

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**SELECCIÓN DE BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO PARA EL  
ÁRBOL EXTINTO DE RAPA NUI *SOPHORA TOROMIRO***

**POR**

**DANIELLA IGNACIA AQUEVEQUE JARA**

**MEMORIA PRESENTADA A LA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA  
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
INGENIERA AGRÓNOMA.**

**CHILLÁN – CHILE**  
**2024**

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**SELECCIÓN DE BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO PARA EL  
ÁRBOL EXTINTO DE RAPA NUI *SOPHORA TOROMIRO***

**POR**

**DANIELLA IGNACIA AQUEVEQUE JARA**

**MEMORIA PRESENTADA A LA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA  
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
INGENIERA AGRÓNOMA.**

**CHILLÁN – CHILE  
2024**

Aprobada por:

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

---

Guía

Profesor Asociado, Leandro Paulino.  
Ingeniero Forestal, Dr.

---

Asesor

Profesor Asociado, Arturo Calderón O.  
Ing. Agrónomo, Ph.D.

---

Asesor

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

---

Decano

<b>TABLA DE CONTENIDOS</b>	<b>Página</b>
Resumen .....	1
Summary.....	1
Introducción .....	2
Materiales y Métodos .....	5
Resultados y Discusión .....	10
Conclusiones .....	20
Referencias .....	21
Anexos.....	27

## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

		<b>Página</b>
Figura 1	Comparación entre conglomerados de bacterias en base al índice de solubilización de fósforo.....	15
Figura 2	Comparación entre conglomerados de bacterias en base al índice de solubilización de potasio.....	16
Figura 3	Cladograma de las relaciones genéticas entre bacterias de acuerdo al producto RAPDs-PCR con el partidor A1R	17
Tabla 1	Colecta de muestras de suelo de distintas partes de Chile Continental (C) e Insular (I) y Rapa Nui (R).....	10
Tabla 2	Origen e índice de solubilización (IS) de fósforo y potasio de bacterias aisladas a partir de muestras de suelo provenientes de Chile Continental e Insular y Rapa Nui.....	11
Tabla 3	Caracterización de las bacterias seleccionadas en actividad ACC-Desaminasa y producción de ácido indolacético (IAI).....	18
Tabla 4	Prueba de compatibilidad entre cepas seleccionadas y <i>Mesorhizobium</i> sp. (AG-105) .....	20

## **SELECCIÓN DE BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO E INDUCTORAS DE TOLERANCIA A ESTRÉS PARA EL ÁRBOL EXTINTO DE RAPA NUI *SOPHORA TOROMIRO***

SELECTION OF GROWTH PROMOTING AND STRESS TOLERANCE INDUCING BACTERIA FOR THE EXTINCT RAPA NUI TREE *SOPHORA TOROMIRO*

**Palabras índice adicionales: consorcios bacterianos, fósforo, potasio, ACC-desaminasa, ácido indol-acético.**

### **RESUMEN**

*Sophora toromiro* es una especie endémica de Rapa Nui que se extinguió a finales de la década de los 50. Posee una gran importancia cultural y religiosa para los lugareños, por lo que se han realizado varios intentos por reintroducirlo *in situ* sin tener éxito hasta el momento. Un factor clave en el restablecimiento de especies leguminosas es la interacción con rizobios específicos y con bacterias del suelo y rizósfera. Los objetivos de este trabajo fueron seleccionar bacterias promotoras de crecimiento asociadas a *Sophora* spp y evaluar su compatibilidad con *Mesorhizobium* spp para la conformación de consorcios bacterianos. Se colectaron diez muestras de suelo rizosférico asociado a *Sophora* spp. en Chile continental e insular y tres muestras de suelo de Rapa Nui, a partir de las cuales se obtuvo 72 aislados bacterianos. De estos se seleccionaron 9 cepas por su habilidad para solubilizar fósforo y potasio, producir ácido indolacético y ACC-desaminasa. Posterior a las pruebas de compatibilidad con *Mesorhizobium* spp, se seleccionaron las cepas CL-Cont 27, CL-Rap 5, CL-Cont 34 y CL-Rap 17 para conformar consorcios bacterianos.

### **SUMMARY**

*Sophora toromiro* is an endemic species of Rapa Nui that became extinct in the late 1950's. It has great cultural and religious importance for the locals, and several attempts have been made to reintroduce it *in situ* without success so far. A key factor in the reestablishment of leguminous species is the interaction with specific rhizobia

and soil and rhizosphere bacteria. The objectives of this work were to select growth-promoting bacteria associated with *Sophora* spp and to evaluate their compatibility with *Mesorhizobium* spp for the formation of bacterial consortia. Ten samples of soil from *Sophora* spp. root area were collected in Continental and Insular Chile, as well as three samples of soil from Rapa Nui, from which 72 bacterial isolates were obtained. Nine strains were selected for their ability to solubilize phosphorus and potassium, produce indoleacetic acid and ACC-desaminase. After compatibility tests with *Mesorhizobium* spp, strains CL-Cont 27, CL-Rap 5, CL-Cont 34 and CL-Rap 17 were selected to form a bacterial consortia.

## INTRODUCCIÓN

*Sophora toromiro* (Phil.) Skotts., de nombre vernáculo toromiro, es una especie perteneciente a la familia de las fabáceas, endémica y representativa de la flora de Rapa Nui, que conforma una de las más de 20 especies del género *Sophora* sección *Edwardsia* distribuidas por el Pacífico Sur (Püschel, 2014). Chile, en particular, cuenta con 6 taxones endémicos de *Sophora* distribuidos entre Chile Continental y el Archipiélago de Juan Fernández (Rodríguez et al., 2018). El toromiro corresponde a un árbol pequeño o arbusto perenne que alcanza una altura promedio de dos a tres metros, con un tronco de entre 10 a 14 cm de diámetro y una corteza de color café-rojizo. Posee hojas compuestas y largas, de hasta 45 cm de largo, con 7 a 21 folíolos elípticos de color verde grisáceo en la parte superior. Su inflorescencia está formada por racimos laxos compuestos, de flores amarillas y ligeramente tubulares. El fruto corresponde a una vaina alargada, que contiene de 1 a 6 semillas con forma ovoide-globosa, amarillas y con un diámetro que oscila entre los 4 y 5 mm (Püschel, 2014).

El toromiro fue de gran valor cultural y religioso para los habitantes de Rapa Nui. Su fruto era comestible y su madera se utilizaba para crear artefactos religiosos, como los moais Kava-Kava, y utensilios comunes, como las tablillas Rongo-Rongo, en las que escribían. Sin embargo, con la llegada de los colonos a la isla, la población experimentó un crecimiento exponencial, lo que generó la necesidad de expandir las áreas de pastoreo (Pezoa *et al.*, 2021; Wasilewski, 2013). A esto, se

sumó la introducción de especies exóticas, especialmente ovejas, y la explotación excesiva de la madera como fuente de energía, lo que llevó a la extinción del último toromiro en estado salvaje en 1960 (Espejo y Rodríguez, 2013). Si bien, en la actualidad el toromiro es catalogado como una especie extinta en su hábitat natural, se encuentran ejemplares vivos en jardines botánicos europeos y en Chile (Maunder *et al.*, 2000). Debido a su gran importancia religiosa y cultural, desde 1981 se han realizado diversos intentos por reintroducirlo *in situ*, sin tener éxito hasta la fecha, lográndose mantener en zonas protegidas como el vivero Mataveri otai vari en Rapa Nui (Conservación del toromiro, 2023). Diversos estudios señalan el cambio que sufrió el paisaje de Rapa Nui desde la colonización, destacando la deforestación sufrida en pos de aumentar el área cultivable del territorio, junto a la erosión del suelo y pérdida de la biodiversidad; en particular, la desaparición de dos especies de palmeras que servían de cobijo al toromiro (Zizka y Zizka, 2022; Mieth y Bork, 2005). Este cambio a su hábitat junto con la aparición de nuevas plagas, la falta de bacterias fijadoras de nitrógeno y la baja disponibilidad de ciertos macronutrientes, como el fósforo y potasio, contribuyen a la dificultad en su reinserción (Conservación del Toromiro, 2023; Benni, 2017; CONAF, 2011; Ladefoged, 2010; Maunder, 1997).

La rizosfera de las plantas representa un hotspot que alberga una amplia diversidad de microorganismos que, mediante una variedad de vías, mejoran la disponibilidad de nutrientes y fomenta el crecimiento vegetal (Prasad *et al.*, 2020). Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR; del inglés: *Plant Growth promoting rhizobacteria*) forman un grupo heterogéneo de bacterias, que actúan en la rizosfera, sobre o alrededor de la superficie de la raíz, promoviendo directa o indirectamente el crecimiento de las plantas (Parewa *et al.*, 2018; Babalola, 2010). Entre los mecanismos que emplean para estimular el desarrollo y crecimiento de la planta, encontramos la producción y/o regulación de fitohormonas como las auxinas, giberelinas y citoquininas (Adedeji *et al.*, 2020). En el grupo de auxinas, por ejemplo, se encuentra el ácido indol-3-acético o ácido indolacético. que estimula la división, elongación y diferenciación celular, traduciéndose en una mejora en los parámetros fisiológicos y de crecimiento de la planta (Chamkhi *et al.*, 2022; Ljung, 2013). También son capaces de aumentar la disponibilidad de ciertos

macronutrientes, como el fósforo y potasio, que juegan un rol importante en el crecimiento y desarrollo vegetal, tanto a nivel fisiológico como morfológico (Etesami y Maheshwari, 2018). Algunos géneros de PGPR son productoras de la enzima ácido 1-aminociclopropano-1-carboxilo que permite controlar los niveles endógenos de etileno en la planta, facilitando su desarrollo bajo condiciones de estrés (Velázquez *et al.*, 2019).

