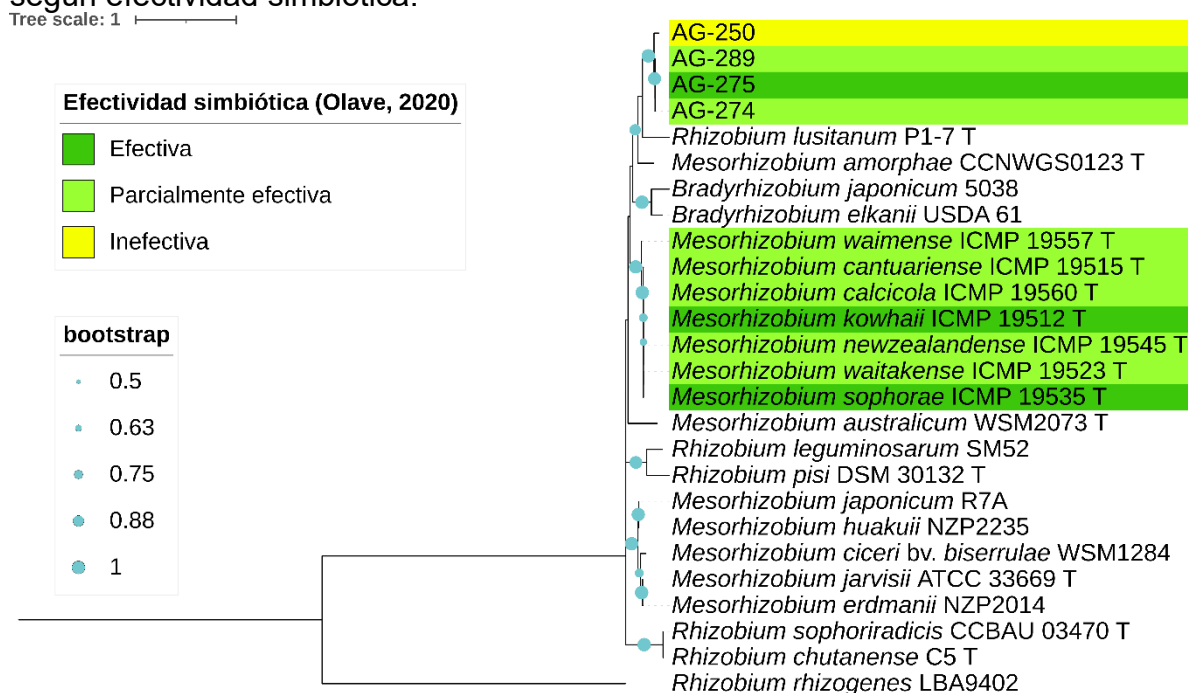
Dentro del género *Rhizobium* quedaron las cepas AG-294 y AG-264. Entre ellas hay diferencias que no permitieron agruparlas en el mismo clado, contrastando con lo ocurrido en el árbol de relaciones filogenéticas según el gen 16S rRNA, donde se muestran como idénticas entre sí. De acuerdo con Olave (2020), la cepa AG-264 fue extraída de un ejemplar de *S. toromiro* ubicado en el Vivero Carlos Douglas, Yumbel, Región del Biobío, pese a ello, no formó nódulos tras ser inoculado en toromiro. Del mismo modo, en el trabajo de Gerding *et al.*, (2023), tampoco logró nodular con ninguno de los tres árboles de su investigación. La cepa AG-294 fue extraída de *S macrocarpa*, en Quilaco. No formó nódulos con toromiro, a diferencia de las cepas AG-274, AG-275 Y AG-289 que fueron aisladas del mismo árbol y sí establecieron simbiosis (Olave, 2020). Estos resultados refuerzan la idea de que *S. toromiro* puede tener huéspedes que no sean simbiotes efectivos, por lo que es importante inocular la o las cepas que aporten nitrógeno atmosférico a la planta (Olave, 2020). Ya que se han visto casos en que luego de seis a siete años de inoculación en el suelo con cepas que poseen los genes simbióticos adecuados para una leguminosa específica, las cepas nativas los adquieren por transferencia horizontal (Barcellos *et al.*, 2007; Nandaseena *et al.*, 2006; Nandaseena *et al.*, 2007).

