

“Ensayos de germinación de semillas de tomate platense (*Solanum lycopersicum*) inoculadas con levaduras y actinobacterias”



Ana Eugenia MARI

Universidad Nacional de Río Negro (UNRN) - Tecnicatura en Viveros - Escuela de
Producción Tecnología y Medio Ambiente - San Carlos de Bariloche - Argentina

Informe de Práctica Laboral

Institución: MABB-ves - IPATEC (CONICET - UNComahue)

Período: Enero - abril 2022

Fecha de entrega: Diciembre 2022

Tutoras en UNRN: Lic. Biól. Paola Andrea Pizzingrilli e Ing. Agr. Liliana Nijensohn

Tutora en IPATEC: Dra. Biól. María Cecilia Mestre y Lic. Biól. Micaela Boenel

Profesor de la práctica laboral: Ing. (Mg.) Ariel Mazzoni

Director de la carrera: Tec.Viv. Gustavo Sanchez

Índice

1. Introducción	2
1.1. Acerca de la institución: IPATEC - MABB-ves	2
1.2. Ubicación del laboratorio y período de práctica	2
1.3. Infraestructura	3
1.4. Microorganismos	4
1.5. Especie utilizada en los ensayos	5
2. Objetivos	6
2.1. Objetivo general	6
2.2. Objetivos específicos	6
3. Materiales y métodos	6
3.1. Generalidades del método de trabajo empleado	7
3.1.1. Desinfección del material y área de trabajo	7
3.1.2. Microorganismos utilizados durante la práctica	8
3.1.3. Origen, desinfección, inoculación y siembra de semillas	9
3.1.4. Toma de datos y análisis de resultados	11
3.2. Puesta a punto del método a utilizar	13
3.2.1. Medios de cultivo y concentración de cloruro de sodio	13
3.2.2. Disposición y elección de las placas en ambiente controlado	15
3.3. Evaluación de los ensayos con levaduras y actinobacterias	16
4. Resultados	18
4.1. Asepsia, sanidad y medios de cultivo de los ensayos	18
4.2. Envases y posición de placas	19
4.3. Análisis estadísticos de resultados	19
5. Conclusiones	21
6. Observaciones y sugerencias para futuros ensayos	22
7. Bibliografía	24
8. Anexo	26

1. Introducción

1.1. Acerca de la institución: IPATEC - MABB-ves

El Instituto Andino Patagónico de Tecnologías Biológicas y Geoambientales (IPATEC) se creó desde dos instituciones de amplia trayectoria en la región como son el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y Centro Regional Universitario Bariloche (CRUB) de la Universidad Nacional del Comahue (UNCo), con el objetivo de dar respuestas a tareas de índole práctica en áreas de biotecnología y geología ambiental aplicada, y que los avances en investigación generados se vinculen y transfieran a la sociedad y al sector productivo de San Carlos de Bariloche y sus alrededores (Web CONICET, 2022).

Dentro del IPATEC se encuentra el laboratorio Microbiología Aplicada y Biotecnología vegetal y del suelo (MABB-ves), lugar donde se realizó esta práctica laboral, asociada al trabajo de investigación diseñado por la Dra. Biól. María Cecilia Mestre y la Lic. Biól. Micaela Boenel para su tesis doctoral.

1.2. Ubicación del laboratorio y período de práctica

La práctica se llevó a cabo entre enero y abril del 2022, en las instalaciones del laboratorio de IPATEC-MABB-ves ($41^{\circ} 12' 87''$ S, $71^{\circ} 42' 03''$ O, 840 ms.n.m.) (Fig. 1 y 2) y en el laboratorio de microbiología del CRUB ($41^{\circ} 14' 46''$ S $71^{\circ} 31' 58''$ O) de la ciudad de San Carlos de Bariloche.