En particular en especies de la familia fabácea existe un grupo de bacterias rizosféricas que son especialmente relevantes para la planta, comúnmente llamados rizobios, con los que establecen una asociación simbiótica mutualista altamente específica. Los rizobios son en general bacterias Gram negativas, aeróbicas y quimiorganotróficas, capaces de formar unas estructuras llamadas nódulos en las raíces (Verma *et al.*, 2020), donde reducen nitrógeno atmosférico, dejándolo disponible para la planta en un proceso mediado por el complejo enzimático nitrogenasa, aportando al mismo tiempo vitaminas, aminoácidos, sideróforos y auxinas (Prasad *et al.*, 2020). En un estudio realizado por Jordan *et al.* (2001), se evidenció la especificidad de esta relación en *Sophora toromiro*, al ser esta especie incapaz de formar nódulos con rizobios de uso agrícola. En los trabajos llevados a cabo por Gerding y Espejo (2019) y Olave (2020), se demostró que *S. toromiro* se asocia simbióticamente a cepas bacterianas del género *Mesorhizobium*, aisladas de *S. macrocarpa* y *S. mycrophylla*, cuya inoculación, bajo condiciones controladas, mostró una mejora significativa en la fijación de nitrógeno, producción de materia seca y sobrevivencia en vivero.

La interacción entre los microorganismos presentes en la rizosfera, como la interacción rizobio-bacterias rizosféricas, a menudo benefician a la planta mediante diversos mecanismos. Además del aporte en nutrientes, existen bacterias rizosféricas capaces de promover una nodulación más rápida y efectiva mediante la producción de ácido indolacético y ACC-desaminasa (Chamkhi *et al.*, 2022; Abedini *et al.*, 2021). Por consiguiente, la inoculación de leguminosas con consorcios microbianos conformados por los microorganismos descritos, no solo conlleva un efecto benéfico para la planta (Wang *et al.*, 2022; Zhue *et al.*, 2019) sino que también se produce un efecto sinérgico entre ellos (Woo y Pepe, 2018). El objetivo de este

trabajo consistió en caracterizar y seleccionar bacterias del suelo, asociadas a *Sophora* spp con atributos promotores del crecimiento vegetal y evaluar su compatibilidad con *Mesorhizobium* sp. para la conformación de consorcios bacterianos para *Sophora toromiro*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Muestras de suelo**

Para el aislamiento de bacterias del suelo se colectó un total de 13 muestras de suelo, priorizando suelo y raíces asociados a especies del género *Sophora*. Diez de las muestras fueron colectadas en Chile Continental e Isla Magdalena y tres desde Rapa Nui, (Tabla 1). Las muestras colectadas en Chile Continental e Isla Magdalena se encontraban asociadas a *Sophora macrocarpa* y *Sophora cassioides*, o a suelos con una alta presencia de vegetación y/o prístinos. De las muestras provenientes de Rapa Nui, Miro Macoy 1 y 2 provienen de suelos con una alta vegetación mientras que Rano Kau corresponde a la zona donde se encontró el último toromiro.

La colecta de suelo se realizó removiendo la primera capa del suelo, para tomar muestras compuestas a una profundidad de 20 cm. Las muestras, de aproximadamente 500 g, se depositaron en bolsas de polietileno y se mantuvieron en una caja refrigerante hasta su análisis en laboratorio. Las muestras provenientes de Rapa Nui se analizaron en el Laboratorio de Análisis de Suelos y Plantas del Departamento de Suelos y Recursos Naturales, Universidad de Concepción, Campus Chillán, Región de Ñuble, Chile (Anexo 1).

### **Aislamiento de bacterias solubilizadoras de fósforo y potasio**

El aislamiento, la caracterización e identificación molecular de las bacterias se realizaron en el Laboratorio de Microbiología Agrícola del Departamento de Producción Vegetal, Universidad de Concepción, Campus Chillán, Región de Ñuble, Chile.

Se prepararon suspensiones de suelo, depositando 10 g de cada muestra en 90 mL de solución salina (0,9 % p/v NaCl), y luego agitando cada suspensión durante 15 minutos. A partir de estas, se realizaron diluciones en serie de 10 hasta la  $10^{-5}$  y

se sembraron 0,1 mL en placas Petri con el medio Pikovskaya [10 g Glucosa; 5 g  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ; 0,2 g KCl; 0,5 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,1 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,5 g extracto de levadura,  $\text{MnSO}_4$  trazas; 15 g agar-agar en 1000 mL de agua destilada a pH 7,3 (Hariprasad y Niranjana, 2009)] y en Aleksandrov modificado (5,0 g Glucosa, 0,5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,008 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g  $\text{CaCO}_3$ , 2,0 g  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , 2,0 g de feldespato) y 18 g de agar- agar en 1000 ml de agua destilada a pH de 7,5, ajustado con NaOH 1N (Hu *et al.*, 2006). El período de incubación fue de 48 horas para las placas con el medio Pikovskaya y 7 días para las placas con el medio Aleksandrov a 25 °C. Se seleccionaron un máximo de 10 cepas por muestra que evidenciaran la formación de un halo transparente alrededor de la colonia, utilizando criterios de descarte como forma de crecimiento y coloración. De las cepas seleccionadas, se realizó una re-aislación sobre agar nutritivo mediante siembra en estrías, con el fin de obtener cultivos puros. Cada cultivo puro fue criopreservado a -80° C en tubos Eppendorf de 1,5 mL con una solución estéril compuesta de 400  $\mu\text{L}$  de solución salina (0,9 % p/v), 200  $\mu\text{L}$  de glicerol y 200  $\mu\text{L}$  de caldo nutritivo. Se depositaron tres asadas de cultivo para cada tubo y se rotularon con el número de la muestra de suelo, medio del cual se obtuvo y número de la colonia. Los aislados criopreservados se guardaron en duplicado.

### **Selección de bacterias solubilizadoras de fósforo y potasio**

Se prepararon tubos con 5 mL de caldo de cultivo, los cuales una vez inoculados, se llevaron a un agitador orbital a 150 rpm por 24 horas a 25°C. Se tomó un 1 mL del caldo de cultivo y se centrifugó a 5.000 rpm durante 5 minutos y se realizó un lavado celular para eliminar el caldo de cultivo sobrante. Posteriormente se preparó una alícuota 1:10 (100  $\mu\text{L}$  suspensión de células: 900  $\mu\text{L}$  solución salina (9% p/v)) y se ajustó a una densidad óptica a 600 nm ( $\text{DO}_{600}$ ) de 0,1. Se sembraron 5  $\mu\text{L}$  de las cepas ajustadas en placas petri con el medio Pikovskaya y el medio Aleksandrov, en triplicado, utilizando el mismo período de incubación empleado en el aislamiento. Se calculó su capacidad de solubilización utilizando la siguiente fórmula (Premono *et al.*, 1996):

$$\text{Índice de solubilización} = \frac{\text{Diámetro solubilización (mm)}}{\text{Diámetro colonia (mm)}}$$

### **Fingerprint molecular**

Para identificar los aislados a nivel de cepa se utilizó la técnica molecular de BOX PCR usando el partidor A1R (5'- CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G G-3') (Versalovic *et al.*, 1994) como cebador de acuerdo con la metodología utilizada por Guiñazú *et al.*, (2013). Las células utilizadas pasaron por un proceso de centrifugado, a 5.000 rpm durante 5 min, y posteriormente se lavaron 3 veces, ajustándolas a una  $DO_{600}=1,5$ . Posteriormente, fueron sometidas a un shock térmico por 5 min a 65°C y luego a -20°C por 5 min. La mezcla de reacción de PCR contenía 5,0 µL de células templadas, 0,3 µL de polimerasa Gotaq (Promega) (2 U µL<sup>-1</sup>), 5,0 µL de cebador A1R (2 µM) 0,5 µL de dNTPs (0,2 mM), 2,5 µL de la solución tampón Gotaq (1x) 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM) y 10,15 µL de agua ultrapura, haciendo un total de 25 µL (Marques et al. 2008). Las condiciones de PCR fueron: 95°C durante 7 min, después 35 ciclos a 94°C durante 1 min, 52°C durante 1 min y 72°C durante 8 min y finalmente 72°C durante 16 min (Guiñazú *et al.*, 2013 con modificaciones). Los productos obtenidos de la PCR se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2 % (p/v) con 2,5 µL mL<sup>-1</sup> de Gel Red (10.000x in DMSO, Biotium) depositado sobre una solución tampón TAE 1x (40mM Tris-Acetato, 1mM EDTA, pH 8.0), a una potencia de 75 V por 3 horas. Transcurrido este tiempo, se observaron las bandas en el gel en una cámara transiluminadora de UV.

