



Universidad de Concepción

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

Magíster en Ciencias y Recursos Naturales con Mención en Botánica

**ABUNDANCIA Y ACTIVIDAD PROMOTORA DEL CRECIMIENTO VEGETAL DE
BACTERIAS ASOCIADAS A PLANTAS DE FORMACIONES XEROFÍTICAS
ANDINAS Y SU USO POTENCIAL EN LA RESTAURACIÓN ECOLÓGICA**

Tesis para optar al grado académico de Magíster en Ciencias y Recursos Naturales

con Mención en Botánica

POR: CARLA AGUILERA TORRES

Profesora Guía: Dra. Angela Sierra

Profesor Co-guía: Dr. Mauricio Schoebitz

Concepción, Chile, 2022

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.



Esta tesis ha sido realizada en el Grupo de Ecofisiología Térmica en el Departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas.

Ha sido Aprobada por la siguiente comisión evaluadora:

Profesor Guía

Dra. Angela Sierra Almeida

Profesor Co-Guía

Dr. Mauricio Schoebitz

Evaluadores



Dr. Pablo Guerrero

Dr. Rodrigo Hasbún

Dr. Götz Palfner

Directora de Programa

Dra. Fabiola Cruces

Director Dirección de Postgrado

Dr. Bernardo Riffo Ocares



*A mis plantas,
en ellas encuentro vida y
preguntas.*

AGRADECIMIENTOS

En este transcurso de intenso aprender, trabajar, infinitas colaboraciones y conversaciones, doy gracias a todas las personas que estuvieron presentes en estos dos años y 10 meses en el capítulo de mi vida llamado “que buena idea sería hacer un Magíster en Botánica”.

A quien me dijo que si apenas escribí ese correo para postular al Magíster. A mi profe Angela Sierra...queridísima, eterna cómplice y guía espiritual que encauzó mis ideas, y en todo momento estuvo ahí apañándome, desafiándome, abriéndome las puertas de sus dos laboratorios, el que está en la universidad y el otro allá lejitos sobre el límite arbóreo. Por hacerme crecer en niveles que jamás pensé crecer. No caben las hojas, ni palabras, ni sentires para agradecer todo lo que aprendí de mi profe, una gran científica, persona y mujer, no pude haber tenido una mejor guía.

Agradezco al profe Mauricio Schoebitz, por su paciencia y por enseñarme ese mundo bajo los suelos, por solucionar cada imprevisto y por dar calma cada vez que un ensayo no resultaba, por darme la confianza para asistir a su laboratorio y crecer en él. Gracias a todos mis compañeros del Laboratorio de Suelos, especialmente a Matías que nos ayudó a coleccionar suelos en Fumarolas y también a Gustavo Riveros que colaboró desinteresadamente en la elaboración de mi metodología, escritura del artículo,

agradezco cada una de sus brillantes ideas, agradezco igual a Paulo que fue un apoyo tremendo cuando estuvo en el laboratorio, especialmente con la formulación de mis reactivos y su rigor para realizar cada experimento. A la profe Lola y a Felipe del Laboratorio de Bioactivos en plantas e Ingredientes Vegetales, por apañarme con cada insumo que faltaba, por las conversaciones metodológicas, por cada solución, y por ayudarme a realizar las mediciones en HPLC.

Del Departamento de Botánica, agradezco al profe José Becerra por dar apoyo con sus instalaciones, personal y equipos para realizar las mediciones en el cromatógrafo, al igual que a la Dra. Claudia Pérez quien nos orientó con las primeras aproximaciones del ensayo ARA. También agradezco a Bartolo por permitirnos ocupar su sensor PAR. A Alfredo Saldaña por prestarnos el fluorímetro durante todo el periodo de mediciones. Al laboratorio de Fisiología Vegetal que nos colaboró con materiales para la realización del ensayo en las cámaras de crecimiento.

Al profe Rodrigo Hasbún, quien con su proyecto de Fondo de Investigación del Bosque Nativo (CONAF FIBN 047/2020), permitió financiar la mayoría de los ensayos que se realizaron en esta tesis, quien también facilitó la identificación de mis bacterias, encauzó ideas para afinar mis resultados y confió en mi para modificar objetivos y metodologías. A Pablo Azúa, Coordinador del programa de Restauración Cayumanque, quien me facilitó 60 individuos de *Gomortega keule* para la realización de este ensayo.

A mis compañeros GET: Loreto, Esteban, Diego y Catalina, que los quiero y alegran la vida en el Laboratorio, gracias por todo lo que entregan, por esa energía de vivir la montaña y compartir las plantas, por cada pregunta curiosa que encendía la llama, por los mates, las risas, conversaciones profundas y no tan profundas, por crecer juntos, acompañarnos y ser el equipo que toda persona querría tener... aprendí de formas hermosas junto a ustedes. Mención honrosa a mi Dra. Morales, que gran amiga, tan sabia y perseverante, gracias por todo lo bonito que aprendí de ti.

A mi mamá y mi hermana, que me apoyaron emocionalmente cada vez que la moral bajaba, por su amor, especialmente el primer año de pandemia. Gracias por esperarme con comida rica cada vez que volví a casa, por consentir mis mañas, por las diarias e infaltables llamadas, ánimos y risas... pero por sobre todo por dejarme ser, hacer y vivir libremente de las plantas. A mi Antü que en el primer año me acompañó intensas madrugadas, por sus exigentes solicitudes para salir a pasear y curiosear juntas.

A mí misma, por las múltiples Carlas, que perseveraron, dieron espacio y se entregaron a las locuras de la Carli estudiosa y curiosa... Lo dimos todo.

Y a mis plantas... A mis plantas siempre.

INDICE

| | |
|--|----|
| ÍNDICE DE FIGURAS | 1 |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | 4 |
| RESUMEN..... | 6 |
| ABSTRACT | 8 |
| INTRODUCCIÓN..... | 10 |
| A. PREGUNTAS, HIPÓTESIS, OBJETIVOS | 20 |
| OBJETIVO ESPECÍFICO 1. DETERMINAR CÓMO VARÍA LA ABUNDANCIA Y ACTIVIDAD DE BACTERIAS ASOCIADAS A DOS ESPECIES VEGETALES DE FORMACIONES XEROFÍTICAS ANDINAS QUE CRECEN EN LADERAS OPUESTAS. | 22 |
| METODOLOGÍA..... | 22 |
| RESULTADOS..... | 32 |
| OBJETIVO ESPECÍFICO 2. EVALUAR DIFERENCIAS EN LA SUPERVIVENCIA, DESEMPEÑO Y CRECIMIENTO DE PLANTAS NATIVAS EXPUESTAS A SEQUÍA, AL SER INOCULADAS CON PGPB ASOCIADAS A PLANTAS DE FORMACIONES XEROFÍTICAS ANDINAS..... | 44 |
| METODOLOGÍA..... | 44 |
| RESULTADOS..... | 53 |
| DISCUSIÓN..... | 61 |
| CONCLUSIÓN..... | 72 |
| REFERENCIAS | 75 |

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sitio de estudio ubicado en el complejo volcánico Nevados de Chillán. Letras a. y b. indican las laderas norte y sur respectivamente. Las especies seleccionadas presentes en ambas laderas se indican en el costado derecho: c. *A. prolifera* y d. *B. empetrifolia*..... 24

Figura 2. Condiciones climáticas del suelo medidas en dos laderas contrastantes del complejo volcánico Nevados de Chillán. a. El potencial hídrico (MPa) y la b. Temperatura del suelo (°C) fueron medidos a 15 cm de profundidad del suelo en dos laderas contrastantes. Los valores corresponden a la media \pm EE (n = 3). Las flechas azules indican las nevadas. Los asteriscos muestran diferencias significativas (ANOVA de medidas repetidas, $p < 0,05$)..... 35

Figura 3. Abundancia bacteriana calculada en Log UFC g^{-1} para el suelo de *A. prolifera* (a) y *B. empetrifolia* (b). Los valores indican media \pm EE (n = 3). Las letras indican diferencias significativas entre las laderas (prueba de Wilcoxon, $p > 0,05$) 39

Figura 4. Árbol filogenético de 9 aislados bacterianos obtenidos de las especies *A. prolifera* y *B. empetrifolia*, en las laderas norte y sur en el complejo volcánico Nevados de Chillán. 40

Figura 5. Producción de ácido indolacético (IAA) de bacterias aisladas de 2 especies de formaciones xerofíticas andinas en laderas opuestas. Para todos los mecanismos las columnas se dividieron por especie: en la izquierda la especie *A. prolifera* y a la derecha la especie *B. empetrifolia*. Para cada especie las laderas se indican con colores: verde para la ladera norte y celeste para la ladera sur. Los valores indican la media±EE. Letras iguales indican que no existen diferencias (t-test o equivalente no paramétrico, $p > 0,05$). 41

Figura 6. Mecanismos promotores del crecimiento vegetal de carácter enzimático de bacterias aisladas de 2 especies de formaciones xerofíticas andinas en laderas opuestas. Para todos los mecanismos las columnas se dividieron por especie, en la izquierda la especie *A. prolifera* y a la derecha la especie *B. empetrifolia*. Para cada especie las laderas se indican con colores, verde para la ladera norte y celeste para la ladera sur. La actividad de la enzima **ACC desaminasa** (a y b) se presentan como μM de α -cetobutirato. La **solubilización de fosfato** (c y d) se presenta como Índice P. **La fijación de nitrógeno** (e y f) se indica como $\text{nmoles C}_2\text{H}_4 \text{ d}^{-1}\text{vial}^{-1}$. Barras de error indican la media±EE. Letras distintas por sobre barras de error indican diferencias significativas entre laderas (T test o equivalente no paramétrico, $p < 0,05$), letras iguales indican que no existen diferencias (T test o equivalente no paramétrico, $p > 0,05$). 43

Figura 7. Condición inicial de plantas de *G. keule* utilizadas para inoculación bacteriana..... 48

Figura 8. Medias del potencial hídrico (MPa) de los suelos de los tratamientos riego y sequía durante el ensayo de inoculación bacteriana en plantas de *G. keule*. Los valores corresponden a la media \pm EE. La Línea vertical de color negro muestra el período en el cual se realizó el desfonde de los maceteros..... 54

Figura 9. Gráfico de la tabla de supervivencia proveniente de análisis Kaplan-Meier para los tratamientos con riego (a) y sequía (b), con tres tipos de inoculación (NIAA, PACC y sin bacteria). 55

Figura 10. Indicadores de desempeño de la planta para los tratamientos riego (izquierda) y sequía (derecha), con 3 tipos de inoculación (NIAA, PACC y sin bacteria). Barras de error indican error estandar (media \pm EE). Líneas verticales de color negro indican el tiempo en el cual se realizó el desfonde de los maceteros para el tratamiento con sequía. La **eficiencia fotoquímica máxima del fotosistema II (Fv/Fm)** se indican con las letras a y b. La **conductancia estomática (nmol/m²s)** se indican con las letras c y d..... 57

Figura 11. Indicadores de crecimiento para determinar el efecto de la inocuación bacteriana en plantas de *G.keule* en los tratamientos riego (izquierda) y sequía (derecha), con tres tipos de inoculación (NIAA, PACC y sin bacteria). Baras de error indican el error estándar (media \pm EE). Comparaciones estadísticas (ANOVA de varianza factorial o equivalente no paramétrico) se indican con letras por sobre las barras de error: a y b indican que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), letras iguales indican que no existen diferencias estadísticamente

significativas ($p > 0,05$). El **número de hojas** se indica en los paneles a y b. Las medias del **Área Específica de la Hoja** (SLA, $\text{mm}^2 \text{mg}^{-1}$) se indican en los paneles c y d. La **Longitud Específica de la Raíz** (LER, m g^{-1}) se indican con las letras e y f. **Relación Raíz Brote** de plantas se indican en los paneles g y h. 60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones térmicas y de humedad del aire medidas en dos laderas contrastantes de la zona alpina del complejo volcánico Nevados de Chillán. Los valores corresponden a la media \pm EE ($n = 3$) para todo el período sin nieve entre el 28 de octubre de 2021 y el 19 de abril de 2022. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las temperaturas extremas se muestran entre paréntesis como valores absolutos..... 33

Tabla 2. Caracterización química de los suelos bajo el dosel de las especies *A. prolifera* y *B. empetrifolia*, ubicadas en las laderas norte y sur en el complejo volcánico Nevados de Chillán. Los valores representan la media + EE ($n = 3$). Las letras diferentes indican diferencias significativas entre las laderas (prueba T o equivalente no paramétrico, $p \leq 0,05$). 37

Tabla 3. Caracterización de inóculos bacterianos utilizados en el ensayo, señalando actividad, ladera y especie asociados a ellos junto con la identidad probable de la bacteria y la concentración del inóculo (Log UFC g⁻¹)..... 46

Tabla 4. Tratamientos diferenciales en disponibilidad hídrica y tipo de inoculación para el desarrollo de individuos juveniles de *G. keule*, con distintos tipos de inóculos.
..... 49



RESUMEN

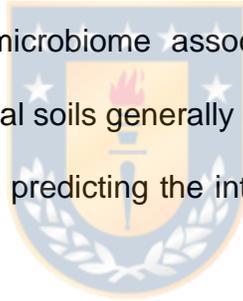
Las plantas interactúan con una gran diversidad de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB, del inglés Plant Growth-Promoting Bacteria), que mejoran su desempeño fisiológico, especialmente en condiciones de estrés. En sistemas naturales con componente extrema como la alta montaña, este tipo de interacción ha sido escasamente estudiada, pese a que se tiene conocimiento que las plantas de estos sistemas poseen una alta especialización y un microbioma asociado potencialmente benéfico. En la zona centro sur de la cordillera de los Andes, se ubican una de las formaciones xerofíticas más australes de Chile, que componen centros de alta biodiversidad, y a su vez se encuentran expuestos a una alta degradación de sus hábitats producto de la constante actividad antrópica. Las especies que componen estos sistemas sobreviven y crecen pese a la sequía estival y a las bajas temperaturas propias de un sistema alpino, por lo que es probable que la capacidad de estas plantas para enfrentar las limitaciones climáticas esté complementada por la interacción benéfica con PGPB. Considerando la potencialidad de estos microbiomas para asistir a otras especies nativas en condiciones extremas, es que el presente proyecto buscó realizar una primera aproximación a este sistema, a través de dos preguntas claves ¿Existen diferencias en la abundancia y en la actividad promotora del crecimiento de bacterias asociadas a plantas de las formaciones xerofíticas andinas que crecen en laderas opuestas? y ¿Cuáles son los efectos en el crecimiento y supervivencia de plantas nativas expuestas a sequía cuando son inoculadas con PGPB aisladas de especies de formaciones xerofíticas andinas? Para responder estas preguntas se midió la

abundancia de bacterias presentes en los suelos de las especies arbustivas *Azorella prolifera* y *Berberis empetrifolia*, ambas presentes en laderas de exposición contrastante en la zona alpina del complejo volcánico Nevados de Chillán. Las bacterias más abundantes fueron seleccionadas y aisladas para evaluar la actividad de distintos mecanismos promotores del crecimiento vegetal: la actividad de la enzima nitrogenasa, fosfatasa, ACC desaminasa y la fitohormona ácido indolacético, las cuales fueron comparadas entre laderas. Posteriormente, se seleccionaron 4 cepas bacterianas abundantes correspondientes a los géneros *Arthrobacter* y *Pseudoarthrobacter*, las cuales obtuvieron mayor actividad en cada uno de los mecanismos evaluados, para ser bioencapsuladas e inoculadas en plantas de *Gomortega keule* en condiciones de vivero. Se evaluó el efecto de la inoculación en condiciones de sequía sobre distintos indicadores de supervivencia, desempeño y crecimiento de las plantas inoculadas. Los resultados indicaron una mayor abundancia bacteriana (Log UFC g⁻¹) en los suelos de *B. empetrifolia* de la ladera norte (6,43 Log UFC g⁻¹), mientras que la actividad de los mecanismos promotores del crecimiento vegetal varió entre laderas y las tendencias de dependieron de la especie. La inoculación bacteriana no tuvo efectos en la supervivencia, desempeño y crecimiento de las plantas de *G. keule*. Es probable que los microorganismos de la rizósfera de *G. keule* hayan interactuado de forma negativa con los microorganismos inoculados. Es necesario explorar el microbioma asociado a plantas nativas que se deseen inocular, y el de los sustratos generalmente utilizados en programas de viverización, ya que esta información sería relevante para predecir la interacción entre microorganismos inoculados y no inoculados.

ABSTRACT

Plants interact with a great diversity of Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB), which improve the physiological performance of their host, especially under constraint conditions. In natural systems with extreme components such as high-elevation systems, this type of interaction has been scarcely studied, although it is known that plants in these systems have high specialization and a potentially beneficial associated microbiome. In the south-central zone of the Chilean Andes, one of the southernmost xerophytic formations in Chile is located, which are “Hotspot of Biodiversity” and is exposed to habitat degradation by anthropogenic activity. Plants that live in these systems have to cope with summer drought and low temperatures. Thus, the ability of plants to tolerate climatic limitations could be favored by the beneficial interaction between plants and their associated PGPB. Considering the potential of these microbiomes to assist other native species in extreme conditions, this proposal deals with two key questions: Are there differences in the abundance and growth-promoting activity of bacteria associated with plants from Andean xerophytic formations growing on opposite slopes? What is the effect on the growth and survival of native plants exposed to drought when are inoculated with PGPB isolated from species of Andean xerophytic formations? To answer these questions, was measured the abundance of bacteria present in the soils of *Azorella prolifera* and *Berberis empetrifolia* species, both present on contrasting slopes in the Nevados de Chillán volcanic complex. The most abundant bacteria were selected and isolated to evaluate the activity of different plant growth-promoting mechanisms: the activity of the enzyme nitrogenase, phosphatase, ACC deaminase, and the

phytohormone indoleacetic acid, which were compared between slopes. Subsequently, 4 abundant bacterial strains with the highest activity per mechanism corresponding to the genus *Arthrobacter* and *Pseudoarthrobacter* were selected to be bioencapsulated and inoculated in *Gomortega keule* plants under nursery conditions. The effect of inoculation under drought conditions on different indicators of survival, well-being, and growth of the inoculated plants was evaluated. PGBP (Log CFU g⁻¹) were more abundant in *B. empetrifolia* soils on the northern slope (6,43 Log CFU g⁻¹), while mechanisms do not have the same activity between slopes and their trends depend on the plant species. As for the bacterial inocula, no effect on the survival, welfare and growth of inoculated plants was observed. Further studies have to explore the microbiome associated with native plants to be inoculated, and that of commercial soils generally used in nursery programs, as this information would be relevant to predicting the interaction between inoculated and non-inoculated microorganisms.



INTRODUCCIÓN

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (del inglés, Plant Growth-Promoting Bacteria, PGPB) son un grupo diverso de microorganismos benéficos para las plantas, que poseen formas de vida libre o endófitas y habitan distintos compartimentos de la planta (Douza *et al.* 2015; Afzal *et al.* 2017). La promoción del crecimiento vegetal puede ocurrir de forma directa o indirecta a través de mecanismos que han sido ampliamente documentados (*e.g.* Gamalero & Glick, 2011; Ramakrishna *et al.* 2019) y que incluyen actividades enzimáticas y la producción de fitohormonas bacterianas (Glick, 2012). Entre los mecanismos más documentados se encuentran la fijación de nitrógeno, la solubilización de fosfatos, la producción de fitohormonas, los sideróforos y la actividad de enzimas como la ACC desaminasa, que promueven la resistencia a diferentes factores de estrés (*e.g.* sequía, Ashry *et al.* 2022; salinidad, Kumar *et al.* 2020, metales pesados, Kong & Glick, 2017). Las formas en las que opera cada mecanismo promotor del crecimiento son diversas. Por ejemplo, la enzima bacteriana nitrogenasa cataliza el nitrógeno molecular a amoníaco, que es absorbido por las plantas aumentando el rendimiento de los cultivos (Franche *et al.* 2009). Asimismo, bacterias con actividad enzimática ACC desaminasa pueden degradar el 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC, precursor del etileno) produciendo amoníaco y α -cetobutirato (Hontzeas *et al.* 2006). La disminución de los niveles de etileno permite a la planta sobrevivir en condiciones de estrés (como, sequía y salinidad) (Glick *et al.* 2007; Orozco-Mosqueta *et al.* 2021). Igualmente, la solubilización de fosfatos opera a través de la actividad de enzimas bacterianas como la fosfatasa, la fitasa y la liasa

C-P solubilizan el fosfato orgánico en fosfato inorgánico, que puede ser absorbido y utilizado para el metabolismo de las plantas (Rawat *et al.* 2020). También, fitohormonas como el ácido indol acético (IAA), producido por las bacterias estimulan la división celular de la planta, potenciando el crecimiento de las raíces y de las estructuras aéreas (Duca & Glick, 2020). A pesar de que la forma en que opera cada uno de estos mecanismos ha sido ampliamente estudiada, no ocurre lo mismo para los estudios relacionados a los factores que influyen en una mayor o menor actividad de cada uno.

Existen distintos factores controlados por la planta que determinan la abundancia y actividad de distintas PGPB. Entre estos factores bióticos, el exudado radicular de las plantas, rico en azúcares para el metabolismo microbiano, es uno de los factores que favorecen significativamente la actividad promotora del crecimiento y la interacción planta-PGPB (Bais *et al.* 2006). La liberación de exudados radiculares está sujeta a las condiciones abióticas a las que se exponen las plantas, como la disponibilidad de agua y nutrientes en el suelo y la temperatura ambiental (Hale & Moore, 1980). La composición de estos exudados radiculares puede favorecer la presencia y actividad de las PGPB, especialmente cuando las condiciones ambientales son estresantes para las plantas (Vives-Peris *et al.* 2018; Barbosa *et al.* 2020). Por ejemplo, en un trabajo realizado por Xiong *et al.* (2020) observaron que en condiciones de estrés salino la supervivencia de la planta *Limonium sinense* (Girard) Kuntze aumentaba cuando era inoculada con bacterias del género *Bacillus*, efecto que ocurría en respuesta al cambio en la composición de los exudados radiculares que favorecían la interacción. Considerando los antecedentes expuestos, donde los exudados radiculares pueden favorecer o

repeler a las PGPB en determinadas condiciones ambientales sería esperable que bajo condiciones de mayor estrés para las plantas la probabilidad de encontrar estos microorganismos sería mayor.

Los factores abióticos del suelo también pueden afectar al microbioma de las plantas. Por ejemplo, la composición química del suelo influye en la actividad de los mecanismos promotores del crecimiento vegetal (Kumar *et al.* 2020; Alemneh *et al.* 2022). En primer lugar, la fijación de nitrógeno se ve favorecida por el aumento de la disponibilidad de fósforo y carbono, pero disminuye en presencia de metales pesados (Liengen, 1999; Wakelin *et al.* 2010). Para la solubilización de fosfato, estudios como los de Mujahid *et al.* (2015) mencionan que el carbono y el nitrógeno del suelo potencian esta actividad, mientras que otros señalan que la solubilización de fosfato está correlacionada negativamente con el nitrógeno, el fósforo y el carbono (Alemneh *et al.* 2022). Con respecto a la producción de ácido indol acético (IAA), se menciona que esta se correlaciona positivamente con la presencia de triptófano y metales pesados y se relaciona negativamente con la disponibilidad de azúcares, nitrógeno y fósforo (Ahmad *et al.* 2005; Mendoza-Hernández *et al.* 2016; Alemneh *et al.* 2022). En cuanto a la actividad ACC-desaminasa, las bacterias aumentan su capacidad de desaminar ACC en presencia de metales pesados (Mendoza-Hernández *et al.* 2016). La temperatura y la humedad ambiental también se han definido como impulsores de la actividad promotora del crecimiento bacteriano (Rousk *et al.* 2010). La temperatura ideal para la solubilización del fosfato está por debajo de los 25°C (Mujahid *et al.* 2015), mientras que las temperaturas más altas junto con una mayor acidez del suelo aumentan la producción de IAA (Kanu & Dakora, 2009; Alemneh *et al.* 2022). La disponibilidad de agua, a su vez,

ha sido definida como un recurso indispensable para la actividad de las bacterias fijadoras de nitrógeno en climas fríos como la tundra ártica (Rousk *et al.* 2018). Si bien, cada grupo bacteriano posee requerimientos particulares que influyen en su abundancia y actividad, aún no se comprende del todo cómo esta variabilidad ambiental afecta a los microorganismos cuando provienen de un mismo sistema.