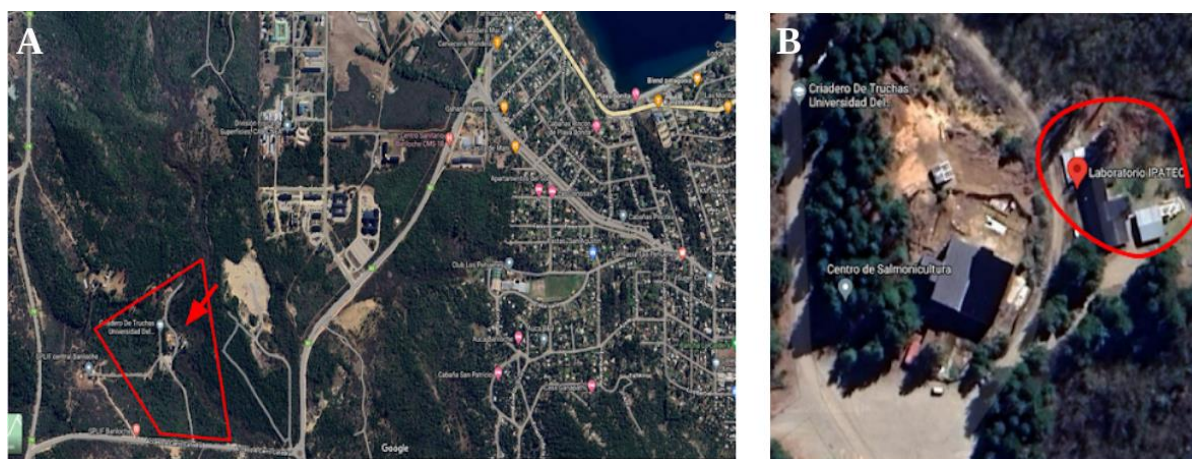


Figura 1: **A.** Imagen satelital, Google Erth, ubicación del predio de IPATEC. **B.** Laboratorio MABB-ves.

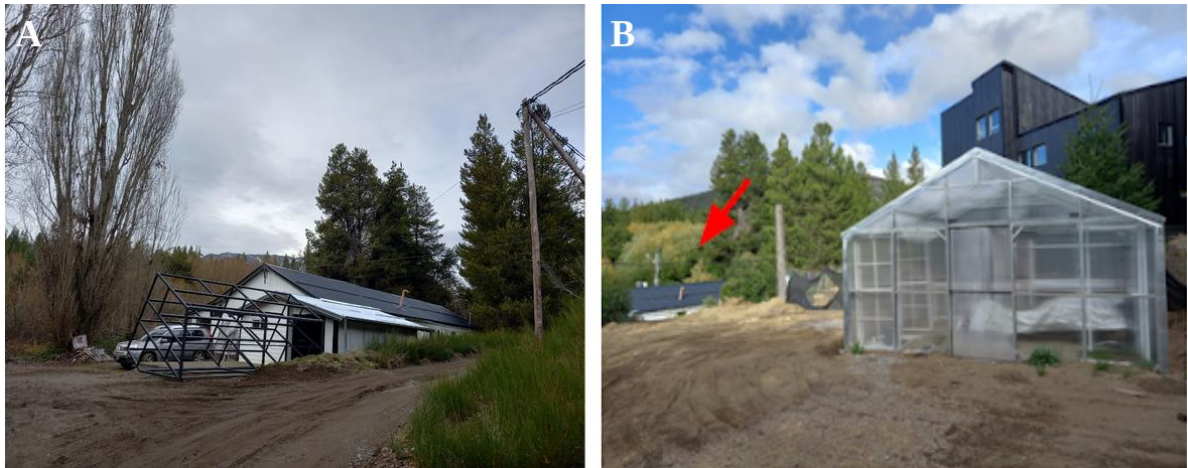


Figura 2: A. Laboratorio MABB-ves. B. Invernadero en construcción y al fondo a la izquierda el laboratorio de MABB-ves.

1.3. Infraestructura

El laboratorio de MABB-ves cuenta con: área de laboratorio con mesada para trabajar con la asepsia que generan tres mecheros Bunsen y un tubo UV, una cámara de germinación, un freezer, una heladera, una balanza granataria, conductímetro, área de lavado y autoclave. Además cuenta con un área de escritorios como se muestra en las figuras 3 y 4.



