

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO  
VEGETAL (PGPR) PARA LA INOCULACIÓN DE PLANTINES DE AVELLANO  
CHILENO (*GEVUINA AVELLANA* MOL.) MICROPROPAGADOS**

**POR**

**CONSTANZA ARACELY ZAPATA GUTIÉRREZ**

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

**CHILLÁN – CHILE  
2025**

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO  
VEGETAL (PGPR) PARA LA INOCULACIÓN DE PLANTINES DE AVELLANO  
CHILENO (*GEVUINA AVELLANA* MOL.) MICROPROPAGADOS**

**POR**

**CONSTANZA ARACELY ZAPATA GUTIÉRREZ**

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

**CHILLÁN – CHILE  
2025**

Aprobada por:

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

---

Guía

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

---

Asesor

Profesor Asistente. Miguel Garriga C.  
Lic. Biología, M. Sc. Dr.

---

Asesor

Profesor Asociado, Guillermo Wells M.  
Ing. Agrónomo, M. Sc.

---

Decano

## RECONOCIMIENTO

Esta investigación fue financiada por empresas CMPC S.A. a través del fondo de financiamiento a tesis de pregrado

**TABLA DE CONTENIDOS**

	<b>Página</b>
Resumen .....	1
Summary.....	2
Introducción .....	2
Materiales y métodos .....	6
Resultados y discusión .....	10
Conclusiones .....	18
Referencias .....	18

**INDICE DE FIGURAS Y TABLAS**

	<b>Página</b>
Figura 1 Sistema radical de plantines de avellano chileno, inoculado con cepas bacterianas <i>Mesorhizobium</i> sp. AG-275, <i>Pseudomonas koreensis</i> AG-97 y control.....	13
Figura 2 Altura de plantas desde el tallo hasta el ápice del eje central, durante el periodo de aclimatación .....	14
Figura 3 Supervivencia de plantas de avellano chileno inoculadas con PGPR. ....	15
Figura 4 Acumulación de materia seca de raíces y parte aérea de plantas de avellano chileno, con diferentes tratamientos de inoculación .....	17
Tabla 1 Caracterización de PGPR utilizadas en la inoculación de avellano chileno.....	10
Tabla 2 Efecto de inoculación con bacterias rizosféricas en parámetros de crecimiento en avellano chileno.....	12
Tabla 3 Peso seco de plantas de avellano chileno.....	16

## **CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL (PGPR) PARA LA INOCULACIÓN DE PLANTINES DE AVELLANO CHILENO (*GEVUINA AVELLANA* MOL.) MICROPROPAGADOS**

CHARACTERIZATION OF PLANT GROWTH PROMOTING BACTERIA (PGPR) FOR INOCULATION OF MICROPROPAGATED CHILEAN HAZEL (*GEVUINA AVELLANA* MOL.) SEEDLINGS

**Palabras índice adicionales:** *Pseudomonas koreensis*, *Mesorhizobium* sp, ácido indolacético (AIA), enzima ACC-desaminasa, fijación biológica de nitrógeno.

### **RESUMEN**

Bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) han demostrado su capacidad de promover crecimiento vegetal y desarrollo de raíces en plantas. El cultivo *in vitro* permite la producción masiva de plantas en un corto plazo, sin embargo, la aclimatación *ex vitro* es un proceso complejo en el que, usualmente, gran cantidad de plántulas no logran sobrevivir. El objetivo de esta investigación fue caracterizar la bacteria simbiote de leguminosas *Mesorhizobium* sp. AG-275 y evaluar el efecto de la inoculación con PGPR en plantines de avellano chileno micropropagados, previo enraizamiento *in vitro*. Se evaluó la habilidad de dos cepas bacterianas: AG-275 y AG-97 de producir ácido indolacético (AIA), ACC desaminasa, de fijar nitrógeno y de solubilizar fósforo. Los resultados *in vitro* mostraron que ambas cepas son capaces de fijar nitrógeno en vida libre y producir ácido indolacético, auxina que regula crecimiento. En plantas de avellano chileno se observó una mayor presencia de pelos radicales con la inoculación AG-275, sin embargo, esto no se tradujo en diferencias en crecimiento ni sobrevivencia de las plantas inoculadas con respecto a plantas control. La producción de compuestos indica que *Mesorhizobium* sp. AG-275, además de ser simbiote de leguminosas, podría promover crecimiento en plantas no leguminosas.

### **SUMMARY**

Plant growth promoting bacteria (PGPR) have demonstrated their ability to promote plant growth and plant root development. *In vitro* cultivation allows massive plant production in the short term. However, the transition to *ex vitro* is a complex process in which many seedlings fail to survive. The objective of this research was to characterize the legume symbiont bacteria *Mesorhizobium* sp. AG-275 and evaluate the effect of inoculation with PGPR on micropropagated seedlings of the Chilean hazelnut species, after *in vitro* rooting. The ability of two bacterial strains, AG-275 and AG-97, to produce indole acetic acid (IAA), the enzyme ACC deaminase, to fix nitrogen and to solubilize phosphorus was evaluated. The *in vitro* results showed that both strains are capable of fixing nitrogen in free life and producing indoleacetic acid, an auxin that regulates growth. In Chilean hazelnut plants, a greater presence of root hairs will be observed with AG-275 inoculation; however, this did not translate into differences in growth or survival of the inoculated plants with respect to control plants. The production of compounds indicates that *Mesorhizobium* sp. AG-275, besides being a legume symbiont, could promote growth in non-legume plants.

## INTRODUCCIÓN

La rizosfera corresponde a la porción de suelo que se encuentra adherida a la raíz donde ocurre una gran actividad microbiana y una comunicación dinámica entre las raíces de las plantas y los microorganismos (Esquivel *et al.*, 2013). Las rizobacterias son bacterias que habitan la rizosfera. Cuando son benéficas para las plantas se les denomina rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, PGPR (por sus siglas en inglés; *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) (Velasco *et al.*, 2020). Las PGPR pueden aportar a la fertilidad del suelo y nutrición de la planta, mejorando la disponibilidad de nutrientes, así como promoviendo el crecimiento y desarrollo de las raíces (Hernández y Escalona, 2003), lo que ha llevado a que diversas especies hayan sido utilizadas como inoculantes bacterianos, principalmente para mejorar la producción y rendimiento de cultivos agrícolas (Esquivel *et al.*, 2013).

Los mecanismos por los cuales las PGPR promueven el crecimiento vegetal pueden categorizarse como directos e indirectos. Los mecanismos directos permiten aumentar la disponibilidad de nutrientes presentes en la rizosfera y, por

tanto, mejorar la nutrición de las plantas; o pueden producir compuestos enzimáticos y hormonales que estimulen el crecimiento de éstas (Esquivel *et al.*, 2013). Los mecanismos indirectos, como producción de antibióticos, sideróforos, enzimas líticas y otros metabolitos antimicrobianos, benefician a las plantas al disminuir las poblaciones de microorganismos fitopatógenos (Esquivel *et al.*, 2013).