En general, la caracterización de las PGPB ha sido explorada en sistemas agrícolas, debido a la demanda alimentaria a nivel global (Bhattacharyya & Jha, 2012; Ramakrishna *et al.* 2019). Sin embargo, en los sistemas naturales con una menor proporción de estudios, se han encontrado PGPB con un gran potencial y novedad (Pérez-Jaramillo *et al.* 2018) especialmente en ambientes climáticamente limitantes. Por ejemplo, Sezen *et al.* (2016) aislaron bacterias de la rizósfera de distintas plantas silvestres de las regiones montañosas de Turquía, y posteriormente evaluaron distintos mecanismos promotores del crecimiento, que permitieron seleccionar seis aislados para inoculación en plantas de trigo, donde la totalidad de ellos tuvo un efecto positivo en el crecimiento de las plantas inoculadas. Así mismo, en el altiplano chileno, se aislaron bacterias con ACC desaminasa de la rizósfera de la planta nativa *Parastrephia quadrangularis* (Meyen) Cabrera, las cuales se inocularon en plantas de trigo y aumentaron su biomasa en condiciones de estrés salino (Acuña *et al.* 2019). En el desierto de Atacama también se han detectado una gran proporción de PGPB correspondientes a los taxones Actinobacteria y Proteobacteria en el microbioma rizosférico de plantas perennes como *Baccharis calliprinos* Griseb y *Solanum chilense* (Dunal) Reiche (Fuentes *et al.* 2020), y de otras efímeras como *Cistanthe longiscapa* (Barnéoud) Carolin ex Hershkovitz que sólo crecen durante los eventos del desierto florido (Astorga-Eló *et al.* 2020). Sin

duda la capacidad de las PGPB para crecer y promover el crecimiento vegetal en ambientes climáticamente limitantes para muchas formas de vida, fomentan su exploración para encontrar soluciones en la recuperación de suelos o producción de plantas.

Los sistemas alpinos representan un laboratorio natural para explorar la presencia y la actividad de los PGPB debido a las múltiples condiciones limitantes para la vida (Körner *et al.* 2004; Li *et al.* 2020; Rahman *et al.* 2020). En los sistemas alpinos, la temperatura, la radiación, la exposición y la precipitación varían con la estación, la altitud, la pendiente y la orientación (Körner & Ohsawa, 2005), produciendo una heterogeneidad espacial de las condiciones ambientales (Siles & Margesin, 2016; Körner, 2021), que puede afectar desde las respuestas fisiológicas individuales hasta la distribución y la estructura comunitaria de las plantas (Chaturvedi & Shivaji, 2006; Rumpf *et al.* 2018; López-Angulo *et al.* 2019; Sklenář *et al.* 2021). Dicha heterogeneidad ambiental se ha estudiado principalmente a lo largo de gradientes altitudinales y laderas contrastantes. En concreto, los suelos de las laderas orientadas al polo tienden a ser más húmedos, fríos y con mayor materia orgánica que los de las laderas orientadas al ecuador (Scherrer & Körner 2011). Estas diferencias ambientales entre laderas influyen en distintos aspectos de las plantas, por ejemplo, la floración que se adelanta 1-2 meses en la ladera norte respecto a la sur en Los Andes de Chile central (Rozzi *et al.* 1997). Así mismo, a nivel comunitario la mayor riqueza y cobertura de especies ocurre en las laderas con orientación polar (Tang *et al.* 2013; Måren *et al.* 2015; Viale *et al.* 2019; Yang *et al.* 2020). Mientras, los efectos de la heterogeneidad espacial sobre la diversidad vegetal han sido ampliamente explorada (e.g. Zeng *et al.* 2014; Yang *et al.* 2020),

para otros organismos como las PGPB ha sido casi inexplorada. Hasta la fecha, se sabe que la diversidad bacteriana disminuye con la altitud (Adamczyk *et al.* 2019), mientras que la abundancia relativa, especialmente en los psicrófilos de vida libre, aumenta con la elevación (Siles & Margesin, 2016; Rui *et al.* 2022).

Los PGPB nativos de los sistemas alpinos son de gran interés en la actualidad debido a su capacidad para hacer frente a las bajas temperaturas y promover el crecimiento de las plantas a través de diferentes mecanismos en condiciones de frío y suelos pobres en nutrientes (Chaturvedi & Shivaji, 2006; Jaggy *et al.* 2020; Farooq *et al.* 2022). Estas condiciones limitantes para las plantas pueden ser aliviadas por las PGPBs a través de la actividad de enzimas y fitohormonas que favorecen la absorción de nutrientes por parte de las plantas y la resistencia al estrés (Haselwandter *et al.* 1983; Widawati & Suliashi, 1970; Joshi *et al.* 2014; Yarzabal, 2014; Kadioglu *et al.* 2018; Pandey & Yarzabal, 2018; Fan *et al.* 2021). Algunos estudios han informado de la presencia de PGPB en ecosistemas alpinos (Yadav *et al.* 2015), han descrito su diversidad en términos de factores que estructuran las comunidades bacterianas (Rui *et al.* 2022; Tang *et al.* 2020; Wang *et al.* 2020) y han cuantificado su actividad promotora del crecimiento vegetal (Haselwandter *et al.* 1983; Widawati & Suliashi, 1970; Viruel *et al.* 2011; Yadav *et al.* 2015; Kadioglu *et al.* 2018). Aunque la interacción con microorganismos beneficiosos podría formar parte de la estrategia adaptativa de las plantas en sistemas de alta elevación (Farooq *et al.* 2022), falta información para comprender sobre su abundancia y actividad de PGPB en microhábitats climáticamente contrastantes.

En el altiplano chileno se han caracterizado comunidades bacterianas del suelo, con dos grandes particularidades: la primera referida a una proporción del 30% de especies nuevas y la segunda relacionada al potencial biotecnológico de las especies encontradas, entre ellas potenciales PGPB de los géneros *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Microbacterium*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Stenotrophonas* y *Streptomyces* (Maza *et al.* 2019). Por otro lado, en los Andes centrales de Chile se han aislado Alphaproteobacterias de la rizósfera de *Equisetum arvense* y de *Blechnum chilense*. Esta clase de bacterias incluye a distintos simbiontes que fijan nitrógeno, tales como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* y géneros dominantes como *Burkholderia*, donde algunas son PGPB (Jorquera *et al.* 2016). A su vez, Maldonado *et al.* (2022) caracterizaron el microbioma de *Hoffmannseggia doellii* Phil., una hierba perenne, que crece sobre los 2700 m en la cordillera norte de Chile, en suelos con baja disponibilidad hídrica y con déficit de nutrientes, detectando una gran proporción de microorganismos benéficos que además interactuaban de forma positiva con la planta hospedera. A pesar de estos reportes, que en su mayoría detectan microorganismos y los caracterizan a través de métodos de secuenciación, existen pocos estudios que midan la actividad de los distintos mecanismos promotores del crecimiento vegetal de bacterias asociadas a plantas presentes en ambientes climáticamente limitantes.

Las formaciones xerofíticas son un grupo de plantas nativas que se desarrollan en ambientes con limitaciones hídricas (Cabrera, 2002). En Chile, estas formaciones xerofíticas se distribuyen desde la zona norte en la región de Arica y Parinacota hasta la zona centro-sur en la región de Biobío de forma discontinua,

llegando a habitar zonas extremadamente áridas como el desierto de Atacama, hasta las zonas alpinas con grandes oscilaciones térmicas y sequía estival en la región de Biobío (Sáez, 2010). Las especies dominantes de estas formaciones son importantes para mantener la diversidad biológica en zonas degradadas por la erosión o la sequía, ya que mejoran las propiedades químicas del suelo y mantienen una mayor humedad bajo sus doseles, generando así microclimas propicios para el refugio de especies herbáceas nativas que tienen menor tolerancia a la escasez hídrica (Gutiérrez & Squeo, 2004; Pagano *et al.* 2012). A su vez, especies que componen estas formaciones, exhiben un gran potencial para la recuperación de suelos. Por ejemplo, especies como *Baccharis linearis* (Ruiz & Pav.) Pers. se ha reportado como una especie colonizadora en zonas de vertederos de relaves mineros, en ambientes como el desierto de Atacama y por ello, se ha utilizado en ensayos de recuperación de suelos a través de técnicas de fitoestabilización (Ginocho *et al.* 2021). Otras especies que también componen estas formaciones xerofíticas como *Escallonia illinita* C. Presl, *Muehlenbeckia hastulata* (Sm.) I.M. Johnst., *Proustia cuneifolia* D., *Fabiana imbricata* Ruiz & Pav. han sido estudiadas para la recuperación de suelos en taludes, teniendo excelentes resultados (Doll *et al.* 2013). Cabe destacar que, a pesar de la relevancia ecológica, sumada a la gran distribución y potencial para la restauración que poseen estas formaciones, han sido escasamente caracterizadas, aun cuando existen incentivos estatales que fomentan el estudio y recuperación de sus poblaciones (Ley de Bosque Nativo, 20.283, BCN, 2020).

La pérdida de biodiversidad en Chile, producto de múltiples factores bióticos y abióticos ha fomentado diversas prácticas de restauración ecológica en los últimos 35 años (Smith-Ramírez *et al.* 2015). Donde los esfuerzos por recuperar zonas degradadas no han sido suficientes para frenar la tasa de desertificación y pérdida de ecosistemas diversos con alto valor ecológico (Miranda *et al.* 2017; Braun *et al.* 2021), compuestos por especies emblemáticas y otras seriamente amenazadas en sus categorías de conservación (Hechenleitner *et al.* 2005). Se cree que las causas de estos resultados subyacen a que la oferta de especies nativas en viveros es escasa, y a que la mayoría de estas plantas no cumplen con los estándares mínimos de calidad para la reintroducción a sistemas naturales, obteniendo grandes pérdidas en el periodo de establecimiento que a su vez coincide con el periodo de mayor escasez hídrica (Bannister *et al.* 2018; Acevedo *et al.* 2021). Frente a este escenario, se ha vuelto necesario reforzar las prácticas de restauración a través de la utilización de especies nativas adaptadas a condiciones extremas como la sequía (Alvarez-Maldini *et al.* 2020). Así como también se ha propuesto crear herramientas que faciliten la transferencia tecnológica y de conocimiento a viveristas para favorecer la introducción de especies nativas a sistemas naturales (Acevedo *et al.* 2021). Probablemente, considerar el microbioma asociado a plantas nativas adaptadas a condiciones extremas podría ser la respuesta a este problema. Ya existen algunos trabajos al respecto como los de Molina-Montenegro *et al.* (2016), que evaluaron el aumento del efecto nodriza de la especie *Porlieria chilensis* I.M. Johnst. cuando se consideraba su microbioma asociado. Por lo cual, es muy probable que la consideración de especies nativas adaptadas a condiciones

climáticas limitantes con sus microbiomas asociados podría ser la respuesta a las limitantes en la restauración ecológica en Chile.

El complejo volcánico Nevados de Chillán, es una zona de transición climática mediterránea - templada (Arroyo *et al.* 2004), caracterizada por una topografía compleja (González-Ferrán 1995; Dixon *et al.* 1999), con una gran diversidad vegetal y endemismo (Rodríguez *et al.* 2008). Esta zona se encuentra emplazada en el corredor biológico Nevados de Chillán - Laguna del Laja creado bajo la categoría de Reserva de la Biósfera (San Martín, 2014). La parte inferior del cinturón vegetacional alpino está dominada por vegetación xerófitas, donde se ubican una de las formaciones xerofíticas más australes de Chile (Squeo *et al.* 2008). Las formaciones xerofíticas “andinas” de esta zona enfrentan la escasez hídrica estival y las bajas temperaturas propias del sistema alpino a través de un despliegue especializado de estrategias (Cabrera, 2002; Larcher *et al.* 2010). Sin embargo, lo que hasta la fecha no se sabe es si parte de esta adaptación a condiciones climáticamente limitantes podría estar siendo complementada por la interacción benéfica con PGPBs. Se cree que formaciones xerofíticas andinas pueden tener un microbioma modelo para el estudio del impacto de la variabilidad ambiental de la montaña en la abundancia y actividad de las PGPB, siendo un excelente punto de partida para relevar la importancia de estas interacciones, comprendiendo que su estudio puede permitir elaborar herramientas biotecnológicas para asistir a otras especies de plantas nativas a través de prácticas de restauración.

a. Preguntas, hipótesis, objetivos.

Preguntas de investigación:

- i. ¿Existen diferencias en la abundancia y en la actividad promotora del crecimiento vegetal de bacterias asociadas a plantas de las formaciones xerofíticas andinas que crecen en laderas opuestas?
- ii. ¿Cuáles son los efectos en la supervivencia, desempeño y crecimiento de plantas nativas expuestas a sequía cuando son inoculadas con PGPB asociadas a especies de formaciones xerofíticas andinas?



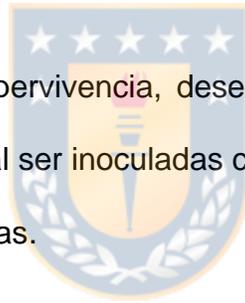
Hipótesis:

- i. La abundancia y actividad promotora del crecimiento vegetal de diferentes bacterias asociadas a plantas de formaciones xerofíticas andinas será mayor en la ladera con condiciones climáticas más limitantes.
- ii. Las plantas inoculadas con consorcios de PGPB asociadas a plantas de formaciones xerofíticas andinas presentarán una mayor supervivencia, desempeño y crecimiento bajo condiciones de sequía que plantas sin inocular.

Objetivo General: Estudiar la abundancia y la actividad promotora del crecimiento vegetal de diferentes cepas de PGPB asociadas a dos plantas de formaciones xerofíticas andinas en laderas opuestas y evaluar su potencial para favorecer la supervivencia, desempeño y crecimiento de especies nativas en condiciones de sequía.

Objetivos específicos

1. Determinar cómo varía la abundancia y actividad de bacterias asociadas a dos especies vegetales de formaciones xerofíticas andinas que crecen en laderas opuestas.
2. Evaluar diferencias en la supervivencia, desempeño y crecimiento de plantas nativas expuestas a sequía, al ser inoculadas con PGPB asociadas a plantas de formaciones xerofíticas andinas.



OBJETIVO ESPECÍFICO 1. Determinar cómo varía la abundancia y actividad de bacterias asociadas a dos especies vegetales de formaciones xerofíticas andinas que crecen en laderas opuestas.

METODOLOGÍA

El área de estudio se encuentra a 70 km al este de la ciudad de Chillán, en la región de Ñuble, Chile, en el sector de Fumarolas de Nevados de Chillán (36°55'15"S, 71°26'25"O). Es un sistema de origen volcánico, donde existe una fuerte influencia del clima de transición mediterráneo (Armesto & Martínez, 1978). La vegetación está compuesta por elementos esclerófilos y bosques templados perennifolios, con una flora altamente endémica (Rodríguez *et al.* 2008). Según los datos de las estaciones meteorológicas de las estaciones de las Trancas y Nevados de Chillán se sabe que las precipitaciones anuales sobrepasan los 2000 mm, con estaciones secas en verano con precipitaciones que no superan los 25 mm entre los meses diciembre y febrero, mientras que las temperaturas durante la temporada de crecimiento de las plantas pueden fluctuar entre 0°C y 23°C (DGA, 2022). En general, los ambientes de estos sistemas alpinos están influenciados por dos componentes extremos dentro del gradiente altitudinal: escasez hídrica y fluctuación térmica. En las zonas bajas, el déficit hídrico es uno de los factores abióticos más limitantes para las plantas, donde dominan las especies de arbustos esclerófilos de hoja pequeña, caducifolios y perennes, que conforman las formaciones xerofíticas (Cabrera, 2001). Las asociaciones dominantes de interés donde están presentes las formaciones xerofíticas en nuestra área de estudio ocurren entre *Adesmia emarginata*-*Pozoa*

coriacea, *Adesmia emarginata*-*Berberis empetrifolia*, *Adesmia emarginata*-*Loasa lateritia*, *Chusquea culeou*-Coironales (Pfanzelt *et al.* 2008). En el área de Las Fumarolas, hay 2 laderas que tienen orientación opuesta: Ladera de exposición norte (36°54'24.25"S 71°24'10.16"O), a una altitud de 1.984 msnm y ladera de exposición sur (36°54'16.90"S 71°23'58.83"O) a 2.089 m sobre el nivel del mar (Figura 1a y b). La utilidad de estas laderas fue confirmada con la información existente sobre la presencia de las especies reconocidas dentro de las formaciones xerofíticas.

Selección de especies

Con el apoyo del listado de flora registrado para el sector de Nevados de Chillán (Rodríguez *et al.* 2008), una preselección de especies en base a los registros de colecta del herbario de la Universidad de Concepción (CONC) y el conocimiento previo del área, se seleccionaron 2 especies de formaciones xerofíticas andinas localmente abundantes. Se consideraron especies arbustivas dominantes y abundantes en ambas laderas (norte y sur). Las especies seleccionadas fueron *Azorella prolifera* (Cav.) G.M. Plunkett & A.N. Nicolas (Apiaceae) y *Berberis empetrifolia* Lam. (Berberidaceae). *A. prolifera* es un arbusto y subarbusto que puede formar cojines de hasta 100 cm de alto, de color verde-amarillento y a veces glauco, muy aromático, sus hojas son pecioladas y miden hasta 0,5 cm de largo, numerosas y alternas, con folíolos triangulares a subulados, cilíndricos o planos, duros y punzantes, sus flores son amarillas, hermafroditas al centro y masculinas en el borde, dispuestas en umbelas simples que sobresalen por sobre el follaje, su

fruto es un esquizocarpo alado amarillo-rojizo (Fernández & Calviño, 2019). *B. empetrifolia* es un arbusto de baja estatura, espinoso, de hasta 500 cm de altura, de espinas tripartidas, y hojas pecioladas a subsésiles, dispuestas en fascículos, coriáceas, mucronadas, la sección transversal se redondea por encima con un surco profundo por debajo, sus flores son solitarias y amarillas, su fruto es una baya subglobosa de color violeta a negruzca, de sabor agri dulce (Landrum *et al.* 1999). Tanto *A. prolifera* como *B. empetrifolia* especies que logran importantes asociaciones para el reclutamiento (Nuñez *et al.* 1999; Rodríguez *et al.* 2008) y presentan resistencia a diferentes tipos de estrés (Durante *et al.* 2011; Golluscio *et al.* 2011; Varas *et al.* 2013; Sierra-Almeida *et al.* 2016). Las laderas y especies seleccionadas se muestran en la Figura 1 (Figura 1c y d).



Figura 1. Sitio de estudio ubicado en el complejo volcánico Nevados de Chillán. Letras a. y b. indican las laderas norte y sur respectivamente. Las especies seleccionadas presentes en ambas laderas se indican en el costado derecho: c. *A. prolifera* y d. *B. empetrifolia*.

Caracterización microclimática de las laderas

Se caracterizó el microclima de las laderas norte y sur en base a las condiciones térmicas e hídricas que imperan durante el período libre de nieve. En cada ladera se instalaron tres sensores de temperatura del aire (°C) y humedad relativa (%), a 15 cm sobre el nivel del suelo (U23 Hobo Pro v2 6', Onset Comp, USA) y se programaron para registrar cada 30 minutos durante la temporada de crecimiento. Para la ladera norte, los sensores se instalaron el 28 de octubre (2021), mientras que para la ladera sur se instalaron el 2 de diciembre, producto de la nieve presente antes de esta fecha. Los datos de humedad se utilizaron para calcular la humedad media, máxima y mínima. El registro de la temperatura del aire se utilizó para estimar los grados-día de crecimiento (GDDs; McMaster y Wilhelm, 1997), la amplitud térmica, extremas, frecuencia y duración de los eventos de temperaturas extremas. Los GDD se utilizaron como una medida de la acumulación de calor (en °C) por encima de una temperatura base (es decir, 0°C) para representar un índice de la energía acumulada disponible para las plantas en crecimiento, que se calculada como:

$$GDD_0 = \left[\frac{(temperatura\ máxima\ diaria + temperatura\ mínima\ diaria)}{2} \right] - temperatura\ base$$

Las GDD diarias se sumaron para toda la temporada de crecimiento en cada ladera. Utilizamos 0°C como temperatura base por encima de la cual las plantas realizan sus funciones metabólicas, las plantas de clima frío varían en su temperatura base de crecimiento absoluta, y este valor abarca esta variabilidad (Körner, 2011).

La temperatura y potencial hídrico del suelo se registraron mediante el uso de psicrómetros (PST-55, C52 Wescor Inc., Utah, Estados Unidos), que se instalaron a 15 cm de profundidad del suelo ($n = 3$ por pendiente). Estos sensores se enterraron en la misma fecha que los sensores de aire. La temperatura y la humedad del suelo se registraron manualmente una vez al mes con un microvoltímetro (HR 33T; Wescor Inc., Utah, EE.UU.). En abril no se realizaron mediciones de la temperatura y el potencial hídrico del suelo porque el suelo se cubrió de nieve el día de monitoreo. Todos los sensores se retiraron de las dos laderas 19 de abril de 2022.

El 8 de abril de 2021, se tomaron muestras de suelo bajo la cubierta vegetal para su caracterización química. Un total de doce muestras de suelo de 1 kg (3 réplicas x 2 especies x 2 ladera) fueron colocadas en bolsas de plástico, marcadas, y transportadas al Laboratorio de Microbiología de Suelos de la Universidad de Concepción (Concepción). Luego, las muestras de suelo fueron enviadas para su análisis químico completo al Laboratorio de Análisis de Suelos y Plantas de la Universidad de Concepción en Chillán.

Abundancia bacteriana

En cada ladera, se colectó el suelo que rodea las raíces de cinco individuos de *A. prolifera* y cinco individuos de *B. empetrifolia*, separados por al menos 2 m de distancia (5 réplicas x 2 especies x 2 laderas, $n = 20$). Las muestras de suelo se tomaron en condiciones estériles con guantes, desinfectante y equipo esterilizado con alcohol al 70%. Las muestras fueron rotuladas y guardadas por 8 horas en

neveras para el traslado al Laboratorio de Microbiología de Suelos en la Universidad de Concepción, donde fueron almacenadas a -20°C inmediatamente y hasta el inicio de las pruebas microbiológicas de abundancia y actividad.

Para determinar la abundancia bacteriana de PGPB asociadas a las especies *A. prolifera* y *B. empetrifolia* en las laderas norte y sur, 1 g de cada muestra de suelo, proveniente del suelo circundante a las raíces, se diluyó en serie en 9 ml de medio PBS, en condiciones estériles. Las diluciones de 10^{-2} y 10^{-3} se sembraron en placas con medio de agar para recuento en placa (Plate count, DIFCO) y se incubaron durante dos días a 25°C . Luego, se contaron las colonias presentes en las placas y se transformaron a Unidades Formadoras de Colonias (UFC) y posteriormente a su logaritmo natural (Log UFC g^{-1}).



Identificación de los aislados bacterianos mediante el estudio del gen 16S rRNA

Una vez contabilizadas las colonias cultivables bacterianas en medios sólidos, se seleccionaron las 10 cepas más abundantes morfológicamente distintas según su apariencia en lupa. Las colonias bacterianas se cultivaron en un medio semisólido TBS. Se realizaron extracciones de ADN de colonias individuales utilizando el kit DNeasy® Plant Mini (QIAGEN, Dusseldorf, Alemania) según las instrucciones del fabricante. Se visualizó la integridad de las muestras de ADN en electroforesis en gel de agarosa y se determinó la concentración por espectrofotometría (A_{260}/A_{280}) utilizando Infinite® M200 Pro NanoQuant (Tecan®, Tecan Trading AG, Suiza) y las muestras de ADN se mantuvieron a -20°C .