También dentro del género *Rhizobium* se encuentra la cepa AG-262, siendo la especie conocida más cercana *R. chutanense*, la cual, según el trabajo de Young *et al.*, (2021), también se ubica en el complejo *R. leguminosarum*. Fue extraída de *S. macrocarpa*, en el Vivero Carlos Douglas, y no logró formar nódulos en *S. toromiro* (Olave 2020). Gerding *et al.*, (2023), no lograron nodular con ninguna de las tres especies de *Sophora* que participaron en esa investigación.

### Análisis del gen simbiótico *NodA*

Solo para cuatro bacterias se logró amplificar el gen *nodA* con el protocolo antes descrito. Las cepas AG-274, AG-275 y AG-289 se agruparon en el mismo clado. Estas tres cepas habían sido capaces de inducir nodulación en toromiro y fijar nitrógeno (Olave, 2020). La cepa AG-250 está contigua y diferenciada de las anteriores. Los resultados del estudio de Olave (2020) indican que esta cepa logró formar nódulos en *S. toromiro*, pero estos fueron inefectivos en la fijación de nitrógeno. Resulta afín el hecho de que estas cepas se agrupen en cercanía a las bacterias de fijación efectiva, ya que en otras investigaciones se ha mostrado que los genes simbióticos (*nodA*, *nodB*, *nodC*, *nifH*) de *Mesorhizobium* se ordenan en clados según sus plantas hospederas (Lemaire *et al.*, 2015).

Figura 3: Árbol filogenético Máxima verosimilitud del gen parcial *NodA* y clasificación según efectividad simbiótica.



Secuencias de aproximadamente 470 pares de base. Valor Bootstrap 500 repeticiones, expresadas en porcentajes, valores inferiores a 50% no se muestran. Resultados de Efectividad obtenidos por Olave (2020).

Las cepas provenientes de Nueva Zelanda que fueron evaluadas en cuanto a su efectividad simbiótica por Olave (2020), se agrupan cercanas entre ellas, pero distantes de las cepas chilenas, lo que indica que se trata de genes *NodA* distintos

entre sí, pese a que comparten la capacidad de nodular con *S. toromiro*. La similitud filogenética de los genes simbióticos de *Mesorhizobium* asociados a las especies de *Sophora* nativas de Nueva Zelanda, en contraste con la diferenciación que ocurre con los genes conservados, ya ha sido reportada previamente (Andrews *et al.*, 2018; Nguyen, *et al.*, 2017; De Meyer *et al.*, 2016; De Meyer *et al.*, 2015; Tan *et al.*, 2015). El hospedero de las especies neozelandesas efectivas para toromiro es *S. microphylla* (De Meyer *et al.*, 2016), ambos arbustos son mostrado cercanía filogenética (Peña *et al.*, 2000). Tanto las bacterias efectivas como parcialmente efectivas se ubican junto a *Mesorhizobium*, lo cual es congruente con reportes previos que muestran evidencia de que el género *Sophora* tiene a sus principales simbioses en el género bacteriano *Mesorhizobium*. (De Meyer *et al.*, 2015; De Meyer *et al.*, 2016; Nguyen, *et al.*, 2017; Tan *et al.*, 2015).

En muchas especies de rizobios, los genes que determinan el rango de hospederos y su eficacia en la fijación de nitrógeno están ubicados en plásmidos o islas simbióticas (Andrews *et al.*, 2018; Klepa *et al.*, 2024; Turner y Young, 2000). Por lo que se ha descrito que los genes de nodulación *nod* pueden ser compartidos a través de transferencia horizontal (Andrews *et al.*, 2018; Sullivan *et al.*, 1995; Barcellos *et al.* 2007; Nandaseena *et al.*, 2007; Nandaseena *et al.*, 2006; Kaneko *et al.*, 2000). Debido a esto puede ocurrir que la filogenia de los genes simbióticos como *nodA* no coincida con la filogenia de los genes conservados (16S rRNA, *glnII*, *recA*, *rpoB*) (Remigi *et al.*, 2016; Sullivan *et al.*, 1995; Andrews *et al.*, 2018). Este fenómeno también explica la distribución de las especies en los clados no coincida con la taxonomía de cada género, por ejemplo, se observa a *R. lusitanum* cercano a *M. amorphae*.