La disponibilidad de nutrientes puede aumentar a través de la fijación de nitrógeno, solubilización de fósforo inorgánico, mineralización de fosfato orgánico, oxidación de sulfuros, reducción de la toxicidad por metales pesados, entre otros (Esquivel *et al.*, 2013). Los ácidos orgánicos producidos por los microorganismos rizosféricos incrementan la disponibilidad de nutrientes como fósforo, hierro, zinc y manganeso en el suelo, al disminuir el pH en la rizosfera o por la quelación de estos micronutrientes (Hernández *et al.*, 2017). Algunas cepas pueden producir sideróforos, biomoléculas que actúan como agentes quelantes específicos de hierro facilitando su absorción por la planta. Este elemento es de vital importancia en la planta para la realización de procesos como síntesis de ADN, respiración, fotosíntesis y fijación biológica de nitrógeno (FBN) (Hernández *et al.*, 2015).

Por otro lado, las PGPR pueden estimular el crecimiento directamente a través de la síntesis de fitohormonas (auxinas, giberelinas, citoquininas), vitaminas y enzimas, como la 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC) desaminasa, que tiene la capacidad de disminuir la concentración de etileno, fitohormona que es producida por las plantas ante condiciones de estrés (Esquivel *et al.*, 2013). En particular, el ácido 3-indolacético (AIA), es una auxina que regula crecimiento en plantas, mediante la activación de respuestas a nivel celular, regula la formación de raíces laterales y pelos radicales, por lo tanto, aumenta el acceso a los nutrientes del suelo y la absorción de agua (Duca y Glick, 2020; Hernández *et al.*, 2015).

Dentro del grupo de bacterias promotoras del crecimiento vegetal se encuentran también los rizobios, microorganismos que se asocian simbióticamente con plantas de la familia *Fabaceae* y que se alojan en las raíces en estructuras especializadas denominadas nódulos (Ledermann *et al.*, 2021; Hernández *et al.*, 2015). Los rizobios se caracterizan por realizar la FBN mediante una reacción catalizada por el complejo nitrogenasa, donde se reduce el nitrógeno en forma gaseosa para dejarlo disponible

en forma de amonio para la planta (Hernández *et al.*, 2015). Sin embargo, se ha reportado que hay rizobios capaces de promover crecimiento en plantas no leguminosas a través de la producción de sideróforos, fitohormonas como AIA o a través de la solubilización de fosfatos y de la producción de la enzima ACC-desaminasa (Hernández *et al.*, 2017; Hernández *et al.*, 2015) y/o de controlar hongos fitopatógenos al suprimir el crecimiento saprofito de estos o mediante la producción de compuestos antifúngicos o antibacterianos (Santillana *et al.*, 2012).

*Gevuina avellana* Mol. se conoce como “Gevuin” o “Avellano Chileno”, es una especie monotípica, nativa de Chile, perteneciente a la familia *Proteaceae* (Grinbergs *et al.*, 1986). Geográficamente se encuentra distribuido entre la región de La Araucanía, Los Ríos y Los Lagos (Jil y Martínez Lagos, 2017). En su área de distribución, se encuentra asociado principalmente a las especies fagáceas como roble (*Nothofagus obliqua*) y raulí (*Nothofagus alpina*) (Donoso, 1978). Es una especie del sotobosque que en su medio natural puede alcanzar alturas de 3 a 18 m (Fierro *et al.*, 1998).

Al igual que otras especies de proteáceas, las plantas de avellano chileno desarrollan raíces proteiformes o conglomerados de raíces, con abundantes pelos radicales dispuestos en torno a un eje, cuya funcionalidad se relaciona con el aumento de la capacidad de absorción de agua y nutrientes lo que permite una alta capacidad para aglomerar suelo. Sin embargo, las raíces proteiformes de esta especie no se desarrollan en suelos esterilizados, lo que indica el rol que cumplen los microorganismos edáficos en su formación (Loewe *et al.*, 1997). Estas raíces proteiformes están asociadas a la eficiente movilización de nutrientes del suelo, principalmente fósforo, a través de la liberación de exudados, tales como carboxilatos, los cuales son los principales exudados de las raíces y los responsables de la adquisición de nutrientes y la movilización de metales pesados desde la rizósfera (Saldivia, 2021).

El avellano chileno es una especie frutal nativa con gran relevancia ecológica, cultural y económica. Posee valor nutricional y comercial de su fruto, comúnmente conocido como avellana, rico en grasas saludables, antioxidantes, proteínas y minerales, del cual se pueden obtener productos como harina y avellanas tostadas

para consumo directo, además de subproductos para la industria cosmética, debido a sus propiedades hidratantes y antioxidantes (Jil y Martínez, 2017). Es una especie altamente adaptable a diversas condiciones climáticas y suelos, resistente a sequías, lo hace una especie ideal para la reforestación y conservación de ecosistemas nativos (Pohl, 2020). Su importancia cultural radica en que ha sido utilizado tradicionalmente por comunidades indígenas como alimento y su madera para revestimientos y artesanías (Jil y Martínez, 2017). Aunque su cultivo aún es limitado, se considera una especie con gran potencial económico para la diversificación agrícola en Chile.

*Gevuina avellana* puede reproducirse por semillas, lo cual es un proceso lento, irregular, poco eficiente y hace difícil la obtención de grandes cantidades de plántulas que formen una población homogénea en cuanto a edad y tamaño (Grinbergs *et al.*, 1986). La micropropagación *in vitro* es un método eficiente que permite una alta tasa de multiplicación en un tiempo reducido, se puede efectuar en cualquier época del año y se obtienen plantas con características homogéneas y, en la mayoría de los casos, libres de patógenos (Sánchez *et al.*, 2004). La micropropagación ha sido utilizada con éxito en diferentes especies leñosas (Chandra *et al.*, 2010; Durkovic, 2006; Damiano *et al.*, 2005), siendo la baja supervivencia de las microplantas al pasar a condiciones *ex vitro*, uno de los factores limitantes (Álvarez *et al.*, 2012; Chandra *et al.*, 2010). La etapa de aclimatación es la fase más compleja en el proceso donde existe gran porcentaje de mortalidad de plántulas, ya que estas presentan hipersensibilidad a la demanda evaporativa, producto de provenir de un ambiente *in vitro* con máxima humedad relativa (Tomayo, 2014; Chandra *et al.*, 2010). En pruebas preliminares de micropropagación de avellano chileno, se ha observado mayor crecimiento de raíces y mayor sobrevivencia de plantas al ser inoculadas con bacterias rizosféricas del género *Mesorhizobium*, bacteria simbiote del árbol de la familia de las leguminosas *Sophora toromiro*, sin embargo, se desconocen los mecanismos que esta bacteria pudiese utilizar para promover crecimiento en especies no leguminosas. Los objetivos de esta tesis fueron caracterizar la cepa de *Mesorhizobium* sp. AG-275 en cuanto a producción de ácido indolacético, ACC-

deaminasa, fijación de nitrógeno y solubilización de fósforo, y comparar el efecto de cepas bacterianas promotoras de crecimiento en el desarrollo y sobrevivencia de *Gevuina avellana* durante la fase de aclimatación *ex vitro*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Los ensayos de caracterización de bacterias se realizaron en el Laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Concepción, sede Chillán, región de Ñuble. Los ensayos en plantas micropropagadas se realizaron en el laboratorio BioVitro ubicado en Concepción, región del Biobío y en vivero Carlos Douglas de empresa CMPC ubicado en Yumbel, región del Biobío (-37.1350672, -72.4698265).