La PCR se llevó a cabo para amplificar y secuenciar parte del gen 16S rRNA. Las reacciones de PCR contienen 1X tampón de reacción GoTaq® (1,5 mM MgCl₂), 200 μM de dNTP, 0 2 μM de cada cebador (16S_27F; 5'-AGAGTTTGATCCTGCTCAG-3' y 16S_805R; 5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'), 1 U de GoTaq ADN Polimerasa (Promega, Madison, EEUU), 20 ng/μl de ADN y se llenó hasta 20 μl con agua de grado molecular filtrada y estéril. Las condiciones térmicas se lograron con un ciclo a 94 °C durante 3 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización del ADN a 94 °C durante 60 s, recocido de cebadores a 45 °C durante 40 s y elongación del ADN a 72 C durante 60 s, y una extensión final a 72 °C durante 7 min. Los productos de la PCR se corrieron en geles de agarosa al 1% (p/v) con SYBR Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific, Inc., Carlsbad, CA) en un tampón TAE a 80 V durante 45 min. Los amplicones se fotografiaron en un transiluminador de luz UV. Los fragmentos de ADN amplificados se purificaron y se secuenciaron directamente en ambas direcciones (Macrogen, Seúl, Corea del Sur). Los análisis de las similitudes entre las secuencias se llevaron a cabo con la herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLAST, NCBI) y luego se compararon en línea en busca de homologías con otras secuencias de la base de datos del Instituto Europeo de Bioinformática (EBI, Cambridge, Reino Unido). Se construyó un árbol filogenético utilizando el programa Seaview 4.0 con el método de unión de vecinos para determinar las relaciones filogenéticas con otras bacterias anotadas relacionadas. El árbol de consenso resultante se construyó utilizando 1000 réplicas.

Actividad de los mecanismos promotores del crecimiento vegetal

Se seleccionaron 19 cepas más abundantes y morfológicamente diferentes para evaluar la actividad de los distintos mecanismos promotores del crecimiento vegetal. Cada una de las cepas asociadas a *A. proliferans* o *B. empetrifolia* en la ladera norte o sur, se aislaron en medio sólido (Plate count, DIFCO) y se incubaron durante 12 a 18 horas en medio TBS líquido. Luego se almacenaron en glicerol a -20°C hasta la realización de los ensayos que evaluaron la actividad promotora del crecimiento vegetal de las bacterias. Antes de cada ensayo que evaluó cada mecanismo promotor del crecimiento vegetal, todas las cepas aisladas fueron activadas en medio TBS líquido a 28°C durante 18 horas a 120 rpm.

Los mecanismos promotores del crecimiento vegetal evaluados comprendieron 1 de carácter fitohormonal y 3 enzimáticos, todos estos mecanismos se evaluaron en las 19 cepas seleccionadas. Para evaluar la producción de la fitohormona **ácido indol acético (IAA)**, las cepas seleccionadas cultivables se inocularon en caldo nutritivo genérico (1 gr D-(+)-glucosa, 15 g de peptona, 6 g de NaCl, 3 gr de extracto de levadura), con 0,15% (p/v) de triptófano en la oscuridad durante 96 h a 30°C con 120 rpm, la producción de IAA se midió mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC; Primaide, Hitachi Co, Ltd., Tokio, Japón) (Gang *et al.* 2019) en el Laboratorio Bioactivos en Plantas e Ingredientes Vegetales de la Facultad de Agronomía (Universidad de Concepción). La curva de calibración se preparó con soluciones seriadas de ácido indol acético que iban de 0 a 50 ppm en metanol, se inyectaron 50 µl de las muestras en una columna kromasil C-18 equipada con un detector de matriz de diodos, y los tiempos de retención

oscilaron entre 5,7 min y 7,9 min todas las muestras se analizaron por triplicado. Los resultados fueron expresados en $\mu\text{g ml}^{-1}$ de IAA bacteriano.

Para determinar evaluar el mecanismo enzimático promotor del crecimiento vegetal **ACC-desaminasa**, se siguió el protocolo de Senthilkumar *et al.* (2021) y Penrose & Glick (2003) con modificaciones. Se preparó un medio de cultivo mínimo DF líquido, donde se inocularon las bacterias de interés a 28°C durante 72 horas; las bacterias que mostraron turbidez se sembraron en un medio mínimo DF sólido para confirmar la presencia de ACC-desaminasa. En los cultivos que evidenciaron crecimiento en placa en medio DF sólido, la actividad enzimática de la ACC desaminasa se midió por la producción de α -cetobutirato, que se determinó mediante espectrofotómetro (Spectroquant Prove 300) a 540 nm por comparación con la curva estándar de α -cetobutirato, que oscilaba entre 0 y 100 μM (Honma & Shimomura, 1978). Las concentraciones más altas de α -cetobutirato fueron indicadoras de una mayor actividad enzimática (Ali *et al.* 2014).

La actividad de la **enzima fosfatasa** se evaluó a través del índice de solubilización de fosfato. Los cultivos bacterianos se sembraron en medio sólido PVK a 28°C para determinar el índice de solubilización de fosfato mediante la formación de un halo que se midió y calculó según Senthilkumar *et al.* (2021), las muestras se analizaron por triplicado.

Para determinar la capacidad de las bacterias aisladas para fijar nitrógeno se midió la actividad de la **enzima nitrogenasa** a través del ensayo de reducción de acetileno en el Laboratorio de Química de Productos Naturales (Universidad de Concepción). Las 19 cepas seleccionadas se incubaron en un medio NFK

semisólido sin nitrógeno durante 72 horas a 28°C. En las muestras que mostraron indicios de turbidez se eliminó el 10% de la atmósfera con una jeringa y se sustituyó por acetileno. Después de 20 horas, se tomaron 4,4 ml de gas de cada vial para analizar la cantidad de etileno formada mediante cromatografía de gases. El proceso de inyección se realizó en el cromatógrafo de gases GC 6890N (Agilent Technologies) equipado con columna GC J&W HP-5, 30 m, 0,25 mm, 0,25 µm, detectores de H₂, N₂ y aire, con caudales de 40, 24 y 450 ml /min respectivamente. Las temperaturas de inyección fueron de 150 °C, de detección de 150 °C y de columna de 50 °C. Los tiempos de retención oscilaron entre 1 y 1,5 min. Cada muestra se midió por triplicado. Se inyectaron 4,5 ml por 10 min para cada muestra. La curva de calibración se preparó con soluciones compuestas por diferentes concentraciones de etileno expresadas en nmol C₂H₄ d⁻¹vial⁻¹.



Análisis estadístico

Las diferencias en los parámetros de temperatura y humedad relativa entre laderas se realizaron con pruebas t o equivalentes no paramétricos. Las diferencias de medias para las características químicas de los suelos entre laderas se compararon también mediante pruebas t o su equivalente no paramétrico ($p \leq 0,05$). Las diferencias en la frecuencia de heladas y calor entre laderas se evaluaron con χ^2 . Las diferencias entre laderas para la temperatura y humedad del suelo fueron evaluadas con ANOVA de medidas repetidas ($p \leq 0,05$). Las diferencias en abundancia de PGPB como la actividad de los mecanismos promotores del

crecimiento vegetal de *A. prolifera* y *B. empetrifolia* entre laderas se evaluaron usando pruebas no paramétricas de Wilcoxon ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS

Caracterización climática de las laderas

La ladera norte fue potencialmente más extrema que la ladera sur, según los datos microclimáticos obtenidos durante el periodo completo sin nieve (Tabla 1). Aunque la temperatura media del aire fue similar entre laderas ($t = 0,02$, $p = 0,985$), los GDD₀ fue un 22% mayor ($\chi^2 = 3133$, $p < 0,0001$) y la amplitud térmica fue 3,9°C mayor ($t = 7,3$, $p < 0,001$) en la ladera norte que en la ladera sur. Además, se observaron diferencias considerables en las temperaturas extremas (Tabla 1). Por ejemplo, la temperatura mínima media fue menor en la ladera norte que en la ladera sur (2,5°C \pm 0,2 frente a 4,3°C \pm 0,2, $t = 4,2$, $p < 0,0001$). La intensidad de las heladas fue de -2,4°C de media en ambas laderas ($t = 0,11$, $p = 0,74$), pero su frecuencia fue 2,4 veces mayor en la ladera norte que en la sur ($\chi^2 = 10,7$, $p = 0,001$), con una temperatura mínima de -9,9°C registrada el 4 de noviembre, mientras la ladera sur estaba cubierta de nieve. La duración de las heladas fue un 25% mayor en la ladera sur que en la ladera norte ($t = 5$, $p = 0,028$), pero en ambos micrositios duraron al menos 4 horas (Tabla 1). En el otro extremo, la temperatura media máxima del aire fue 2,2°C mayor en la ladera norte que en la ladera sur (Tabla 1, $Z = 2,86$, $p = 0,004$). En la ladera norte, los eventos de calor fueron 1,8 veces más frecuentes ($\chi^2 = 9,8$, $p = 0,002$), 1,3 veces más largos ($Z = 2,3$, $p = 0,022$) y 1,3°C más calientes ($Z = 2,5$, $p = 0,011$) que en la ladera sur. Además, sólo se registraron eventos de calor con

temperaturas superiores a los 40°C en la ladera norte (Tabla 1). En cuanto a la humedad relativa del aire (HR), fue en promedio 51% y similar para ambas laderas ($t = 2,7$, $p = 0,077$), pero la HR mínima fue 6,5% menor ($t = 3,9$, $p = 0,001$) y la HR máxima fue 4% mayor ($t = 2,1$, $p = 0,034$) en la ladera norte que en la sur.

Tabla 1. Condiciones térmicas y de humedad del aire medidas en dos laderas contrastantes de la zona alpina del complejo volcánico Nevados de Chillán. Los valores corresponden a la media \pm EE ($n = 3$) para todo el período sin nieve entre el 28 de octubre de 2021 y el 19 de abril de 2022. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las temperaturas extremas se muestran entre paréntesis como valores absolutos.

| Variable | Ladera Norte | Ladera Sur |
|--|------------------------------------|------------------------------------|
| Periodo sin nieve (d) | 174 | 140 |
| Temperatura media (°C) | 11,9 \pm 0,1 ^a | 12,3 \pm 0,1 ^a |
| GDD ₀ (°C día ⁻¹) | 2363.4 \pm 153 ^a | 1846.8 \pm 78.5 ^b |
| Amplitud térmica (°C) | 22.1 \pm 0.3 ^a | 18.2 \pm 0.3 ^b |
| Temperatura mínima (°C) | 2.6 \pm 0.2 ^a | 4.3 \pm 0.2 ^b |
| Intensidad de congelación (°C) | -2,5 \pm 0,2 ^a [-9,9] | -2,3 \pm 0,3 ^a [-6,6] |
| Duración de la congelación (h) | 4.1 \pm 0.3 ^a | 5.5 \pm 0.6 ^b |
| Frecuencia de congelación (%) | 29.3 ^a | 11.4 ^b |
| Temperatura máxima (°C) | 24.6 \pm 0.4 ^a | 22.5 \pm 0.6 ^b |
| Intensidad térmica (°C) | 33,5 \pm 0,3 ^a [41,3] | 32,2 \pm 0,2 ^b [35,8] |
| Duración del calor (°C) | 3.2 \pm 0.2 ^a | 2.4 \pm 0.3 ^b |

| | | |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Frecuencia de calentamiento (%) | 48,9 ^a | 27,9 ^b |
| Humedad relativa media (%) | 51,9 ± 0,2 ^a | 51 ± 0,3 ^a |
| Humedad relativa mínima (%) | 21,9 ± 0,6 ^a | 28,4 ± 1,2 ^b |
| Humedad relativa máxima (%) | 84 ± 0,6 ^a | 80,4 ± 1,3 ^b |

* En la ladera norte, la congelación se produjo el 4 de noviembre de 2021, mientras que el calor se produjo el 17 de enero de 2022; en la ladera sur, el calor se produjo el 8 de febrero y la congelación el 3 de abril de 2022.

La temperatura del suelo fue similar en las laderas norte y sur (Figura 2, Ladera, $F_{1,4} = 0.5$, $p = 0.519$), con variaciones que se documentaron a lo largo de toda la estación de crecimiento (Figura 2, Fecha, $F_{2,8} = 15,3$, $p = 0,002$). Por el contrario, la humedad del suelo disminuyó en la ladera norte desde -0,68 MPa en diciembre a -1,96 MPa en marzo y fue 2,2 veces mayor que en la ladera sur (fecha x ladera, $F_{2,8} = 9,3$, $p = 0,008$). En abril no se realizaron registros porque la nieve cubrió los sensores.

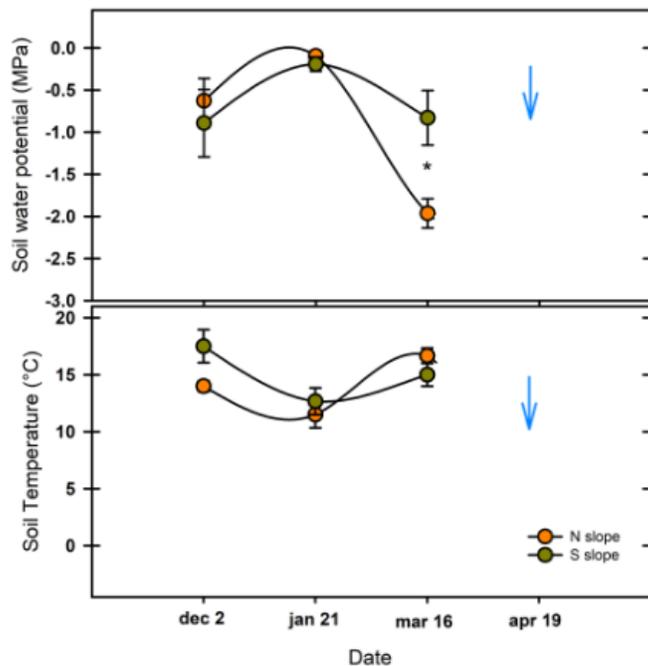


Figura 2. Condiciones climáticas del suelo medidas en dos laderas contrastantes del complejo volcánico Nevados de Chillán. a. El potencial hídrico (MPa) y la b. Temperatura del suelo (°C) fueron medidos a 15 cm de profundidad del suelo en dos laderas contrastantes. Los valores corresponden a la media \pm EE (n = 3). Las flechas azules indican las nevadas. Los asteriscos muestran diferencias significativas (ANOVA de medidas repetidas, $p < 0,05$).

Las propiedades químicas de los suelos bajo el dosel de *A. prolifera* y *B. empetrifolia* y entre laderas presentaron diferentes patrones, especialmente en los micronutrientes (Tabla 2). Independiente de la especie, los suelos de la ladera norte tuvieron mayor saturación de Ca (Especie x Ladera, $H_{3,12}=9,46$, $p = 0,02$). En cuanto a las diferencias entre especies, encontramos diferencias marginales en el pH del suelo, donde estos fueron más alcalinos en los suelos de *A. prolifera* que en *B. empetrifolia* (Especie x Ladera, $H_{3,12} = 8,43$, $p = 0,04$). Mientras que la saturación

de Al fue marginalmente mayor para los suelos de la especie *B. empetrifolia* que los de *A. prolifera* (Especie x Ladera, $H_{3,12}=9,25$, $p=0,04$). A su vez, el intercambio de Al fue marginalmente mayor en los suelos de *B. empetrifolia* (Especie x Ladera, $H_{3,12}=9,04$, $p=0,04$). Los suelos de *A. prolifera* en la ladera norte tuvieron las menores concentraciones de materia orgánica en comparación con los otros suelos (Especie x Ladera, $H_{3,12}=9,15$, $p=0,04$). El K disponible, alcanza sus extremos en los suelos de *A. prolifera* donde fue un tercio menor en la ladera norte en comparación con los suelos de la ladera sur de la misma especie y los suelos de *B. empetrifolia* (Especie x Ladera, $H_{3,12}=8,43$, $p=0,04$), mientras que en la ladera sur de la misma especie se alcanzaron las concentraciones más altas de este nutriente (Especie x Ladera, $H_{3,12}=8,43$, $p=0,04$). El S disponible por su parte fue 8 veces mayor en la ladera sur de la especie *A. prolifera* en comparación con los suelos de la ladera norte de la misma especie y los suelos de *B. empetrifolia* (Especie x Ladera, $F_{1,4}=12,94$, $p=0,001$). En cuanto a la saturación de K, en la ladera norte bajo *A. prolifera* tuvo las concentraciones más bajas con respecto a la ladera sur de la misma especie y los suelos de *B. empetrifolia* (Especie x Ladera, $H_{3,12}=9,25$, $p=0,04$), mientras que en la ladera sur, los suelos de *B. empetrifolia* alcanzaron la mayor saturación de K con respecto a los otros suelos (Especie x Ladera, $H_{3,12}=9,35$, $p=0,04$). La saturación de Mg fue casi el doble mayor en la ladera norte en los suelos de *B. empetrifolia*, con respecto a la ladera sur de la misma especie y los suelos de *A. prolifera* (Especie x Ladera, $F_{1,4}=4,81$, $p=0,02$).

Tabla 2. Caracterización química de los suelos bajo el dosel de las especies *A. prolifera* y *B. empetrifolia*, ubicadas en las laderas norte y sur en el complejo volcánico Nevados de Chillán. Los valores representan la media + EE (n = 3). Las letras diferentes indican diferencias significativas entre las laderas (prueba T o equivalente no paramétrico, $p \leq 0,05$).

| Propiedades químicas del suelo | <i>Azorella prolifera</i> | | <i>Berberis empetrifolia</i> | |
|--|---------------------------|---------------------------|------------------------------|--------------------------|
| | Ladera norte | Ladera sur | Ladera norte | Ladera sur |
| pH al agua | 6,36 ± 0,07 ^a | 6,32 ± 0,27 ^a | 5,34 ± 0,07 ^b | 5,32 ± 0,09 ^b |
| Materia orgánica (%) | 0,85 ± 0,19 ^a | 1,87 ± 0,14 ^{bc} | 2,48 ± 0,22 ^b | 1,63 ± 0,05 ^c |
| Nitratos (N-NO ₃) (mg kg ⁻¹) | 2,8 ± 0,40 ^a | 2,27 ± 1,45 ^a | 4 ± 1,25 ^a | 8,43 ± 2,24 ^a |
| Amonio (N-NH ₄) (mg kg ⁻¹) | 1,8 ± 0,36 ^a | 1,3 ± 0,15 ^a | 2,7 ± 0,32 ^a | 1,7 ± 0,21 ^a |
| Nitrógeno disponible (mg kg ⁻¹) | 4,63 ± 0,12 ^a | 3,57 ± 1,58 ^a | 6,7 ± 1,33 ^a | 10,1 ± 2,37 ^a |
| Fósforo Olsen (mg kg ⁻¹) | 4,27 ± 1,72 ^a | 3,93 ± 0,44 ^a | 4,27 ± 1,07 ^a | 3,93 ± 0,21 ^a |
| K disponible (mg kg ⁻¹) | 53,5 ± 20,9 ^a | 162 ± 3,61 ^b | 150 ± 25,8 ^{bc} | 97,9 ± 18,6 ^c |
| K intercambiable (cmol kg ⁻¹) | 0,22 ± 0,03 ^a | 0,41 ± 0,01 ^a | 0,39 ± 0,06 ^a | 0,25 ± 0,05 ^a |

| | | | | | |
|------------------------------------|-----------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Ca intercambiable | | 14,6 ± 2,67 ^a | 12,2 ± 3,38 ^a | 9,53 ± 3,44 ^a | 1,22 ± 0,18 ^a |
| (cmol kg⁻¹) | | | | | |
| Mg intercambiable | | 1,44 ± 0,37 ^a | 1,24 ± 0,46 ^a | 2,98 ± 1,27 ^a | 0,26 ± 0,05 ^a |
| (cmol kg⁻¹) | | | | | |
| Na intercambiable | | 0,06 ± 0,02 ^a | 0,03 ± 0,01 ^a | 0,04 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 |
| (cmol kg⁻¹) | | | | 3 ^a | 3 ^a |
| Suma de bases | | 16,3 ± 2,79 ^a | 13,8 ± 3,65 ^a | 12,9 ± 4,78 ^a | 1,76 ± 0,28 ^a |
| (cmol kg⁻¹) | | | | | |
| Intercambio | Al | 0,14 ± 0,09 ^a | 0,08 ± 0,05 ^a | 1,44 ± 0,34 ^b | 0,47 ± 0,13 ^c |
| (cmol kg⁻¹) | | c | | | |
| CICE (cmol kg⁻¹) | | 16,5 ± 2,72 ^a | 13,9 ± 3,6 ^a | 14,4 ± 5,02 ^a | 2,23 ± 0,38 ^a |
| Saturación de Al (%) | | 1,09 ± 0,81 ^a | 1 ± 0,79 ^a | 10,9 ± 2,4 ^b | 20,9 ± 3,81 ^b |
| Saturación de K (%) | | 1,37 ± 0,1 ^a | 3,57 ± 1,15 ^b | 3,02 ± 0,54 ^b | 11,2 ± 0,21 ^c |
| Saturación de Ca | | 88 ± 3,58 ^a | 85,8 ± 3,82 ^a | 66 ± 1,24 ^b | 55 ± 3,48 ^b |
| (%) | | | | | |
| Saturación de Mg | | 9,08 ± 2,6 ^a | 9,34 ± 2,4 ^a | 19,7 ± 1,53 ^b | 11,5 ± 0,49 ^a |
| (%) | | | | | |
| S disponible (mg/kg) | | 0,97 ± 0,5 ^a | 8,83 ± 1,36 ^b | 1,93 ± 0,37 ^a | 3,97 ± 0,63 ^a |
| Fe (mg kg⁻¹) | | 8,2 ± 1,36 ^a | 15,3 ± 5,13 ^a | 18,3 ± 2,27 ^a | 10,2 ± 0,31 ^a |
| Mn (mg kg⁻¹) | | 1,83 ± 0,3 ^a | 3,53 ± 0,13 ^a | 2,57 ± 1,07 ^a | 1,5 ± 0,47 ^a |
| Zn (mg kg⁻¹) | | 0,17 ± 0,03 ^a | 0 ± 0 ^a | 0,1 ± 0 ^a | 0,17 ± 0,03 ^a |
| Cu (mg kg⁻¹) | | 0,6 ± 0,12 ^a | 1,27 ± 0,38 ^a | 0,67 ± 0,09 ^a | 0,4 ± 0 ^a |
| B (mg kg⁻¹) | | 0,13 ± 0,03 ^a | 0,23 ± 0,03 ^a | 0,1 ± 0 ^a | 0,13 ± 0,03 ^a |

Abundancia bacteriana

La abundancia bacteriana varió entre laderas sólo para los suelos de la especie *B. empetrifolia*, siendo un 6,3% mayor en la ladera norte que en la sur (Figura 3b, Ladera, $F_{1,18} = 0,59$, $p = 0,031$). Los suelos de la especie *A. prolifera* no existieron diferencias en la abundancia bacteriana entre las laderas (Figura 3a, Ladera, $F_{1,18} = 2,38$, $p = 0,16$).

Abundancia bacteriana

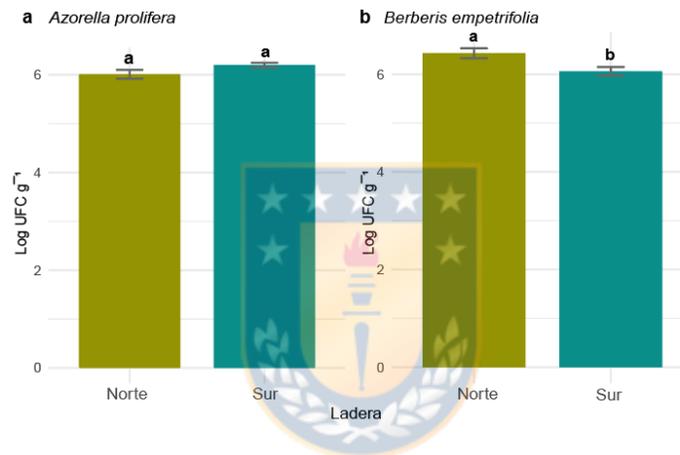


Figura 3. Abundancia bacteriana calculada en Log UFC g⁻¹ para el suelo de *A. prolifera* (a) y *B. empetrifolia* (b). Los valores indican media ± EE (n = 3). Las letras indican diferencias significativas entre las laderas (prueba de Wilcoxon, $p > 0,05$).