Hay una cepa que logró nodular y fijar parcialmente nitrógeno (Olave 2020), pero cuyo gen *nodA* no pudo ser amplificado. Esta fue AG-252, identificada según el árbol construido en base al gen 16S rRNA como *Paraburkholderia*. Este género ha sido caracterizado por contener cepas principalmente ambientales dentro de las betaproteobacterias, en el cual hay especies que pueden realizar simbiosis con leguminosas (Sawana *et al.* 2014). Por lo que podría tratarse de una cepa que sea simbionte fijador de nitrógeno. Este género se concentra principalmente en

Sudamérica y Sudáfrica, y nodula con especies nativas de las subfamilias Mimosoideae y Papilionoideae (Paulitsch *et al.*, 2021), esta última es a la cual pertenece el género *Sophora* (Andrews *et al.*, 2018). Si bien está documentada la capacidad de la transferencia horizontal de genes dentro de *Paraburkholderia*, no existe evidencia de este fenómeno entre alfa y betaproteobacteria (Lemaire *et al.*, 2015).

### **Cepas simbiotes de *Sophora toromiro*.**

Los resultados del árbol concatenado de genes 16S rRNA, *glnII*, *recA* y *rpoB*, junto con los del árbol del gen *nodA*, muestran resultados concordantes en cuanto a que las cepas AG-274, AG-275 y AG-289 constituyen una misma especie dentro del género *Mesorhizobium*, y que no coincide con alguna otra especie expuestas en dichos árboles. Según lo señalado en Olave (2020), corresponderían a un simbiote efectivo de *S. toromiro*, que además ha presentado nodulación en *S. fernandeziana* (Gerding *et al.*, 2023). Crecieron en medio YMA, y fueron extraídos de nódulos de *S. macrocarpa*, de la cual no se tiene conocimiento si son simbiotes efectivos. Las tres cepas provienen de la misma localidad, Quilaco, Altos del Bío-Bío, Región del Bío-Bío, Chile, y se ubican en clados distintos de las especies de *Mesorhizobium* provenientes de Nueva Zelanda, que han resultado ser simbiotes efectivos y parcialmente efectivos (Olave, 2020).

Se logró amplificar el gen parcial *nodA*, donde también las cepas AG-274, AG-275, AG-289 resultaron ser idénticas, y a la vez, se distanciaron filogenéticamente de las cepas capaces de nodular con *S. toromiro* provenientes de Nueva Zelanda.

Chun y colaboradores (2018) plantean que para identificar una especie como nueva se deben obtener las secuencias del gen 16S rRNA completas, y compararlas con sus vecinos filogenéticos, si la similitud es menor a 98,7% es una nueva especie. Por el contrario, si la similitud es igual o mayor al 98,7%, se debe calcular el OGRI (del inglés *Overall genome related index*) del genoma de las cepas tipos. Si los valores de ANI (*Average nucleotide identity*) dan valores menos a 95% o los valores de dDDH (*digital DNA-DNA hybridization*) dan menos de 70%; entonces sería una especie nueva.

Se sugiere, para comprobar que se trata de una especie nueva, seguir los lineamientos descritos en revisiones *del Subcommittee on the taxonomy of Rhizobia and Agrobacteria* (Subcomité de Taxonomía de Rizobios y Agrobacterias); creado por el *International Committee on Systematics of Prokaryotes* (ICSP) (Comité Internacional de Sistemática de Procariontes), los cuales indican que la información que se debe proveer para la descripción de una nueva especie involucra al menos: la secuenciación del genoma completo de la cepa tipo como mínimo, en caso de no tener la secuencia completa, sí incluir el tamaño del genoma obtenido, el contenido de C+G, el número de cóntigos, N50, la profundidad de secuenciación de cobertura, y la secuencia completa del gen 16S RNA de la cepa tipo. Y además la evidencia de que se trata de otra especie diferenciada de las anteriormente descritas, a través de los valores ANI Y dDDH (De Lajudie *et al.*, 2019; Chun *et al.*, 2018).

### CONCLUSIONES.

- En los nódulos de *Sophora spp* se identificaron los géneros bacterianos *Mesorhizobium*, *Brucella*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Paraburkholderia*, *Pseudomonas*, *Dyella*, *Collimonas*.
- Las cepas AG-274, AG-275 y AG-289 se agrupan como una misma especie, no descrita previamente, y han mostrado efectividad simbiótica con *S. toromiro*.

