



A1-256 Diversidad microbiana y productividad de tomate asociadas a la bioestimulación como estrategia de transición agroecológica.

López AC¹, García SS¹, Bernabeu P¹, Casajús V¹, Chavez Montes E¹, Ormazabal C¹, Cavello I¹, Cagnola E¹, Galar ML¹, De Luca LC³, Boiardi JL¹ Luna MF^{1,2*}

¹CINDEFI (UNLP; CCT-La Plata, CONICET), Facultad de Cs. Exactas - Calles 50 y 115 (1900). La Plata, Argentina. ²CIC PBA. ³Instituto de Investigación y Desarrollo Tecnológico para la Pequeña Agricultura Familiar Región Pampeana (IPAF) * mafla@quimica.unlp.edu.ar

Resumen

Se realizó un relevamiento de bacterias endófitas de tallo de cultivares de tomate (*Lycopersicon esculentum*) bajo cubierta con o sin tratamiento de bioestimulación en etapa de plantín, como estrategia para una transición agroecológica. La producción de tomate tardío y el rediseño de manejos para las coberturas fueron dos determinantes en este ensayo. Se determinó la capacidad bacteriana de promover el crecimiento vegetal *in vitro* y la productividad de los cultivos. No se encontró una relación directa entre la cantidad, diversidad y capacidad de promover el crecimiento vegetal de endófitos de tallo de tomate y la bioestimulación, características que estarían relacionadas al genotipo de tomate. El tomate platense mostró mayor biodiversidad de endófitos promotores del crecimiento vegetal que el híbrido BADRO y la variedad UCO, pero como línea genética, no resultó apropiada como cultivo de tomate tardío. En cambio, el híbrido BADRO y la variedad UCO mostraron buenos rendimientos y respondieron a la bioestimulación.

Palabras-clave: tomate; promoción del crecimiento vegetal; endófitos; bioestimulación.

Abstract

A survey of endophytic bacteria from stem of tomato cultivars under cover with or without biostimulation treatment in seedling stage was realized as strategy for an agroecological transition. Late tomato production and the redesign of the handlings for hedges were two determinants in this assay. Its ability to promote plant growth *in vitro* was determined and crop productivity was evaluated. No direct relationship was found between the amount, diversity and ability to promote plant growth of tomato stem endophytes and biostimulation, but these features would be related to tomato genotype. The platense tomato showed a greater biodiversity of endophytes with plant growth promoting characteristics comparing to the BADRO hybrid and UCO variety, but as genetic line, it was not suitable for cultivation as late tomato. However, the BADRO hybrid and UCO variety showed good yields and responded to biostimulation.

Keywords: tomato; plant growth promotion; endophytes; biostimulation.

Introducción

La importancia de los microorganismos en un ecosistema está relacionada con su cantidad y diversidad y, sobre todo, con su versatilidad metabólica y con sus múltiples funciones en los ciclos biogeoquímicos (Acuña O, 2006). En este contexto, las plantas no son sólo las principales suministradoras de sustratos para el crecimiento selectivo de poblaciones de hongos, bacterias y actinomicetos en el entorno rizosférico, sino que también sus tejidos internos son un nicho ecológico que permite el establecimiento y desarrollo de microorganismos endófitos. Décadas atrás una planta colonizada interiormente por microorganismos era considerada una planta enferma. En la actualidad, es sabido que muchos de estos microorganismos son beneficiosos para su desarrollo. Dentro de los