### **Material vegetal**

Se utilizaron brotes de la especie *Gevuina avellana* previamente enraizadas *in vitro* durante un mes en biorreactor de inmersión temporal en un medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), con concentración hormonal 1,000 mg L<sup>-1</sup> de ácido indolbutírico (AIB).

### **Material bacteriano**

Las cepas *Mesorhizobium* sp. AG-275, *Pseudomonas koreensis* AG-97 fueron obtenidas desde la colección de microorganismos del laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción.

Las cepas bacterianas, que se encontraban criopreservadas a -80 °C en un ultrafreezer, fueron reactivadas en cámara de flujo laminar utilizando un asa bacteriológica que fue esterilizada en mechero de Bunsen e inmediatamente introducida en los critotubos congelados para obtener células de ambas cepas. La cepa AG-275 fue inoculada en placas Petri con medio de cultivo YMA (del inglés Yeast Mannitol Agar) y AG-97 en Agar nutritivo estándar. Las placas inoculadas se depositaron en una incubadora a 25 ± 3 °C por 72 horas en oscuridad. Una vez desarrolladas las colonias, se preparó una suspensión de células en solución salina y se ajustó la densidad óptica a 600 nm (DO<sub>600nm</sub>) a 0,1, que es equivalente a 10<sup>7</sup> unidades formadoras de colonia (UFC) por mL<sup>-1</sup>.

### **Caracterización *in vitro* de *Mesorhizobium* sp. AG-275**

### **Evaluación de la producción de ácido indolacético**

Se inoculó 3 mL de caldo YMB con 100  $\mu$ L de la suspensión de células y se incubaron en agitación por 72 horas a 25 °C y 150 rpm. Se traspasó 1 mL del cultivo a un tubo Eppendorf y se centrifugó en una microcentrífuga (HILAB) 3 min a 5.000 rpm. Se extrajo 120  $\mu$ L de sobrenadante y se depositaron en cada uno de los pocillos de una microplaca (placa de microtitulación). Se les agregó 80  $\mu$ L de reactivo de Salkowski (0,5 M de  $\text{FeCl}_3$ ; 35 % ácido perclórico) a cada pocillo. Se utilizó como blanco la mezcla de 120  $\mu$ L de caldo de cultivo YMB y 80  $\mu$ L de reactivo Salkowski.

Las microplacas inoculadas fueron mantenidas por 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente y se midió la absorbancia en espectrofotómetro (Optizen) a 535 nm. Se construyó una curva de calibración con distintas concentraciones de AIA para interpolar los datos de absorbancia obtenidos del sobrenadante y así se cuantificó la cantidad de AIA producido.

### **Evaluación de la producción de la enzima ACC-desaminasa**

Se depositaron 100  $\mu$ L de suspensión celular a una concentración de  $1 \times 10^7$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  en 3 mL de caldo nutritivo, dejando en agitación a 150 rpm por 72 horas a  $25 \pm 2$  °C. Posteriormente, se tomó 1 mL del cultivo, el que fue centrifugado a 8.000 g por 10 min, se extrajo el sobrenadante y se realizaron dos lavados con 1 mL de caldo Dworkin & Foster (DF), dejando en agitación en 1 mL de este mismo caldo. Transcurridas 24 horas, los tubos fueron nuevamente centrifugados y se extrajo 500  $\mu$ L, para concentrar la suspensión bacteriana.

Se depositaron 5  $\mu$ L de la cepa en 30 mL de agar DF, agar DF + ACC (sin fuente de nitrógeno) y agar DF +  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2 g (como fuente de nitrógeno). Se utilizaron como controles positivos dos cepas PGPR que poseen el gen *acds* (8R6 Wild Type (WT) y YsS6 WT) AG 29 y AG 30. Como control negativo las cepas mutantes (8R6 *acds* y YsS6 *acds*) AG 146 y AG 151, las cuales no poseen el gen. Se comparó el crecimiento de las colonias en medio básico DF y en medio DF con ACC con respecto al crecimiento de los controles positivos y negativos.

### **Evaluación de fijación de nitrógeno**

Para evaluar la capacidad de la cepa bacteriana de crecer en un medio sin nitrógeno

disponible, se depositaron microgotas de 5  $\mu\text{L}$  de suspensión celular a una concentración de  $1 \times 10^7$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ , sobre una placa de medio nutritivo Burk, con 4 repeticiones en la misma placa. Se utilizó solución salina (0,89 % NaCl) como control. Las placas se incubaron a  $25 \pm 3$  °C y transcurridas 72 horas se evaluó el crecimiento bacteriano.

### **Evaluación eficiencia de solubilización de fósforo**

Para evaluar la eficiencia de la cepa bacteriana en solubilizar fósforo, se depositaron microgotas de 5  $\mu\text{L}$  de suspensión celular a una concentración de  $1 \times 10^7$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  sobre una placa de agar Pikovskaya, con 4 repeticiones en la misma placa. Se utilizó solución salina (0,89 % Na Cl) como control. Las placas se incubaron a  $25 \pm 3$  °C y transcurridas 72 horas se evaluó crecimiento bacteriano y la formación de un halo translúcido alrededor de la colonia, que indica la solubilización del fosfato tricálcico.

### **Establecimiento del ensayo en planta**

Los plantines propagados mediante sistema inmersión temporal, una vez enraizados, fueron inoculados a través de inmersión durante 10 segundos en 100 mL de cada cepa bacteriana a una concentración de  $1 \times 10^7$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ , el control sin inoculación fue inmerso en solución de sacarosa 1 %, que corresponde al medio de suspensión de las bacterias. Luego fueron transferidos a tubetes forestales de tipo almacigueras de 87 cc, en sustrato de corteza de pino compostada con fertilizante de liberación controlada de nutrientes, con una formulación de 16 % Nitrógeno total (N), 8 % Fósforo ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ), 12 % Potasio ( $\text{K}_2\text{O}$ ), 2 % Magnesio (MgO), 12 % Azufre (S), 0,02% Boro (B), 0,05 % Cobre (Cu), 0,40 % Hierro (Fe), 0,06 % Manganeso (Mn), 0,015 % Molibdeno (Mo), 0,020% Zinc (Zn). Fertilizante recubierto con polímero que regula la liberación de nutrientes en función de humedad y temperatura del sustrato, durante un periodo de 5-6 meses. Se utilizó de 6 kilogramos de fertilizante por metro cúbico de sustrato. Además, se realizó una segunda inoculación con 1 ml al 0,1 ( $\text{DO}_{600\text{nm}}$ ) de cada inóculo, depositado directamente al sustrato. El control sin inoculación fue inmerso en solución de sacarosa 1 %.

Los tratamientos correspondieron a las cepas bacterianas *Mesorhizobium* sp.

AG-275, *Pseudomonas koreensis* AG-97 y un testigo sin inocular. El diseño experimental fue de bloques al azar con tres repeticiones por tratamiento. Cada unidad experimental correspondió a 8 plantas.

Las bandejas con tubetes se establecieron en un invernadero sistema fog, con ambiente semi controlado, que permite regular la humedad, mediante la evaporación de agua, lo que produce una niebla que se distribuye de forma uniforme y permite, además, reducir la temperatura a través de la humidificación.

