



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Forestales
Programa Doctorado en Ciencias Forestales

**RIZOBACTERIAS QUE PROMUEVEN EL
ENRAIZAMIENTO DE MINIESTACAS DE HÍBRIDOS
DE *EUCALYPTUS* SP. Y SUS POSIBLES MECANISMOS
DE ACCIÓN.**

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Forestales

PAULINA GONZÁLEZ CANDIA

Profesor Guía: Eugenio Sanfuentes
Dpto. de Silvicultura, Facultad de Ciencias Forestales
Universidad de Concepción

CONCEPCIÓN-CHILE

Julio 2021

**RIZOBACTERIAS QUE PROMUEVEN EL ENRAIZAMIENTO EN
MINIESTACAS DE HÍBRIDOS DE *EUCALYPTUS* SP. Y SUS POSIBLES
MECANISMOS DE ACCIÓN.**

Comisión Evaluadora:

Eugenio Sanfuentes Von Stowasser (Profesor guía)

Ingeniero Forestal, Dr.

Katherine Sossa Fernández (Profesor co-guía)

Biologa, Dr.

Acelino Couto Alfenas (Comisión evaluadora)

Ingeniero Forestal, Ph.D.

José Becerra Allende (Comisión evaluadora)

Químico Farmacéutico, Dr.



Director de Postgrado:

Darcy Ríos Leal

Profesora Biología y Química, Dr.

Decano Facultad de Ciencias Forestales:

Manuel Sánchez Olate

Ingeniero Forestal, Dr.

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer a mi profesor guía el Dr. Eugenio Sanfuentes por su apoyo en la realización de esta investigación a pesar de las dificultades.

A los laboratorios de Patología Forestal de la Facultad de Ciencias Forestales y el laboratorio de Microbiología Ambiental y Biopelículas del centro de Biotecnología, ambos de la Universidad de Concepción. En especial a todas las personas que lo integran e integraron, por su valiosa ayuda en cada etapa de esta tesis.

A don Carlos Villagra y don Francisco Rodríguez jefes del vivero Carlos Douglas de Forestal Mininco y a todos los trabajadores que ayudaron en cada ensayo de campo.

A mi familia y amigos, por su constante ánimo y en especial a mi esposo Andrés por su apoyo incondicional y su confianza en mí.

Finalmente agradecer a CONICYT por financiar la realización de este doctorado.

TABLA DE CONTENIDOS

INDICE

AGRADECIMIENTOS	3
TABLA DE CONTENIDOS	4
INDICE DE FIGURAS	6
INDICE DE TABLAS	7
RESUMEN	8
ABSTRACT	10
CAPÍTULO 1	12
1.1 INTRODUCCIÓN GENERAL	12
1.1.1 Híbridos de <i>Eucalyptus</i> spp	12
1.1.2 Propagación de <i>Eucalyptus</i> spp.	13
1.1.3 Enraizamiento adventicio	14
1.1.4 AIA y etileno en el enraizamiento	15
1.1.5 Rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas (PGPR).	17
1.1.6 Mecanismos indirectos.	18
1.1.7 Mecanismos directos.	20
1.1.8 PGPR en especies forestales.	22
1.2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	24
ABSTRACT	25
MATERIALS AND METHODS	28
Isolation of the rhizobacteria	28
Rooting Trials	28
Evaluation and experimental design	29
Identification of the rhizobacteria	29
RESULTS	30
Trial one	30
Trial two	32
Trial three	33
DISCUSSION	36
CONCLUSIONS	39

ACKNOWLEDGMENTS	39
REFERENCES	40
CAPÍTULO 3	46
Abstract	46
Introduction	48
Methodology	50
Results	55
Rooting trial.....	57
Discussion.....	58
REFERENCES	62
RESUMEN	69
4.1 INTRODUCCIÓN	70
4.2 METODOLOGÍA.....	73
4.2.1 Aislamiento de bacterias endófitas.....	74
4.2.2 Ensayos en vivero	75
4.2.3 Determinación de mecanismos asociados a promoción de crecimiento y enraizamiento e identificación de bacterias endófitas.....	77
4.3 RESULTADOS	79
4.4 DISCUSIÓN.....	85
4.5 CONCLUSIONES	87
4.6. REFERENCIAS.....	88
REFERENCIAS	98

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos asociados a las bacterias promotoras del crecimiento de plantas (Gupta et al. 2015).	18
Figure 1.-Agarose gel from the PCR product using the specific primer of <i>Bacillus thuringiensis</i> cry8. At the top of the gel, the number 1 indicates the lane with the marker of molecular weight 10.000bp. At the bottom of the gel, the number 1 indicates the lane with the marker of molecular weight 100bp. The presence of the cry8 gene is observed in isolate 63 in lanes 2, 3, 4, 5, 6 and in isolate 122 in lanes 7, 9, 10 and 11.	35
Figure 1. Activity of the enzyme ACC-deaminase (expressed as α -ketobutyrate) in the rhizobacterial isolates. Different letters indicate significant differences ($p<0.05$) according to the LSD test. Rooting trial.....	56
Figure 3. Root biomass of <i>Eucalyptus nitens</i> x <i>Eucalyptus globulus</i> X-64 hybrid clone mini-cuttings.....	58
Figura 1. Efecto de PGPRs en plantas y sus mecanismos de acción (Nazir et al. 2018).	72
Figura 2. A) Ensayo de crecimiento y B) Ensayo de enraizamiento. En ambas fotografías se observa disposición de las bandejas con sus respectivas plántulas en invernadero.....	76
Figura 3.- Aislados de bacterias endófitas que incrementaron significativamente ($p<0,05$) la longitud de la raíz (a), longitud de planta (b), la biomasa de raíz (c), y la biomasa de planta (d).....	80
Figura 4.- Aislados de bacterias endófitas que incrementaron significativamente ($p<0,05$) el enraizamiento en miniestacas del clon X-64 (<i>E. nitens</i> x <i>E. globulus</i>), comparado con el control.....	81
Figura 5.- Incremento en el enraizamiento adventicio de miniestacas del clon X-64, el gráfico de cajas indica la distribución en cuanto a las ganancias en el enraizamiento (%).	81
Figura 6.- Proporción de bacterias endófitas con efecto promotor, según órgano de aislamiento. Efecto en longitud de raíz de <i>E. nitens</i> (b), altura de planta del híbrido X-65 (b), longitud de planta del híbrido X-65 (c) y enraizamiento del híbrido X-64(c).....	82
Figura 7.- Producción de (a) sideróforos por el aislado EH-111 (<i>Achromobacter insuavis</i> y (b) solubilización de fosfato por el aislado EH-400 (<i>Pantoea rodasi</i>).....	84

INDICE DE TABLAS

Table 1. - Rooting of <i>Eucalyptus nitens</i> x <i>E. globulus</i> (clone X-64) mini-cuttings, treated with different rhizobacterial strains and control (Trial one).....	31
Table 2.- Rooting and root length in the <i>Eucalyptus nitens</i> x <i>E. globulus</i> X-64 and X-65 clones mini-cuttings treated with different rhizobacterial strains (Trial two).	32
Table 2.- Continuation.....	33
Table 3.- Effect of rhizobacterial strains in rooting and root length in the <i>Eucalyptus nitens</i> x <i>E. globulus</i> X-64 and X-65 clones and control.....	34
Table 1. Rhizobacterial isolates used in <i>in vitro</i> assays.....	50
Table 2. Detection of mechanisms of the rhizobacterial isolates evaluated in the <i>in vitro</i> trials.	56
Tabla 3.- Aislados de bacterias endófitas que presentaron mecanismos asociados a la promoción del crecimiento en plantas.	83



RESUMEN

En Chile, el sector forestal es fundamental en la economía, donde las plantaciones de las especies *Eucalyptus globulus* y *E. nitens* en conjunto suman más de 800 mil hectáreas, ocupando el segundo y tercer lugar en importancia, respectivamente. En los últimos años se ha incorporado a las plantaciones el híbrido *E. nitens* x *E. globulus* que combina características deseables de ambas especies, transformándose en una alternativa para incrementar la productividad. Sin embargo, las especies de eucalipto e híbridos pueden presentar dificultades en su cultivo clonal, debido al bajo enraizamiento de las miniestacas, obstaculizando la propagación operacional en viveros. Con esto surge la necesidad del desarrollo e implementación de nuevas tecnologías que mejoren el proceso de enraizamiento. En este contexto, las posibilidades que ofrece la biotecnología, aparecen como alternativa de interés, y dentro de estas el uso de rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas (PGPR).

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto promotor de enraizamiento de rizobacterias en miniestacas de dos clones híbridos de *Eucalyptus*, los mecanismos que estarían asociados a este efecto promotor, y la identificación de estas bacterias. Además se evaluó el efecto de bacterias endófitas en el enraizamiento y crecimiento de plántulas de *Eucalyptus*.

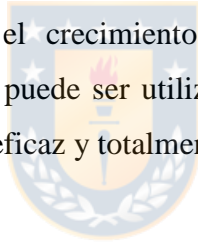
En una primera fase fueron realizados ensayos en condiciones operacionales de vivero, en las temporadas primavera-verano con más de 100 bacterias aisladas desde la rizosfera de clones de *Eucalyptus* spp. Suspensión de rizobacterias fueron aplicadas en la base de las miniestacas y también como riego en los clones X-64 y X-65, evaluándose el nivel de enraizamiento de los aislados, y posteriormente la producción de: ácido indol acético (AIA), sideróforos, amoníaco, ácido cianhídrico (HCN), enzimas líticas y la enzima ACC desaminasa, la capacidad de las bacterias de solubilizar fosfato y la inhibición del crecimiento del patógeno *Botrytis cinerea* por parte de las bacterias. Las rizobacterias con mayor efecto en el enraizamiento fueron identificadas por secuenciación del ADNr 16S.

Entre los aislados evaluados, en primera instancia 30 aumentaron significativamente el enraizamiento con un aumento promedio de 47%. Los 10 aislados con un mayor y consistente efecto durante los tres ensayos, tuvieron enraizamientos que fluctuaron entre 22 y 33%, y correspondieron a especies de *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Chryseobacterium*,

Mucilaginibacter y *Rhodococcus*, además se determinó que las rizobacterias que tuvieron efecto positivo en el enraizamiento, presentaron uno o más mecanismos de acción con la producción indistinta de amoníaco, sideróforos y ACC-desaminasa así como de proteasas, HCN, y AIA. Asimismo se observó que las rizobacterias tuvieron la capacidad de solubilizar fosfato e inhibir el crecimiento del patógeno *B. cinerea*. La estimulación del enraizamiento se observó en los periodos más ambientalmente desfavorables para el enraizamiento de eucalipto, dando cuenta que el efecto promotor de las bacterias se produciría cuando las plantas están sujetas a estrés.

Las bacterias endófitas aisladas desde *Eucalyptus* también aumentaron en condiciones de vivero el crecimiento en plantas de *E. nitens*, del híbrido *E. nitens x E. globulus* X-65 y el enraizamiento de las miniestacas del híbrido X-64, con producción de sideróforos, amoníaco y solubilización de fosfato.

Los antecedentes y resultados obtenidos en esta investigación aportan información relevante en cuanto al uso de rizobacterias, siendo también el primer reporte del uso de bacterias endófitas para mejorar el crecimiento y enraizamiento de plántulas de *Eucalyptus*. Toda esta información puede ser utilizada como base para la formulación de un bioproducto o biofertilizante eficaz y totalmente inocuo para el medio ambiente.



ABSTRACT

In Chile, the forestry sector is fundamental in the economy, where the species *Eucalyptus globulus* and *E. nitens* together add up to more than 800 thousand hectares, occupying the second and third place in importance, respectively. In recent years, the hybrid *E. nitens* x *E. globulus* has been incorporated into the plantations that combines desirable characteristics of both species, becoming an alternative to increase productivity. However, eucalyptus and hybrid species can present difficulties in their clonal cultivation, due to the low rooting of mini-stalls, impeding the operational propagation in nurseries, resulting in the need for the development and implementation of new technology that improves the rooting process. In this context, the possibilities offered by biotechnology arise as alternatives of interest, and within these the use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR).

The objective of this research was to evaluate the effect of rhizobacteria on the rooting of mini-stakes of two hybrid clones of *E. nitens* x *E. globulus*, in addition to identifying the possible mechanisms associated with the promoter effect, and the rhizobacteria that would exert this effect. It was also part of the research to evaluate the effect of endophytic bacteria on the rooting and growth of *Eucalyptus* seedlings.

In a first phase, tests were carried out under nursery operational conditions, in the spring-summer seasons with more than 100 bacteria isolated from the rhizosphere of clones of *Eucalyptus* spp. Rhizobacteria suspension were applied at the base of the mini-stakes and also as irrigation in clones X-64 and X-65, assessing the level of rooting of the isolates, as well as the production of: indole acetic acid (AIA), siderophores, ammonia, hydrocyanic acid (HCN), lithic enzymes and the ACC enzyme in addition to the ability of bacteria to solubilize phosphate. Rhizobacteria with the greatest rooting effect were identified by sequencing the 16s rDNA.

Among the isolates evaluated in the first instance, 30 significantly increased rooting with an average increase of 47%. The 10 isolates with a greater and consistent effect during the three trials, had rooting that fluctuated between 22 and 33%, and corresponded to species of *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Chryseobacterium*, *Mucilaginibacter* and *Rhodococcus*, it was also determined that the rhizobacteria that had a positive effect on rooting, presented one or more mechanisms of action with the indistinct production of ammonia, siderophores and ACC-deaminase as well as proteases, HCN, and AIA.

Phosphate solubilization and antagonism against *B. cinerea* were also observed as mechanisms. Together, it was found that rooting stimulation was more unfavorable environmental conditions for eucalyptus rooting. The background and results obtained in this investigation can be the information base for using these microorganisms in a marketable biofertilizer.



CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUCCIÓN GENERAL

El sector forestal en Chile es un pilar fundamental de la economía, representando el 2% del producto interno bruto (PIB) y aportando con 300.000 empleos directos e indirectos al sector productivo. Esta industria, tercera en exportaciones y la primera basada en un recurso natural renovable, posee 17,5 millones de hectáreas de cobertura forestal, aproximadamente un quinto del área total del país, donde las plantaciones forestales ocupan un 14% y el resto corresponde a bosques nativos (86%). Las plantaciones se localizan entre las regiones de O'Higgins y de Los Lagos y están constituidas principalmente por *Pinus radiata* D. Don, *Eucalyptus globulus* H. Labill y *Eucalyptus nitens* E. Maiden con el 58%, 24% y 10,8%, respectivamente, del total de bosques plantados (CORMA 2019).

Las especies de *Eucalyptus* poseen más de 800 mil hectáreas plantadas encontrándose la mayor superficie plantada en la región del Biobío, destacándose *E. globulus* como la especie con mayor valor comercial en Chile debido a su variedad de usos tanto como fibra y madera, papeles de impresión, pisos, molduras, chapas y parquet (INFOR 2018). Posee un alto crecimiento, buena forma, densidad de madera y bajo contenido de lignina, lo cual facilita el proceso de extracción de celulosa (Schwambach *et al.* 2005, Sotelo y Monza 2007).

1.1.1 Híbridos de *Eucalyptus* spp

A pesar de la relevancia alcanzada por *E. globulus* en la industria forestal local, esta especie presenta algunas dificultades en su cultivo. Debido a su sensibilidad a las bajas temperaturas, puede sufrir severos daños y comprometer su producción en las regiones más frías del país (Ipinza *et al.* 2014). Sin embargo, el hecho de que otras especies de *Eucalyptus* presenten mayor tolerancia a los efectos negativos del congelamiento o heladas, ha llevado a que la hibridación con especies tolerantes al frío promueva una considerable mejora en la producción (Medina *et al.* 2015). Se ha demostrado que mediante la hibridación interespecífica se pueden combinar en un individuo, características deseables (forma, densidad de la madera, crecimiento, tolerancia a

heladas, resistencia a plagas etc.) de dos especies de valor forestal. Esta conjunción de cualidades de distintos individuos, se manifiesta como “vigor híbrido” o heterosis, constituyendo una superioridad por sobre los progenitores (Ipinza *et al.* 2014).

La hibridación ha sido utilizada para transferir resistencia al cancro de eucalipto a *E. grandis* mediante su cruzamiento con *E. urophylla* (Sartori *et al.* 2018), también se constató que el uso de heterosis ha permitido incrementos volumétricos en híbridos de *E. toleriana* x *E. citridora* (Kapoor y Sharma, 1983) y en *E. camaldulensis* x *E. tereticornis* (Harrand y Schenone, 2002). La hibridación de *E. globulus* con la especie tolerante al frío *E. nitens* también ha sido exitosa (Volker *et al.* 1994, Gomes y Canhoto 2003), obteniéndose además de rasgos deseados en la madera (Orme *et al.* 1993) buen crecimiento, alta densidad y una mayor capacidad de tolerancia al frío.

1.1.2 Propagación de *Eucalyptus* spp.

Conjuntamente con los beneficios del uso de híbridos para contrarrestar la sensibilidad ambiental y mantener los caracteres comerciales de interés, otro aspecto clave para la producción de especies e híbridos de *Eucalyptus* sp es la forma de propagación empleada para estas (Díaz *et al.* 2009). La propagación o replicación masiva de plantas, es un aspecto relevante dentro del proceso de producción forestal. Actualmente, para *Eucalyptus* spp se dispone de dos sistemas para propagar material “genéticamente superior”. El primero considera el uso de huertos semilleros (reproducción sexual), y la segunda considera la propagación clonal (reproducción asexual) mediante reproducción vegetativa. Esta última alternativa proporciona importantes ventajas en relación al uso de huertos semilleros de polinización abierta, debido principalmente al incremento en el volumen de producción (Arnold *et al.* 1991, Noda-Jiménez *et al.* 2000). Además, permite fijar caracteres genéticos al producir copias genéticamente idénticas al árbol progenitor, y es un método de propagación de menor costo, se lleva a cabo en mayor o menor grado de sofisticación en la mayoría de las empresas forestales que han adoptado la silvicultura clonal, y se considera estratégica para mejorar el rendimiento y la calidad de los cultivos (Zobel 1993, Assis *et al.* 2004, Brondani *et al.* 2012). Dentro de la propagación clonal, la utilización de estacas y miniestacas es un método ampliamente utilizado para *Eucalyptus* sp. por la mayor facilidad de manejo en comparación con los métodos de micropropagación. Las estacas y miniestacas son esquejes que corresponden

segmentos de tallo con yemas, que se obtienen desde una planta madre. Las raíces que se desarrollan a partir de estas se denominan adventicias, y su formación es un aspecto clave en el proceso de propagación clonal. El pobre enraizamiento mediante el uso de estacas convencionales es una limitación importante para la clonación, y entre otros factores se ha atribuido al grado de maduración del material vegetal (Titon *et al.* 2006). Debido a este tipo de dificultades, la introducción de las mini-estacas ha mejorado el potencial de enraizamiento y la velocidad y calidad del sistema de raíces; ya que las miniestacas, a diferencia de las estacas al ser obtenidas desde brotes axilares de plantas madres mantienen un alto grado de juvenilidad (Assis *et al.* 2004).

1.1.3 Enraizamiento adventicio

El desarrollo de raíces adventicias es una etapa esencial en el enraizamiento y, por lo tanto, es un factor determinante del éxito de la propagación clonal. El proceso consta de tres fases sucesivas interdependientes y con diferentes requisitos fisiológicos: inducción, iniciación y expresión. La inducción es la fase donde ocurren eventos moleculares y bioquímicos, en que células específicas del tallo se vuelven competentes a la señal rizogénica (De Klerk *et al.* 1999, Li *et al.* 2009, Pacurar *et al.* 2014). La fase de iniciación está constituida de divisiones celulares consecutivas que conducen a la formación de los meristemas de raíces y luego las primeras células se dividen consecutivamente, determinando la formación de la raíz bajo la influencia de la señal inductora de raíz, la auxina ácido indol acético (AIA). En la última etapa llamada expresión ocurre a la aparición de la raíz (Kevers *et al.* 1997, Li *et al.* 2009). El éxito del proceso de enraizamiento, tanto en términos de calidad del sistema radical como de porcentaje de enraizamiento, depende, por lo tanto, del grado de optimización de cada una de estas tres fases (Bellamine *et al.* 1998, Yadav *et al.* 2010).

A pesar del alto potencial de la propagación clonal como mecanismo para masificar el material vegetal, este método presenta importantes dificultades para su exitosa aplicación en los cultivos forestales, manifestándose como un déficit en el enraizamiento y formación de plantas en algunos clones, afectando la ejecución de los programas de plantación (Xavier *et al.* 1997, Schwambach *et al.* 2005, Brondani *et al.* 2012). En este sentido, y a pesar de los avances en las técnicas de clonamiento y aumento en las tasas de enraizamiento y desarrollo del sistema radicular, ocurren

variaciones en la capacidad de enraizar entre especies de *Eucalyptus*, entre sus híbridos y dentro de clones de la misma especie (Mafia *et al.* 2007a, Teixeira *et al.* 2007). Esta variabilidad radica en que el enraizamiento puede ser afectado por factores exógenos y endógenos al material vegetal. Exógenamente pueden afectar la temperatura, la humedad, las características del sustrato y los microorganismos del suelo (Mafia *et al.* 2007b). Por su parte, los factores endógenos que influyen en el enraizamiento incluyen el estado nutricional, las características genéticas de la planta y las hormonas (Ragonezi *et al.* 2010). Dentro de las hormonas sin duda el rol central lo posee el AIA, “fitohormona” vegetal o regulador de crecimiento vegetal considerada la más importante en la formación de las raíces adventicias. Estudios moleculares realizados en especies de plantas modelo, han confirmado el papel central de la auxina en la formación de raíces adventicias y muestran las complejas interacciones de regulación cruzada entre la auxina y muchas fitohormonas diferentes en la regulación de este proceso (Pacurar *et al.* 2014).

1.1.4 AIA y etileno en el enraizamiento.

Se ha establecido que el AIA es la fitohormona más importante en el enraizamiento, esta es sintetizada a partir de triptófano, indol o glicerol fosfato. Su catabolismo consiste en la descarboxilación oxidativa por peroxidasas o vías alternativas sin descarboxilación, y puede conjugarse por lo general con aminoácidos formando amidas, y con azúcares formando ésteres, pudiendo almacenarse de esta forma (Kawaguchi y Sydno 1996). La mayoría de las formas conjugadas son resistentes a las enzimas oxidativas, por lo que pueden volver a ser auxinas libres para definir la regulación de su actividad.

El AIA promueve el enraizamiento ya que se une a una proteína receptora de membrana activando una cascada de señales de transducción que determinan la elongación celular a través de la activación de genes (Figura 1). En el enraizamiento, las mayores concentraciones de auxina se han observado en la fase de inducción, mientras que se convierten en inhibidoras en la fase de iniciación. La respuesta del enraizamiento, por lo tanto, está fuertemente afectada por el contenido endógeno de auxinas. Los ápices de los brotes son la mayor fuente de auxinas endógenas y los tallos poseen un activo movimiento basipétalo a través de las células del parénquima vascular llevado a cabo

por proteínas transportadoras de influjo y eflujo, llamadas AUX1 y PIN, respectivamente (Fogaca y Fett-Neto 2005).

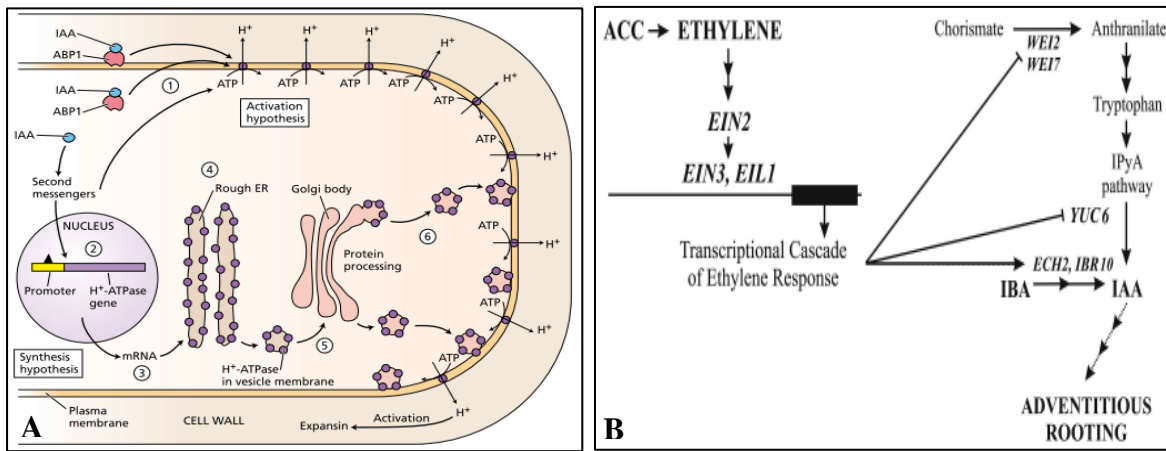


Figura 1.- A) Expansión celular inducida por AIA mediante la activación de genes (Fuente: Taiz y Zeiger 2010) y B) relación entre AIA y etileno (Fuente: Velocchia *et al.* 2016).

El etileno considerada otra fitohormona también juega un papel central en el enraizamiento, ya que al actuar en situaciones de estrés biótico y abiótico conduce a varios efectos morfogénicos que inhiben fuertemente el alargamiento de las células del meristema radicular (Ruzicka *et al.* 2007) y por consiguiente el enraizamiento. Su aumento puede darse en diversos tipos de estrés incluyendo congelamiento, calor, infección, heridas, presencia de patógenos y estrés nutricional (Glick 2012), a concentraciones muy elevadas de auxina se activa la transcripción del gen de la ACC sintasa (ácido 1- aminociclopropano-1-carboxilato), enzima precursora del etileno afectándose también el enraizamiento (Galland *et al.* 2012). En manzana por ejemplo, el ACC promueve el enraizamiento en los sistemas bien aireados, como discos de hoja, sin embargo, es inhibitorio en estacas cultivadas en agar debido a las cantidades tóxicas de etileno acumulado alrededor de la base del tallo, producido por la anoxia (De Klerk *et al.* 1999).

Dada la importancia de las fitohormonas en el proceso de enraizamiento, en los viveros de producción de miniestacas de *Eucalyptus* se utilizan análogos sintéticos del AIA como el AIB (ácido indol butírico), lo que lleva a aumentos en los costos de producción, e implica la contaminación del suelo a largo plazo sin resultados óptimos. En consecuencia, resulta fundamental en los viveros forestales minimizar el uso de estos

compuestos y por sobre todo mejorar el enraizamiento. Es por ello que el uso de estrategias alternativas que optimicen o complementen los métodos ya utilizados para mejorar la formación de raíces, es de gran interés por parte de las empresas forestales y encabezan líneas de investigación en países con una avanzada industria forestal. Así, enmarcado en el uso de tecnologías efectivas, menos costosas y más amigables con el medio ambiente surge el estudio de las bacterias del suelo como estrategia en la biotecnología forestal, debido a que su influencia puede aumentar el enraizamiento y crecimiento de las plantas.

1.1.5 Rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas (PGPR).

Las rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas, en adelante PGPRs, han emergido como estrategia promisoría en vista de las posibilidades de aumentar el enraizamiento, el crecimiento y promover el control biológico de patógenos. La capacidad de estas bacterias para incrementar el crecimiento y rendimiento de plantas ha sido ampliamente demostrada en cultivos agrícolas (Karlidag *et al.* 2007, Ercisli *et al.* 2010) siendo escasos los estudios realizados en especies forestales (Chanway 1997, Mafia *et al.* 2005, Karthikeyan y Sakthivel 2011). Las PGPRs son bacterias que pueden habitar la rizósfera o capa de suelo adyacente a la raíz, así como el rizoplano (superficie de la raíz), donde logran incluso formar biopelículas, además de los espacios inter e intracelulares de la raíz como bacterias endófitas (Gray y Smith 2005, Goswami *et al.* 2016, Coy *et al.* 2019). La rizósfera es una zona directamente influenciada por las raíces, especialmente por sus exudados, los cuales intervienen en los procesos físicos, químicos y biológicos del suelo. Estos exudados abarcan una gama de compuestos incluyendo: iones, agua, oxígeno libre, enzimas, mucílagos, aminoácidos, ácidos orgánicos, proteínas, azúcares y compuestos fenólicos (Bais *et al.* 2006). La interacción que se da entre las raíces de plantas y las bacterias se debe a la utilización por parte de las rizobacterias, de estos exudados como fuente de carbono y energía (Benizri *et al.* 2001).