Figura 3: Vista general del laboratorio MABB-ves.



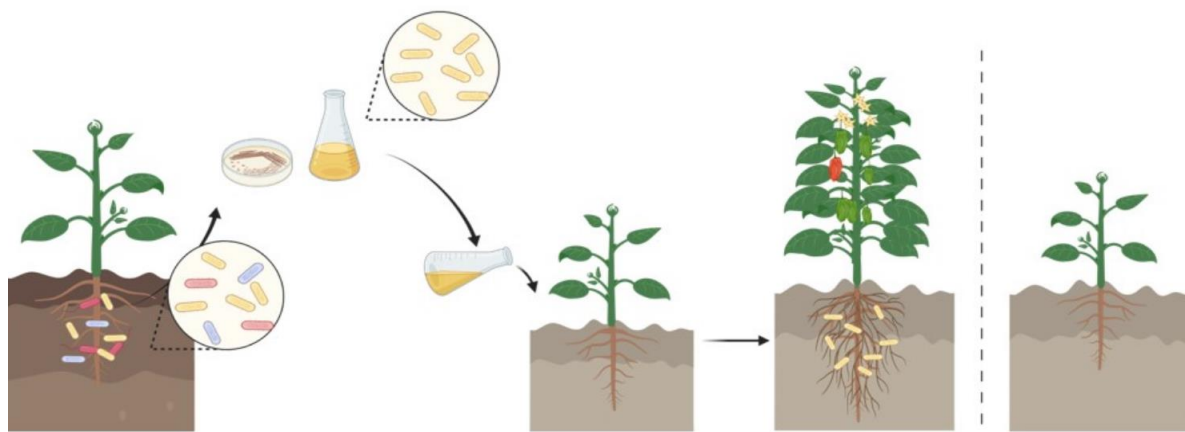
Figura 4: Equipamiento en IPATEC. **A.** Área de limpieza. **B.** Autoclave. **C.** Cámara de germinación.

1.4. Microorganismos

Los microorganismos del suelo comprenden un gran grupo de organismos que pueden ser patógenos o benéficos y se concentran principalmente en la rizósfera (zona cercana a las raíces), entre los 2-10 cm de profundidad. Pueden soportar suelos pobres y con baja humedad. Cumplen una función fundamental en la degradación de la materia orgánica del suelo y mantienen su fertilidad.

Las levaduras y actinobacterias (hongos eucariotas y bacterias procariotas respectivamente) utilizadas en este trabajo son microorganismos nativos de la Patagonia norte, que generan asociaciones simbióticas benéficas con las plantas. Dichos microorganismos se adaptan a condiciones de salinidad que otros no toleran y promueven el crecimiento vegetal. Pueden soportar medios con alta salinidad (10 % p/v). Tienen la capacidad de mejorar la absorción de agua y de fosfatos entre otros nutrientes, producen sideróforos (que ayudan a la absorción de nutrientes por parte de las plantas), producen auxinas, giberelinas y citoquininas, hormonas reguladoras del crecimiento vegetal como el ácido indol 3-acético (AIA) (que influye en el crecimiento de las raíces), producen también antifúngicos y antibióticos (inhibiendo la proliferación de patógenos). Por lo tanto, influyen en la tolerancia a la sequía y mejoran el establecimiento, el crecimiento y rendimiento de las plantas, son reguladores de patógenos de suelo y controladores de enfermedades poscosecha. Por tal motivo, conforman parte del grupo de microorganismos a utilizar como una innovadora forma de manejo de cultivos, como agentes de biocontrol y promotores de crecimiento vegetal (El-Tarabily et al, 2003-2006; Mestre et al, 2016; Solans et al, 2022).

En la figura 5 se muestra un esquema gráfico de la extracción de microorganismos de suelo hasta su utilización como inóculos (Serrano et al, 2022).