### BIBLIOGRAFIA

1. Andrews, M., S. De Meyer, E.K. James, T. Stępkowski, S. Hodge, M.F. Simon, & J. P. W. Young. 2018. Horizontal transfer of symbiosis genes within and between rhizobial genera: occurrence and importance. *Genes*. 9(7): 321.
2. Andrews, M., y M. E. Andrews. 2017. Specificity in legume-rhizobia symbioses. *International journal of molecular sciences*.18(4): 705.
3. Avontuur J. R., M. Palmer, C. W. Beukes, W.Y. Chan, M.P.A. Coetzee, J. Blom, T. Stępkowski, N.C. Kyrpides, T. Woyke, N. Shapiro, W.B. Whitman, S.N. Venter, y E. T. Steenkamp. 2019. Genome-

informed *Bradyrhizobium* taxonomy: where to from here?. Systematic & Applied Microbiology. 42 (4): 427–439

4. Barcellos, F. G., P. Menna, J.S. da Silva Batista, y M. Hungría. 2007. Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strain to indigenous diazotrophs *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian Savannah soil. Applied and environmental microbiology. 73(8): 2635-2643.
5. Benni, M. 2017. Análisis físico-químico de suelos utilizados para la recuperación de *Sophora* toromiro, especie endémica de Isla de Pascua. Trabajo de Titulación para optar al Título de Técnico Universitario en CONTROL DEL MEDIO AMBIENTE. Universidad Técnica Federico Santa María. Viña del Mar, Chile.
6. Carlson, T. A., y B. K. Chelm. 1986. Apparent eucaryotic origin of glutamine synthetase II from the bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. Nature. 322: 568–570.
7. Chun, J., A. Oren, A. Ventosa, H. Christensen, D. R. Arahall, M. S. A. P. da Costa, Rooney, H. Yi, X-W. Xu, S. De Meyer, y M.E. Trujillo. 2018. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 68(1): 461-466.
8. De Carvalho Fernandes, G., A. C. Turchetto-Zolet, y L. M. Pereira Passaglia. 2022. Glutamine synthetase evolutionary history revisited: tracing back beyond the last universal common ancestor. Evolution. 76(3): 605-622.
9. De Lajudie, P. M., M. Andrews, J. Ardley, B. Eardly, E. Jumas-Bilak, N. Kuzmanović, F. Lassalle, K. Lindström, R. Mhamdi, E. Martínez-Romero, L. Moulin, Mousavi, S., Nesme, X., Peix, A., Puławska, J., Steenkamp, E., Stępkowski, T., Tian Ch., P. Vinuesa, G. Wei, A. Willems, J. Zilli, y P. Young. 2019. Minimal standards for the description of new genera and species of rhizobia and agrobacteria. International journal of systematic and evolutionary microbiology. 69(7): 1852-1863.
10. De Meyer S. E., H. W. Tan, M. Andrews, P. B. Heenan, y A. Willems. 2016. *Mesorhizobium calcicola* sp. nov., *Mesorhizobium waitakense* sp. nov., *Mesorhizobium sophorae* sp. nov., *Mesorhizobium newzealandense* sp. nov. and *Mesorhizobium kowhahi* sp. nov. isolated from *Sophora* root nodules. Int J Syst Evol Microbiol. 66(2):786-795.