Existen dos mecanismos por los cuales las PGPRs pueden estimular el crecimiento de las plantas, llamados mecanismos directos e indirectos (Figura 2). La promoción indirecta del crecimiento de las plantas se produce cuando las rizobacterias disminuyen o previenen los efectos nocivos de uno o varios organismos fitopatógenos, y consideran;

la estimulación de la resistencia sistémica inducida (IRS) en la planta, la producción de sideróforos, la producción de antibióticos, parasitismo, y competencia por nutrientes y espacio hacia los patógenos (Ping y Boland 2004, Romeiro *et al.* 2005, Siddiqui *et al.* 2005, Compant *et al.* 2010).

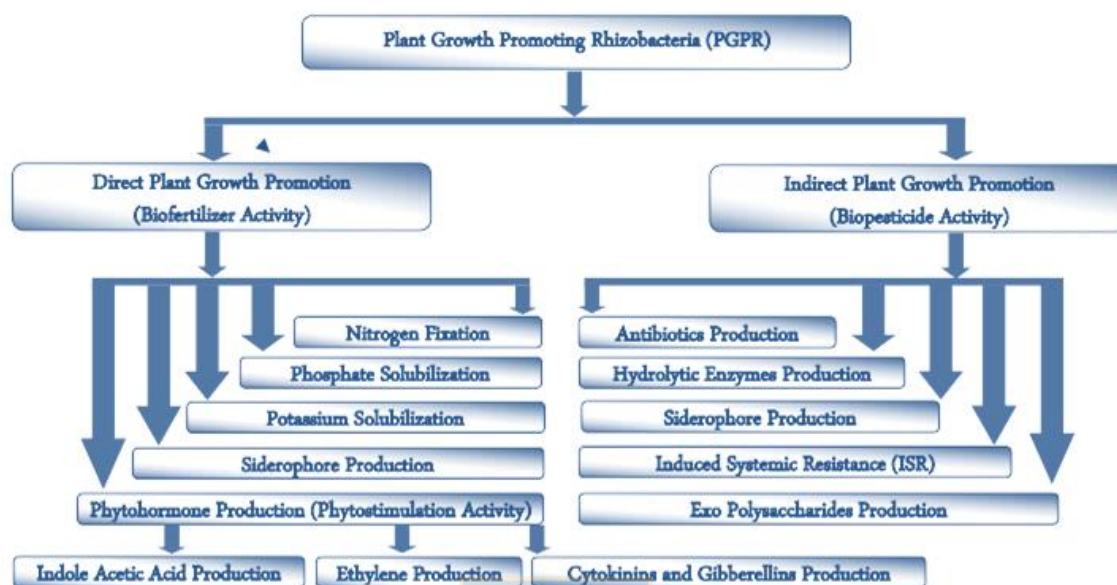


Figura 2. Mecanismos asociados a las bacterias promotoras del crecimiento de plantas (Fuente: Gupta *et al.* 2015).

1.1.6 Mecanismos indirectos.

La resistencia sistémica inducida ISR (Induced Systemic Resistance), es causada por microorganismos no patógenos, a diferencia de la resistencia sistémica adquirida (SAR) que se obtiene luego de que la planta se ve afectada por patógenos (Choudhary *et al.* 2009, Maksimov *et al.* 2011). En la ISR, debido a la colonización de la planta huésped por rizobacterias, se generan cambios metabólicos que desencadenan mecanismos de defensa en la planta como la producción de fitoalexinas, acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) y deposición de barreras estructurales (Fatima y Anjum 2017).

Por ejemplo, una especie de *Streptomyces*, induce la resistencia antimicrobiana *in vitro* y en plantas contra patógenos, activando rutas de señalización en *Arabidopsis* contra *Erwinia carotovora* (Conn *et al.* 2008), con *Azospirillum* sp. se constató un efecto similar al estimular la resistencia a enfermedades en arroz y promover el crecimiento

(Yasuda *et al.* 2009). Yi *et al.* (2013) que inocularon *Bacillus pumilus* en plantas de pimienta observaron una disminución significativa en los síntomas de la mancha bacteriana causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. A su vez las bacterias endófitas también han sido señaladas como desencadenantes de la IRS, siendo efectivas contra diferentes tipos de patógenos y distinguiéndose de la SAR ya que no causa síntomas visibles en la planta (Ryan *et al.* 2008).

El hierro es un mineral vital para las plantas, en el suelo no se encuentra disponible para su directa captación por los microorganismos pues se encuentra en el estado Fe^{3+} el cual predomina en el ambiente. Para su desarrollo, algunas rizobacterias producen y liberan compuestos de bajo peso molecular llamados sideróforos, que se unen al hierro con alta afinidad, esta unión permite a las bacterias captar mediante un receptor específico localizado en su membrana externa el complejo hierro-sideróforo. Una vez dentro de la célula el hierro es liberado encontrándose disponible para sobrellevar el crecimiento microbiano (Eldor 2007, Glick 2012). Muchas bacterias descritas como productoras de sideróforos, protegen a la planta hospedera al disminuir la cantidad de este mineral para los fitopatógenos. Entre ellas *P. syringae* (Wensing *et al.* 2010) y *Bacillus atrophaeus* (Shanmugam *et al.* 2011). Las PGPRs pueden entonces evitar de cierta forma la proliferación de hongos y otros patógenos por producción de sideróforos en el área alrededor de la raíz. Mientras tanto, las plantas no son afectadas por esta localizada reducción de los niveles de hierro del suelo, pudiendo crecer a concentraciones hasta 1000 veces menores (Dastager *et al.* 2010, Ahmed y Holmstrom 2014).

Dentro de los considerados mecanismos indirectos, la utilización de microorganismos antagonistas contra patógenos de plantas se ha propuesto como una alternativa a los pesticidas químicos en cultivos agrícolas. Se ha observado la capacidad de producir antibióticos principalmente en especies de *Pseudomonas* y *Bacillus*, donde se incluyen el 2,4-diacetil floroglucinol, el ácido 1-carboxílico fenazina, pirrolnitrina, viscosinamida, butirólactonas, ácido cianhídrico (HCN), aerugina y otros. Entre los efectos de estos antibióticos se cuentan la actividad antimicrobial, antiviral y antifúngica (Beneduzi *et al.* 2012). En la especie *Paenibacillus polymixa* se ha demostrado la producción de péptidos antifúngicos capaces de inhibir el crecimiento de *Leptosphaeria maculans* el agente causal del pie negro de canola (Miransari 2011).

El fenómeno de competencia también se observa entre los microorganismos de la rizósfera y la colonización exitosa de las raíces es uno de los factores más importantes para ser un buen competidor en este microambiente. Se ha determinado que ciertas *Pseudomonas* desplazan la microbiota nativa compitiendo así por el espacio, reduciendo con esto la población de microorganismos nocivos (Prashar *et al.* 2014), además su síntesis de lipopolisacárido le permite una mayor adhesión a superficies. Por otra parte, el uso de diferentes fuentes de carbono, la movilidad y las respuestas quimiotácticas entre otros factores son también importantes para ocupar el espacio y limitar el crecimiento de patógenos en la rizósfera (Santoyo *et al.* 2012).

1.1.7 Mecanismos directos.

Este mecanismo describe la estimulación del desarrollo de la planta mediante la facilitación de compuestos nutritivos por parte de las rizobacterias, ya sea produciéndolos o mejorando su captación. Conlleva una o más formas tales como la fijación de nitrógeno, la solubilización de minerales, la síntesis de distintas fitohormonas y la producción de enzimas que pueden modular los niveles de fitohormonas (Penrose y Glick 2002, Siddiqui *et al.* 2005, Gupta *et al.* 2015). Dada esta capacidad de las rizobacterias para aumentar la disponibilidad de nutrientes hacia la planta, se les ha denominado “biofertilizantes” (Vessey 2003, Goswami *et al.* 2016). Entre las ventajas de utilizar estos microorganismos se destaca la disminución del impacto negativo derivado del uso continuado de fertilizantes químicos en el suelo y el ambiente y reducir los costos por la adición de compuestos estimuladores del crecimiento (Adesemoye 2003, Gupta *et al.* 2015).

Una de las formas en que las PGPRs aumentan la eficiencia en la obtención de nutrientes, es mediante la captación de fósforo. Este mineral precipita en el suelo después de su aplicación quedando menos disponible para las plantas (Gyaneshwar *et al.* 2002). Ciertas rizobacterias son capaces de solubilizar el fósforo insoluble jugando un rol clave en la nutrición al aumentar la disponibilidad de fósforo para las plantas. El principal mecanismo es solubilizar el fosfato del suelo disminuyendo el pH por medio de la producción y liberación de ácido orgánicos. Los grupos hidroxilo y carboxilo de estos ácidos orgánicos quelan el catión Al, Fe y Ca unido al fosfato convirtiéndolo en una forma soluble (Khan *et al.* 2009). *Bacillus* y *Pseudomonas* son las principales bacterias capaces de solubilizar fósforo insoluble. Sin embargo, también han sido

reportados como solubilizantes de fósforo especies de *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Serratia*, *Phyllobacterium ureafaciens*, *Azotobacter chroococcum*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Pantoea* (Zaidi *et al.* 2009, Mehmood *et al.* 2018).

Finalmente, la síntesis de fitohormonas llevada a cabo por muchas bacterias del suelo, es actualmente considerada como una importante condición para la interacción entre rizobacterias y plantas. Muchas PGPR poseen un set de características metabólicas para la síntesis de fitohormonas tipo auxinas como el AIA, y son capaces además de aumentar el contenido de esta fitohormona en varios tejidos y órganos de la planta (Loper y Schroth 1986, Merzaeva y Shirokikh 2010). Sobre el 80% de las rizobacterias pueden producir AIA (Loper y Schroth 1986) y la cantidad producida varía entre especies (Noreen *et al.* 2012). Su síntesis se ha descrito en bacterias pertenecientes a varios géneros, entre ellos *Azotobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter* y *Pseudomonas* (Tsavkelova *et al.* 2005). El mayor requisito para la síntesis de AIA es la presencia del aminoácido triptófano precursor de esta fitohormona (Barazani y Friedman 1999, Merzaeva y Shirokikh 2010). El triptófano además de ser obtenido mediante los exudados de la raíz puede ser captado por las bacterias a partir de la desintegración de la planta (restos celulares) (Patten y Glick 1996). Antecedentes sobre la producción de AIA a partir de triptófano por parte de rizobacterias se describen por ejemplo, en *Azospirillum brasilense*, que estimula la formación de raíces laterales en plántulas de trigo (Gray y Smith 2005). No obstante, existen varias rutas de biosíntesis. *Agrobacterium tumefaciens* y *A. rhizogenes* sintetizan AIA principalmente por la vía de la indol-acetamida la cual se estima específica de bacterias. En las plantas superiores existe la ruta del ácido indol-3-pyrúvico e indol-3-acetaldehído, aunque también ha sido observada en bacterias no deletéreas como *Erwinia herbicola* (Persello-Cartieaux *et al.* 2003).

Las auxinas no son el único tipo de fitohormona que las rizobacterias son capaces de sintetizar, tanto bacterias de la filósfera como la rizósfera pueden producir citoquininas otro tipo de fitohormona. Se ha demostrado la producción citoquininas en las bacterias *Rhodospirillum rubrum*, *Rhizobium leguminosarum*, *Methylobacterium* sp y *Bacillus* (Serdyuk *et al.* 1995, Ortíz *et al.* 2009, Egorshina *et al.* 2011). Las citoquininas son aminopurinas sustituidas en N6 e influyen en la planta la división celular, la germinación de la semilla, la acumulación de clorofila y la elongación de la raíz. Su síntesis por parte de rizobacterias con influencia en el crecimiento de la planta ha sido

observada, con cepas de *P. fluorescens* que producen citoquininas promoviendo la emergencia de la plántula y la longitud de la raíz en varios cultivos bajo condiciones controladas (García de Salamone *et al.* 2001). Las rutas de síntesis de citoquininas bacteriales que se han propuesto consideran a la adenina como el punto de inicio (precursor) tanto en plantas como en microorganismos, siendo también indicados la adenosina-5'-monofosfato (AMP), isopireno y 3-metil-1-2-buten-1-ol como precursores de la síntesis de citoquininas en *Azotobacter chroococcum*. Arshad y Frankenberger (1998) determinaron que la primaria citoquinina isopentil-adenina (iP), isopentil-adenosina (iPA) o sus derivados fosforilados forman un compuesto con alta actividad biológica tipo zeatina.

La producción de giberelinas otra fitohormona, fue primero descrita en *Azospirillum brasilense* y *Rhizobium*, siendo posteriormente confirmada para *Rhizobium phaseoli* y *Burkholderia* sp con producción de varios tipos de giberelinas. Las giberelinas no jugarían un rol central en el metabolismo de las bacterias, más bien serían un metabolito secundario, sin embargo, varias observaciones sugieren que la producción de giberelinas por los microorganismos puede inducir en sus plantas hospederas la promoción del crecimiento a través de la liberación de estos compuestos (Gutiérrez-Mañero *et al.* 2001, Joo *et al.* 2009). Otros géneros de bacterias también han sido descritos como productores de giberelinas entre ellos *Acetobacter* sp, *Proteus* sp, *Klebsiella* sp, *Bacillus* y *Bradyrhizobium* entre otros (Bastián *et al.* 1998, Karadeniz *et al.* 2006, Bottini *et al.* 2004). Por otra parte existen antecedentes que dan cuenta de la producción de ácido absísico (ABA) en cultivos de la bacteria *A. brasilense*, y que su inoculación en plantas de *A. thaliana* aumenta el contenido endógeno de esta fitohormona (Cohen *et al.* 2008). En tanto, Forchetti *et al.* (2007) da cuenta de la síntesis de ABA en el medio de cultivo de bacterias endófitas aisladas desde plantas de girasol.

1.1.8 PGPR en especies forestales.

El efecto de las PGPR en plantas de interés forestal ha sido determinado en varias especies de coníferas como *Pinus*, *Picea*, *Tsuga* y *Pseudsotsua*, describiéndose un aumento en el crecimiento de plántulas de vivero (Chanway 1997). En *Pinus patula*, *P. taeda* y *P. pinea* ha sido constatado un aumento en la fijación de nitrógeno y la biomasa luego de inocular *B. licheniformis*, *A. chroococcum* y *Pseudomonas* respectivamente (Probanza *et al.* 2002, Orozco y Martínez 2009, Brunetta *et al.* 2010). Mafia *et al.*

(2007a), da cuenta del efecto de PGPR en el enraizamiento de estacas de clones híbridos de *Eucalyptus* (*E. grandis* x *E. urophylla*) en vivero, describiendo aumento en la biomasa y enraizamiento al inocular cepas de *P. aeruginosa*, *P. fulva*, *B. subtilis* y *Stenotrophomonas maltophilia*, concluyendo que éstas podrían ser utilizadas para maximizar la propagación vegetativa de estacas. Además, señalaron que este efecto también era observado en diferentes condiciones de propagación clonal y que la respuesta varía dependiendo del clon y la cepa de rizobacteria utilizada indicando cierta especificidad entre planta y microorganismo, esta especificidad se da debido principalmente a las características de los exudados de las raíces y como estos pueden afectar el comportamiento de los microorganismos que habitan la rizosfera, manifestándose en diferencias entre las comunidades de bacterias dependiendo de la planta hospedera (Dutta y Podile 2010). Díaz *et al.* (2009), aplicaron al substrato cepas de *B. subtilis/amyloliquefaciens*, *B. mycoides* y *Brevibacillus brevis* aisladas de *E. globulus* y *E. nitens*, obteniendo una mayor calidad del sistema radicular (fibrosidad) en las estacas y duplicando el enraizamiento y la biomasa. Puente *et al.* (2010) por su parte describieron un aumento en la tasa de germinación, altura y biomasa de raíz en plántulas de *E. globulus* sobre el 50% al ser inoculadas con *A. brasilense*, como también Karthikeyan y Sakthivel (2011) que aplicaron *Azotobacter choococcum* en la base del tallo y constataron un aumento de hasta 90% sobre el enraizamiento en estacas de *E. camaldulensis*. Angulo *et al.* (2014) verificaron el efecto positivo de aislados de *Arthrobacter*, *Lysinibacillus*, *Rahnella* y *Bacillus* en el crecimiento de plántulas de *E. nitens*, manifestado en un aumento sobre un 50% en la altura, la biomasa y el largo de las raíces. Recientemente González - Díaz *et al.* (2019) observaron un mayor número de hojas y mejoras en el enraizamiento en plántulas de *E. grandis* al inocular *Azotobacter* spp y *Azospirillum* spp.

Como se mencionó, el enraizamiento es una etapa crítica en el proceso de propagación clonal de especies forestales de interés como *E. globulus* y sus híbridos. Este paso aún presenta aspectos no completamente conocidos sobre el rol de las rizobacterias y su efecto en el enraizamiento adventicio. En este sentido ¿puede la inoculación con rizobacterias producir un efecto en incrementar el enraizamiento de miniestacas de clones híbridos de *E. nitens* x *E. globulus*? De ser así, ¿Cuáles son los mecanismos que podrían asociarse a estas bacterias, y que podrían estar involucrados en estimular el enraizamiento de clones híbridos de *E. nitens* x *E. globulus*?

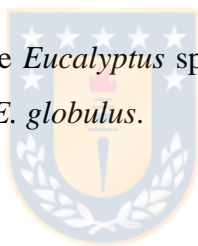
1.2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

1. Rizobacterias aisladas desde clones de *Eucalyptus* spp, aumentan el enraizamiento adventicio de miniestacas de dos clones híbridos de *E. nitens* x *E. globulus*.

2. El mayor enraizamiento de las miniestacas se asocia a más de un mecanismo de acción de las rizobacterias, como síntesis de fitohormonas, producción de enzimas, producción de sideróforos, amoniaco y solubilización de fosfato los cuales estimulan el enraizamiento.

Objetivo General.

Evaluar el efecto de rizobacterias de *Eucalyptus* spp en el enraizamiento adventicio de miniestacas de *Eucalyptus nitens* x *E. globulus*.



Objetivos Específicos.

1. Determinar la capacidad de rizobacterias para incrementar el enraizamiento adventicio de miniestacas de clones híbridos *Eucalyptus nitens* x *E. globulus*.
2. Determinar la capacidad de las rizobacterias (promotoras de enraizamiento) de producir fitohormonas y enzimas con actividad directa e indirecta en el enraizamiento adventicio.
3. Determinar la capacidad de las rizobacterias (promotoras de enraizamiento) de producir moléculas que estimulen de manera directa o indirecta el enraizamiento adventicio.

CAPÍTULO 2

Rhizobacteria strains as promoters of rooting in hybrids of *Eucalyptus nitens* x *Eucalyptus globulus*.

Paulina González, Katherine Sossa, Francisco Rodríguez, Eugenio Sanfuentes.

Publicado en Chilean Journal Agricultural Research 78 (1), octubre 2018.

doi:10.4067/S0718-58392018000100003

ABSTRACT

In Chile, the *Eucalyptus nitens* x *E. globulus* hybrid presents the highest production potential due to its desirable characteristics for the production of cellulose. Nevertheless, its low ability to rooting complicates the clonal propagation in nurseries, with the need for new alternatives to increase rooting.

The objective of this research was to evaluate the effect of rhizobacteria in the adventitious rooting of mini-cuttings of two hybrid *E. nitens* x *E. globulus* clones, wherein 106 rhizospheric bacterial isolates from five species and hybrids of *Eucalyptus* spp. were use. The mini-cuttings were treated at the base with a liquid suspension of rhizobacterial strains. In addition, cultured bacteria that were applied by manual sprinklers in the rooting substrate. In the first trial, 38 percent (%) of rhizobacteria increased significantly the rooting of X-64 clone mini-cuttings. Of these, in a second trial 50% of rhizobacteria maintained their effect in promoting the rooting in two clones, and in the third trial among the 20 strains evaluated, ten increased the rooting in both clones. The rhizobacteria that had the most consistent effect in the rooting increase of the mini-cuttings corresponded to the species of *Bacillus* and *Pseudomonas* sp, as well as, the genus *Chryseobacterium*, *Mucilaginibacter* and *Rhodococcus* sp, with these results, it is concluded that ten rhizobacterial isolates have increased the adventitious rooting of minicuttings of two hybrid clones of *E. nitens* x *E. globulus*, and these inoculants could be used in periods of underperformance of minicuttings, in order to optimize their performance.

Key words: Forestry nurseries, rhizobacteria, roots.

INTRODUCTION

Species derived from the *Eucalyptus* genus, constitute the second most important forestry resource in Chile after the *Pinus radiata* D. Don (INFOR 2015), approximately covering the twenty four percent of the total forest plantations. Its importance is due to its high volumetric yield per area, short fibers and higher wood density, characteristics that are excellent for the production of cellulose (Pereira 2007, Sotelo and Monza 2007). Within the eucalyptus genus species, the eucalyptus (*Eucalyptus globulus* Labill) is the most planted due to its rapid growth and high pulp quality (Coopman et al. 2008), closely followed by the *Eucalyptus nitens* Maiden that presents a lower surface area, however, exhibits high tolerance to low temperatures and rapid growth rate (Humphreys et al. 2008).

In order to identify superior eucalyptus genotypes that increase the levels of production, traditional improvement programs have explored its genetic variation and hybridization. Among the hybrid genotypes, desired characteristics like rapid growth, wood properties like short fiber, pest resistance and stress tolerance are combined for improving the plantations productivity (Grattapaglia and Kirst 2008). From here, the inter-specific hybridization in *Eucalyptus* has been a low cost and efficient method for the improvement programs (Rezende 2014). In Chile, the use of hybrid *Eucalyptus nitens* x *Eucalyptus globulus* clones has become relevant due to their higher production levels in comparison to its parent species, presenting intermediate characteristics of its technological wood properties, added to resistance to cold environments (Madhibha et al. 2007).

The system for proliferating *Eucalyptus* has been based on the clonal propagation, which consists of the adventitious rooting of vegetative material using cuttings and mini-cuttings obtained from mother plants (Pardos 2007). Nevertheless, problems surge with the application of this technique due to the variability in the rooting capacity among the species and hybrid clones, frequently causing a gradual reduction in the rooting potential (Teixeira 2007). The situation in Chile follows this tendency mostly in hybrid clones of *Eucalyptus*, such as the *E. nitens* x *E. globulus* hybrid, which presents reductions in rooting (Díaz et al. 2009).

The adventitious rooting is affected by multiple endogenous and exogenous factors. Specific factors of the plant include the juvenility, the diameter of the cutting, the presence of buds or leaves, the species and the nutritional state of the plant. On the other hand, endogenous factors such as phytohormones, phenolic compounds, and the genetic characteristics of the plant that also influence the rooting (Da Costa et al. 2013). The environmental conditions that also can affect the physiological process are the collection period of the cutting, humidity, temperature, luminosity, photoperiod, chemical composition of the substrate, stress and the microorganisms present in the soil and/or substrate of the rooting (Dennis 2010).

The constant problematic in the adventitious rooting of the elite material for the *Eucalyptus* spp, has intensified the search for methods that increase rooting. In this scenario, the rhizobacteria has appearing as a promising strategy due to its characteristics that allow the increment of rooting and growth rate, in addition to the possibility of acting as biological control agents (Ahemad and Kibret 2014). The potential of the rhizobacteria has been demonstrated principally in agricultural crops, where have been registered increment in the length and biomass of the roots, as well as improvements in the rate of germination and crop production, among others (Karlidag et al. 2007, Saharan and Nehra 2011, Arora et al. 2013). On the other hand in forestry the species research is limited, however, it has been demonstrated that rhizobacteria have increased the biomass and plant height for the species *Pinus*, *Quercus*, *Picea* and *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco and *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh (Mafia et al. 2007, Teixeira et al. 2007, Karthikeyan and Sakthivel 2011, Gumiere et al. 2014). In addition, for the *Eucalyptus grandis* W. Hill and *E. globulus* cuttings, through the application of *Bacillus* spp and *Pseudomonas* spp has been possible to increase the rooting and biomass of these species (Teixeira et al. 2007, Díaz et al. 2009). On the other the use of *Azotobacter chroococum* for the *E. camaldulensis* have presented increment on biomass, and roots number and length (Karthikeyan and Sakthivel 2011).

For these reasons and considering the potential benefit of the bacteria in the production of eucalyptus plants, the objective of this paper was to evaluate the effect of rhizobacteria, in the rooting of mini-cuttings of two hybrid clones of *E. nitens* x *E. globulus*.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of the rhizobacteria

The rhizobacteria isolation was carried out according to the methodology described by Díaz et al. 2009, in which the strains were obtained from the rhizosphere of five clones of *Eucalyptus*: two hybrids of *E. nitens* x *E. globulus* (X-64, X-65), two clones of *E. globulus* (X-49 and X-52) and one clone of the hybrid *E. globulus* x *E. camaldulensis* (X-89). For the isolation process, four selective culture mediums were utilized: casein yeast (CCY) for the *Bacillus* spp. (Stewart et al 1981), King B (KB) for the *Pseudomonas* spp (Geels and Schippers 1983), starch casein (AC) for the *Streptomyces* spp (Kendrick and Ensign 1983) and finally the Reasoner's 2A (R2A agar) as a general isolation medium (Reasoner and Geldreich 1985). During this procedure, the plaques were conserved at 25°C for four days, and later the rhizobacteria samples were selected in terms of color and morphology of its colonies. Finally, the chosen strains were stored in a mixture of liquid medium (R2A broth) and glycerol (70%) at -80°C for their future use during the rooting trials.

Rooting Trials

Three trials were conducted. The first was in January 2011 (Trial one), the second in October 2011 (Trial two) and the third in January 2012 (Trial three), which coincides with the summer season for the clonal propagation of the *Eucalyptus* species in Chile. The trials location was in the “Los Ángeles Forestry Nursery”, owned by Forestal Mininco S.A.

During trial one only the hybrid X-64 (*E. nitens* x *E. globulus*) clone was used and for trials two and three the hybrid clones X-64 and X-65 (all with low rooting) were utilized. Additionally in trials one and two second order mini-cuttings were used, which is obtained for the middle part of the mother plant, this imply that they have no apex and present approximately 5 cm of length. On the other hand, in trial three, 7 cm length apical mini-cuttings were obtained from the apexes of the mother plants.

For the production of the rhizobacteria inoculum, the strains were cultivated using R2A liquid medium during 48 h at 25° C and shaken at 120 rpm, until a concentration of 1×10^8 colony forming unit (UFC)/mL was reached. In addition, 120 ml of cultured bacteria were applied by manual sprinklers in 1 L of the rooting substrate, which was

composed by a mixture of turf, vermiculite and perlite in proportion 50%-30%-20% respectively. The inoculated substrate was introduced in plastic bags for the incubation stage at 25°C during 48 h. At the Forestry Nursery, the collected mini-cuttings were treated through immersion for 10s in bacterial suspension (1×10^8 UFC/ml). Immediately, the mini-cuttings were planted in individual rooting trays (241 cavities), wherein each cavity contains a volume of 15.5 ml of previously treated substrate together with the rhizobacterial strains.

Evaluation and experimental design

The trials were completed a random blocks design, wherein were considered three blocks in trials one and two, and four blocks in trial three. Firstly, trial one was arranged in 107 treatments corresponding to 106 rhizobacterial strains and one control (water), wherein the experimental unit included ten mini-cuttings. Later in trial two, the 32 strains that had best rooting effects in trial one were chosen, adding one control (water) and a 20 mini-cuttings experimental unit. In trial three, the 20 strains with best rooting effects in trial two were chosen, wherein were added one control (water) and a 20 mini-cuttings experimental unit. During the trials, hormones were not used and the relative humidity was maintained at 80% for the first seven days, after this period, the relative humidity was decreased at 70%. After 45 days of each trial's set up, the percentage of rooted mini-cuttings, the length (cm) and the root biomass (dry weight in mg) were evaluated. The results were analyzed with the software SAS 9.2., comparing the means to establish $p < 0.05$ significant differences with the Fisher test.