microorganismos endófitos, las bacterias que ejercen efectos positivos sobre el desarrollo de las plantas que colonizan son llamadas bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) (Bashan y Olguin, 1998). Las BPCV endófitas presentan ciertas ventajas ecológicas frente a las bacterias rizosféricas, debido a que: a) establecen un intercambio más directo de metabolitos con la planta, b) no compiten por nutrientes con la gran diversidad de microorganismos del suelo, c) están protegidas de los cambios ambientales (Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006). No obstante, pueden también ejercer sus efectos promotores del crecimiento vegetal durante el proceso de colonización de las raíces y en la rizósfera, si es que tienen la posibilidad de persistir en ella (Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004). Las BPCV, tanto rizosféricas como endófitas, pueden promover el crecimiento vegetal a través de mecanismos directos e indirectos, tales como la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN), la producción de fitohormonas (especialmente las auxinas y el ácido indolacético), la solubilización de fosfatos inorgánicos, la producción de aleloquímicos y sideróforos, entre otros. Como consecuencia de una o más de estas posibles acciones se puede lograr, por ejemplo, una estimulación de la germinación de las semillas, la protección de la planta frente a adversidades como estrés hídrico, la inhibición específica o inespecífica del crecimiento de fitopatógenos, etc.. Existen numerosos reportes que indican que el suelo es el mayor responsable de las diferencias que se encuentran en la composición de las comunidades microbianas endófitas de las raíces pero son escasos los referidos a dicho estudio en relación a las poblaciones endófitas de tallo, y menos aún referidos a la biodiversidad de las poblaciones bacterianas endófitas en relación con los sistemas de cultivo (con o sin agroquímicos, con alta utilización de insumos y maquinarias, en transición agroecológica, etc) o incluso con la diversidad genética del cultivo (variedad o híbrido). Considerando al conjunto de los tejidos internos de los vegetales y a los microorganismos que lo habitan como componentes de un agroecosistema en el que pueden interactuar positivamente, y teniendo como objetivo general contribuir al conocimiento de la biodiversidad de bacterias endófitas con capacidad promotora del crecimiento vegetal en plantas de tomate, la propuesta de este trabajo fue hacer un relevamiento de las bacterias endófitas del tallo de diferentes plantas de tomate crecido bajo cubierta con o sin tratamiento de bioestimulación en etapa de plantín, de manera de aportar modificaciones en el manejo para una transición agroecológica. La producción de tomate tardío y el rediseño de manejos para las coberturas fueron dos determinantes para la implementación de este ensayo.

Metodología

Se determinó por métodos cultivo-dependientes la presencia de bacterias endófitas en tallo de diferentes cultivares de tomate con o sin tratamiento de bioestimulación en la etapa de plantín, y se evaluó su potencialidad para ejercer un efecto promotor del crecimiento vegetal mediante técnicas de screening *in vitro*. Otro de los objetivos fue evaluar la productividad como rendimiento en gramos de los cultivos de tomate para determinar si a través de la bioestimulación las plantas obtenían algún beneficio que se pudiera ver reflejado en ese parámetro de crecimiento.

Condiciones de cultivo y material biológico

El trabajo se realizó en invernáculo en el campo del productor Hector Almazan en una zona de experimentación dentro de las Franjas con Restricción de Pulverización de Agroquímicos del partido de Gral. Pueyrredón, Pcia. de Bs. As. zona que surge por una Ordenanza que crea el Programa de Desarrollo Rural Sustentable el cual reglamenta el uso de Agroquímicos en dicho partido. El cultivo seleccionado fue el de tomate, y para este trabajo se utilizaron distintas líneas genéticas: platense (*platense italiano*) (TP), la variedad UCO PLATA (TV) y el híbrido Badro (TH). En todas las líneas se obtuvieron plantines No Bioestimulados (No BE) y plantines bioestimulados (BE). La bioestimulación para TP

consistió en la inoculación de los plantines (crecidos sobre vermiculita estéril) con una bacteria diazotrofa (que fija nitrógeno atmosférico) endófito con características de BPCV, *Burkholderia tropica* Mto-293 (Reis *et al.*, 2004). Se regaron periódicamente con solución de Fähræus sin nitrógeno, con el objetivo de desarrollar un plantín en el que se pudiera poner de manifiesto la capacidad de promover el crecimiento de *B. tropica* a través de la FBN. Un día antes del trasplante se inoculó cada seedling con un volumen de 5 ml de cultivo de 48 hs de *B. tropica* correspondiente a un recuento de 10^9 UFC/ml. Para el caso de TV y TH, se pretendió potenciar los grupos funcionales del suelo y los simbioses con la utilización de un sustrato no esterilizado, a base de lombricompost, tierra de monte (De Luca y Pérez, 2014), según se detalla:

-*Plantines bioestimulados*: para TV y TH es el plantín obtenido sobre una mezcla turba:lombricompost:tierra de monte 1:1:10 utilizada como sustrato, en bandeja de 50 celdas, con semillas pregerminadas de 48 hs, y 40 días de desarrollo al trasplante con dos riegos de tintura de *Equisetum sp.*, uno en primer par de hojas y otro el día anterior al trasplante.

-*Plantines convencionales*: es el plantín obtenido con sustrato comercial (Terrafertil 1028), en bandeja de 125 celdas, con semillas pregerminadas de 48 hs y riego solo con agua de pozo.

Intensidad de micorrización y rendimiento de cosecha

Este último se determinó desde la primera cosecha y hasta el final del cultivo cada 6 a 15 días y se expresó como peso total de frutos de las plantas analizadas por cosecha para cada tratamiento. Los pesos de TP No I e I corresponden al total de las plantas de cada tratamiento que inicialmente fueron 50, quedando 35 y 38 al final del ensayo, respectivamente. Los pesos de TH y V No BE y BE fueron de 10 plantas marcadas al azar al iniciar el ensayo, sobre un total de 100 plantas. La intensidad de micorrización se evaluó con utilización del programa MYCOCALC – INRA siguiendo la metodología de Trouvelot, 1986.

