

# INCREMENTO DE PARÁMETROS BIOMÉTRICOS Y DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA RIZOSFÉRICA DE *Pinus pinea* MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO Y ECTOMICORRIZAS.

J.J. COLÓN FLORES; F.J. GUTIÉRREZ MAÑERO; M. RUÍZ PALOMINO; A. PROBANZA LOBO.

Universidad San Pablo CEU. Fac. CC. Experimentales y Técnicas, Urb. Montepríncipe, Ctra. Boadilla del Monte 28668 Madrid. (a.probanza@ceu.es)

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la inoculación de *Pinus pinea*, con las bacterias PGPRs *Bacillus licheniformis* y *Bacillus pumilus*, en combinación con la ectomicorriza *Pisolithus tinctorius* sobre parámetros biométricos de las plantas y actividad biológica rizosférica. La producción de fitohormonas (auxinas y giberelinas) por parte de las PGPRs mencionadas, produjeron un incremento significativo en la superficie y longitud aérea y radical, así como también el en peso seco de las plantas tratadas. Respecto a la actividad biológica rizosférica se evaluó mediante la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina y <sup>14</sup>C-Leucina, encontrándose que ésta fue mayor en las plantas tratadas, debido a que las plantas inoculadas exudaron mayores cantidades de amonio, nitratos y azúcares, los cuales quedan disponibles para las bacterias rizosféricas las que a su vez, intervienen en el reciclado de nutrientes.

**P.C.** *Pinus pinea*, PGPR, fitohormonas, biofertilizantes, Timidina/Leucina, rizosfera.

## SUMMARY

The aim of the present study was to evaluate the effect on *P. pinea* seedlings growth, of the PGPRs *Bacillus licheniformis* and *Bacillus pumilus* in combination with *Pisolithus tinctorius*, and microbial activity on plants rhizosphere. Plant hormone production by PGPR (IAA and GA<sub>3</sub>) yield a significant increase on root and aerial length and surface, as far as dry weight. As regards biological activity on rhizosphere (evaluated by TdR/Leu incorporation method) was higher on treated plants than control ones. This fact can be related with the bigger amounts of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, and sugar detected on root exudates of these plants.

**K.W.** *Pinus pinea*, PGPR, plant hormones, biofertilizer, rhizosphere.

## INTRODUCCIÓN

Un grupo importante de la microflora rizosférica está constituido por bacterias y hongos que estimulan el crecimiento vegetal a través de mecanismos que incluyen la mejora de la absorción de nutrientes, control biológico de patógenos y la producción de reguladores del crecimiento vegetal. Hay abundantes citas sobre la fisiología, ecología y biología molecular de estos microorganismos y su interacción con la planta (Kropp & Langlois 1990; Scgwintzer & Tjepkema 1990; Torrey 1992).

Las bacterias edáficas beneficiosas de vida libre se denominan Plant Growth Promoting Rhizobacteria, (literalmente, rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas) o por su acrónimo PGPRs (Kloepper *et al.*, 1989). Su aplicación como biofertilizantes con el fin de incrementar la producción primaria, cobra cada vez más importancia debido a los problemas ambientales por el uso excesivo de fertilizantes. Las PGPRs actúan sobre la planta directamente mediante la producción de fitohormonas, tales como auxinas, citoquininas y giberelinas (Bothe *et al.*, 1992; Probanza *et al.*, 1996; Gutiérrez Mañero *et al.*, 1996; Gutiérrez Mañero *et al.*, 2000), o indirectamente, reduciendo la incidencia de patógenos mediante movilización y competencia por nutrientes, tanto por C como por N, y nichos ecológicos (Ström *et al.*, 1994; Devliegher *et al.*, 1995), producción de sideróforos a través de metabolitos capaces de quelar eficazmente el Fe (Kloepper *et al.*, 1980; Leong, 1986) control de patógenos mediante antagonismos o competencia (Weller, 1988) sintetizando moléculas antifúngicas como la pioluteorina, tropolona, etc. (Lindbergh, 1981). Además, las rizobacterias no patógenas pueden inducir una resistencia sistémica en las plantas similar a la resistencia sistémica adquirida (SAR) cuando son atacadas por patógenos. La mediación de diferentes cepas bacterianas en la Resistencia Sistémica Inducida (SIR) ha sido demostrada contra hongos, bacterias y virus en diversos cultivos como cucurbitáceas, frijoles, tabaco, tomate, etc., (van Loon *et al.*, 1998).