Identification of the rhizobacteria

The rhizobacteria that had the greatest effect on the rooting of the mini-cuttings was identified through the amplification of the 16S rDNA, using the methodology of Jopia-Contreras et al. (2011) with modifications. The polymerase chain reaction (PCR) was used in order to obtain the segment of amplified DNA with the specific primers 9f and 1492r, with the following sequence; 9f 5'-GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3' y 1492r 5'-GGY TAC CCT GTT ACG ACTT-3'. In addition, the mix used in the reaction was in 25 μ l with: 1 μ l of genomic DNA, 1X Flexi buffer (Promega), 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM of dNTP, 0.5 mM of each primer and 0.025 U/ μ l of GoTaq polymerase (Promega). The amplification process was performed in a Thermocycler (Eppendorf Mastercycler Gradient PCR Thermal Cycler, Model 5331, Germany). The cycle and the

PCR temperature programs were the following: a) one cycle of two min at 95° C; b) 30 cycles configured in three segments; first segment 30 s at 95° C, second segment 30 s at 94° C and third segment one min 30 s at 72°C; then c) one cycle of two min at 72°C maintaining the final PCR product at 4°C. The amplification of the DNA segment was verified by electrophoresis in agarose gel (1.5%), staining the gel with ethidium bromide (0.5µg/ml). The PCR product was sent to Macrogen Inc (Seoul, South Korea) for its sequencing, and the sequences were edited with the software GENEIUS and inserted into the NCBI database for the rhizobacterial strains identification. Afterwards, a complementary identification was developed in order to prove the identity of the strains in which were used the pair of specific cry8f and cry8r primers of *Bacillus thuringiensis* (Chen *et al.* 2014) in a new PCR. The PCR conditions were the same as those previously used with modification in the temperature program as follows: One cycle of 3 min at 94 °C; 35 cycles consisting of three segments; First segment 30 s at 94°C, second segment 40 s at 55°C and third segment from 1 to 72 °C; Then one cycle of 5 min at 72 °C maintaining the final PCR product at 4°C.



RESULTS

Trial one

Among the 106 rhizobacterial strains, 84 strains were evaluated, due to the high mortality in the mini-cuttings of 22 strains, associated to watering problems in some specific sectors within the greenhouse. Over the 84 strains, 32 were significantly increased their rooting of the X-64 clone (Table one), presenting a rooting fluctuation the between 32% and 75%, wherein the strain 53 has triplicate the control rooting of 28%. Additionally, an average gain of 73% is reached among the 32 strains. Moreover, it is important to mention that within the treatments that affected the rooting, 31% were rhizosphere strains of the X-64 clone, indicating correlation between the clone and bacterial strain.

Table 1. - Rooting of *Eucalyptus nitens* x *E. globulus* (clone X-64) mini-cuttings, treated with different rhizobacterial strains and control (Trial one).

Trial 1					
Strain (clon origin)	Rooting (%)	Strain (clon origin)	Rooting (%)	Strain (clon origin)	Rooting (%)
Control	28	20 (X-64)	38*	41 (X-64)	28
53 (X-89)	75*	13 (X-64)	38*	31 (X-49)	27
21 (X-64)	63*	56 (X-65)	37*	24 (X-52)	26
44 (X-49)	63*	119 (X-49)	37*	125 (X-52)	25
89 (X-89)	60*	59 (X-64)	37*	105 (X-89)	25
92 (X-49)	58*	122 (X-52)	37*	27 (X-49)	24
106 (X-49)	58*	72 (X-65)	35	61 (X-89)	24
52 (X-89)	58*	51 (X-89)	35	33 (X-49)	23
14 (X-49)	57*	34 (X-65)	35	114 (X-89)	23
87 (X-65)	56*	35 (X-64)	33	118 (X-64)	23
121 (X-64)	56*	91 (X-89)	33	103 (X-64)	23
46 (X-65)	56*	3 (X-64)	33	74 (X-52)	22
63 (X-65)	53*	55 (X-64)	33	104 (X-64)	22
58 (X-65)	52*	60 (X-64)	33	124 (X-52)	22
86 (X-89)	51*	77 (X-49)	32	12 (X-64)	21
18 (X-64)	47*	83 (X-64)	32	117 (X-89)	20
49 (X-49)	46*	1 (X-52)	32	8 (X-65)	20
62 (X-49)	46*	45 (X-65)	31	109 (X-165)	19
75 (X-52)	44*	67 (X-89)	31	100 (X-52)	19
17 (X-65)	44*	25 (X-89)	30	23 (X-52)	18
69 (X-64)	44*	16 (X-52)	30	4 (X-64)	18
43 (X-49)	43*	68 (X-52)	29	28 (X-65)	17
54 (X-89)	43*	123 (X-52)	29	22 (X-64)	13
48 (X-65)	43*	95 (X-52)	29	112 (X-89)	10
81 (X-64)	42*	102 (X-65)	28	11 (X-64)	7
84 (X-64)	41*	65 (X-64)	28	64 (X-65)	6
116 (X-52)	40*	29 (X-64)	28	79 (X-49)	5
66 (X-64)	40*	7 (X-52)	28	37 (X-64)	4

*Strains that presented rooting (%) significantly greater than control.

Trial two

Among the 32 rhizobacterial strains that increased rooting of the *E. nitens* x *E. globulus* (X-64) clone mini-cuttings in the previous trial, and which were evaluated in this trial, nine rhizobacterial strains had the capacity to significantly increase rooting in the X-64 clone mini-cuttings, presenting a fluctuation between 9 and 18%. Additionally, other seven strains had an effect on the X-65 clone, with a rooting increase between 36-41% (Table 2). Furthermore, in this trial the control rooting for the X-64 clone had an extremely low increase (1%), added to six (6) strains that increased the length of the rooting in the X-64 clone, with no observable effect in roots for the X-65 clone. Finally, in the X-64 clone, three (3) rhizobacterial strains (N°122, N°43 and N°59) have presented changes in both rooting and root length.

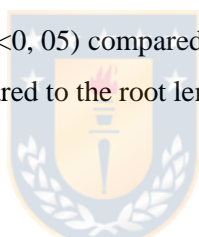
Table 2.- Rooting and root length in the *Eucalyptus nitens* x *E. globulus* X-64 and X-65 clones mini-cuttings treated with different rhizobacterial strains (Trial two).

Trial 2				
Strain	Rooting (%)		Root Length (cm)	
	X-64	X-65	X-64	X-65
Control	1	26	0,1	4,3
122	18*	36*	3,1°	4
43	17*	38*	4,0°	4,4
59	14*	24	3,3°	3,4
87	10*	28	1,4	5
14	9*	28	1,5	3,9
63	9*	29	1,5	3,9
86	9*	36*	1	5
20	9*	30	1,2	5,2
119	9*	39*	1,6	4,1
21	8	24	1,6	4,4
89	8	16	1,8°	3,9
92	8	20	1,4	3,5
44	6	41*	2,6°	4
121	6	40*	1,7	5,1
53	5	31	0,5	4,3
106	5	19	0,9	4,2
17	5	24	0,5	4,2

Table 2.- Continuation...

Trial 2				
Strain	Rooting (%)		Root Length (cm)	
	X-64	X-65	X-64	X-65
116	5	30	1	2,5
51	5	35	1,6	3,6
55	5	15	0,7	2,4
69	4	30	2,3°	3,7
54	4	19	1,6	3,1
81	4	18	1,7	5,6
46	3	35	0,6	5,1
7	3	25	0,4	3,2
18	3	21	1,2	2
48	3	30	1,2	4,2
56	3	20	0,9	3,6
34	1	35	0,9	3,7
58	1	33	0,1	4,4
49	1	40*	0,3	4

*Strains with significant differences ($p < 0,05$) compared to the rooting control and °Strains with significant differences ($p < 0,05$) compared to the root length control.



Trial three

In this trial, twenty (20) rhizobacterial strains have initially tested, where the chosen selection criteria was the highest levels of rooting achieved in the previous trials. Twelve strains have increased their rooting for the *E. nitens* x *E. globulus* X-64 clone mini-cuttings, presenting an average gain of 77% (Table 3). Otherwise for the *E. nitens* x *E. globulus* X-65 clone, ten strains have increased the rooting with an average gain of 27%. Additionally, in this trial, 10 strains presented increased rooting in both clones. The rhizobacteria did not have effect on the root length (Table 3) nor in the biomass for both clones' mini-cuttings.

At the end of these three nursery trials, 10 bacterial strains that obtained the best results in rooting for the *E. nitens* x *E. globulus* X-64 and X-65 clones mini-cuttings were identified, through the sequencing of 16s rDNA. Additionally, through the comparison of the sequences obtained with the NCBI database, five (5) strains have been identified at the genus level, and two at the species level corresponding to *Bacillus thuringiensis*

(Table 4). This identification was completed using the gene cry8, that encodes the specific toxin Cry produced by this species of bacteria. The gel electrophoresis shows the amplification of the gene proving its presence in the strains 63 and 122, identified both as *B. thuringiensis*.

Table 3.- Effect of rhizobacterial strains in rooting and root length in the *Eucalyptus nitens* x *E. globulus* X-64 and X-65 clones and control.

Trial 3				
Strain	Rooting (%)		Root Length (cm)	
	X-64	X-65	X-64	X-65
Control	7	54	4,5	7
119	40*	77*	6	7
18	37*	86*	5,7	7,4
92	34*	67	5,9	7,4
63	32*	79*	5,4	7,3
86	32*	77*	5,3	7,3
14	29*	74*	6,5	7,8
116	29*	68	7	7,1
46	28*	74*	6,1	7,2
49	28*	78*	6,1	7,5
56	27*	67	6,1	7,7
59	27*	68	5,5	6,9
121	26*	75*	5,5	6,9
43	25*	78*	4,8	6,5
87	24	61	5,9	7,4
122	24	74*	4,9	7,6
20	23	57	5,4	7,4
52	22	58	6,1	6,7
51	21	64	5,3	7,6
44	19	62	5	7,4

*Strains that presented significant differences compared to the control strain.

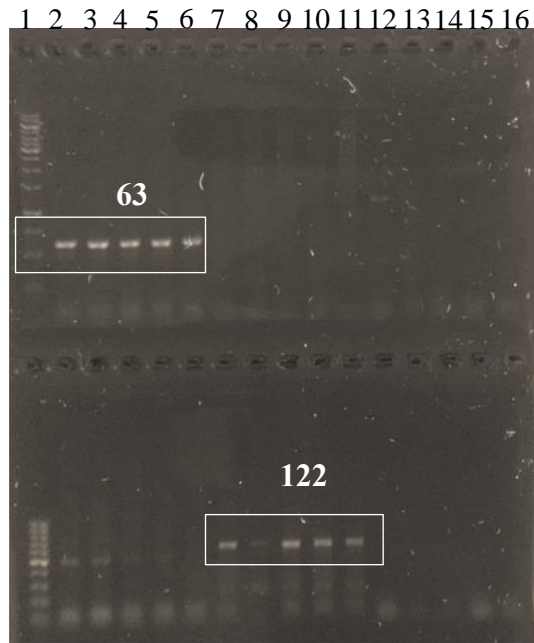


Figure 1.-Agarose gel from the PCR product using the specific primer of *Bacillus thuringiensis* cry8. At the bottom of the gel, the number 1 indicates the lane with the marker of molecular weight 100bp. The presence of the cry8 gene is observed in isolate 63 in lanes 2, 3, 4, 5, 6 and in isolate 122 in lanes 7, 9, 10 and 11.



DISCUSSION

Decades ago, bacteria were being researched in order to establish their ability for increasing growth rates in plants, principally for its application in agricultural crops (Andesemoye et al. 2009, Bhattacharyya and Jha 2012). In particular, the interest for these bacterial inoculums has emerged from the necessity of improve the quantity and quality of the forestry plant production, applying techniques that are more environmentally friendly at a lower cost (Atkhar et al. 2009).

The effect of bacterial inoculums has been verified in conifer seedlings of the genera *Pinus*, evaluating its effect in the increase of the germination rate, height and dry weight of the seedlings (Puente et al 2010). Due to the importance of the forestry industry in countries such as Brazil and Chile, studies about the effect of bacteria in *Eucalyptus* has reached high relevance (Ferreira et al 2008, Pardos 2007). One example of this is the research conducted by Díaz et al. (2011), which verified the effect of rhizobacteria in the rooting and root fibrosity.

In the present study, rhizobacterial strains have been evaluated in sequential trials in an operational nursery. In the first trial, the average gain in the rooting was 70%, results that are similar to those obtained by Teixeira et al. (2007), which presents an average gain of 63% in the cuttings of *Eucalyptus grandis* hybrid clone, through the application of rhizobacteria strains, principally *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas* sp. Additionally, Mafia et al. (2007) also obtained gains between 5 and 90% in the rooting percentage in *Eucalyptus* seedlings with different clonal propagation conditions, using in their research, strains of *Pseudomonas* sp, *Bacillus* sp and *Stenotrophomonas maltophilia*. Moreover, Díaz et al. (2009) also analyzed the potential use of rhizobacteria in order to stimulate the rooting in *E. globulus* mini-cuttings, reaching average gains of 41% through the application of *B. subtilis/amyloliquefaciens* and *B. mycoides*. The increase in the percentage of rooting of these minicuttings, means an increase in the survival of the seedlings that later will be adult trees in the plantations. Therefore, improvement in the first instance of rooting through a biotechnological technique is a valuable tool for the forestry industry. Further in this first trial, most of the strains with rooting effect (31%) were strains from the X-64 clone, demonstrating the specificity of the plant-rhizobacteria. This can be principally explained by the nature of the root exudates, which varies according to the genotype of the plant, influencing the type of bacteria that colonize the rhizosphere Bais et al. (2006). In addition, the characteristic pointed out in

this trial have been observed in other studies, for example Mafia et al. (2009), wherein they obtained that the use of isolates from this type of plant have improve in rooting.

In the second trial, the average gains in the rooting was even greater compared to the first trial, with 88% and 48% for the *E. nitens* x *E. globulus* X-64 and X-65 clones, respectively. In the case of the X-64 clone, the main effect of the rhizobacteria is partly explained due to the level of rooting is lower at the beginning of the rooting season (month of October for trial 2) compared to rooting in the full harvest season of mini-cuttings, presenting variations between 28% and 1%, respectively. Furthermore, the X-64 clone originally possesses a lower natural rooting ability, variability that is frequently mentioned between species and *Eucalyptus* clones (Teixeira et al. 2007). On the other hand, the factors that influence the formation of the new root such as the development of the mother plant, the nutrition of the plant, its metabolites and the environmental conditions, should be considered (Geiss et al. 2009). In particular in Chile, the end of spring and summer is the season in which the highest levels of rooting are obtained, being, nevertheless, lower at the beginning and end of the seasons, due to that the temperature is a relevant factor in the adventitious rooting (Trueman et al. 2013). In the case of this study, it was observed that the largest magnitude in the increase of rooting, occurred in times of lower temperature, and that are more stressful for plants. This behavior is mentioned in previous researches, which indicated that the greatest effect of rhizobacteria on growth tends to be in more stressful conditions for plants (Dimkpa et al. 2009, Ali et al. 2014). Thus the application of these rhizobacteria should be performed at these times and in order to obtain greater effects on rooting.

Additionally in the second trial, six rhizobacteria increased the root length in the X-64 clone mini-cuttings. This can be explained due to: the production of growth regulators by bacteria, this increases both elongation and cell division in the plants (Ahemad and Kibret 2014), the production of enzymes that decrease the effect of pathogens (Djuric et al. 2011), or the production of molecules such as siderophores that can take in iron for the plant (Beneduzi et al. 2012) or phosphate solubilization (Ahemad and Kibret 2014). These results are to the research conducted by Karthikeyan and Sakthivel (2011), wherein the increase of the root length observed in the *E. camaldulensis* cuttings occurred when *Azotobacter chroococum* is applied. In addition, it is important to mention that the ability of the rhizobacteria for increasing the length of the taproots is

considered crucial due to the plant has a greater nutrient uptake, positively influencing its growth rate (Matilla et al. 2011).

In the third trial, a greater increase occurred in the rooting of the two clones used due to the employment of apical mini-cuttings, having that the 12 and 10 rhizobacterial strains have significantly increased their rooting in the X-64 and X-65 clones, respectively, presenting average gains of 300% for the X-64 clone, and 43% for the X-65 clone. In particular, in this trial the rhizobacteria did not affect the root length, similar situation pointed out by Probanza et al. (2002) who obtained increases in *P. taeda* and *P. pinea* seedlings without observable rhizobacterial effects in the root length. As a global result, in the three trials completed the magnitude in the rooting increase was always greater in the X-64 clone compared to the X-65 clone. This can be explained due to the X-64 clone possesses less rooting, which can increase the effect of the rhizobacteria in mini-cuttings that present higher difficulty to root. With this, it is confirmed that the application of the inoculants of rhizobacteria would have greater effect in the minicuttings subjected to some type of stress, that can belong to the plant itself or some environmental stress.

Another point to discuss is related to that ten rhizobacteria had greater consistency and gains in the rooting in both *Eucalyptus* hybrid clones (Table 5), wherein have been identified species of *Bacillus* and *Pseudomonas*, which are known for being PGPR in different plant species (Santoyo et al. 2012, Armada et al. 2016). The rhizobacterial strains 63 and 122 correspond to *B. thuringiensis* species, which possess an effect of growth promoter in plants (Armada et al. 2016), likewise a species of the genus *Rhodococcus* that has been identified, with antecedents of its use as bacterial inoculums, promoting the elongation of the plant roots of *Brassica juncea* (Qaisrani et al. 2014). Moreover, *Mucilaginibacter* sp (strain 56) has been found in the rhizosphere of plants (Kim et al. 2012) and lichens (Mannisto et al. 2010), showing increments in the plant growth and being considered PGPR (Madhaiyan et al. 2010). In Chile, the presence of *Bacillus* and *Pseudomonas* has been described in previous studies of the rhizosphere of eucalyptus (Diaz et al. 2009); however, it is the first time that other genera such as *Rhodococcus* and *Mucilaginibacter* have been described promoting the adventitious rooting of *Eucalyptus* minicuttings for commercial use.

CONCLUSIONS

Considering the effect of some rhizobacteria in the nursery trials, in operational conditions of clonal propagation, it is possible to conclude that ten isolates have increased the adventitious rooting in mini-cuttings of two hybrid clones of *E. nitens* x *E. globulus*. However, even though an increase in the length of the root was observed in some strains, there is not strong evidence in order to conclude that there is a rhizobacteria effect on this variable. For this reason, new trials should be performed in order to determine the mechanisms wherein the rhizobacteria can be used for promoting the rooting in vegetative material, and being considered as growing regulators, enzymes modulators or another use.

Considering the results of this research, ten rhizobacterial isolates have increased the adventitious rooting of minicuttings of two hybrid clones of *E. nitens* x *E. globulus* under operational conditions of clonal propagation. For this reason, these inoculants could be used in the times of underperformance of minicuttings, in order to optimize their results. Field results should be complemented with laboratory tests to determine which mechanisms would be used for the rhizobacteria for promoting the rooting in minicuttings. These findings not only contribute to scientific knowledge, but also represent a relevant contribution for the forestry industry, due to it would improve the production by the use biotechnological tools, converting the forestry industry into a more sustainable industry.

ACKNOWLEDGMENTS

This work and the student were supported by CONICYT (Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica).

REFERENCES

- INFOR 2015 http://wef.infor.cl/sector_forestal/sectorforestal.php#/14
- Pereira, H. 2007. Variability in the chemical composition of plantation eucalypts (*Eucalyptus globulus* Labill.). Wood and Fiber Science 20:82-90.
- Sotelo, M., and J. Monza. 2007. Micropropagation of *Eucalyptus maidenii* elite trees. Agrociencia 11:81-89.
- Coopman, J., J. Jara, L. Bravo, K. Saez, G. Mella and R. Escobar. 2008. Changes in morpho-physiological attributes of *Eucalyptus globulus* plants in response to different drought hardening treatments. Electronic Journal of Biotechnology 11:30-39. doi: 10.2225/vol 11-issue2-fulltext-9.
- Humphreys, J.R., J.M. O'Reilly-Wapstra, J.L. Harbard, N.W. Davies, A.R. Griffin, G.J. Jordan and B.M. Potts. 2008. Discrimination between seedlings of *Eucalyptus globulus*, *E. nitens* and their F₁ hybrid using near-infrared reflectance spectroscopy and foliar oil content. Silvae Genetica 57: 4-5.
- Grattapaglia, D., and M. Kirst. 2008. *Eucalyptus* applied genomics: from gene sequences to breeding tools. New Phytologist 179: 911-929. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02503.x.
- Rezende, G.D., M.D. De Resende, and T.S. De Assis. 2014. *Eucalyptus* breeding for clonal forestry. p. 393-424. In Fenning, T. (ed), Challenges and opportunities for the world's forests in the 21st century. Springer. Netherlands.
- Madhibha, T., R. Murepa, C. Musokonyi, and W. Gapare. 2013. Genetic parameter estimates for interspecific *Eucalyptus* hybrids and implications for hybrid breeding strategy. New Forest 44:63-84. doi: 10.1007/s11056-011-9302-8.
- Pardos, J.A. 2007. Perspectiva fisiológica en la producción y mejora de eucalipto (con énfasis en *Eucalyptus globulus* Labill). Boletín del CIDEU 3: 7-55.
- Teixeira, D.A., A. C. Alfenas, R. C. Mafia, E.M. Ferreira, L. De Siqueira, L.A. Maffia, and A.H. Mounteer. 2007. Rhizobacterial promotion of eucalypt rooting and growth. Brazilian Journal of Microbiology 38:118-123. doi: 10.1590/S1517-83822007000100025.

Díaz, K., C. Valiente, M. Martínez, M. Castillo, and E. Sanfuentes. 2009. Root-promoting rhizobacteria in *Eucalyptus globulus* cuttings. *World Journal Microbiol Biotechnology* 25: 867-873. doi: 10.1007/s11274-009-9961.

Da Costa, C.T., M.R. De Almeida, C.M. Ruedell, J. adesech, F.S. Maraschin, and A.G. Fett-Neto. 2013. When stress and development go hand in hand: main hormonal controls of adventitious rooting in cuttings. *Frontiers in Plant Science* 4:133. doi: 10.3389/fpls.2013.00133.

Dennis, P., A. Miller, and P. Hirsch. 2010. Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities? *FEMS Microbiology Ecology* 72: 313–327. doi: 10.1111/j.1574-6941.2010.00860.

Karlidag, H., A. Esitken, M. Turan, and F. Sahin. 2007. Effects of root inoculation of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient element contents of leaves of apple. *Scientia Horticulturae* 114:16-20. Doi: 10.1016/j.scienta.2007.04.013.

Saharan, B.S., and V. Nehra. 2011. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. *Life Sciences and Medicine Research* 21: 1-30.

Arora, N., K. Tewari, and R. Singh. 2013. Multifaceted plant-associated microbes and their mechanisms diminish the concept of direct and indirect PGPRs .p. 411-449. In Arora, N. (ed), *Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances*. Springer India.

Mafia, R., A. Alfenas, L. Maffia, E. Ferreira, and L. Siqueira. 2007. Effect of rhizobacteria on rooting and growth of *Eucalyptus* clones under different conditions of clonal propagation. *Revista Arvore* 31: 813-821. doi: 10.1590/S0100-67622007000500005.

Karthikeyan, A., and K. Sakthivel. 2011. Efficacy of *Azotobacter chroococcum* in rooting and growth of *Eucalyptus camaldulensis* stem cuttings. *Research Journal Microbiology* 6: 816-624. doi:10.3923/jm.2011.618.624.

Gumiere, T., C. Ribeiro, R. Figueiredo, and E. Nogueira. 2014. Indole-3-acetic acid producing root-associated bacteria on growth of Brazil Pine (*Araucaria angustifolia*) and Slash Pine (*Pinus elliottii*). *Antonie van Leeuwenhoek* 105: 663-669. doi:10.1007/s10482-014-0120-9.

Stewart, G., K. Johnstone, E. Hagelberg, and D. Ellar. 1981. Commitment of bacterial spores to germinate. *Biochemical Journal* 198: 101-106.

Geels, F., and B. Schippers. 1982. Selection of antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp. and their root colonization and persistence following treatment of seed potatoes. *Journal Phytopathology* 108: 293-206.

Kendrick, K., and J. Ensign. 1983. Sporulation of *Streptomyces griseus* in Submerged Culture. *Journal Bacteriology* 155: 357-366.

Reasoner, D., and E. Geldreich. 1985. A New Medium for the Enumeration and Subculture of Bacteria from Potable Water. *Applied and Environmental Microbiology* 49: 1-7.

Jopia-Contreras, P., H. Urrutia, K. Sossa, and A. Nocker. 2011. Effect of PCR amplicon length on suppressing signals from membrane-compromised cells by propidium monoazide treatment. *Journal Microbiological Methods* 87: 89-95. doi: 10.1016/j.mimet.2011.07.016.

Chen, M., P. Chen, J. Pang, C. Lin, C. Hwang, and H. Tsen. 2014. The Correlation of the Presence and Expression Levels of cry genes with the insecticidal activities against *Plutella xylostella* for *Bacillus thuringiensis* Strains. *Toxins* 6: 2453-2470. doi: 10.3390/toxins6082453

Adesemoye, A., H. Tobert, and J. Kloepper. 2009. Plant growth-promoting rhizobacteria allow Reduced Application Rates of Chemical Fertilizers. *Microbial Ecology* 58:921-929. doi: 10.1007/s00248-009-9531-y.

Bhattacharyya, P., and D. Jha. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28: 1327-1350. doi: 10.1007/s11274-011-0979-9.

Akhtar, M.J., H.N. Asghar, K. Shahzad, and M. Arshad. 2009. Role of plant growth promoting rhizobacteria applied in combination with compost and mineral fertilizers to improve growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Pakistan Journal of Botany* 41:381-390.

Puente, M., J. García, P. Pathauer, and A. Peticari. 2010. Inoculation with *Azospirillum brasilense* is a useful tool in *Eucalyptus globulus* management. *American-Eurasian Journal of Agriculture and Environmental* 8: 124-130.

Ferreira, A., M. Quecine, L.P. Teixeira, S. Oda, J. Azevedo, and W. Araujo. 2008. Diversity of endophytic bacteria from *Eucalyptus* species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. *FEMS Microbiology Letters* 287:8-14. doi:10.1111/j.1574-6968.2008.01258.x.

Bais, H., T. Weir, L. Perry, S. Gilroy, and J. Vivanco. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *The Annual Review Plant Biology* 57: 233-266. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159.

Mafia, R.G., A.C. Alfenas, L.A. Maffia, E.M. Ferreira, D.H. Breda, and L. Siqueira. 2009. Microbiolization and interaction between growth promoting rhizobacteria and *Eucalyptus* clones. *Arvore* 33: 789-797.

Geiss, G., L. Gutiérrez, and C. Bellini. 2009. Adventitious root formation: New insights and perspectives. *Annual Plant Reviews* 37: 127-156. doi: 10.1002/9781444310023.ch5.

Trueman, S., T. McMahon, and T. Bristow. 2013. Production of *Eucalyptus cloeziana* cuttings in response to stock plant temperature. *Journal of Tropical Forest Science* 25: 60-69.

Dimkpa, C., T. Weinand, and F. Asch. 2009. Plant–rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant Cell Environmental* 32:1682-1694. doi:10.1111/j.1365-3040.2009.02028.x.

Ali, S., C. Trevor, and B. Glick. 2014. Amelioration of high salinity stress damage by plant growth-promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase. *Plant Physiology and Biochemistry* 80: 160-167. doi:10.1016/j.plaphy.2014.04.003.

Djuric, S., A. Pavic, M. Jarak, S. Pavlovic, M. Starovic, R. Pivic, and D. Josic. 2011. Selection of indigenous fluorescent pseudomonad isolates from maize rhizospheric soil in Vojvodina as possible PGPR. *Romanian Biotechnological Letters* 16: 6580-6590. doi:10.1016/j.plaphy.2014.04.003.