En el árbol filogenético (Figura 4), se detectaron 4 géneros de las bacterias más abundantes en los suelos de la ladera norte y bajo los doseles de *A. prolifera* y *B. empetrifolia*. El primer clado correspondió a *Pseudomonas*, con similitud a la especie *P. fluorescens* para los aislados de la ladera norte y sur bajo los doseles de *B. empetrifolia*, correspondientes a 4SBER4 y 2HBER4 respectivamente. El segundo clado correspondió a *Rhodococcus* con una alta similitud con *R.*

kyotonensis correspondiente a un aislado de la ladera sur en los suelos de *B. empetrifolia* (2HBER10). El cuarto clado correspondió a *Pseudarthrobacter/Arthrobacter* donde se agruparon 5 aislados correspondientes a suelos de las dos laderas y las dos especies (4HBER2, 1SBER5, 4HAZO6, 2SAZO6 y 6 SAZO5). El quinto clado correspondió a *Leifsonia* donde se agrupó el aislado 3HBER9 de la ladera sur bajo los suelos de *B. empetrifolia* con similitud a la especie *L. bigeumensis*.

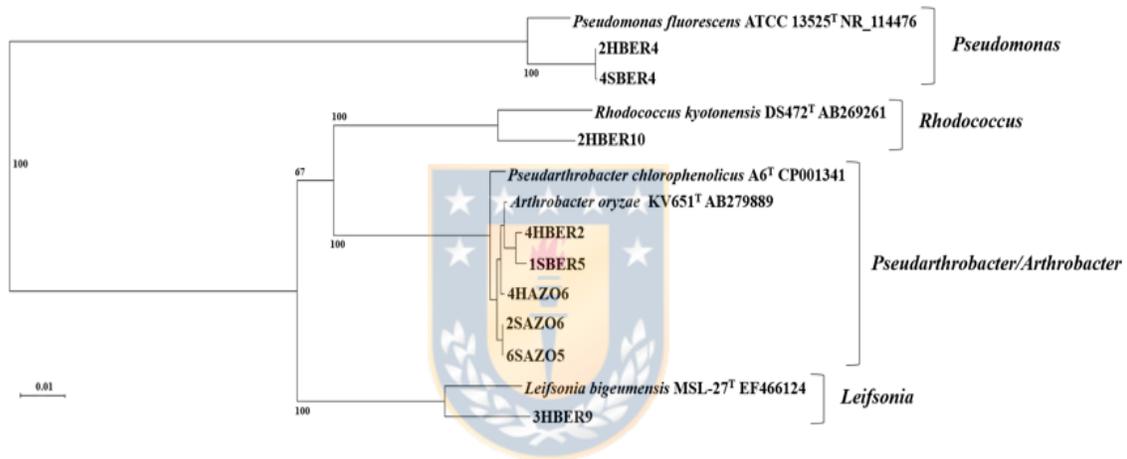


Figura 4. Árbol filogenético de 9 aislamientos bacterianos obtenidos de las especies *A. prolifera* y *B. empetrifolia* de las laderas norte y sur del complejo volcánico Nevados de Chillán. 2HBER4, 2HBER10, 4HBER2, 3HBER9 corresponden a aislamientos de la especie *B. empetrifolia* de la ladera sur. 4SBER4, 1SBER5 corresponden a aislados de la especie *B. empetrifolia* en la ladera norte. 4HAZO6 corresponde a aislados de la especie *A. prolifera* en la ladera sur. 2SAZO6, y 6SAZO5 corresponden a aislados de la especie *A. prolifera* en la ladera norte.

Comparación de la actividad de diferentes mecanismos promotores del crecimiento de las plantas.

El mecanismo promotor del crecimiento de carácter hormonal correspondiente a la producción de ácido indol acético (IAA), tuvo rangos de producción hormonal cercanos al $1,5\mu\text{g ml}^{-1}$ de IAA. La actividad de IAA fue similar entre laderas para *A. prolifera* (Figura 5a, Ladera, $F_{1,22}=16,49$, $p=0,90$) y *B. empetrifolia* (Figura 5b, Ladera, $F_{1,25}=0,89$, $p=0,46$).

Producción de Ácido Indolacético (IAA)

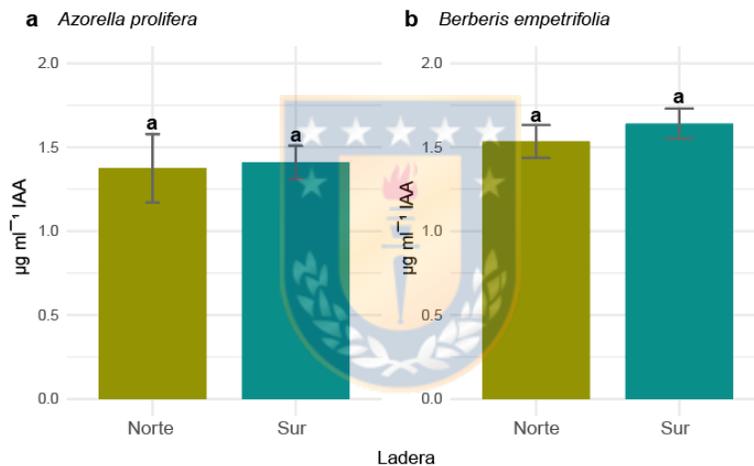


Figura 5. Producción de ácido indolacético (IAA) de bacterias aisladas de 2 especies de formaciones xerofíticas andinas en laderas opuestas. Para todos los mecanismos las columnas se dividieron por especie: en la izquierda la especie *A. prolifera* y a la derecha la especie *B. empetrifolia*. Para cada especie las laderas se indican con colores: verde para la ladera norte y celeste para la ladera sur. Los valores indican la media \pm EE. Letras iguales indican que no existen diferencias (t-test o equivalente no paramétrico, $p > 0,05$).

Con respecto a los mecanismos promotores de tipo enzimático se encontró lo siguiente:

Para los mecanismos promotores del crecimiento enzimáticos, la actividad ACC desaminasa de todos los aislados se muestra en la Figura 6a y 6b. Las bacterias cultivables aisladas de *A. proliferans* en la ladera norte tuvieron una actividad 7 veces mayor que en la ladera sur (7,05 vs 1,03, Figura 6a, Ladera, $F_{1,7} = 0,80$, $p = 0,013$). En contraste, actividad ACC desaminasa fue similar entre laderas para las bacterias aisladas de *B. empetrifolia* (Figura 6b, Ladera, $F_{1,8} = 0,04$, $p = 0,41$).

La actividad fosfatasa, medida a través del índice de solubilización de fosfato presentó diferencias entre las laderas solo para las bacterias asociadas a *A. proliferans*, siendo un 12% mayor en la ladera norte (Figura 6c, Ladera, $F_{1,15} = 1,811$, $p = 0,007$). Para *B. empetrifolia* la capacidad de las bacterias para solubilizar fosfato fue similar entre las laderas norte y sur (Figura 6d, Ladera, $F_{1,21} = 0,24$, $p = 0,87$).

La actividad de la enzima nitrogenasa fue mayor en ladera norte para las dos especies. Particularmente, para los aislados de *A. proliferans*, la producción de etileno fue en promedio de 396 nmoles $C_2H_4 \text{ d}^{-1} \text{ vial}^{-1}$ en la ladera sur, inferior a los 1109 nmoles $C_2H_4 \text{ d}^{-1} \text{ vial}^{-1}$ presentes en la ladera norte (Figura 6e, Ladera, $F_{1,25} = 0,95$, $p = 0,007$). Para los aislados de suelo de *B. empetrifolia*, también se observó la misma tendencia con 1302 nmoles $C_2H_4 \text{ d}^{-1} \text{ vial}^{-1}$ en la ladera norte, mayor que los 396 nmoles $C_2H_4 \text{ d}^{-1} \text{ vial}^{-1}$ de la ladera sur (Figura 6f, Ladera, $F_{1,25} = 3,5$, $p = 0,001$).

Actividades promotoras del crecimiento enzimáticas

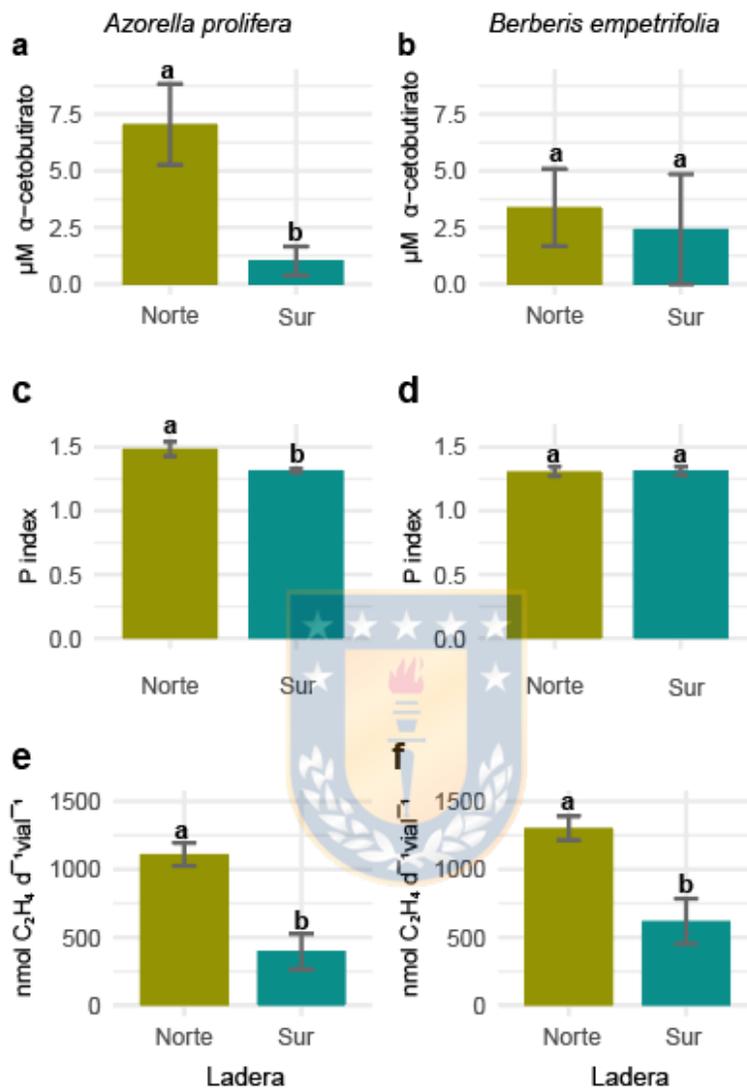


Figura 6. Mecanismos promotores del crecimiento vegetal de carácter enzimático de bacterias aisladas de 2 especies de formaciones xerofíticas andinas en laderas opuestas. Para todos los mecanismos las columnas se dividieron por especie, en la izquierda la especie *A. prolifera* y a la derecha la especie *B. empetrifolia*. Para cada especie las laderas se indican con colores, verde para la ladera norte y celeste para la ladera sur. La actividad de la enzima **ACC desaminasa** (a y b) se

presentan como μM de α -cetobutirato. La **solubilización de fosfato** (c y d) se presenta como Índice P. **La fijación de nitrógeno** (e y f) se indica como $\text{nmol C}_2\text{H}_4 \text{ d}^{-1} \text{vial}^{-1}$. Barras de error indican la media \pm EE. Letras distintas por sobre barras de error indican diferencias significativas entre laderas (T test o equivalente no paramétrico, $p < 0,05$), letras iguales indican que no existen diferencias (T test o equivalente no paramétrico, $p > 0,05$).

OBJETIVO ESPECÍFICO 2. Evaluar diferencias en la supervivencia, desempeño y crecimiento de plantas nativas expuestas a sequía, al ser inoculadas con PGPB asociadas a plantas de formaciones xerofíticas andinas.



METODOLOGÍA

Obtención de inóculos de PGPB

Considerando los resultados del objetivo 1, se realizó una selección de bacterias con mayor actividad para cada mecanismo promotor del crecimiento. Es decir, se seleccionó una bacteria con la mayor actividad ACC-desaminasa, otra con producción de ácido indol acético (IAA), fijación de nitrógeno y solubilización de fosfato (Tabla 3).

Las bacterias seleccionadas se encapsularon según el método de microencapsulación por gelificación inversa descrito por Martins *et al.* (2015) con modificaciones. Primero, se preparó un pellet con las bacterias seleccionadas y previamente enriquecidas en medio TBS, el cual se centrifugó y lavó 3 veces con

solución PBS. Posterior a ello, se disolvió 0,1 M de cloruro de calcio (CaCl_2), 0,02 % de triptófano y 1% TBS en 100 ml de Glicerina. Una vez lista esta solución se agregaron 2 ml de pellet bacteriano (solución bacteriana). La segunda etapa consistió en preparar una solución con 1 g de alginato y 0,1 g de tween 20 en 100 ml de agua (solución de alginato), que se mantuvo en un agitador mientras caían por gravedad gotas de la solución bacteriana contenidas en una bureta. Una vez obtenidas las cápsulas, se protegieron con una solución de quitosano al 4% mezclada con 0,8 % v/v de ácido glacial (pH se ajustó previamente a 5).

Para crear las combinaciones de consorcios bacterianos que fueran compatibles entre ellos, se realizaron pruebas de antagonismo dual con todas las posibles combinaciones entre las 4 bacterias. La prueba de antagonismo dual consiste en sembrar un par de bacterias en medio sólido generando intersecciones entre ambas bacterias, donde existe compatibilidad, las intersecciones presentan crecimiento microbiano de ambas bacterias, mientras que donde existe antagonismo crece sólo una o ninguna (Molina-Romero *et al.* 2017). Las combinaciones seleccionadas para la generación de consorcios bacterianos consideraron dos combinaciones, en la primera aquellas bacterias con mayor actividad para solubilización de fosfato y ACC desaminasa (**PACC**). La segunda combinación consideró a las bacterias con mayor actividad de nitrogenasa y producción de ácido indol acético (**NIAA**). En total se inocularon 4 g por cada combinación, ósea 2 g por bacteria, su concentración se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Caracterización de inóculos bacterianos utilizados en el ensayo, señalando actividad, ladera y especie asociados a ellos junto con la identidad probable de la bacteria y la concentración del inóculo (Log UFC g⁻¹)

| Mecanismo promotor del crecimiento vegetal | Ladera | Especie de planta asociada | Identidad probable | Log UFC g⁻¹ |
|---|---------------|-----------------------------------|--|-------------------------------|
| ACC desaminasa | Sur | <i>B. empetrifolia</i> | <i>Pseudoarthrobacter chlorophenicus</i> | 3,5 |
| IAA | Norte | <i>A. prolifera</i> | <i>Arthrobacter oryzae</i> | 3,08 |
| Fijación de nitrógeno | Norte | <i>B. empetrifolia</i> | <i>Pseudoarthrobacter chlorophenicus</i> | 2,58 |
| Solubilización de fosfato | Norte | <i>A. prolifera</i> | Sin identificar | 3,08 |

Ensayo de vivero

Los consorcios bacterianos fueron inoculados en las raíces de plantas de *Gomortega keule* (Molina) Baill. (Gomortegaceae). *G. keule* es un árbol endémico de la cordillera de la Costa, crece entre las regiones del Maule y Biobío, entre los 0-700 msnm (Rodríguez *et al.* 2018). *G. keule* es una especie perenne que alcanza hasta los 30 metros de altura, sus hojas son coriáceas, ovaladas de 15 cm de alto y un color verde brillante en su haz, y de color verde claro en su envés y fragantes, sus frutos son redondos y de color amarillo brillante. La mayoría de sus poblaciones

se encuentran en el bosque maulino, crecen cercanas a cursos de agua o en valles con influencia oceánica. En el límite sur de su distribución *G. keule* crece en laderas pronunciadas y sobre suelos metamórficos asociadas a árboles perennes (Hechenleitner *et al.* 2005). Esta especie es un Monumento Natural (Decreto 13/1995) y está en peligro de extinción, amenazada por la deforestación y el monocultivo (MMA, 2022). Las actividades para la recuperación de las poblaciones de *G. keule* son complejas debido principalmente a las dificultades que existen en su propagación, crecimiento y aclimatación, ya que se ha observado alta mortalidad en los primeros estados y luego de trasplantes (Muñoz-Concha *et al.* 2010) dada estas dificultades es que se consideró *G. keule* como una especie atractiva para estudiar los efectos de la inoculación de PGPB sobre su supervivencia, desempeño y crecimiento en condiciones de sequía.

Se obtuvieron 60 plantas de *Gomortega keule* del vivero del Centro de Semillas, Genética y Entomología (CONAF, Chillán). Las plantas tenían aproximadamente 2 años y sus semillas provenían de dos sitios: Reserva Nacional Los Queules (región del Maule) y de Cobquecura (región de Ñuble). El sustrato con el que provenían estas especies era del tipo “sustrato de pino compostado” muy utilizado en viveros para producción de árboles, ya que posee una alta concentración de materia orgánica y retención de humedad (Zapata *et al.* 2015; Coker, 2021). Para ensayos de inoculación generalmente se esterilizan los suelos, pero este proceso afecta negativamente la actividad enzimática de las bacterias (Xun *et al.* 2015), así como también exacerban el efecto de la actividad promotora del crecimiento vegetal puesto a que no existen otros microorganismos que interactúen con los inóculos (Goldstein *et al.* 1985). Considerando que nuestro

trabajo es una aproximación práctica se decidió dejar los suelos sin esterilizar, con la finalidad de observar el efecto de los inóculos bacterianos en la promoción del crecimiento vegetal en presencia de los microorganismos originales que vienen con los sustratos empleados en procesos de viverización.

Previo al ensayo de inoculación y sequía, las plantas fueron aclimatadas desde noviembre (2021) a enero (2022) a condiciones de vivero en cámaras de crecimiento ubicadas en el Laboratorio de Microbiología de Suelos (Universidad de Concepción). La temperatura se programó a 22°C, con un fotoperíodo de 16/8 h luz/oscuridad. Tanto la temperatura como la humedad relativa del aire fueron monitoreadas, instalando dos sensores (Hobo Pro v2), programados para registrar cada 30 minutos durante todo el tiempo que duró el ensayo. En paralelo, se instalaron 6 psicrómetros de suelo (PST-55, Wescor Inc.) por debajo del nivel de las raíces, para monitorear semanalmente la humedad del suelo. La condición inicial de las plantas se muestra en la Figura 7. Durante el periodo de aclimatación, las plantas que no mejoraron respecto a sus estados iniciales fueron excluidas del ensayo de restricción hídrica, quedando con un número total de 53 plantas.



Figura 7. Condición inicial de plantas de *G. keule* utilizadas para inoculación bacteriana.

Para determinar el efecto de los encapsulados bacterianos sobre el desempeño de las plantas en condiciones de déficit hídrico, se asignaron homogéneamente las 53 plantas de *G. keule* a 2 condiciones de disponibilidad hídrica: Riego, con irrigación semanal a capacidad de campo (26 plantas); Sequía, suspensión del riego desde febrero a junio de 2022 (27 plantas). Dentro de cada condición hídrica, las plantas fueron asignadas aleatoriamente a tres tipos de inoculación bacteriana: bacterias con actividad P y ACC desaminasa (PACC), bacterias con actividad nitrogenasa y ácido indolacético (NIAA) y el control, que consistió en una inoculación de bioencapsulados sin bacterias (Tabla 4). Las plantas se inocularon el 8 de febrero (2022) y el riego se suspendió el 3 de marzo (2022).

Tabla 4. Tratamientos diferenciales en disponibilidad hídrica y tipo de inoculación (n = 6) para el desarrollo de individuos juveniles de *G. keule*, con distintos tipos de inóculos.

| TRATAMIENTO | TIPO DE INOCULACIÓN | | | N° plantas |
|---------------|---------------------|-------------------|-----------------|------------|
| | Cepa 1 NIAA | Cepa 2 PACC | Sin Bacteria | |
| RIEGO | 9 | 9 | 8 | 26 |
| SEQUÍA | 10 | 9 | 8 | 27 |

Medición de indicadores de supervivencia, desempeño y crecimiento

El ensayo tuvo una duración de 8 meses (incluyendo aclimatación y ensayo de sequía e inoculación). Durante 5 meses, que fue el tiempo que las plantas se

expusieron a sequía y se inocularon se midió la supervivencia, desempeño y crecimiento de las plantas en todas las condiciones experimentales, a través de distintos rasgos e indicadores.

Porcentaje de Supervivencia. El estado de cada planta se cuantificó semanalmente (viva o muerta). Esta información se utilizó para estimar el porcentaje de supervivencia en el tiempo y se pudo comparar si existieron diferencias entre los tratamientos.

Desempeño

Eficiencia fotoquímica máxima del PSII (F_v/F_m). Esta variable refleja el buen o mal funcionamiento del aparato fotosintético. Su rango varía entre 0 y 1, con valores > 0,83 considerados como plantas saludables. Para medir F_v/F_m se utilizó un fluorímetro (Pocket PEA - Hansatech Instruments Ltd.). Para cada planta se seleccionó una hoja joven, pero completamente extendida, la cual fue oscurecida por 10 minutos previo a las mediciones. La periodicidad de estas mediciones fue semanal y se midieron en todos los individuos de todos los tratamientos.

Conductancia estomática ($mmol/m^2s$). Indica la tasa de intercambio de gases determinada por el grado de apertura de los estomas; estomas más abiertos permiten una mayor conductancia y por ende indican mayores tasas fotosintéticas y de transpiración (Pietragalla & Pask, 2012). En condiciones de sequía las plantas tienen a disminuir su conductancia estomática para evitar la deshidratación, por lo que la medición de este indicador se utilizó para verificar el estado hídrico de las plantas (Polle, 1996). La conductancia estomática fue medida en (1 hoja x 5 plantas

x tratamiento, n = 30), utilizando un porómetro SC-1 (Meter Group). Las mediciones se realizaron semanalmente entre mayo y junio.

Crecimiento

Número de hojas. Este indicador se midió para todos los individuos al comienzo y final del ensayo, de manera de cuantificar cambios en el número de hojas de cada planta entre las diferentes condiciones experimentales.

Relación Raíz/Brote. Es la razón entre la biomasa subterránea y aérea y refleja de forma directa la asignación de biomasa por las plantas a distintas funciones de los órganos (Qi *et al.* 2019). Para calcularla, las plantas se cosecharon al final del ensayo, se separaron las estructuras aéreas de las raíces, se embolsaron y secaron en horno a 70°C por 48 horas. Posteriormente, cada porción se pesó en balanza electrónica (Ohaus Corporation, model STX223) y luego se calculó la razón entre ambas biomásas. La relación raíz brote se midió para todos los individuos.

Longitud específica de la raíz (LER, m g⁻¹). Es la relación entre la longitud de la raíz y la biomasa seca de las raíces finas. La longitud específica de la raíz disminuye a medida que aumenta el grado de estrés hídrico (Ostonen *et al.* 2007). Representa el carácter subterráneo análogo al área foliar específica. Se midió LER para todas las plantas, se limpiaron las raíces y se digitalizaron a través de escáner especializado con una resolución de 15 µm para el cálculo de la longitud y diámetro de las raíces. Las muestras se secaron a 70° C por 48 horas para determinar el peso seco.

Área específica de la hoja (SLA, mm²/mg). Es la relación entre el área de una hoja y su masa seca. Es un indicador indirecto de la tasa de crecimiento relativo y fotosíntesis máxima. Plantas sometidas a estrés causado por sequía suelen poseer un SLA menor, debido a que la sequía afecta la expansión de las hojas. Hojas más gruesas poseen una mayor densidad de clorofila y proteínas por unidad de área foliar, por lo tanto, poseen una mayor capacidad fotosintética acompañada de una mayor eficiencia en el uso del agua. SLA se midió para todas las plantas por triplicado. Se tomaron hojas sanas y desarrolladas del dosel superior. Se midió el área foliar proyectada utilizando un escáner de oficina siguiendo el protocolo de Pérez-Harguindeguy *et al.* (2013). Las imágenes fueron procesadas con el programa “*Fiji Image J*”. Las hojas fueron secadas en un horno a 70°C por 48 horas. Luego, se midió el peso seco de cada hoja con una balanza analítica digital (Techne). Finalmente se determinó SLA dividiendo el área proyectada hoja dividida en su peso seco (mm²/mg). SLA se midió una vez terminado el ensayo de inoculación para todas las plantas.