11. De Meyer SE, H. Wee Tan, P. B. Heenan, M. Andrews, A. Willems. 2015. *Mesorhizobium waimense* sp. nov. isolated from *Sophora longicarinata* root nodules and *Mesorhizobium cantuariense* sp. nov. isolated from *Sophora microphylla* root nodules. Int J Syst Evol Microbiol. 65(10):3419-3426.
12. Del Cerro, P. F. Pérez-Montaña, A. Gil-Serrano, F. J. López-Baena, M. Megías, M. Hungria, F. J. Ollero. 2017. The *Rhizobium tropici* CIAT 899 NodD2 protein regulates the production of Nod factors under salt stress in a flavonoid-independent manner. Sci. Rep. 7(1):46712.
13. Ferguson, B., M. H. Lin y P. M. Gresshoff. 2013. Regulation of legume nodulation by acidic growth conditions. Plant Signaling & Behavior. 8 (3): e23426-1 - e23426-5.
14. Gerding, M., T. Quezada, J. Espejo, I. Olave, S. Soto, P. Hernández. 2023. Rizobios asociados a *Sophora* spp. en Chile continental e insular y su potencial rol en el restablecimiento y sobrevivencia de estas especies en peligro de extinción. Congreso Chileno de Microbiología, XLV. 4 al 7 de diciembre, 2023. Sociedad de Microbiología de Chile. Hotel Enjoy, Pucón, Chile.
15. Gerding, M., G.W. O'Hara, L. Bräu, K. Nandasena and J.G. Howieson. 2012. Diverse *Mesorhizobium* spp. With unique nodA nodulating the South African legume species of the genus *Lessertia*. Plant Soil. 358: 385-401.
16. Giller, K. E., D. Herridge, y J.I. Sprent. 2016. The legume-rhizobia symbiosis and assessing the need to inoculate. Pp:15-24. In: Howieson J.G. and Dilworth M.J. (Eds). Working with rhizobia. Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR). Canberra, Australia.
17. Haukka K, K. Lindström, J. P. Young. 1998. Three phylogenetic groups of nodA and nifH genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolates from leguminous trees growing in Africa and Latin America. Appl Environ Microbiol. 64(2):419-26.
18. Helene, L. C. F., G. O'Hara, y M. Hungria. 2020. Characterization of *Bradyrhizobium* strains indigenous to Western Australia and South Africa indicates remarkable genetic diversity and reveals putative new species. Systematic and applied microbiology, 43(2): 126053.
19. Hernández Forte, I., M. C. Nápoles García, y B. Morales Mena. 2015. Caracterización de aislados de rizobios provenientes de nódulos de soya

- (*Glycine max* (L.) Merrill) con potencialidades en la promoción del crecimiento vegetal. *Cultivos Tropicales*. 36(1): 65-72.
20. Hördt, A., M.G. López, J.P. Meier-Kolthoff, M. Schleuning, L.M. Weinhold, B.J. Tindall, S. Gronow, N.C. Kyrpides, T. Woyke, M. Göker. 2020. Analysis of 1,000+ type-strain genomes substantially improves taxonomic classification of Alphaproteobacteria. *Front. Microbiol.* 11(468).
  21. Hungria, M., P. Menna, y J. R. M. Delamuta. 2015. *Bradyrhizobium*, the ancestor of all rhizobia: Phylogeny of housekeeping and nitrogen-fixation genes. *Biological nitrogen fixation*. 191-202.
  22. Jordan, M., M. Larrain, A. Tapia, y C. Roveraro. 2001. In vitro regeneration of *Sophora toromiro* from seedling explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 66: 89–95
  23. Kampfer P., HC. Scholz, B. Huber, E. Falsen, HJ. Busse. 2007. *Ochrobactrum haematophilum* sp. nov. and *Ochrobactrum pseudogrignonense* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol.* 57 (11): 2513–2518.
  24. Kaneko T., Y. Nakamura, S. Sato, E. Asamizu, T. Kato, S. Sasamoto, A. Watanabe, K. Idesawa, A. Ishikawa, K. Kawashima, T. Kimura, Y. Kishida, Ch. Kiyokawa, M. Kohara, M. Matsumoto, A. Matsuno, Y. Mochizuki, S. Nakayama, N. Nakazaki, S. Shimpo, M. Sugimoto, Ch. Takeuchi, M. Yamada, S. Tabata. 2000. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res.* 7(6): 331-338.
  25. Klepa, M. S., L. C. F. Helene, y M. Hungría. 2024. Understanding the Diversity and Evolution of Rhizobia from a Genomic Perspective. Pp: 89-115. In: Surajit Das, Hirak Ranjan Dash (Eds.). *Microbial Diversity in the Genomic Era*. (Second Edition). Academic Press. Londres, United Kingdom.
  26. Lemaire, B., J. Van Cauwenberghe, S. Chimphango, C. Stirton, O. Honnay, E. Smets, y A.M. Muasya. 2015. Recombination and horizontal transfer of nodulation and ACC deaminase (*acdS*) genes within Alpha-and Betaproteobacteria nodulating legumes of the Cape Fynbos biome. *FEMS Microbiology Ecology*. 91(11): fiv118.
  27. Li, S. Y., Huang, Y. E., Chen, J. Y., Lai, C. H., Mao, Y. C., Huang, Y. T., & Liu, P. Y. 2021. Genomics of *Ochrobactrum pseudogrignonense* (newly named *Brucella pseudogrignonensis*) reveals a new bla OXA subgroup. *Microbial Genomics*, 7(8): 000626.