Beneduzi, A., A. Ambrosini, and M. Passaglia. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetic and Molecular Biology* 35:1044-105. doi:10.1590/S1415-47572012000600020.

Matilla, M., P. Pizarro-Tobias, A. Roca, M. Fernández, E. Duque, L. Molina, X. Wu, D. Van der Lie, M. J. Gómez, A. Segura, and J. L. Ramos. 2011. Complete genome of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* BIRD-1. *Journal of Bacteriology* 193: 1290-1290. doi: 10.1128/JB.01281-10.

Probanza, A., J. García, M. Ruiz, B. Ramos, and F. Gutiérrez-Mañero. 2002. *Pinus pinea* L. seedling growth and bacterial rhizosphere structure after inoculation with PGPR *Bacillus* (*B. licheniformis* CECT 5106 and *B. pumilus* CECT 5105). *Applied Soil Ecology* 20: 75-84. doi: 10.1016/S0929-1393(02)00007-0.

Santoyo, G., Ma del C. Orozco-Mosqueda, and M. Govindappa. 2012. Mechanisms of biocontrol and plant growth promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. *Biocontrol Science and Technology* 22: 855-872. doi: 10.1080/09583157.2012.694413.

Armada, E., A. Probanza, A. Roldan, and R. Azcon. 2016. Native plant growth promoting bacteria *Bacillus thuringiensis* and mixed or individual mycorrhizal species improved drought tolerance and oxidative metabolism in *Lavandula denata* plants. *Journal of Plant Physiology* 192:1-12. doi:10.1016/j.jplph.2015.11.007.

Qaisrani, M.M., M. S. Mirza, A. Zaheer, and A. Malik. 2014. Isolation and identification by 16s sequence analysis of *Achromobacter*, *Azospirillum* and *Rhodococcus* strains from the rhizosphere of maize and screening for the beneficial effect on plant growth. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences* 51:91-99.

Kim, B.C., H. Poo, K.H. Lee, N.M. Kim, O. Kwon, and K.S. Shin. 2012. *Mucilaginibacter angelicae* sp. nov., isolated from the rhizosphere of *Angelica polymorpha* Maxim. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62: 55-60. doi: 10.1099/ijs.0.029728-0.

Mannisto, M., M. Tirola, J. McConnell, and M. Haggblom. 2010. *Mucilaginibacter frigoritolerans* sp. nov., *Mucilaginibacter lappiensis* sp. nov. and *Mucilaginibacter*

mallensis sp. nov., isolated from soil and lichen samples. Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 60: 2849-2856. DOI: 10.1099/ijs.0.019364-0.

Madhaiyan, M., S. Poonguzhali, J.S. Lee, M. Senthikumar, K. Chul Lee, and S. Sundaram. 2010. *Mucilaginibacter gossypii* sp. nov. and *Mucilaginibacter gossypicola* sp. nov., plant-growth-promoting bacteria isolated from cotton rhizosphere soils. Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 60: 2451-2457. doi: 10.1099/ijs.0.018713-0



CAPÍTULO 3

Mechanisms of rhizobacteria associated with the promotion of rooting in mini-cuttings of *Eucalyptus nitens* x *Eucalyptus globulus* hybrids

Enviado en Julio 2021 a la revista American Journal of Agriculture and Forestry

Paulina González-Candia^a, Khaterine Sossa^a, Eugenio Sanfuentes^{a*}.

^aUniversidad de Concepción, Facultad de Ciencias Forestales, Concepción, Chile.

*Corresponding author (esanfuen@udec.cl).

Abstract

Currently, the production of *Eucalyptus* hybrid plants in Chile is attained through mini-cuttings, and rooting is the most important stage of this production. One of the biotechnological alternatives that has been evaluated are rhizobacteria, which help improve growth and rooting through direct and indirect mechanisms. Thus, the objective of this research was to evaluate the mechanisms of some rhizobacterial isolates that promote rooting in mini-cuttings of the *Eucalyptus* hybrid. The production of indole-acetic acid (IAA), siderophores, ammonia, hydrogen cyanide (HCN), lytic enzymes and ACC-deaminase, as well as phosphate solubilization was evaluated. The rhizobacterial isolates' ability to inhibit the growth of the pathogen *Botrytis cinerea* was also tested. In addition, a rooting trial of the mini-cuttings of the hybrid clone was carried out in a plant nursery to evaluate the effect of the isolates, both individually and in consortium. For this trial, the percentage of rooting and the roots' biomass was evaluated.

It was determined that all of the isolates produced ammonia and siderophores, followed by the production of the lytic enzyme protease, HCN and the remaining lytic enzymes. On the other hand, the production of IAA, phosphate solubilization and inhibition of *B. cinerea* was observed as a result of 30% of the isolates. On the contrary,

all of the isolates produced ACC-deaminase and five significantly increased the rooting of the mini-cuttings.

The isolates in this study showed more than one mechanism associated with growth stimulation in plants, which could be associated with their capacity to increase the adventitious rooting of *Eucalyptus* hybrid mini-cuttings, and the studied rhizobacterial isolates consequently have the potential to be used as a biofertilizer.

Keywords

Rhizobacteria, Mechanisms, Rooting, *Eucalyptus*



Introduction

Currently, Chile has 860.317 ha of *Eucalyptus* plantations [1] equivalent to 33.1% of the total planted forestry area, principally with the species *E. globulus* and *E. nitens*, with 23% and 10.1% of respective surface area. Throughout the last decade, interest in the use of hybrids of these two species has increased, given that the hybrids have both the growth and pulp qualities of *E. globulus* in addition to *E. nitens* resistance to cold [2].

The plant production of these *Eucalyptus* species and their hybrids is performed principally with mini-cuttings that are collected from mother plants with the desired phenotypes, due to their superior silvicultural characteristics. After being harvested, the mini-cuttings are arranged in different types of substrates, where they form their new root (adventitious root), allowing for their subsequent nutrition and growth [3]. Months afterwards, when the plants have reached a determined height, they are planted in the field. The rooting is the most critical phase during the propagation of the mini-cuttings because of the vulnerability of the mini-cuttings during the physiological formation of a new root, where environmental factors, like high and low temperatures can cause a decrease in rooting [4]. Another relevant factor is the variable rooting facility of diverse species of *Eucalyptus*. *E. saligna*, for example, easily form roots from cuttings, while *E. globulus* is known for its difficulty to root [5], and in hybrids such as *Eucalyptus nitens* x *Eucalyptus globulus* [6] rooting can be extremely difficult.

To increase the rooting of forestry species, biotechnology has become very relevant due to the need to diminish the use of chemical fertilizers that are not only expensive, but can also negatively affect the environment [7]. Among biotechnological alternatives, the effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR), also called biostimulants or biofertilizers [8], has been evaluated in agricultural species, since they contribute to improving plant growth, crop yields, root formation, disease control and stress reduction [9]. It is proposed that rhizobacteria promote plant growth in diverse ways; their effects are classified as direct and indirect [10]. Direct effects are characterized by rhizobacteria that stimulate plant growth through the production of compounds that plants can use for their nutrition, while indirect effects correspond to rhizobacteria that are capable of reducing pathogen attacks [9]. Direct mechanisms include the production of growth stimulating molecules, such as auxins [11] and indoleacetic acid (IAA). IAA can be synthesized by the majority of soil-dwelling bacteria,

using the tryptophan amino acids present in root exudates for root formation, which corresponds to the principal precursors of IAA biosynthesis in bacteria [12]. Plants take advantage of the IAA bacteria that induce changes at the molecular level and lead to growth in size through elongation and cell division; this mechanism is thus responsible for the growth of the plant and its roots [13]. Another mechanism used by the rhizobacteria that positively intervenes in plant growth is its ability to solubilize phosphate [14], facilitating the absorption of this macro-element to produce pH changes in the soil that modify the non-assimilable phosphorus into forms that are available for the plant [15]. The production of siderophores, one of the most documented PGPR mechanisms that promote plant development [16], consists of the rhizobacteria releasing molecules that trap the iron in the environment, increasing its availability for the plant [17]. The production of diverse enzymes, like ACC-deaminase, is another way to support the PGRP, associated with the capacity to degrade the ACC molecule, ethylene precursor, which can diminish plant growth when it exists in excess [18].

Among the indirect mechanisms, is the production of enzymes with pathogen control activity, referred to as lytic enzymes, including cellulases, lipases, glucanases, proteases and pectinases, which have an antifungal effect by acting upon the cell wall of fungi [19], Cyanuric acid (HCN), produced by some rhizobacteria, also positively affects plant growth by inhibiting the development of pathogens due to its antibiotic effect [20].

Although there are numerous studies and antecedents regarding the effect of PGPR in plants of agricultural interest, very few have been carried out on plants of forestry interest, like *Eucalyptus*. Brazilian studies performed by Teixeira et al, [21]; Mafia et al, [22] and Alfenas et al, [23] have shown the effect of rooting and growth promotion in macro-cuttings of *Eucalyptus*. In Chile, however, research that considers the effects of plant growth promoting rhizobacteria and their diverse mechanisms on rooting in plants of forestry interest are few, the work of Díaz et al, [24] evaluated the effect of rhizobacterial isolates on rooting cuttings from only two *Eucalyptus* clones of this species and Angulo et al, [25] studied the effect of rhizobacteria isolates in the growth of *Eucalyptus nitens* plants grown from seed. Therefore, the objective of this research was to evaluate the mechanisms of some of the rhizobacterial isolates that have been associated with the promotion of adventitious rooting in mini-cuttings of *Eucalyptus nitens* x *Eucalyptus globulus* hybrids.

Methodology

Rhizobacterial isolates used and inoculum production.

For this study, 11 bacterial isolates were used, obtained from a previous study (González et al. 2018). The isolates were obtained from rhizosphere of clones of species and hybrids of *Eucalyptus*. All of them effectively increased the adventitious rooting in hybrid clones of *E. nitens* x *E. globulus* (Table 1).

Table 1. Rhizobacterial isolates used in *in vitro* assays.

Isolate	Identification	Clone Origin
92	<i>Rhodococcus</i> sp	<i>E. globulus</i> (X-49)
14	<i>Pseudomonas</i> sp	<i>E. globulus</i> (X-49)
121	<i>Rhodococcus</i> sp	<i>E. nitens</i> x <i>E. globulus</i> (X-64)
63	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>E. nitens</i> x <i>E. globulus</i> (X-65)
18	<i>Bacillus</i> sp	<i>E. globulus</i> (X-52)
49	<i>Bacillus</i> sp	<i>E. nitens</i> x <i>E. globulus</i> (X-64)
116	<i>Rhodococcus</i> sp	<i>E. globulus</i> (X-52)
56	<i>Mucilaginibacter</i> sp	<i>E. nitens</i> x <i>E. globulus</i> (X-65)
59	<i>Chryseobacterium</i> sp	<i>E. nitens</i> x <i>E. globulus</i> (X-64)
119	<i>Bacillus</i> sp	<i>E. globulus</i> (X-49)
122	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>E. globulus</i> (X-52)

The rhizobacteria were stored at -80°C , and all of the *in vitro* assays were cultivated in a solid R2A agar medium at 28°C for 48 h, the bacterial colonies were thus obtained in active growth.

Indole acetic acid (IAA) production.

For this assay, the methodology described by Asghar et al. [26] was used. This consisted of detecting the IAA produced by the bacteria in cultures as a result of their reaction with the Salkowski reagent. The rhizobacterial isolates were individually cultivated in 30 ml of Reasoner & Geldreich (R2A) broth for 48 h at 28°C under 120 rpm of agitation. The bacterial cultures were supplemented with tryptophan (0.5% v/v), with the exception of the control. After 48 h, the cultures were centrifuged at 10,000 rpm for 10 minutes, and 1.5 ml of each supernatant was mixed in glass tubes with the Salkowski reagent (2 ml FeCl_3 0.5 M + 98 ml HClO_4 35%) at a 2:3 ratio and maintained in the dark for 20 min. Afterwards, the tubes were observed and those that presented a pink coloration indicated the presence of IAA. This qualitative colorimetric reaction

was measured by a spectrophotometer at 535 nm and the auxin concentration was calculated with a calibration curve previously established using a 1mM IAA standard with three replicates per measurement.

Siderophore production.

Siderophore production was evaluated utilizing the methodology of Schwyn and Neilands [27]. Cultures of each rhizobacteria isolate grown in solid trypticase soy agar mediums (TSA) were inoculated in plates with a solid chromium azurol agar medium (CAS agar). The CAS agar was prepared by mixing a solution 1 of the CAS-Fe compound, consisting of: 10 ml of FeCl_3 1 mM in a solution of HCl 10 mM, plus 50 ml of CAS solution (1.21 mg/ml) in addition to 40 ml of CTAB (1.82 mg/ml). Solution 2 was prepared with 30 g of Tryptic Soy Broth (TSB) powder, 9.76 g of MES buffer and 15 g of agar; this solution was adjusted to a pH of 6.8 with KOH. Solutions 1 and 2 were sterilized separately and once warm they were mixed to then prepare the Petri dishes with the CAS agar. The plates were inoculated with the rhizobacterial isolates in seven places per plate, with three replicates per isolate. They were then incubated for 72 h at 30°C. Afterwards, the siderophore production was evaluated by the formation of a yellow/orange halo around each bacterial colony; the appearance of this halo represented a positive reaction for siderophore production.

Phosphate solubilization.

To evaluate the phosphate solubilization of the rhizobacteria the Nautiyal [28] methodology was utilized, using the NBRIP culture medium (Institute Phosphate Medium). This medium was composed of: 10 g of glucose, 5 g of $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 5 g of $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.25 g of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g of KCl, 0.1 g of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and 15 g of agar, the medium was adjusted to a pH of 7 and subsequently sterilized in autoclave at 121°C. The rhizobacteria were placed in the culture medium using the same method as the previous trial. They were incubated for 15 days at 30°C, after which the formation of a transparent halo around the bacterial colony was observed, indicating a positive reaction to the phosphate solubilization in the medium. For this experiment three replicates were used for each isolate.

Production of ammonia.

In this assay, the production of ammonia (NH_3) by rhizobacterial isolates was evaluated using Sherman's [29] methodology. Aliquots of fresh culture from each isolate were grown in 10 ml of peptone water 10 g of pancreatic peptone, 3 g of yeast extract and 5 g of NaCl per 1 L. The cultures were maintained for 48 h at 30°C under 120 rpm of agitation, they were then centrifuged at 9000 rpm for 10 min, and the supernatant collected was mixed with 500 ul of Nessler's reagent (Sigma-Aldrich). The presence of a coffee to yellow color indicated a positive reaction for the production of ammonia; for this assay three replicates for each isolate were used.

Production of hydrocyanic acid.

The rhizobacterial isolates' production of hydrocyanic acid (HCN) was evaluated with the methodology of Ahmad et al. [30]. The fresh inoculum of each bacterial isolate was streaked on Tryptic Soy Agar (TSA) plates. After 24 h, a filter paper (Whatman N°1) soaked in Na_2CO_3 2 % prepared in a solution of 5% picric acid was placed on top of the colony growth. Then, the plates were incubated at 30°C for 4 to 6 days. After the incubation time, the production of HCN was evident in the plates developing an orange to red color, indicating the HCN production. Three plates were used for each isolate.

Production of extracellular lytic enzymes: lipases, pectinases, proteases and cellulases.

For these assays, the methodology described by Pereira et al. [31] was used. The rhizobacterial isolates were cultivated for 12 h in 10 ml of TSB at 30°C and centrifuged at 9000 rpm for 10 min in order to use the supernatant as the enzymatic extract. Seven aliquots of 20 ul of the supernatant were then collected from each bacterial culture and placed in the culture medium prepared specifically for each enzyme. The production of protease enzymes was evaluated using nutrient agar (5 g of peptone, 3 g of meat extract, 8 g of NaCl, 1 g of skim milk and 15 g of agar per 1 L) incubating the plates for three days at 30°C. A positive result was evident when the originally cloudy medium around the bacterial colony cleared up. The production of cellulase enzymes was evaluated using a carboxymethylcellulose (CMC) agar medium (0.5 g KH_2PO_4 , 0.25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g of CMC (Disodium Salt)) and 15 g of agar per 1 L. After five days of incubation at 30°C, the surface of the CMC medium was covered for 15 min with a

solution of Congo red (1 % v/v), the excess Congo red solution was poured off, and the surface of the medium was covered with a solution of NaCl (1 M) for 15 min. The formation of a clear halo around the colony was indicative of the production of cellulase enzymes, and thus considered as a positive reaction. Three replicates for each isolate were used in these assays.

The production of pectinase enzymes was evaluated in a solid modified M9 agar medium (10 g of pectin, 2 g of glucose and 1.2 g of yeast extract per 1 L). The rhizobacteria were first cultivated for 12 h in 10 ml of a TSB at 30°C, they were then centrifuged at 9000 rpm for 10 min, and the supernatant was used as an enzymatic extract. Seven aliquots of 20 ul of the supernatant were collected from each bacterial culture and placed in Petri dishes with the M9 medium and then grown for 3 days at 30°C. After this, the plates were wetted with a lugol solution for 10 minutes; afterwards, they were maintained in the dark for 15 minutes. The formation of a clear halo around the colony indicated the production of pectinase. Three replicates per isolate were used for this trial. Finally, the production of lipase enzymes was evaluated in a solid Luria Bertani (LB) modified agar medium (20 g de CaCl₂, 10 g de Tween-20). The plates were incubated for three days at 30°C. A positive reaction for the production of this enzyme was observed as points around the colony with a greasy and disaggregated aspect. Three replicates for each isolate were used.

Production of ACC-deaminase enzyme.

To evaluate the production of the ACC-deaminase enzyme, extracellular enzymatic extracts from the rhizobacterial isolates were used and the quantity of α -ketobutyrate molecules generated from the hydrolysis of ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) was measured. The rhizobacterial isolates were grown in 10 ml of a mineral medium (2.67 g NaHPO₄·2H₂O, 1.40 g KH₂PO₄, 0.20 g MgSO₄·7H₂O, 10 g of glucose and 10 ml of trace elements) and were incubated for 48 to 96 h at 30°C. The cultures were centrifuged to obtain a cellular pellet, which was washed twice with 5 ml of Tris-HCl 0.1 M at a pH of 7.6; this was then resuspended in 500 ul of Tris-HCl 0.1 M at a pH of 8.5. Fifty ul of toluene were then added to agitate the mixture in a vortex for 20 s. Then, 200 ul were placed in microcentrifuge tubes and were supplemented with 20 ul of ACC 0.5 M. The suspension was agitated in a vortex shaker and incubated at 30°C for 30 min. One ml of HCl 0.56 M was then added and the mix was agitated in a vortex

and centrifuged at 10,000 rpm for 10 min, subsequently 250 ul of the supernatant was mixed with 200 ul of HCl 0.5 M and with 75 ul of the reagent 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNHP) (DNHP 2% in HCl 2M). This mixture was incubated at 30°C for 30 min, after which 500 ul of NaOH 2M was added. The absorbance of this final blend was measured in a spectrophotometer at 540 nm, and the activity of the ACC-deaminase enzyme was calculated using a calibration curve with pure α -ketobutyrate (0-0.50 uM). The experiment was repeated twice and the ACC-deaminase measurement was performed in triplicate.

Antagonism *in vitro* against *Botrytis cinerea*.

This assay was done *in vitro* to evaluate the bacterial antagonism of the rhizobacterial isolates, against the fungi pathogen *Botrytis cinerea* using the methodology of Valiente et al. [32]. Two mm disks of fresh *Botrytis cinerea* mycelium were placed in Petri dishes with a solid PDA (potato dextrose agar) medium; they were then maintained at 25°C for 48 h or until the colony reached a diameter of 1 cm. Afterwards, a suspension of 100 ul of fresh culture from each rhizobacteria isolate was distributed in a uniform circle 6 cm from the center of the *B. cinerea* colonies. In the assay, three plates were used for each rhizobacteria isolate and they were maintained at 25°C for 72 h. For the controls, plates with *B. cinerea* colonies 1 cm in diameter were used, but they were inoculated with sterile distilled water. After the time of the trial, the formation of a halo inhibiting the growth of the pathogen colony greater than 0.5 cm was considered as positive for antagonism against *B. cinerea*.

Rooting assay.

To evaluate the effect of the rhizobacterial isolates on the adventitious rooting of *Eucalyptus* mini-cuttings, an assay was performed under operational conditions of *Eucalyptus* plant production in a nursery. For this, three isolates that presented the highest amount of growth promotion mechanisms in the previously performed *in vitro* assays were selected. The assay was executed in March 2015 in the forestry nursery “Carlos Douglas,” which belongs to the company Forestal Mininco S.A. located in Yumbel, Biobío Region, Chile. Hybrid *Eucalyptus nitens* x *Eucalyptus globulus* clone X-64 mini-cuttings that have naturally low levels of adventitious rooting were used [33]. The mini-cuttings were obtained exclusively from the apex of the mother plants, and had a length of 7 cm. The collection of mini-cuttings was performed on the same

day of the assay, using mini-cuttings without any pathogen-attributable symptoms. The bacterial isolates *Bacillus* sp., *Bacillus thuringiensis* and *Pseudomonas* sp. with the codes 49, 63 and 14, respectively were used. Furthermore, mixtures of two isolates (63+14, 49+14 y 49+63) and one mixture of the three isolates (63+14+49) were used.

For the production of inoculum, the bacterial isolates were cultivated in a liquid TSB medium of 25% for 24h at 28°C. They were then agitated at 120 rpm until they reached a concentration of 1×10^8 UFC/ml [25]. Ten ml of each rhizobacteria culture was applied to the rooting substrate (coconut fiber), which was then placed in trays with 150 cavities with individual volumes of 15 ml. The mini-cuttings, before their installation in the substrate, were treated at the base through immersion in the bacterial suspension (1×10^8 UFC/ml) for 1 min, and immediately placed in the rooting substrate previously treated with the corresponding bacterial isolates; water was used as a negative control to simulate the conditions of the nursery. The assay was maintained for 45 days in a greenhouse; the relative humidity was maintained at 80% through fogging for the first 7 days and then sustained at 70% until the end of the assay. After 45 days, the percentage of the rooted mini-cuttings and the roots' biomass (dry weight in mg) were evaluated. A completely randomized design with 30 mini-cuttings per treatment (individual rhizobacterial isolates and mixtures) was used, with three replicates. The statistical analysis was performed using the SAS 9.2 software, evaluating the data using ANOVA with Fisher's LSD test to detect significant differences ($p > 0.05$) among the means.

Results

In vitro assays

In the completed assays, all the bacterial isolates produced ammonia and siderophores in *in vitro* conditions (Table 2). The production of proteases, HCN and lipases were the most frequently detected mechanisms of the rhizobacteria, with 10, 9, and 8, respectively, out of a total of 11 isolates tested. Meanwhile, the production of IAA, phosphate solubilization and inhibition of *B. cinerea* growth were observed in 30% of the isolates. Five rhizobacterial isolates produced IAA (15.6 a 93.4 $\mu\text{g/ml}$), These same rhizobacterial isolates proved to have the majority of the mechanisms evaluated, only excluding the solubilization of P (except for isolate 18 corresponding to *Bacillus* sp) and the production of pectinases (Table 2). All of the bacterial isolates produced the enzyme ACC-deaminase, and of these, six isolates reached a significantly

higher production than the rest of the isolates, varying between 1 and 2.5 nmoles α -ketobutyrate $\text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$ (Figure 1).

Table 2. Detection of mechanisms of the rhizobacterial isolates evaluated in the *in vitro* trials.

koIsolated	IAA ($\mu\text{g/ml}$)	HCN	Siderophore	NH_3	Solubilization of P	Inhibition <i>B. cinerea</i>	Lipases	Proteases	Pectinases
<i>Rhodococcus</i> sp	-	++	+	+	+	no	-	-	-
<i>Bacillus</i> sp	17,2 ^d	++	++	+	+	yes	++	+	++
<i>Bacillus</i> sp	93,4 ^a	++	+	+	-	no	++	++	-
<i>Pseudomonas</i> sp	22,2 ^b	++	++	+	-	yes	++	++	-
<i>B. thuringiensis</i>	18,1 ^c	++	++	+	-	yes	-	++	-
<i>Rhodococcus</i> sp	-	-	+	+	-	no	+	++	+
<i>Mucilaginibacter</i> sp	-	-	+	+	-	no	-	+	+
<i>Chryseobacterium</i> sp	15,6 ^e	++	+	+	-	no	-	++	-
<i>B. thuringiensis</i>	-	++	+	+	-	no	++	++	+
<i>Rhodococcus</i> sp	-	-	+	+	+	no	++	-	+
<i>Bacillus</i> sp	-	++	+	+	-	no	+	++	+

- no production, + production, ++ greater production. Different letters indicate significant differences according to the LSD test.

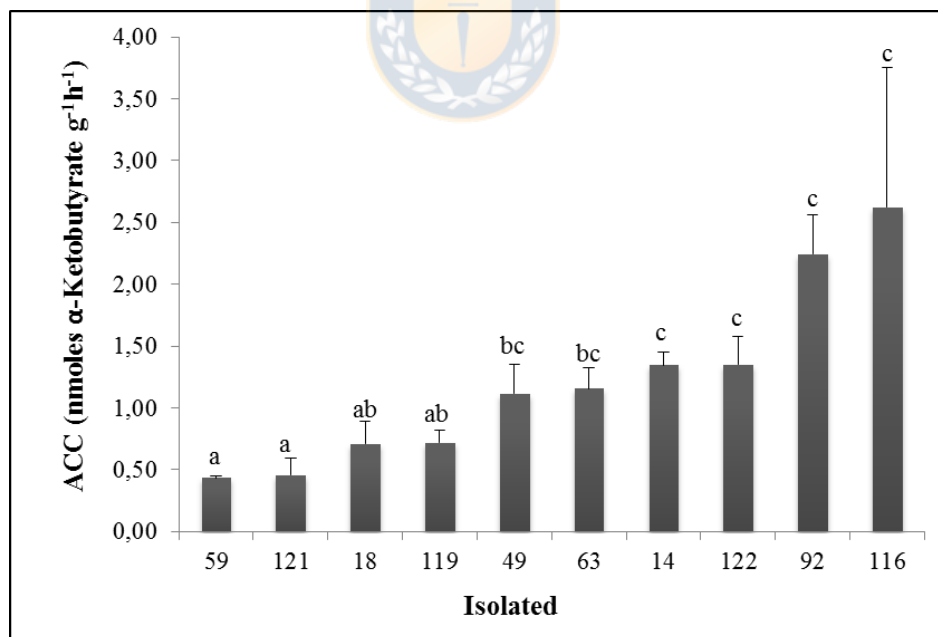


Figure 1. Activity of the enzyme ACC-deaminase (expressed as α -ketobutyrate) in the rhizobacterial isolates. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) according to the LSD test.

Rooting trial

Of the seven isolate combinations evaluated, five significantly increased the rooting of the mini-cuttings of the hybrid clone *Eucalyptus nitens* x *E. globulus* X-64, with respect to the control (Figure 2). The isolates of *Bacillus* sp. (49), *Bacillus thuringiensis* (63) and *Pseudomonas* sp. (14), applied individually, increased rooting with gains of 42, 53 and 61%, respectively. The mixtures of the two isolates (*Bacillus* sp. 49 + *Pseudomonas* sp. 14 and *Bacillus* sp. 49 + *B. thuringiensis* 63), showed gains in rooting of approximately 80%, even though they did not differ from the effect of the bacterial isolates applied individually. The mixture of the three isolates did not significantly increase the adventitious rooting of the *Eucalyptus* mini-cuttings. No effect was observed when the rhizobacterial isolates were tested on the biomass of the hybrid clone root (Figure 3).

