

EMERGENCIA DE PLÁNTULAS DE *Hedeoma multiflora* Benth INOCULADAS CON RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS (PGPR)

Turco, F.R.^{1,2}; Banchio, E.³; Chaves, A.G.¹; Torres, L.E.¹

¹Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Cátedra de Genética. Córdoba. Argentina

²Becaria Doctoral SeCyT.

³INBIAS Instituto Biotecnología Ambiental y Salud (CONICET-Universidad Nacional de Río Cuarto).

florenciaturco@agro.unc.edu.ar

RESUMEN

Hedeoma multiflora Benth. es una hierba serrana aromática y medicinal nativa de la provincia de Córdoba. Dado que la demanda se cubre a través de la recolección de ejemplares silvestres, diezmando las poblaciones naturales, es necesario diseñar estrategias para lograr la preservación y utilización sostenible del recurso. Esto implica el conocimiento de las características de germinación y crecimiento de la especie. Las PGPR (rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas) son bacterias benéficas de vida libre del suelo que juegan un rol significativo en promover el crecimiento y desarrollo vegetal, al colonizar el sistema radicular de la planta. Se planteó como objetivo de trabajo evaluar el número de plántulas emergidas de *H. multiflora*, a partir de la inoculación de semillas con rizobacterias (PGPRs). El ensayo se llevó a cabo en el invernadero de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba. Se utilizaron 25 semillas recolectadas (abril, 2019) de las localidades Río Cuarto (Dpto. Río Cuarto) y Bialeto Massé (Dpto. Punilla), de la provincia de Córdoba, previamente desinfectadas. Las cepas que se utilizaron para la inoculación fueron *Pseudomonas putida* SJ04 y *Bacillus amyloliquefaciens* GB03. Los tratamientos fueron: *P. putida* (SJ04), *B. amyloliquefaciens* (GB03), Medio de cultivo y Control, realizando 3 repeticiones. Los resultados se efectuaron mediante el análisis de varianza (ANOVA) y como test a posteriori se aplicó el test de Fisher LSD, a nivel de probabilidad de $p \leq 0,05$. De acuerdo a los resultados obtenidos se concluye que *B. amyloliquefaciens* (GB03) y *P. putida* (SJ04) presentaron mejor comportamiento en la germinación y emergencia de las plántulas de *H. multiflora*. Así mismo la presencia de mucílago en las semillas de *H. multiflora*, podría ser un factor que interfiera en el tiempo de imbibición de las cepas analizadas. Es necesario repetir el ensayo, utilizando mayor número de semillas y provenientes de cosechas tardías.

Palabras clave: *Pseudomonas putida* SJ04, *Bacillus amyloliquefaciens* GB03, *Hedeoma multiflora*, PGPR, especies nativas.

INTRODUCCIÓN

Hedeoma multiflora Benth. (Tomillito de las sierras) es una hierba aromática y medicinal serrana nativa de la provincia de Córdoba, que crece en forma de pequeñas matas de 10-20cm de altura (Liébana, 2011) y presenta tallos decumbentes y erectos con escasas hojas. Esta especie se encuentra distribuida desde Santiago del Estero hasta Río Negro (Barboza *et al.*, 2006; Brunetti, 2008) y se la encuentra en manchones más o menos conspicuos, en lomas pedregosas y secas (Elechosa *et al.*, 2009) (**Figura 1**). Sus hojas, tallos verdes y flores están cubiertos por pelos glandulares simples que secretan aceites esenciales aromáticos, cuyos componentes químicos principales son L-limoneno, mentona y pulegona (Barboza *et al.*, 2001; Barboza *et al.*, 2006; Liébana, 2011). Debido a sus propiedades estimulantes, digestivas y carminativas, es una especie muy requerida para el consumo.



Figura 1. Planta de *Hedeoma multiflora* en su ambiente natural.