### **Cuantificación de solubilización de fósforo y potasio en medio líquido**

Se ajustó la  $DO_{600}$  de las cepas seleccionadas a 0,1 y se depositaron 100 µL de la suspensión ajustada en 20 ml del medio líquido Pikovskaya y 20 ml del medio líquido Aleksandrov en tubos Falcon de 50 mL. Posteriormente, los tubos se llevaron a un agitador a 150 rpm por 48 horas para el medio Pikovskaya y por 7 días para el medio Aleksandrov a una temperatura de 25°C. Se centrifugaron a 11.000 rpm durante 10 min y el sobrenadante se filtró para ser analizado en el Laboratorio de Análisis Químico de Suelos y Plantas de la Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción, Campus Chillán.

### **Producción de ácido indol acético (AIA)**

Se evaluó la producción de AIA por parte de las cepas seleccionadas utilizando una técnica colorimétrica, para ello se construyó una curva de calibración relacionando

la absorbancia con la concentración de AIA.

**Curva de Calibración.** Se prepararon soluciones con concentraciones crecientes de AIA ( $1,5625 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $3,125 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $6,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  y  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Para medir la absorbancia de cada concentración de AIA, se mezcló 120  $\mu\text{L}$  de cada dilución con 80  $\mu\text{L}$  de reactivo de Salkowski [98 mL ácido perclórico 35 %; 2 mL  $\text{FeCl}_3$  0,5 M] (modificado de Sarwar y Kremer (1995)) en una microplaca utilizando como blanco 120  $\mu\text{L}$  de caldo nutritivo con 80  $\mu\text{L}$  de reactivo Salkowski. Después se incubó por 30 min bajo oscuridad y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 535 nm en un espectrofotómetro. Con los datos de absorbancia obtenidos se construyó una curva de calibración para concentraciones entre 0 y  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  de AIA.

**Producción de AIA para cepas seleccionadas.** Se depositó 100  $\mu\text{L}$  de suspensión celular, a una  $\text{DO}_{600}=0,1$ , en 3 mL de caldo nutritivo. Estos se incubaron en agitación a 150 rpm durante 24 horas a una temperatura de  $25^\circ\text{C}$ . Posteriormente se traspasó 1 mL de la suspensión a tubos Eppendorf y se centrifugaron durante 3 minutos a 5.000 rpm. Se retiró 120  $\mu\text{L}$  del sobrenadante el cual se mezcló con 80  $\mu\text{L}$  del reactivo de Salkowski en una microplaca y se determinó la concentración de AIA, realizándose por triplicado.

#### **Actividad de ACC-Desaminasa**

Para verificar la habilidad de las cepas de sintetizar la enzima ACC desaminasa, se depositó 100  $\mu\text{L}$  de suspensión celular a una  $\text{D.O}_{600}= 0,1$  en 3 mL de caldo nutritivo, dejando en agitación a 150 rpm por 24 horas a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Posteriormente se extrajo un 1 mL, se centrifugó a 8.000 g por 10 min, extrayendo el sobrenadante, y realizando dos lavados con 1 mL de caldo Dworkin y Foster (DF) ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$  4 g;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  6 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,2 g; glucosa 2 g; ácido glucónico 2 g; ácido cítrico 2 g; solución de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,1 mL; elementos trazas ( $\text{H}_3\text{BO}_3$  10 mg;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  11,19 mg;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  124,6 mg;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  78,22 mg  $\text{MoO}_3$  10 mg; agua destilada estéril 100 mL), dejando en agitación en 1 mL de este mismo caldo. Transcurridas 24 horas, los tubos fueron centrifugados y se extrajo 500  $\mu\text{L}$ , para concentrar la suspensión bacteriana. De estos tubos, se extrajo 5  $\mu\text{L}$  de cada una de las cepas, depositando 9 cepas en 30 mL de agar DF, agar DF + ACC (sin fuente

de nitrógeno) y agar DF +  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2 g (como fuente de nitrógeno) (Penrose y Glick, 2003). Para los controles positivos se utilizó la cepa AG-29 y AG-30, mientras que para los controles negativos se utilizaron las cepas AG-31 y AG-32, las cuales no poseen el gen *acdS* para la producción de ACC-desaminasa (Rashid *et al.*, 2012). Se comparó el crecimiento de las colonias en medio básico DF, con el crecimiento en medio DF con ACC, con respecto al crecimiento de los controles positivos y negativos.

### **Prueba de compatibilidad**

Las pruebas de compatibilidad se realizaron con las cepas seleccionadas más las siguientes cepas del Cepario del laboratorio de bacteriología: AG-78 y AG-79 (PGPR con actividad ACC-desaminasa) y *Mesorhizobium* sp. cepa AG-105. Se prepararon tubos con 5 mL de caldo de cultivo, cada uno de los cuales fue inoculado con cada cepa bacteriana seleccionadas y llevados a un agitador orbital a 150 rpm por 24 h a 25°C. Transcurrida la incubación se tomó una alícuota de 1 mL del caldo colonizado y se centrifugó a 5.000 rpm durante 5 minutos y se realizó un lavado celular para eliminar el caldo de cultivo sobrenadante. Posteriormente se realizó una dilución 1:10 (100  $\mu\text{L}$  suspensión de células: 900  $\mu\text{L}$  solución salina (9% p/v)) y se midió la  $\text{DO}_{600}$ , ajustándola a 0,1. Se realizó un césped depositando 0,1 mL de cada cepa en una placa de agar nutritivo y se depositaron 0,5  $\mu\text{L}$  de las cepas ajustadas, en triplicado. Se evaluó el crecimiento de colonias y formación de halo de inhibición a las 24, 48 y 72 horas.

### **Análisis estadístico**

Para la selección de las cepas por su índice de solubilización de fósforo y de potasio, se llevó a cabo un análisis de conglomerado utilizando los datos de eficiencia de solubilización y luego la comparación de los conglomerados mediante un análisis de varianza no paramétrica de Kruskal-Wallis. De esta forma, se seleccionaron los grupos de bacterias con mayor eficiencia (Di Rienzo, *et al.*, 2016).

Para la determinación de cepas mediante la huella genética, se analizaron los patrones de bandas amplificadas y a partir de estos se construyó una matriz binaria para indicar presencia o ausencia de bandas. La matriz fue analizada en el software AFPL-SURV versión 1.0 (Vekemans, 2002) para calcular la distancia genética entre

aislados. La matriz de distancia genética fue analizada por UPGMA usando la aplicación Neighbor del paquete de softwares PHYLIP. El cladograma fue visualizado en Mega 7 (Tamura *et al.*, 2011), distinguiendo las cepas individuales a utilizar en los siguientes ensayos y descartando las copias.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Aislamiento bacterias solubilizadoras de fósforo y potasio

De las 13 muestras de suelo colectadas (Tabla 1) se obtuvo 72 aislados bacterianos que variaron en morfología de colonia y en habilidades para solubilizar fósforo y potasio. De los aislados, 54 fueron obtenidos desde muestras de suelo de Chile Continental e Insular y 18 desde Rapa Nui (Tabla 2).

Tabla 1. Colecta de muestras de suelo de distintas partes de Chile Continental (C) e Insular (I) y Rapa Nui (R).

Muestra	Lugar	Coordenadas	N° Aislados
S1	Puente Renegado (C)	38°51'25.62"S 71°38'20.1"W	3
S2	La Campana (C)	32°57'12.0"S 71°04'00.2"W	7
S3	Rucue (C)	37°20'36.2"S 71°47'53.0"W	2
S4	Rucue (C)	37°20'36.2"S 71°47'53.0"W	8
S5	Rucue (C)	37°20'36.2"S 71°47'53.0"W	6
S6	Los Ruiles (C)	35°49'32.1"S 72°22'28.5"W	5
S7	Los Ruiles (C)	35°49'32.1"S 72°22'28.5"W	3
S8	Isla Magdalena (I)	52°55'6.9"S 70°34'40.1"W	9
S9	Isla Magdalena (I)	52°55'6.9"S 70°34'40.1"W	6
S10	Isla Magdalena (I)	52°55'6.9"S 70°34'40.1"W	5
S11	Miro Macoy 1 (R)	27°6'8.5"S 109°20'47.0"W	11
S12	Miro Macoy 2 (R)	27°6'8.5"S 109°20'47.0"W	2
S13	Rano Kau (R)	27°07'15.1"S 109°17'31.6"W	5

El índice de solubilización es una metodología empleada y aceptada por diversos autores, la cual permite estimar la capacidad que posee un microorganismo de

solubilizar un elemento en particular (Kiprotich *et al.*, 2023; Tariq *et al.*, 2022; Schoebitz *et al.*, 2013). En general, se ha observado que aislados con un índice de solubilización sobre 1,5 muestran efectos positivos en parámetros de crecimiento en plantas (Kiprotich *et al.*, 2023; Paul y Sinha, 2017; Teymouri *et al.*, 2016).