Aislamiento y evaluación de bacterias endófitas

El aislamiento de bacterias endófitas se realizó a partir de una porción de tallo (ramificación del tallo a la altura de la primer corona) de plantas de 60 días post- trasplante, que se desinfectó con hipoclorito al 10%, se pesó y se desintegró en mortero en condiciones de esterilidad según Luna *et al.*, 2012. Luego se resuspendió en solución fisiológica y se plaquearon diluciones seriadas del macerado en medio LB con cicloheximida. A las 24 hs. se observaron macroscópicamente y se contaron las colonias para el cálculo del número de bacterias endófitas cultivables por gramo de tejido. Las colonias aisladas se repicaron en medio LB y se conservaron a -80° C en medio LB con glicerol al 20 %.

A todos los aislamientos se le realizaron pruebas para determinar su capacidad de promover el crecimiento *in vitro*, las mismas fueron:

1- *Solubilización de compuestos insolubles de Fósforo*: se utilizó el medio sólido NBRIP (*National Botanical Research Institute's phosphate growth medium*) según Nautiyal (1999) con glucosa como fuente de Carbono y Energía. Los fenotipos positivos podrían aumentar la disponibilidad de P para las plantas.

2- *Producción de sideróforos*: la producción de sideróforos fue detectada mediante la formación de un halo naranja alrededor de la colonia bacteriana en medio agar cromo azulol S (CAS) (Schwyn y Neilands, 1987) por el método de la bicapa (Pérez-Miranda *et al.*, 2007). Los fenotipos positivos harían que el Hierro este más disponible para las plantas que para organismos fitopatógenos.

3- *Producción de amilasas*: se determinó en placa según Fuwa, 1954.

4- *Producción de Lipasas*: se determinó utilizando Tween 80 según Samad *et al.*, 1989.

5- *Producción de proteasas*: se determinó según Walsh *et al.*, 1995.

Resultados y Discusión

Se determinó la presencia de bacterias endófitas de tallo asociadas a diferentes cultivares de tomate y, en particular, se evaluó qué proporción de éstas presentaron ciertas capacidades de promover el crecimiento vegetal, tal como se muestra en las Tablas 1 y 2. A los diferentes Tratamientos se les dio la siguiente nomenclatura: Tomate platense no inoculado (TP No I), Tomate platense inoculado (TP I), Tomate variedad no bioestimulado (TV No BE), Tomate variedad bioestimulado (TV BE), Tomate híbrido no bioestimulado (TH No BE), Tomate híbrido bioestimulado (TH BE).

TABLA 1. Población endofítica total de tallo e Intensidad de micorrización % (M).

Tratamiento	UFC endófitas/g de tallo	Nro. de aislados	M
TP No I	2,29E+04	24	40
TP I	5,38E+03	20	45
TV No BE	1,61E+04	9	60
TV BE	1,91E+02	8	65
TH No BE	1,24E+03	13	65
TH BE	3,69E+03	9	60

Se aislaron bacterias endófitas de todas las plantas de tomate que en apariencia estaban sanas, indicando que todos los aislamientos corresponderían a bacterias saprófitas de tomate. El análisis cuantitativo de la población endofítica total mostró valores que se encontraron dentro de los órdenes de magnitud de bacterias endófitas presentes en otras plantas estudiadas, siendo en promedio mayor el número de bacterias endófitas tanto en cantidad como en variedad para el cultivar de TP comparado con TV y TH. Una posible causa de esta diferencia en diversidad bacteriana podría ser el genotipo de tomate. Por otro lado, para TP y TV se observó mayor número de endófitos totales en el tratamiento sin bioestimulación, a diferencia de los resultados obtenidos para TH en el que los valores de bacterias endófitas en tallo fueron semejantes con o sin bioestimulación.

La intensidad de micorrización no mostró mayores diferencias entre las líneas genéticas, pero si entre los tratamientos, encontrando los % M mayores en tratamientos con menores aislamientos de endófitas.

TABLA 2. Capacidad de promoción del crecimiento *in vitro* del total de los aislamientos.

