

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**SELECCIÓN DE RIZOBIOS EFECTIVOS PARA LA INOCULACIÓN DE
SOPHORA FERNANDEZIANA (PHIL.) SKOTTSB. ESPECIE EN PELIGRO DE
EXTINCIÓN EN SU HÁBITAT NATURAL.**

POR

MARÍA SUSANA SOTO RAMÍREZ

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

**CHILLÁN – CHILE
2023**

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**SELECCIÓN DE RIZOBIOS EFECTIVOS PARA LA INOCULACIÓN DE
SOPHORA FERNANDEZIANA (PHIL.) SKOTTSB. ESPECIE EN PELIGRO DE
EXTINCIÓN EN SU HÁBITAT NATURAL.**

POR

MARÍA SUSANA SOTO RAMÍREZ

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

**CHILLÁN – CHILE
2023**

Aprobada por:

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

Guía

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

Asesor

Profesor Asociado, Cristina Muñoz V.
Ing. Agrónomo, Dr.

Asesor

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

Decano

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
Resumen	1
Summary.....	1
Introducción	2
Materiales y Métodos	6
Resultados y Discusión	9
Conclusiones	14
Referencias	14
Anexos.....	20

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Página
Figura 1 Índice de nodulación en plantas de <i>Sophora fernandeziana</i> inoculadas con distintas cepas de rizobios.....	10
Figura 2 Comparación de nodulación total activos e inactivos en plantas de <i>Sophora fernandeziana</i> inoculadas con distintas cepas de rizobios	11
Figura 3 Comparación del peso seco aéreo de plantas de <i>Sophora fernandeziana</i> inoculadas con distintas cepas de rizobios.....	12
Figura 4 Comparación de peso seco de raíces en plantas de <i>Sophora fernandeziana</i>	13
Tabla 1 Cepas de rizobios aislados desde nódulos radiculares de <i>Sophora.spp.</i> en Chile continental, insular y desde Nueva Zelanda.....	6

SELECCIÓN DE RIZOBIOS EFECTIVOS PARA LA INOCULACIÓN DE *SOPHORA FERNANDEZIANA* (PHIL.) SKOTTSB. ESPECIE EN PELIGRO DE EXTINCIÓN EN SU HÁBITAT NATURAL.

SELECTION OF EFFECTIVE RIZOBIA FOR INOCULATION OF *SOPHORA FERNANDEZIANA* (PHIL.) SKOTTSB. ENDANGERED SPECIES IN ITS NATURAL HABITAT.

Palabras índice adicionales: Archipiélago de Juan Fernández, árbol endémico, fijación de nitrógeno.

RESUMEN

Sophora fernandeziana es un árbol que se encuentra en peligro de extinción, es endémico del archipiélago de Juan Fernández y pertenece a la familia de las leguminosas, la cual se caracteriza por realizar una asociación simbiótica con bacterias que fijan nitrógeno. El objetivo de esta investigación fue seleccionar bacterias que fueran compatibles con *S. fernandeziana* y efectivas en la fijación de nitrógeno atmosférico. Se utilizaron 10 cepas de rizobios de los géneros *Mesorhizobium*, *Paraburkholderia*, *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, aislados desde nódulos radiculares de distintas especies de *Sophora* desde las regiones de Biobío, Valparaíso y desde Nueva Zelanda. Se realizó un ensayo bajo condiciones controladas en *S. fernandeziana* inoculadas con las distintas cepas de rizobio, en donde se determinó materia seca y nodulación radicular transcurridos 90 días. De las cepas evaluadas, las cepas de *Mesorhizobium* sp. AG-250 (*S. fernandeziana*), AG-275 (*S. macrocarpa*) y AG-274 (*S. macrocarpa*); y la cepa de *Paraburkholderia* sp. AG-252 (*S. fernandeziana*) lograron formar nódulos en *S. fernandeziana*. Ninguna de las cepas evaluadas logró incrementar significativamente la biomasa de las plantas, probablemente debido al corto tiempo de estudio. Se puede concluir que *S. fernandeziana* se asocia preferentemente con bacterias del género *Mesorhizobium* y comparte simbiote con la especie *S. macrocarpa*.

SUMMARY

Sophora fernandeziana is an endangered endemic tree from the Juan Fernández archipelago. It belongs to the family Leguminosae which is characterized for establishing a symbiotic association with nitrogen-fixing bacteria. The objective of this work was to select effective nitrogen fixing bacteria for *S. fernandeziana*. Ten strains of rhizobia of the genera *Mesorhizobium*, *Paraburkholderia*, *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, isolated from root nodules of different *Sophora* species from the Biobío region, Valparaíso region and New Zealand, were assessed for nodulation and effectiveness. An experiment was carried out under controlled conditions where *S. fernandeziana* was inoculated with different rhizobia strains to assess dry matter and root nodulation after 90 days. Of the evaluated strains *Mesorhizobium* sp. AG-250 (from *S. fernandeziana*), AG-275 (from *S. macrocarpa*) and AG-274 (from *S. macrocarpa*) and the strain of *Paraburkholderia* sp. AG-252 (from *S. fernandeziana*) were able to form nodules in *S. fernandeziana*. None of the evaluated strains significantly increased plant biomass, probably due to the short period of study. In conclusion, *S. fernandeziana* preferentially associates with bacteria of the genus *Mesorhizobium* and shares symbionts with *S. macrocarpa*.

INTRODUCCIÓN

Alrededor del mundo, numerosos ecosistemas naturales se han visto alterados por la pérdida vertiginosa de especies causada principalmente por factores antrópicos. Esto se ha visto reflejado en indicadores de los ecosistemas como también de la biodiversidad que nos muestran que el deterioro es rápido. Por ejemplo, la superficie terrestre ha sufrido alteraciones de carácter considerable en un 75 %, en la superficie oceánica, un 66 % está experimentando cada vez más efectos acumulativos y se ha perdido más del 85 % de la superficie de los humedales (IPBES, 2019, Pimm y Raven, 2000)

Indicadores desarrollados por el World Wide Fund for Nature (WWF) para medir tendencias de la biodiversidad y el estado de salud de los ecosistemas, registran un decrecimiento del orden del 30 % al presente, evidenciando una degradación sin precedentes al finalizar el siglo XX (WWF 2009, FAO 2009). Es así como en el año 1888 una publicación del profesor de Oxford Norman Myers trajo de nuevo el

término de “hotspot” para así diferenciar partes del mundo en donde se concentran grandes números de especies de los más diversos grupos en extensiones superficiales pequeñas (Pironon *et al.*, 2020). Los cuales deben cumplir con dos requisitos fundamentales para considerarse un “hotspot”, estos son: tener al menos 1500 plantas vasculares endémicas y debe tener 30 % o menos de su vegetación amenazado de extinción (Conservation International, 2022).

