



ESTUDIO DE LA CAPACIDAD PROMOTORA DE CRECIMIENTO Y DE BIOCONTROL SOBRE HONGOS FITOPATÓGENOS DE NUEVAS CEPAS DE *Bacillus* EN TRIGO (*Triticum aestivum*).

Gaido, Jimena

Laboratorio de Investigaciones en Fisiología y Biología Molecular Vegetal (LIFiBVe), Departamento de Producción Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias, UNL.

Director: Dr. Lucas Daurelio
Co-director: Dr. Martín Espariz

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Trigo, promotores de crecimiento, biocontrol.

INTRODUCCIÓN

Las rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas (PGPR) son bacterias beneficiosas que tienen la capacidad de colonizar las raíces de las plantas, promover su crecimiento y actuar como antagonistas de patógenos. Las vías por las cuales las bacterias ejercen su acción son diversas, siendo la síntesis de metabolitos secundarios una de las más importantes (Ferraris y Couretot 2014, Chen y col., 2007). En trigo, las especies más utilizadas como PGPRs son *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas fluorescens* y *P. chlororaphis* (Ferraris y Faggioli, 2013). Este uso se ha realizado con un gran desconocimiento de la respuesta de los cultivos, tanto frente a las distintas prácticas agronómicas como frente a las condiciones ambientales a las que son expuestos, lo que limita el desarrollo de estrategias y herramientas que mejoren las condiciones de cultivo, para incrementar su producción. Dentro de los PGPRs, los géneros más estudiados son *Bacillus*, *Azospirillum* y *Pseudomonas*, sin embargo, los *Bacillus*, por ser formadores de esporas, tienen mayor viabilidad en el tiempo, siendo los elegidos para formular productos comerciales (Chen y col., 2007, Kloepper y col., 2004).

El trigo (*Triticum aestivum*) se encuentra en segundo lugar, detrás del maíz, entre los cereales producidos en nuestro país. Debido a que su rendimiento se ve afectado por causas ambientales, se han desarrollado diferentes prácticas agronómicas para mantener los rindes de cultivo, pero como consecuencia de esto se ha producido un notable incremento en el uso de agroquímicos, lo que constituye, actualmente, un problema que demanda solución. Por ello, se requiere desarrollar productos de menor impacto medioambiental, como ser los formulados a base de curasemillas biológicos y/o promotores de crecimiento.

OBJETIVOS

- Evaluar la capacidad promotora de crecimiento de los nuevos aislados de *Bacillus* en trigo.
- Estudiar la capacidad de biocontrol sobre hongos fitopatógenos de las cepas de *Bacillus* al ser utilizadas para inocular las semillas de trigo.

METODOLOGÍA

Material vegetal, cepas utilizadas y condiciones de crecimiento.

Se utilizaron semillas de trigo Tauro del semillero Klein. Las plantas, tanto en los ensayos en

Título del proyecto: Análisis de los cambios metabólicos y transcripcionales en plantas Rutáceas en respuesta a patógenos bacterianos. Búsqueda de mecanismos que promuevan su resistencia a la canchosis.

Instrumento: PICT D

Año convocatoria: 2016

Organismo financiador: ANPyCT

Director: Dr. Daurelio, Lucas

vasos como en placas de Petri, fueron cultivadas en cámara de crecimiento a 23°C con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, y con riego diario a saturación.

Las inoculaciones se realizaron con las siguientes cepas, aisladas a partir de dos lotes de producción de trigo (Casal y col., 2018): RNF_12.2177, RNF_5.4130, RNF_7.2124, RNF_12.356, cepa de *Bacillus velezensis*, cepa de *B. Megaterium*, y *B. Safensis* S9, correspondientes a los tratamientos 1, 2, 3, 4, 5, 6, y 7, respectivamente. En todos los casos, se realizaron cultivos *overnight* de los aislados en medio papa-dextrosa, a 28°C, en agitación.

Estudio de la capacidad promotora de crecimiento.