28. Long, Sh. R. 1989. Rhizobium-legume nodulation: Life together in the underground. *Cell*. 56(2), 203–214.
29. Mackinder, B., M. Staniforth. 1997. Plate 330. *Sophora toromiro*. *Curtis's Botanical Magazine* 14 (4): 221-226.
30. Martens M., P. Dawyndt, R. Coopman, M. Gillis, P. De Vos y A. Willems. 2008. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). *Int J Syst Evol Microbiol*. 58(1):200-214.
31. Martens, M., M. Delaere, R. Coopman, P. De Vos, M. Gillis, & A. Willems. 2007. Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. *Int J Syst Evol Microbiol* 57(3): 489–503.
32. Martínez-Hidalgo, P., M. H. Ramírez-Bahena, J. D. Flores-Félix, J. M. Igual, J. Sanjuán, M. León-Barrios, A. Peix, E. Velázquez. 2016. Reclassification of strains MAFF 303099T and R7A into *Mesorhizobium japonicum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 66(12): 4936-4941.
33. Maunder, M. 1992. Plan reintroduction: an overview. *Biodiversity & conservation* (1): 51–61.
34. Mousavi SA, J. Österman, N. Wahlberg, X. Nesme, C. Lavire, L. Vial, L. Paulin, P. de Lajudie, K. Lindström. 2014. Phylogeny of the *Rhizobium-Allorhizobium-Agrobacterium* clade supports the delineation of *Neorhizobium* gen. nov. *Syst Appl Microbiol*. 37(3):208-15.
35. Murray JD. 2011. Invasion by invitation: rhizobial infection in legumes. *Mol Plant Microbe Interact*. 24(6): 631-639.
36. Mutch, L.A., S. M. Tamimi, J. P. W. Young. 2003. Genotypic characterisation of rhizobia nodulating *Vicia faba* from the soils of Jordan: a comparison with UK isolates. *Soil Biology and Biochemistry*. 35 (5): 709-714.
37. Nandaseena, K.G., G.W. O'Hara, R.P. Tiwari, E. Sezmi, J.G. Howieson. 2007. In situ lateral transfer of symbiosis islands results in rapid evolution of diverse competitive strains of mesorhizobia suboptimal in symbiotic nitrogen fixation on the pasture legume *Biserrula pelecinus* L. *Environ. Microbiol.*, 9(10): 2496–2511.

38. Nandaseena, K.G.; G.W. O'Hara, R.P. Tiwari, J.G. Howieson. 2006. Rapid in situ evolution of nodulating strains for *Biserrula pelecinus* L. through lateral transfer of a symbiosis island from the original mesorhizobial inoculant. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(11): 7365–7367.
39. Nguyen, T.D.; P.B. Heenan, S.E. De Meyer, T.K. James, W.M. Chen, J.D. Morton, M. Andrews. 2017. Genetic diversity and nitrogen fixation of mesorhizobia symbionts of New Zealand endemic *Sophora* species. *N. Z. J. Bot.* 55(4): 466-478.
40. O'Hara, G. W., J. E. Zilli, P. S. Poole, y M. Hungria. 2016. Taxonomy and physiology of rhizobia. Pp: 125-144. In: Howieson J.G. and Dilworth M.J. (Eds). *Working with rhizobia*. Australian Centre for International Agricultural Research. Canberra, Australia.
41. Olave, I. 2020. Identificación y selección de rizobios para *Sophora toromiro* (Phil.) Skottsb., especie extinta en Rapa Nui. Memoria de título, Ing. Agrónomo. Universidad de Concepción. Facultad de Agronomía. Chillán, Chile.
42. Ormeño-Orrillo, E., y E. Martínez-Romero. 2019. A genomotaxonomy view of the *Bradyrhizobium* genus. *Frontiers in microbiology*, 10: 1334.
43. Palaniappan, P., P. S. Chauhan, V. S. Saravanan, R. Anandham, y T. Sa. 2010. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacterial isolates from root nodule of *Lespedeza* sp. *Biology and fertility of soils*. 46: 807-816.
44. Paulitsch, F., F. B. dos Reis Jr, y M. Hungría. 2021. Twenty years of paradigm-breaking studies of taxonomy and symbiotic nitrogen fixation by beta-rhizobia, and indication of Brazil as a hotspot of *Paraburkholderia* diversity. *Archives of Microbiology*. 203(8): 4785-4803.
45. Peña, R.C., L. Iturriaga, G. Montenegro, B.K. Cassels. 2000. Phylogenetic and biogeographic aspects of *Sophora* sct. *Edwardsia* (Papilionaceae). *Pac. Sci.* 54(2): 159-167
46. Perret X, C. Staehelin, W. J. Broughton. 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64(1): 180-201.