H. multiflora es recolectada como planta entera de su ambiente natural, a principios de floración o previo a ella (Barboza *et al.*, 2006) y forma desmedida para su comercialización disminuyendo así sus poblaciones e

impidiendo la resiembra natural. Debido a la presión por sobre-recolección está considerada una especie en peligro de extinción (Elechosa *et al.*, 2009; Liébana 2011, Martínez *et al.*, 2006).

Es importante para mantener la biodiversidad, la preservación de la flora nativa y en especial de *H. multiflora*. Para ello, es necesario iniciar programas de domesticación para proteger esta especie vegetal (Brunetti, 2008). La explotación sustentable y racional de estos recursos lo constituye su producción en sistemas de cultivos. Esto implica el conocimiento de las características de germinación y crecimiento de la especie (Liébana, 2011).

Las PGPR (rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas) son bacterias benéficas de vida libre del suelo que juegan un rol significativo en promover el crecimiento y desarrollo vegetal, al colonizar el sistema radicular de la planta; a través de diferentes mecanismos que pueden ser directos o indirectos (Kloepper *et al.*, 1993; Lucy *et al.*, 2004; Shrivastava *et al.*, 2015, Backer *et al.*, 2018). El aumento en la promoción del crecimiento puede atribuirse a la fijación de nitrógeno atmosférico, a la solubilización de fosfatos, a la producción de fitohormonas y de compuestos orgánicos volátiles mVOCs (del inglés: *Microbial Volatile Organic Compounds*) entre otros mecanismos (Rashid & Chung, 2017). Indirectamente las PGPR pueden promover el crecimiento vegetal al suprimir un amplio espectro de enfermedades virales, bacterianas, fúngicas y ataque de insectos herbívoros, a través de antagonismo microbiano o de la inducción de resistencia en la planta (Van Loon, 2007; Pineda *et al.*, 2010, Tonelli & Fabra, 2014; Salomon *et al.*, 2017; Shikano *et al.*, 2017).

Estudios recientes en plantas aromáticas han demostrado que la inoculación directa con distintas especies de rizobacterias PGPRs en plantas como mejorana (*Origanum majorana*), orégano mendocino (*Origanum x majoricum*), suico (*Tagetes minuta*), menta (*Mentha piperita*) y albahaca (*Ocimum basilicum*) producen un incremento significativo en el desarrollo vegetal y un incremento en el contenido de metabolitos secundarios (Banchio *et al.*, 2008, 2009, 2010, Cappellari *et al.*, 2013).

Como objetivo de trabajo se planteó evaluar el número de plántulas emergidas de *H. multiflora*, a partir de la inoculación de semillas con rizobacterias PGPRs. Es importante destacar que no siempre las bacterias PGPR presentaron el mismo grado de respuesta sobre la planta, lo que demuestra una gran especificidad en la relación microorganismo-planta.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se llevó a cabo en el invernadero de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba (UNC). Se utilizaron semillas recolectadas (abril, 2019) de poblaciones silvestres de las localidades de Río Cuarto (Dpto. Río Cuarto) y Bialet Massé (Dpto. Punilla), en la provincia de Córdoba.

La inoculación se realizó utilizando las siguientes cepas con capacidad de promover el crecimiento vegetal: **Pseudomonas putida* SJ04 aislada de la rizosfera de *Mentha piperita* de un cultivo comercial de la provincia de Córdoba (GenBank KF312464.1) (Santoro *et al.*, 2016); **B. amyloliquefaciens* GB03, (conocida anteriormente como *B. subtilis* GB03 (Choi *et al.*, 2014).

Las condiciones de cultivo para los ensayos de inoculación, colonias bacterianas aisladas, fueron crecidas sobre medio Luria Bertani (LB) (Luria y Burrows, 1955) agarificado, fueron transferidas a Erlenmeyers de 100 ml conteniendo 25 ml de medio líquido LB. Las cepas se hicieron crecer hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento, en un agitador a 30°C y 150 rpm.