No son abundantes los estudios orientados a PGPRs y plantas forestales. Sin embargo, Chanway

(1997) señala que, su uso es un sistema emergente para la obtención de plantas robustas destinadas a la repoblación forestal en suelos pobres.

El objetivo de este trabajo fue (i) evaluar el efecto de la inoculación en el crecimiento de plantulas de *Pinus pinea* con las PGPRs *Bacillus licheniformis*, y *Bacillus pumilus* y el hongo micorrízico *Pisolithus tinctorius* y (ii) evaluar el efecto sobre el reciclado de nutrientes en el suelo rizosférico como resultado de la inoculación.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Microorganismos:** las PGPRs utilizadas fueron *Bacillus licheniformis* B1 (CECT 5106), y *Bacillus pumilus* B2 (CECT 5105) aisladas y determinadas por Probanza *et al.*, (1996) después de un screening de 600 cepas aisladas de la rizosfera de *Alnus Glutinosa*, y caracterizadas como PGPRs por ser productoras de AIA (Gutiérrez Mañero *et al.*, 1996), así como también de 4 giberilinas (GA<sub>4</sub>, GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>20</sub>, Gutiérrez Mañero *et al.*, 2000). Por otra parte, se utilizó la ectomicorriza *Pisolithus tinctorius* (PT) comercializada por Mycor Plant, S.L.

**Condiciones de cultivo e inoculación:** Se emplearon envases forestales “Rootainers” tipo libro con 6 alvéolos individuales de 14.5 x 4.5 x 4.5 cm, que contenían un sustrato de turba “Flora Gard” y arena lavada en proporción 1:1 v/v previamente esterilizada. Las plantas proceden de un experimento en el que se ensayaron las cepas B1 y B2 con y sin hongo micorrizógeno durante su primera savia en condiciones de invernadero. Durante dicho período se mantuvieron con dos riegos de 2 minutos en días alternos desde el mes de mayo a junio, pasando a ser diarios en el mes de julio hasta septiembre, y desde octubre en adelante se continuó con el primer régimen de riego. Antes de realizar la inoculación se suspendieron los riegos 2 días antes y 2 después. Las plantas se inocularon con las PGPRs B2 y la combinación de B1 junto a la ectomicorriza PT. En cada caso, la concentración usada fue de 10<sup>8</sup> células g<sup>-1</sup> ó 10<sup>-5</sup> esporas g<sup>-1</sup> de suelo. Otro grupo de plantas no inoculadas se utilizaron como control. La inoculación se hizo a los 65 y a los 150 días después de germinadas. Estos momentos correspondieron al 15 de julio y 15 de noviembre de 1998 respectivamente. De dicho período se seleccionaron los 2 tratamientos más eficaces en sentido del crecimiento y vigor de la parte aérea y radical.

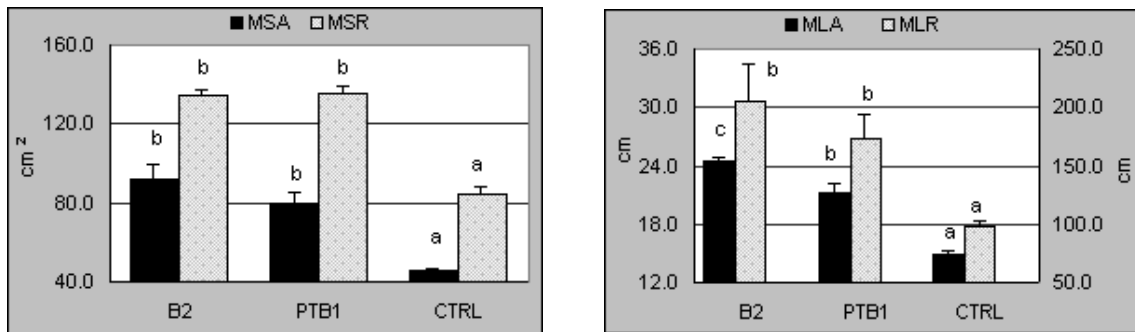
**Trasplante a condiciones de campo y muestreos:** Una tercera inoculación se realizó en la primavera (marzo) de 1999, es decir cuando las plantas comenzaban a desarrollar su segunda savia, y una semana después se trasplantaron con todo el cepellón a macetas de 18 cm x 22 cm que contenían un suelo procedente de un sistema forestal incendiado y se mantuvieron en condiciones de campo.