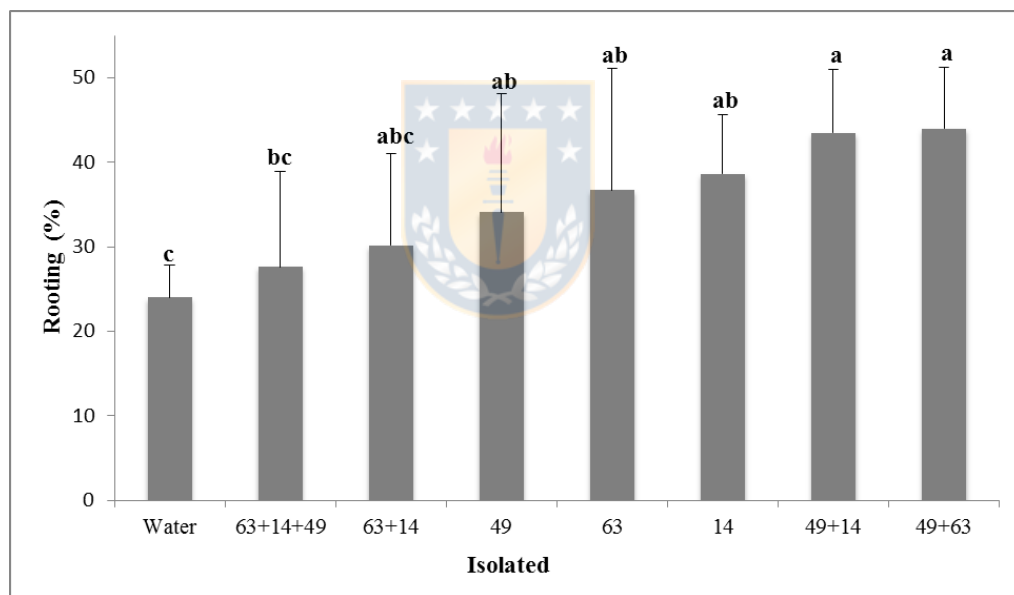


Figure 2. Rooting of *Eucalyptus nitens* x *Eucalyptus globulus* X-64 hybrid clone mini-cuttings. Different letters indicate significant differences compared to the control ($p < 0.05$), according to the LDS test of means comparison.

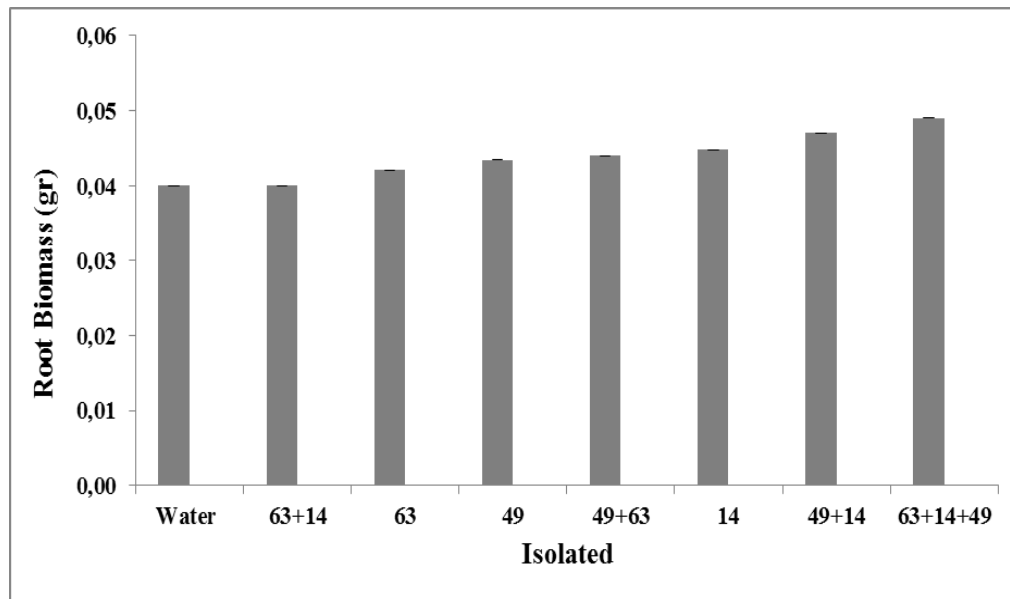


Figure 3. Root biomass of *Eucalyptus nitens* x *Eucalyptus globulus* X-64 hybrid clone mini-cuttings.

Discussion

In this study, in the rhizobacterial isolates evaluated the presence of various mechanisms were found that have been fundamentally associated the promotion of growth and rooting of various plant species [30]. One of these was the production of IAA, generated by rhizobacteria from the amino acid tryptophan by one of the previously reported synthesis routes [12-34]. In the culture mediums with tryptophan added, of the 11 isolates evaluated 5 produced IAA, fluctuating between 15 and 94 ug/ml. These values are similar to those determined in previous research, with the isolates *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. and *Streptomyces* sp. producing between 14 and 106 ug/ml [11-16]. Among the bacteria tested in this study, isolate 49 (corresponding to *Bacillus* sp) not only increased rooting in clone X-64, in both individual and mixed forms; it also reached the highest production of IAA compared to the other rhizobacteria. The production of this hormone is particularly relevant since it is principally responsible for the formation of adventitious roots in plants [35], as well as being an important feature found in *Bacillus* and *Pseudomonas*, the principal bacteria within PGPR which, in turn, represent the majority of the isolates evaluated in this research.

Of the eleven bacterial isolates, nine isolates (75%) produced HCN, an antibiotic also produced by species of *Pseudomonas* sp. and *Bacillus* sp. as described in previous

studies [30-36], and coinciding with species identified in our work. Its production has also been observed in *Chromobacterium*, *Rhizobium* [20], *Rhodococcus* and *Microbacterium* [31]. The mechanism of antibiosis could contribute to the rooting of plants by reducing the presence of pathogens in the natural substrate used in nurseries. In addition, Neidig et al. [37] determined that the bacteria HCN are toxic to certain plant parasitic nematodes, therefore indirectly promoting plant growth.

The production of siderophores, considered as a direct and indirect promotor of plant growth [38], was observed in all of the rhizobacteria isolates evaluated in this study. Siderophores are molecules that can trap iron and are produced by certain bacteria when there is a deficiency of this mineral in the soil. The bacteria can incorporate it for their own requirements, or they can release it in a form available for plants [39]. Previous research has already recognized the production of these molecules by rhizobacteria; in fact, Sadeghi et al. [16] verified the production of siderophores by isolates of *Streptomyces* under conditions of salinity, where the growth of wheat plants was improved when these bacteria were applied to the soil. Rani et al. [40] verified the production of iron chelators in nine rhizobacterial isolates associated with plant growth of the gandul legume (*Cajanus cajan*), and Sgroy et al. [41] described the production of siderophore type phenolates in the endophyte *Pseudomonas putida* Ps30, isolated from plants of *Prosopis strombulifera*. In this study, isolates 14 (*Pseudomonas* sp.), 49 (*Bacillus* sp.) and 63 (*Bacillus thuringiensis*) reached the highest siderophore production, coinciding with their capacity to increase rooting in the mini-cuttings of the hybrid clone X-64, suggesting that this mechanism would be associated with the stimulation of root formation, a relationship that has been observed previously [42].

Ammonia was produced by all of the rhizobacterial isolates tested in this study. Pereira et al. [31] showed a positive correlation between the production of rhizobacterial ammonia and the stimulation of both shoots and roots in plants of *Zea mays*. Therefore, this mechanism could have stimulated the formation of adventitious roots of *Eucalyptus* mini-cuttings; however, ammonia has mainly been associated with plant growth rather than rooting. As described by Joseph et al. [43], the production of ammonia by the majority of rhizobacterial isolates belong to the genus *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azotobacter* and *Rhizobium*, obtained from chickpea plants, which proved to increase the growth of this species.

Only three bacterial isolates *Rhodococcus* sp. (116), *Bacillus* sp. (18) and *Rhodococcus* sp. (121) solubilized phosphate. These isolates were not evaluated in the rooting trials of this study; however, in previous greenhouse trials they had a positive effect on the rooting of *Eucalyptus* mini-cuttings. The solubilization of phosphate is also considered a PGRP characteristic, since this macronutrient is fundamental for plant growth [9]. Angulo et al. [25] described the solubilization of phosphate in 6 of 15 rhizobacterial isolates obtained from the rhizosphere of *E. nitens*, where they stimulated plant growth in this species.

Referring to the antagonistic capacity of the bacterial isolates against the pathogen *B. cinerea*, the isolates *Bacillus* sp. (18), *Pseudomonas* sp. (14) and *Bacillus thuringiensis* (63) inhibited the mycelial growth of this pathogen, and of these, the isolates *Pseudomonas* sp. (14) and *Bacillus thuringiensis* (63) also increased the rooting of the hybrid clone studied here. The biocontrol mechanism of bacteria has been widely studied, since its use is the base of biopesticide production [44]. The effect of bacteria against *B. cinerea* has specifically been observed in apples, inhibiting the germination of spores and reducing the disease [45]. Martínez-Absalón et al. [46] described a mycelial growth inhibition of up to 70% by the isolate *B. thuringiensis* UM96 in plants of *Medicago truncatula*. Salla et al. [47] also observed an increase in the defense response in plants of *Eucalyptus grandis* when treated with the bacteria *Streptomyces* sp. PM9.

Of the 11 isolates evaluated for the production of extracellular enzymes, 10 produced proteases, 8 lipases and 6 pectinases, while the production of cellulases was not detected. The production of these types of enzymes is considered an indirect strategy to promote plant growth, since they affect diverse fungal pathogens. Research accounting for this mechanism is varied. Djuric et al. [19] described the production of lipases and proteases by rhizobacterial isolates of fluorescent *Pseudomonas*, and Pereira et al. [31] determined the production of pectinases, proteases, and lipases by several rhizobacterial isolates. Rhizobacterial isolates that produce extracellular enzymes could affect adventitious rooting by inhibiting the proliferation of pathogens that could decrease growth through the stress they cause in plants. The production of these types of enzymes is considered an indirect strategy to promote plant growth, since they affect diverse fungal pathogens

The production of the ACC-deaminase enzyme was found in 100% of the rhizobacterial isolates tested in this study. Previous research has documented the production of this enzyme in the species analyzed [18-48-49]. The production rate of this enzyme also fell within the range found in previous studies.

When plants are placed under stress for a prolonged period of time they respond by forming ethylene, which in high quantities triggers reactions such as senescence, foliar abscission and the decrease of root growth. The ACC-deaminase enzyme breaks down the ACC precursor of ethylene [38]. The advantage of rhizobacteria able to produce this enzyme lies in the bacteria's capacity to use ACC as a source of nitrogen [50]. The bacterial production of this enzyme has been studied in different types of plants of agricultural interest, like tomatoes, rice, gandul and corn [51-18-40-31]. Nevertheless, little research regarding this enzyme has been carried out on plants of forestry interest. Angulo et al. [25], in one of the only studies of this type, verified the production of ACC-deaminase in an isolate of *Bacillus amyloliquefaciens*, obtained from the rhizosphere of *E. nitens*.

In the rooting assay carried out in the nursery, of the seven rhizobacteria treatments, five increased the adventitious rooting in the mini-cuttings of the hybrid *Eucalyptus nitens* x *Eucalyptus globulus* clone X-64. The highest values of rooting were registered with the mixtures 49 (*Bacillus* sp.) +14 (*Pseudomonas* sp.) and 49 (*Bacillus* sp.) + 63 (*B. thuringiensis*), which also showed the greatest IAA production, HCN production, siderophores, ammonia and proteases, indicating that these mechanisms could be related to the promotion of rooting in mini-cuttings. Species of *Pseudomonas* and *Bacillus*, which present these same mechanisms, have previously been described as stimulators of root growth in *Eucalyptus* plants and their hybrids [52-22-53]. In this research, the mixture of the three isolates 49+63+14 did not significantly differ from the control, suggesting a possible antagonism among the bacterial isolates or competition among them. This could result in a lower yield of IAA, HCN, siderophores, ammonia and proteases; therefore, inducing less of an effect on the rooting of the mini-cuttings. The antagonism among bacteria has been previously documented in *Pseudomonas* and *Microbacterium*, which presented a slight decrease in growth when exposed to the bacterial mixture [54-55]. Nonetheless, the synergistic effect of the use of the bacterial mixtures have been described in previous studies, with increases in the growth of the plants used [56]. Baris et al. [57] applied a mixture of *Bacillus megaterium*, *Bacillus*

subtilis and *Azospirillum brasilense* on seeds of wheat and barley, increasing the yield of the crops more so than when the rhizobacterial isolates were used individually.

The rhizobacterial isolates evaluated in this study possess more than one mechanism associated with the stimulation of plant growth, and could be associated with the capacity to increase the adventitious rooting of mini-cuttings of the hybrid *Eucalyptus nitens* x *Eucalyptus globulus*. These bacteria could potentially be used in future studies to create a biofertilizer formula that could be feasibly incorporated into the vegetative production of the *Eucalyptus* hybrids used in Chile.

Acknowledgements

We would like to thank CONICYT for financing the student internship to carry out this study. We also thank Professor Paula Castro from the Laboratory of Environmental Microbiology at the Catholic University of Porto in Portugal for her help in in vitro tests. Finally, we would like to especially thank Sofia Pereira for being a guide in each essay.



REFERENCES

- [1] INFOR 2019 http://wef.infor.cl/sector_forestal/sectorforestal.php#/14 page 8
- [2] Madhibha T, Murepa R, Musokonyi C, Gapare W (2013) Genetic parameter estimates for interspecific eucalyptus hybrids and implications for hybrid breeding strategy. *New Forest* 44:63-84. doi: 10.1007/s11056-011-9302-8.
- [3] Brondani GE, Benedini F, De Wit Ondas H, Stape J, Gonçalves A, De Almeida M (2012) Low temperature, IBA concentrations and optimal time for adventitious rooting of *Eucalyptus benthamii* mini-cuttings. *Journal of Forestry Research* 23:583-592. doi 10.1007/s11676-012-0298-5.
- [4] Trueman SJ, McMahon V, Bristow M, (2013) Production of *Eucalyptus cloeziana* cuttings in response to stock plant temperature. *Journal of Tropical Forest Science* 25: 60-69. doi 10.1007/s11056-012-9315-y

- [5] Da Costa CT, De Almeida M, Ruedell C, Schwambach J, Maraschin F, Fett-Neto A (2013) When stress and development go hand in hand: main hormonal controls of adventitious rooting in cuttings. *Frontiers in Plant Science* 4:133.doi: 10.3389/fpls.2013.00133.
- [6] Schwambach J, Ruedell C, De Almeida M, Penchel R, De Araujo E, Fett-Neto A (2008) Adventitious rooting of *Eucalyptus globulus* x *maidennii* mini-cuttings derived from mini-stumps grown in sand bed and intermittent flooding trays: a comparative study. *New Forest* 36:261-271. doi 10.1007/s11056-008-9099-2.
- [7] Adesemoye AO, Tobert H, Kloepper J (2009) Plant growth-promoting rhizobacteria allow Reduced Application Rates of Chemical Fertilizers. *Microbial Ecology* 58:921-929. doi: 10.1007/s00248-009-9531-y.
- [8] Saharan BS, Nehra V (2011) Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. *Life Sciences and Medicine Research* 21: 1-30.
- [9] Ahemad M, Kibret M (2014) Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University-Science* 26:1-20.doi: 10.1016/j.jksus.2013.05.001.
- [10] Battacharyya PN, Jha D (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal Microbiological Biotechnology* 28:1327-1350.doi: 10.1007/s11274-011-0970-9.
- [11] Ali B, Sabri A, Ljung K, Hasnai S (2009) Auxin production by plant associated bacteria: impact on endogenous IAA content and growth of *Triticum aestivum* L. *Letters in Applied Microbiology* 48:542-547. doi:10.1111/j.1472-765X.2009.02565.x.
- [12] Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R (2007) Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews* 31: 425-448.doi:10.1111/j.1574-6976.2007.0071.x.
- [13] Taiz L, Zeiger E (2002) *Plant Physiology* 3rd ed Sunderland: Sinauer Associates
- [14] Pereira SIA, Barbosa L, Castro P (2015) Rhizobacteria isolated from a metal-polluted area enhance plant growth in zinc and cadmium-contaminated soil.

International Journal of Environmental Science and Technology 12:2127-2142. doi: 10.1007/s13762-014-0614-z.

[15] Xia Y, Xu Q, Lin Y, Chen Z, Kong F, Zhang C (2014) Research Progress of Mechanism of Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *Agricultural Science & Technology* 15:87-90

[16] Sadeghi A, Karimi E, Dahaji P, Javid M, Dalvand Y, Askari H (2012) Plant growth promoting activity of an auxin and siderophores producing isolate of *Streptomyces* under saline soil conditions. *World Journal Microbiololy Biotechnology* 28:1503-1509. doi: 10.1007/s11274-011-0952-7

[17] Compant S, Duffy B, Nowak J, Clement C, Ait Barka E (2005) Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Applied and environmental microbiology* 71:4951-4059. doi:10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005

[18] Bal H B, Nayak L, Das S, Adhya T (2012) Isolation of ACC deaminase producing PGPR from rice rhizosphere and evaluating their plant growth promoting activity under salt stress. *Plant Soil* 366:93-105. doi: 10.1007/s11104-012-1402-5

[19] Djuric S, Pavic A, Jarak M, Pavlovic S, Starovic M, Pivic R, Josic D (2011) Selection of indigenous fluorescent pseudomonad isolates from maize rhizospheric soil in Vojvodina as possible PGPR. *Romanian Biotechnological Letters* 16: 6580-6590. doi:10.1016/j.plaphy.2014.04.003.

[20] Blom D, Fabbri C, Eberl L, Weisskopf L (2011) Volatile-Mediated Killing of *Arabidopsis thaliana* by Bacteria Is Mainly Due to Hydrogen Cyanide. *Applied and Environmental Microbiology* 77:1000-1008. doi: 10.1128/AEM.01968-10

[21] Teixeira, DA, Alfenas A, Mafia R, Ferreira E, De Siqueira L, Maffia L, Munteer A (2007). Rhizobacterial promotion of eucalypt rooting and growth. *Brazilian Journal of Microbiology* 38:118-123. doi: 10.1590/S1517-83822007000100025.

[22] Mafia RG, Alfenas A, Maffia L, Ferreira E, Breda D, Siqueira L (2009) Microbiolization and interaction between growth promoting rhizobacteria and *Eucalyptus* clones. *Arvore* 33: 789-797.

- [23] Mafia RG, Alfenas A, Maffia L, Ferreira E, Siqueira L (2007). Effect of rhizobacteria on rooting and growth of *Eucalyptus* clones under different conditions of clonal propagation. *Revista Arvore* 31: 813-821. doi: 10.1590/S0100-67622007000500005.
- [24] Díaz K, Valiente C, Martínez M, Castillo M, Sanfuentes E (2009). Root-promoting rhizobacteria in *Eucalyptus globulus* cuttings. *World Journal Microbiology Biotechnology* 25: 867-873. doi: 10.1007/s11274-009-9961.
- [25] Angulo VC, Sanfuentes E, Rodríguez F, Sossa K (2014). Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*. *Revista Argentina de Microbiología* 46:338-347.
- [26] Asghar HN, Zahir Z, Arshad M, Khaliq A (2002) Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. *Biology Fertility of Soils* 35:231–237 DOI 10.1007/s00374-002-0462-8
- [27] Schwyn B, Neilands J (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry* 160:47–56. doi: 10.1016/0003-2697(87)90612-9
- [28] Nautiyal C, Shekhar C (1999) An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 170:265-270. Doi: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x
- [29] Cappuccino JC, Sherman N (1992) *Microbiology: A Laboratory Manual* (third ed), Benjamin/cummings Pub. Co., New York (1992), pp. 125-179
- [30] Ahmad F, Ahmad I, Khan M (2008) Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research* 163:173-181
- [31] Pereira SIA, Barboza L, Castro P (2015) Rhizobacteria isolated from a metal-polluted area enhance plant growth in zinc and cadmium-contaminated soil. *International Journal of Environmental Science and Technology* 12:2127-2142. Doi: 10.1007/s13762-014-0614-z

- [32] Valiente C, Díaz K, Gacitúa S, Martínez M (2008) Control of charcoal root rot in *Pinus radiata* nurseries with antagonistic bacteria. *World Journal Microbiology Biotechnology* 24:557-568. Doi: 10.1007/s11274-007-9510-8
- [33] Brondani GE, Benedini F, De Wit Ondas H, Stape J, Gonçalves A, De Almeida M (2012) Low temperature, IBA concentrations and optimal time for adventitious rooting of *Eucalyptus benthamii* mini-cuttings. *Journal of Forestry Research* 23:583-592. DOI 10.1007/s11676-012-0298-5
- [34] Mohite B (2013) Isolation and characterization of indol acetic (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effects on plant growth. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 13:638-649
- [35] De Klerk GJ, Van Der Krieken W, De Jong J (1999) The Formation In Vitro Cell. *Dev. Biol.--Plant* 35:189-199 of adventitious roots: new concepts, new possibilities. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 35:189-199
- [36] Kumar A, Kumar A, Devi S, Patil S, Payal C, Negi S (2012) Isolation, screening and characterization of bacteria from Rhizospheric soils for different plant growth promotion (PGP) activities: an in vitro study. *Recent Research in Science and Technology* 4:1-5
- [37] Neidig N, Rüdiger J, Scheu S, Jousset A (2011) Secondary Metabolites of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 Drive Complex Non-Trophic Interactions with Bacterivorous Nematodes. *Microbiology Ecology* 61:853-859. DOI 10.1007/s00248-011-9821-z
- [38] Arora N, Tewari K, Singh R (2013) Multifaceted plant-associated microbes and their mechanisms diminish the concept of direct and indirect PGPRs. Springer, India.
- [39] Colombo C, Palumbo G, He J, Pinton R, Cesco S (2014) Review on iron availability in soil: interaction of Fe minerals, plants, and microbes. *Journal Soils Sediments* 14:538-548. DOI 10.1007/s11368-013-0814-z
- [40] Rani MU, Arundhathi, Reddy G (2012) Screening of rhizobacteria containing plant growth promoting (PGPR) traits in rhizosphere soils and their role in enhancing growth of pigeon pea. *African Journal of Biotechnology* 11:80805-8091. Doi 10.5897/AJB10.2186

- [41] Sgroy V, Cassan F, Masciarelli O, Del Papa M, Lagares A, Luna V (2009) Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. *Applied Microbiology Biotechnology* 85:371-381. DOI 10.1007/s00253-009-2116-3
- [42] Sivanesan I, Hwang S, Jeong B (2008) Influence of plant growth regulators on axillary shoot multiplication and iron source on growth of *Scrophularia takesimensis* Nakai - a rare endemic medicinal plant. *African Journal of Biotechnology* 7:4484-4490.
- [43] Joseph B, Rajan Patra R, Lawrence R (2007) Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). *International Journal of Plant Production* 2:141-152
- [44] Droby S, Wisniewski M, Teixidó N, Spadaro D, Haissam Jijakli E (2015) The science, development, and commercialization of postharvest biocontrol products. *Postharvest Biology and Technology*. Doi:10.1016/j.postharvbio.2016.04.006
- [45] Calvo J, Calvente V, De Orellano M, Benuzzi D, Sanz M (2007) Biological control of postharvest spoilage caused by *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* in apple by using the bacterium *Rahnella aquatilis*. *International Journal of Food Microbiology* 113: 251-257. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.003
- [46] Martínez-Absalón S, Rojas D, Hernandez L, Prieto C, Orozco M, Peña J, Sakuda S, Valencia E, Santoyo G (2014) Potential use and mode of action of the new strain *Bacillus thuringiensis* UM96 for the biological control of the grey mould phytopathogen *Botrytis cinerea*. *Biocontrol Science and Technology* 24: 1349-1362. Doi: 10.1080/09583157.2014.940846
- [47] Salla TD, Astarira L, Santarem E (2015) Defense responses in plants of *Eucalyptus* elicited by *Streptomyces* and challenged with *Botrytis cinerea*. *Planta*. Doi: 10.1007/s00425-015-2460-8
- [48] Nascimento FX, Rossi M, Soares C, McConkey B, Glick B (2014) New Insights into 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate (ACC) Deaminase Phylogeny, Evolution and Ecological Significance 9 Doi: 10.1371/journal.pone.0099168

- [49] Raweekul W, Wuttitummaporn S, Sodchuen W, Kittiwongwattana C (2016) Plant Growth Promotion by Endophytic Bacteria Isolated from Rice (*Oryza sativa*). *Thammasat International Journal of Science and Technology* 21. Doi: 10.14456/tijsat.2016.2
- [50] Glick BR (2005) Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiology Letters* 251:1-7. Doi: 10.1016/j.femsle.2005.07.030
- [51] Esquivel-Cote R, Gavilanes M, Cruz R, Huante P (2013) Importancia Agrobiotecnológica de la Enzima ACC Aesaminasa en Rizobacterias. *Revista Fitotecnica Mexico* 36:251-258
- [52] Mafia R, Alfenas A, Maffia L, Ferreira E, Siqueira L (2007) Effect of rhizobacteria on rooting and growth of *Eucalyptus* clones under different conditions of clonal propagation. *Revista Arvore* 31: 813-821. doi: 10.1590/S0100-67622007000500005.
- [53] Paz IC, Santin R, Guimaraes A, Rosa O, Dias A, Quecine M, Azevedo J, Matsumara T (2012) *Eucalyptus* growth promotion by endophytic *Bacillus* spp. *Genetics and Molecular Research* 11: 3711-3720. Doi: 10.4238/2012.August.17.9
- [54] Malboobi MA, Behbahani M, Madani H, Owlia P, Deljou A, Yakhchali B, Moradi M, Hassanabadi H (2009) Performance evaluation of potent phosphate solubilizing bacteria in potato rhizosphere. *World Journal Microbiology Biotechnology* 25:1479-1484. Doi: 10.1007/s11274-009-0038-y
- [55] Ordookhani K, Sharafzadeh S, Zare M (2011) Influence of PGPR on growth, essential oil and nutrients uptake of sweet basil. *Advances Environmental Biology* 5:672-677. Doi:
- [56] Lenin G, Jayanthi M (2012) Efficiency of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on enhancement of growth, yield and nutrient content of *Catharanthus roseus*. *International Journal of Research in Pure and Applied Microbiology* 2:37-42.
- [57] Baris O, Sahin F, Turan M, Orhan F, Gilluce M (2014) Use of Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) Seed Inoculation as Alternative Fertilizer Inputs in Wheat and Barley Production. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 45:2457-2467. Doi:10.1080/00103624.2014.912296

CAPÍTULO 4

Evaluación de bacterias endófitas en el crecimiento de plantas de especies de *Eucalyptus* e híbridos.

Paulina González-Candia, Katherine Sossa, Eugenio Sanfuentes.

Artículo en preparación

RESUMEN

Eucalyptus globulus, *E. nitens* y principalmente su híbrido *E. nitens* x *E. globulus* presentan problemas en la fase de producción clonal debido a la baja capacidad de las miniestacas para enraizar. Dentro de este contexto el uso de bacterias endófitas que poseen la capacidad de promover el crecimiento en plantas, ha mostrado ser una alternativa eficaz y un complemento a la aplicación de compuestos químicos. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de bacterias endófitas en el crecimiento y enraizamiento de plantas de *E. nitens* e híbridos de *E. nitens* x *E. globulus*, y sus posibles mecanismos de acción. Se llevaron a cabo dos ensayos operacionales en condiciones de vivero con 43 aislados, constatándose que 13 aumentaron la longitud de la raíz en *E. nitens*, otros 13 aumentaron la altura de las plantas en el híbrido y 7 aumentaron el enraizamiento. Se observó que en general los aislados con efectos sobre el crecimiento fueron obtenidos desde el órgano de la planta sobre el cual tuvieron efecto, sugiriendo especificidad entre bacterias y órgano de aislamiento y la mayoría de las bacterias presentaron dos mecanismos promotores de crecimiento. Los resultados obtenidos en esta investigación constituyen información relevante en cuanto al uso de bacterias endófitas para favorecer el crecimiento y enraizamiento de *Eucalyptus*, complementándolo al conocimiento existente de las bacterias de rizósfera, además de ser el primer reporte en Chile de bacterias endófitas favoreciendo crecimiento y enraizamiento en especies forestales.

Palabras clave: Bacterias, endófitas, forestal, Chile.