Los tratamientos fueron: *Pseudomonas putida* (SJ04), *Bacillus amyloliquefaciens* (GB03), Medio de cultivo y el control se utilizó agua destilada, realizando 3 repeticiones. Se utilizaron 25 semillas de *H. multiflora*, por tratamiento que previamente fueron desinfectadas con alcohol 70% durante un minuto, luego enjuagadas durante un minuto con agua destilada estéril hasta eliminar los residuos de alcohol. Posteriormente se utilizó hipoclorito de sodio al 10% durante 10 minutos y realizando 2 enjuagues con agua destilada estéril hasta eliminar los residuos de hipoclorito.

Se prepararon los inóculos de las cepas las cuales se sembraron en caldo de cultivo LB y se incubaron por un período de 24-48 h. (hasta alcanzar una suspensión bacteriana con una concentración de 1×10^8 UFC/m), momento en el cual se utilizaron como medio para embeber las semillas.

El tiempo de imbibición varió de 30 a 60 minutos, utilizando un volumen de 5ml donde se sumergieron las 25 semillas previamente desinfectadas (**Figura 2**).



Figura 2. Envases con cepas de rizobacterias, semillas y bandejas de vermiculita estéril

Inmediatamente después de la imbibición, las semillas fueron colocadas con la ayuda de una pinza estéril, en bandejas con vermiculita estéril colocadas dentro de bolsas de nylon previamente identificadas. Las bandejas con las semillas inoculadas se ubicaron dentro del invernadero con riego periódico utilizando agua destilada (**Figura 3**).



Figura 3. Semillas inoculadas mantenidas en el invernadero de la Facultad de Ciencias Agropecuarias-UNC.

Las evaluaciones se realizaron diariamente, en las cuales se registró el número de plántulas emergidas. Las comparaciones entre los diferentes tratamientos, se efectuaron mediante el análisis de varianza (ANOVA) y como test a posteriori se aplicó el test de Fisher LSD, a nivel de probabilidad de $p \leq 0,05$. Se realizó el análisis

estadístico utilizado el programa Infostat 2020 (Di Rienzo *et al.*, 2020).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al cabo de 43 días de cultivo, se observó que los tratamientos correspondientes a GB03 y SJ04 fueron los que presentaron diferencias significativas en cuanto al número de plántulas emergidas con respecto al Control y al Medio de Cultivo (**Figura 4**).

A partir del día 31 pos siembra, se observó que los tratamientos GB03 y SJ04 se diferencian ampliamente de los tratamientos Medio de Cultivo y Control, debido al efecto provocado por la inoculación en la germinación de las semillas (**Figura 5**).

Analizando los resultados de acuerdo a los días transcurridos se pudo visualizar que de la siembra hasta los 24 días no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos: (GB03) *B. amyloliquefaciens*, (SJ04) *P. putida*, Control y Medio de cultivo.

A partir del día 25 hasta el día 43 de cultivo se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, siendo mayor el número de plántulas emergidas en los tratamientos (GB03) *B. amyloliquefaciens* y (SJ04) *P. putida* (**Figura 6**).

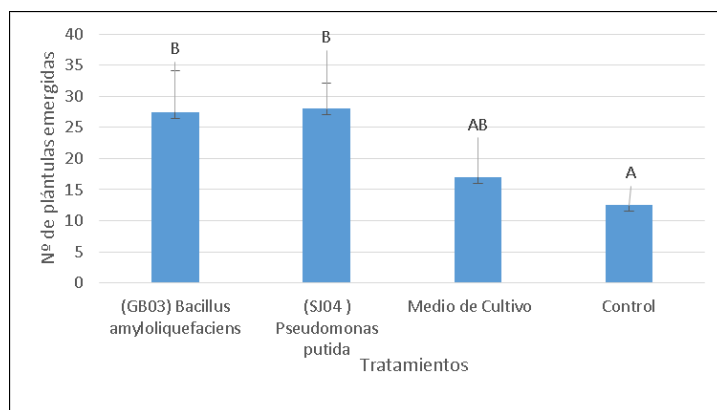


Figura 4. Número de plántulas emergidas en los tratamientos: GB03, SJ04, Medio de cultivo y Control a los 40 días de realizada la siembra (letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos para $p \leq 0,05$).