El archipiélago Juan Fernández, es considerado un hotspot de biodiversidad (Bello-González *et al.*, 2018) Juan Fernández se encuentra en la Región Micronesia-Polinesia que agrupa unas 4.500 islas en el Pacífico Sur, sumando 46.488 km² de región considerada un epicentro de la pérdida global de biodiversidad. Es tal la importancia de estos ecosistemas que de 80 taxas de flora extintos en los últimos 400 años, un 63 % corresponde a plantas originarias de las islas oceánicas (Sax y Gaines, 2008).

El archipiélago Juan Fernández está situado en el océano Pacífico a 670 km al oeste de Valparaíso, y está constituido por 3 islas de origen volcánico: Robinson Crusoe (Más a Tierra), Alejandro Selkirk (Más Afuera) y Santa Clara (Baeza *et al.* 2007). En el archipiélago se registran 223 taxones de plantas vasculares silvestres de los cuales 149 (67 %) son endémicos y 74 (33 %) nativos. Dentro de estas, las especies *Sophora fernandeziana* (Phil.) Skottsb var *fernandeziana*, *Sophora fernandeziana* (Phil.) Skottsb var. *reedeanae* (Phil.) Skottsb y *Sophora masafuerana* (Phil.) Skottsb, han sido declaradas en peligro de extinción desde el 2006 (Ricci, 2006; Penneckamp 2018). Ambas especies pertenecen a la familia Fabaceae (leguminosas), subfamilia Faboideae y a la sección Edwardsia dentro del género *Sophora*, sección que agrupa a aproximadamente 20 especies distribuidas en el hemisferio sur (Peña *et al.*, 2000, Mitchell y Heenan, 2002)

Sophora fernandeziana var *fernandeziana* es una especie que se encuentra en la isla de Robinson Crusoe, es un árbol pequeño que alcanza los 5 metros de altura aproximadamente. Con un tronco ramificado de color marrón oscuro, sus hojas son compuestas, imparipinadas y sus foliolos elíptico - lanceolado. Su inflorescencia es en forma de racimo corto con flores hermafroditas sobre pedúnculos pilosos con su corola paripinada de color amarillo. El fruto es una legumbre moniliforme,

indehiscente, coriácea, no alada. Su semilla es elíptica rectangular de color marrón rojizo (Johow 1896, Skottsberg 1922, Rodríguez *et al.*, 1983).

La madera de *S. fernandeziana* fue utilizada para la fabricación de partes de embarcaciones, principalmente para la protección de la quilla debido a la dureza de la madera (Rodríguez *et al.*, 1983). Esta especie es polinizada preferentemente por colibríes ya que es una buena productora de néctar. Bernardello *et al.* (2004) llevaron a cabo un estudio acerca de la biología reproductiva de *S. fernandeziana*, encontrando mecanismos de autoincompatibilidad en el ovario con una baja producción de frutos y semillas, determinando que es una especie genéticamente vulnerable a la extinción.

Crawford *et al.* (2001) determinaron que *S. fernandeziana* presenta una baja diversidad genética en las poblaciones existentes. El estado de conservación de acuerdo con la categoría y criterio de la Unión Internacional de Conservación de la Naturaleza (IUCN del inglés: International Union for Conservation of Nature), es de “riesgo crítico” debido a su presencia en sólo una localidad (isla Robinson Crusoe) en una extensión aproximadamente de 14 km². Además, existe una proyección hacia una disminución de la calidad del hábitat, debido a procesos erosivos, presencia de plantas introducidas y por la presencia de animales exóticos invasivos tales como el conejo (*Oryctolagus cuniculus*) (Ricci, 2008; Ricci *et al.*, 2008).

Una de las cualidades de las especies de la familia Fabaceae es la capacidad de establecer una relación simbiótica con bacterias del suelo llamadas rizobios debido a que las plantas por sí solas no son capaces de utilizar el nitrógeno atmosférico. Por lo tanto, la simbiosis es fundamental para la formación de nitrógeno amoniacal, forma disponible para las plantas, además de mejorar las condiciones físicas y la biodiversidad del suelo (Rubiales y Mikic, 2015).

Esta relación es de carácter mutualista ya que es una interacción obligada, que requiere de la integración de vías metabólicas de la fijación (bacteroides) y de la asimilación del nitrógeno (por parte de la planta hospedera) en donde la planta hospedera le entrega compuestos carbonatados y otros nutrientes a cambio del aporte de amonio (Marcano *et al.*, 2001; Angus, 2010). Esta asimilación es a través de enzimas presentes en el nódulo y luego es exportado desde el nódulo hacia la

parte aérea de la planta por el xilema en forma de amidas o de ureidos (Cooper y Scherer, 2012).

Esta interacción simbiótica es específica y requiere de una serie de señales químicas de reconocimiento entre la planta y el rizobio. En primer lugar, las leguminosas atraen al rizobio a través del exudado de compuestos fenólicos del tipo flavonoides derivados de 2-fenil-1,4-benzopirona. Esta es la primera señal que recibe el rizobio de su leguminosa hospedera, el cual es un conjunto característico de flavonoides de cada leguminosa que activa los genes específicos de la nodulación (genes *nod*) del rizobio (Perret *et al.*, 2000). El ingreso de las bacterias a los tejidos internos de la raíz puede ocurrir a través de los pelos radicales los cuales se curvan para formar así un canal infeccioso de manera interna (Dénarié *et al.*, 1992). Luego se induce la formación de nódulos y colonización interna de las células por los rizobios, proceso que puede tardar unos 15 días, para dar lugar a la fijación de N atmosférico (Oldroyd y Downie, 2008; Fox *et al.*, 2011).

Especies del género *Sophora* han sido reportadas como capaces de establecer simbiosis con rizobios predominantemente con bacterias del género *Mesorhizobium* (Chen *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011; Tan *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2003; Olave, 2020). En particular para las especies *S. fernandeziana*, *S. macrocarpa*, *S. microphylla* y *S. toromiro*, Zuñiga *et al.* (1998) constataron la formación de nódulos y asociaciones micorrícicas al ser estas expuestas a suelos colectados en su hábitat natural y en jardines Botánicos de Chile y Europa, confirmando su capacidad simbiótica. Sin embargo, este estudio no logró el aislamiento, identificación, ni la evaluación de los aislados específicos.