Tratamiento	Solubilización de P	Sideróforos	Amilasas	Proteasas	Lipasas
TP No I	22%	17%	13%	56%	35%
TP I	10%	15%	10%	45%	20%
TV No BE	45%	11%	0%	0%	11%
TV BE	20%	20%	0%	60%	0%
TH No BE	15%	38%	0%	38%	0%
TH BE	40%	40%	0%	0%	0%

Todas las propiedades de promoción del crecimiento vegetal evaluadas fueron encontradas en algunos de los aislamientos de bacterias endófitas provenientes de TP. Para todos los

cultivares de tomate se encontraron aislamientos que presentaban las capacidades de solubilización de P y producción de sideróforos. Para TH prácticamente no se hallaron aislamientos con actividad de enzimas hidrolíticas y para TV se encontró un alto porcentaje de proteasas. Para TH la proporción de bacterias endófitas con capacidad de promover el crecimiento vegetal fue mayor en el Tratamiento Bioestimulado. Los resultados muestran que la población endofítica con capacidad promotora del crecimiento vegetal también estaría asociada al genotipo de tomate.

TABLA 3. Rendimiento en gramos del total de plantas por cosecha por tratamiento.

Tratamiento	04-Abr	10-Abr	24-Abr	30-Abr	09-May	23-May
TP No I	8600	8300	8400	2000	sc	sc
TP I	7600	7500	5300	2500	sc	sc
TV No BE	sd	sc	sd	7200	8065	3220
TV BE	sd	sc	33100	9000	30650	23500
TH No BE	sd	sc	19500	13650	15225	9650
TH BE	sd	sc	22500	10780	20165	12560

Conclusiones

En líneas generales, en nuestro trabajo no hemos encontrado una relación directa entre la cantidad, variedad y capacidad de promover el crecimiento vegetal de endófitos de tallo de tomate, y las características del sustrato, bioestimulado o no, en la etapa del plantín, sí en cambio en relación a la variedad de tomate.

El tomate platense, como línea genética, no resultó apropiada para su cultivo como tomate tardío, al menos en este ciclo. En cambio, el híbrido BADRO y la variedad UCO mostraron buenos rendimientos y respondieron a la bioestimulación.

Referencias bibliográficas

- Acuña O, Peña W, Serrano E, Pocasangre L, Rosales F, Delgado E, Trejos J y Segura A (2006) "La importancia de la microbiología en la calidad y salud de suelos" XVII Reunion Internacional para la investigación sobre banano en el Caribe y América Tropical. Joinville. Santa Catarina. Brasil.
- Bashan Y, Holguin G (1998) Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB and PGPB. *Soil Biology and Biochemistry* 30: 1225-1228.
- De Luca L, Pérez M (2014) Suppressiveness induction to plant pathogens, a strategy for agroecological transition in horticulture. *European Journal of Science* ISSN 1857-788110: 270 – 276.
- Fuwa, H (1954) A new method of microdetermination of amylase activity by the use of amylase as the substrate, *J. Biochem.* 41: 583–603.
- Kuklinsky-Sobral J, Araújo WL, Mendes R, Geraldi IO, Pizzirani-Kleiner AA, Azevedo JL (2004) Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environ Microbiol* 12: 1244–1251.
- Luna MF, Aprea J, Crespo JM, Boiardi JL (2011) Colonization and yield promotion of tomato by inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Applied Soil Ecology* 61: 225-229.
- Nautiyal CS (1999) An efficient microbiological medium growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* 170: 265–270.
- Pérez-Miranda S, Cabirol N, George-Téllez R, Zamudio-Rivera LS, Fernández FJ (2007) O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *J Microbiol Methods* 70:127-31.



- Reis VM, Estrada-de los Santos P, Tenorio-Salgado S, Voge J, Stoffels M, Guyon S, Mavingui P, Baldani VLD, Schmid M, Baldani JI, Balandreau J, Hartmann A, Caballero-Mellado J (2004) *Burkholderia tropica* sp. nov. A novel nitrogen-fixing plant-associated bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 2155–2162.
- Rosenblueth M, Martínez-Romero E (2006) Bacterial endophytes and their interaction with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19: 827-837.
- Samad MYA, CNA Razak, AB Salleh, WMZW Yunus, K Ampon, M Basri (1989) A plate assay for primary screening of lipase activity. *Journal of Microbiological Methods* 9: 51- 56.
- Schwyn B, Neilands J (1987) Universal chemical assay for detection and determination of siderophores. *Analytical Biochem* 160: 47–56.
- Trouvelot A, Kough JL & Gianinazzi-Pearson V (1986) Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. INRA Press, Paris, pp. 217-221.
- Walsh GA, Murphy RA, Killeen GF, Headon DR, Power RF (1995) Technical note: detection and quantification of supplemental fungal beta-glucanase activity in animal feed. *J. Anim. Sci.* 73: 1074-1076.