Tabla 2. Origen e índice de solubilización (IS) de fósforo y potasio de bacterias aisladas de muestras de suelo de Chile Continental e Insular y Rapa Nui.

Aislado	Ubicación	Origen	IS P	IS K
CL-Cont1	S1	<i>S.macrocarpa</i>	1,72	1,4
CL-Cont2	S1	<i>S.macrocarpa</i>	1,09	1,4
CL-Cont3	S1	<i>S.macrocarpa</i>	1,34	1
CL-Cont4	S2	<i>S.macrocarpa</i>	1	1
CL-Cont5	S2	<i>S.macrocarpa</i>	1,3	1
CL-Cont6	S2	<i>S.macrocarpa</i>	1,19	1
CL-Cont7	S2	<i>S.macrocarpa</i>	1,37	1,46
CL-Cont8	S2	<i>S.macrocarpa</i>	1,17	1
CL-Cont9	S2	<i>S.macrocarpa</i>	1,35	1
CL-Cont10	S2	<i>S.macrocarpa</i>	1,39	1
CL-Cont11	S3	<i>S.macrocarpa</i>	1,44	1
CL-Cont12	S3	<i>S.macrocarpa</i>	1,14	1,46
CL-Cont13	S4	<i>S.cassioides</i>	1,65	1,46
CL-Cont14	S4	<i>S.cassioides</i>	1,19	1,1
CL-Cont15	S4	<i>S.cassioides</i>	1,53	1,3
CL-Cont16	S4	<i>S.cassioides</i>	1	1,62
CL-Cont17	S4	<i>S.cassioides</i>	1	1,58
CL-Cont18	S4	<i>S.cassioides</i>	1,06	1,55
CL-Cont19	S4	<i>S.cassioides</i>	1,11	1,49
CL-Cont20	S4	<i>S.cassioides</i>	1,39	1,87
CL-Cont21	S5	<i>S.cassioides</i>	1,51	1,63
CL-Cont22	S5	<i>S.cassioides</i>	1,4	1,51
CL-Cont23	S5	<i>S.cassioides</i>	1,39	1,55
CL-Cont24	S5	<i>S.cassioides</i>	1,48	1,54

\*Índices igual a 1 indica una solubilización mínima y/o nula del elemento

Tabla 3 (cont.) Origen e índice de solubilización (IS) de fósforo y potasio de bacterias aisladas de muestras de suelo de Chile Continental e Insular y Rapa Nui.

Aislado	Ubicación	Origen	IS P	IS K
CL-Cont25	S5	<i>S.cassioides</i>	1,54	1,81
CL-Cont26	S5	<i>S.macrocarpa</i>	1,33	1,4
CL-Cont27	S6	<i>S.macrocarpa</i>	2,03	1,61
CL-Cont28	S6	<i>S.macrocarpa</i>	1	1,32
CL-Cont29	S6	<i>S.macrocarpa</i>	1,65	1,6
CL-Cont30	S6	<i>S.macrocarpa</i>	1	1,31
CL-Cont31	S6	<i>S.macrocarpa</i>	1,24	1,55
CL-Cont32	S7	<i>S.macrocarpa</i>	1,13	1,62
CL-Cont33	S7	<i>S.macrocarpa</i>	1	1,65
CL-Cont34	S7	Suelo	1,53	1,91
CL-Cont35	S8	Suelo	1,3	1,62
CL-Cont36	S8	Suelo	1,23	1
CL-Cont37	S8	Suelo	1,28	1
CL-Cont38	S8	Suelo	1,44	1
CL-Cont39	S8	Suelo	1,18	1
CL-Cont40	S8	Suelo	1,1	1,4
CL-Cont41	S8	Suelo	1,03	1
CL-Cont42	S9	Suelo	1,2	1
CL-Cont43	S8	Suelo	1,51	1
CL-Cont44	S8	Suelo	1,42	1
CL-Cont45	S9	Suelo	1,2	1
CL-Cont46	S9	Suelo	1,2	1
CL-Cont47	S9	Suelo	1,6	1
CL-Cont48	S9	Suelo	1,31	1
CL-Cont49	S9	Suelo	1,36	1
CL-Cont50	S10	Suelo	1,06	1,63

\*Índices igual a 1 indica una solubilización mínima y/o nula del elemento

Tabla 4 (cont.) Origen e índice de solubilización (IS) de fósforo y potasio de bacterias aisladas de muestras de suelo de Chile Continental e Insular y Rapa Nui.

Aislado	Ubicación	Origen	IS P	IS K
CL-Cont51	S10	Suelo	1,26	1,27
CL-Cont52	S10	Suelo	1,53	1,78
CL-Cont53	S10	Suelo	1,48	1
CL-Cont54	S10	Suelo	1,63	1,07
CL-Rap 1	S11	Suelo	1,26	1,46
CL-Rap 2	S11	Suelo	1,69	1
CL-Rap 3	S11	Suelo	1,57	1,59
CL-Rap 4	S11	Suelo	1,53	1
CL-Rap 5	S11	Suelo	1	1,82
CL-Rap 6	S11	Suelo	1,75	1
CL-Rap 7	S11	Suelo	1,68	2,03
CL-Rap 8	S11	Suelo	1,14	1,52
CL-Rap 9	S11	Suelo	1,73	1,58
CL-Rap 10	S11	Suelo	1,77	1,92
CL-Rap 11	S11	Suelo	1	1,78
CL-Rap 12	S12	Suelo	1	1
CL-Rap 13	S12	Suelo	1,25	1,36
CL-Rap 14	S13	Suelo	1,22	1
CL-Rap 15	S13	Suelo	1,66	1
CL-Rap 16	S13	Suelo	1,11	1
CL-Rap 17	S13	Suelo	1,48	2,14
CL-Rap 18	S13	Suelo	1,92	1

\*Índices igual a 1 indica una solubilización mínima y/o nula del elemento.

Del total de aislados, el 89% fue capaz de solubilizar fósforo con un índice que fluctuó entre 1,11 y 2,03 (Tabla 2). Por otra parte, un 60% fue capaz de solubilizar potasio con un índice que fluctuó entre 1,07 y 2,14 y un 49% de los aislados presentó la capacidad de solubilizar fósforo y potasio a la vez (Tabla 2). En todos los sitios se encontraron bacterias con la habilidad de solubilizar fósforo y/o potasio, salvo en

el sitio 9 de Isla Magdalena, donde no se registró presencia de bacterias solubilizadoras de potasio.

### **Selección de bacterias solubilizadoras de fósforo y potasio**

En el análisis de los conglomerados de los aislados en base a su capacidad para solubilizar fósforo, se obtuvieron cuatro conglomerados significativamente diferentes de acuerdo a la distancia euclídea (Apéndice 1).

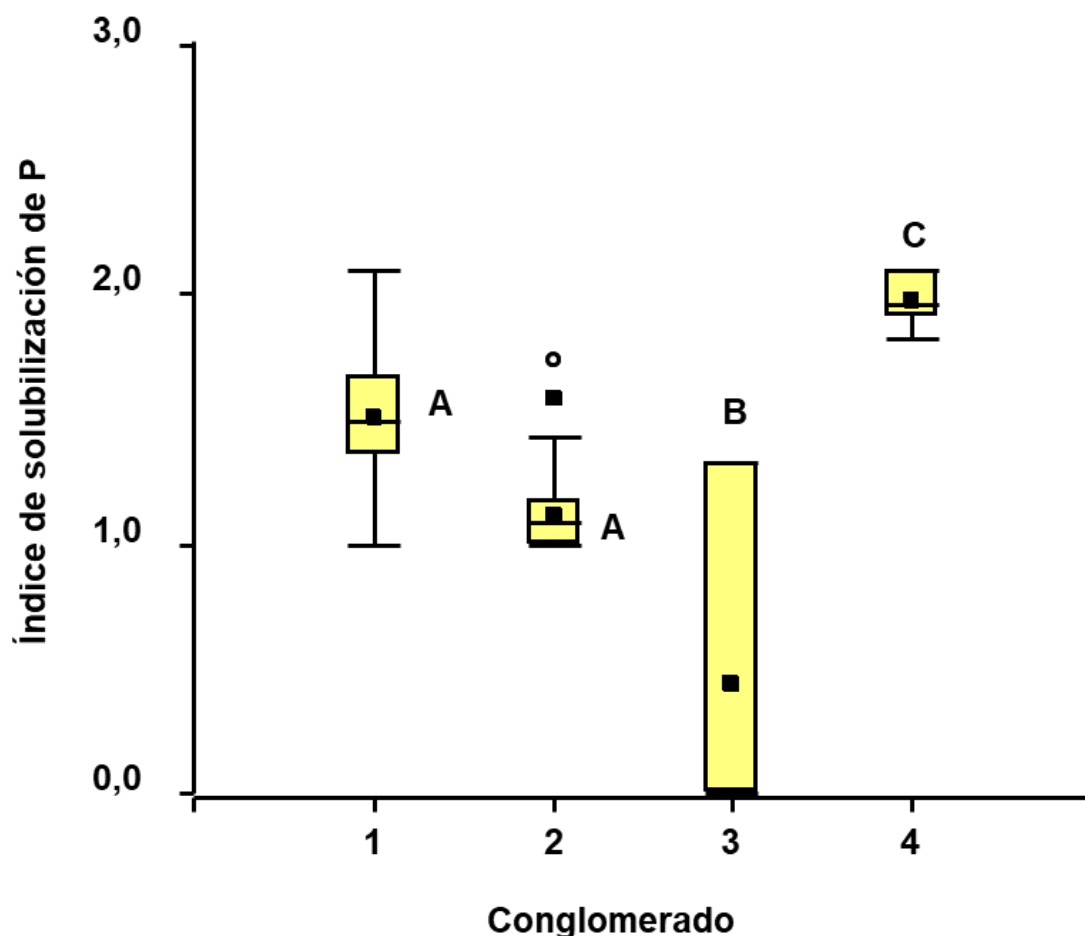
En la Figura 1 se observa la comparación entre los 4 conglomerados de bacterias en base a su habilidad para solubilizar fósforo, donde el conglomerado que obtuvo un mayor índice fue el 4. Este conglomerado incluyó los aislados CL-Cont 27 y CL-Rap 18, donde el primer aislado solubilizó 8,2 mg L<sup>-1</sup> de fósforo en la cuantificación de medio líquido y el segundo 3,9 mg L<sup>-1</sup>.