Una vez terminado el ensayo se tomaron muestras de 1kg de suelo de los tratamientos riego y sequía, ambos sin inoculación bacteriana (dos muestras por tratamiento, n = 4), para análisis químico completo de suelos en el Laboratorio de Análisis de Suelos y Plantas de la Universidad de Concepción, Chillán.

Análisis estadístico

Las diferencias en el porcentaje de supervivencia de plantas de *G. keule* entre los tratamientos, fueron evaluados con análisis de Kaplan-Meier. Las diferencias en el

potencial hídrico de los tratamientos riego y sequía fueron analizadas en sus mediciones finales a través de prueba no paramétrica Wilcoxon. Las diferencias en F_v/F_m y conductancia estomática fueron analizadas a través del tiempo con ANOVAs de medidas repetidas con riego (2 niveles) e inoculación (3 niveles) como predictores. Las diferencias en variables post-cosecha tales como SLA, RSR y LER fueron comparados entre tratamientos diferenciales de inoculación (NIAA, PACC, y sin PGPB) a través de ANOVA factorial o su equivalente no paramétrico. Todos los datos fueron analizados mediante el software Statistica versión 13.

RESULTADOS



El ensayo se realizó en condiciones de temperatura que fluctuó entre los 18°C y los 24°C entre febrero y junio, con un promedio de 21,8°C durante todo el periodo que duró el ensayo. La humedad relativa del ambiente fluctuó entre 37% y 75% entre los meses de febrero y junio, y tuvo un promedio de 54,83%.

La disponibilidad hídrica disminuyó en los suelos donde se suspendió el riego (Figura 8). Mientras los suelos con riego semanal mantuvieron un potencial hídrico promedio de $-0,1 \pm 0,3$ MPa, aquellos suelos con suspensión de riego registraron potenciales hídricos de $-2,73 \pm 0,9$ MPa en la última semana de ensayo. Esta caída abrupta del potencial hídrico del suelo en las últimas 3 mediciones coincide con el desfonde de los maceteros que permitieron que ambos sustratos se comportaran

de manera distinta en las mediciones finales (Figura 8, Tratamiento x Fecha Final, $F_{1,9}=1,91$, $p=0,01$).

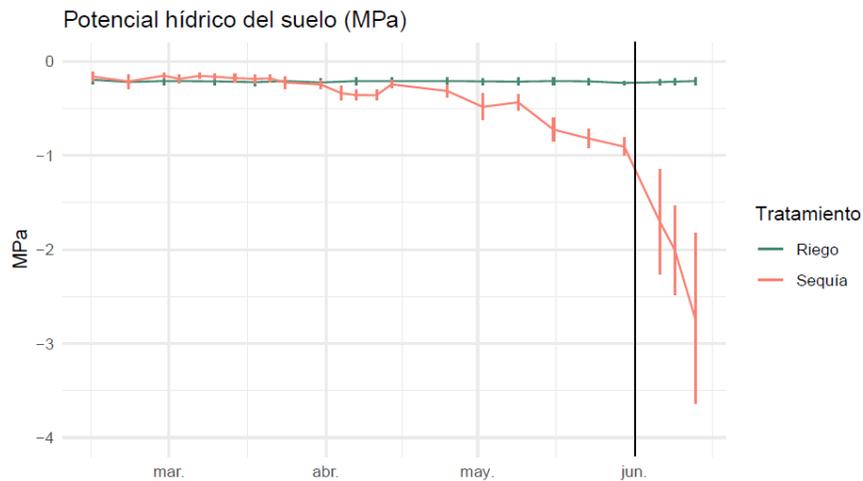


Figura 8. Medias del potencial hídrico (MPa) de los suelos de los tratamientos riego y sequía durante el ensayo de inoculación bacteriana en plantas de *G. keule*. Los valores corresponden a la media \pm EE. La línea vertical de color negro muestra el período en el cual se realizó el desfonde de los maceteros.

El efecto de la inoculación en plantas de *G. keule* expuestas a condiciones de sequía fue evaluado a través de distintos e indicadores de supervivencia, desempeño y crecimiento. En el caso de la supervivencia, los resultados dependieron de la condición hídrica. (Figura 9). Por ejemplo, en condiciones de riego permanente, la supervivencia fue un 29,9% menor entre las plantas sin inóculos, mientras que en la condición sequía la supervivencia de plantas inoculadas con NIAA se redujo un 30,3% ($\text{Chi}^2 = 25,5$ $p < 0,001$). En ambos tratamientos, la supervivencia se redujo después de los 90 días de iniciado el ensayo (Figura 9).

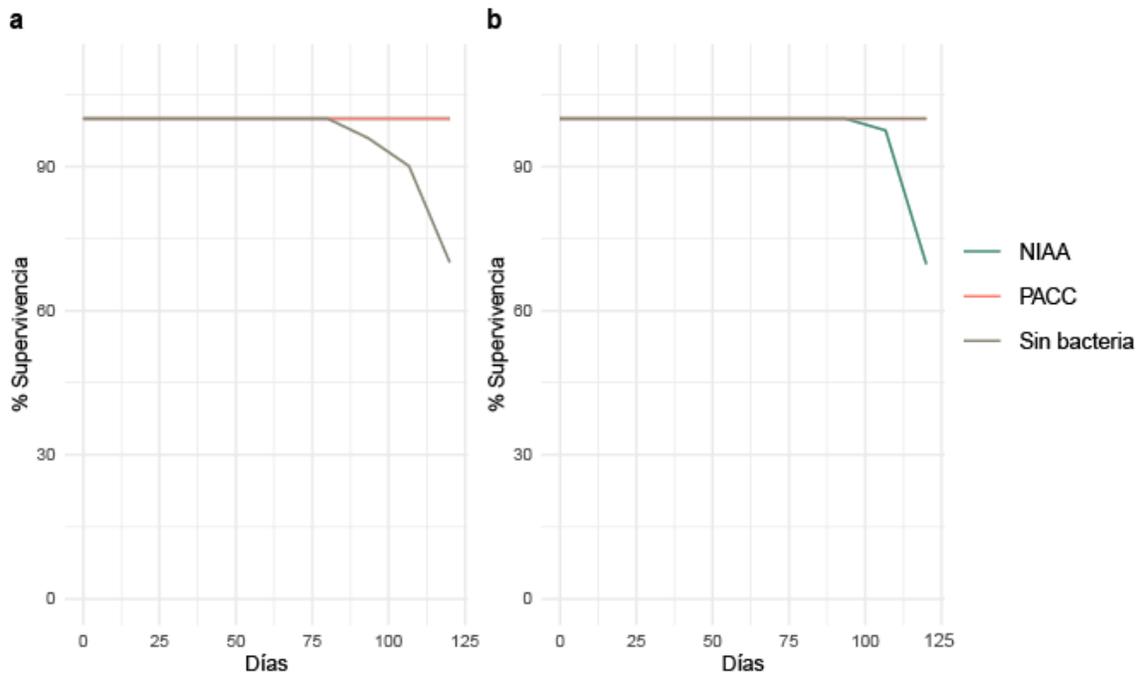


Figura 9. Gráfico de la tabla de supervivencia proveniente de análisis Kaplan-Meyer para los tratamientos con riego (a) y sequía (b), con tres tipos de inoculación (NIAA, PACC y sin bacteria).

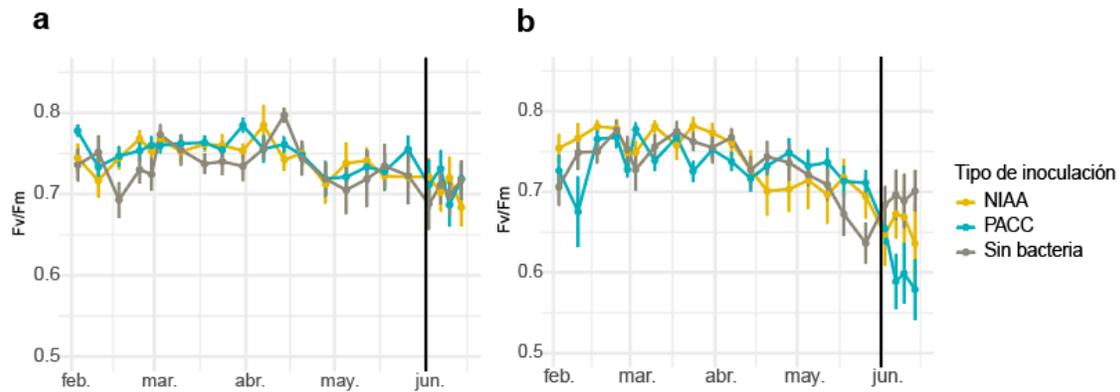
Eficiencia fotoquímica máxima del PSII (F_v/F_m). En general, la totalidad de las plantas en los tratamientos con riego y sequía tuvieron una tendencia a disminuir en su F_v/F_m entre el periodo inicial y final. Las plantas con riego en los tres tipos de inoculación presentaron un comportamiento similar (Figura 10a, Tipo de Inoculación x Fecha, $F_{2,22}=0,16$, $p=0,854$) (Anexo 1). En particular las plantas inoculadas con bacterias con NIAA presentaron una disminución notable en el tiempo ($p = 0,025$). Para las plantas expuestas a sequía existió un cambio de las tendencias posterior al desfonde de los maceteros. Previo al desfonde, las plantas sin inoculación bacteriana eran las con menor F_v/F_m en comparación con NIAA y PACC. Sin

embargo, al final del experimento las plantas sin inoculación bacteriana fueron las que presentaron mayor F_v/F_m que las inoculadas ($F_v/F_m = 0,7$ vs $0,52$, Figura 10b, Tipo de Inoculación x Fecha, $F_{2,23}=1,16$, $p = 0,006$; detalles estadísticos en Anexo 1).

Conductancia estomática. Para todas las plantas la conductancia estomática fue disminuyendo en el tiempo (Figura 10). En general la conductancia estomática se comportó de manera similar en todos los tratamientos (Figura 10, Condición hídrica x Tipo de inoculación, $F_{2,23}=1,25$, $p = 0,30$, detalles estadísticos ver Anexo 2). A pesar de no haber observado diferencias entre plantas inoculadas y no inoculadas en riego y sequía, si se observaron disminuciones en la conductancia estomática de los tratamientos inoculados con PACC en condiciones de riego (Figura 10a, Fecha x PACC, $F_{2,23}=1,25$, $p=0,02$).



Eficiencia fotoquímica máxima del fostosistema II (Fv/Fm)



Conductancia Estomática

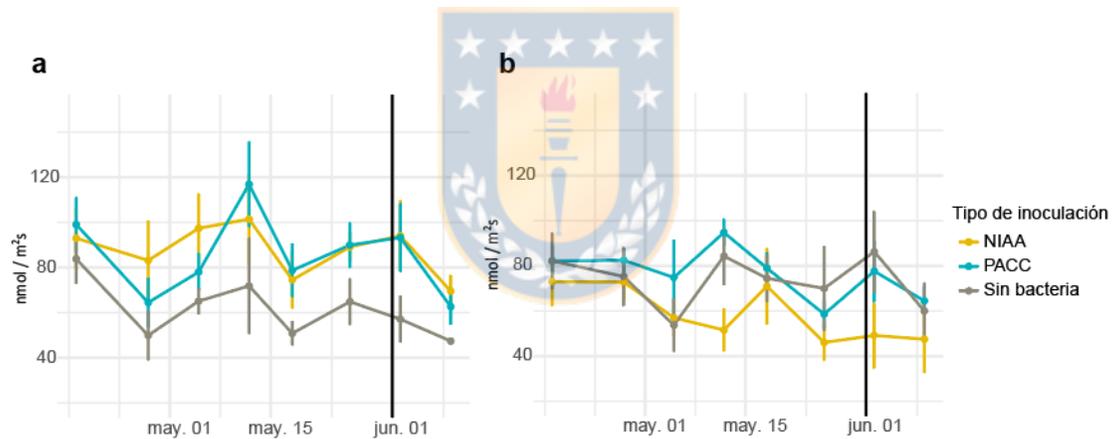


Figura 10. Desempeño de la planta para los tratamientos riego (izquierda) y sequía (derecha), con 3 tipos de inoculación (NIAA, PACC y sin bacteria). Barras de error indican error estandar (media \pm EE). Líneas verticales de color negro indican el tiempo en el cual se realizó el desfonde de los maceteros para el tratamiento con sequía. La **eficiencia fotoquímica máxima del fostosistema II**

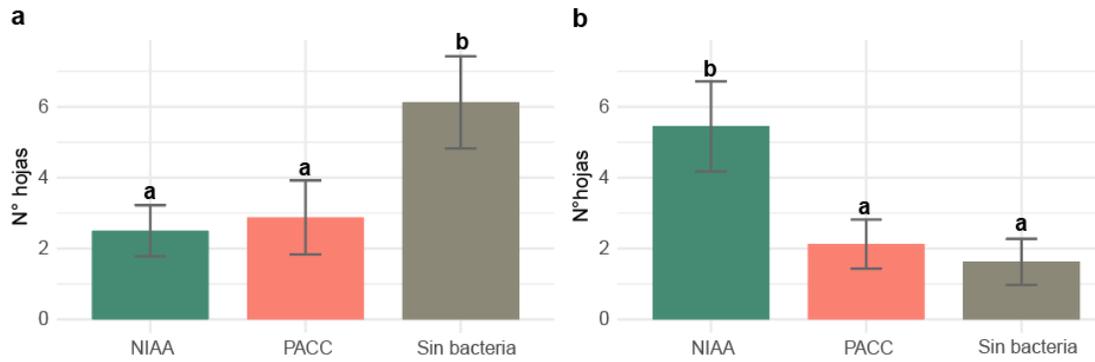
(F_v/F_m) se indican con las letras a y b. La **conductancia estomática (nmol/m²s)** se indican con las letras c y d.

Para los indicadores del crecimiento, sólo en el *número de hojas* se observó que las plantas se comportaron distinto según su tipo de inoculación (Figura 11). En particular, las plantas sin inoculación bacteriana aumentaron al doble su número de hojas que las plantas con inoculación bacteriana en condiciones de riego (Figura 11a, sin bacteria x NIAA, $F_{1,44}=0637$, $p=0,005$, sin bacteria x PACC $F_{1,44}=0637$, $p=0,026$). Mientras que para las plantas con sequía la tendencia fue contraria, observándose que la inoculación de plantas con NIAA aumentó su número de hojas con respecto a aquellas inoculadas con PACC (Figura 11b, NIAA x PACC, $F_{1,44}=0637$, $p=0,019$) y sin inoculación bacteriana (Figura 11b, Sin bacteria x PACC, $F_{1,44}=0637$, $p=0,007$). En cuanto a los otros indicadores de crecimiento, no se observó que la inoculación tuviera algún efecto en las plantas con riego o sequía. Por ejemplo, para el *área específica de la hoja (SLA, mm²mg⁻¹)*, las plantas se comportaron de manera similar en todos los tipos de inoculación (Figuras 11c y 11d, Tratamiento x Tipo de inoculación, $F_{2,42}=1,58$ $p=0,21$; ver detalles estadísticos en Anexo 4). Al igual que para la *longitud específica de la raíz (LER, g m⁻¹)* donde tampoco se observaron diferencias para este indicador (Figuras 11e y 11f, Tratamiento x Tipo de Inoculación, $H_{2,44}=0,79$ $p=0,45$; ver detalles estadísticos en Anexo 5). Lo mismo que para la *relación raíz brote*, donde los tres tipos de inóculo no tuvieron efectos en las plantas (Figuras 11g y 11h, Tratamiento x Tipo de Inoculación, $F_{2,44} = 0,35$ $p=0,7$; ver detalles estadísticos en Anexo 6).

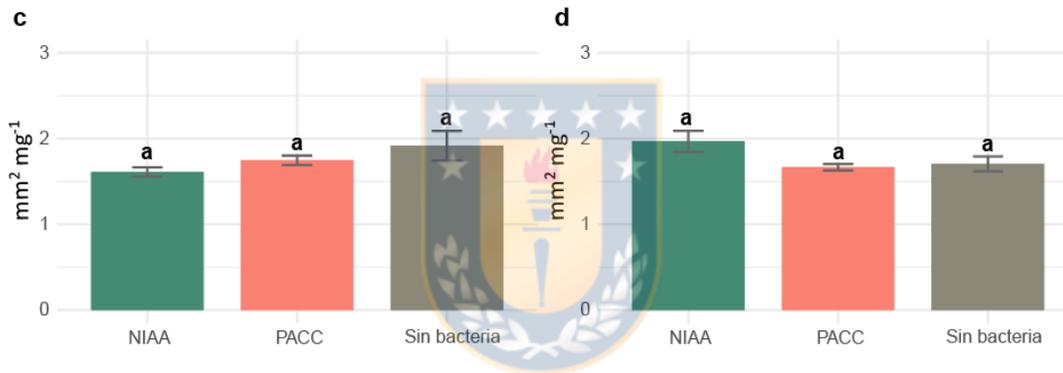
RIEGO

SEQUÍA

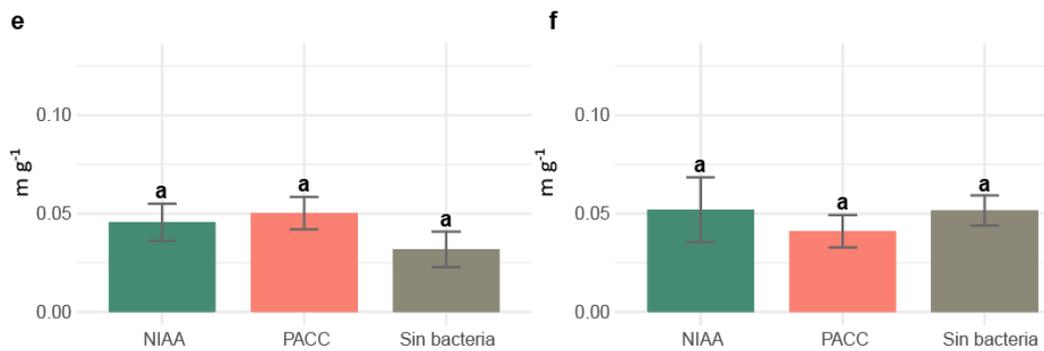
Número de hojas



Área específica de la hoja (SLA)



Longitud Específica de la Raíz (LER)



Relación Raíz Brote

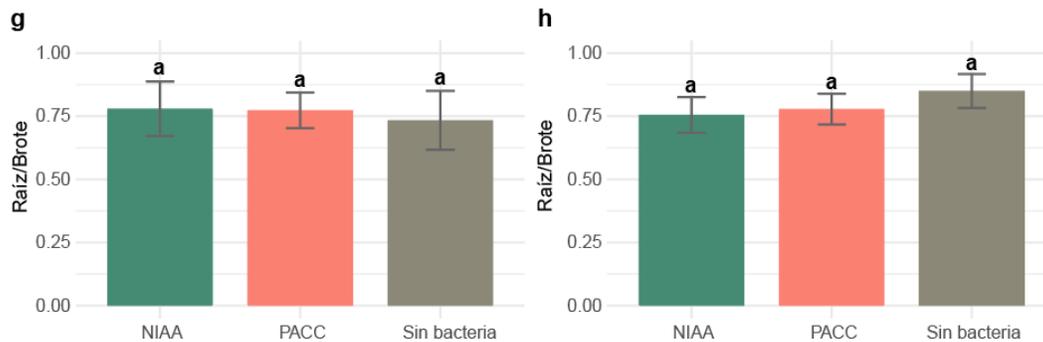


Figura 11. Indicadores de crecimiento para determinar el efecto de la inoculación bacteriana en plantas de *G.keule* en los tratamientos riego (izquierda) y sequía (derecha), con tres tipos de inoculación (NIAA, PACC y sin bacteria). Baras de error indican el error estándar (media \pm EE). Comparaciones estadísticas (ANOVA de varianza factorial o equivalente no paramétrico) se indican con letras por sobre las barras de error: a y b indican que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), letras iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). El **número de hojas** se indica en los paneles a y b. Las medias del **Área Específica de la Hoja** (SLA, $\text{mm}^2 \text{mg}^{-1}$) se indican en los paneles c y d. La **Longitud Específica de la Raíz** (LER, m g^{-1}) se indican con las letras e y f. **Relación Raíz Brote** de plantas se indican en los paneles g y h.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se logró cuantificar la abundancia bacteriana y actividad de PGPB asociadas a plantas de formaciones xerofíticas andinas en función de la variación en la disponibilidad hídrica, la temperatura influenciada por la exposición de la ladera y las propiedades químicas del suelo, éstas últimas afectadas por la identidad de la especie. Un gran hallazgo en la presente investigación es haber detectado mayor abundancia bacteriana y actividad enzimática en la ladera norte, que tuvo mayor oscilación térmica y déficit hídrico que la ladera sur. Dos de los tres mecanismos enzimáticos mostraron diferencias entre laderas, pero sólo para las bacterias asociadas a *Azorella prolifera*. Por lo que creemos que la identidad de las especies es clave a la hora de explorar el potencial beneficioso de las bacterias que promueven el crecimiento de las plantas en los sistemas alpinos.

En primer lugar, los rangos obtenidos para la abundancia bacteriana parecen coincidir con la literatura. Por ejemplo, trabajos como los de Sinigani *et al.* (2017) han obtenido rangos cercanos a 3 Log UFC g⁻¹ para sitios contaminados, y valores entre 6,3 y 8,3 Log UFC g⁻¹ para pastizales y sistemas agrícolas, siendo el más común el cercano a 6 Log UFC g⁻¹. Kieft *et al.* (1993), por su parte, han obtenido rangos entre 2 y 6,7 Log UFC g⁻¹ para suelos de sistemas naturales áridos en Estados Unidos. A pesar de que los rangos de abundancia bacteriana que obtuvimos parecen ser normales, no ocurre lo mismo para los rangos de actividad de las PGPB, que tuvieron valores bajos si se comparan con los de sistemas agrícolas. Por ejemplo, nuestras PGPBs produjeron ácido indol acético en un rango

de $1,4 \mu\text{g ml}^{-1}$ a $1,7 \mu\text{g ml}^{-1}$, valores bajos en comparación con lo reportado en sistemas agrícolas, donde las producciones de IAA fluctúan entre $8,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ y $69,7 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Herlina *et al.* 2017). Asimismo, mientras que la solubilización de fosfato en sistemas agrícolas fluctúa entre 4-5 (Schoebitz *et al.* 2013; Pande *et al.* 2017), en nuestro sistema no superó el 1,5. En cuanto a la actividad de la nitrogenasa, nuestras PGPB no superaron los $1,4 \mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ d}^{-1} \text{ vial}^{-1}$, un rango bajo si se compara con bacterias industriales que poseen entre 6 y $108 \mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ d}^{-1} \text{ vial}^{-1}$ (Li *et al.* 2017). La mayoría de los estudios que evalúan los beneficios potenciales de las PGPB se llevan a cabo en sistemas agrícolas, con bacterias que han sido optimizadas durante años, por lo que la baja actividad enzimática observada en bacterias de sistemas naturales no es sorprendente. Sin embargo, este patrón cambia cuando comparamos nuestros resultados con la actividad promotora del crecimiento vegetal de las bacterias de los sistemas naturales. Por ejemplo, Kadioglu *et al.* (2018), aislaron bacterias tolerantes al frío con actividad ACC deaminasa de diferentes plantas alpinas nativas en Erzurum (entre 1760 y 2720 de elevación). La actividad de estas bacterias oscilaba entre 0,9 y $1,2 \mu\text{M}$ de α -acetobutirato, casi seis veces menos que la actividad obtenida en nuestro estudio. La mayoría de los estudios sobre la abundancia y la actividad de las PGPB en sistemas alpinos proceden generalmente del Himalaya, un sistema muy distinto al nuestro, donde las bacterias interactúan con plantas cultivadas y en suelos muy degradados (e.g. Kumar *et al.* 2011; Majeed *et al.* 2014). Esto hace difícil establecer comparaciones que evidencien el potencial de los hallazgos plasmados en este estudio.