47. Peters, N. K., J. W. Frost, S. R. Long. 1986. A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Science*, 233(4767): 977–980.
48. Philippi, R. 1873. La isla de Pascua i sus habitantes. Imprenta Nacional. Santiago, Chile.
49. Remigi, P., J. Zhu, J. P. W. Young, y Masson-Boivin, C. 2016. Symbiosis within symbiosis: evolving nitrogen-fixing legume symbionts. *Trends in microbiology*. 24(1): 63-75.
50. Ricci, M., L. Eaton. 1997. Do all existing *Sophora toromiro* descend from one individual. *Biodiversity and conservation* 6(12): 1697 – 1702.
51. Ribeiro, R. A., E. Ormeno-Orrillo, R. F. Dall'Agnol, P. H. Graham, E. Martinez-Romero, y M. Hungria. 2013. Novel *Rhizobium* lineages isolated from root nodules of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Andean and Mesoamerican areas. *Research in microbiology*. 164(7): 740-748.
52. Sawana, A., M. Adeolu, y R. S. Gupta. 2014. Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species. *Frontiers in genetics*. 5 (429).
53. Skottsberg, C. 1920. The natural history of Juan Fernandez and Easter Island. Vol II. Botany. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB, Uppsala, Sweden.
54. Stackebrandt, E., W. Frederiksen, G. M. Garrity, P. A. Grimont, P. Kämpfer, M. C. Maiden, X. Nesme, R. Rosselló-Mora, J. Swings, H. G. Trüper, L. Vauterin, A. C. Ward, W. B. Whitman. 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 52(3): 1043-1047.
55. Sullivan J.T., H.N. Patrick, W.L. Lowther, D.B. Scott y C.W. Ronson. 1995. Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92(19): 8985-8989.
56. Taboada, H., S. Encarnacion, M. D. C. Vargas, Y. Mora, E. Martinez-Romero, y J. Mora. 1996. Glutamine synthetase II constitutes a novel taxonomic marker