La capacidad de solubilizar elementos químicos en el suelo es ampliamente difundida en los microorganismos (Santos y Olivares, 2021). Dentro de ellos, el fósforo destaca por ser el segundo elemento más importante para el desarrollo de las plantas, pues participa en diversas actividades metabólicas como la fotosíntesis, respiración, transducción de señales de transferencia y, en cultivos de la familia Fabaceae es clave para la fijación del nitrógeno (Barman *et al.*, 2019). Pese a encontrarse una gran cantidad en el suelo, entre 400 a 1200 mg kg<sup>-1</sup> de suelo, solo cerca del 0,1% se encuentra disponible para la planta. Los microorganismos solubilizadores de fósforo son capaces de convertir el fósforo inmovilizado a su forma accesible mediante la producción de enzimas como fosfatasas, fitasas y C-P liasas; producción de ácidos orgánicos como el glucónico y cítrico, reducción del pH, actividades quelantes entre otros (Billah *et al.*, 2019; Nagargade *et al.*, 2018).

En el análisis de conglomerados de los aislados en base a su capacidad para solubilizar potasio, se obtuvieron cuatro conglomerados de bacterias (Apéndice 2), donde los conglomerados 3 y 4 obtuvieron el mayor índice de solubilización, siendo significativamente superiores a los conglomerados 1 y 2 ( $P \leq 0,05$ ) (Figura 2). Se seleccionó el conglomerado 3 y 4 que incluye las cepas CL-Cont 20, CL-Cont 25, CL-Cont 34, CL-Cont 52, CL-Rap 10, CL-Rap 5 y CL-Rap 17, las cuales fueron evaluadas en su habilidad para solubilizar potasio en medio líquido, sin detectarse niveles cuantificables. Los microorganismos solubilizadores de potasio, dentro de

los cuales encontramos bacterias, hongos y actinomicetos, son capaces de incrementar el potasio disponible gracias a la secreción de ácidos orgánicos y polisacáridos y reacciones de acidólisis, complexólisis, quelación e intercambio (Das y Pradhan, 2016). Sin embargo, se acepta que el principal mecanismo se basa en la acción de los ácidos orgánicos (Meena *et al.*, 2017).

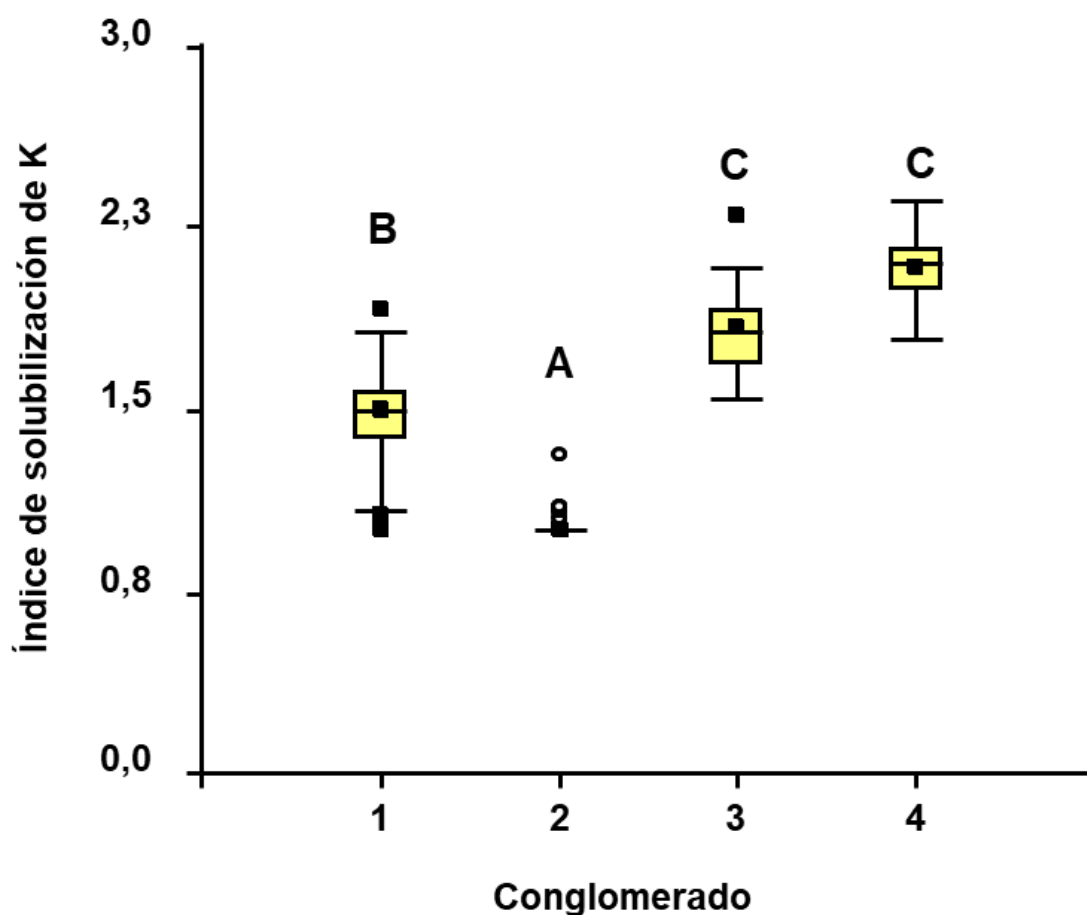
Figura 1. Comparación entre conglomerados de bacterias en base al índice de solubilización de fósforo.



Al igual que el fósforo, el potasio es un macroelemento esencial para el crecimiento de las plantas y diversos procesos metabólicos, que tienen lugar dentro de las células. Este nutriente desempeña un papel crucial en la fotosíntesis, la activación de enzimas, la síntesis de proteínas y la degradación de azúcares. Una deficiencia de este elemento provoca amarillamiento en los bordes de las hojas, un crecimiento

lento de la planta y desarrollo pobre y/o incompleto de su sistema radicular. Más del 90% se encuentra insoluble en forma de roca y minerales de silicato, por lo que la concentración en el suelo es muy baja, rondando entre el 0,04 y 3% (Mohan, 2021; Maçik *et al.*, 2020).