Abundancia bacteriana y mecanismos promotores del crecimiento relacionados con la exposición de la ladera

La abundancia bacteriana y la actividad enzimática fueron mayores en la ladera norte que en la sur. El patrón climático favoreció a una ladera sobre la otra. En general, la ladera norte tiende a ser más seca y cálida que la ladera sur, tal y como se ha descrito anteriormente para laderas de orientación ecuatorial (Scherrer & Körner 2011). Además, en la ladera norte se produjeron eventos de calor y congelación más intensos y frecuentes (Tabla 1), con mayores fluctuaciones térmicas estacionales que en la ladera sur. Esto significa que las interacciones planta-PGPB deberían ser más probables en la ladera norte, y los beneficios, representados como la actividad de los mecanismos PGP, deberían ser mayores en esta ladera más extrema.



La influencia de los factores ambientales en la abundancia bacteriana, que podrían contribuir a las diferencias observadas en la ladera norte, se ha descrito de forma independiente: la temperatura (Chen *et al.* 2015), la humedad del suelo (Naylor & Coleman, 2018) y las propiedades químicas del suelo (Ai *et al.* 2020). Particularmente, el aumento de la temperatura favorece la abundancia bacteriana especialmente en las regiones frías (Chen *et al.* 2015). Mientras que para la humedad del suelo, los efectos son más dinámicos, ya que afectan las propiedades químicas del suelo y el desempeño de las plantas (Naylor & Coleman, 2018), lo que indirectamente repercuten en las bacterias. Sin embargo, la identidad y las adaptaciones de las PGPB determinarían si éstas sobreviven y crecen en

condiciones extremas (Pérez-Jaramillo *et al.* 2018). Además, su respuesta depende de lo estables que sean las comunidades que componen; comunidades bacterianas estables no cambian en suelos más secos (Stres *et al.* 2008). Un claro ejemplo es un trabajo de Chodak *et al.* (2015), quienes evaluaron la respuesta de las bacterias adaptadas a la sequía que fueron posteriormente rehumedecidas, provocando una disminución de bacterias gran negativas producto del estrés y un aumento de las gran positivas. Es evidente que la abundancia de bacterias depende del ambiente, de las características de las bacterias (*i.e.* adaptaciones e identidad), su comunidad albergante y de las plantas con las que interactúa.

La identidad de las bacterias más abundantes y activas coincide con la reportada para otros sistemas con condiciones extremas. Todos los géneros bacterianos identificados en este estudio han sido identificados en entornos climáticamente limitantes como el Himalaya (*e.g.* *Pseudomonas*, Selvakumar, 2008; *Rhodococcus*, Ruberto *et al.* 2005, *Leifsonia*, Reddy *et al.* 2008), la cordillera de Los Andes (*e.g.* *Pseudomonas* Viruel *et al.* 2011; Vega-Celedón *et al.* 2021), la Antártida (*e.g.*, *Arthrobacter*, Dsouza *et al.* 2015; *Pseudoarthrobacter*, Shin *et al.* 2020; *Leifsonia*, Ganzert *et al.* 2011), así como en regiones extremadamente secas (*e.g.* *Pseudoarthrobacter* aislado de los desiertos africanos, Buckley *et al.* 2019). En cuanto a su actividad, los géneros detectados se han caracterizado como PGPB. Por ejemplo, la producción de IAA por las bacterias del género *Leifsonia* (Kang *et al.* 2016), o la actividad ACC deaminasa, fosfatasa y nitrogenasa de *Pseudomonas* (Georgieva *et al.* 2018; Adhikari *et al.* 2021; Vega-Celedón *et al.* 2021), o las bacterias de los géneros *Arthrobacter* y *Pseudoarthrobacter* que han sido reportadas con múltiples actividades promotoras del crecimiento (Lahsini *et al.*

2022). Se cree que las limitaciones climáticas de nuestra área de estudio favorecieron a un grupo selecto de PGPB que poseen adaptaciones que les permiten sobrevivir y crecer en condiciones que para otros grupos bacterianos serían letales.

La influencia de la variabilidad climática respecto a la temperatura y la disponibilidad de agua en la actividad enzimática de las PGPB ha sido estudiada de forma limitada. Por ejemplo, en el caso de la actividad enzimática de la ACC deaminasa, sabemos que es una enzima característica de los suelos salinos y expuestos a la sequía (Glick, 2004; Brockett *et al.* 2012), pero no sabemos cómo cambios en la temperatura, humedad, o disponibilidad hídrica afectan su actividad. Teniendo en cuenta nuestros resultados, se podría intuir que en ambientes más extremos podría haber una mayor actividad de esta enzima. Sin embargo, no existe información relacionada. En cuanto a la actividad de la fosfatasa se han detectado bacterias psicotolerantes capaces de solubilizar fosfato en condiciones de baja temperatura (*e.g. Pseudomonas spp.* aisladas de Hílāmāyā, Adhikari *et al.* (2021)). Nuestras bacterias estudiadas probablemente poseen las mismas cualidades, pero faltan estudios para entender la influencia de la temperatura en la solubilización de fosfato de nuestros aislados. Finalmente, para la fijación de nitrógeno sabemos que la actividad de la enzima nitrogenasa se ve favorecida en las condiciones húmedas y frías del sur (Rousk *et al.* 2018). Sin embargo, nuestros resultados mostraron que la actividad de la enzima nitrogenasa fue mayor en la ladera norte, más seca y fluctuante. Es probablemente, que la identidad de las PGPB fijadoras de nitrógeno estuviesen adaptadas a las condiciones extremas de nuestro sistema. A pesar de

que, la exposición de la ladera favoreció la actividad de los tres mecanismos enzimáticos en la ladera norte, las diferencias microclimáticas de la ladera no fueron suficientes para crear diferencias en las dos especies, creemos que la identidad de la planta jugó un papel clave en nuestros resultados.

Abundancia bacteriana y mecanismos de promoción del crecimiento relacionados con la identidad de las especies

La abundancia bacteriana se vio influida por la exposición de la ladera, e inesperadamente por la identidad de la especie. Inicialmente, pensamos que las tendencias en la abundancia y la actividad deberían responder sólo a la exposición de la pendiente y deberían coincidir para las dos especies, ya que ambas estaban presentes en las mismas condiciones de temperatura y humedad. Al observar las propiedades químicas del suelo, se observaron notables diferencias entre las especies. Un ejemplo claro, fue la alteración del pH por la identidad de las plantas, que exacerbó las diferencias en la abundancia bacteriana sólo en los suelos de *B. empetrifolia*. Los suelos de *B. empetrifolia* y *A. prolifera* presentaban diferencias en el pH, siendo el primero más ácido. El pH del suelo suele estar alterado por los exudados radiculares, que a su vez varían en su composición dependiendo de la identidad vegetal (Youssef & Chino, 2012). Sin embargo, los estudios que han evaluado la abundancia bacteriana en función del pH afirman que el aumento del pH debería aumentar la abundancia bacteriana (Rousk *et al.* 2010). Por otro parte, investigaciones como la de Yang *et al.* (2019), realizadas en sistemas alpinos perturbados por la actividad agrícola, mencionan que la abundancia de grupos como las Actinobacterias (e.g. *Pseudomonas* asociadas a *B. empetrifolia* en la ladera

norte) no está influenciada por los cambios de pH (Yang *et al.* 2019). Aunque creemos que la combinación de la exposición a la pendiente junto con los cambios de pH en los suelos de *B. empetrifolia* benefició la abundancia bacteriana de un grupo de microorganismos, faltan estudios para esclarecer estas ideas.

Relacionando la identidad de las plantas y las bacterias abundantes asociadas. Encontramos que para el género *Azorella*, es primera vez que se detectan bacterias del género *Pseudoarthrobacter*. Previamente, trabajos como los de Rodríguez-Echeverría *et al.* (2021) habían detectado filos abundantes como las actinobacterias, para *A. compacta* y *A. madreporica*. Sin embargo, dentro de las bacterias identificadas no se notificaron actinobacterias para *A. prolifera*. Mientras que para *Berberis*, investigaciones como las de Vega-Celedón *et al.* (2021) habían detectado previamente bacterias del género *Arthrobacter* asociada a *B. microphylla* en la Patagonia. Géneros como *Pseudomonas*, *Rhodococcus* y *Leifsonia* no habían sido detectados previamente, por lo que este es el primer registro al respecto.

En este estudio, la identidad de la planta influyó en dos de los tres mecanismos evaluados de PGPB. La actividad de la fosfatasa fue alta en los suelos bajo el dosel de *A. prolifera*, que paralelamente exhibió el menor porcentaje de materia orgánica en la ladera norte. Coincidentemente, Alemneh *et al.* (2022) informaron de una correlación negativa entre la solubilización del fosfato y el carbono del suelo, lo que explica nuestros resultados. En cuanto a la actividad de la enzima ACC deaminasa, creemos que no está ligada a las propiedades químicas del suelo y está relacionada con la planta de una manera más compleja. Sabemos que la planta a través de sus exudados radiculares modifica su microbioma

beneficiando a un grupo de microorganismos sobre otros para su beneficio (Glick *et al.* 2007). Es probable que las condiciones de la ladera norte afectaran de distinta manera a las dos especies evaluadas en este estudio, y por esta razón, sólo tuvimos diferencias en la actividad de la ACC deaminasa para una especie. En cuanto a la actividad de la enzima nitrogenasa, ésta fue mayor en la ladera norte para ambas especies, por lo que creemos que al menos este mecanismo no está influenciado por la identidad de las especies. Nuestros resultados evidencian una relación notoria entre las plantas y la actividad de PGPB, donde las interacciones no parecen ocurrir al azar.

La combinación de la orientación de la ladera y la identidad de la planta evidenció una clara influencia en la actividad de la enzima PGPB, donde la dureza del sistema alpino favoreció la abundancia de las bacterias y sus beneficios cuando las condiciones se hicieron más extremas en la pendiente norte, pero estos beneficios estuvieron condicionados por la especie. Estudios indican que las plantas estresadas modifican sus exudados radiculares, alterando el microbioma del suelo y favoreciendo la presencia de PGPB (Liu *et al.* 2020; Glick & Gamalero 2021; Cheng *et al.* 2022). La composición de los exudados radiculares depende de las propiedades químicas del suelo, del genotipo de la planta y de su edad (Vives-Peris *et al.* 2019). Tal vez, las condiciones climáticamente limitantes "mejoraron" la exudación de las raíces de *A. prolifera*, aumentando la actividad de las PGPB. Es necesario que estudios futuros consideren las respuestas de las plantas incorporando los exudados de las raíces entre los predictores de la abundancia y actividad bacteriana.

Efecto de la inoculación bacteriana sobre el desempeño de plantas de G. keule bajo estrés hídrico en vivero

Los inóculos bacterianos tuvieron un efecto inesperado en este ensayo. Contrario a nuestra propuesta, los inóculos bacterianos no mejoraron la supervivencia, desempeño, ni crecimiento de las plantas de *Gomortega keule* en condiciones de sequía. Los indicadores de desempeño tuvieron tendencia general a la disminución, tanto para las plantas inoculadas con bacterias y las sin inocular. En cuanto a los rasgos que evaluaban el crecimiento, no se puede decir que estos se vieron favorecidos por la inoculación, ya que sólo en el número de hojas se encontraron diferencias, lo cual podría deberse a múltiples factores. Se cree que los resultados obtenidos pudieron responder a una suma de factores que subyacen a la metodología, la especie inoculada y su microbioma.

La metodología utilizada pudo haber afectado a distintas escalas nuestros resultados. Primero, la **combinación de inóculos** podría no haber tenido efectos en la planta, especialmente la de bacterias con actividad nitrogenasa y ácido indolacético (ambos denominados NIAA), ya que la producción de IAA fue muy baja (*i.e.* media de $1,48 \mu\text{g ml}^{-1}$ entre todos los aislados) si se compara con bacterias de sistemas agrícolas las cuales son efectivas en el crecimiento de la planta y producen 30 veces más IAA que las obtenidas en nuestro ensayo (Mohite,2013). Para este factor sería interesante determinar qué y cuánta actividad necesitan las plantas nativas utilizadas en viveros que tienen problemas en etapas de trasplante. Segundo, la **selección de la especie a inocular**, *G. keule* es una especie con una

tasa de crecimiento baja en sus primeros 3 años, aumentando su altura entre 25 y 40 cm anualmente (Rodríguez, 1988), condición que se vuelve mucho más lenta en condiciones controladas (Navarrete, 2006). La mayoría de los indicadores analizados en plantas inoculadas con bacterias, como las sin bacterias tuvieron una tendencia a la disminución. Creemos que para próximos ensayos utilizas especies nativas de las que se tenga más información podría revelar de mejor manera si tiene o no un efecto promotor del crecimiento.

En cuanto a nuestro sustrato, la utilización de **sustrato no estéril** combinado con un **momento de inoculación tardío** podría haber afectado negativamente los indicadores de crecimiento. Acorde a esta última reflexión, trabajos como los de Bashan (1986), quien utilizó concentraciones bacterianas de inóculo similares a las de este ensayo con sustratos estériles (Log UFC g^{-1}), tuvo mejores resultados en el crecimiento de las plantas cuando inoculaba en estado de semillas. Es importante establecer el tiempo de inoculación ideal tanto para *G. keule*, como para otras especies nativas, así como también es imprescindible que se caractericen los microbiomas de suelos de carácter comercial, para predecir interacciones, especialmente las antagónicas. En cuanto a las **características químicas del sustrato utilizado**, estas eran completamente diferentes a las de Nevados de Chillán. El sustrato de pino compostado poseía 30 veces más materia orgánica, 100 veces más fósforo, 400 veces más potasio disponible y una mayor concentración de macronutrientes como hierro, manganeso, zinc y boro (Anexo 7), junto con la alta retención de humedad. Creemos que es probable que esta mayor disponibilidad de macro y micronutrientes afectaron a nuestros inóculos. Sin embargo, existen pocos estudios que aclaren el impacto de los macro y micronutrientes en la actividad de

las PGPB provenientes de sistemas naturales. Por ejemplo, la materia orgánica influye en la abundancia bacteriana (Mhete *et al.* 2021), pero no sabemos específicamente a qué grupos bacterianos. Lo mismo ocurre para la humedad del suelo que favorece a distintos grupos bacterianos (Chodak *et al.* 2015). Es probable que tanto la materia orgánica, como la humedad del suelo no favorecieron a nuestros inóculos bacterianos, pero sí a los microorganismos presentes originalmente en el sustrato. Quedan muchas interrogantes relacionadas al desconocimiento del microbioma los suelos nativos, determinar los requerimientos básicos de las PGPB en condiciones de vivero y sistemas naturales es clave para revelar su verdadero potencial.

El desfonde de los maceteros alteró las interacciones entre la planta y su microbioma, lo cual se hizo evidente en el cambio de las tendencias que se iban observando previo al desfonde. Cambios en el medio circundante a las raíces, producto del desfonde podrían haber alterado la composición de los exudados radiculares, que provocaron una alteración del microbioma. En este sentido, la composición de los exudados radiculares responde a los cambios que la planta perciba en el medio, tales como el déficit hídrico (Hale & Moore, 1980), los cuales alteran las interacciones entre la planta y los distintos microorganismos presentes en el suelo (Xiong *et al.* 2020). Se cree que los microorganismos presentes en el sustrato de pino compostado también eran benéficos, lo cual provocó que estos compitieran con los inoculados, especialmente posterior al desfonde, desplazándolos de la rizósfera, lo cual explicaría porque las plantas sin inoculación bacteriana tuvieron mejores indicadores que las con inoculación bacteriana. El antagonismo en la rizósfera ocurre con frecuencia, especialmente cuando existen

cambios en ella que favorecen a determinados grupos por sobre otros (Raaijmakers *et al.* 2009; Armada *et al.* 2015; Liu *et al.* 2020). Si bien se desconocía la identidad de los microorganismos presentes en el sustrato de pino compostado, al igual que la forma en que estos interactuarían con los microorganismos que inoculamos. Es imprescindible estudiar la composición de los exudados radiculares de plantas nativas, y como estos cambian en respuesta al estrés, y los efectos de estos cambios en las interacciones con los distintos grupos bacterianos. El microbioma del suelo sigue siendo un espacio en el cual falta mucho por descubrir y estudiar, ya que el mismo desconocimiento de él hace que sea altamente impredecible cuando queremos comprender su interacción con las plantas, y descubrir el verdadero potencial para solucionar problemas atinentes relacionados al trabajo con plantas nativas en viveros.



CONCLUSIÓN

Hasta la fecha, todos los estudios relacionados a actividad promotora del crecimiento de las bacterias presentes en los suelos de la cordillera de los Andes han evidenciado su gran potencial biotecnológico y novedad para la detección de nuevas especies. Sin embargo, estos estudios se han concentrado principalmente en el desierto de Atacama y el altiplano, con caracterizaciones preliminares que no ahondan en el potencial benéfico. El presente trabajo enriquece la información existente relacionada a la presencia de PGPB en sistemas andinos y entrega una primera aproximación para comprender cómo varía la abundancia y los distintos

mecanismos promotores del crecimiento vegetal de bacterias abundantes presentes en los suelos de plantas de formaciones xerofíticas andinas en función del microclima.

Claramente la heterogeneidad ambiental y la identidad de la especie influyen en la abundancia y actividad de las bacterias presentes en sistemas alpinos. A pesar de haber reportado baja actividad promotora del crecimiento vegetal en las bacterias aisladas en comparación con lo que se sabe de sistemas agrícolas, es interesante resaltar cómo varían estas actividades entre laderas y cómo las especies hospederas a las que se asocian determinan la intensidad de su actividad. Estas tendencias colaboran con el conocimiento de lo poco que se sabe de las bacterias nativas de la cordillera de Los Andes. A su vez, cada vez es más claro que estas interacciones no son azarosas y dependen de las especies con las que se asocian.

Las bacterias que detectamos logran sobrevivir y tener actividad, pese al filtro ambiental que ocurre en estos sistemas. Considerando que la variación climática influye en la abundancia y actividad de las PGPB, sería apropiado considerar las condiciones en las que viven estas bacterias en los experimentos que se realizan en laboratorio, ya que probablemente las “*condiciones ideales*” para trabajos microbiológicos con bacterias no sean las mismas entre bacterias agrícolas y de sistemas naturales, y mucho menos entre bacterias alpinas y bacterias ubicadas en zonas templadas o mediterráneas al nivel del mar, probablemente bajo otras condiciones de laboratorio que consideren las temperaturas extremas, podríamos observar resultados prometedores.

En cuanto al potencial promotor del crecimiento una vez inoculadas estas bacterias de formaciones xerofíticas andinas, se esperaban otros resultados que permitieran establecer tendencias claras. Es evidente que se necesitan estudios para comprender las interacciones entre plantas y PGPB, especialmente cuando se piensa en herramientas biotecnológicas con aplicaciones prácticas. Generalmente, cuando se utilizan inóculos bacterianos estos se aplican en suelos estériles, sin considerar que en la realidad esto no ocurre. Es de suma importancia estudiar los exudados radiculares de las plantas nativas, sus cambios en respuesta al estrés, ya sea en su composición como en su actividad promotora del crecimiento vegetal. Cambios en la composición microbiana producto de la sequía repercuten en la interacción entre potenciales inóculos bacterianos y los originalmente presentes. Entender estas dinámicas, permite predecir mejor el efecto de los inóculos, más aún, considerando que posibles antagonismos ocurren en el mundo natural.

En este entorno cambiante, donde al parecer todos los ambientes tal y como los conocemos se volverán más extremos, será necesario la comprensión de las interacciones entre plantas y PGPB, las cuales no ocurren al azar y al parecer responden en primer lugar a las necesidades de la planta. Valorar estas interacciones no sólo priorizará la conservación de plantas presentes en ambientes extremos con sus microbiomas, sino también pueden ser la solución para que otras especies nativas en apuros logren sobrevivir cuando el clima se vuelva más duro.

REFERENCIAS

- Acevedo, M., Álvarez-Maldini, C., Dumroese, R. K., Bannister, J. R., Cartes, E., & González, M. (2021). Native plant production in Chile. Is it possible to achieve restoration goals by 2035? *Land*, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.3390/land10010071>
- Acuña, J. J., Campos, M., Mora, M. de la L., Jaisi, D. P., & Jorquera, M. A. (2019). ACCD-producing rhizobacteria from an Andean Altiplano native plant (*Parastrephia quadrangularis*) and their potential to alleviate salt stress in wheat seedlings. *Applied Soil Ecology*, 136(January), 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.01.005>
- Adamczyk, M., Hagedorn, F., Wipf, S., Donhauser, J., Vittoz, P., Rixen, C., Frossard, A., Theurillat, J.-P., & Frey, B. (2019). The Soil Microbiome of GLORIA Mountain Summits in the Swiss Alps. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1080. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01080>
- Adhikari, P., Jain, R., Sharma, A., & Pandey, A. (2021). Plant Growth Promotion at Low Temperature by Phosphate-Solubilizing *Pseudomonas* Spp. Isolated from High-Altitude Himalayan Soil. *Microbial Ecology*, 82(3), 677–687. <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01702-1>
- Afzal, I., Iqrar, I., Shinwari, Z. K., & Yasmin, A. (2017). Plant growth-promoting potential of endophytic bacteria isolated from roots of wild *Dodonaea viscosa* L. *Plant Growth Regulation*, 81(3), 399–408. <https://doi.org/10.1007/s10725-016-0216-5>
- Ahmad, F., Ahmad, I., & Khan, M. S. (2005). Indole Acetic Acid Production by the Indigenous Isolates of *Azotobacter* and Fluorescent *Pseudomonas* in the Presence and Absence of Tryptophan. *Turk J Biology*, 29, 29–34.
- Ai, S., Chen, J., Gao, D., & Ai, Y. (2020). Distribution patterns and drivers of artificial soil bacterial community on cut-slopes in alpine mountain area of southwest China. *Catena*, 194(April), 104695. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2020.104695>
- Alemneh, A. A., Zhou, Y., Ryder, M. H., & Denton, M. D. (2022). Soil environment influences plant growth-promotion traits of isolated rhizobacteria. *Pedobiologia*, 90(October 2021), 150785. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2021.150785>
- Álvarez-Maldini, C., Acevedo, M., Dumroese, R. K., González, M., & Cartes, E. (2020). Intraspecific Variation in Drought Response of Three Populations of *Cryptocarya alba* and *Persea lingue*, Two Native Species From Mediterranean Central Chile. *Frontiers in Plant Science*, 11(July), 1–15.
- Armesto, J. J., & Martínez, J. A. (1978). Relations between vegetation structure and slope aspect in the mediterranean region of Chile. *The Journal of Ecology*, 881-889
- Arroyo, J., Carrión, J. S., Hampe, A., & Jordano, P. (2004). La distribución de las especies a diferentes escalas espacio-temporales. *Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante*, 27-67.

Ashry, N. M., Alaidaroos, B. A., Mohamed, S. A., Badr, O. A. M., El-Saadony, M. T., & Esmael, A. (2022). Utilization of drought-tolerant bacterial strains isolated from harsh soils as a plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Utilization of drought-tolerant bacterial strains. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(3), 1760–1769. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.10.054>

Astorga-Eló, M., Zhang, Q., Larama, G., Stoll, A., Sadowsky, M. J., & Jorquera, M. A. (2020). Composition, predicted functions and co-occurrence networks of rhizobacterial communities impacting flowering desert events in the Atacama Desert, Chile. *Frontiers in Microbiology*, 11, 571.