Se realizaron dos muestreos; el primero, la primera semana de julio y el segundo, la última semana de noviembre. Se seleccionaron estas fechas a fin de abarcar dos momentos críticos en la fisiología de la planta: el primero, el momento de mayor actividad fotosintética y crecimiento y el segundo, el momento de parada fisiológica invernal, aunque aquí se presentan los valores medios de los dos tiempos de muestreo.

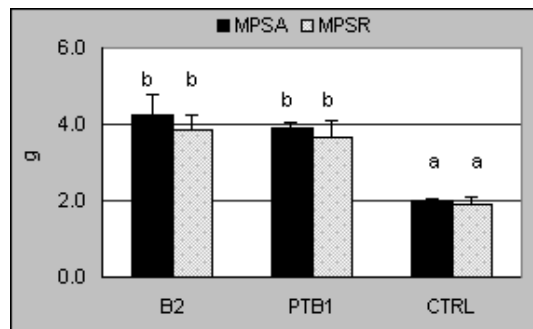
**Análisis de las plantas y de la rizosfera:** Los parámetros biométricos medidos fueron: superficie aérea (SA), superficie radical (SR), longitud aérea (LA), longitud radical (LR) y peso seco, a través de un sistema de análisis de imagen Delta-T con el software Dias II. Para cada tratamiento y tiempo de muestreo se utilizaron 3 plantas que previamente habían sido prensadas. También, se pesó la parte aérea y radical por separado. Además, se midió la actividad biológica de la rizosfera mediante la incorporación de precursores radiactivos (<sup>3</sup>H-Thy y <sup>14</sup>C-L-Leu) (Bååth, 1994).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los ANOVAS y LSD realizados con los resultados indican diferencias significativas entre las plantas inoculadas y el control en todos los parámetros biométricos tal y como se observa en las Figuras 1, 2 y 3. Estos efectos se relacionan con el hecho constatado de que B1 y B2 son productoras de auxinas (Gutiérrez Mañero *et al.*, 1996), y de giberelinas (Gutiérrez Mañero *et al.*, 2000). Es destacable que dados los resultados biométricos, las bacterias producen en la rizosfera cantidades equilibradas desde el punto de vista fisiológico, de auxinas y GAs, y que redundan en un aspecto vigoroso en las plantas. En ningún caso se ven efectos de sobredosis de ninguna de las hormonas.

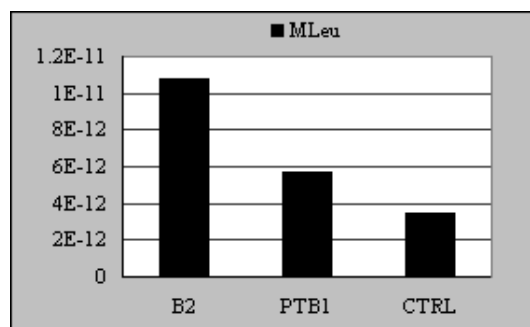
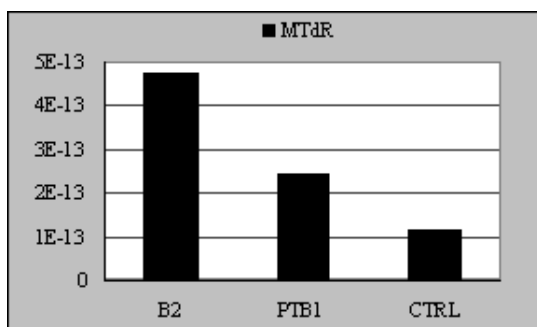


**Figuras 1 y 2** Resultados de los valores medios (media de los dos tiempos de muestreo) superficie aérea -MSA- y radical -MSR- (fig. izquierda) y de la longitud aérea -MLA- y radical -MLR- (fig. derecha) de las plantas bajo el efecto de los diferentes inoculantes en los ensayos de campo en el suelo forestal quemado. Las letras a, b, c, indican diferencias entre tratamientos. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).