- in *Rhizobium etli* and other *Rhizobium* species. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 46(2): 485-491.
57. Takada, K., N. Tanaka, H. Kikuno, P. Babil, M. Onjo, B. J. Park, y H. Shiwachi. 2019. Isolation of nitrogen-fixing bacteria from water yam (*Dioscorea alata* L.). Tropical Agriculture and Development. 63(4): 198-203.
58. Tan H. W., P. B. Heenan, S. E. De Meyer, A. Willems, M. Andrews. 2015. Diverse novel mesorhizobia nodulate New Zealand native *Sophora* species. Syst Appl Microbiol. 38(2): 91-98.
59. Trujillo, M.E., A. Willems, A. Abril, A.-M. Planchuelo, R. Rivas, D. Ludeña, P.F. Mateos, E. Martínez-Molina, E. Velázquez. 2005. Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. Appl. Environ. Microbiol. 71: 1318–1327.
60. Turner SL., JPW., Young. 2000. The glutamine synthetases of rhizobia: Phylogenetics and evolutionary implications. Mol Biol Evol 17: 309–319.
61. Vasconcelos, M.W., M., E. Pinto, A. Gomes, H. Ferreira, B. Balázs, T. Centofanti, G. Ntatsi, D. Sayvas, A. Karkanis, M. Williams, A. Vandenberg, L. Toma, S. Shrestha, F. Akaichi, C. Oré Barrios, S. Gruber, E. James, M. Maluk, A. Karley, P. Iannetta. 2020. The Biology of Legumes and Their Agronomic, Economic, and Social Impact. Pp: 3-25. In: M. Hasanuzzaman, S. Araújo, S. Gill (Eds.). The Plant Family Fabaceae. Springer, Singapore.
62. Viillard, V., I. Poirier, B. Cournoyer, J. Haurat, S. Wiebkin, K. Ophel-Keller, y J. Balandreau. 1998. *Burkholderia graminis* sp. nov., a rhizospheric *Burkholderia* species, and reassessment of [*Pseudomonas*] *phenazinum*, [*Pseudomonas*] *pyrrocinia* and [*Pseudomonas*] *glathei* as *Burkholderia*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 48(2): 549-563.
63. Vinuesa P., C. Silva, D. Werner, E. Martínez-Romero. 2005. Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and recombination in *Bradyrhizobium* species cohesion and delineation. Mol Phylogenet Evol. 34(1): 29–54.
64. Walker L, B. Lagunas, y M. L. Gifford. 2020. Determinants of Host Range Specificity in Legume-Rhizobia Symbiosis. Front. Microbiol. 11: 585749.

65. Wang, H., C. Gu, X. Liu, C. Yang, W. Li, y S. Wang. 2020. Impact of soybean nodulation phenotypes and nitrogen fertilizer levels on the rhizosphere bacterial community. *Frontiers in Microbiology*, 11: 750.
66. Wang, E. T., C. F. Tian, W. F. Chen, J. P. W. Young, W. X. Chen y E. T. Wang. 2019. Symbiosis Between Rhizobia and Legumes. Pp: 3-19. *Ecology and evolution of rhizobia: Principles and applications*. Springer. Singapore.
67. Weir, B. 2006. Systematics, specificity, and ecology of New Zealand Rhizobia. Doctoral dissertation, ResearchSpace@ Auckland. School of Biological Sciences. The University of Auckland. New Zealand.
68. Weir, B. S., S. J. Turner, W. B. Silvester, D. C. Park, y J. M. Young. 2004. Unexpectedly diverse *Mesorhizobium* strains and *Rhizobium leguminosarum* nodulate native legume genera of New Zealand, while introduced legume weeds are nodulated by *Bradyrhizobium* species. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(10): 5980-5987.
69. Whatmore, A. M., y J. T. Foster. 2021. Emerging diversity and ongoing expansion of the genus *Brucella*. *Infection, Genetics and Evolution*. 92, 104865.
70. Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiological reviews*. 51(2): 221-271.
71. Xiang S, T. Yao, L. An, B. Xu, J. Wang. 2005. 16S rRNA sequences and differences in bacteria isolated from the Muztag Ata glacier at increasing depths. *Appl Environ Microbiol*.71(8): 4619-4627.
72. Yates, R.J. 2008. Symbiotic interactions of geographically diverse annual and perennial *Trifolium* spp. with *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Thesis, Doctor of Philosophy. Murdoch University. Perth, Australia.
73. Young, J. P. W., S. Moeskjær, A. Afonin, P. Rahi, M. Maluk, E. K. James, M. I. A. Cavassim, M. H-o. Rashid, A. A. Aserse, B. J. Perry, E. Tao Wang, E. Velázquez, E. E. Andronov, A. Tampakaki, J. D. Flores, R. Rivas, S. H. Youseif, M. Lepetit, S. Boivin, B. Jorin, G. J. Kenicer, A. Peix, M. F. Hynes, M. H. Ramírez-Bahena, A. Gulati, C. F. Tian. 2021. Defining the *Rhizobium leguminosarum* species complex. *Genes*. 12(1): 111.
74. Zurdo-Pineiro, J. L., R. Rivas, M. E. Trujillo, N. Vizcaino, J. A. Carrasco, M. Chamber, A. Palomares, P. F. Mateos, E. Martínez-Molina y E. Velazquez. 2007. *Ochrobactrum cytisi* sp. nov., isolated from nodules of *Cytisus*

*scoparius* in Spain. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57(4): 784-788.