Durante las primeras 3 semanas de aclimatación en el invernadero, se mantuvo la humedad relativa mayor al 80 % y PPF (Densidad de flujo de fotones fotosintéticos) entre 150 y 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . La temperatura ambiente promedio fue de 11,7 °C, fluctuando entre una mínima de 0,9 °C en la noche y máxima de hasta 27,4 °C en el día. De la semana 4 hasta la 8, la humedad relativa se disminuyó a un mínimo de 70 %, temperatura ambiente promedio fue de 6,9 °C, con mínimas de -1,6 °C en la noche y máxima de 11,8 °C en el día. Desde la semana 9 hasta la 11, estuvieron en invernadero forestal abierto, sin ambiente controlado, con riego de mantenimiento. Se utilizaron las condiciones que habitualmente se usan en vivero Carlos Douglas (CMPC), para la aclimatación de especies micropropagadas.

Durante el período de aclimatación de las plantas, cada 14 días se realizaron las siguientes mediciones no destructivas; altura de planta, desde el cuello hasta el ápice del eje central, y sobrevivencia, mediante registro de plantas muertas. Transcurridas 11 semanas mediante mediciones destructivas, se evaluó:

**Volumen radical:** utilizando una probeta de 10 mL, con una cantidad de agua conocida, se sumergieron las raíces previamente lavadas y se midió el volumen de raíces de acuerdo con el desplazamiento de agua.

**Área foliar:** se tomaron fotografías de las hojas, en ángulo 90° del lente respecto a las hojas, las imágenes se convirtieron a imágenes binarias, para así asociar el número de píxeles verdes a una longitud específica y determinar el área total de las hojas, mediante el programa Easy leaf área (Easlon y Bloom, 2014). Se tomó como referencia un cuadrado rojo de 1 cm<sup>2</sup>.

**Peso seco:** se secaron las plantas en estufa de aire forzado a 60 ° de temperatura (Binder FD150) durante 72 horas, hasta obtener peso constante, luego se pesaron

en una balanza (MRC modelo BPS-210-C2).

**Número de hojas:** se registró totalidad de hojas por planta.

**Altura de canopia:** se midió altura de plantas, desde el cuello de la planta hasta la hoja más alta.

### **Análisis estadístico**

Los datos de peso seco radical, área foliar, altura de canopia fueron sometidos a análisis de varianza ( $P \leq 0,05$ ) previa comprobación de los supuestos, mediante test de normalidad (Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianza (test de Levene).

Los datos de número de hojas, volumen radical y peso seco aéreo se sometieron a análisis de varianza no paramétrico, de Kruskal-Wallis. El software estadístico utilizado para los análisis fue Infostat (Di Rienzo, 2020).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Los datos de la caracterización *in vitro* de la cepa *Mesorhizobium* sp. AG-275 se presentan en la Tabla 1. Se determinó que AG-275 no produce la enzima ACC desaminasa al no formar colonia en el medio DF suplementado con ACC, donde si formaron colonias los controles positivos. Se determinó que AG-275 produce ácido indolacético (AIA) logrando generar  $7,672 \mu\text{g mL}^{-1}$ , además formó colonia en medio Burk, libre de nitrógeno, indicando que es capaz de fijar nitrógeno en vida libre, en decir sin estar necesariamente asociada a una planta.

Tabla 1. Caracterización de PGPR utilizadas en la inoculación de avellano chileno

Cepa	Producción de AIA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Producción de ACC	Solubilización de P	Fijación de Nitrógeno
<i>Mesorhizobium</i> sp. AG-275	7,672	NO	NO	SI
<i>Pseudomonas koreensis</i> AG-97	35,181*	NO*	NO*	SI*

\*Fuente: Sepúlveda, 2014.

La comparación de AG-275 con AG-97, la otra cepa bacteriana utilizada en esta

investigación (Tabla 1), muestra que ambas tienen atributos similares, sin embargo, *Pseudomonas koreensis* es capaz de producir una mayor cantidad de AIA llegando a  $35,18 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Sepúlveda, 2014). Ninguna de las dos cepas formó halo transparente en el medio Pikovskaya con fosfato tricálcico, por lo que se descarta que las cepas puedan solubilizar este elemento.

Se ha reportado que cerca de un 80 % de las bacterias rizosféricas son capaces de producir AIA (Patten y Glick, 2002) y estimular el desarrollo vegetativo y radical de las plantas (Duca y Glick, 2020). El AIA es la principal auxina presente en plantas y promueve el crecimiento de estas a través de procesos fisiológicos de alargamiento y división celular. Plantas inoculadas con bacterias productoras de AIA presentan, en general, una mayor altura de tallos, elongación de brotes y número de raíces (Vega *et al.*, 2016; Duca y Glick, 2020).

Los rizobios son bacterias promotoras del crecimiento vegetal que se asocian simbióticamente con leguminosas y se alojan en las raíces de estas especies en nódulos, donde realizan la fijación biológica de nitrógeno (Hernández *et al.*, 2015; Ledermann *et al.*, 2021). Los rizobios pueden, en algunos casos, aumentar la disponibilidad de otros nutrientes y producir fitohormonas, lo que fue descrito en aislados de rizobios provenientes de nódulos de soya donde se determinó la capacidad de algunas cepas de producir sideróforos, AIA y la actividad de la enzima ACC desaminasa (Hernández *et al.*, 2015).

El rizobio utilizado en esta tesis, identificado como *Mesorhizobium* sp., fue previamente aislado desde *Sophora macrocarpa*, un arbusto nativo de la familia de las leguminosas, y ha mostrado efectos en la fijación de nitrógeno y promoción de crecimiento en *Sophora toromiro* y *S. fernandeziana* (Olave, 2020; Soto, 2023). El hecho de que la cepa además genere AIA, puede ser parte de la estrategia de colonización de raíces ya que una estimulación en el crecimiento de pelos radicales, contribuye a aumentar los sitios de entrada para la formación de nódulos en leguminosas (Bianco, 2020). Esto, a su vez, podría generar respuestas en especies no leguminosas como se ha observado en plantas de arroz inoculadas con *Mesorhizobium* sp. que generaron mayor biomasa radical (Hernández *et al.*, 2017).

Es importante destacar que las cepas bacterianas utilizadas en esta

investigación fueron capaces de fijar nitrógeno en medio Burk. Se les denomina de vida libre a las bacterias que son capaces de fijar nitrógeno sin la presencia de exudados de las raíces de las plantas y que no dependen de estos para sobrevivir. La importancia de estas bacterias fijadoras de nitrógeno en vida libre, también llamadas diazotróficas, radica en la capacidad que tienen de reducir y transformar el nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) a amonio ( $NH_4^+$ ) una forma de nitrógeno asimilable para las plantas (Bautista-Cruz y Martínez-Gallegos, 2020).