Para evaluar la capacidad promotora de crecimiento de los aislados bacterianos, se realizaron ensayos en vasos plásticos perforados con una mezcla 1:1 de arena y vermiculita como sustrato. En cada vaso se sembraron 3 semillas, y se utilizaron 6 vasos por tratamiento. Las inoculaciones se realizaron tratando las semillas durante 5 minutos con una suspensión de las cepas 2, 3, 5 y 6 diluidas a una DO=1. De la misma forma se procesaron los vasos control, en el cual las semillas fueron inoculadas con una dilución de similar proporción del medio de cultivo. Luego de 15 días se determinó la altura de la parte aérea, el peso fresco y el peso seco de parte aérea y de la raíz, y el índice de verdor mediante SPAD, y se obtuvieron el largo total y el diámetro promedio de la raíz mediante WinRHIZO. Además, se realizó un ensayo en suelo. Para la inoculación, se procedió como se describe anteriormente, utilizando las cepas 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7. La siembra se llevó a cabo en una parcela de 4 m por 4 m, subdividida en 9 parcelas de 1 m² cada una. Los tratamientos fueron distribuidos al azar, alrededor del tratamiento control (semillas sumergidas en medio papa-dextrosa), que fue ubicado en el centro de la parcela. Para cada tratamiento, se sembraron 50 semillas por línea, en 5 líneas, separadas por una distancia de 17 cm. Se hizo el seguimiento del crecimiento del cultivo midiendo el número de hojas, macollos y de espigas por planta, y se analizó el índice de verdor utilizando SPAD.

Estudio de la capacidad de biocontrol.

Con el objetivo de evaluar la capacidad de defensa de las semillas de trigo inoculadas con los aislados bacterianos contra *Fusarium graminearum* y contra hongos de almacenamiento, se realizaron ensayos en placas de Petri. Las inoculaciones se realizaron de la misma manera que en los ensayos anteriores, utilizando las cepas 2, 3, 5 y 6. Se colocaron 12 semillas en cada placa, las cuales contenían medio agar papa-dextrosa. Un grupo fue desafiado con *F. graminearum* mediante la siembra de una suspensión de conidios en el centro de la placa, ajustada a 1x10⁷ conidios/ml, mientras que el otro grupo no fue enfrentado a ningún hongo fitopatógeno. En ambos casos, se realizaron controles en idénticas condiciones, utilizando semillas inoculadas con una dilución del medio de cultivo. Cada tratamiento se procesó por cuadruplicado. Transcurridos 7 días de incubación, se registró la infección de las semillas con *F. graminearum* y el desarrollo de hongos de almacenamiento presentes en las mismas.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Estudio de la capacidad promotora de crecimiento.

De las variables medidas en los ensayos en vasos, se detallan en la *Figura 1* los resultados obtenidos de: largo total de la raíz, peso seco de la raíz y largo de la parte aérea. Además, en la *Figura 2* se muestran fotografías representativas de las plantas de trigo.

Con respecto al ensayo en tierra, como se puede observar en la *Figura 3*, tres de las cepas ensayadas (2, 3 y 6) dieron lugar a plantas con un número mayor de hojas con respecto a

las plantas que recibieron el tratamiento control ($4,79 \pm 0,10$; $4,50 \pm 0,12$; $4,57 \pm 0,09$, vs $4,16 \pm 0,11$, respectivamente, $p < 0,05$, Kruskal Wallis, media \pm EE). A su vez, las plantas tratadas con las cepas 2 y 3 presentaron un mayor número de macollos que las plantas control ($1,53 \pm 0,10$; $1,46 \pm 0,12$, vs $1,00 \pm 0,11$, respectivamente, $p < 0,05$, Kruskal Wallis, media \pm EE).