Aislamiento ➔ Siembra de ➔ Inoculación ➔ Evaluación
microorganismos con y sin inóculo

Figura 5: Esquema gráfico del proceso de extracción e inoculación de microorganismos de suelo.

1.5. Especie utilizada en los ensayos

La especie elegida por las investigadoras para este trabajo fue *Solanum lycopersicum* (tomate), utilizada comúnmente en ensayos por ser de rápido crecimiento y con capacidad de manifestar respuestas a diferentes condiciones de cultivo. Según indica Goykovic Cortés & Saavedra del Real (2007), las plantas de tomate que se cultivan en medios salinos tienden a disminuir su rendimiento por ser sensible a la salinidad, con una tolerancia hasta 2,5 dS/m. La respuesta de las plantas de tomate depende de la concentración de sales a que se exponen y de la especie o cultivar de que se trate y del tiempo de exposición al estrés. Todas las partes de las plantas de tomate se ven alteradas por la salinidad. A medida que aumenta el contenido de sales en el medio, se observa: menor germinación, raíces más cortas y reducción del área foliar (que provoca un menor rendimiento por disminución de frutos en tamaño y cantidad).

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Realizar y evaluar ensayos de germinación con semillas de tomate platense (*Solanum lycopersicum*) sometidas a diferentes concentraciones salinas e inoculadas con levaduras y actinobacterias, como parte de un trabajo de investigación con microorganismos del suelo de Patagonia norte.

2.2. Objetivos específicos

- Aprender la forma de trabajo en condiciones de asepsia para el desarrollo de la actividad en el laboratorio de microbiología.

- Poner a punto el método a utilizar.

- Evaluar la génesis radicular y las plántulas de tomate platense de semillas inoculadas con levaduras y actinobacterias sembradas en medios de diferentes concentraciones salinas.

3. Materiales y métodos

Se realizaron cuatro ensayos de germinación de diseño factorial, consecutivos e independientes de una semana de duración cada uno, con semillas de tomate platense inoculadas con levaduras o actinobacterias y bajo diferentes concentraciones de salinidad, en ambiente controlado (Fig. 6). Todos los ensayos contaron con un testigo sin microorganismos y sin salinidad.

En el cierre de cada ensayo, se ajustó la metodología y esto se desarrolló en los siguientes ítems:

- 3.1. Generalidades del método de trabajo empleado

- 3.2. Puesta a punto del método a utilizar

- 3.3. Evaluar los ensayos con levaduras y actinobacterias

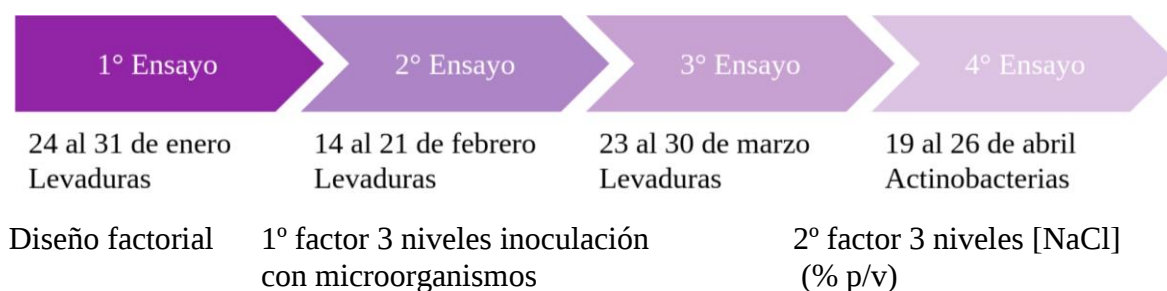


Figura 6: Línea de tiempo del diseño de los ensayos realizados con sus respectivos microorganismos y concentración de salinidad.

3.1. Generalidades del método de trabajo empleado

3.1.1. Desinfección del material y área de trabajo

La desinfección de manos, mesadas y cámara de germinación en el laboratorio se realizó con alcohol 70% v/v y espadol 5% v/v y para la desinfección de las semillas se usó lavandina 20% v/v.