En el experimento de inoculación de plantas micropropagadas de avellano chileno no se encontraron diferencias significativas con respecto al control en volumen radical, área foliar, número de hojas y altura de canopia en plantas de avellano inoculadas con *Mesorhizobium* sp. AG-275 y con *Pseudomonas koreensis* AG-97 (Tabla 2). Esto contrasta con los ensayos preliminares en avellano chileno realizados por la empresa Biovitro, donde se observó un mayor volumen de raíces al inocular plantines con la cepa AG-275 durante el proceso de inmersión temporal. Una de las razones para la ausencia de promoción de crecimiento podría ser el escaso desarrollo radical de los plantines de avellano al momento de la inoculación. Al ser ambas cepas bacterias rizosféricas, requieren de exudados radicales para obtener energía para multiplicarse y así producir metabolitos que beneficien a la planta (Sharma *et al.*, 2023).

Tabla 2. Efecto de inoculación con bacterias rizosféricas en parámetros de crecimiento en avellano chileno

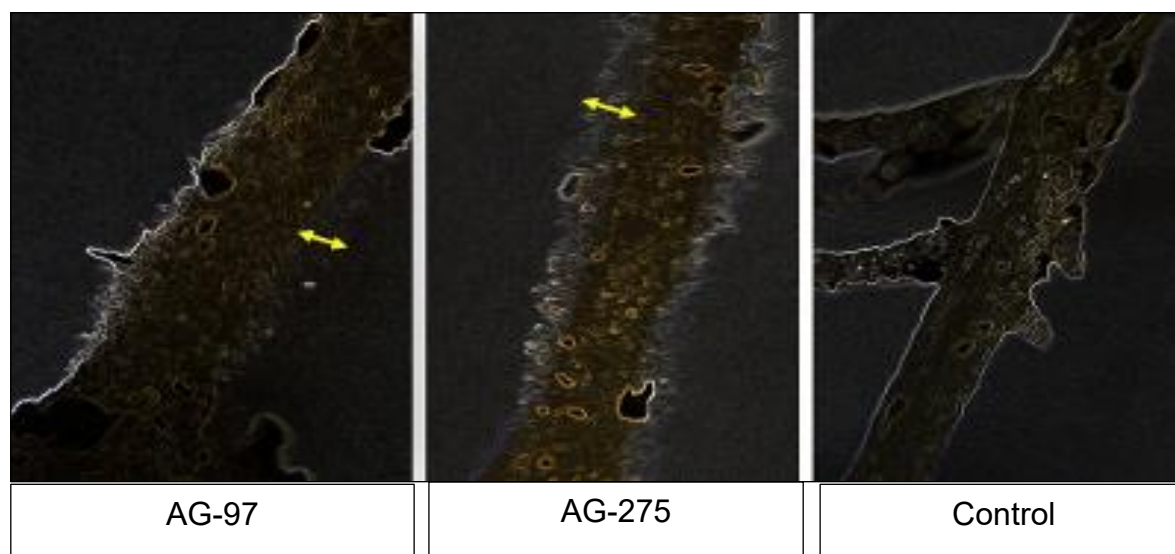
	Volumen radicular (mL)	Área foliar (cm <sup>2</sup> )	Número de hojas	Altura de canopia (cm)
Control	0,44 A	13,30 A	13,80 A	5,70 A
<i>Mesorhizobium</i> sp. AG-275	0,38 A	11,70 A	11,70 A	5,00 A
<i>Pseudomonas</i> <i>koreensis</i> AG-97	0,37 A	14,10 A	12,30 A	5,60 A

\* Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $P > 0,05$ )

*Pseudomonas koreensis* AG-97 ha estimulado un mayor desarrollo de raíces en especies como lechuga (*Lactuca sativa* L.) (Sepúlveda, 2014), tomate (*Solanum*

*lycopersicum*) (Reyes-Castillo *et al.*, 2019), portainjerto de cerezo (*Prunus avium L.*) (López, 2024) y cilantro (*Coriandrum sativum L.*) (Arévalo, 2023), sin embargo, en este estudio no se logró un efecto positivo en este parámetro. Por otro lado, es destacable la mayor cantidad de pelos radicales generados con la inoculación tanto con AG-97 como con el rizobio AG-275, con respecto a las plantas control de avellano chileno no inoculadas (Figura 1). Esto había sido previamente observado por Sepúlveda (2014) en lechuga, aunque, al igual que en esta investigación, no fue posible asignar un valor cuantitativo.

Figura 1. Sistema radical de plantines de avellano chileno inoculados con las cepas bacterianas *Mesorhizobium sp.* AG-275, *Pseudomonas koreensis* AG-97 y control.



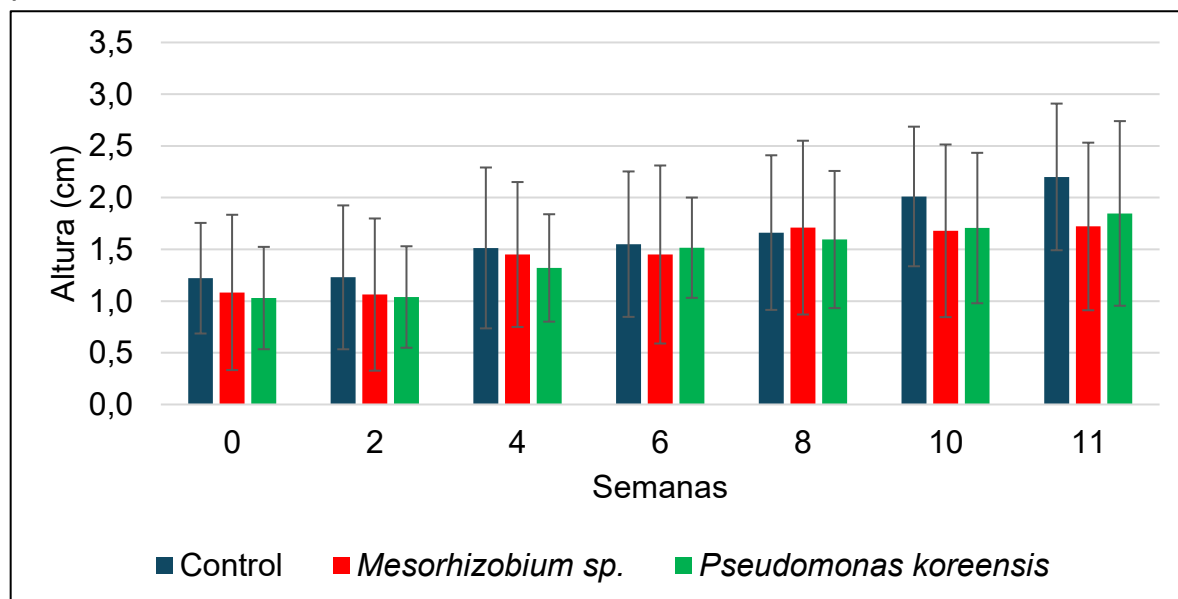
La cantidad y tamaño de pelos radicales en las raíces de las plantas dependen de la especie. Un mayor desarrollo de pelos radicales permite que la planta sea más eficiente en absorber nutrientes y agua, especialmente, favorecen la absorción de nutrientes de poca movilidad como el fósforo, lo que podría eventualmente estimular el crecimiento aéreo (Cabeza y Claassen, 2017).

La especie *Gevuina avellana* mol. desarrolla además conglomerados de raíces, que la planta crea ante la baja disponibilidad de nutrientes, cuya funcionalidad se relaciona con el aumento de la capacidad de absorción de agua y nutrientes (Cabeza y Claassen, 2017). En este trabajo de investigación no fue posible observar

estos conglomerados de raicillas, pues estos se desarrollan en etapas más avanzadas de crecimiento del sistema radical.