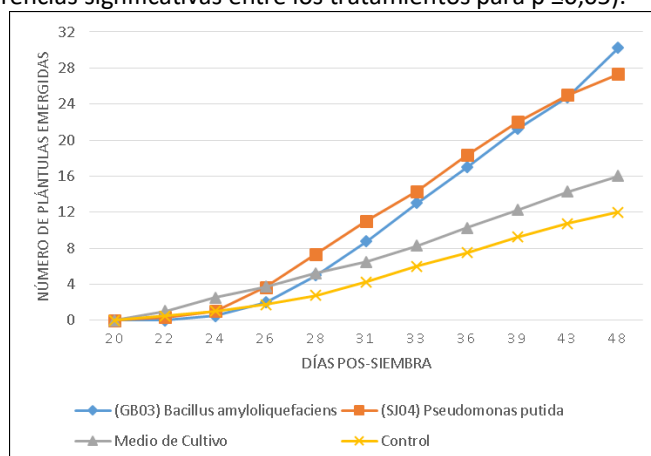


Figura 5. Número de plántulas emergidas en el transcurso de los 48 días de siembra.

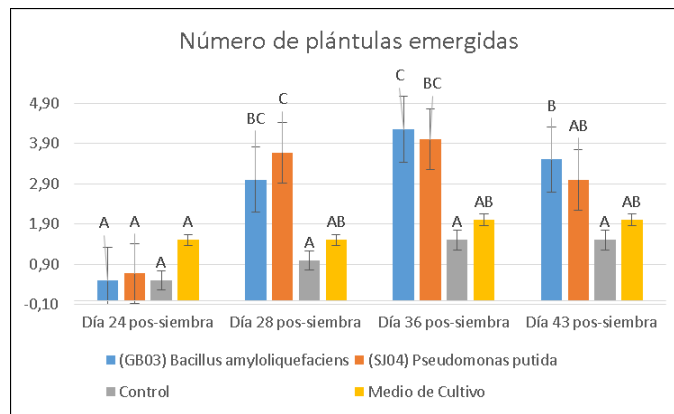


Figura 6. Comportamiento de los tratamientos de (GB03) *B. amyloliquefaciens*, (SJ04) *P. putida*, Control y Medio de cultivo en los días 24, 28, 36 y 43 pos-siembra de semillas de *H. multiflora*.

En el caso de *H. multiflora* la presencia de mucílago (**Figura 7**) puede ser otra causa que pueda influir en el corto tiempo de imbibición de las cepas observadas para lograr que las semillas adhieran a su superficie los microorganismos en estudio, sin la influencia del medio líquido añadido en la germinación o el tiempo de emergencia de la radícula en las semillas evaluadas (Darrant, 2007; Ogata *et al.*, 2008).



Figura 7. Semillas de *H. multiflora* con presencia de mucílago

Las diferencias observadas en las respuestas de la especie a las cepas inoculadas, podría deberse principalmente a las interacciones generadas entre ambos. Cada cepa durante la fase estacionaria (período en el cual es inoculada y en donde genera metabolitos secundarios) libera distintas sustancias como fitohormonas, antibióticos, ácidos orgánicos y enzimas que podrían beneficiar al cultivo, siempre y cuando se encuentren en cantidades necesarias para el crecimiento y desarrollo de la planta (Loper & Schroth, 1986); de la misma manera, las plantas producen diferentes moléculas químicas y sustancias que atraen a determinados microorganismos (quimiotaxis) y generan las condiciones adecuadas para su establecimiento y multiplicación (Dakora & Phillips, 2002). Para una

respuesta positiva de la planta a la cepa aplicada, debe existir entonces cierta afinidad entre los componentes generados por ambos organismos, caso contrario, se podrían generar interacciones que reduzcan la germinación, crecimiento o desarrollo de la planta (Alstrom & Burns, 1989; Carrillo *et al.*, 2000).

CONCLUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos se concluye que *B. amyloliquefaciens* (GB03) y *P. putida* (SJ04) estimulan la germinación y emergencia de las plántulas de *H. multiflora*. Siendo relevante en esta especie la época de recolección además es importante tener en cuenta la calidad de la semilla y la madurez al momento de la inoculación con rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas. La presencia de mucílago (sustancia que recubre la semilla) en las semillas de *H. multiflora*, podría ser un factor que interfiera en el tiempo de imbibición de las cepas analizadas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la Secretaria de Ciencia y Tecnología –Universidad Nacional de Córdoba (SeCyT-UNC) por el financiamiento de la beca doctoral de Turco, F.R.

BIBLIOGRAFÍA

- Alstrom, S. & R. G. Burns. 1989. Cyanide production by rhizobacteria as a posible mechanism of plant growth inhibition. *Biol. Fert. Soils* 7: 232 – 238.
- Asociación Tecnología y Desarrollo (TECNIDES). 1994. Estudio sobre cultivos in vitro de “tara” (*Caesalpinia spinosa*). Documento emitido por la FAO. Lima, Perú. 47pp.
- Backer, R, Rokem, JS, Ilangumaran, G, Lamont, et al. 2018. Plant growth-promoting rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable

- agriculture. *Front. Plant Sci.* 9:1473. 10.3389/fpls.2018.01473.
- Banchio, E, Bogino P, Zygadlo, J, Giordano, W. 2008. Plant growth promoting rhizobacteria improve growth and essential oil yield in *Origanum majorana* L. *Bioch. Syst. Ecol.* 36:766-771
- Banchio, E, Xie, X, Zhang, H, Paré, PW. 2009. Soil Bacteria Elevate Essential Oil Accumulation and Emissions in Sweet Basil. *J. Agric. Food Chem.* 57: 653-657.
- Banchio, E, Bogino, P, Santoro, M, Torres, L, Zygadlo, J, Giordano, W. 2010. Systemic induction of monoterpene biosynthesis in *Origanum x majoricum* by soil bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 58: 650-654.
- Barboza G.E., Cantero J.J., Nuñez C.O. y Ariza Espinar L. 2006. Flora Medicinal de la Provincia de Córdoba (Argentina) Pteridofitas y Antófitas silvestres o naturalizadas. Ed. Museo Botánico, Argentina, pp. 1251.
- Barboza G.E., Bonzani N., Filippa E.M., Luján M.C., Moreno R., Bugatti M., Decolatti N. y Ariza Espinar L. 2001. Atlas histo-morfológico de plantas de interés medicinal de uso corriente en Argentina. Museo botánico de Córdoba, Córdoba-Argentina, pp. 1126-1128.
- Brunetti P.C. 2008. Propagación in vitro de *Hedeoma multiflorum* Benth. y composición de aceites esenciales. Tesis de Grado. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.
- Cappellari, L, Santoro, MV, Nievas, F, Giordano, W, Banchio, E. 2013. Increase of secondary metabolite content in marigold by inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. *Appl. Soil Ecol.* 70:16-22.
- Carrillo, G., J. Juárez, D. Ruiz & R. Müller. 2000. Aumento del rendimiento de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) cuando la raíz se desarrolla colonizada por microorganismos. *Biotec. Aplic.* 17: 171 – 176.
- Choi, SK, Jeong, H, Kloepper, JW, Ryu, CM. 2014. Genome sequence of *Bacillus amyloliquefaciens* GB03, an active ingredient of the first commercial biological control product. *Genome Announc.* e01092-14.
- Dakora, F. & D. Phillips. 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low -nutrient environments. *Plant and Soil* 245: 35 – 47.