4.1 INTRODUCCIÓN

Chile cultiva principalmente tres especies forestales introducidas; *Pinus radiata* D. Don originaria de California Estados Unidos (Dick *et al.* 2014) y las especies de *Eucalyptus*, *Eucalyptus globulus* H. Labill y *Eucalyptus nitens* Dean et Maiden originarias del sureste de Australia (Costa *et al.* 2017). Sus principales usos son para celulosa de exportación, industria del aserrío, astillas, tableros y chapas en ambas especies (INFOR 2018). Debido a su importancia, las empresas forestales enfocan sus esfuerzos en mejorar los procesos de producción.

Eucalyptus globulus es la segunda especie más cultivada en nuestro país, basando la producción de plantas en la propagación clonal que ofrece múltiples ventajas por sobre el sistema de reproducción sexual por semillas, especialmente cuando el material propagativo es obtenido desde plantas madres de genotipos superiores (Díaz *et al.* 2012). Las principales ventajas respecto a otros sistemas de propagación son su menor costo, la mantención de la juvenilidad, la disminución de la variabilidad genética de las plantas (clones), la oportunidad de producción masificada y la facilidad para el manejo y condiciones ambientales con el objetivo de obtener su óptimo crecimiento (Assis *et al.* 2004).

La producción clonal de *Eucalyptus* spp comienza con la colecta de las estaquillas desde las plantas madres, presentándose un punto crítico en el proceso; la pérdida del enraizamiento adventicio (González *et al.* 2018). Esta fase es clave en la producción clonal, ya que de la formación de la nueva raíz dependerá que se produzca una nueva planta, así como un adecuado sistema de raíces asegurará el crecimiento óptimo para posteriormente ser plantada en terreno. Para aumentar el enraizamiento, se utilizan varios métodos; el uso de fitohormonas artificiales reguladoras del crecimiento vegetal, como el ácido indol butírico (IBA), el que se asemeja al ácido indol acético (AIA) presente naturalmente en las plantas (Pacurar *et al.* 2014). También se maneja el tipo de esqueje que se utiliza (estaca o miniestaca), siendo actualmente utilizadas las miniestacas ya que presentan mayor juvenilidad, a diferencia de las estacas que poseen una mayor lignificación y son más recalcitrantes en enraizar. La nutrición mineral de las plantas también es optimizada para mejorar el enraizamiento (Shu *et al.* 2019), las condiciones ambientales como humedad y temperatura (Pardos 2007), la prevención del ataque de patógenos (Zaldúa *et al.* 2010), el tipo de substrato de enraizamiento y el

periodo de cosecha de los esquejes (Higashi *et al.* 2000). Sin embargo, aun empleando todas estas técnicas, en clones de alto valor de *E. nitens*, *E. globulus* y sus híbridos (*E. nitens* x *E. globulus*) en la propagación no se alcanza el 40% de enraizamiento (C. Villagra jefe de producción invernaderos y canaletones Forestal Mininco S. A. vivero Carlos Douglas, comunicación personal marzo 2015). La disminución en el enraizamiento determinará una merma en la cantidad de plantas, aumenta la vulnerabilidad a enfermedades como el moho gris (*Botrytis cinerea*), significando un aumento en las pérdidas de plantas en viveros (Zaldúa *et al.* 2010). Además, durante el proceso de viverización es fundamental que las plantas formen raíces en cantidad y calidad, ya que se espera que las plantas alcancen los mayores crecimientos posibles en biomasa y altura, para que puedan soportar el estrés asociado al establecimiento en terreno, y de esta forma asegurar el éxito en la plantación (O'Reilly 2002, Angulo *et al.* 2014).

Dentro de este contexto, el uso de rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas (PGPR) y más específicamente de rizobacterias promotoras del enraizamiento en las plántulas, ha mostrado ser una alternativa eficaz y un complemento a la aplicación de compuestos químicos, debido principalmente, a su naturaleza inocua (Adesemoye *et al.* 2009).

Las PGPR se consideran dentro de las tecnologías verdes, ya sea como biofertilizantes (Vessey 2003) o bioestimulantes (Du Jardin 2015), al ser microorganismos que presentan la capacidad de estimular el crecimiento de plantas. Las rizobacterias pueden habitar la superficie de la raíz (rizoplano) y la zona adyacente a la raíz (rizósfera) (Walker *et al.* 2003). También han sido consideradas dentro de este grupo, las denominadas bacterias endófitas, que viven dentro de la planta (Santoyo *et al.* 2016) y que igualmente ejercen un efecto positivo al estimular su crecimiento. Las bacterias endófitas colonizan los espacios intercelulares y/o intracelulares de los tejidos sanos de su planta huésped, generalmente sin causar síntomas aparentes de enfermedad (Sekar y Kandavel 2010).

Las bacterias PGPRs poseen varios mecanismos de acción para generar el aumento en el crecimiento de las plantas (Figura 1), los que se clasifican en directos e indirectos (Gupta *et al.* 2015). Se denomina efecto directo al uso de moléculas que son producidas por las bacterias, y que las plantas utilizan para crecer, como compuestos reguladores

del crecimiento o fitohormonas, entre ellas el AIA, ácido giberélico (GA), citoquininas y ácido abscísico (ABA), también se considera efecto directo que las bacterias solubilizan fósforo del suelo quedando este mineral disponible para la planta (Piccoli *et al.* 2011, Patel *et al.* 2012). El efecto indirecto a su vez, radica en la disminución del ataque de patógenos debido a varios mecanismos de las rizobacterias, entre ellos producir enzimas líticas como quitinasas y glucanasas que atacan la pared celular de hongos patógenos, producir antibióticos como el ácido cianhídrico, la competencia por los nutrientes y el espacio en la rizósfera y la inducción de resistencia sistémica en contra de un amplio espectro de patógenos de plantas (Bodhankar *et al.* 2017).

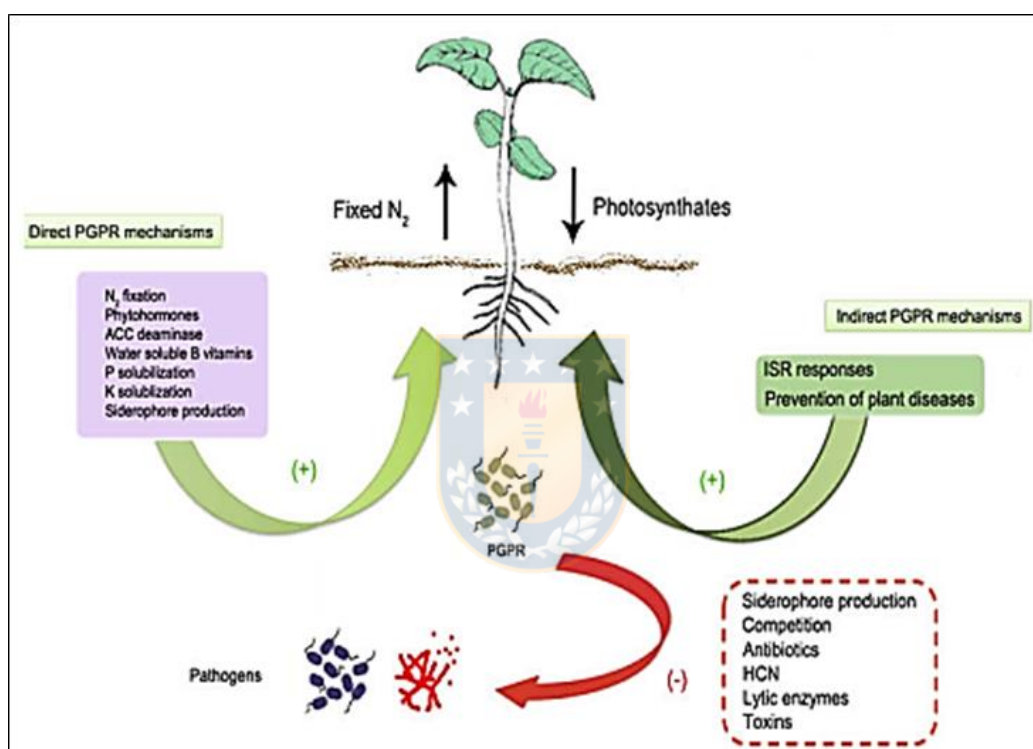


Figura 1. Efecto de PGPRs en plantas y sus mecanismos de acción (Fuente; Nazir *et al.* 2018).

En diversas especies de plantas se ha descrito que las PGPR endófitas estimulan el crecimiento y enraizamiento. En plantas de maíz se observó que la inoculación con bacterias endófitas ha mejorado el desarrollo de estas plantas, al disminuir el estrés provocado por salinidad (Akhtar *et al.* 2015). Aumentos significativos en el crecimiento de plantas de arroz se han verificado al inocularlas con la endófito *Pseudomonas stutzeri* (Pham *et al.* 2017), similar a lo observado por Wang *et al.* (2014), quienes determinaron una gran colonización de las raíces de plantas de arroz junto con un incremento en el desarrollo de estas, después de la inoculación con cepas de las endófitas *Burkholderia* sp, *Sphingomonas* sp y *Enterobacter* sp.. En la especie *Abelmoschus esculentus*

(quimbombó) luego de la inoculación con cepas endófitas de *Alcaligenes faecalis* (Ray *et al.* 2015), se incrementó la biomasa, la longitud de raíz y brotes, Karimi *et al.* (2018) aisló la endófitas *Azospirillum brasilense* y *Azospirillum zea* desde plantas de trigo comprobando la estimulación del crecimiento de las plantas en condiciones controladas (experimento de macetero) y de campo, aumentando el rendimiento del grano de trigo. Recientemente Ferchichi *et al.* (2019), describieron una cepa de *Paenibacillus glycanilyticus* y *Pseudomonas brenneri* como endófitas promotoras del crecimiento de la leguminosa lupino blanco (*Lupinus luteus*), mostrando varios de los mecanismos de promoción directa e indirecta del crecimiento de plantas. En *Eucalyptus* existen muy pocos registros de investigaciones que evalúen el efecto de este tipo de bacterias, Paz *et al.* (2012) aislaron las endófitas *B. subtilis* y *B. licheniformis* desde el híbrido *E. urophylla* x *E. grandis* observando que estimularon el crecimiento de la raíz además de producir AIA, solubilizar fosfato y fijar nitrógeno.

Según lo anteriormente planteado, la mayoría de las investigaciones que evalúan el efecto de bacterias endófitas en el enraizamiento y crecimiento se han llevado a cabo en especies de interés agrícola, entretanto, las investigaciones realizadas en especies forestales se han centrado en evaluar solo el efecto de bacterias tipo rizosféricas en el crecimiento de plantas, con escasos estudios que evalúen el efecto de bacterias endófitas en el enraizamiento de plantas de vivero. En concordancia a los antecedentes presentados, el objetivo del estudio fue evaluar el efecto de aislados de bacterias endófitas, en el crecimiento y enraizamiento de plantas de *E. nitens* y en plantas de dos clones híbridos de *E. nitens* x *E. globulus*, además de evaluar sus posibles mecanismos de acción.

4.2 METODOLOGÍA

En el estudio fueron ensayadas bacterias endófitas de *Eucalyptus* spp., coletadas desde plantas de viveros y árboles de predios forestales, de las empresas; Forestal Mininco S.A. y Forestal Arauco S.A. (FONDEF CA13I10285). En viveros, las bacterias se aislaron de plantas de *E. nitens*, *E. globulus*, y dos clones del híbrido *E. nitens* x *E. globulus* X-64 y X-65, con rangos de edades entre uno y dos años, colectadas desde el vivero de Proplanta (S36°36'23.9" - O72°6'12.4") y del vivero de Carlos Douglas

(S37°5'18.17" - O72°36'57.42"). Desde plantaciones de propiedad de Forestal Arauco S.A. fueron colectadas muestras de *E. nitens*, *E. globulus*, y sus híbridos, desde predios localizados en las regiones del Maule, Biobío, Araucanía y de los Ríos. Los árboles fueron seleccionados por tener buen estado fitosanitario y crecimiento en altura y diámetro mayor que la media de rodal. Se tomaron muestras de tronco de árboles de diferentes edades, como también muestras de ramas, hojas adultas y juveniles y de raíces. El aislamiento de las bacterias endófitas, se realizó en el Laboratorio de Patología Forestal de la Universidad de Concepción, utilizando medios de cultivos selectivos según metodología descrita por Angulo *et al.* (2014).

4.2.1 Aislamiento de bacterias endófitas

El aislamiento de las bacterias se realizó desde hojas, raíces, tallos y troncos, tanto de plantas como de árboles. Todas las muestras fueron lavadas con agua potable por cinco minutos, además los tallos y raíces fueron cepillados para retirar las partículas de suelo. Posterior al lavado se procedió a fragmentar los tejidos en trozos pequeños y se realizó un enjuague con agua destilada mezclada con Tween 80 al 0,1% con la finalidad de reducir la tensión superficial. Luego, las muestras fueron depositadas en tubos de 50 ml y desinfectadas según la metodología de Helander, mediante enjuagues de alcohol (75%) por 30 s, hipoclorito de sodio (4% de cloro activo) por 1 min y alcohol (75%) por 10 s, con tres lavados sucesivos de agua destilada estéril. Fragmentos de los distintos tejidos fueron depositados en bolsas plásticas con 3 ml de solución PBS (Phosphate buffered solution) (g/l: NaCl 8g, KCl 0.2g, Na₂ HPO₄ x 7H₂O 2.72g, KH₂ PO₄ 0.24 g) (pH 7.2) suplementado con Tween 80 al 0,1%, y se maceró cada muestra para liberar las bacterias endófitas desde el interior de los tejidos. El macerado de tejidos fue alicuotado en microtubos por duplicado, cada muestra de 1 ml fue sometida a choque térmico de 70°C durante 30 min para el aislamiento de esporas bacterianas de *Bacillus* spp. Con las otras muestras maceradas se realizaron diluciones seriadas, sembrando una alícuota de 100 µl de cada dilución mediante asa de drigalski en los medios de cultivo selectivos de acuerdo al grupo taxonómico: para bacterias en general (Medio cultivo TSA 10%), *Pseudomonas* (Medio de cultivo King B), *Bacillus* (Medio de cultivo CCY) y *Streptomyces* (Medio de cultivo AC), a todos los medios de cultivo se le agrego el fungicida Cicloheximida (50 ug L⁻¹) (González *et al.* 2018). Las placas de Petri sembradas fueron incubadas a 25°C por 48 h. Para el aislamiento de bacterias endófitas

desde troncos leñosos fueron seccionadas cinco rodelas por muestra, se retiró la corteza y se procedió a tomar muestras de astillas. Las astillas fueron dispuestas en tubos de 15 ml y se utilizó nuevamente la metodología de Helander. Posteriormente, 3 ml de PBS fueron añadidos a cada muestra, seguido de una centrifugación a 3000 g durante 20 min con el fin de extraer las bacterias del apoplasto, para luego macerar los fragmentos y realizar diluciones seriadas y proceder a la siembra en los medios de cultivo selectivos.

Desde las placas de aislamiento donde surgieron de 30 a 300 colonias bacterianas, fueron seleccionadas colonias que presentaron distintos tipos morfológicos. Cada colonia fue aislada mediante cultivo sucesivo. Las colonias obtenidas fueron observadas mediante lupa estereoscópica para una descripción morfológica. Finalmente con las colonias seleccionadas se realizó un cepario a 20°C para mantener los aislados hasta su uso.

4.2.2 Ensayos en vivero

Fueron realizados dos ensayos, uno en enero de 2014 y el otro en febrero de 2015, y en cada ensayo se evaluaron 43 aislados de bacterias. En el primer ensayo se evaluó el efecto de bacterias endófitas en el crecimiento de plántulas de eucalipto y en el segundo ensayo se evaluó el efecto en el enraizamiento de miniestacas de eucalipto, coincidiendo con el periodo estival de cosecha de miniestacas en el vivero. Los ensayos fueron ejecutados en el vivero Carlos Douglas (Yumbel) perteneciente a la empresa Forestal Mininco S.A.

Para el ensayo de promoción de crecimiento fueron utilizadas plántulas de tres meses de edad, originadas por semillas, del híbrido *E. nitens* x *E. globulus* clon X-65 y plántulas de *E. nitens*, con 8 y 3 cm altura respectivamente. Fueron utilizados 43 aislados de bacterias endófitas y un control negativo (agua destilada estéril). Para la obtención del inóculo de cada aislado, una muestra colectada desde el cepario se transfirió a medio de cultivo líquido (caldo R2A al 25%) y se incubó a 28°C por 24 h alcanzando una concentración de 1×10^8 UFC/ml. Las bacterias fueron aplicadas directamente al sustrato de crecimiento (compost de corteza de pino) a razón de 7 ml del cultivo bacteriano por cavidad. Luego las bandejas con las plantas fueron dispuestas en el

invernadero en condiciones controladas de temperatura (28°C) y humedad (70%) (Figura 2).

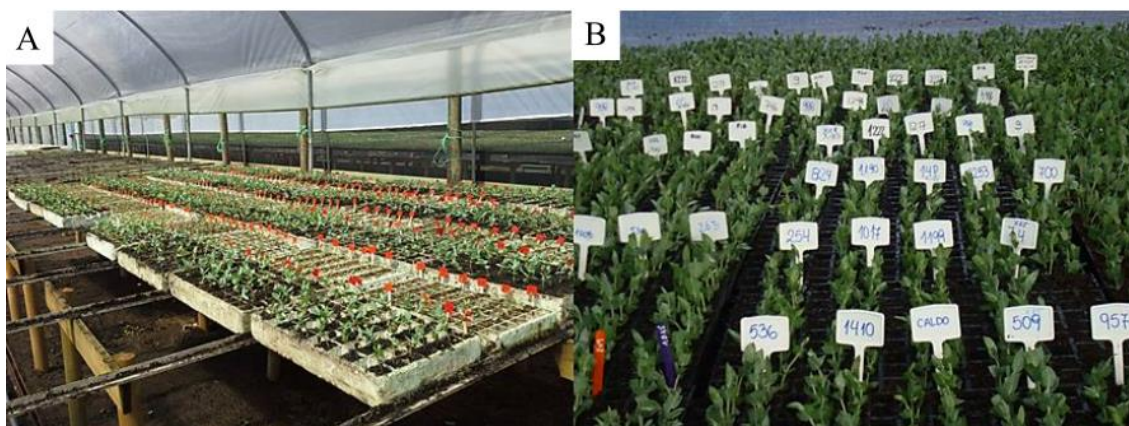


Figura 2. A) Ensayo de crecimiento y B) Ensayo de enraizamiento. En ambas fotografías se observa disposición de las bandejas con sus respectivas plántulas en invernadero.

El diseño del ensayo fue completamente aleatorio, con tres repeticiones, siendo la unidad experimental ocho plantas para *E. nitens* y en el caso del clon híbrido X-65, cuatro repeticiones, con siete plantas cada una. El ensayo tuvo una duración de 45 días, para luego ser evaluada la altura de la planta, longitud de raíz principal, y biomasa (peso seco) de la parte aérea de la planta y la raíz. Para la biomasa, el material se mantuvo en un horno a 200°C durante 24 h, luego se pesaron plantas y raíces por separado en una balanza analítica. Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante Anova, y las comparaciones múltiples se realizaron con el test LSD con 95% de confianza, mediante el software SAS 9.2.

En el ensayo de enraizamiento fueron evaluados 41 aislados de bacterias endófitas y dos aislados de bacterias rizosféricas (*Pseudomonas* sp. 14 y *Bacillus* sp 18) que poseían antecedentes como promotoras de enraizamiento (González *et al.* 2018), además de incluir un control negativo (agua destilada estéril). Como material vegetal se utilizaron miniestacas de 3 cm de longitud obtenidas desde plantas madres del híbrido *E. nitens* x *E. globulus* clon X-64. Para la obtención del inoculo de cada aislado se procedió de la misma forma que la descrita en el ensayo de promoción de crecimiento. Los aislados de bacterias endófitas fueron aplicados mediante inmersión de las miniestacas en el cultivo líquido de cada aislado, durante 1 min, y además fueron aplicados al substrato de enraizamiento (fibra de coco) de cada miniestaca. Las bandejas con las miniestacas fueron dispuestas en invernadero en condiciones controladas de temperatura (28°C) y humedad (70%). El ensayo fue conducido en un diseño completamente aleatorio, cada

tratamiento consistía de tres repeticiones, cada una compuesta de 20 miniestacas. Los ensayos tuvieron una duración de 45 días, evaluándose el porcentaje de enraizamiento para cada tratamiento. Los resultados fueron analizados mediante Anova y las medias fueron comparadas mediante test LSD, con nivel de confianza de 95%, mediante el software SAS 9.2.

4.2.3 Determinación de mecanismos asociados a promoción de crecimiento y enraizamiento e identificación de bacterias endófitas.

Fueron utilizados solo aquellos aislados de bacterias endófitas que tuvieron un efecto en estimular el crecimiento o enraizamiento en los ensayos previos, evaluándose la presencia de alguno(s) de los mecanismos asociados a la promoción de crecimiento de plantas. Los ensayos se realizaron en el Laboratorio de Patología Forestal de la Universidad de Concepción.

Producción de ácido indol acético (AIA).

Para detectar la producción de AIA se utilizó el reactivo de Salkowski (2 ml 0.5 M $\text{FeCl}_3 + 98 \text{ ml } 35\% \text{ HClO}_4$) con análisis colorimétrico (Asghar *et al.* 2002). Luego de obtener inóculo bacteriano de cada aislado a evaluar mediante crecimiento en medio de cultivo sólido TSA por 48 h a 28°C. La suspensión bacteriana se traspasó a tubos con 10 ml de caldo de cultivo TSB suplementado con triptófano (0.5%), los cultivos fueron entonces incubados a 25°C en agitación de 120 rpm. Después de 48 h se colectó una muestra 1,5 ml de cada cultivo y se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue mezclado con reactivo Salkowski (relación 2:3) y se mantuvo en oscuridad por 20 min. El desarrollo de una coloración rosada indico reacción positiva a la presencia de AIA, midiéndose en espectrofotómetro a 535 nm. La concentración de auxina se calculó mediante una curva de calibración utilizando como patrón AIA a 1mM.

Producción de amoniacó.

La producción de amoniacó (NH_3) fue determinada mediante la metodología descrita por Cappuccino y Sherman (1992). En este método cualitativo se indica la producción de NH_3 mediante una coloración amarilla en la suspensión bacteriana. El inóculo bacteriano fue traspasado a tubos con 10 ml de agua peptona e incubado a 25°C en

agitación de 120 rpm. Luego de 48 h, los cultivos líquidos de cada aislado bacteriano fueron centrifugados a 9000 rpm durante 10 min, y 10 ml de sobrenadante se mezcló con 500ul del reactivo Nessler's (Sigma-Aldrich) evaluándose la reacción colorimétrica a los 10 minutos de incubación a temperatura ambiente.

Solubilización de fosfato.

Para este ensayo se usó la metodología de Nautiyal (1999), utilizando el medio de cultivo NBRIP (Institute Phosphate médium). Luego de obtener el inóculo bacteriano de cada aislado, se traspasó a placas con medio de cultivo sólido NBRIP que presenta una coloración blanca, la formación de un halo trasparente alrededor de la colonia bacteriana indica la solubilización del fosfato en el medio. Se utilizaron tres replicas por cada aislado y se hicieron crecer siete colonias en cada placa.

Producción de sideróforos.

La capacidad de los aislados de producir sideróforos se evaluó mediante la metodología de Schwyn y Neilands (1987). El inóculo bacteriano obtenido en medio de cultivo sólido TSA por 48 h a 28°C, fue traspasado a placas con el medio de cultivo sólido agar cromo azurol (agar CAS). Este medio presenta una coloración verde/azulada y la formación de un halo anaranjado y/o trasparente alrededor de la colonia bacteriana indica la producción de sideróforos. Se utilizaron tres replicas por cada aislado y se hicieron crecer siete colonias en cada placa.

Identificación de bacterias endófitas.

Para identificar las bacterias endófitas que estimularon el crecimiento de eucalipto se utilizaron cultivos frescos obtenidos en medio sólido. Desde una colonia pura se extrajo el ADN genómico total utilizando el kit de extracción GeneJET (Thermo Scientific), verificando la extracción con una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Posteriormente para amplificar el gen de ADN(r) 16S se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) según la metodología de Jopia *et al.* (2011). Para la amplificación del segmento de ADN de interés se utilizaron los cebadores específicos 9f y 1492r, con la siguiente secuencia; 9f 5'-GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3' y 1492r 5'-GGY TAC CCT GTT ACG ACTT-3'. En la mezcla se utilizó: 1 µL de ADN genómico, Flexi buffer 1X (Promega, Madison, Wisconsin, EE. UU.), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP,

0,5 mM de cada cebador y $0,025 \text{ U}\mu\text{L}^{-1}$ de polimerasa GoTaq (Promega). El ciclo y los programas de temperatura de la reacción PCR fueron los siguientes: a) un ciclo de 2 min a 95°C ; b) 30 ciclos configurados en tres segmentos; primer segmento 30s a 95°C , segundo segmento 30s a 94°C , y tercer segmento 1 min 30s a 72°C ; luego c) un ciclo de 2 min a 72°C manteniendo el producto final de la PCR a 4°C . La amplificación del segmento de ADN se verificó nuevamente mediante electroforesis y tinción del gel con bromuro de etidio ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$). El producto de la PCR se envió a Macrogen (Seúl, Corea del Sur) para su secuenciación, las secuencias se editaron con el software GENEIUS y se compararon en la base de datos NCBI para la identificación de los aislados de bacterias endófitas.

4.3 RESULTADOS

De total de bacterias endófitas evaluadas en el primer ensayo, 13 aislados aumentaron la longitud de la raíz de *E. nitens*, fluctuando entre 7,3 y 8,7 cm, comparado con 6,5 cm del tratamiento control (Figura 3a). Entretanto, 13 aislados aumentaron la altura de planta en el clon híbrido X-65, comparado con su control, con alturas entre 33 y 23 cm (Figura 3b). El 39% de los aislados de bacterias endófitas que aumentaron la longitud de raíz de *E. nitens* fueron obtenidos en su mayoría desde esta misma especie (Figura 6a). Además el 61% de los aislados con efecto en la altura de planta del híbrido fueron obtenidos del tallo de las plantas, sugiriendo una cierta especificidad entre bacterias y órgano (Figura 6b).

Referente a la biomasa, en *E. nitens*, seis aislados incrementaron la biomasa de las raíces (Figura 3c), y cinco la biomasa de la planta (Figura 3d), siendo los aislados EH-400 y EH-736 quienes además de tener un efecto en la biomasa también incrementaron la altura de las plantas en el híbrido X-65 y la longitud de raíz en *E. nitens*.