El crecimiento de las plantas en el tiempo fue homogéneo, independiente del inoculante utilizado, sin encontrarse diferencias significativas en la altura de plantas ( $P < 0,05$ ) en el transcurso del ensayo (Figura 2). Tampoco se observó un efecto significativo en la sobrevivencia de plantas con ninguno de los tratamientos de inoculación. Sin embargo, en las plantas inoculadas con la cepa AG-97 de *Pseudomonas koreensis* se observó la tendencia a una mayor mortalidad, alcanzando menores porcentajes de sobrevivencia en comparación con el control y las plantas inoculadas con *Mesorhizobium sp* durante todo el proceso de aclimatación (Figura 3). Esto se contrapone con lo determinado por López (2024) en portainjertos de cerezo micropropagados que al ser inoculados con *Pseudomonas koreensis* AG-97 aumentaron el porcentaje de sobrevivencia de plantas en la fase de aclimatación. Es importante señalar que en dicho estudio la inoculación fue al sustrato, lo que pudo haber propiciado mejores condiciones para la sobrevivencia de las bacterias.

Figura 2. Altura de plantas desde el tallo hasta el ápice del eje central, durante el periodo de aclimatación.



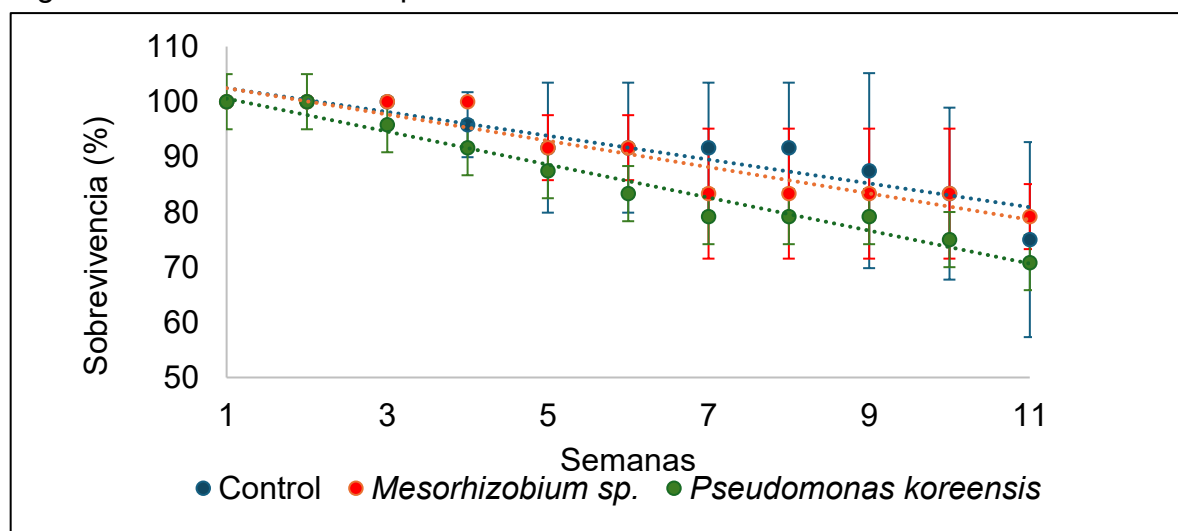
\*Barras verticales representan el error estándar de la media.

La adaptación de cepas bacterianas en el sistema radical de las plantas está

regulada por los exudados radicales (Velasco *et al.*, 2020). Los exudados cumplen funciones de comunicación y reconocimiento entre la planta y el microorganismo, además de ser fuente de carbono para estos últimos (Velasco *et al.*, 2020; Sharma *et al.*, 2023). La ausencia de exudados en la primera etapa de aclimatación pudo haber retrasado la asociación simbiótica, afectando la sobrevivencia de las bacterias en la rizósfera y la producción de metabolitos como el AIA.

Las plantas en la fase de aclimatación se vieron afectadas por *Botrytis cinerea*, hongo que atacó en particular a aquellas plantas inoculadas con *Pseudomonas koreensis*. Existen antecedentes de la enfermedad moho gris, causada por *B. cinerea* en viveros forestales de Chile, donde se ha descrito afectando a plantas del género *Eucalytus* y a la especie *Pinus radiata*, atacando la porción apical, causando problemas de pudrición en las primeras etapas de establecimiento (Molina *et al.*, 2006), síntomas similares a los observados en avellano chileno. En algunos casos la inoculación con *Pseudomonas* no patógenas puede inducir la proliferación de patógenos a través de competencia por recursos. Si la cepa de *Pseudomonas* coloniza el espacio en la planta sin producir metabolitos antibióticos, podría dejar espacios libres para que otros patógenos se establezcan y crezcan. Además las bacterias no patógenas pueden desplazar a otros microorganismos benéficos en la rizosfera, lo que podría cambiar la composición microbiana y favorecer a patógenos específicos (Compant *et al.*, 2010)

Figura 3. Sobrevivencia de plantas de avellano chileno inoculadas con PGPR.



\*Barras verticales representan el error estándar de la media.

Al finalizar el ensayo, no se encontraron diferencias significativas entre el peso seco aéreo y peso seco de raíz de las plantas entre los diferentes tratamientos evaluados (Tabla 3).

Tabla 3. Peso seco de plantas de avellano chileno.

	Peso seco aéreo (g)	Peso seco de raíz (g)
Control	0,14 A	0,05 A
<i>Mesorhizobium</i> sp AG-275	0,11 A	0,05 A
<i>Pseudomonas koreensis</i> AG-97	0,13 A	0,04 A

\*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $P > 0,05$ ).