Los estudios realizados en Nueva Zelanda por Tan *et al.* (2015) y De Meyer *et al.* (2015) reportan nodulación cruzada entre las especies de *Sophora*, es decir, especies diferentes pueden compartir el mismo simbiote o rizobio. Esto es reforzado por los resultados obtenidos recientemente en el trabajo de Olave (2020) en *Sophora toromiro*, donde se determinó que distintas especies de *Sophora* que crecen en Chile y en Nueva Zelanda pueden establecer simbiosis efectivas con cepas de rizobios de la misma especie.

Considerando estos antecedentes el objetivo de este trabajo fue determinar la

efectividad simbiótica de cepas de rizobios asociadas a especies del género *Sophora* de Chile y Nueva Zelanda, en *Sophora fernandeziana* var *fernandeziana*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material bacteriano

Se utilizó cepas de rizobios aislados desde nódulos radiculares de distintas especies del género *Sophora* (Tabla 1). Las cepas se encontraban mantenidas a -80 °C en 20 % glicerol en la colección de microorganismos de la Facultad de Agronomía. Se reactivaron, inoculando una alícuota obtenida desde el criotubo congelado, en una placa Petri con agar YMA con rojo Congo, las que fueron incubadas a 25 °C por tres a cinco días. Para la inoculación en planta estas fueron suspendidas en sacarosa al 1 % y sus concentraciones estandarizadas en un espectrofotómetro para alcanzar la densidad óptica (a 600 nm) de 0,1 que es equivalente a 10^{-7} UFC mL⁻¹.

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

N° cepa	Identificación	Origen geográfico	Especie hospedera	Fuente
AG-250 (JF4)	<i>Mesorhizobium plurifarum</i>	Isla Robinson Crusoe, vaquería, Valparaíso	<i>S. fernandeziana</i>	Olave, 2020
AG-252 (JF6)	<i>Paraburkholderia</i> sp	Isla Robinson Crusoe, Valparaíso	<i>S. fernandeziana</i>	Olave, 2020
AG-262 (P24)	<i>Rizobium</i> sp	Vivero Carlos Douglas, Yumbel, Biobío	<i>S. macrocarpa</i>	Olave, 2020
AG-263 (P25)	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	Vivero Carlos Douglas, Yumbel, Biobío	<i>S. cassioides</i>	Olave, 2020

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

N° cepa	Identificación	Origen geográfico	Especie hospedera	Fuente
AG-264 (P26)	<i>Mesorhizobium</i> sp	Vivero Carlos Douglas, Yumbel, Biobío	<i>S. toromiro</i>	Olave, 2020
AG-269 (P31)	<i>Rhizobium</i> sp	Vivero Carlos Douglas, Yumbel, Biobío	<i>S. toromiro</i>	Olave, 2020
AG-274 (P36)	<i>Mesorhizobium</i> sp	Quilaco, Altos del Biobío, Biobío	<i>S. macrocarpa</i>	Olave, 2020
AG-275 (P37)	<i>Mesorhizobium</i> sp	Quilaco, Altos del Biobío, Biobío	<i>S. macrocarpa</i>	Olave, 2020
AG-277 (P39)	<i>Mesorhizobium</i> sp	Quilaco, Altos del Biobío, Biobío	<i>S. macrocarpa</i>	Olave, 2020
IMCP19560	<i>Mesorhizobium calcicola</i>	Marborough, Terraza de río Waima, Nueva Zelanda	<i>S. longicarinata</i>	De Meyer <i>et al.</i> , 2015

Ensayo de efectividad simbiótica en planta

Las semillas de *Sophora fernandeziana* fueron obtenidas en colaboración con Conaf oficina Juan Fernández colectadas en octubre del 2020. Estas fueron escarificadas en ácido sulfúrico por un minuto, luego desinfectadas en inmersión en etanol al 70

% (v/v) por un minuto, en hipoclorito de sodio al 3 % (v/v) por tres minutos y después lavadas cinco veces en agua destilada estéril. En cámara de flujo laminar, se depositaron las semillas tratadas en placas Petri con agar agua (1,5 %). Previo al ensayo el sustrato fue esterilizado en autoclave (120 °C, 1,5 Atm por 20 min) compuesto por arena: perlita en relación 2:1. Las semillas fueron depositadas en placas Petri con agar agua e incubadas en cámara de germinación a 25 °C en oscuridad, luego de 20 días se observaron semillas con radícula visible.

Establecimiento del ensayo

Se utilizaron macetas de 500 cc que fueron desinfectadas en hipoclorito de sodio (3 %) y etanol al 70 %, antes de depositar el sustrato preparado para luego plantar una semilla germinada por maceta, todo esto bajo la cámara de flujo laminar. Las macetas fueron regadas con 40 mL de agua y 20 mL de solución nutritiva sin nitrógeno en cada maceta y dejadas a 23 °C en un fitotrón con luz LED y fotoperiodo de 12 h.

Transcurridos cuatro días se inoculó cada plántula con un mL de cultivo bacteriano a una DO (600 nm) de 0,1. Se incluyó un testigo sin inocular y sin nitrógeno (N-) y otro sin inocular y con nitrógeno (N+) al cual se le administró 10 mL de KNO₃ 0,1 M semanalmente. En cada maceta se instaló un tubo de polipropileno estéril para suministrar agua y solución nutritiva, evitando así contaminación entre los tratamientos además de papel aluminio en el fondo de las macetas. Luego de 90 días se evaluaron los siguientes parámetros:

Nodulación. Se contaron los nódulos presentes en el sistema radicular, tanto en la raíz principal como secundarias. Se verificó cuantos de ellos estaban activos mediante una disección y observando la coloración rojiza en el interior. Se registró además el tamaño y la posición de cada nódulo en el sistema radical para así obtener un índice de nodulación para cada tratamiento con la escala propuesta por el Center for *Rhizobium* Studies (2012).

Peso seco aéreo y radicular. Se separó la parte aérea de la radical para luego ser depositadas en bolsas de papel y ser secadas a 60 °C hasta alcanzar peso constante y obtener así el peso seco de cada uno de los tratamientos.

Análisis de datos de ensayo de efectividad simbiótica

Los datos peso seco aéreo y radical fueron sometidos a análisis de varianza (ANDEVA) y comparados mediante test de Tukey, con un nivel de confianza del 95 %.