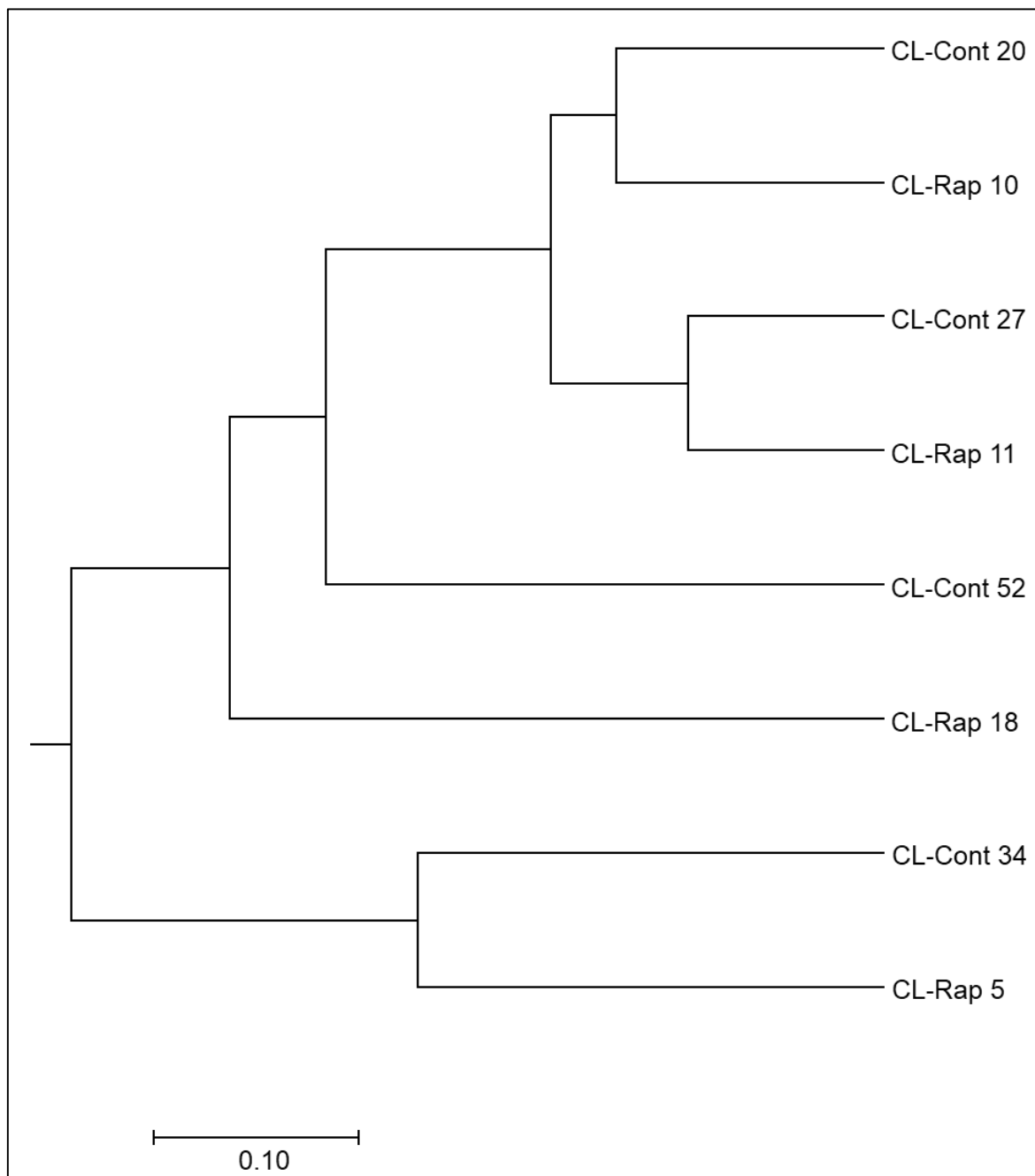
Figura 2. Comparación entre conglomerados de bacterias en base al índice de solubilización de potasio.



De las bacterias seleccionadas, se determinó que todas eran genéticamente distintas, de acuerdo al cladograma de las relaciones genéticas entre bacterias de acuerdo al producto RAPDs-PCR con el partidor A1R (Figura 3). Esta técnica se fundamenta en la amplificación al azar de fragmentos de ADN mediante el uso de cebadores cortos y secuencias de ADN. Es capaz de diferenciar a nivel de cepa,

incluso dentro de una misma especie, evitando de esta forma trabajar con copias idénticas (Welsh y McClelland, 1990).

Figura 3. Cladograma de las relaciones genéticas entre bacterias de acuerdo al producto RAPDs-PCR con el partidor A1R.



De las nueve cepas seleccionadas, cinco presentaron actividad ACC-Desaminasa que corresponden a CL-Cont 25, CL-Cont 27, CL-Cont 34, CL-Cont 52 y CL-Rap

18, (Tabla 3). Ciertas bacterias rizosféricas y del suelo son capaces de sintetizar esta enzima, que actúa sobre el 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC), precursor del etileno, convirtiéndolo en  $\alpha$ -cetobutirato y amoníaco, los cuales utiliza como fuente de carbono y nitrógeno (Jha *et al.*, 2021).

Tabla 5. Caracterización de las bacterias seleccionadas en actividad ACC-Desaminasa y producción de ácido indolacético (IAI).

Cepa	Ubicación	Origen	IS de P	IS de K	Actividad ACC-Desaminasa	Producción AIA
CL-Cont 20	S4	<i>S.cassioides</i>	1,39	1,87	-	0
CL-Cont 25	S5	<i>S.cassioides</i>	1,54	1,81	+	0
CL-Cont 27	S6	<i>S.macrocarpa</i>	2,03	1,61	+	0
CL-Cont 34	S7	Suelo	1,53	1,91	+	7,39
CL-Cont 52	S10	Suelo	1,53	1,78	+	0
CL-Rap 5	S11	Suelo	1	1,82	-	0
CL-Rap 10	S11	Suelo	1,77	1,92	-	0
CL-Rap 17	S13	Suelo	1,48	2,14	-	0
CL-Rap 18	S13	Suelo	1,92	1	+	3,68

+: producción, -: no produce.

El etileno es una hormona conocida por regular diversos procesos en la planta, que van desde la diferenciación de brotes y raíces, formación de raíces adventicias, abscisión de hojas y frutos hasta inducción a floración y maduración de frutos. Una

sobreproducción de esta hormona, inducida por períodos prologados de estrés, conduce a una serie de efectos negativos en la planta como crecimiento radicular anormal, inhibición en el crecimiento, senescencia y muerte (Ali *et al.*, 2018; Saleem *et al.*, 2007). Diversos autores han reportado que la inoculación de plantas con bacterias productoras de ACC-Desaminasa les permite sobrellevar de mejor manera situaciones de estrés, siendo esto posible mediante la disminución de la biosíntesis de etileno en la planta (Zhao *et al.*, 2023; Hamid *et al.*, 2021). En leguminosas, además, se ha visto que incrementa la nodulación mediante la modificación de las estructuras de las raíces, facilitando la infección por parte del rizobio (Khalid *et al.*, 2017).

Al mismo tiempo, las cepas CL-Cont 34 y CL-Rap 18 produjeron Ácido indol-3-acético (AIA), un tipo de auxina que regula la elongación de las raíces gracias a la síntesis de triptófano y otros procesos fisiológicos de las plantas (Kaur *et al.*, 2022). Las bacterias productoras de AIA son capaces de modificar la estructura de las raíces, aumentando el volumen radicular total, lo que permite incrementar la absorción de agua y nutrientes, otorgándole una mayor capacidad de resistencia bajo condiciones de estrés (Etsami y Maheshawari, 2018). Esta hormona está involucrada en la división celular, la diferenciación y formación de haces vasculares y es esencial para la formación de los nódulos (Gopalakrishnan *et al.*, 2015).

La Tabla 4 muestra los resultados de las pruebas de compatibilidad realizadas entre *Mesorhizobium* (AG-105) y las cepas promotoras de crecimiento seleccionadas. Aquellas cepas compatibles entre ellas, señaladas en la tabla con la letra “C”, poseen potencial para conformar los consorcios bacterianos. Por otra parte, los pares de cepas indicados con “NC”, no compatibles, presentaron cierto efecto inhibitorio entre sí. Dentro de los mecanismos indirectos de acción tanto en rizobios como bacterias del suelo y de la rizosfera, están la síntesis de antibióticos y enzimas líticas siendo capaces, además, de competir por nutrientes y/o sitios de unión en las raíces de las plantas (Olanrewaju *et al.*, 2017).

Para la selección final de las cepas se consideró, además de la compatibilidad con *Mesorhizobium* spp (AG-105) y su capacidad de producir ACC-Desaminasa y AIA, el origen de la cepa. Este último factor es importante debido a que los

microbiomas tienden a ser resistentes y resilientes, es decir, luego de una perturbación externa o ingreso de nuevas especies, tienden a volver a una estructura comunitaria similar a la original (Toju *et al.*, 2018). Por ello, se seleccionaron las cepas CL-Cont 27, CL-Cont 34, CL-Rap 5, y CL-Rap 17, las cuales cumplen con las características mencionadas con anterioridad para la conformación de consorcios bacterianos, los cuales serán probados en *Sophora toromiro*.

Tabla 6. Prueba de compatibilidad entre cepas seleccionadas y *Mesorhizobium* spp. (AG-105)

Cepas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	-	NC	NC	NC	NC	C	NC	NC	NC	NC
2	NC	-	NC	NC	NC	C	C	NC	C	NC
3	NC	NC	-	NC	NC	C	C	NC	NC	C
4	NC	NC	NC	-	NC	C	NC	C	C	C
5	NC	NC	NC	NC	-	NC	NC	NC	NC	NC
6	C	C	C	C	NC	-	NC	C	C	NC
7	NC	NC	NC	NC	NC	NC	-	C	C	C
8	NC	C	NC	NC	NC	C	NC	-	C	NC
9	NC	C	NC	C	NC	C	NC	C	-	C
10	NC	NC	C	C	NC	NC	C	C	C	-

\* Cepas: 1=CL-Cont20; 2= CL-Cont25; 3= CL-Cont27; 4= CL-Cont34; 5= CL-Cont52; 6= CL-Rap10; 7= CL-Rap5; 8= CL-Rap18; 9= CL-Rap17; 10= AG-105  
 NC: no compatibles; C: compatibles.

## CONCLUSIONES

- En suelos asociados a *Sophora* spp. y suelo libre de Rapa Nui e Isla Magdalena es factible encontrar bacterias cultivables con atributos promotores del crecimiento vegetal tales como solubilización de fósforo y potasio y producción de ácido indolacético y la enzima ACC- desaminasa.
- Las cepas CL-Cont 27, CL-Cont 34, CL-Rap 5, y CL-Rap 17 fueron seleccionadas por sus mayores niveles de solubilización y/o por producir ácido indolacético y ACC-desaminasa y fueron además compatibles con el rizobio de *Sophora toromiro*, *Mesorhizobium* spp (AG-105). Son, por lo tanto, cepas factibles de ser incluidas en

consorcios bacterianos para la inoculación de *Sophora toromiro*.