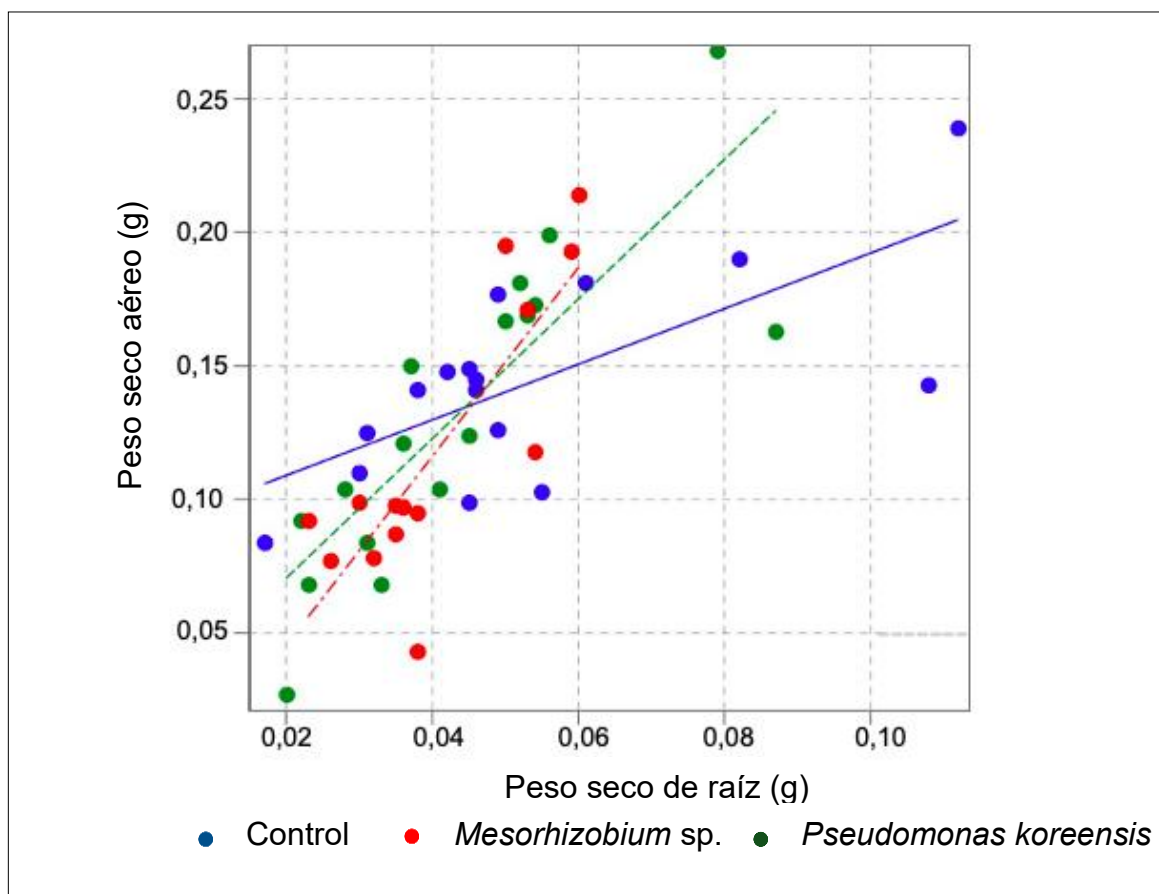
Sin embargo, al relacionar el peso seco de la parte aérea en función del peso seco de raíz (Figura 4) se observó que las plantas inoculadas presentaron mayor crecimiento en su parte aérea para un desarrollo similar de raíces, a diferencia de las plantas control. Esto sugiere que las plantas inoculadas fueron más eficientes en la producción de biomasa, lo que se podría deber a una mayor eficiencia en la absorción de agua y nutrientes del sustrato.

El impacto de las PGPR sobre la raíces no se traduce únicamente en un aumento en el peso total de raíces, estas pueden inducir una mejora en la estructura o salud de las raíces, lo que resulta en una mejor calidad de estas. Favorecen la arquitectura radicular, es decir las PGPR pueden promover la ramificación de las raíces o mejorar la distribución de las raíces en el sustrato, lo favorece la capacidad de la planta para explorar el suelo en busca de nutrientes. También pueden mejorar la calidad de las raíces al aumentar la tolerancia a condiciones de estrés como sequías o ataques de patógenos (Lugtenberg y Kamilova, 2009).

En estudios previos con la cepa AG-97 se reportó un aumento en el desarrollo aéreo en los primeros 8 días post-inoculación en plantas de lechuga inoculadas con distintas concentraciones ( $10^6$  y  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) de la bacteria (Ponce, 2015) y un aumento en peso seco de raíces, follaje y volumen radical en plantas de cilantro (Arévalo, 2023). Estos antecedentes indican que AG-97 es una cepa que es capaz

de inducir un mayor desarrollo vegetativo en etapas tempranas de crecimiento independiente de la especie a la que se asocie. Esta estimulación del crecimiento se asocia a la síntesis de fitohormonas, en particular el AIA, auxina que regula el crecimiento en plantas mediante la formación de raíces laterales y pelos radicales, por lo tanto aumenta el acceso a los nutrientes del suelo y absorción de agua.

Figura 4. Relación entre la materia seca de raíces y de la parte aérea de plantas de avellano chileno, con diferentes tratamientos de inoculación.



En particular la estimulación del crecimiento vegetativo en la etapa de aclimatación posterior a la micropropagación fue demostrado en portainjertos de cerezo donde la inoculación promovió el crecimiento y desarrollo en etapa inicial de la planta, lo que es de gran importancia para la sobrevivencia de estas y permite obtener plantas *ex vitro* en un corto plazo (López, 2024). Era esperable, por tanto, que la bacteria AG-97 tuviera un efecto promotor de crecimiento en avellano chileno. En consecuencia,

a futuro será necesario mejorar ciertos aspectos como por ejemplo la técnica y momento de inoculación. Una alternativa sería la inoculación de sustrato en vez de la inoculación directa a la raíz y evaluar el efecto en plantas micropropagadas con mayor desarrollo radical y presencia de pelos radicales, para favorecer la colonización de las bacterias en la rizosfera, o complementar la inoculación *in vitro* con una segunda inoculación cuando las plantas tengan mayor desarrollo de raíces.

## CONCLUSIONES

1. La cepa de *Mesorhizobium* sp. AG-275, es capaz de producir ácido indol acético y fijar nitrógeno en vida libre.
2. La inoculación de la especie avellano chileno con bacterias promotoras de crecimiento no incrementó el crecimiento aéreo ni radical en comparación con el control.
3. Las plantas inoculadas con bacterias promotoras del crecimiento presentaron mayor crecimiento en su parte aérea en comparación a plantas sin inocular, para un desarrollo similar de raíces.

## REFERENCIAS

1. Álvarez, C., P. Sáez, K. Sáez, M. Sánchez, D. Ríos. 2012. Effects of and ventilation on physiological parameters during in vitro acclimatization of *Gevuina avellana* Mol. Plant. Cell. Tiss. Organ. Cult. 110:93–101.
2. Arévalo, J. 2023. Inoculación de compost con bacterias benéficas: efecto en el crecimiento de cilantro (*Coriandrum sativum* L.) y en su tolerancia al déficit hídrico. Memoria de título, Ingeniero Agrónomo. Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía, Chillán, Chile.
3. Bautista-Cruz, M.A., y V. Martínez-Gallegos. 2020. Promoción del crecimiento de *Agave potatorum* Zucc. por bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre. Terra Latinoam. 38(3): 555–567.
4. Bianco, L. 2020. Principales aspectos de la nodulación y fijación biológica de nitrógeno en Fabáceas. Idesia. 38(2): 21–29.
5. Cabeza, R.A. y N. Claassen. 2017. Sistemas radicales de cultivos: extensión, distribución y crecimiento. Agro Sur. 45(2): 31–45.
6. Chandra, S., R. Bandopadhyay, V. Kumar and R. Chandra. 2010. Acclimatization

of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. *Biotechnol Lett* 32:1199–1205