Se utilizó luz UV por 30 minutos para bajar la carga microbiana, previo a poner los medios en las placas (plaquear) y de la siembra de semillas.

Se esterilizaron en autoclave: cajas de Petri, pipetas, tubos Falcon de 50 ml (todo envuelto en papel madera y rotulado), botellas caramelo de litro con agua destilada y agua de la canilla (rotuladas y con papel aluminio en la tapa semicerrada) (fig. 7). Los medios de cultivo se esterilizaron, se plaquearon y rotularon, un día previo a la siembra para control de la esterilidad de los mismos.

La desinfección, inoculación con microorganismos y siembra de semillas de tomate platense se realizó entre mecheros Bunsen encendidos, método que genera un área de trabajo aséptica, mientras que las pinzas, cucharas y colador se flamearon con alcohol 96 vol.

Se trabajó con delantal y barbijo. Al manipular los microorganismos también se utilizaron guantes.

Al finalizar cada ensayo se descontaminó el material en autoclave para la eliminación de todo tipo de microorganismos.

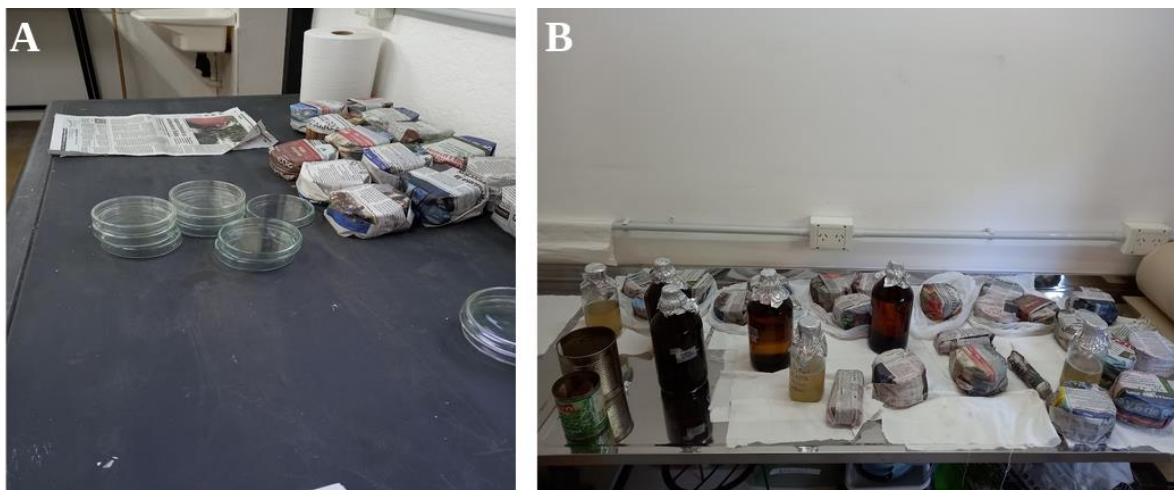


Figura 7: A. Preparación del material a esterilizar. **B.** Material esterilizado en autoclave.

3.1.2. Microorganismos utilizados durante la práctica

Este apartado describe la siembra y resuspensión específica para levaduras y actinobacterias utilizadas en esta práctica, actividad que fue realizada por la Lic. Micaela Boenel en el laboratorio del CRUB en el cual fui observadora.

En los ensayos se utilizaron como inóculos dos tipos de levaduras o dos tipos de actinobacterias nativas de la Patagonia norte, en estudio (según correspondió), cada una con código de letras y números. Se realizaron tres tratamientos para cada ensayo con un control sin los microorganismos.

-Levaduras (x2): *Candida sake* (TR5) y *Lachancea nothofagi* (PR48) más un control sin inóculo (Y-).

-Actinobacterias (x2): *Streptomyces* sp. (Mm 40), *Micromonospora* sp. (Mm 18) más un control sin inóculo (A-).