Armada, E., Barea, J. M., Castillo, P., Roldán, A., & Azcón, R. (2015). Characterization and management of autochthonous bacterial strains from semiarid soils of Spain and their interactions with fermented agrowastes to improve drought tolerance in native shrub species. *Applied Soil Ecology*, 96, 306–318. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.08.008>

Badano, E. I., Cavieres, L. A., Molina-Montenegro, M. A., & Quiroz, C. L. (2005). Slope aspect influences plant association patterns in the Mediterranean matorral of central Chile. *Journal of Arid Environments*, 62(1), 93–108. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2004.10.012>

Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., & Vivanco, J. M. (2006). the Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions With Plants and Other Organisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57(1), 233–266. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159>

Bannister, J. R., Vargas-Gaete, R., Ovalle, J. F., Acevedo, M., Fuentes-Ramirez, A., Donoso, P. J., Promis, A., & Smith-Ramírez, C. (2018). Major bottlenecks for the restoration of natural forests in Chile. *Restoration Ecology*, 26(6), 1039–1044. <https://doi.org/10.1111/rec.12880>

Barbosa, M. S., Rodrigues, E. P., Stolf-Moreira, R., Tischer, C. A., & de Oliveira, A. L. M. (2020). Root exudate supplemented inoculant of *Azospirillum brasilense* Ab-V5 is more effective in enhancing rhizosphere colonization and growth of maize. *Environmental Sustainability*, 3(2), 187–197. doi:10.1007/s42398-020-00103-3

Bashan, Y. (1986). Significance of timing and level of inoculation with rhizosphere bacteria on wheat plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 18(3), 297–301. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0038-0717\(86\)90064-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0038-0717(86)90064-7)

Bhattacharyya, P. N., & Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1327–1350. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9>

Braun, A. C., Faßnacht, F., Valencia, D., & Sepulveda, M. (2021). Consequences of land-use change and the wildfire disaster of 2017 for the central Chilean biodiversity hotspot. *Regional Environmental Change*, 21(2). <https://doi.org/10.1007/s10113-021-01756-4>

Brockett, B. F. T., Prescott, C. E., & Grayston, S. J. (2012). Soil moisture is the major factor influencing microbial community structure and enzyme activities across seven biogeoclimatic zones in western Canada. *Soil Biology and Biochemistry*, 44(1), 9–20. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.09.003>

Buckley, E., Lee, K. C., Higgins, C. M., & Seale, B. (2019). crossm Whole-Genome Sequences of One *Arthrobacter* Strain and Desert. *Microbiology Resource Announcements*, 8(August), 18–19.

Cabrera, H. M. (2002). Ecophysiological responses of plants in ecosystems with Mediterranean-like climate and high mountain environments. *Revista Chilena de Historia Natural*, 75(3), 625-637.

Chaturvedi, P. & Shivaji, S. (2006). *Exiguobacterium indicum* sp. nov., a psychrophilic bacterium from the Hamta glacier of the Himalayan mountain ranges of India. *Int J Syst Evol Microbiol* 56, 2765–2770.

Chen, J., Luo, Y., Xia, J., Jiang, L., Zhou, X., Lu, M., Liang, J., Shi, Z., Shelton, S., & Cao, J. (2015). Stronger warming effects on microbial abundances in colder regions. *Scientific Reports*, 5, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep18032>

Chen, C., Wang, M., Zhu, J., Tang, Y., Zhang, H., Zhao, Q., Jing, M., Chen, Y., Xu, X., Jiang, J., & Shen, Z. (2022). Long-term effect of epigenetic modification in plant–microbe interactions: modification of DNA methylation induced by plant growth-promoting bacteria mediates promotion process. *Microbiome*, 10(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01236-9>

Chodak M, Golebiewski M, Morawska-Ploskonka J, Kuduk K, Niklinska M (2015) Soil chemical properties affect the reaction of forest soil bacteria to drought and rewetting stress. *Ann Microbiol* 65(3):1627–1637

Coker, C. S. (2021). Compost utilization in ornamental and nursery crop production. In *Compost Utilization in Production of Horticultural Crops* (pp. 77-84). CRC Press.

Das, K., Katiyar, V., & Goel, R. (2003). “P” solubilization potential of plant growth promoting *Pseudomonas* mutants at low temperature. *Microbiological Research*, 158(4), 359–362. <https://doi.org/10.1078/0944-5013-00217>

Dastager, S. G., Lee, J. C., Ju, Y. J., Park, D. J., & Kim, C. J. (2008). *Leifsonia bigeumensis* sp. nov., isolated from soil on Bigeum Island, Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(8), 1935–1938. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65572-0>

Dirección General de Aguas (DGA) (2022). Datos de temperatura y precipitación de las estaciones meteorológicas en el sector las Trancas y Nevados de Chillán, para los meses de enero a marzo del año 2022. Recuperado de https://snia.mop.gob.cl/dgasat/pages/dgasat_param/dgasat_param_1.jsp

Dixon, HJ, Murphy, MD, Sparks, SJ, Chávez, R., Naranjo, JA, Dunkley, & Pringle, MR (1999). La geología del volcán Nevados de Chillán, Chile. *Revista geológica de Chile*, 26 (2), 227-253.

Doll, U., Norambuena, C., & Sánchez, O. (2013). Efecto de la aplicación de IBA sobre el enraizamiento de estacas en seis especies arbustivas nativas de la región mediterránea de Chile. *Idesia (Arica)*, 31(3), 65-69.

Dsouza, M., Taylor, M. W., Turner, S. J., & Aislabie, J. (2015). Genomic and phenotypic insights into the ecology of *Arthrobacter* from Antarctic soils. *BMC Genomics*, 16(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1220-2>

Duca, D. R., & Glick, B. R. (2020). Indole-3-acetic acid biosynthesis and its regulation in plant-associated bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(20), 8607–8619. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10869-5>

Durante, M., Maseda, P. H., & Fernández, R. J. (2011). Xylem efficiency vs. safety: Acclimation to drought of seedling root anatomy for six Patagonian shrub species. *Journal of Arid Environments*, 75(5), 397–402. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2010.12.001>

Fan, S., Sun, H., Yang, J., Qin, J., Shen, D., & Chen, Y. (2021). Variations in soil enzyme activities and microbial communities along an altitudinal gradient on the eastern Qinghai–Tibetan plateau. *Forests*, 12(6), 1–14. <https://doi.org/10.3390/f12060681>

Farooq, S., Nazir, R., Ganai, B. A., Mushtaq, H., & Dar, G. J. (2022). Psychrophilic and psychrotrophic bacterial diversity of Himalayan Thajwas glacial soil, India. *Biologia*, 77(1), 203–213. <https://doi.org/10.1007/s11756-021-00915-6>

Fernández, M., & Calviño, C. I. (2019). Nueva clasificación infragenérica de *Azorella* (Apiaceae, Azorelloideae) y sinopsis del subgénero *Andinae*. *Darwiniana*, nueva serie, 7(2), 289-304.

Franche, C., Lindström, K., & Elmerich, C. (2009). Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and Soil*, 321(1–2), 35–59. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9833-8>

Fuentes, A., Herrera, H., Charles, T. C., & Arriagada, C. (2020). Fungal and bacterial microbiome associated with the rhizosphere of native plants from the atacama desert. *Microorganisms*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020209>

Gang, S., Sharma, S., Saraf, M., Buck, M., & Schumacher, J. (2019). Analysis of indole-3-acetic acid (IAA) production in *Klebsiella* by LC-MS/MS and the Salkowski method. *Bio-Protocol*, 9(9), 1–9. <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.3230>

Ganzert, L., Bajerski, F., Mangelsdorf, K., Lipski, A., & Wagner, D. (2011). *Leifsonia psychrotolerans* sp. nov., a psychrotolerant species of the family microbacteriaceae from Livingston Island, Antarctica. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(8), 1938–1943. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.021956-0>

Georgieva, T., Evstatieva, Y., Savov, V., Bratkova, S., & Nikolova, D. (2018). Assessment of plant growth promoting activities of five rhizospheric *Pseudomonas* strains. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 16, 285-292.

Glick, B. R., Todorovic, B., Czarny, J., Cheng, Z., Duan, J., & McConkey, B. (2007). Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 26(5-6), 227-242.

Glick, B. R. (2012). *Plant Growth-Promoting Bacteria : Mechanisms and Applications*. 2012.

Glick, B. R., & Gamalero, E. (2021). Recent developments in the study of plant microbiomes. *Microorganisms*, 9(7), 1–18. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071533>

Goldstein, R. M., Mallory, L. M., & Alexander, M. (1985). Reasons for possible failure of inoculation to enhance biodegradation. *Applied and environmental microbiology*, 50(4), 977-983.

Golluscio, R. A., Cavagnaro, F. P., & Valenta, M. D. (2011). Arbustos de la estepa patagónica: ¿adaptados a tolerar la sequía o el pastoreo? *Ecología Austral*, 21(1), 61–70.

González-Ferrán, O. 1995. *Volcanes de Chile*. Editorial IGM, Santiago de Chile. 640 pp

Gupta, S., & Pandey, S. (2019). ACC Deaminase Producing Bacteria With Multifarious Plant Growth Promoting Traits Alleviates Salinity Stress in French Bean (*Phaseolus vulgaris*) Plants. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1506. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01506>

Gutiérrez, J. R., & Squeo, F. A. (2004). Importancia de los arbustos en los ecosistemas semiáridos de Chile. *Ecosistemas*, 13(1).

Hale, M. G., & Moore, L. D. (1980). Factors Affecting Root Exudation II: 1970–1978 (N. C. B. T.-A. in A. Brady (ed.); Vol. 31, pp. 93–124). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60137-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60137-6)

Haselwandter, K., Hofmann, A., Holzmann, H. P., & Read, D. J. (1983). Availability of nitrogen and phosphorus in the nival zone of the Alps. *Oecologia*, 57(1–2), 266–269. <https://doi.org/10.1007/BF00379589>

Hashem, H. A., & Mohamed, A. H. (2020). Strategies for drought tolerance in xerophytes. In *Plant Ecophysiology and Adaptation under Climate Change: Mechanisms and Perspectives I* (pp. 269-293). Springer, Singapore.

Hechenleitner, VP, Gardner, MF, Thomas, PI y Brownless, P. (2005). *Plantas amenazadas del centro-sur de Chile: distribución, conservación y propagación*. Valdivia, Chile: Trama Impresores SA.

Herlina, L., Pukan, K. K., & Mustikaningtyas, D. (2017). The endophytic bacteria producing IAA (Indole Acetic Acid) in *Arachis hypogaea*. *Cell Biology and Development*, 1(1), 31–35. <https://doi.org/10.13057/cellbioldev/v010106>

Hijmans, R. J., Cameron, S. E., Parra, J. L., Jones, P. G., & Jarvis, A. (2005). Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International*

Journal of Climatology: A Journal of the Royal Meteorological Society, 25(15), 1965-1978.

Honma, M., & Shimomura, T. (1978). Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Agricultural and Biological Chemistry*, 42(10), 1825-1831.

Hontzeas, N., Hontzeas, C. E., & Glick, B. R. (2006). Reaction mechanisms of the bacterial enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Biotechnology advances*, 24(4), 420-426.

Horwath, W. (2007). Carbon cycling and formation of soil organic matter. In *Soil microbiology, ecology and biochemistry* (pp. 303-339). Academic Press.

Hussein, K. A., & Joo, J. H. (2015). Isolation and characterization of rhizomicrobial isolates for phosphate solubilization and indole acetic acid production. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 58(6), 847–855. <https://doi.org/10.1007/s13765-015-0114-y>

Jorquera, M. A., Maruyama, F., Ogram, A. V., Navarrete, O. U., Lagos, L. M., Inostroza, N. G., Acuña, J. J., Rilling, J. I., & de La Luz Mora, M. (2016). Rhizobacterial Community Structures Associated with Native Plants Grown in Chilean Extreme Environments. *Microbial Ecology*, 72(3), 633–646. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0813-x>

Joshi, P., Joshi, G. K., Tanuja, Mishra, P. K., Bisht, J. K., & Bhatt, J. C. (2014). Diversity of Cold Tolerant Phosphate Solubilizing Microorganisms from North Western Himalayas. https://doi.org/10.1007/978-3-319-05936-5_10

Kadioglu, G. B., Koseoglu, M. S., Ozdal, M., Sezen, A., Ozdal, O. G., & Algur, O. F. (2018). Isolation of cold tolerant and ACC Deaminase producing Plant Growth Promoting Rhizobacteria from High Altitudes. *Romanian Biotechnological Letters*, 23(2), 13479–13486.

Kang, S. M., Asaf, S., Kim, S. J., Yun, B. W., & Lee, I. J. (2016). Complete genome sequence of plant growth-promoting bacterium *Leifsonia xyli* SE134, a possible gibberellin and auxin producer. *Journal of biotechnology*, 239, 34-38.

Kanu, S., & Dakora, F. D. (2009). Thin-layer chromatographic analysis of lumichrome, riboflavin and indole acetic acid in cell-free culture filtrate of *Psoralea nodule* bacteria grown at different pH, salinity and temperature regimes. *Symbiosis*, 48(1–3), 173–181. <https://doi.org/10.1007/BF03179996>

Kieft, T. L., Amy, P. S., Brockman, F. J., Fredrickson, J. K., Bjornstad, B. N., & Rosacker, L. L. (1993). Microbial abundance and activities in relation to water potential in the vadose zones of arid and semiarid sites. *Microbial ecology*, 26(1), 59-78.

Kitajima, M., & Butler, W. L. (1975). Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 376(1), 105–115. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0005-2728\(75\)90209-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0005-2728(75)90209-1)

- Kong, Z., & Glick, B. R. (2017). The role of plant growth-promoting bacteria in metal phytoremediation. *Advances in microbial physiology*, 71, 97-132.
- Körner, C. (2004). Mountain biodiversity, its causes and function. *Ambio*, 33(SPEC. ISS. 13), 11–17. <https://doi.org/10.1007/0044-7447-33.sp13.11>
- Körner C, Ohsawa M. (2005) Mountain Systems. In: Hassan R, Scholes R, Ash N (eds) *Ecosystems and human well-being: current state and trends*, vol 1. Island press, Washington DC, pp 681–716
- Körner, C. (2011). Coldest places on earth with angiosperm plant life. *Alp. Bot.* 121, 11–22. doi: 10.1007/s00035-011-0089-1
- Körner, C. (2021). Life under and in snow: protection and limitation. In *Alpine Plant Life*. https://doi.org/10.1007/978-3-030-59538-8_5
- Kumar, A., Pandey, A. K., Singh, S. S., Shanker, R., & Dhawan, A. (2011). Cellular uptake and mutagenic potential of metal oxide nanoparticles in bacterial cells. *Chemosphere*, 83(8), 1124-1132.
- Kumar, A., Kumari, M., Swarupa, P., & Shireen. (2019). Characterization of pH dependent growth response of agriculturally important microbes for development of plant growth promoting bacterial consortium. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 13(2), 1053–1061. <https://doi.org/10.22207/JPAM.13.2.43>
- Kumar, N., Kumar, A., Jeena, N., Singh, R., & Singh, H. (2020). Factors Influencing Soil Ecosystem and Agricultural Productivity at Higher Altitudes. https://doi.org/10.1007/978-981-15-1902-4_4
- Lahsini, A., Sallami, A., Ait-ouakrim, E. H., El, H., Obtel, M., Douira, A., El, C., Benkerroum, N., Talbi, C., Chakhchar, A., & Filali-maltouf, A. (2022). Rhizosphere Isolation and molecular identification of an indigenous abiotic stress-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria from the rhizosphere of the olive tree in southern Morocco. *Rhizosphere*, 23(June), 100554. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2022.100554>
- Landrum, L. R. (1999). Revision of *Berberis* (Berberidaceae) in Chile and adjacent southern Argentina. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 793-834.
- Larcher W, Kainmüller C, Wagner J (2010) Survival types of high mountain plants under extreme temperatures. *Flora* 205:3–18
- Lee, S., & Lim, H. (2019). Review of statistical methods for survival analysis using genomic data. *Genomics & informatics*, 17(4).
- Li, J., Li, C., Kou, Y., Yao, M., He, Z., & Li, X. (2020). Distinct mechanisms shape soil bacterial and fungal co-occurrence networks in a mountain ecosystem. *FEMS Microbiology Ecology*, 96(4), 1–12. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa030>
- Liengen, T. (1999). Environmental factors influencing the nitrogen fixation activity of free-living terrestrial cyanobacteria from a high arctic area, Spitsbergen. *Canadian Journal of Microbiology*, 45(7), 573–581. <https://doi.org/10.1139/w99-040>

Liu, H., Brettell, L. E., Qiu, Z., & Singh, B. K. (2020). Microbiome-Mediated Stress Resistance in Plants. *Trends in Plant Science*, 25(8), 733–743. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.03.014>

López-Angulo, J., Pescador, D. S., Sánchez, A. M., Luzuriaga, A. L., Cavieres, L. A., & Escudero, A. (2019). Alpine vegetation dataset from three contrasting mountain ranges differing in climate and evolutionary history. *Data in Brief*, 27. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2019.104816>

Majeed, A., Muhammad, Z., & Ahmad, H. (2018). Plant growth promoting bacteria: role in soil improvement, abiotic and biotic stress management of crops. *Plant cell reports*, 37(12), 1599-1609.

Maldonado, J. E., Gaete, A., Mandakovic, D., Aguado-Norese, C., Aguilar, M., Gutiérrez, R. A., & González, M. (2022). Partners to survive: Hoffmannseggia doellii root-associated microbiome at the Atacama Desert. *New Phytologist*, 234(6), 2126–2139. <https://doi.org/10.1111/nph.18080>

Måren, I. E., Karki, S., Prajapati, C., Yadav, R. K., & Shrestha, B. B. (2015). Facing north or south: Does slope aspect impact forest stand characteristics and soil properties in a semiarid trans-Himalayan valley? *Journal of Arid Environments*, 121, 112–123. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2015.06.004>

Martins, J., Batail, N., Silva, S., Rafik-Clement, S., Chaumonnot, A., Uzio, D., Nguyen, T. S., & Piccolo, L. (2015). Improving the catalytic performances of metal nanoparticles by combining shape control and encapsulation. *Applied Catalysis A: General*, 504, 504–508. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apcata.2014.11.034>

Maza, F., Maldonado, J., Vásquez-Dean, J., Mandakovic, D., Gaete, A., Cambiazo, V., & González, M. (2019). Soil bacterial communities from the Chilean Andean highlands: Taxonomic composition and culturability. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7(FEB). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00010>

McMaster, G. S., & Wilhelm, W. W. (1997). Growing degree-days: one equation, two interpretations. *Agricultural and forest meteorology*, 87(4), 291-300.

Mhete, M., Eze, P. N., Rahube, T. O., & Akinyemi, F. O. (2020). Soil properties influence bacterial abundance and diversity under different land-use regimes in semi-arid environments. *Scientific African*, 7, e00246. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00246>

Ministerio de Medio Ambiente (Chile), MMA. (2022). Revisión de la categoría de conservación de la especie nativa *Gomortega keule* (Molina) Baill.) Recuperado de http://especies.mma.gob.cl/CNMWeb/Web/WebCiudadana/ficha_indepen.aspx?EspecieId=27&Version=1

Miranda, A., Altamirano, A., Cayuela, L., Lara, A., & González, M. (2017). Native forest loss in the Chilean biodiversity hotspot: revealing the evidence. *Regional Environmental Change*, 17(1), 285–297. <https://doi.org/10.1007/s10113-016-1010-7>

Mohite, B. (2013). Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 13(3), 638–649. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162013005000051>

Molina-Montenegro, M. A., Osés, R., Atala, C., Torres-Díaz, C., Bolados, G., & León-Lobos, P. (2016). Nurse effect and soil microorganisms are key to improve the establishment of native plants in a semiarid community. *Journal of Arid Environments*, 126, 54–61. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2015.10.016>

Molina-Romero D, Baez A, Quintero-Hernández V, Castañeda-Lucio M, Fuentes-Ramírez LE, Bustillos-Cristales MdR, Rodríguez-Andrade O, Morales-García YE, Munive A, Muñoz-Rojas J (2017) Compatible bacterial mixture, tolerant to desiccation, improves maize plant growth. *PLoS ONE* 12(11): e0187913. doi: 10.1371/journal.pone.0187913

Mujahid, T. Y., Subhan, S. A., Wahab, A., Masnoon, J., Ahmed, N., & Abbas, T. (2015). Effects of different physical and chemical parameters on phosphate solubilization activity of plant growth promoting bacteria isolated from indigenous soil. *Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences*, 5(1), 64–70.

Muñoz-Concha, D., & Davey, M. R. (2011). Micropropagation of the endangered Chilean tree, *Gomortega keule*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 47(1), 170–175. <https://doi.org/10.1007/s11627-010-9331-6>

Navarrete AG (2006) Estado de desarrollo ex situ de quillay (*Quillaja saponaria* Mol.), keule (*Gomortega keule* (Mol.) Baillon) y belloto del sur (*Beilschmiedia berteriana* (Gay) Kosterm.) en Valdivia. Tesis, Universidad Austral de Chile, Chile

Naylor, D. y Coleman-Derr, D. (2018). Estrés por sequía y comunidades bacterianas asociadas a las raíces. *Fronteras en la ciencia de las plantas* , 8 , 2223.

Núñez, C. I., Aizen, M. A., & Ezcurra, C. (1999). Species associations and nurse plant effects in patches of high-Andean vegetation. *Journal of Vegetation Science*, 10(3), 357-364.

Ostonen, I., Püttsepp, Ü., Biel, C., Alberton, O., Bakker, M. R., Lõhmus, K., Majdi, H., Metcalfe, D., Olsthoorn, A. F. M., Pronk, A., Vanguelova, E., Weih, M., & Brunner, I. (2007). Specific root length as an indicator of environmental change. *Plant Biosystems*, 141(3), 426–442. <https://doi.org/10.1080/11263500701626069>

Orozco-Mosqueda, M. del C., Flores, A., Rojas-Sánchez, B., Urtis-Flores, C. A., Morales-Cedeño, L. R., Valencia-Marin, M. F., Chávez-Avila, S., Rojas-Solis, D., & Santoyo, G. (2021). Plant growth-promoting bacteria as bioinoculants: Attributes and challenges for sustainable crop improvement. *Agronomy*, 11(6), 1–15. <https://doi.org/10.3390/agronomy11061167>

Pagano, M. C., Lugo, M., Araújo, F., Ferrero, M., Menoyo, E., & Steinaker, D. (2012). Native species for restoration and conservation of biodiversity in South America. *Native Species: Identification, Conservation and Restoration*, 1-55.

Pande, A., Pandey, P., Mehra, S., Singh, M., & Kaushik, S. (2017). Phenotypic and genotypic characterization of phosphate solubilizing bacteria and their efficiency on the growth of maize. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(2), 379–391. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.06.005>

Pandey, A., & Yarzabal, L. A. (2019). Bioprospecting cold-adapted plant growth promoting microorganisms from mountain environments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(2), 643–657. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9515-2>

Penrose, D. M., & Glick, B. R. (2003). Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia Plantarum*, 118(1), 10–15. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2003.00086.x>

Pérez-Harguindeguy, N., Díaz, S., Garnier, E., Lavorel, S., Poorter, H., Jaureguiberry, P., Bret-Harte, M. S., Cornwell, W. K., Craine, J. M., Gurvich, D. E., Urcelay, C., Veneklaas, E. J., Reich, P. B., Poorter, L., Wright, I. J., Ray, P., Enrico, L., Pausas, J. G., de Vos, A. C., Cornelissen, J. H. C. (2013). New handbook for standardised measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany*, 61(3), 167–234. <https://doi.org/10.1071/BT12225>

Pérez-Jaramillo, J. E., Carrión, V. J., de Hollander, M., & Raaijmakers, J. M. (2018). The wild side of plant microbiomes. *Microbiome*, 6(1), 4–9. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0519-z>

Pfanzelt, S., Grau, J., & Rodríguez, R. (2008). A Vegetation Map of Nevados De Chillan Volcanic Complex, Bio-Bio Region, Chile. *Gayana. Botánica*, 65(2), 209–219. doi:10.4067/s0717-66432008000200007

Pietragalla, J., & Pask, A. (2012). Stomatal conductance. *Physiological breeding II: a field guide to wheat phenotyping*. A. Pask, J. Pietragalla, D. Mullan & M. Reynolds (eds.). México, CIMMYT, 15-17.