7. Compant, S., Clément, C., & Baillieul, F. (2010). "Bacterial model to study plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and their interaction with plants." *Science Progress*, 93(2), 76-87.
8. Di Rienzo J.A., F. Casanoves, M.G. Balzarini, L. Gonzalez, M. Tablada, C.W. Robledo. *InfoStat versión 2020*. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
9. Damiano, C, E. Catenaro, J. Giovinazzi, A. Frattarelli and E. Caboni. 2005. Micropropagation of hazelnut (*Corylus avellana* L.). *Acta Hort.* 686: 221-226.
10. Donoso, C. 1978. Avance de Investigación: Antecedentes Sobre Producción de Avellanas. *Bosque* .2(2): 105–108.
11. Duca, D.R. and B.R. Glick. 2020. Indole-3-acetic acid biosynthesis and its regulation in plant-associated bacteria. *App Microbiol Biotechnol* 104: 8607-8619.
12. Durkovic, J. 2006. Rapid micropropagation of mature wild Cherry. *Biol Plantarum* 50 (4): 733-736
13. Easlon, H.M. and Bloom, A.J. 2014, Easy Leaf Area: Automated digital image analysis for rapid and accurate measurement of leaf área. *Applications in Plant Sciences*, 2: 1400033.
14. Esquivel. C., M. Rosalba, R. Gavilanes, R. Cruz, and O.P. Huante. 2013. Importancia agrobiotecnológica de la enzima ACC desaminasa en rizobacterias, una revisión. *Rev. Fitotec. Mex.* 36(3):251-258.
15. Fierro, P., L. Pancel, H. Rivera y J.C. Castillo. 1998. Experiencia silvicultural del bosque nativo de Chile: Recopilación de antecedentes para 57 especies arbóreas y evaluación de prácticas silviculturales. Corporación Nacional Forestal. Santiago, Chile.
16. Grinbergs J., E. Valenzuela y C. Ramírez. 1986. Germinación "in vitro" de *Gevuina avellana* Mol. (Proteaceae). *Bosque*.7(2): 95-101.
17. Hernández F., M.C. Ionel, G. Nápoles y B. Morales. 2015. Caracterización de aislados de rizobios provenientes de nódulos de soya (*Glycine max* L. Merril) con potencialidades en la promoción del crecimiento vegetal. *Cultivos Tropicales*. 36(1): 65-72.
18. Hernández F., M.C. Ionel y G. Nápoles. 2017. Rizobios residentes en la rizosfera de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) cultivar INCA LP-5. *Cultivos Tropicales*. 38(1): 39-49.

19. Hernández, L., y M.A. Escalona. 2003. Microorganismos que benefician a las plantas: las bacterias PGPR. Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Veracruzana. México. Documento de clases.
20. Jil, P. y J, Martínez-Lagos. 2017. Aspectos básicos del avellano chileno (*Gevuina avellana* Mol.). pp: 1-4. Informativo N° 173. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA). Osorno. Región de Los Lagos. Chile.
21. Ledermann, R., C.M. Schulte and P.S. Poole. 2021. How Rhizobia Adapt to the Nodule Environment. *J. Bacteriol* 203: e00539-20.
22. Loewe M., F. Veronica, y G, Klein. 1997. Avellano chileno. *Gevuina avellana*. Monografía. INFOR. Santiago, Chile.
23. López B. 2024. Interacción de las bacterias promotoras de crecimiento y micorrizas arbusculares asociadas al patrón Maxma 60: efecto en enraizamiento y protección frente a estrés hídrico. Tesis, Magister en Ciencias Agronómicas. Universidad de Concepción. Facultad de Agronomía. Chillán, Chile.
24. Lugtenberg, B., and Kamilova, F. (2009). "Plant growth-promoting rhizobacteria." *Annual Review of Microbiology*, 63, 541-556.
25. Molina, G., S. Zaldúa, G. González y E. Sanfuentes. 2006. Selección de hongos antagonistas para el control biológico de *Botrytis cinerea* en viveros forestales en Chile. *Bosque (Valdivia)*. 27(2): 126-134.
26. Murashige, T., y F. Skoog. 1962. A revised médium for the rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-497.
27. Olave, I. 2020. Identificación y selección de rizobios para *Sophora toromiro* (phil.) skottsbo., especie extinta en rapa nui. Memoria de título, Ingeniero Agrónomo. Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía, Chillán, Chile.
28. Patten, C.L. y B.R. Glick. 2002. Role of *Pseudomonas putida* Indoleacetic Acid in Development of the Host Plant Root System. *Appl Environ Microbiol*. 68(8): 3795-3801.
29. Pohl, B. 2020. Productos Forestales No Madereros (PFNM) en Chile, Importancia y sustentabilidad: El caso del avellano (*Gevuina avellana*). Tesis, Magister en Ciencias Regionales. Universidad de Concepción. Facultad de Arquitectura, Urbanismo y Geografía. Concepción, Chile.
30. Ponce, S. 2014. Germinación y rendimiento de lechuga (*Lactuca sativa* L.) var. *capitata* inoculada con rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal. Memoria de título, Ingeniero Agrónomo. Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía. Chillán. Chile.

31. Reyes-Castillo, A., M. Gerding, P. Oyarzúa, E. Zagal, J. Gerding, and S. Fischer. 2019. Plant growth-promoting rhizobacteria can improve NPK availability: selection, identification and effects on tomato growth. *Chil. J. Agric. Res.* 79(3): 473-485.
32. Saldivia, M. 2021. Aislamiento, caracterización e identificación de *Bacillus* sp. asociados a la rizósfera de *Gevuina avellana* Mol. en la zona centro sur de Chile. Memoria de título, Ingeniero Agrónomo. Universidad Adventista de Chile. Chillán, Chile.
33. Sanchez, O., D. Manuel, M. Rios, G. Pedraza, H. Pereira, R. Castellanos, y R. Escobar. 2004. Propagación in vitro de *Nothofagus procera* (Poepp. et Endl Oerst.) a partir de embriones aislados. *Bosque.* 25 (1): 123-128.
34. Santillana, N., D. Zúñiga, y C. Arellano. 2012. Capacidad promotora del crecimiento en cebada (*Hordeum vulgare*) y potencial antagónico de *Rhizobium leguminosarum* y *Rhizobium etli*. *Agrociencia (Uruguay).* 16(2):11-17.
35. Sepúlveda, M. 2014. Aislamiento, selección y evaluación de bacterias promotoras de crecimiento (pgpr) en lechuga (*Lactuca sativa* L.) var. *capitata* L. 'desert storm'. Memoria de título, Ingeniero Agrónomo. Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía. Chillán. Chile.
36. Sharma, I., Kashyap, S., y Agarwala, N. 2023. Biotic stress-induced changes in root exudation confer plant stress tolerance by altering rhizospheric microbial community. *Front. Plant Sci.* 14: 1132824.
37. Soto, M.S. 2023. Selección de rizobios efectivos para la inoculación de *Sophora fernandeziana* (phil.) skotts. especie en peligro de extinción en su hábitat natural. Memoria de título, Ingeniero Agrónomo. Universidad de Concepción. Facultad de Agronomía. Chillán, Chile.
38. Tomayo, C. 2014. Tasa de incremento lumínico óptimo durante la aclimatación in vitro de *Nothofagus alpina* (*Nothofagus alpina* Poepp et Endl Oerst). Memoria de título, Ingeniera Forestal. Universidad Austral de Chile, Facultad de ciencias forestales y recursos naturales. Valdivia, Chile.
39. Vega-Celedón, P., C. Martínez, H., González, y M. Seeger. 2016. Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. *Cultivos Tropicales.* 37: 33–39.
40. Velasco J.A., O.H. Castellanos, G. Acevedo, R. Clarenc y A. Rodríguez. 2020. Bacterias rizosféricas con beneficios potenciales en la agricultura. *Terra Latinoam.* 38(2): 333-334.