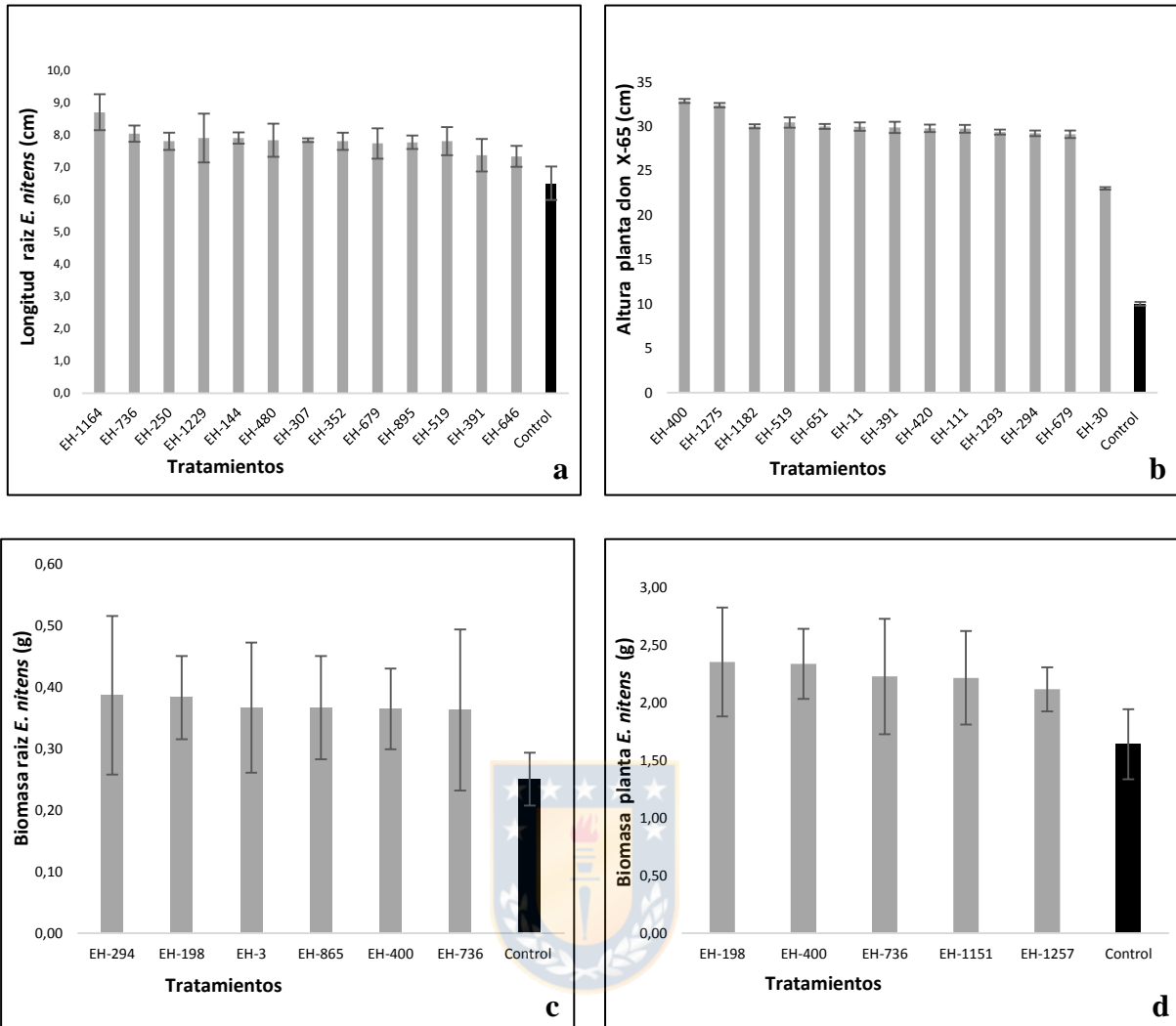


Figura 3.- Aislados de bacterias endófitas (tratamientos) que incrementaron significativamente ($p < 0,05$) la longitud de la raíz (a), altura de planta (b), la biomasa de raíz (c), y la biomasa de planta (d).

En el segundo ensayo, siete aislados de bacterias endófitas incrementaron significativamente el enraizamiento en las miniestacas del clon X-64 (Figura 4), contrariamente no se obtuvo efecto en las miniestacas del clon X-65. Los aislados bacterianos con efecto alcanzaron en promedio 50% (44-59%) de enraizamiento comparado con el tratamiento control (33%) (Figura 5). El 85 % de los aislados con efecto en el enraizamiento fueron obtenidos desde la raíz de las plantas de *Eucalyptus*, mostrando cierta especificidad entre las bacterias endófitas y el órgano del cual se aislaron (Figura 6c).

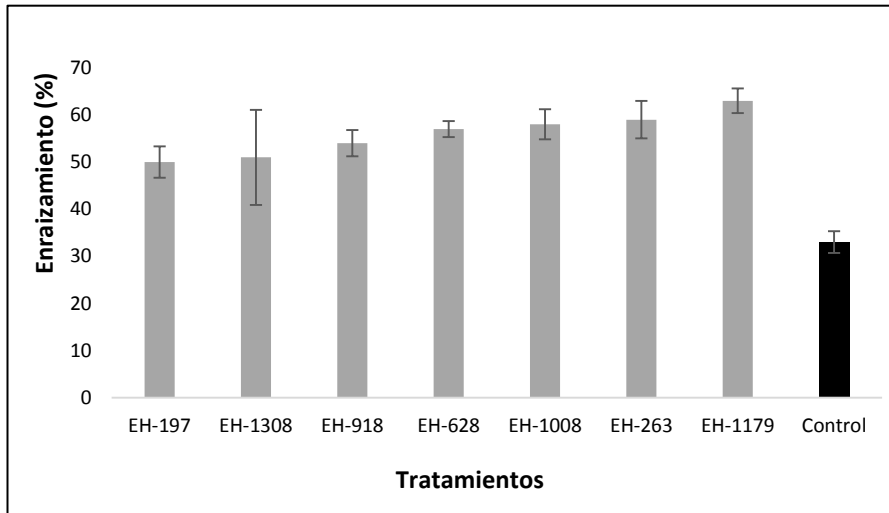


Figura 4.- Aislados de bacterias endófitas que incrementaron significativamente ($p < 0,05$) el enraizamiento en miniestacas del clon X-64 (*E. nitens* x *E. globulus*) comparado con el control.

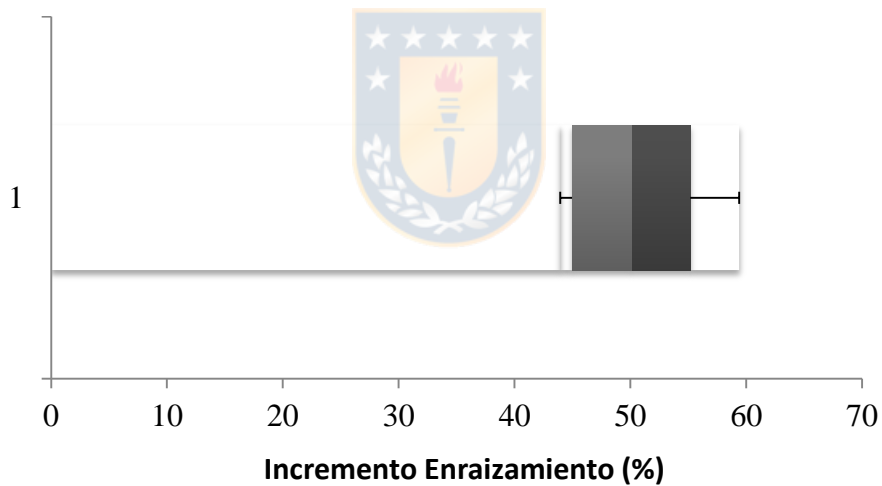


Figura 5.- Incremento en el enraizamiento adventicio de miniestacas del clon X-64, el gráfico de cajas indica la distribución en cuanto a las ganancias en el enraizamiento (%).

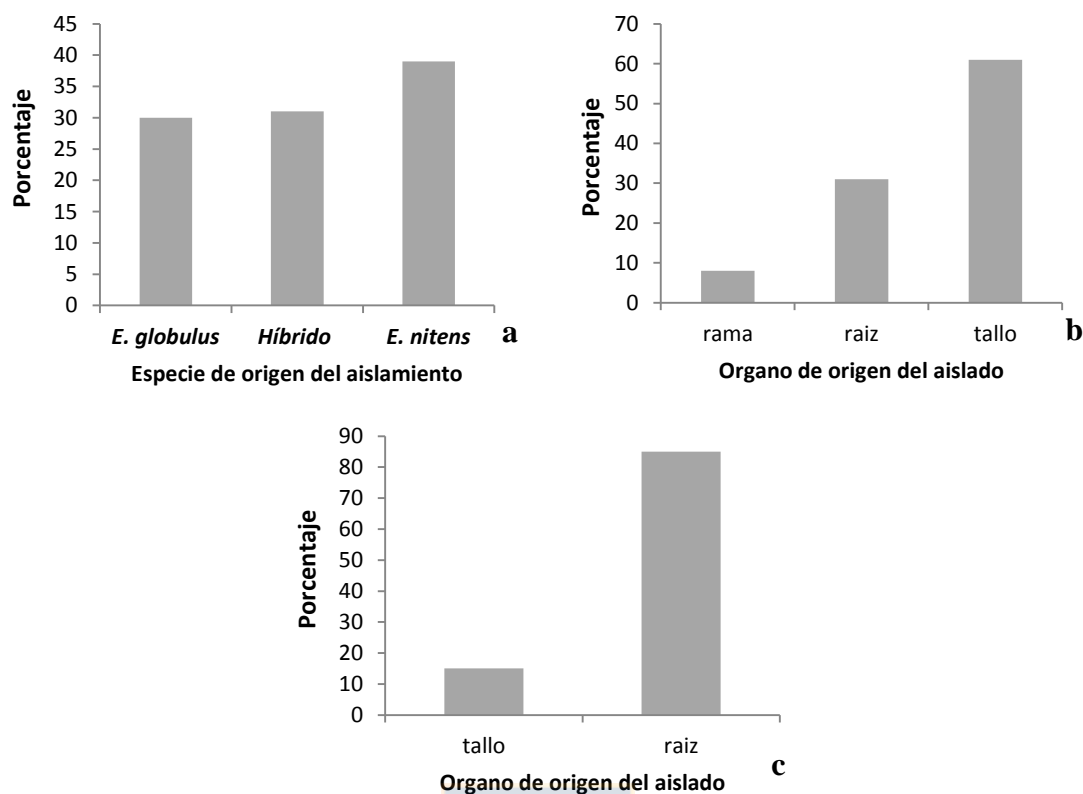


Figura 6.- (a) Indica en porcentaje desde que especie fueron aisladas las bacterias que aumentaron la longitud de raíz en *E. nitens*. (b) Indica en porcentaje desde que órgano fueron aisladas las bacterias que aumentaron la altura de planta en el clon X-65 y (c) indica en porcentaje desde que órgano fueron aisladas las bacterias que aumentaron el enraizamiento en el clon X-64.

Referente a los mecanismos de acción, los aislados EH-11 y EH-250 que presentaron el 100% y 75% de los mecanismos de promoción de crecimiento evaluados (Tabla 1), tuvieron la capacidad de aumentar la altura de las plantas y longitud de raíz. El resto presentó uno o dos mecanismos, y cinco aislamientos no presentaron ninguno de los mecanismos evaluados (datos no mostrados). El mecanismo más frecuente fue la producción de amoníaco, el cual puede ser utilizado por las plantas como fuente de N_2 , seguido de la solubilización de fosfato que tendría un efecto en estimular el crecimiento de las plantas. Los aislados con mayor efecto en el crecimiento no coincidieron con aquellos que presentaron mayor cantidad de mecanismos asociados a la acción promotora, por lo que podrían ser otros los mecanismos que estén actuando en estimular el crecimiento de las plantas. Asimismo, la producción de AIA solo fue observada en un aislado que estimulo el enraizamiento, indicando que este no sería el mecanismo principal para la estimulación de este rasgo.

Tabla 1.- Aislados de bacterias endófitas que promovieron el crecimiento en plantas de *E. nitens* y el híbrido X-65 y los mecanismos detectados.

Aislamiento	Mecanismos				Identificación
	AIA	NH ₃	PO ₄	SD	
EH-11	+	+	+	+	<i>Pantoea</i> sp
EH-111	-	+	-	+	<i>Achromobacter insuavis</i>
EH-198	-	+	-	-	<i>Enterobacter ludwigii</i>
EH-250	+	+	+	-	<i>Pantoea rodasi</i>
EH-263	+	+	-	-	<i>Serratia quinivorans</i>
EH-391	-	-	+	-	<i>Pantoea agglomerans</i>
EH-400	-	+	+	-	<i>Pantoea rodasi</i>
EH-420	-	-	-	+	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
EH-609	-	+	+	-	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
EH-711	-	+	-	-	<i>Pseudomonas azotoformans</i>
EH-736	-	-	+	+	<i>Streptomyces yanii</i>
EH-1164	-	+	-	-	<i>Pantotea eucalypti</i>

AIA: ácido indol acético, NH₃: amoníaco, PO₄: solubilización de fosfato y SD: sideróforos. (+) Indica presencia del mecanismo.



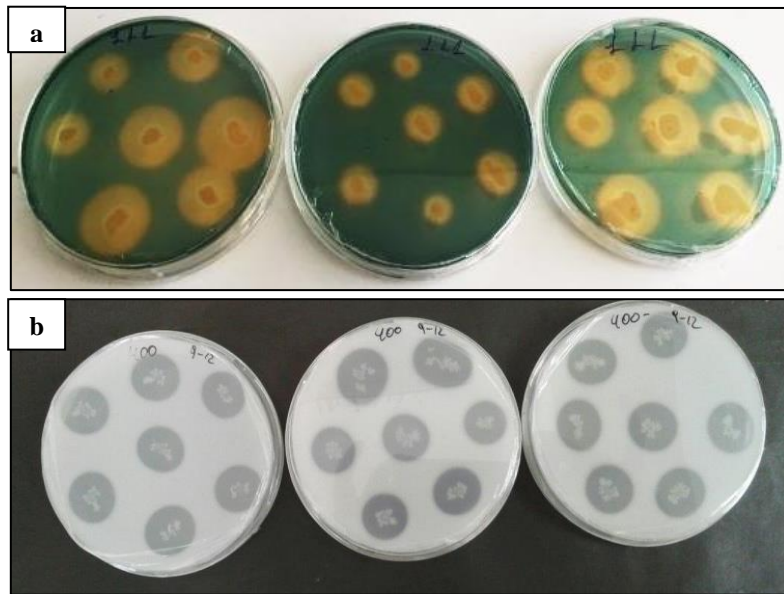


Figura 7.- Producción de (a) sideróforos por el aislado EH-111 (*Achromobacter insuavis* y (b) solubilización de fosfato por el aislado EH-400 (*Pantoea rodasi*).



4.4 DISCUSIÓN

En este estudio se determinó que bacterias endófitas obtenidas desde *Eucalyptus* spp tuvieron un efecto al promover el crecimiento en plantas de *E. nitens* y en el híbrido *E. nitens* x *E. globulus* X-65, así como en el enraizamiento de miniestacas del híbrido *E. nitens* x *E. globulus* X-64. En el caso del incremento en el crecimiento de plantas, el efecto fue constatado en la altura de planta, longitud de raíz, biomasa de la parte aérea y raíces de las plantas. Las investigaciones efectuadas con bacterias endófitas en plantas de especies forestales son escasas. Doty *et al.* (2009), daban cuenta que la presencia de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno atmosférico en tallos de álamo (*Populus trichocarpa*) y sauce (*Salix sitchensis*), serían responsables de que estos árboles pudieran colonizar pioneramente suelos pobres en nitrógeno, disminuyendo la dependencia a los fertilizantes de nitrógeno sintéticos, que además pueden tener efectos negativos en el ambiente. Taghavi *et al.* (2009), observaron un aumento en la biomasa de estacas de álamo (*Populus* spp), luego de diez días de crecimiento en cultivos hidropónicos, inoculados con bacterias endófitas aisladas desde álamo, conjuntamente detectaron un aumento en el enraizamiento de las estacas.

En esta investigación conjuntamente se observó un aumento en la longitud de raíz cuando se inocularon los aislados de bacterias endófitas, característica relevante, ya que una mayor longitud de raíz principal permite la exploración de un mayor volumen de suelo, otorgando una ventaja a las plantas para la obtención de agua y nutrientes. Las bacterias que incrementaron la longitud de raíz en *E. nitens* fueron mayoritariamente aisladas desde esta especie, dando cuenta de una posible especificidad entre los microorganismos endófitos y su planta hospedera, un rasgo ya descrito en las PGPR (Bais *et al.* 2006). En efecto, en esta investigación la mayoría de las bacterias endófitas con efecto en el crecimiento fueron aisladas desde el tallo de las plantas, indicando nuevamente especificidad entre los microorganismos y el órgano de aislamiento, así como aquellas con efecto en el enraizamiento que fueron aisladas desde las raíces. Dentro de las posibles razones del éxito de las bacterias endófitas, destacan que su proliferación dentro de los tejidos permite que interactúen más estrechamente con su planta hospedera, además enfrentan menor competencia por nutrientes y están más protegidas de los cambios adversos del medio ambiente (Asis y Adachi 2003). La importancia de evaluar este tipo de bacterias radica en que pueden ofrecer varios beneficios, particularmente promoción del crecimiento y protección contra patógenos,

además de comunicarse e interactuar con la planta hospedera de manera más eficiente que las bacterias rizosféricas (Santoyo 2016).

Si bien existen investigaciones realizadas en cuanto a endófitos en *Eucalyptus*, la información es escasa, no obstante, hay antecedentes de la presencia de este tipo de microorganismos en estas especies (Shen *et al.* 2010) y de los efectos en el crecimiento de eucalipto. Paz *et al.* (2012) determinaron el efecto de dos bacterias endófitas en el crecimiento y enraizamiento del híbrido de *E. urophylla* x *E. grandis* (*E. urograndis*), que estimularon el enraizamiento y la biomasa de planta, los cuales no coincidieron con la variedad de aislados que produjeron AIA, solubilizaron fosfato y fijaron nitrógeno. En el presente estudio varios aislados tuvieron uno o más mecanismos asociados a la promoción de crecimiento en plantas, y estos podrían estar asociados a los efectos positivos observados al inocularlos. En su revisión Gaiero *et al.* (2013) describe a las bacterias endófitas con la capacidad para aumentar el crecimiento y/o enraizamiento en plantas como PGPBE(s) y detalla que pueden presentar todos los mecanismos evaluados en la esta investigación clasificándolos como mecanismos de fitoestimulación, biofertilización y biocontrol.

Los aislados que estimularon el enraizamiento no presentaron los mecanismos evaluados a excepción del aislado EH-263, indicando que otros mecanismos (no evaluados) como la producción de enzimas líticas, antibióticos o colonización eficaz de los tejidos, podrían ser responsables de estimular el enraizamiento. La evaluación de mecanismos adicionales y corroboración de los encontrados en esta investigación, daría luces de como estarían actuando las bacterias endófitas en el crecimiento y enraizamiento de las plántulas de *Eucalyptus* sp.

Las trece bacterias endófitas con efecto en el crecimiento o enraizamiento fueron identificadas, observándose que la mayoría pertenecían el género *Pantoea* y *Pseudomonas*. Estudios que describen la comunidad de bacterias endófitas en especies de *Eucalyptus* coinciden con los resultados obtenidos en esta investigación, detectándose especies de enterobacteriaceas como *Pantoea*, *Erwinia* y *Agrobacterium* (Procopio *et al.* 2009), algunas especies de *Enterococcus* y *Paenibacillus* (Ferreira *et al.* 2008, Miguel *et al.* 2016), además de *Bacillus* sp (Paz *et al.* 2012) todas dentro de los tejidos de *Eucalyptus* sp.

4.5 CONCLUSIONES

Bacterias endófitas aisladas desde *Eucalyptus nitens* y el híbrido *Eucalyptus nitens* x *Eucalyptus globulus*, aumentan el crecimiento en plantas de *E. nitens*, del híbrido *E. nitens* x *E. globulus* X-65 y el enraizamiento de las miniestacas del híbrido X-64 en condiciones de vivero.

La capacidad de estimular el crecimiento y enraizamiento estaría asociada principalmente a la producción de, sideróforos, amoníaco y a la capacidad de las bacterias de solubilizar fosfato, mecanismos que estimulan de manera directa e indirecta el desarrollo de las plantas.



4.6. REFERENCIAS

- Adesemoye AO, Torbert HA, Kloepper JW. (2009) Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microbial Ecology* 58: 921-929.
- Akhtar S, Andersen M, Naveed M, Zahir Z, Liu F. (2015) Interactive effect of biochar and plant growth-promoting bacterial endophytes on ameliorating salinity stress in maize. *Functional Plant Biology* 42:770-781.
- Angulo V, Sanfuentes E, Rodríguez F, Sossa K. (2014) Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*. *Revista Argentina de Microbiología* 46:338-347.
- Asghar HN, Zahir Z, Arshad M, Khaliq A. (2002) Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. *Biology Fertility of Soils* 35:231-237.
- Asis C.A. Jr, Adachi K. (2003) Isolation of endophytic diazotroph *Pantoea agglomerans* and nondiazotroph *Enterobacter asburiae* from sweetpotato stem in Japan. *Letters in Applied Microbiology* 38:19-23.
- Assis T, Fet-Netto A, Alfenas A. (2004) Current techniques and prospects for the clonal propagation of hardwoods with emphasis on *Eucalyptus*. Christian Walter and Mike Carson Plantation (Eds) *Forest Biotechnology for the 21st Century*. Research Signpost, Trivandrum, India, 303-333.
- Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM. (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review Plant Biology* 57:233-66.
- Bodhankar S, Minakshi G, Hemanth S, Reddy G, Rasul S, Yadav S, Desai S, Mallappa M, Mandapaka M, Srinivasarao C. (2017) Maize seed endophytic bacteria: dominance of antagonistic, lytic enzyme-producing *Bacillus* spp. *Biotechnology* 7:232.
- Cappuccino JC, Sherman N . (1992) *Microbiology: A Laboratory Manual* (third ed), Benjamin/cummings Pub. Co., New York (1992), pp. 125-179.

- Costa J, Vaillancourt R, Steane E, Jones R, Marques C. (2017) Microsatellite analysis of population structure in *Eucalyptus globulus*. *Genome* 60: 770-777.
- Dick M, Williams N, Bader M, Gardner J, Bulman S. (2014) Pathogenicity of *Phytophthora pluvialis* to *Pinus radiata* and its relation with red needle cast disease in New Zealand. *New Zealand Journal of Forestry Science* 44: 6.
- Díaz K, Araya T, Valenzuela S, Sossa K, Martínez M, Peña-Cortés H, Sanfuentes E. (2012) Production of phytohormones, siderophores and population fluctuation of two root-promoting rhizobacteria in *Eucalyptus globulus* cuttings. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28: 2003-2014.
- Doty S, Oakley B, Xin G, Kang J.W, Singleton G, Khan Z, Vajzovic A, Staley J. (2009) Diazotrophic endophytes of native black cottonwood and willow. *Symbiosis* 47:23-33.
- Du Jardin P. (2015) Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation *Scientia Horticulturae* 196:3-14.
- INFOR. Inventario de Bosques Plantados por Especie Según Región, Acumulado a Diciembre del 2009 (ha). [http://www.infor.cl/archivos/series_estadisticas/Recurso Forestal/recurso forestal 3.pdf](http://www.infor.cl/archivos/series_estadisticas/Recurso_Forestal/recurso_forestal_3.pdf).
- Accesado 3 de junio 2018.
- Ferchichi N, Toukabri W, Boularess M, Smaoui A, Mhamdi R, Trabelsi D. (2019) Isolation, identification and plant growth promotion ability of endophytic bacteria associated with lupine root nodule grown in Tunisian soil. *Archives of Microbiology* 201:1333-1349.
- Ferreira A, Quecine M, Teixeira L.P., Oda S, Azevedo J, Araujo W. (2008) Diversity of endophytic bacteria from *Eucalyptus* species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. *FEMS Microbiology Letters* 287:8-14.
- Gaiero J, McCall C, Thompson K, Day N, Best A, Dunfield K. (2013) Inside The Root Microbiome: Bacterial Root Endophytes And Plant Growth Promotion. *American Journal of Botany* 100: 1738-1750.

- Gonzalez P, Sossa K, Rodriguez F, Sanfuentes E. (2018) Rhizobacteria strains as promoters of rooting in hybrids of *Eucalyptus nitens* x *Eucalyptus globulus*. Chilean Journal of agricultural research 78: 3-12.
- Gupta G, Parihar S, Ahirwar N, Snehi S, Singh V. (2015) Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. Journal Microbial Biochemical Technology 7: 96-102.
- Higashi E, Silveira R, Gonçalves N. (2000) Propagação vegetativa de *Eucalyptus*: princípios básicos e a sua evolução no Brasil. Circular técnica IPEF, 192, 1-11.
- Jopia P, H. Urrutia, K. Sossa, and A. Nocker. (2011). Effect of PCR amplicon length on suppressing signals from membrane-compromised cells by propidium monoazide treatment. Journal Microbiological Methods 87: 89-95. doi: 10.1016/j.mimet.2011.07.016.
- Karimi N, Zarea MJ., Mehnaz S. (2018) Endophytic *Azospirillum* for enhancement of growth and yield of wheat. Environmental Sustainability 1: 149-158.
- Miguel P, Oliveira M, Delvaux J, De Jesus G, Borges A, Totola M, Neves J, Costa M. (2016) Diversity and distribution of the endophytic bacterial community at different stages of *Eucalyptus* growth. *Antonie van Leeuwenhoek* 109:755-771.
- Nautiyal C, Shekhar C. (1999) An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiology Letters 170:265-270.
- Nazir N, Kamili A. Shah D. (2018) Mechanism of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) in enhancing plant growth - A Review. International Journal of Management, Technology And Engineering 8:709-721.
- O'Reilly C, Keane M, Morrissey N. (2002) The importance of plant size for successful forest plantation establishment. Coford connects. Boletín N°5, Dublin, Ireland.
- Pacurar D, Perrone I, Bellini C. (2014) Auxin is a central player in the hormone cross-talks that control adventitious rooting. *Physiologia plantarum* 151:83-96.
- Pardos J. (2007) Perspectiva fisiológica en la producción y mejora de eucalipto (con énfasis en *Eucalyptus globulus* Labill). Boletín del CIDEU 3: 7-55.

- Patel H, Patel R, Khristi S, Parikh K, Rajendran G. (2012) Isolation and Characterization of Bacteria Endophytes from *Lycopersicon esculentum* Plant and Their Plant Growth Promoting Characteristics. Nepal Journal of Biotechnology 1:37:52.
- Paz I, Santin R, Guimaraes A, Rosa O, Dias A, Quecine M, Azevedo J, Matsumara T. (2012) *Eucalyptus* growth promotion by endophytic *Bacillus* spp. Genetics and Molecular Research 11: 3711-3720.
- Piccoli P, Travaglia C, Cohen A, Sosa L, Cornejo P, Masuelli R, Bottini R. (2011) An endophytic bacterium isolated from roots of the halophyte *Prosopis strombulifera* produces ABA, IAA, gibberellins A₁ and A₃ and jasmonic acid in chemically-defined culture medium. Plant Growth Regulation 64:207-210.
- Procópio R, Araújo W, Maccheroni W.Jr, Azevedo J. (2009) Characterization of an endophytic bacterial community associated with *Eucalyptus* spp. Genetic and Molecular Research. 8:1408-1422.
- Pham V, Rediers H, Ghequire M, Nguyen H, De Mot H, Vanderleyden J, Spaepen S. (2017) The plant growth-promoting effect of the nitrogen-fixing endophyte *Pseudomonas stutzeri* A15. Archives of microbiology 199:513-517.
- Ray S, Singh S, Sarma B. K., Singh, H. B. (2016) Endophytic Alcaligenes Isolated from Horticultural and Medicinal Crops Promotes Growth in Okra (*Abelmoschus esculentus*). Journal of Plant Growth Regulation 35:401-412.
- Santoyo G, Moreno G, Orozco M, Glick B. (2016) Plant growth-promoting bacterial endophytes. Microbiological Research 183: 92-99.
- Schwyn B, Neilands J. (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Analytical Biochemistry 160:47-56.
- Sekar S, Kandavel D. (2010) Interaction of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Endophytes with Medicinal Plants-New Avenues for Phytochemicals. Journal of Phytology. Journal of Phytology 2: 91-100.

- Shen H, LI Z, Han D, Yang F, Huang Q, Ran L. (2010) Detection of indigenous endophytic bacteria in *Eucalyptus urophylla* in vitro conditions. *Front. Agric. China* 4: 37-41.
- Shu W, Zhou H, Jiang C, Zhao S, Wang L, Quanzi L, Yang Z, Groover A, Lu M. (2019) The auxin receptor TIR 1 homolog (Pag FBL 1) regulates adventitious rooting through interactions with Aux/IAA 28 in *Populus*. *Plant biotechnology journal*, 17: 338-349.
- Taghavi S, Garafola C, Monchy S, Newman L, Hoffman A, Weyens N, Barac T, Vangronsveld J, Van der Lelie D. (2009) Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. *Applied and environmental microbiology* 75:748-757.
- Vessey JK. (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255: 571-586.
- Walker T, Bais H, Grotewold E, Vivanco, J. (2003) Root exudation and rhizosphere biology. *Plant physiology* 132:44-51.
- Wang Y, Yang X, Zhang X, Dong L, Zhang J, Wei, Feng Y, Lu L. (2014) Improved plant growth and Zn accumulation in grains of rice (*Oryza sativa* L.) by inoculation of endophytic microbes isolated from a Zn Hyperaccumulator, *Sedum alfredii* H. *Journal of agricultural and food chemistry* 62:1783-1791.
- Zaldúa S, Sanfuentes E. (2010) Control of *Botrytis cinerea* in *Eucalyptus globulus* mini-cuttings using *Clonostachys* and *Trichoderma* strains. *Chilean Journal of agricultural research* 70:576-582.