Polle, A. (1996). 17 - Protection from Oxidative Stress in Trees as Affected by Elevated CO₂ and Environmental Stress. In G. W. Koch & H. A. Mooney (Eds.), *Carbon Dioxide and Terrestrial Ecosystems* (pp. 299–315). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012505295-5/50018-5>

Qi, Y., Wei, W., Chen, C., & Chen, L. (2019). Plant root-shoot biomass allocation over diverse biomes: A global synthesis. *Global Ecology and Conservation*, 18, e00606. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00606>

Rahman, I. U., Afzal, A., Iqbal, Z., Hart, R., Abd_Allah, E. F., Alqarawi, A. A., Alsubeie, M. S., Calixto, E. S., Ijaz, F., Ali, N., Kausar, R., Shah, M., & Bussmann, R. W. (2020). Response of plant physiological attributes to altitudinal gradient: Plant adaptation to temperature variation in the Himalayan region. *Science of the Total Environment*, 706, 135714. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135714>

Raaijmakers, J. M., Paulitz, T. C., Steinberg, C., Alabouvette, C., & Moëgne-Loccoz, Y. (2009). The rhizosphere: A playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and Soil*, 321(1–2), 341–361. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9568-6>

Ramakrishna, W., Yadav, R., & Li, K. (2019). Plant growth promoting bacteria in agriculture: Two sides of a coin. *Applied Soil Ecology*, 138(March), 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.02.019>

Rawat, P., Das, S., Shankhdhar, D., & Shankhdhar, S. C. (2021). Phosphate-Solubilizing Microorganisms: Mechanism and Their Role in Phosphate Solubilization and Uptake. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 21(1), 49–68. <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00342-7>

Reddy, G. S. N., Prabakaran, S. R., & Shivaji, S. (2008). *Leifsonia pindariensis* sp. nov., isolated from the Pindari glacier of the Indian Himalayas, and emended description of the genus *Leifsonia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(9), 2229–2344. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65715-0>

Rodríguez, R. (1988). *Arboles chilenos para ornamentacion. cola. Gomortega queule (Mol.) Baillón.*

Rodríguez-Echeverría, S., Delgado-Baquerizo, M., Morillo, J. A., Gaxiola, A., Manzano, M., Marquet, P. A., & Armas, C. (2021). Azorella cushion plants and aridity are important drivers of soil microbial communities in Andean ecosystems. *Ecosystems*, 24(7), 1576-1590.

Rodríguez, Roberto, Grau, Jürke, Baeza, Carlos, & Davies, Alison. (2008). Lista comentada de las plantas vasculares de los Nevados de Chillán, CHILE. *Gayana. Botánica*, 65(2), 153-197. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-66432008000200005>

Rodríguez, R., Marticorena, C., Alarcón, D., Baeza, C., Cavieres, L., Finot, V. L., Fuentes, N., Kiessling, A., Mihoc, M., Pauchard, A., Ruiz, E., Sanchez, P., & Marticorena, A. (2018). Catálogo de las plantas vasculares de Chile. *Gayana. Botánica*, 75(1), 1–430. <https://doi.org/10.4067/s0717-66432018000100001>

Rousk, J., Bååth, E., Brookes, P. C., Lauber, C. L., Lozupone, C., Caporaso, J. G., Knight, R., & Fierer, N. (2010). Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *The ISME Journal*, 4(10), 1340–1351. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.58>

Rousk, K., Sorensen, P. L., & Michelsen, A. (2018). What drives biological nitrogen fixation in high arctic tundra: Moisture or temperature. *Ecosphere*, 9(2). <https://doi.org/10.1002/ecs2.2117>

Rozzi, R., Arroyo, M. K., & Armesto, J. J. (1997). Ecological factors affecting gene flow between populations of *Anarthrophyllum cumingii* (Papilionaceae) growing on equatorial-and polar-facing slopes in the Andes of Central Chile. *Plant Ecology*, 132(2), 171-179.

Ruberto, L. A. M., Vazquez, S., Lobalbo, A., & Mac Cormack, W. P. (2005). Psychrotolerant hydrocarbon-degrading *Rhodococcus* strains isolated from polluted Antarctic soils. *Antarctic Science*, 17(1), 47–56. <https://doi.org/10.1017/S0954102005002415>

Rui, J., Hu, J., Wang, F., Zhao, Y., & Li, C. (2022). Altitudinal niches of symbiotic, associative and free-living diazotrophs driven by soil moisture and temperature in

the alpine meadow on the Tibetan Plateau. *Environmental Research*, 211(February), 113033. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113033>

Rumpf, S. B., Hülber, K., Klöner, G., Moser, D., Schütz, M., Wessely, J., Willner, W., Zimmermann, N. E., & Dullinger, S. (2018). Range dynamics of mountain plants decrease with elevation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(8), 1848–1853. <https://doi.org/10.1073/pnas.1713936115>

Sáez, D. E. (2010). Formaciones xerofíticas: un análisis de su presencia en la Ley de Bosque Nativo.

San Martín, P. (2014). Reserva de la Biosfera Corredor Biológico Nevados de Chillán–Laguna del Laja: de la amenaza de la extinción al desarrollo sustentable. *Reservas de la Biosfera de Chile: Laboratorios para la Sustentabilidad*, edited by: Moreira-Muñoz, A. and Borsdorf, A., Academia de Ciencias Austríaca, Pontificia Universidad Católica de Chile, Instituto de Geografía, Santiago, serie Geolibros, 17, 146-160.

Santacruz-Calvo, L., González-López, J., & Manzanera, M. (2013). *Arthrobacter siccitolerans* sp. nov., a highly desiccation-tolerant, xeroprotectant-producing strain isolated from dry soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(PART 11), 4174–4180. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.052902-0>

Sardans, J., & Peñuelas, J. (2007). Drought changes phosphorus and potassium accumulation patterns in an evergreen Mediterranean forest. *Functional Ecology*, 21(2), 191-201.

Scherrer, D., & Körner, C. (2011). Topographically controlled thermal-habitat differentiation buffers alpine plant diversity against climate warming. *Journal of biogeography*, 38(2), 406-416

Schoebitz, M., Ceballos, C., & Ciampi, L. (2013). Effect of immobilized phosphate solubilizing bacteria on wheat growth and phosphate uptake. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 13(1), 1–10. <https://doi.org/10.4067/s0718-95162013005000001>

Selvakumar, G., Kundu, S., Joshi, P., Nazim, S., Gupta, A. D., Mishra, P. K., & Gupta, H. S. (2008). Characterization of a cold-tolerant plant growth-promoting bacterium *Pantoea dispersa* 1A isolated from a sub-alpine soil in the North Western Indian Himalayas. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(7), 955–960. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9558-5>

Senthilkumar, M., Amaresan, N., & Sankaranarayanan, A. (2021). Estimation of Malondialdehyde (MDA) by Thiobarbituric Acid (TBA) Assay. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1080-0_25

Sezen, A., Ozdal, M., Kubra, K. O. C., & Algur, O. F. (2016). Isolation and characterization of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and their effects on improving growth of wheat. *Journal of Applied Biological Sciences*, 10(1), 41-46.

Shin, Y., Lee, B. H., Lee, K. E., & Park, W. (2020). *Pseudarthrobacter psychrotolerans* sp. Nov., a cold-adapted bacterium isolated from antarctic soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(12), 6106–6114. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004505>

Sierra-Almeida, A., Reyes-Bahamonde, C., & Cavieres, L. A. (2016). Drought increases the freezing resistance of high-elevation plants of the Central Chilean Andes. *Oecologia*, 181(4), 1011–1023. <https://doi.org/10.1007/s00442-016-3622-5>

Sklenář, P., Romoleroux, K., Muriel, P., Jaramillo, R., Bernardi, A., Diazgranados, M., & Moret, P. (2021). Distribution changes in páramo plants from the equatorial high Andes in response to increasing temperature and humidity variation since 1880. *Alpine Botany*, 131(2), 201–212. <https://doi.org/10.1007/s00035-021-00270-x>

Siles, J. A., & Margesin, R. (2016). Abundance and Diversity of Bacterial, Archaeal, and Fungal Communities Along an Altitudinal Gradient in Alpine Forest Soils: What Are the Driving Factors? *Microbial Ecology*, 72(1), 207–220. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0748-2>

Sinegani, A. A. S., & Younessi, N. (2017). Antibiotic resistance of bacteria isolated from heavy metal-polluted soils with different land uses. *Journal of global antimicrobial resistance*, 10, 247-255.

Smith-Ramírez, C., González, M. E., Echeverría, C., & Lara, A. (2015). Estado actual de la restauración ecológica en Chile, perspectivas y desafíos: Current state of ecological restoration in Chile: Perspectives and challenges. In *Anales del Instituto de la Patagonia* (Vol. 43, No. 1, pp. 11-21). Universidad de Magallanes.

Squeo, F. A.; Arancio, G; Gutiérrez, J. R; Letelier, L; Arroyo, M. T. K; León-Lobos, P; Y, Rentería-Arrieta, L (2008): ,Flora amenazada de la Región de Atacama y estrategias para su conservación. Anexo acuerdos taller de la Ley de Bosque Nativo de la Macrozona Norte. Ediciones de la Universidad de La Serena, pp. 71-72

Stres, B., Danevčič, T., Pal, L., Fuka, M. M., Resman, L., Leskovec, S., Hacin, J., Stopar, D., Mahne, I., & Mandic-Mulec, I. (2008). Influence of temperature and soil water content on bacterial, archaeal and denitrifying microbial communities in drained fen grassland soil microcosms. *FEMS Microbiology Ecology*, 66(1), 110–122. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00555.x>

Tang, Z., Fang, J., Chi, X., Feng, J., Liu, Y., Shen, Z., Wang, X., Wang, Z., Wu, X., Zheng, C. and Gaston, K.J. (2012), Patterns of plant beta-diversity along elevational and latitudinal gradients in mountain forests of China. *Ecography*, 35: 1083-1091. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.2012.06882.x>

Varas, B., Castro, M. H., Rodriguez, R., Von Baer, D., Mardones, C., & Hinrichsen, P. (2013). Identification and characterization of microsattellites from calafate (*Berberis microphylla*, Berberidaceae). *Applications in plant sciences*, 1(7), 1200003.

Vega-Celedón, P., Bravo, G., Velásquez, A., Cid, F. P., Valenzuela, M., Ramírez, I., Vasconez, I. N., Álvarez, I., Jorquera, M. A., & Seeger, M. (2021). Microbial diversity

of psychrotolerant bacteria isolated from wild flora of andes mountains and patagonia of chile towards the selection of plant growth-promoting bacterial consortia to alleviate cold stress in plants. *Microorganisms*, 9(3), 1–28. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030538>

Viale, M., Bianchi, E., Cara, L., Ruiz, L. E., Villalba, R., Pitte, P., ... & Zalazar, L. (2019). Contrasting climates at both sides of the Andes in Argentina and Chile. *Frontiers in Environmental Science*, 7, 69.

Viruel, E., Lucca, M. E., & Siñeriz, F. (2011). Plant growth promotion traits of phosphobacteria isolated from Puna, Argentina. *Archives of Microbiology*, 193(7), 489–496. <https://doi.org/10.1007/s00203-011-0692-y>

Vives-Peris, V., Molina, L., Segura, A., Gómez-Cadenas, A., & Pérez-Clemente, R. M. (2018). Root exudates from citrus plants subjected to abiotic stress conditions have a positive effect on rhizobacteria. *Journal of Plant Physiology*, 228(January), 208–217. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.06.003>

Wakelin, S. A., Gupta, V. V. S. R., & Forrester, S. T. (2010). Regional and local factors affecting diversity, abundance and activity of free-living, N₂-fixing bacteria in Australian agricultural soils. *Pedobiologia*, 53(6), 391–399. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2010.08.001>

Wang, C., Michalet, R., Liu, Z., Jiang, X., Wang, X., Zhang, G., An, L., Chen, S., & Xiao, S. (2020). Disentangling Large- and Small-Scale Abiotic and Biotic Factors Shaping Soil Microbial Communities in an Alpine Cushion Plant System. *Frontiers in Microbiology*, 11(May), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00925>

Widawati, S., & Suliasih, S. (1970). The population of phosphate solubilizing bacteria (PSB) from Cikaniki, Botol Mountain, and Ciptarasa Area, and the ability of PSB to solubilize insoluble P in solid pikovskaya medium. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 7(2), 109–113. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d070203>

Xiong, Y. W., Li, X. W., Wang, T. T., Gong, Y., Zhang, C. M., Xing, K., & Qin, S. (2020). Root exudates-driven rhizosphere recruitment of the plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus flexus* KLBMP 4941 and its growth-promoting effect on the coastal halophyte *Limonium sinense* under salt stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 194(November 2019), 110374. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110374>

Xun, W., Huang, T., Zhao, J., Ran, W., Wang, B., Shen, Q., & Zhang, R. (2015). Environmental conditions rather than microbial inoculum composition determine the bacterial composition, microbial biomass and enzymatic activity of reconstructed soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 90, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.07.018>

Yadav, A. N., Sachan, S. G., Verma, P., & Saxena, A. K. (2015). Prospecting cold deserts of north western Himalayas for microbial diversity and plant growth promoting attributes. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119(6), 683–693. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.11.006>

Yang, J., El-Kassaby, Y. A., & Guan, W. (2020). The effect of slope aspect on vegetation attributes in a mountainous dry valley, Southwest China. *Scientific Reports*, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73496-0>

Yarzabal, LA (2014). Microorganismos solubilizadores de fosfato tolerantes al frío y desarrollo agrícola en regiones montañosas del mundo. En *Microorganismos solubilizadores de fosfatos* (págs. 113-135). Springer, Cham.

Youssef, R. A., & Chino, M. (1989). Root-induced changes in the rhizosphere of plants. I. pH changes in relation to the bulk soil. *Soil Science and Plant Nutrition*, 35(3), 461–468. <https://doi.org/10.1080/00380768.1989.10434779>

Zapata, N., Guerrero, F., & Polo, A. (2005). Evaluación de corteza de pino y residuos urbanos como componentes de sustratos de cultivo. *Agricultura Técnica*, 65(4), 378-387.

Zeng, X. H., Zhang, W. J., Song, Y. G., & Shen, H. T. (2014). Slope aspect and slope position have effects on plant diversity and spatial distribution in the hilly region of Mount Taihang, North China. *J. Food Agric. Environ.*, 12, 391-397



ANEXOS

Anexo 1. Detalle de análisis estadístico de varianza de medidas repetidas para la Eficiencia fotoquímica máxima del PSII (Fv/Fm), para los tratamientos riego (a) y sequía (b).

a.

| Efecto | Análisis de varianza de medidas repetidas de Fv/Fm para riego | | | | |
|---------------------|--|----------------|--------|---------|------|
| | Parametrización Sigma-restrictiva | | | | |
| | Descomposición efectiva de hipótesis | | | | |
| | SS | G. de libertad | MS | F | p |
| Intercepción | 292.01 | 1 | 292.01 | 10783.8 | 0 |
| Tipo de Inoculación | 0.0009 | 2 | 0.004 | 0.16 | 0.85 |
| Error | 0.6 | 22 | 0.027 | | |
| Fecha | 0.37 | 21 | 0.018 | 5.93 | 0 |
| Fecha*Inoculo | 0.15 | 42 | 0.004 | 1.21 | 0.18 |
| Error | 1.39 | 462 | 0.003 | | |

b.

| Efecto | Análisis de varianza de medidas repetidas para de Fv/Fm para sequía Parametrización Sigma-restrictiva Descomposición efectiva de hipótesis | | | | |
|------------------------|---|-------------------|--------|--------|-------|
| | SS | G. de libertad | MS | F | p |
| Intercepción | 293.42 | 1 | 293.4 | 9395.8 | 0 |
| Tipo de Inoculación | 0.02 | 2 | 0.0128 | 0.41 | 0.67 |
| Error | 0.71 | 23 | 0.0312 | | |
| Fecha | 1.43 | 21 | 0.068 | 10.613 | 0 |
| Fecha*Inoculo | 0.44 | 42 | 0.0107 | 1.66 | 0.007 |
| Error | 3.1 | 483 | 0.0064 | | |

Anexo 2. Detalle de análisis estadístico de varianza de medidas repetidas para la Conductancia estomática.

| Efecto | Análisis de varianza de medidas repetidas para conductancia estomática Parametrización Sigma-restrictiva Descomposición efectiva de hipótesis | | | | |
|---------------------------------------|--|----------------|--------|--------|---------|
| | SS | G. de libertad | MS | F | p |
| Intercepción | 1506767 | 1 | 156767 | 133.84 | 0 |
| Tratamiento | 25676 | 1 | 25676 | 2.28 | 0.15 |
| Tipo de Inoculación | 34740 | 2 | 17370 | 1.54 | 0.24 |
| Tratamiento*Tipo de Inoculación | 28155 | 2 | 14077 | 1.25 | 0.31 |
| Error | 258926 | 23 | 11258 | | |
| Fecha | 27439 | 7 | 3920 | 5.72 | 0.00001 |
| Fecha*Tratamiento | 12539 | 7 | 1791 | 2.61 | 0.01 |
| Fecha*Tipo de Inoculación | 6571 | 14 | 469 | 0.69 | 0.79 |
| Fecha*Tratamiento*Tipo de Inoculación | 8348 | 14 | 596 | 0.8699 | 0.59 |
| Error | 110354 | 161 | 685 | | |

Anexo 3. Análisis univariado para el número de hojas (a) y LSD test (b).

a.

| Efecto | Análisis univariado para número de hojas | | | | |
|----------------------|--|----------------|---------|-------|-------|
| | Parametrización Sigma-restrictiva | | | | |
| | Descomposición efectiva de hipótesis | | | | |
| | SS | G. de libertad | MS | F | p |
| Intercepción | 570.9 | 1 | 5708985 | 71.44 | 0 |
| Tipo de Inoculación | 19.14 | 2 | 9.56 | 1.12 | 0.31 |
| Tratamiento | 5.09 | 1 | 5.09 | 0.64 | 0.43 |
| Tipo de Inoculación* | 130.37 | 2 | 65.19 | 8.16 | 0.001 |
| Tratamiento | | | | | |
| Error | 351.6111 | 44 | 7.99 | | |



b.

| Efecto | | Prueba LSD para el número de hojas | | | | | | |
|-----------------|--------------|------------------------------------|-------|-------|--------|--------|-------|--------|
| | | Prueba post hoc | | | | | | |
| | | MS=7.9912, grados de libertad=44 | | | | | | |
| Tipo de Inóculo | | Riego | (1) | (2) | (3) | (4) | (5) | (6) |
| | | | 2.875 | 2.125 | 2.1111 | 5.4444 | 6.125 | 1.6250 |
| 1 | PACC | Riego | | 0.6 | 0.58 | 0.07 | 0.03 | 0.38 |
| 2 | PACC | Sequía | 0.60 | | 0.99 | 0.02 | 0.007 | 0.73 |
| 3 | NIAA | Riego | 0.58 | 0.99 | | 0.02 | 0.01 | 0.73 |
| 4 | NIAA | Sequía | 0.07 | 0.02 | 0.02 | | 0.62 | 0.01 |
| 5 | Sin bacteria | Riego | 0.03 | 0.007 | 0.01 | 0.62 | | 0.003 |
| 6 | Sin bacteria | Sequía | 0.38 | 0.73 | 0.73 | 0.01 | 0.003 | |

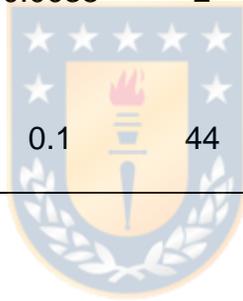
Anexo 4. Análisis univariado para el área específica de la hoja (SLA).

| Efecto | Análisis univariado para SLA | | | | |
|--------------------------------------|-----------------------------------|----------------|--------|---------|------|
| | Parametrización Sigma-restrictiva | | | | |
| Descomposición efectiva de hipótesis | | | | | |
| | SS | G. de libertad | MS | F | p |
| Intercepción | 152.57 | 1 | 152.57 | 1070.02 | 0 |
| Tipo de Inoculación | 0.14 | 2 | 0.07 | 0.48 | 0.62 |
| Tratamiento | 0.004 | 1 | 0.004 | 0.03 | 0.87 |
| Tipo de Inoculación* | 0.45 | 2 | 0.23 | 1.58 | 0.22 |
| Tratamiento | | | | | |
| Error | 5.99 | 42 | 0.14 | | |



Anexo 5. Análisis univariado para LA Longitud específica de la raíz (LER).

| Efecto | Análisis univariado para LER | | | | |
|----------------------|--------------------------------------|----------------|--------|-------|------|
| | Parametrización Sigma-restrictiva | | | | |
| | Descomposición efectiva de hipótesis | | | | |
| | SS | G. de libertad | MS | F | p |
| Intercepción | 0.16 | 1 | 0.16 | 71.16 | 0 |
| Tipo de Inoculación | 0.001 | 2 | 0.0003 | 0.11 | 0.89 |
| Tratamiento | 0.0002 | 1 | 0.0002 | 0.11 | 0.75 |
| Tipo de Inoculación* | 0.0035 | 2 | 0.002 | 0.79 | 0.46 |
| Tratamiento | | | | | |
| Error | 0.1 | 44 | 0.002 | | |



Anexo 6. Análisis univariado para la relación raíz brote

| Efecto | Análisis univariado para la Relación Raíz | | | | |
|--------------------------------------|---|----------------|---------|--------|------|
| | Brote | | | | |
| Parametrización Sigma-restrictiva | | | | | |
| Descomposición efectiva de hipótesis | | | | | |
| | SS | G. de libertad | MS | F | p |
| Intercepción | 29.29 | 1 | 29.29 | 487.46 | 0 |
| Tipo de Inoculación | 0.02 | 2 | 0.00886 | 0.15 | 0.86 |
| Tratamiento | 0.02 | 1 | 0.02 | 0.28 | 0.6 |
| Tipo de Inoculación* | 0.04 | 2 | 0.02 | 0.35 | 0.70 |
| Tratamiento | | | | | |
| Error | 2.64 | 44 | 0.06 | | |



Anexo 7. Caracterización química de los suelos de los suelos riego y sequía sin inoculación bacteriana (media + SE). Las letras a y b indican diferencias significativas (prueba T o equivalente no paramétrico, $p \leq 0,05$). Letras iguales indican que no existen diferencias entre ambos suelos (prueba T o equivalente no paramétrico, $p > 0,05$).

| Propiedades | Riego | Sequía |
|--|------------------------|------------------------|
| químicas del suelo | | |
| pH al agua | 5,47±0,9 ^a | 5,38±0,9 ^a |
| Materia orgánica (%) | 33,7±5,4 ^a | 36,4±1,21 ^a |
| Nitratos (N-NO ₃) (mg kg ⁻¹) | 4,8±0,3 ^a | 4,05±0,4 ^a |
| Amonio (N-NH ₄) (mg kg ⁻¹) | 0,5±0,1 ^a | 0,3±0 ^a |
| Nitrógeno disponible (mg kg ⁻¹) | 5,3±0,3 ^a | 4,35±0,45 ^a |
| Fósforo Olsen (mg kg ⁻¹) | 96,1±1,45 ^a | 100±2,05 ^a |
| K disponible (mg kg ⁻¹) | 454±47,4 ^a | 487±40,2 ^a |
| K intercambiable (cmol kg ⁻¹) | 1,16±0,13 ^a | 1,25±0,07 ^a |
| Ca intercambiable (cmol kg ⁻¹) | 10,6±0,73 ^a | 11±0,08 ^a |

| | | |
|---|-------------------------|-------------------------|
| Mg intercambiable | 20,2±1,77 ^a | 20,1±0,17 ^a |
| (cmol kg ⁻¹) | | |
| Na intercambiable | 0,805±0,07 ^a | 0,905±0,07 ^a |
| (cmol kg ⁻¹) | | |
| Suma de bases (cmol kg ⁻¹) | 32,7±2,44 ^a | 33,3±0,25 ^a |
| Intercambio Al (cmol kg ⁻¹) | 0,04±0,02 ^a | 0,065±0,01 ^a |
| CICE (cmol kg ⁻¹) | 32,8±2,46 ^a | 33,4±0,24 ^a |
| Saturación de Al (%) | 0,115±0,05 ^a | 0,21±0,025 ^a |
| Saturación de K (%) | 3,6±0,64 ^a | 3,74±0,19 ^a |
| Saturación de Ca (%) | 32,3±0,19 ^a | 33,2±0,01 ^b |
| Saturación de Mg (%) | 61,6±0,77 ^a | 60,1±0,06 ^a |
| S disponible (mg/kg) | 25,2±3,1 ^a | 25±3,4 ^a |
| Fe (mg kg ⁻¹) | 724±36 ^a | 592±60 ^a |
| Mn (mg kg ⁻¹) | 26,2±5,8 ^a | 43,6±1,6 |
| Zn (mg kg ⁻¹) | 10±0 ^a | 10.2±0,2 ^a |
| Cu (mg kg ⁻¹) | 2,8±0,1 ^a | 2,55±0,05 ^a |
| B (mg kg ⁻¹) | 3,75±0,05 ^a | 3,8±0,5 ^a |