Para las variables de índice de nodulación y el número de nódulos se realizó un análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis y comparados a través del test propuesto por Conover. Todos los análisis fueron realizados en el programa estadístico Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2016).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

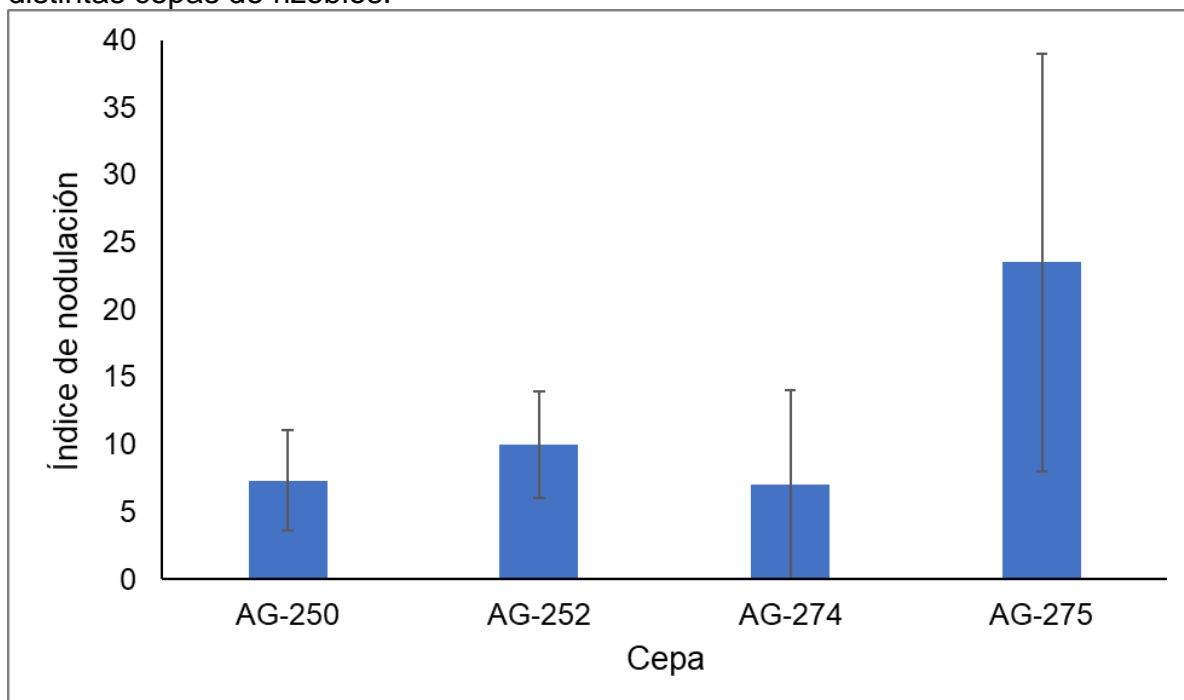
En el ensayo de nodulación y efectividad simbiótica de rizobios asociados a *Sophora* spp. en *Sophora fernandeziana* var *fernandeziana* se verificó la formación de nódulos en el sistema radicular con las cepas: AG-250, AG-252, AG-274 y AG-275 de las 10 cepas evaluadas, sin registrarse nódulos en los tratamientos sin inoculación con nitrógeno (N+) y sin nitrógeno (N-). Las cepas que indujeron nodulación habían sido originalmente aisladas desde *S. fernandeziana* (AG-250 y AG-252) y desde *S. macrocarpa* (AG-274 y AG-275) (Tabla 1). Tres de las cepas que formaron nódulos fueron identificadas como pertenecientes al género *Mesorhizobium* (Olave, 2020), como ha sido reportado para otros rizobios asociados a especies de *Sophora* (De Meyer *et al.*, 2015; Tan *et al.*, 2015). Sin embargo, la cepa AG-252 fue identificada como *Paraburkholderia* sp. (Olave, 2020), género que inicialmente fue descrito como *Burkholderia* (Dobritsa y Samadpour, 2016) y que ha sido reportado como simbiote de leguminosas de los géneros *Mimosa*, *Phaseolus*, *Aspalathus*, *Lebeckia* entre otros, pero hasta ahora, no para el género *Sophora* (Paulitsch *et al.*, 2020).

El índice de nodulación fue superior al inocular *S. fernandeziana* con la cepa AG-275 (aislada de *S. macrocarpa*), sin embargo, no hubo diferencias significativas entre cepas debido a la alta variabilidad entre repeticiones ($P \geq 0,05$). La importancia del índice de nodulación radica en que se valora tanto la ubicación como el tamaño de los nódulos radicales, lo que es un indicador de rapidez de nodulación y se correlaciona con la efectividad de fijación de nitrógeno (Yates *et al.*, 2016). Por lo tanto, la cepa AG-275 fue más rápida en colonizar el sistema radical y en formar

nódulos, que las otras cepas.

El número de nódulos formados por sistema radical fluctuó entre cinco a 12, donde destaca el número nódulos alcanzado al inocular con AG-275 (Figura 2), aunque no hubo diferencias estadísticas ($P > 0,05$). La efectividad de los nódulos determinada por la coloración rojiza en su interior fue inferior al 50 % en todos los tratamientos de inoculación. Entre las cepas inoculadas, nuevamente AG-275 destacó al lograr un porcentaje de 40 %. La coloración rojiza interna de un nódulo está determinada por la presencia de leg-hemoglobina, una proteína que presenta una alta afinidad con el oxígeno y por lo tanto disminuye la concentración de este gas en el interior del nódulo, logrando condiciones microaeróbicas que permite la activación de la enzima nitrogenasa y por lo tanto la fijación del nitrógeno (Proulx y Reddy, 2006.).

Figura 1. Índice de nodulación en plantas de *Sophora fernandeziana* inoculadas con distintas cepas de rizobios.