-Las **levaduras** utilizadas como inóculos se sembraron en cajas de Petri, dentro del flujo laminar en el laboratorio del CRUB, 72 horas antes de la siembra de semillas, en medio MYP (% p/v, extracto de malta 0,7, extracto de levaduras 0,05, peptona de soja 0,25, agar 1,5) y se incubaron a 28 °C. Además se prepararon tubos Falcon con agua peptonada 1% v/v estéril. El día de la siembra, las levaduras se resuspendieron en agua peptonada, se estimaron 10^6 células/ml mediante la densidad óptica (DO) de 0,3 en un espectrofotómetro (aparato que mide la turbidez en la preparación de microorganismos). Se reservó El Tubo Falcon con agua peptonada para el tratamiento control, sin inóculo (Fig. 8).



Figura 8: Secuencia de siembra y resuspensión de levaduras y medición de la densidad óptica.

-Las **actinobacterias** se sembraron una semana antes de la siembra de semillas, en el CRUB, dentro del flujo laminar, en Erlenmeyers en un medio llamado Emerson YpSs líquido (g l^{-1}) (extracto de levadura 4,0; almidón 15,0; K_2HPO_4 1,0 y $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ 0,5 según Emerson 1958) y se incubaron a 28 °C.

El día de la siembra de semillas, las actinobacterias se re suspendieron en tubos Falcon de 50 ml con 30 ml con el mismo medio y se realizaron diluciones sucesivas del inóculo, hasta alcanzar un recuento de 30 a 300 colonias. Se reservó El Tubo Falcon con Emerson para el tratamiento control sin inóculo (Fig. 9).

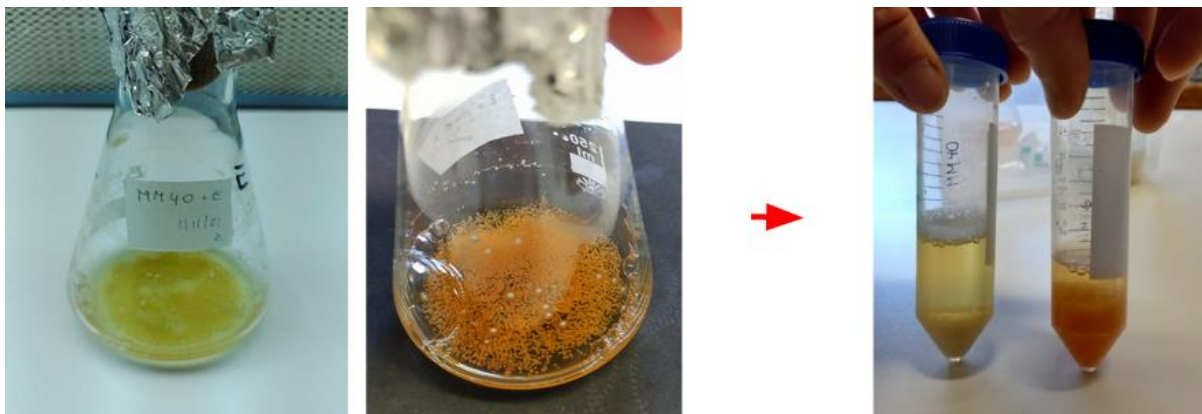


Figura 9: Secuencia de resuspensión de actinobacterias en tubos Falcon.

3.1.3. Origen, desinfección, inoculación y siembra de semillas

En cada ensayo de germinación, se utilizaron tres fracciones de un mismo lote de semilla de tomate platense (*Solanum lycopersicum*) elegidas aleatoriamente. Se calculó la cantidad de semillas por gramo, se pesaron y reservaron para los ensayos (Fig. 10). Se lavaron y desinfectaron el día de la siembra. Las mismas fueron compradas en el vivero Salamida de

San Carlos de Bariloche, en bolsitas de 1 gramo aproximadamente, de venta a granel, marca Garden Giusti Chuchuy S.A. (sin n° de lote, cosecha o partida).