## REFERENCIAS

1. Abedini, D., Jaupitre, S., Bouwmeester, H., y Dong, L. (2021). Metabolic interactions in beneficial microbe recruitment by plants. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 70, 241-247. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.06.015>
2. Adedeji, A. A., Häggblom, M. M., y Babalola, O. O. 2020. Sustainable agriculture in Africa: Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) to the rescue. *Scientific African.*, 9, e00492. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00492>
3. Ali, S., y Kim, W. C. 2018. Plant growth promotion under water: decrease of waterlogging-induced ACC and ethylene levels by ACC deaminase-producing bacteria. *Front. Microbiol.*, 9, 1096
4. Babalola, O. O. 2010. Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnol. Lett.*, 32(11), 1559-1570. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0347-0>
5. Barman, S., Das, S., y Bhattacharya, S. S. 2019. The prospects of bio-fertilizer technology for productive and sustainable agricultural growth. In *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering* (pp. 233-253). Elsevier.
6. Benni Montecino, Melanie. 2017. Análisis físico-químico de suelos utilizados para la recuperación de *Sophora toromiro*, especie endémico de Isla de Pascua. Universidad técnica Federico Santa María.
7. Billah, M., Khan, M., Bano, A., Hassan, T. U., Munir, A., y Gurmani, A. R. 2019. Phosphorus and phosphate solubilizing bacteria: Keys for sustainable agriculture. *Geomicrobiol. J.*, 36(10), 904-916.
8. Chamkhi, I., El Omari, N., Balahbib, A., El Menyiy, N., Benali, T., y Ghoulam, C. 2022. Is — the rhizosphere a source of applicable multi-beneficial microorganisms for plant enhancement? *Saudi J Biol Sci.*, 29(2), 1246-1259. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.09.032>
9. CONAF. 2011. Plan Nacional de Conservación del Toromiro, *Sophora toromiro*.
10. Conservación del toromiro. 2023. Iniciativas de reintroducción. Portal del Plan Nacional de Conservación del *Sophora toromiro*. <https://plantoromiro.org/conservacion/iniciativas-de-reintroduccion/>
11. Das, I., y Pradhan, M. 2016. Potassium-solubilizing microorganisms and their role in enhancing soil fertility and health. *Potassium solubilizing*

microorganisms for sustainable agriculture, 281-291.

12. Di Rienzo J.A., F. Casanoves, M.G. Balzarini, L. Gonzalez, M. Tablada and C.W. Robledo. 2016. InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina
13. Espejo, J., y Rodríguez, R. 2013. Antecedentes históricos en la descripción y del uso de *Sophora toromiro* (Phil.) Skottsb. (Fabaceae) en su hábitat natural: 1770-1948. Gayana. Botánica., 70(2), 384-390.
14. Etesami, H., y Maheshwari, D. K. 2018. Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects. Ecotoxicol. Environ. Saf., 156, 225-246.
15. Gerding M. y J. Espejo. 2019. Informe final "Selección de rizobios asociados a *Sophora* spp. para la inoculación y establecimiento de plantas de *Sophora toromiro* (Phil.) Skottsb. especie extinta en su hábitat natural". Convenio de Investigación Universidad de Concepción -Conaf Isla de Pascua (2017-2019). 22 pp
16. Gopalakrishnan, S., Sathya, A., Vijayabharathi, R., Varshney, R. K., Gowda, C. L., y Krishnamurthy, L. 2015. Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. 3 *Biotech*, 5, 355-377.
17. Guiñazú, L. B., Andrés, J. A., Rovera, M., Balzarini, M., y Rosas, S. B. 2013. Evaluation of rhizobacterial isolates from Argentina, Uruguay and Chile for plant growth-promoting characteristics and antagonistic activity towards *Rhizoctonia* sp. and *Macrophomina* sp. in vitro. Eur. J. Soil Biol, 54, 69-77.
18. Hamid, B., Zaman, M., Farooq, S., Fatima, S., Sayyed, R. Z., Baba, Z. A., ... & Suriani, N. L. (2021). Bacterial plant biostimulants: a sustainable way towards improving growth, productivity, and health of crops. Sustainability., 13(5), 2856. <https://doi.org/10.3390/su13052856>
19. Hariprasad, P., y Niranjana, S. R. 2009. Isolation and characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria to improve plant health of tomato. Plant Soil., 316, 13-24.
20. Hu, X., Chen, J., y Guo, J. 2006. Two phosphate-and potassium-solubilizing bacteria isolated from Tianmu Mountain, Zhejiang, China. World J. Microbiol. Biotechnol., 22(9), 983-990.
21. Jha, C. K., Sharma, P., Shukla, A., Parmar, P., Patel, R., Goswami, D., y Saraf, M. 2021. Microbial enzyme, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase: an elixir for plant under stress. Physiol. Mol. Plant Pathol., 115, 101664.

22. Jordan, M., Larrain, M., Tapia, A., y Roveraro, C. 2001. In vitro regeneration of *Sophora toromiro* from seedling explants. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 66(2), 89-95.
23. Kaur, T., Kour, D., Pericak, O., Olson, C., Mohan, R., Yadav, A., ... y Yadav, A. N. 2022. Structural and functional diversity of plant growth promoting microbiomes for agricultural sustainability. *Appl. Biol. Biotechnol.*, 10(1), 70-89.
24. Khalid, A., Ahmad, Z., Mahmood, S., Mahmood, T., y Imran, M. 2017. Role of ethylene and bacterial ACC-deaminase in nodulation of legumes. *Microbes for Legume Improvement.*, 95-118.
25. Kiprotich, K., Muoma, J., Omayio, D. O., Ndombi, T. S., & Wekesa, C. (2023). Molecular characterization and mineralizing potential of phosphorus solubilizing bacteria colonizing common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizosphere in Western Kenya. *International Journal of Microbiology.*, 2023.
26. Ladefoged, T. N., Stevenson, C. M., Haoa, S., Mulrooney, M., Puleston, C., Vitousek, P. M., y Chadwick, O. A. 2010. Soil nutrient analysis of Rapa Nui gardening. *Archaeology in Oceania.*, 45(2), 80-85.
27. Ljung, K. 2013. Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development.*, 140(5), 943-950.
28. Maçik, M., Gryta, A., y Fraç, M. 2020. Biofertilizers in agriculture: An overview on concepts, strategies and effects on soil microorganisms. *Adv. Agron.*, 162, 31-87.
29. Marques, A. S., Marchaison, A., Gardan, L., y Samson, R. 2008. BOX-PCR-based identification of bacterial species belonging to *Pseudomonas syringae*: *P. viridiflava* group. *Genet. Mol. Biol.*, 31, 106-115.
30. Maunder, M. 1997. Conservation of the extinct Toromiro Tree, *Sophora toromiro*. *Curtis's bot. Mag.*, 14: 226-231. <https://doi.org/10.1111/1467-8748.00113>
31. Maunder, M., Culham, A., Alden, B., Zizka, G., Orliac, C., Lobin, W., Bordeu, A., Ramirez, J. M., y Glissmann-Gough, S. 2000. Conservation of the Toromiro Tree: Case Study in the Management of a Plant Extinct in the Wild. *Conserv. Biol.*, 14(5), 1341–1350. <http://www.jstor.org/stable/2641783>
32. Mieth, A., y Bork, H. R. 2005. History, origin and extent of soil erosion on Easter Island (Rapa Nui). *Catena.*, 63(2-3), 244-260.
33. Meena, V. S., Meena, S. K., Verma, J. P., Kumar, A., Aeron, A., Mishra, P. K., ... y Dotaniya, M. L. 2017. Plant beneficial rhizospheric microorganism (PBRM) strategies to improve nutrients use efficiency: a review. *Ecol.*

Eng., 107, 8-32.