- Darrant Barreto, Nelson Valero, Adriana Muñoz & Arnaldo Peralta. (2007). Efecto de microorganismos rizosféricos sobre germinación y crecimiento temprano de *Anacardium excelsum*. *Rev. Zona Áridas* 11(1): 240 – 250.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2020. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Elechosa M.A., Aguirre E., Bandoni A.L., Di Leo Lira P.M.R., Fernández E.A., Heit C., Juárez M.A., López S., Martínez A.J, Martínez E., Marino A.M., Molina A.C., Molina A.M., Van Baren C.M., Viturro C.I. 2009, Manual de recolección sustentable de plantas aromáticas nativas de la región central y noroeste de la Argentina, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, 7-15 pp.
- Kloepper, J.W.E., 1993. Plant-growth-promoting rhizobacteria as 36iological control agents”. In: Metting, F.B. (Ed.), *Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management*. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 255–273.
- Liébana C. 2011. Caracterización citogenética de poblaciones de (*Hedeoma multiflora* Benth.) tomillito de las sierras. Tesis de Grado. Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.
- Loper J. & M. Scroth. 1986. Influence of bacterial source of indole – 3 – aceti acid on root elongation of sugar beet. *Physiol. Biochem.* 76: 386 – 389.
- Lucy, M, Reed, E., Glick, BR. 2004. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Anton Leeuw* 86:1-25.
- Luria, S. E. y Burrous, J. W. (1955). Hybridization between *Escherichia coli* and *Shigella*. *J. Bacteriol.* 74: 461-47.
- Martínez G., Planchuelo A., Fuentes E. y Ojeda M.S. 2006. A numeric index to establish conservation priorities for medicinal plants in the Paravachasca Valley. Córdoba. Argentina. *Biodiversity and Conservation*, 15: 2457-2475.
- Ogata, K; Arellano, C., Zuñiga, D. 2008. Efecto de diferentes bacterias aisladas de rizósfera de *Caesalpinia spinosa* en la germinación de diferentes especies vegetales cultivados. *Rev. Zonas Áridas* 12 (1).
- Pineda, A., Zheng S.-J., van Loon, JJA, Pieterse CMJ, Dicke, M. 2010. Helping plants to deal with insects: the role of beneficial soil-borne microbes. *Trends in Plant Science*, 15, 507–514.
- Rashid, MHO, Chung, YR. 2017. Induction of systemic resistance against insect herbivores in plants by beneficial soil microbes. *Front. Plant Sci.*8:1816.
- Salomon, MV, Funes Pinter I, Piccoli, P, Bottini, R. 2017. Use of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria as Biocontrol Agents: Induced Systemic Resistance Against Biotic Stress in Plants. In: Kalia V. (eds) *Microbial Applications Vol.2*. Springer, Cham.
- Santoro, VM, Bogino, PC, Nocelli, N, Cappellari, L, Giordano, W., Banchio, E. 2016. Analysis of plant growth-promoting effects of fluorescent *Pseudomonas* strains isolated from *Mentha piperita*

- rhizosphere and effects of their volatile organic compounds on essential oil composition. *Front. Microb.* 7: 1085.
- Shikano, I, Rosa, C, Tan, CW, Felton, GW. 2017. Tritrophic Interactions: microbe-mediated plant effects on insect herbivores. *Annu. Rev. Phytopathol.* 55:13.1-13.19
- Shrivastava, S, Egamberdieva, D, Varma, A. 2015. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and medicinal plants: the state of the art. En: Egamberdieva, D., Shrivastava, S. y Varma, A. (Eds.) *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Medicinal Plants.* (pp.1-16). New York, Estados Unidos: Soil Biology Series. Springer Books
- Tonelli, M, Fabra, A. 2014. The biocontrol agent *Bacillus* sp. CHEP5 primes the defense response against *Cercospora sojina*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30:2503-09
- Van Loon, LC. 2007. Plant response to plant growth-promoting rhizobacteria. *E. J. Plant Pathol.* 119: 243-254.