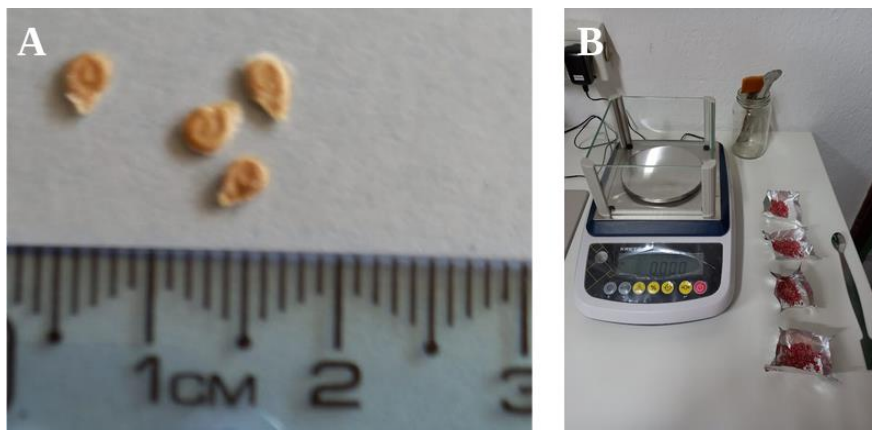


Figura 10: A. Semillas de tomate. B. Preparación de las semillas para los ensayos.

La desinfección de las semillas se realizó con tres lavados de hipoclorito de sodio al 20% v/v, partiendo de hipoclorito comercial 46 gr/L (en tubos Falcon de 50 ml) durante dos minutos con agitación manual y tres enjuagues con agua destilada estéril; se descartaron por vanas las semillas que flotaban en el primer enjuague.

Las semillas desinfectadas en tubos Falcon, se inocularon al colocarles la solución con la suspensión de microorganismos correspondiente; el cual se agitó manualmente durante dos minutos, para luego descartar el líquido.

Las semillas se sembraron con pinzas, una por una, y se dispusieron en una línea por debajo del ecuador de las placas. Todo el procedimiento se realizó entre mecheros Bunsen, en las cajas de Petri plaqueadas y rotuladas previamente, según tratamiento y repetición (Fig. 11 y 12).

Otros materiales utilizados durante estos procedimientos fueron: bases para tubos Falcon, colador, vaso para descarte, alcohol 96 % v/v, espadol 5 % v/v, papel de limpieza, pinzas y cuchara.

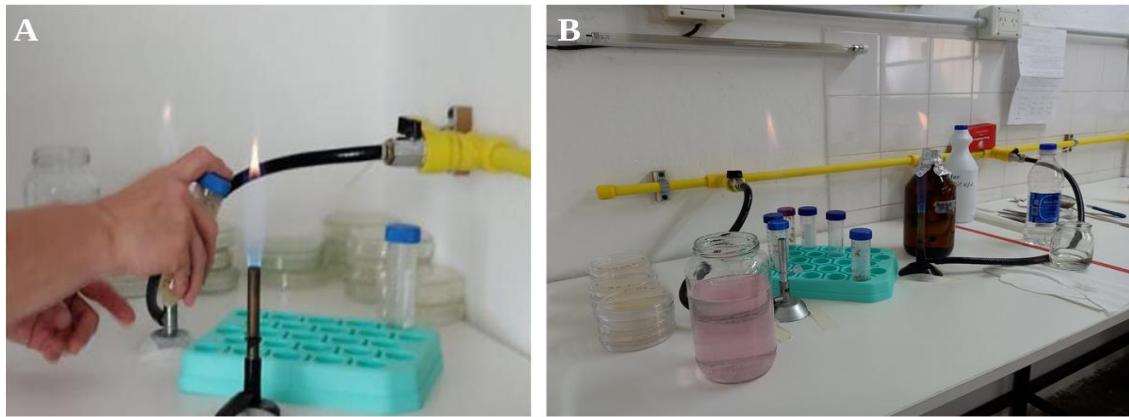


Figura 11: A y B. Desinfección e inoculación de semillas de tomate.