34. Mohan, C., Sivaji, M., Kannan, D., Reka, P., Sowmyapriya, S., y Rasakumar, R. 2021. PROMOTING BACTERIA (PGPB).
35. Nagargade, M., Tyagi, V., y Singh, M. K. 2018. Plant growth-promoting rhizobacteria: a biological approach toward the production of sustainable agriculture. *Role of Rhizospheric Microbes in Soil: Volume 1: Stress Management and Agricultural Sustainability*, 205-223.
36. Olanrewaju, O. S., Glick, B. R., y Babalola, O. O. 2017. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 33, 1-16.
37. Olave, I. 2020. Identificación y selección de rizobios para *Sophora toromiro* (Phil) Skottsb., especie extinta en Rapa nui. Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad de Concepción. 34 pp
38. Parewa, H. P., Meena, V. S., Jain, L. K., y Choudhary, A. 2018. Sustainable crop production and soil health management through plant growth-promoting rhizobacteria. *Role of Rhizospheric Microbes in Soil: Volume 1: Stress Management and Agricultural Sustainability.*, 299-329.
39. Paul, D., & Sinha, S. N. (2017). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KUPSB12 with antibacterial potential from river Ganga, India. *Annals of Agrarian Science.*, 15(1), 130-136.
40. Penrose, D. and B. Glick. 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiol. Plant.*, 118: 10-15.
41. Pezoa, I., Villacreses, J., Rubilar, M., Pizarro, C., Galleguillos, M. J., Ejsmentewicz, T. y Sánchez, C. 2021. Generation of chloroplast molecular markers to differentiate *Sophora toromiro* and its hybrids as a first approach to its reintroduction in Rapa Nui (Easter Island). *Plants.*, 10(2), 342.
42. Prasad, R., Chhabra, S., Gill, S. S., Singh, P. K., y Tuteja, N. 2020. Chapter 14 - The microbial symbionts: Potential for crop improvement in changing environments. In N. Tuteja, R. Tuteja, N. Passricha, y S. K. Saifi (Eds.), *Advancement in Crop Improvement Techniques* (pp. 233-240). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818581-0.00014-0>
43. Premono, M. E., Moawad, A. M., & Vlek, P. L. G. (1996). Effect of phosphate-solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. (No. REP-12113. CIMMYT.).

44. Püschel, T. A., Espejo, J., Sanzana, M. J., y Benitez, H. A. 2014. Analysing the floral elements of the lost tree of Easter Island: A morphometric comparison between the remaining ex-situ lines of the endemic extinct species *Sophora toromiro*. Plos one., 9(12), e115548.
45. Rashid, S., T. Charles and B. Glick. 2012. Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. Appl. Soil ecology. 61: 217-224.
46. Rodríguez, R., C. Marticorena, D. Alarcón, C. Baeza, L. Cavieres, V.L. Finot, N. Fuentes, A. Kiessling, M. Mihoc, A. Pauchard, E. Ruiz, P. Sanchez & A. Marticorena. 2018. Catálogo de las plantas vasculares de Chile. [Gayana Botánica 75\(1\): 1-430.](#)
47. Saleem, M., Arshad, M., Hussain, S., y Bhatti, A. S. 2007. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. J. Ind. Microbiol. Biotechnol, 34(10), 635-648
48. Santos, L. F., y Olivares, F. L. 2021. Plant microbiome structure and benefits for sustainable agriculture. Curr. Opin. Plant Biol., 26, 100198.
49. Sarwar, M., y Kremer, R. J. 1995. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. Lett. Appl. Microbiol., 20(5), 282-285.
50. Schoebitz, M, Ceballos, C, & Ciamp, L. 2013. Effect of immobilized phosphate solubilizing bacteria on wheat growth and phosphate uptake. J. Soil Sc. Plant. Nutr., 13(1), 1-10.
51. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. [Molecular Biology and Evolution](#) 28: 2731-2739
52. Tariq, M. R., Shaheen, F., Mustafa, S., Ali, S., Fatima, A., Shafiq, M., Safdar, W., Sheas, M. N., Hameed, A., & Nasir, M. A. (2022). Phosphate solubilizing microorganisms isolated from medicinal plants improve growth of mint. *PeerJ*, 10, e13782. <https://doi.org/10.7717/peerj.13782>
53. Teymouri, M., Akhtari, J., Karkhane, M., & Marzban, A. (2016). Assessment of phosphate solubilization activity of Rhizobacteria in mangrove forest. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 5, 168-172.
54. Toju, H., Peay, K. G., Yamamichi, M., Narisawa, K., Hiruma, K., Naito, K., ... y Kiers, E. T. 2018. Core microbiomes for sustainable agroecosystems. *Nature plants*, 4(5), 247-257.
55. Vekemans X., T. Beauwens, M. Lemaire and I. Roldan-Ruiz. 2002. Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of

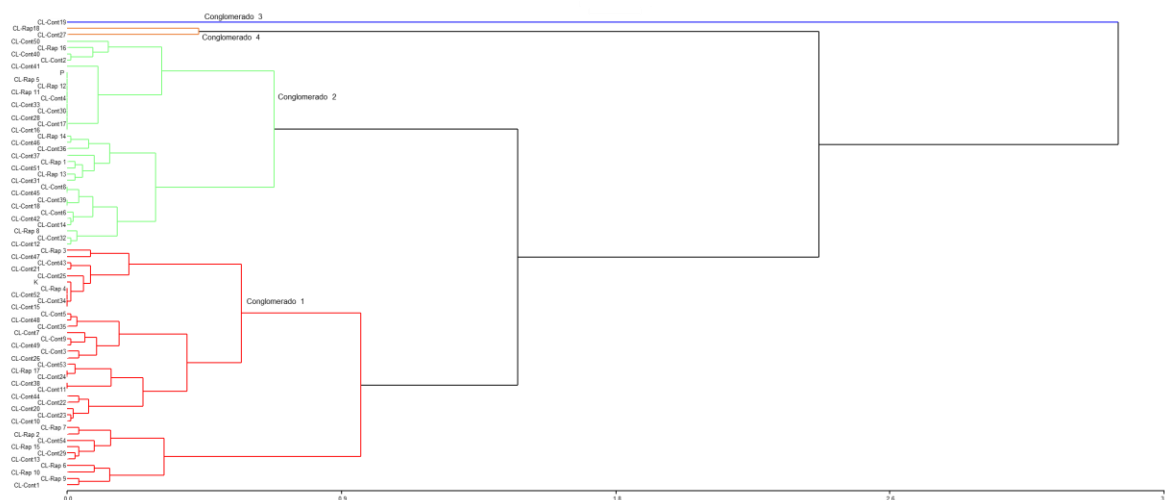
size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. *Molecular Ecology*. 11: 139-151.

56. Velázquez, E., Carro, L., Flores-Félix, J. D., Menéndez, E., Ramírez-Bahena, M. H., y Peix, A. 2019. Bacteria-inducing legume nodules involved in the improvement of plant growth, health and nutrition. *Microbiome in Plant Health and Disease: Challenges and Opportunities.*, 79-104.
57. Verma, R., Annapragada, H., Katiyar, N., Shrutika, N., Das, K., y Murugesan, S. 2020. Chapter 4 - Rhizobium. In N. Amaresan, M. Senthil Kumar, K. Annapurna, K. Kumar, y A. Sankaranarayanan (Eds.), *Beneficial Microbes in Agro-Ecology* (pp. 37-54). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00004-6>
58. Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F. J., y Lupski, J. R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 5(1), 25-40.
59. Wang, Y., Liu, H., Shen, Z., Miao, Y., Wang, J., Jiang, X., Shen, Q., y Li, R. 2022. Richness and antagonistic effects co-affect plant growth promotion by synthetic microbial consortia. *Appl. Soil Ecol.*, 170, 104300. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104300>
60. Wasilewski, M. 2012. Prehistory of Rapa Nui (Easter Island): a general outline.
61. Welsh, J., y McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*, 18(24), 7213–7218. <https://doi.org/10.1093/nar/18.24.7213>
62. Woo, S. L., y Pepe, O. 2018. Microbial Consortia: Promising Probiotics as Plant Biostimulants for Sustainable Agriculture. *Front. Plant Sci.*, 9, 1801.
63. Zhao, X., Yuan, X., Xing, Y., Dao, J., Zhao, D., Li, Y., ... & Wang, Z. (2023). A meta-analysis on morphological, physiological and biochemical responses of plants with PGPR inoculation under drought stress. *Plant, Cell & Environment*, 46(1), 199-214. <https://doi.org/10.1111/pce.14466>
64. Zhu, H., Liu, X., Feng, Z., y Yao, Q. 2019. Chapter 2 - Promoting Crop Growth With Symbiotic Microbes in Agro-Ecosystems in Climate Change Era. In J. S. Singh y D. P. Singh (Eds.), *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 31-41). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64191-5.00002-X>
65. Zizka, G., y Zizka, A. 2022. The Flora and Vegetation of Easter Island: Past and Present. In *The Prehistory of Rapa Nui (Easter Island) Towards an Integrative Interdisciplinary Framework* (pp. 347-376). Cham: Springer International Publishing.

### Anexo 1. Análisis de muestras de suelo provenientes de 3 zonas distintas de Rapa Nui.

Análisis	Miro Macoy 1		Miro Macoy 2		Kano Rau	
Materia Orgánica (%)	5,2	Medio	4,19	Medio	4,92	Medio
Nitratos (N-NO <sub>3</sub> ) (mg/Kg)	2,8	Bajo	0,8	Bajo	0,1	Bajo
Amonio (N-NH <sub>4</sub> ) (mg/Kg)	5,3	Bajo	5,1	Bajo	6,3	Bajo
Nitrógeno disponible (mg/Kg)	8,1	Bajo	5,8	Bajo	6,4	Bajo
Fósforo Olsen (mg/Kg)	1,9	Bajo	10,3	Medio	1,1	Bajo
K Disponible (mg/Kg)	238,6	Alto	163,7	Medio	280,6	Alto

### Apéndice 1. Conglomerados formados en base al índice de solubilización del fósforo.



## Apéndice 2. Conglomerados formados en base al índice de solubilización de potasio.