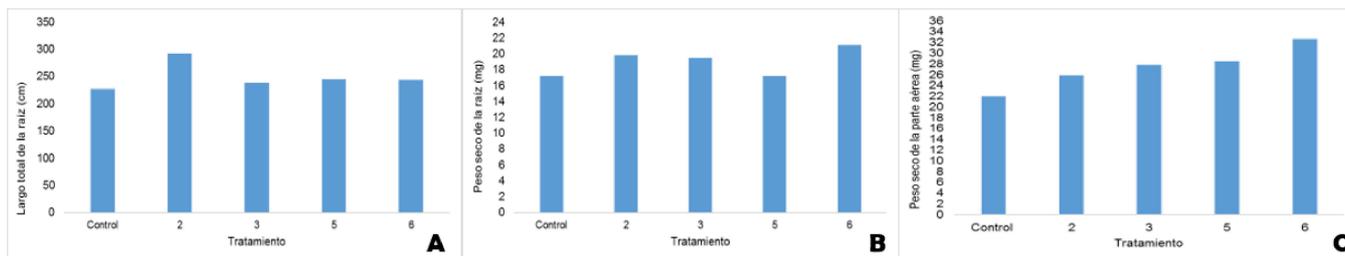


Figura 1. Resultados de las mediciones del largo total de la raíz (A), peso seco de la raíz (B) y peso seco de la parte aérea (C) en los ensayos en vasos.

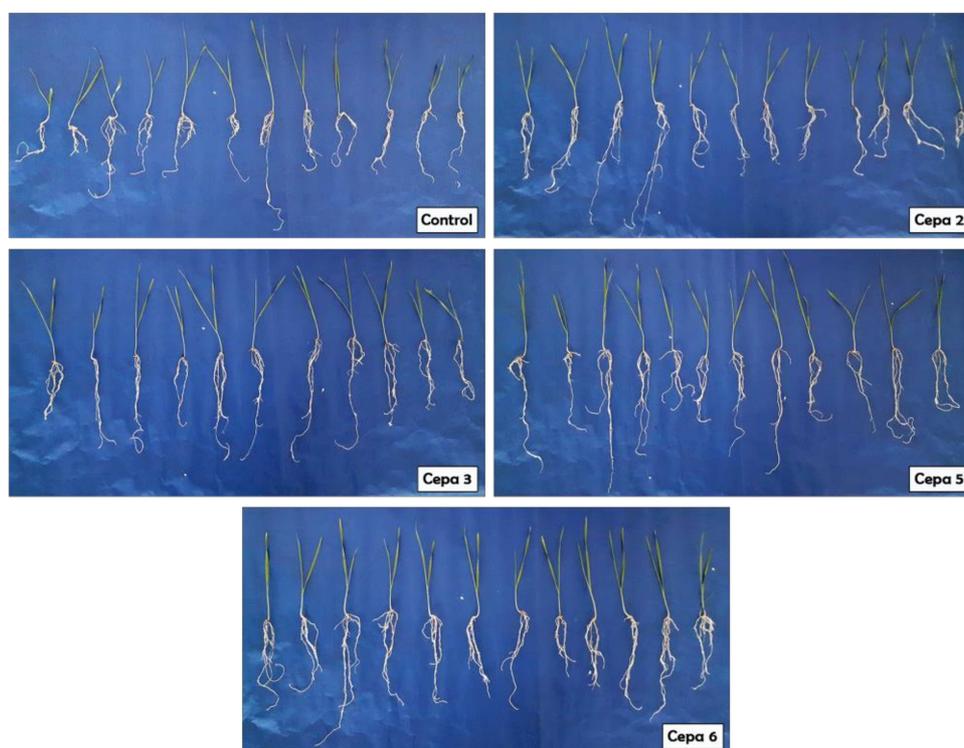


Figura 2. Plantas de trigo correspondientes a cada tratamiento.