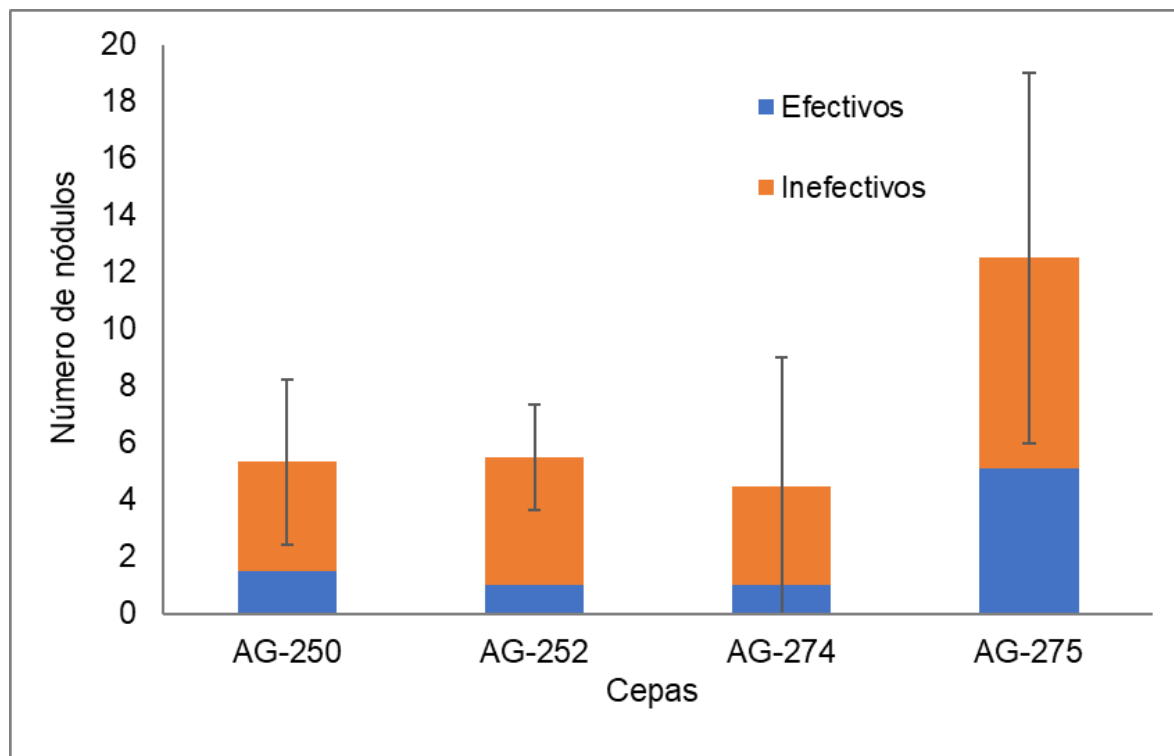


* Barras verticales corresponden al error estándar de la media

Es destacable que la cepa AG-275, que fue aislada desde *S. macrocarpa* en Chile continental, haya tenido un mejor desempeño en cuanto a número y eficiencia de nódulos y en índice de nodulación. De igual modo, esta cepa fue la que formó mayor cantidad de nódulos en *Sophora toromiro* y además fue categorizada como una de

las cepas efectivas en esa especie (Olave, 2020).

Figura 2. Comparación de nodulación total con nódulos activos e inactivos en plantas de *Sophora fernandeziana* inoculadas con distintas cepas de rizobios



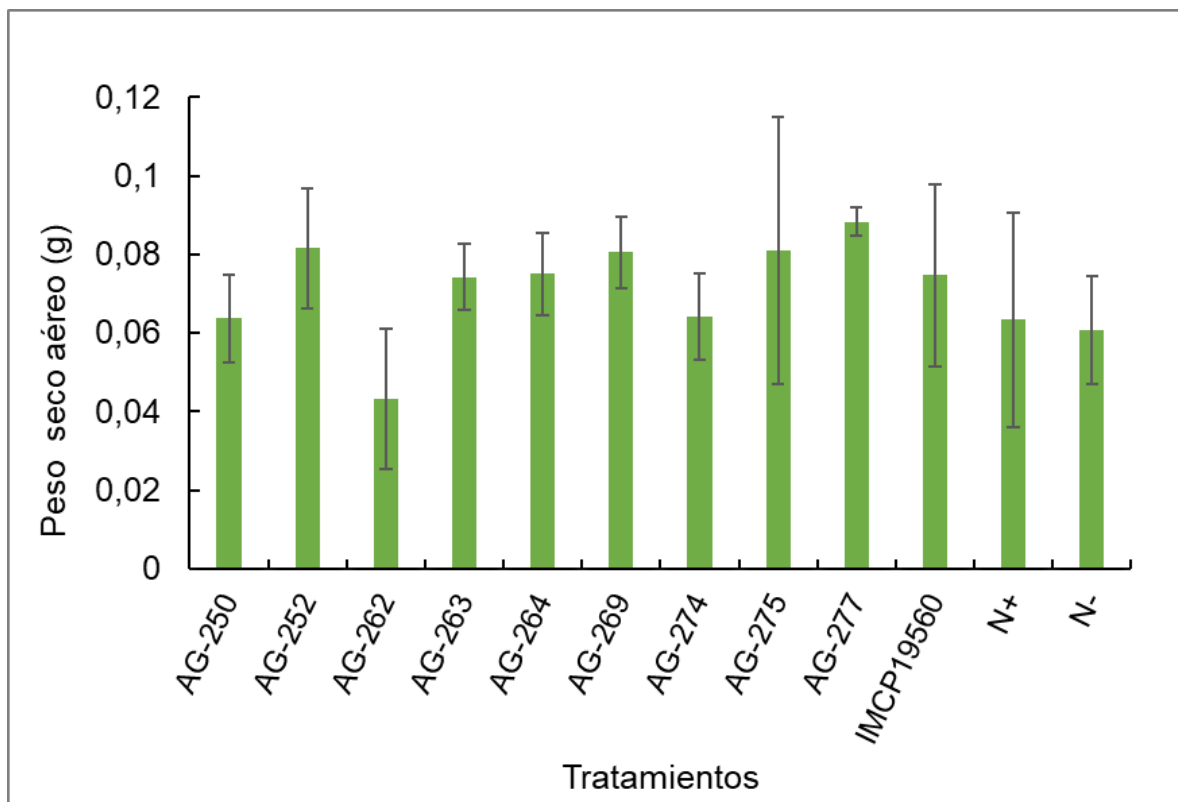
* Barras verticales corresponden al error estándar de la media

La efectividad de la simbiosis está relacionada con la alta especificidad entre leguminosa-rizobio (Madsen *et al.*, 2010; Oldroyd *et al.*, 2009), por lo que una especie determinada de rizobios establece simbiosis con sólo un conjunto limitado de plantas hospederas y viceversa (Perret *et al.*, 2000). La simbiosis rizobio-leguminosa es el resultado de intercambio de señales en distintas etapas del proceso infeccioso, tanto desde el huésped como desde la bacteria. Por ende, se puede producir incompatibilidad de manera frecuente en etapas posteriores al desarrollo del nódulo (Wang *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2017). Esto puede estar dado por una fallida activación de la expresión de los genes de fijación de nitrógeno, conocidos como genes *nif*, los cuales son responsables de la síntesis, procesamiento y ensamblaje del complejo nitrogenasa (Isidra-Arellano y Valdés-López 2022; Paulitsch *et al.*, 2020).