DISCUSION GENERAL

En el primer capítulo, se abordó la problemática de la pérdida del enraizamiento del material vegetal (estacas-miniesticas) utilizado en los viveros para propagar vegetativamente *Eucalyptus* spp, y de qué manera esta dificultad disminuye sustantivamente la productividad de plántulas en los viveros forestales (Díaz *et al.* 2009). Esta baja capacidad de enraizamiento ocurre con más frecuencia en híbridos de *Eucalyptus* que incluyen *E. nitens* en el cruzamiento, como *E. nitens* x *E. globulus*, por lo que aquellas medidas que se desarrollen para mitigar este efecto negativo en estos materiales resultarán fundamentales para los viveros. Dentro de este contexto y con el interés de utilizar tecnologías sustentables, más amigables con el medio ambiente y menos costosas surge la utilización de las rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas o PGPR. Investigaciones previas realizadas en estas bacterias, han demostrado su capacidad para aumentar el enraizamiento en estacas, junto con incrementar la longitud de la raíz, biomasa y mejorar las características de las raíces.

En el segundo capítulo se analizó el efecto de las PGPR, mediante la evaluación de aislados de rizobacterias en el enraizamiento adventicio en miniesticas de dos clones híbridos de *Eucalyptus* (clones X-64 y X-65), llevándose a cabo tres ensayos consecutivos en condiciones operacionales de vivero. Los resultados demostraron la capacidad de las rizobacterias evaluadas de aumentar el enraizamiento en épocas que son consideradas marginales, como son inicios de la primavera y comienzo del otoño. El efecto podría deberse a que la temperatura es un factor ambiental preponderante en la formación de la nueva raíz (Trueman *et al.* 2013), y siendo estas más bajas, serían un factor que actúa negativamente en las plantas. Se ha descrito que las rizobacterias poseen la capacidad de estimular el crecimiento de las plantas en mayor grado cuando se encuentran bajo condiciones estresantes (Ali *et al.* 2014), esto podría explicar el efecto de promoción de enraizamiento de las rizobacterias solo en condiciones marginales.

Entre las especies de bacterias que tuvieron un efecto más consistente en el enraizamiento de las miniesticas, están *Bacillus thuringiensis* (aislado 63 y 122), especie que posee antecedentes sobre su efecto promotor del crecimiento en plantas (Armada *et al.* 2016). Especies de *Pseudomonas*, *Rhodococcus* y *Mucilaginibacter* también han sido descritas por promover el crecimiento en distintas plantas (Qaisrani *et*

al. 2014, Madhaiyan *et al.* 2010), no obstante, la presente investigación es el primer reporte de especies de *Rhodococcus* y *Mucilaginibacter* promoviendo el enraizamiento en plantas de interés forestal en Chile.

En el tercer capítulo se evaluó y describieron los mecanismos de acción ejercidos por los aislados de rizobacterias identificados en etapas anteriores (Capítulo 2). De los once aislados analizados cinco produjeron AIA en cantidades concordantes a estudios anteriores (Ali *et al.* 2009, Sadeghi *et al.* 2012). Además, la mayoría de las rizobacterias (75%) produjeron HCN, compuesto que inhibe el crecimiento de patógenos en la rizósfera, siendo este rasgo promotor indirecto del crecimiento de plantas (Capítulo 3, Tabla 2). El 100% de los aislados caracterizados produjeron sideróforos, mecanismo considerado directo e indirecto de la promoción del crecimiento (Gupta *et al.* 2015), debido a su efecto de inhibir el crecimiento de patógenos por disminución del hierro disponible en el suelo para el patógeno, y por facilitar el hierro para el crecimiento de la planta. Se verificó la producción de amoníaco por parte de las rizobacterias, el que tiene un efecto positivo al ser una fuente de nitrógeno para la planta.

Los aislados también tuvieron la capacidad de solubilizar fosfato, inhibir el crecimiento micelial del patógeno de eucalipto *Botrytis cinerea*, y producir una serie de enzimas con actividad lítica (proteasas, lipasas y pectinasas) que reducirían el ataque de fitopatógenos al poseer la capacidad de degradar componentes estructurales de la membrana de estos organismos (Pereira *et al.* 2015), siendo potenciales microorganismos biocontroladores.

Un aspecto relevante de lo investigado es que todas las bacterias evidenciaron la producción de la enzima ACC-desaminasa, enzima que descompone el ACC, molécula precursora del etileno. El etileno se origina en las plantas bajo condiciones de estrés, y es considerado considerado, por lo tanto, deletéreo para el enraizamiento (Arora *et al.* 2013). Por otra parte en el ensayo en vivero, se constató que la mezcla de dos aislados de bacterias aumentó significativamente el enraizamiento adventicio de miniestacas del clon híbrido *E. nitens* x *E. globulus* X-64, sugiriendo un efecto de sinergia entre las bacterias (Baris *et al.* 2014).

El último capítulo que analiza el efecto de bacterias endófitas en el enraizamiento y el crecimiento de plántulas de *Eucalyptus*, da cuenta de que PGPRs de tipo endófitas también son una potencial fuente de recursos biotecnológicos para obtener un

biofertilizante basado en microorganismos, al constatarse que algunos aislados de bacterias endófitas promovieron el crecimiento de plantas de eucalipto, y asimismo estimularon el enraizamiento adventicio en miniestacas del clon híbrido *E. nitens* x *E. globulus* X-64. Existen escasos antecedentes referente a las bacterias endófitas y su efecto en el crecimiento y enraizamiento de *Eucalyptus*, sin embargo, Paz *et al.* (2012) y Shen *et al.* (2010) constataron un efecto de estimulación del crecimiento de plantas de eucalipto al ser inoculadas con bacterias endófitas aisladas desde la misma planta. Estos resultados concordaron con los obtenidos en el estudio, en que los mayores efectos sobre el crecimiento fueron alcanzados por las bacterias aisladas desde el tallo, y en enraizamiento por bacterias aisladas desde la raíz, indicando una posible especificidad entre las bacterias y el órgano de la planta hospedera.



CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados obtenidos en una serie de ensayos de enraizamiento en condiciones de vivero en distintas épocas, permite aceptar la hipótesis planteada para esta investigación, en que aislados de rizobacterias obtenidos desde clones de *Eucalyptus* spp aumentan el enraizamiento de miniestacas de dos clones híbridos de *E. nitens* x *E. globulus*. El estímulo para enraizar ocurrió especialmente en condiciones ambientales consideradas marginales para el proceso de enraizamiento, siendo un resultado relevante ya que en este periodo es donde son más necesarios métodos complementarios para estimular el enraizamiento.

El aumento en el enraizamiento y crecimiento de las miniestacas de *Eucalyptus* se debería a la presencia de uno o más mecanismos en las bacterias como la solubilización de fosfatos, la producción de sustancias que pueden inhibir el crecimiento de patógenos (enzimas líticas, antibióticos, sideróforos) y de compuestos que estimulan directamente a la planta como fitohormonas y enzimas moduladoras.

La mayoría de las bacterias con efecto en la promoción del enraizamiento fueron identificadas como *Bacillus* y *Pseudomonas*, describiéndose en esta investigación la presencia de *Mucilaginibacter* y *Rhodococcus*, siendo este el primer antecedente de especies de estos géneros promoviendo el enraizamiento en *Eucalyptus* spp.

Bacterias endófitas también promovieron el crecimiento y el enraizamiento de *Eucalyptus* sp, con la presencia de algunos mecanismos, no obstante, deberían evaluarse con más ensayos de vivero para comprobar su efecto, evaluarse mecanismos de promoción adicionales y realizarse la completa caracterización molecular de la comunidad para un análisis acabado de su efecto sobre las plantas.

Se constató que el aumento en el crecimiento y/o enraizamiento de *Eucalyptus* spp fue en aquel órgano (raíz, parte aérea) de cual fue obtenido el aislado, mostrando la especificidad de las bacterias endófitas con su órgano aislamiento.

Los resultados obtenidos de esta investigación pueden ser utilizados como base para posteriores análisis microbiológicos y moleculares a los aislados y potencialmente convertirse en los componentes de un biofertilizante comerciable.



REFERENCIAS

- Adesemoye AO, Torbert HA, Kloepper, JW. (2009) Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microbial Ecology*, 58: 921-929.
- Ahmed E, Holmstrom S. (2014) Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microbial Biotechnology* 7:196-208.
- Ali S, Charles T, Glick B. (2014) Amelioration of high salinity stress damage by plant growth-promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase. *Plant Physiology and Biochemistry* 80:160-167.
- Angulo V, Sanfuentes E, Rodríguez F, Sossa K. (2014) Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*. *Revista Argentina de Microbiología* 46:338-347.
- Arnold R, Carmona J, Balocchi C. (1991) Programa de propagación clonal para *Eucalyptus globulus* en Chile. *Bosque* 12: 3-9.
- Armada E, Probanza A, Roldan A, R Azcón. (2016) Native plant growth promoting bacteria *Bacillus thuringiensis* and mixed or individual mycorrhizal species improved drought tolerance and oxidative metabolism in *Lavandula dentata* plant. *Journal of Plant Physiology* 192:1-12.
- Arshad M, Frankenberger W. (1998) Plant growth-regulating substances in the rhizosphere: microbial production and functions. *Plant Growth-Regulating Substances in the Rhizosphere: Microbial production and functions. Advances in Agronomy* 62: 45-151.
- Assis T, Fet-Netto A, Alfenas A. (2004) Current techniques and prospects for the clonal propagation of hardwoods with emphasis on *Eucalyptus*. *Plantation Forest Biotechnology for the 21st Century. Research Signpost, Trivandrum, India*, 303-333.

- Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM. (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review Plant Biology* 57:233-66.
- Bastián F, Cohen A, Piccoli P, Luna V, Bottini R, Baraldi R, Bottini R. (1998) Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regulation* 24: 7-11.
- Barazani OZ, Friendman J. (1999) Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria? *Journal of Chemical Ecology* 25: 2397-2406.
- Bottini R, Cassan F, Piccoli P. (2004) Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65: 497-503.
- Bellamine J, Penel C, Greppin H, Gaspat T. (1998) Confirmation of the role of auxin and calcium in the late phases of adventitious root formation. *Plant Growth Regulation* 26: 191-194.
- Benizri E. (2001) Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. *Biocontrol Science and Technology* 11: 557-574.
- Beneduzi A, Ambrosini A, Passaglia L. (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology* 35:1044-1051.
- Bottini R, Cassan F, Piccoli P. (2004) Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Applied Microbiology and Biotechnol* 65: 497-503.
- Brondani G, Benedini F, De Wit Ondas H. (2012) Low temperature, IBA concentrations and optimal time for adventitious rooting of *Eucalyptus benthamii* mini-cuttings. *Journal of Forestry Research* 23: 583-592.
- Brunetta J. (2010) Isolation and selection of *Pinus taeda* growth promoting rhizobacteria. *Árvore* 34: 399-406.

- Chanway C. (1997) Inoculation of tree roots with plant growth promoting soil bacteria: An Emerging Technology for Reforestation. *Forest Science* 43: 99-112.
- Compant S, Clément C, Sessitsch A. (2010) Plant growth-promoting bacteria in the rhizo and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry* 42: 669-678.
- Cohen A, Bottini R, Piccoli PN. (2008) *Azospirillum brasilense* Sp 245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in *Arabidopsis* plants. *Plant Growth Regulation* 54:97-103.
- Conn V, Walker A & Franco M. (2008) Endophytic Actinobacteria Induce Defense Pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(2), 208-218.
- CORMA Información de aporte al PIB industria forestal <https://www.corma.cl/bosques-y-madera/> accesado 29 de julio 2020.
- Choudhary D, & Johri B. (2009) Interactions of *Bacillus* spp. and plants—with special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiological research*, 164:493-513.
- Coy R, Held D, Kloepper J. (2019) Rhizobacterial colonization of bermudagrass by *Bacillus* spp. in a Marvyn loamy sand soil. *Applied Soil Ecology* 141 (2019) 10-17.
- Dastager S, Deepa C, Pandey A. (2010) Isolation and characterization of novel plant growth promoting *Micrococcus* sp NII-0909 and its interaction with cowpea. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 987-992.
- De Klerk G, van der Krieken W, de Jong JC. (1999) Review: The Formation of Adventitious Roots: New Concepts, New Possibilities. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 35:189-1999.
- Díaz K, Valiente C, Martínez M, Castillo M, Sanfuentes E. (2009) Root-promoting rhizobacteria in *Eucalyptus globulus* cuttings. *World Journal of Microbiol Biotechnology* 25:867-873.

- Dutta S y Podile A. (2010) Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): the bugs to debug the root zone. *Critical Reviews in Microbiology* 36: 232–244
- Egorshina A, Khairullin RM, Sakhabutdinova AR, Luk'yantsev MA. (2012) Involvement of phytohormones in the development of interaction between wheat seedlings and endophytic *Bacillus subtilis* Strain 11BM. *Russian Journal of Plant Physiology* 59:134-140.
- Eldor P. (2014) *Soil microbiology, ecology and biochemistry*. Academic press.
- Ercisli Y, Haznedar A, Cakmakci R. (2010) Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on rooting and root growth of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) stem cuttings. *Biological Research* 43: 91-98.
- Fatima S & Anjum T. (2017) Identification of a Potential ISR Determinant from *Pseudomonas aeruginosa* PM12 against *Fusarium* Wilt in Tomato. *Frontiers in Plant Science* 8:848
- Fogaca C, Fett-Neto A. (2005) Role of auxin and its modulators in the adventitious rooting of *Eucalyptus* species differing in recalcitrance. *Plant Growth Regulation* 45: 1-10.
- Forchetti G. (2007) Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. *Applied Microbiology and Biotechnology* 76:1145-1152.
- Galland M, Gamet L, Varoquaux F, Touraine B, Touraine B, Desbrosses G. (2012) The ethylene pathway contributes to root hair elongation induced by the beneficial bacteria *Phyllobacterium brassicacearum* STM196. *Plant Science* 190: 74-81.
- García de Salamone I, Hynes RK, Nelson LM. (2001) Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Canadian Journal of Microbiology* 47: 404-411.
- Glick B. (2012) *Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications*. Scientica 2012: 1-15.
- Gomes F, Canhoto J. (2003) Micropropagation of *Eucalyptus nitens* maiden (shining gum). *In Vitro Cellular & Developmental Biology- Plant* 39:316-321.

- Goswami D, Thakker J, Dhandhukia P. (2016) Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food & Agriculture* 2: 1-19.
- González-Díaz A, Ojeda M, Hernández M, Córdova Y, Díaz L, López J, Álvarez J. (2019) Effect of biofertilizers application on the growth of *Eucalyptus grandis* seedlings under greenhouse conditions. *Journal of Plant Nutrition*, 42: 2560-2576.
- Gray E, Smith D. (2005) Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biology Biochemistry* 37: 395-412.
- Gutiérrez-Mañero FJ, Ramos-Solano B, Probanza A, Mehouchi JR, Tadeo F, Talon M. (2001) The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiologia Plantarum* 111: 206-211.
- Gupta G, Parihar S, Ahirwar N, Snehi S, Singh V. (2015) Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. *Journal Microbial & Biochemical Technology* 7: 96-102.
- Gyaneshwar P, Naresh Kumar G, Parekh LJ, Poole PS. (2002) Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant Soil* 245:83-93.
- Harrand L, Schenone R. (2002) Obtención de individuos híbridos de *Eucalyptus* a través de la realización de cruzamientos controlados. *Actas XVII Jornadas Forestales de Entre Ríos. Concordia 2002*. 10p. En CD. ISSN1667-9253.
- INFOR, estadísticas forestales, https://wef.infor.cl/sector_forestal/sectorforestal.php accesado 08 de julio 2021.
- Ipinza R, Barros S, Gutiérrez B, Borralho N. (2014) Mejoramiento Genético de *Eucalyptus* en Chile. *INFOR – FIA* 488 p.
- Joo GJ, Kang SM, Hamayun M, Kim SK, Na CI, Shin DH, Lee IJ. (2009) *Burkholderia* sp. KCTC 11096BP as a newly isolated gibberellin producing bacterium. *The Journal of Microbiology* 47: 167-171.
- Kapoor M & Sharma V. (1983) Studies on the effect of hybridization between *Eucalyptus citriodora* and *Eucalyptus torelliana*. *Indian Forester* 109:891-900.

- Karadeniz A, Topcuoğlu ŞF, Inan S. (2006) Auxin, gibberellin, cytokinin and abscisic acid production in some bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 22:1061-1064.
- Karlıdag H, Esitken A, Turan M, Şahin F. (2007) Effects of root inoculation of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient element contents of leaves of apple. *Scientia Horticulturae* 114:16-20.
- Karthikeyan A, Sakthivel KM. (2011) Efficacy of *Azotobacter chroococcum* in rooting and growth of *Eucalyptus camaldulensis* stem cuttings. *Research Journal Microbiology* 6: 618-624.
- Khan A, Jilani G, Akhtar MS, Naqvi SS, Rasheed M. (2009) Phosphorus solubilizing bacteria: Occurrence, mechanisms and their role in crop production. *Journal of Agriculture and Biological Science* 1:48-58.
- Kawaguchi M, Syōno K. (1996) The excessive production of indole-3-acetic acid and its significance in studies of the biosynthesis of this regulator of plant growth and development. *Plant and cell physiology* 37:1043-1048.
- Kevers C, Hausman JF, Faivre-Rampant O, Evers D, Gaspar T. (1997) Hormonal control of adventitious rooting: progress and questions. *Journal of Applied Botany* 71:71-79.
- Li S, Xue L, Xu S, Feng H, An L. (2009) Mediators, Genes and Signaling in Adventitious Rooting. *Bot. Rev.* (2009) 75:230-247 DOI 10.1007/s12229-009-9029-9
- Loper J, Schroth M. (1986) Influence of bacterial sources of indole-3-acetic acid on root elongation of sugar beet. *Phytopathology* 76:386-389.
- Madhaiyan M, Poonguzhali S, Lee J. S, Senthilkumar M, Lee C, Sundaram S. (2010) *Mucilaginibacter gossypii* sp. nov. and *Mucilaginibacter gossypicola* sp. nov., plant-growth-promoting bacteria isolated from cotton rhizosphere soils. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60:2451-2457.

- Mafia RG, Alfenas AC, Maffia LA, Ferreira EM, Siqueira LD. (2007a) Effect of rhizobacteria on rooting and growth of *Eucalyptus* clones under different conditions of clonal propagation. *Árvore* 31: 813-821.
- Mafia RG, Alfenas AC, Maffia LA, Ferreira EM, Binoti DHB, Mafia GMV, Munteer AH. (2007b) Root colonization and interaction among growth promoting rhizobacteria isolates and *Eucalypts* species. *Árvore* 33: 1-9.
- Mafia R, Alfenas AC, Ferreira EM, Zarpelon TG, Siqueira LD. (2005) Crescimento de mudas e produtividade de minijardins clonais de eucalipto tratados com rizobacterias selecionadas. *Árvore* 29: 843-851.
- Maksimov I, Abizgil`dina R, Pusenkova L. (2011) Plant Growth Promoting Rhizobacteria as Alternative to Chemical Crop Protectors from Pathogens (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology* 47: 333-345.
- Medina A, Schmidt E, Navarrete R, Rothen B, Labra M, Velilla, E. (2015) Antecedentes de desarrollo y potencial productivo de variedades híbridas entre *Eucalyptus nitens* y *Eucalyptus globulus* en Chile. Experiencia CMPC.
- Merzaeva O, Shirokikh I. (2010) The production of auxins by the endophytic bacteria of Winter Rye. *Applied Biochemistry and Microbiology* 46: 44-50.
- Mehmood U, Inam-ul-Haq M, Saeed M, Altaf A, Azam F. (2018) A brief review on plant growth promoting rhizobacteria (pgpr): a key role in plant growth promotion. *Plant Protection* 02: 77-82.
- Miransari M. (2011) Soil microbes and plant fertilization. *Applied Microbiology and Biotechnology* 92:875-885.
- Noda A, Alvarez P, Junco L, Garcia M, Sotolongo R. (2000) Propagación clonal in vitro de *Eucalyptus pellita*, F. Muell. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 6:29-33.
- Noreen S. (2012) Growth promotion of *Vigna mungo* (L.) by *Pseudomonas* spp. Exhibiting auxin production and ACC-deaminase activity. *Annals of Microbiology* 62: 411-417.

- Orme RK, Banham PV, Allison K, Russell S. (1993) Cold caustic soda pulps from young plantation of *Eucalyptus nitens* and *E. globulus*. *Appita* 46:119-122.
- Orozco C, Martínez P. (2009) Evaluación de la inoculación con microorganismos fijadores de nitrógeno asimbióticos aislados de la rizósfera de *Pinus patula* en Colombia. *Bosque* 30: 70-77.
- Ortíz R, Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L, López-Bucio J. (2009) The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signaling & Behavior* 4: 701-712.
- Pacurar D, Perrone I, Bellini C. (2014). Auxin is a central player in the hormone cross-talks that control adventitious rooting. *Physiologia plantarum* 151:83-96.
- Patten CL, Click BR. (1996) Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology* 42: 207-220.
- Penrose D, Glick R. (2003) Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia Plantarum* 118: 10-15.
- Persello-Cartieaux F, Nussaume L, Robaglia C. (2003) Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant, Cell & Environment* 26: 189-199.
- Ping L, Boland W. (2004) Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* 9: 263-266.
- Prashar P, Kapoor N, Sachdeva S. (2014) Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 13:63-77.
- Probanza A, Lucas García JA, Ruiz Palomino M, Ramos B, Gutiérrez M. (2002) *Pinus pinea* L. seedling growth and bacterial rhizosphere structure after inoculation with PGPR *Bacillus* (*B. licheniformis* CECT 5106 and *B. pumilus* CECT 5105). *Applied Soil Ecology* 20:75-84.
- Puente M, Garcia J, Pathauer P, Peticari A. (2010) Inoculation with *Azospirillum brasilense* Is a Useful Tool in *Eucalyptus globulus* Management *America-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Science* 2:124-130.

- Ragonezi C, Klimaszevska K, Castro MR, Lima M, de Oliveira P, Zavattieri MA. (2010) Adventitious rooting of conifers: influence of physical and chemical factors. *Trees* 24:975-992.
- Qaisrani M, Mirza M, Zaheer A, Malik K. (2014) Isolation and identification by 16s rna sequence analysis of *Achromobacter*, *Azospirillum* and *Rhodococcus* strains from the rhizosphere of maize and screening for the beneficial effect on plant growth. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 51(1).
- Romeiro R, Vieira Junior JR, Silva HSA, Baracat-Pereira MC, Carvalho MG. (2005) Macromolecules released by a plant growth-promoting rhizobacterium as elicitors of systemic resistance in tomato to bacterial and fungal pathogens. *Journal of Phytopathology* 153: 120-123.
- Ruzicka K, Ljung K, Vanneste S, Podhorská R, Beeckman T, Friml J, Benková E. (2007) Ethylene regulates root growth through effects on auxin biosynthesis and transport-dependent auxin distribution. *The Plant Cell* 19: 2197-2212.
- Ryan R, Germaine K, Franks A, Ryan DJ, Dowling DN. (2008) Minireview. Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiol Letters* 278: 1-9.
- Santoyo G, Moreno G, Orozco M, Glick B. (2016) Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research* 183: 92-99.
- Sartori C, Mota G, Miranda I, Mori F, Pereira H. (2018) Tannin Extraction and Characterization of Polar Extracts from the Barks of two *Eucalyptus urophylla* Hybrids. *BioResources* 13: 4820-4831.
- Schwambach J, Fadanelli C, Fett-Neto AG. (2005) Mineral nutrition and adventitious rooting in microcuttings of *Eucalyptus globulus*. *Tree Physiology* 25: 487-494.
- Serdyuk O, Smolygina LD, Muzafarov EN, Adanin VM, Arinbasarov MU. (1995) 4-Hydroxyphenethyl alcohol a new cytokinin-like substance from the phototrophic purple bacterium *Rhodospirillum rubrum* 1R. *FEBS Letters* 365:10-12.
- Shanmugam V, Atri K, Gupta S, Kanoujia N, Naruka DS. (2011) Selection and differentiation of *Bacillus* spp. antagonistic to *Fusarium oxysporum* f. sp.

lycopersici and *Alternaria solani* infecting Tomato. *Folia Microbiologica* 56:170-177.

Siddiqui Z. A. (2005). PGPR: prospective biocontrol agents of plant pathogens. In *PGPR: biocontrol and biofertilization* (pp. 111-142). Springer, Dordrecht.

Sotelo M, Monza J. (2007) Micropropagation of *Eucalyptus maidenii* elite trees. *Agrociencia* 11: 81-89.

Taiz L, Zeiger E. (2010) *Auxin: The Growth Hormone*. Plant Physiology 3rd ed Sunderland: Sinauer Associates . p 423-460.

Teixeira D, Alfenas AC, Mafia RG, Ferreira EM, Siqueira LD, Maffia LA, Mounteer AH. (2007) Rhizobacterial promotion of *Eucalyptus* rooting and growth. *Brazilian Journal of Microbiology* 38:118-123.

Titon M, Xavier A, Otoni WC. (2006) Clonal propagation of *Eucalyptus grandis* using the mini-cutting and micro-cutting techniques. *Scientia Forestalis* 71: 109-117.

Trueman S, McMahon T, Bristow M. (2013) Production of cuttings in response to stock plant temperature in the subtropical eucalypts, *Corymbia citriodora* and *Eucalyptus dunnii*. *New Forests* 44:265-279

Tsavkelova EA, Klimova SY, Cherdyntseva TA, Netrusov AI. (2005) Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology* 74: 55-62.

Veloccia A, Fattorini L, Della Rivere F, Soto A, D`Angeli S, Betti C, Falasca G, Altamura M.M. (2016) Ethylene and auxin interaction in the control of adventitious rooting in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 22: 6445-6458.

Vessey JK. (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255: 571-586.

Volker PW, Owen JV, Borralho NMG. (1994) Genetic variances and covariances for frost tolerance in *Eucalyptus globulus* and *E. nitens*. *Silvae Genetica* 43: 366-372.

- Wensing A, Braun SD, Büttner P, Expert D, Völksch B, Ullrich MS, Weingart H. (2010) Impact of siderophore production by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 22d/93 on epiphytic fitness and biocontrol activity against *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* 1a/96. *Applied and Environmental Microbiology* 9: 2704-2711.
- Xavier A, Comério J, Iannelli CM. (1997) Eficiência da microestaquia e da micropropagação na clonagem de *Eucalyptus* spp. In: IUFRO Conference on Silviculture and Improvement of Eucalyptus. Proceedings Colombo: EMBRAPA, 1997. v. 2. p. 40-45.
- Yadav S, David A, Bhatla S. (2010) Nitric oxide modulates specific steps of auxin-induced adventitious rooting in sunflower. *Plant Signaling & Behavior* 5:1163-1166.
- Yasuda M, Isawa T, Shinozaki S, Minamisawa K, Nakashita H. (2009) Effects of colonization of a bacterial endophyte, *Azospirillum* sp. B510 on Disease resistance in rice. *Bioscience Biotechnology, and Biochemistry* 73:2559-2599.
- Yi H, Yang J, Ryu C. (2013). ISR meets SAR outside: additive action of the endophyte *Bacillus pumilus* INR7 and the chemical inducer, benzothiadiazole, on induced resistance against bacterial spot in field-grown pepper. *Frontiers in plant science*, vol 4 p122.
- Zaidi A, Khan MS, Ahemad M, Oves M. (2009) Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 56: 263-284.
- Zobel BJ. (1993) In: Ahuja MR, Libby WJ (eds) *Clonal Forestry II, Conservation and Application*, Springer-Verlag, Berlin, pp 139-148.