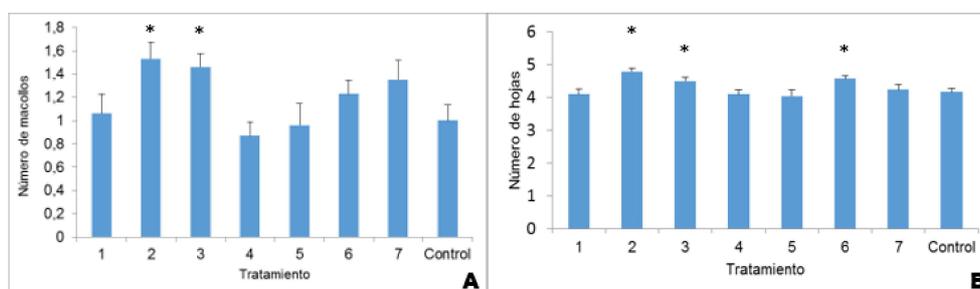


Figura 3. Resultados de la determinación del número de macollos (A) y del número de hojas (B) en el ensayo en tierra. * mayor al grupo control, $p < 0,05$.

Estudio de la capacidad de biocontrol.

En los ensayos realizados en placa, se observó, por un lado, un menor desarrollo de hongos de almacenamiento en las semillas inoculadas respecto al control, y por el otro, que las semillas inoculadas no fueron infectadas por *F. graminearum* en algunos casos, y en otros, aunque el hongo entró en contacto con las semillas, no afectó a la germinación de las mismas, mientras que sí lo hizo en las placas control. Estos resultados, resumidos en la *Tabla 1*, sugieren que las cepas ensayadas contribuyen a los mecanismos de defensa contra patógenos de las plantas. En la *Figura 4* se muestran imágenes representativas de los resultados obtenidos al desafiar con *F. graminearum* a las semillas inoculadas.

Tabla 1. Resultados de los ensayos de biocontrol. El signo + indica que las semillas no fueron afectadas por los hongos, mientras que el signo - indica lo contrario.

	Tratamiento	Cepa 2	Cepa 3	Cepa 5	Cepa 6	Control
Biocontrol	<i>F. Graminearum</i>	+	+	+	+	-
	Hongos de almacenamiento	-	-	+	+	-

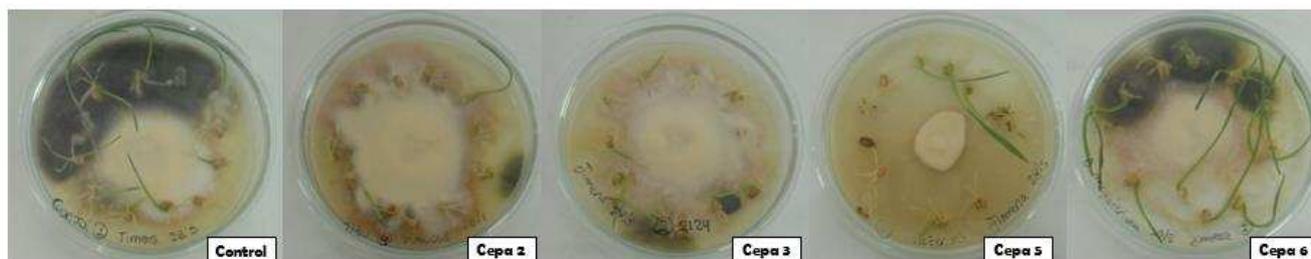


Figura 4. Representación de los resultados obtenidos en los ensayos en placa.

Los resultados obtenidos sugieren que las cepas ensayadas poseen potencial capacidad tanto como promotores de crecimiento como de biocontrol.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Casal, A y col., (2018). Aislamiento y caracterización de cepas antifúngicas de *Bacillus* spp. de suelo no rizosférico y rizosférico asociado a plantas de interés agronómico. IV Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental, Libro de Resúmenes.

Chen, XH y col., (2007). Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nature Biotechnology* 25, 1007-1014.

Ferraris, G y Couretot, L., (2014). Evaluación de tratamientos biológicos con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasiliense* en soja. Efectos sobre la fijación de Nitrógeno y el rendimiento. (INTA, Pergamino).

Ferraris, G y Faggioli, V., (2013). Inoculación con microorganismos con efecto promotor de crecimiento. Conocimientos actuales y experiencias realizadas en la Región Pampeana Argentina. INTA, Marcos Juárez.

Kloepper, E y col., (2004). Induced Systemic Resistance and Promotion of Plant Growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94, 1259-66.