Peso seco aéreo y radicular

El análisis estadístico de los datos de desarrollo foliar y radical no arrojó diferencias significativas ($P > 0,05$) (Figura 3). Este resultado se podría explicar por el acotado tiempo de estudio, ya que *Sophora fernandeziana* si bien llega a ser un árbol que alcanza los cinco metros de altura (Johow 1896, Skottsberg 1922, Rodríguez *et al.*, 1983), al ser una especie leñosa, su desarrollo podría tender a ser más lento que otras leguminosas herbáceas como se ha reportado en otros trabajos (Gerding *et al.*, 2017; Bianco *et al.*, 2013). Por lo tanto, el desarrollo alcanzado en 90 días no permite ver diferencias entre plantas noduladas y plantas sin nódulos ni inoculación.

Figura 3. Comparación del peso seco aéreo de plantas de *Sophora fernandeziana* inoculadas con distintas cepas de rizobios



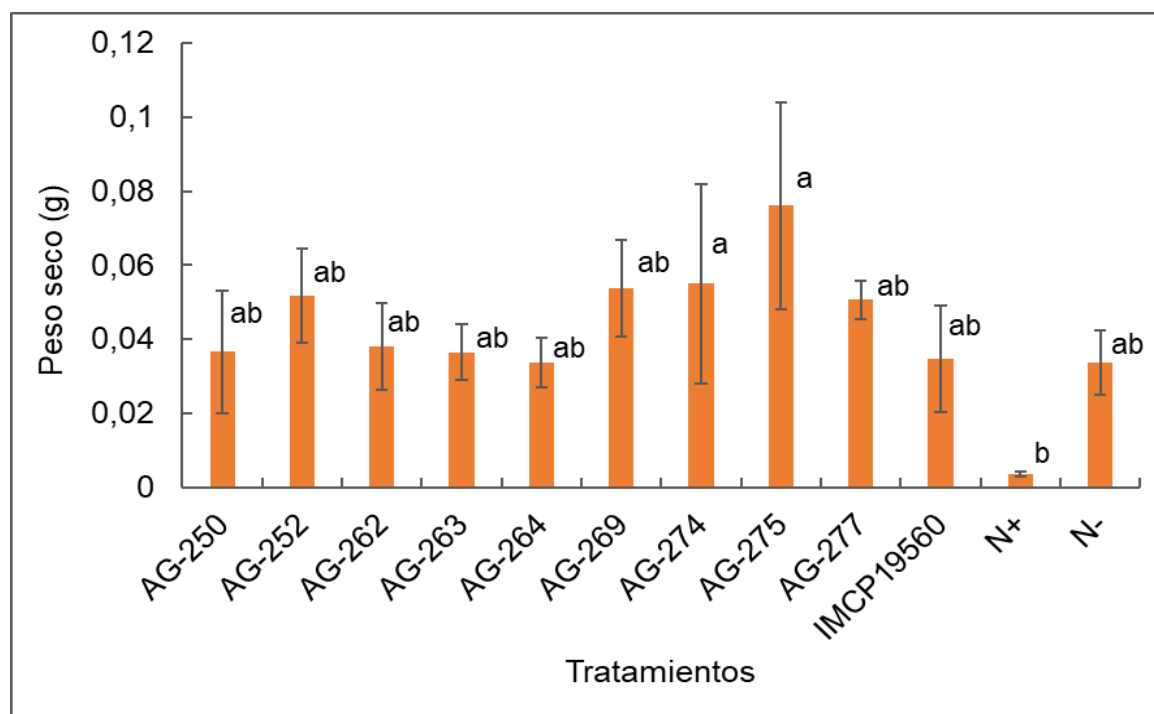
* Barras verticales corresponden al error estándar de la media

Olave (2020), obtuvo resultados promisorios en tan solo 50 días de experimento con *Sophora toromiro*, donde se pudo ver mayor nodulación, ya que 20 de 25 cepas evaluadas fueron capaces de inducir la nodulación, y además hubo cepas que

incrementaron significativamente el peso seco de la planta. En esta investigación sólo cuatro de las 10 cepas indujeron la nodulación lo cual nos indica una mayor complejidad de la relación simbiótica y de la especificidad de la especie. De estas cuatro cepas, sólo AG-252 y AG-275 mostraron una tendencia a inducir mayor peso seco en *S. fernandeziana* en comparación a los testigos sin inoculación, pero sin diferenciarse significativamente ($P > 0,05$) (Figura 3).

En cuanto al peso seco de raíces de *S. fernandeziana*, si bien no hubo diferencias significativas debido a la alta variabilidad entre las unidades experimentales (Figura 4), las plantas inoculadas con las cepas AG-252 y AG-275 tendieron a un mayor peso de raíces, lo que puede estar dado por la mayor formación de nódulos radicales.

Figura 4. Comparación de peso seco de raíces en plantas de *Sophora fernandeziana* inoculadas con distintas cepas de rizobios.



* Barras verticales corresponden al error estándar de la media. Letras diferentes entre columnas indican diferencias significativas de acuerdo al test de separación de medias de Tukey ($P \leq 0,05$)

Cabe destacar, la gran diferencia de tamaño de la raíz en el tratamiento con nitrógeno (0,004 g) con el menor de los tratamientos inoculados (0.034 g). Esto puede estar dado por la toxicidad que pueden provocar la presencia de altas

cantidades de N amoniacal y de nitrato en el suelo o sustrato (Li *et al.*, 2010; Tian *et al.*, 2008), aunque esto no fue evidenciado en un peso seco aéreo significativamente inferior (Figura 3).

Los resultados obtenidos de esta investigación no permiten aún seleccionar una cepa de rizobio efectiva para *S. fernandeziana*. Sin embargo, la información recopilada en este estudio será la base para futuros estudios que permitirán tener en cuenta una mayor cantidad de cepas estudiar, aisladas desde otras especies de *Sophora*, en los ensayos de selección. Por ejemplo, en *S. toromiro* dos de las tres cepas efectivas correspondieron a simbioses de *S. microphylla* de Nueva Zelanda (Olave, 2020), cepas que no pudieron ser evaluadas en esta oportunidad por no contar con la cantidad necesaria de semillas. Además, es necesario tener un conocimiento más detallado del tiempo de desarrollo de la especie ya que será necesario extender la duración de este tipo de ensayos a seis meses para permitir el completo desarrollo de la simbiosis y a futuro establecer estrategias efectivas para su reintroducción en su hábitat.