**Figura 3.** Resultados de los valores medios (media de los dos tiempos de muestreo) del peso seco aéreo -MPSA- y radical -MPSR- de las plantas bajo el efecto de los diferentes inoculantes en los ensayos de campo en el suelo forestal quemado. Las letras a, b, indican diferencias entre tratamiento. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Respecto a la actividad biológica de la rizosfera, medida a través de la incorporación de  $^3\text{H}$ -Timidina y  $^{14}\text{C}$ -Leucina (TdR/Leu), se encontró que ésta fue mayor en las plantas tratadas, como puede observarse en las figuras 4 y 5. Si relacionamos este hecho con la analítica efectuada (Colón Flores *et al.*, 2000), sobre los exudados de esas plantas (Tabla I), podemos deducir que la mayor actividad rizosférica de las plantas inoculadas, se vincula a una mayor tasa de exudación de amonio, nitratos y azúcares, los cuales quedan disponibles para las bacterias rizosféricas las que a su vez, intervienen en el reciclado de nutrientes tal y como lo señalan Perry *et al.*, 1989 y Hart *et al.* 1994 cuando afirman que los microorganismos del suelo son componentes integrales de los ecosistemas forestales, desempeñando papeles clave en el reciclado de nutrientes, mantenimiento de la estructura del suelo y regulación del crecimiento de las plantas. Pero ésta actividad microbiana, es particularmente más intensa en la rizosfera, zona rica en nutrientes alrededor de las raíces, donde se acumula una gran variedad de compuestos orgánicos debido a la exudación, secreción y deposición (Harley & Smith, 1983). Bowen & Rovira, 1991, también apoyan lo anterior cuando exponen que la liberación de compuestos orgánicos por las raíces tiene una influencia decisiva sobre la disponibilidad de nutrientes y, en consecuencia, sobre la actividad microbiana .



**Figuras 4 y 5** Resultados de los valores medios (media de los dos tiempos de muestreo) de la incorporación de <sup>3</sup>H-Timidina -MTdR- y <sup>14</sup>C-L-Leucina -MLeu- en nmol g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> en la rizosfera de las plantas de *Pinus pinea* bajo el efecto de los diferentes inoculantes en los ensayos de campo en el suelo forestal quemado.

**Tabla I.** Resultados de los valores medios (media de los dos tiempos de muestreo) del contenido en amonio, nitratos y azúcares en los exudados de las plantas. El error estándar aparece en cursiva. Las letras a, b, c, indican diferencias entre tratamiento. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas (p<0.05) (datos de Colón Flores *et al.*, 2000)

TRATAMIENTO	µg NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> / ml	µg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> / ml	µg azúcares / ml
B2	0.245 ± 0.016 c	6.75 ± 0.340 b	68.98 ± 1.204 c
PTB1	0.184 ± 0.016 b	9.70 ± 0.529 c	54.55 ± 0.248 b
CTRL	0.049 ± 0.05 a	4.50 ± 0.541 a	36.24 ± 2.04 a

Es importante destacar que el efecto positivo de la inoculación sobre la actividad rizosférica mediante un incremento en la exudación, no solo no reduce las tasas de crecimiento de las plantas (por desviación de fotosintatos vía exudación), sino que, coexiste con una mejora en la biometría de las plantas. De esta manera, la utilización de las PGPRs y ectomicorriza en las condiciones ensayadas, producen un doble beneficio: (i) incremento de la biomasa aérea y radical, y (ii) mejora de la fertilidad del suelo. Como conclusión más relevante del presente estudio podemos señalar que el uso de PGPRs es tal y como señala Chanway (1997):

la técnica de inocular PGPRs puede llegar a ser una forma barata y respetuosa con el medio ambiente para la regeneración de plántulas leñosas, puesto que suelen soportar condiciones extremas después del transplante.

En la medida que el interés por esta técnica crece, aumenta la investigación, y los factores que contribuyen a la variabilidad en la respuesta de crecimiento al inóculo se conocen mejor, de forma que, podrá mejorarse la inoculación bacteriana como herramienta para la reforestación.

Además, existen implicaciones prácticas relacionadas con la viabilidad a largo plazo del almacenamiento del inóculo, y la posible potenciación de la persistencia de las bacterias en condiciones de campo, durante períodos de situaciones adversas usando PGPRs gram positivas esporuladas (por ejemplo *Bacillus* o *Streptomyces*).