CONCLUSIONES

- Cepas bacterianas de los géneros *Mesorhizobium* y *Paraburkholderia*, aisladas desde *S. fernandeziana* y *S. macrocarpa*, indujeron la formación de nódulos en las raíces de *S. fernandeziana*.
- La inoculación de *S. fernandeziana* con distintas cepas de rizobios aislados desde *Sophora* spp. no promovió un mayor peso seco de follaje durante el tiempo de duración del ensayo.

REFERENCIAS

1. Angus, A.A. 2010. Insights into the history of the legume-betaproteobacterial symbiosis. *Mol. Ecol.* 19(1): 28-30.
2. Baeza, C.M., T F. Stuessy y C. Marticorena. 2007. Poaceas en el Archipiélago de Juan Fernández (Robinson Crusoe) *Gayana Bot.* 64(2): 125-174.
3. Bello-González, J.P., E. Contreras-Reyes y C. Arriagada. 2018. Predicted path for hotspot tracks off South America since Paleocene time: Tectonic

- implications of rifting-trench collision along the Andean margin. *Gondwana Res.* (64): 216-234.
4. Bernardello, G., R. Aguilar and G.J. Anderson. 2004. The reproductive biology of *Sophora fernandeziana* (Leguminosae), a vulnerable endemic species from Isla Robinson Crusoe. *Am. J. Bot.* 91(2): 198-206.
 5. Bianco, L., Angelini, J. Fabra, A. and R. Malpassi. 2013. Diversity and symbiotic effectiveness of indigenous Rhizobia-Nodulating *Adesmia bicolor* in Soils of Center Argentina. *Curr. Microbiol.* (66): 174-184.
 6. Conservation International, 2022. Biodiversity hotspots: Targeted investment in nature's most important places. En línea <https://www.conservation.org/priorities/biodiversity-hotspots> >. [consulta: 9 de agosto 2022].
 7. Cooper, J.E. Scherer, H.W. 2012. Nitrogen fixation. *In: P Marschner ed Mineral Nutrition in High Plants*, Academic Press.389-408.
 8. Center for *Rhizobium* Studies. 2012. Master class in rhizobial technology. Murdoch University. Kandy, Sri Lanka. (Documento de trabajo, mgerding@udec.cl).
 9. Chen, WM., Zhu, WF, Bontemps C, Young, JPW. and Wei, GH. 2010. *Mesorhizobium alhagi* sp.noy, isolated from wild *Alhagi sparsifolia* in north-western China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60(4): 958-962.
 10. Chen, WM., Zhu, WF., Bontemps, C., Young JPW. and Wei, GH. 2011. *Mesorhizobium camelthorni* sp. nov., isolated from *Alhagi sparsifolia*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* 61(3): 574-579.
 11. Crawford, D.J., Ruiz, E., Stuessy, T.F., Tepe, E., Aqueveque, P., González, F., Jensen, R.J., Anderson, G.J., Bernardello, B., Baeza, C.M., Swenson, U and M. Silva. 2001. Allozyme diversity in the endemic flowering plant species of the Juan Fernandez Archipelago, Chile ecological and historical factors with implications for conservation. *Am. J. Bot.* 88(12): 2195-2203.
 12. De Meyer, S.E., Tan, H.W., Heenan, P.B., Andrews, M and Willems, A. 2015. *Mesorhizobium waimense* sp. nov. isolated from *Sophora microphylla* root nodules. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65(10): 3219-3426.
 13. Dénarié, J., Debellé, F and C. Rosenberg. 1992. Signaling and host range variation in nodulation. *Annu. Rev. Microbiol.* 46: 497-531.
 14. Di Rienzo J.A., F. Casanoves, M.G. Balzarini, L. Gonzalez, M. Tablada and C.W. Robledo. 2016. InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

15. Dobritsa, A. and Samadpour, M. 2016. Transfer of eleven species of the genus *Burkholderia* to the genus *Paraburkholderia* and proposal of *Caballeronia* gen. nov. to accommodate twelve species of the genera *Burkholderia* and *Paraburkholderia*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66(8): 2836-2846.
16. FAO. 2009. La situación de los bosques del mundo. 158 p
17. Fox, S.L., O'Hara, G.W and L. Bräu. 2011. Enhanced nodulation and symbiotic effectiveness of *Medicago truncatula* when co-inoculated with *Pseudomonas fluorescens* WSM3457 and *Ensifer (Sinorhizobium) medicae* WSM419. *Plant Soil* 348: 245-254.
18. Gerding, M., Oyarzúa, P., García, L., Fischer, S., Norambuena, C., Barahona, V., Pozo, A and C. Ovalle. 2017. Diversity and symbiotic effectiveness of *Adesmia* spp. root nodule bacteria in central and southern Chile. *Symbiosis* 72: 61-72.
19. IPBES, 2019. El informe de la evaluación mundial sobre la diversidad biológica y los servicios de los ecosistemas. pp: 13. Informe. En línea <https://ipbes.net/sites/default/files/202002/ipbes_global_assessment_report_summary_for_policymakers_es.pdf> [Consulta: 04 de agosto del 2021].
20. Isidra-Arellano, M y O. Valdés-López. 2022. ¿Cómo controlan las leguminosas el número de nódulos para evitar comprometer su crecimiento y desarrollo? *REB.* 41 (2): 51-65.
21. Johow, F. 1896. Historia botánica de Juan Fernández. pp: 7-37. En: Estudio sobre la Flora de las Islas de Juan Fernández. Imprenta Cervantes, Santiago de Chile. (288) pp 21.
22. Li, Q., Li, B., Kronzucker, H.J and W, Shi. 2010. Root growth inhibition by NH₄⁺ in *Arabidopsis* is mediated by the root and is linked to NH₄⁺ efflux and GMPase activity. *Plant. Cell. Environ* 33(9): 1529-1542.
23. Madsen, L., Tirichine, L., Jurkiewicz, A., Sullivan, J., Heckmann, A., Bek, A., Ronson, C., James, E and J. Stougaard. 2010. The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus*. *Nat Commun* 1(10): 1-12.
24. Marcano, L., Gonzáles, M., Leal, A y V. Michelena. 2001. Fijación biológica de nitrógeno por *Pachecoia venezuelensis* en dos suelos de Sabana del Oriente Venezolano. *Rev UDO Agrícola* 1(1): 64-69.
25. Mitchell, A.D and P.B. Heenan. 2002. *Sophora* sect. *Edwardsia*: further evidence from nrDNA sequence data of a recent and rapid radiation around the Southern Oceans. *Bot. J. Linn. Soc.* 140(4): 435-441.

26. Olave, I. 2020. Identificación y selección de rizobios para *Sophora toromiro* Phil. Skottsbs., Especie extinta en RapaNui. Tesis Ing. Agrónomo. Universidad de Concepción. Facultad de Agronomía. Chillán, Chile.
27. Oldroyd, G., Harrison, M and U. Paszkowski. 2009. Reprogramming plant cells for endosymbiosis. *Science* 324(5928): 753- 754.
28. Oldroyd, G.E.D. and J.A. Downie. 2008. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 59: 519-546.
29. Paulitsch, F., Marcon, J., Ribeiro, R., Da Silva, J and M.Hungría. 2020. Phylogeny of symbiotic genes reveals symbiovars within legume- nodulating *Paraburkholderia* species. *Syst. Appl. Microbiol.* 43(6): 126-151.
30. Penneckamp, D. 2018. Flora vascular Silvestre del Archipiélago Juan Fernández. Planeta de Papel Ediciones, Valparaíso, Chile.
31. Perret, X., Staehelin, C and W.J. Broughton. 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64(1): 180 201.
32. Peña, R.C., Iturriaga, L., Montenegro, G and B.K. Cassels. 2000. Phylogenetic and biogeographic aspects of *Sophora* sct. *Edwardsia* (Papilionaceae). *Pacific. Science.* 54(2): 159-167.
33. Pironon, S., Borrell, J., Ondo, I., Gouglas, R., Phillips, C., Khoury, C., Kantar, M., Fumia, N., Soto, M., Viruel, J., Govaerts, R., Forest, F and A. Antonelli. 2020. Towards Unifying global hotspots of wild and domesticated biodiversity. *Plants.* 9(9):1-18.
34. Proulx, A and M. Reddy. 2006. Iron bioavailability of hemoglobin from soy root nodules using a Caco-2 cell culture model. *J. Agric. Forrd. Chem* 54(4): 1518-1522.
35. Pimm, S and P. Raven. 2000. Extinction by numbers. *Nature.* 403: 843-845.
36. Rodriguez, R. Matthei, O y M. Quezada. 1983. Flora Arbórea de Chile. Universidad de Concepción. Chile.
37. Ricci, M. 2006. Conservation status and ex-situ cultivation efforts of endemic flora of the Juan Fernandez Archipelago. *Biodiversity. Conserv.* 15: 3111 – 3130.
38. Ricci, M. 2008. Ficha de especie: *Sophora fernandeziana* (Phil.) Skottsbs. pp: 1-6.
39. Ricci, M., Ramírez, C y J.C. Ramírez. 2008. Análisis cuantitativo de la flora de bosques y matorrales de la Isla Robinson Crusoe (archipiélago de Juan Fernández, Chile) *Rev. Geogr. Valps.* 41: 62-76.

40. Rubiales, D and A. Mikic. 2015. Legumes in sustainable agriculture. CRC. Crit. Rev. Plant Sci. 34(1-3): 1-7.
41. Sax, D and S. Gaines. 2008. Species invasion and extinction: The future of nature biodiversity on islands. PNAS. 105(1): 11490-11497.
42. Skottsberg, C. 1922. Nature History of Juan Fernández and Eastern Island Almgvist & Wiksells Boktryckeryg. AB. (2): 73-74.
43. Tan, H., Heenan, P., De Meyer, S., Willems, A and M. Andrews. 2015. Diverse novel mesorhizobia nodulate New Zealand native *Sophora* species. System. Appl. Microbiol. 38(2): 91-98.
44. Tian, Q., Chen, F., Liu, J., Zhang, F and G. Mi. 2008. Inhibition of maize root growth by high nitrate supply is correlated with reduced IAA levels in roots. J. Plant. Physiol. 165(9):942- 951.
45. Wang, D., Yang, S and H. Zhu. 2012. Symbiosis specificity in the legume-rhizobial mutualism. Cell. Microbiol. 14(3): 334-342.
46. Wang, E., Kan, F., Tan, Z., Toledo, I., Chen, W and E. Martinez-Romero. 2003. Diverse *Mesorhizobium* plurifarum population native to Mexican soils. Arch. Microbiol. 180(6): 444-454.
47. Wang, Q., Yang, S., Liu, J., Terecskei, K., Abraham, E., Gombár, A., Domonkos, A., Szűcs, A., Körmöczi, P., Wang, T., Fodor, L., Mao, L., Fei, Z., Kondorisi, E., Kaló, P., Kereszt, A and H. Zhu. 2017. Host-secreted antimicrobial peptide enforces symbiotic selectivity in *Medicago truncatula*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 114(26): 6854-6859.
48. Wang, Q., Liu, J., Yang, S., Körmöczi, P., Kereszt, A and H. Zhu. 2018. Nodule-specific cysteine-Rich peptides negatively regulate nitrogen-fixing symbiosis in a specific in *Medicago truncatula*. Mol plant Microbe Interact. 31(2): 240-248.
49. World Wild Fund for Nature. 2009. WWF position and climate change mitigation. 12 p.
50. Yang, S., Wang, Q., Fedorova, E., Liu, J., Qin, Q., Zheng, Q., Price, P., Pna, H., Wang, D., Griffiths, J., Bisseling, T and H. Zhu. 2017. Mycosymbiont discrimination mediated by a hots-secreted peptide in *Medicago truncatula*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 114(26): 6848- 6853.
51. Yates, R., Howieson, J. and M. Hungria. 2016. Authentication of rhizobia and assessment of the symbiosis in controlled plant growth systems. pp:73-108. In: J.G. Howieson and M.J. Dilworth (Eds). Working with rhizobia. Australian Center for International Agricultural Research. Camberra Australia.

52. Zuñiga, E., Godoy, R., Martínez, M y M. Ricci. 1998. Inoculación de plantas con organismos simbiotes: una alternativa para restauración de sitios degradados. pp 32-39. Boletín N° 13. Soc. Chilena de la Ciencia de suelo.

Anexo 1. Sistema de clasificación de la nodulación para sistemas radiculares jóvenes. (adaptado de Center for *Rhizobium* Studies, 2012).