## BIBLIOGRAFIA

- BÅÅTH, E. (1994). *Thymidine and Leucine incorporation in soil bacteria with different cell size*. Microb. Ecol. 27:267-278
- BOTHE, H.; KÖRSGEN, H.; LEHMACHER, T. y HUNDESHAGEN, E. (1992). *Differential effects of Azospirillum, auxin and combined nitrogen on growth of the roots of wheat*. Symbiosis. 13: 167-179.
- BOWEN, G.D. & ROVIRA, A.D. (1991). *The rhizosphere, the hidden half of the hidden half*. En: Plant Roots-The Hidden Half, (Y. Waisel, A. Eshel y U. Kafkafi, eds.) Marcel-Dekker, Nueva York. 641-649 pp.
- COLÓN FLORES, J.J.; LUCAS GARCÍA, J.A.; RAMOS, B.; GUTIÉRREZ MAÑERO, FJ; PROBANZA, A. (2000). *Increase in free nitrogen fixation in the rhizosphere of Pinus pinea seedlings inoculated with PGPRs in a burned forest soil*. Proc. of 4th European N. Fix. Conference Ed. Junta de Andalucía, Consj.de Agr. y Pesca (eds.), Sevilla pp 157.
- CHANWAY, C.P. (1997). *Inoculation of tree roots with plant growth promoting soil bacteria: an emerging technology for reforestation*. Forest Science 43: 99-112

- DEVLIEGHER, W; SYAMSUL ARIF, MA. y VERSTRAETE, W. (1995). *Survival and plant growth promotion of detergent-adapted Pseudomonas fluorescens ANP15 and Pseudomonas aeruginosa 7NSK2*. Appl. Environ. Microbiol. 61(11): 3865-3871.
- GUTIÉRREZ MAÑERO, FJ; ACERO, N, LUCAS, J.A. y PROBANZA, A (1996). *The influence of native rhizobacteria on european alder [Alnus glutinosa (L.) Gaertn] growth. II. Characterization of growth promoting and growth inhibiting strains*. Plant Soil 182:67-74
- GUTIÉRREZ-MAÑERO, F.J.; RAMOS-SOLANO, B.; PROBANZA, A.; MEHOUACHI, J.; TADEO, F.R.; TALON, M. (2000). *The plant-growth-promoting rhizobacteria Bacillus pumillus and Bacillus licheniformis produce high amounts of physiologically active gibberellins*. Physiologia Plantarum. En prensa.
- HARLEY, J.L. & SMITH, S.E. (1983). *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press. London 483.
- HART, S.C.; NASON, G.E.; MYROLD, D.D. y PERRY, D.A. (1994). *Dynamics of gross nitrogen transformation in an old-growth forest: the carbon connection*. Ecology. 75:880-891.
- KLOEPPER, J.W.; SCHROTH, M.N. y MILLER, T.D. (1980). *Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield*. Phytopathol. 70:1078-1082.
- KLOEPPER, J.W.; LIFSHITZ, R. y ZABLOTOWICZ, R.M. (1989). *Free-living inocula for enhancing crop productivity*. Trends Biotechnol. 7:39-43.
- KROPP, B.R. & LANGLOIS, C.G. (1990). *Ectomycorrhizae in reforestation*. Can. J. For. Res. 20:438-451.
- LEONG, J. (1986). *Siderophores their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens*. Ann. Rev. Phytopathol. 24:187-209.
- LINDBERGH, G.D. (1981) *An antibiotic lethal to fungi*. Plant Disease. 65:680-683.
- PERRY, D.A.; AMARANTHUS, M.P.; BORCHERS, J.G.; BORCHERS, S.L.; BRAINERD, R.E. (1989). *Bootstrapping in ecosystems*. Bioscience. 39:230-237.
- PROBANZA, A.; LUCAS, J.A.; ACERO, N. y GUTIÉRREZ MAÑERO, F.J. (1996). *The influence of native rhizobacteria on european alder [Alnus glutinosa (L.) Gaertn] growth. I. Characterization of growth promoting and growth inhibiting strains*. Plant and Soil. 182: 59-66
- SCHWINTZER, C.A. & TJEKEMA, J.D. (EDS.) (1990). *The biology of Frankia and actinorrhizal plants*. Academic Press. San Diego. 408p.
- STRÖM, L.; OLSON, T.; POKOJSKA-BURDEZEIJ, A. (1994). *Differences between calcifuge and acidifuge plants in root exudation of low-molecular organic acids*. Plant and Soil. 167: 239-245.
- TORREY, J.G. (1992). *Can plant productivity be increased by inoculation of tree roots with soil microorganism?*. Can. J. For. Res. 22:1815-1823
- VAN LOON, L.C.; KABER, P.A.H., PIETERSEN, C.M.J. (1998). *Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria*. Ann. Rev. Phytopathol. 36:453-483
- WELLER, D.M. (1988). *Biological control of soil borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria*. Ann. Rev. Phytopatol. 26: 379-407.