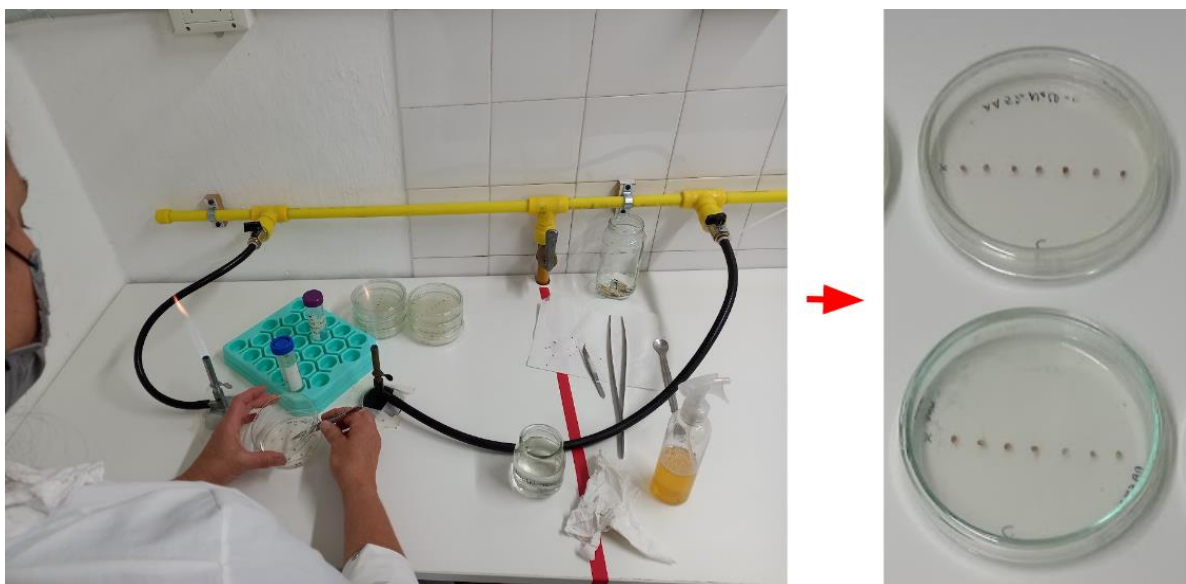


Figura 12: Siembra de semillas de tomate.

3.1.4. Toma de datos y análisis de resultados

Se registraron todas las actividades desde el primer día de la práctica en un cuaderno de campo, allí se anotaron todos los procedimientos y cálculos realizados.

Se tomaron los siguientes datos temporales durante los ensayos: germinación (con la emergencia radicular), aparición de pelos absorbentes, hipocótilo y cotiledones. También se controló la contaminación con hongos o bacterias.

Los datos finales al cierre del ensayo fueron tomados de las semillas germinadas. Se midieron las siguientes variables: largo de raíz principal en cm, cantidad de raíces laterales y largo total de las raíces laterales mayores a 2 mm, diámetro en mm del cuello de la plántula y largo del tallo en cm. Todas las medidas fueron tomadas con escalímetro, regla o calibre digital (Fig. 13 y 14). También se calculó el índice de esbeltez, que se calcula haciendo la

relación entre el diámetro y la altura. Se registró el peso húmedo y seco de cada repetición por tratamientos y concentración salina (Fig. 15).

Los datos finales fueron procesados con el programa Infostat (Di Rienzo et al, 2020). El modelo de ANOVA ajustado fue bifactorial para un diseño completamente al azar. Se evaluó el cumplimiento de la normalidad del término de error mediante gráfico Q-Qplot y la homogeneidad de varianzas entre tratamientos con diagrama de dispersión de residuos vs predichos. Cuando se registraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) se realizó la prueba de comparación de medias DGC (Di Rienzo et al, 2002).



Figura 13: A. Plántula de tomate separada para medición. B. Medición de diámetro. C. Medición de largo de raíz.

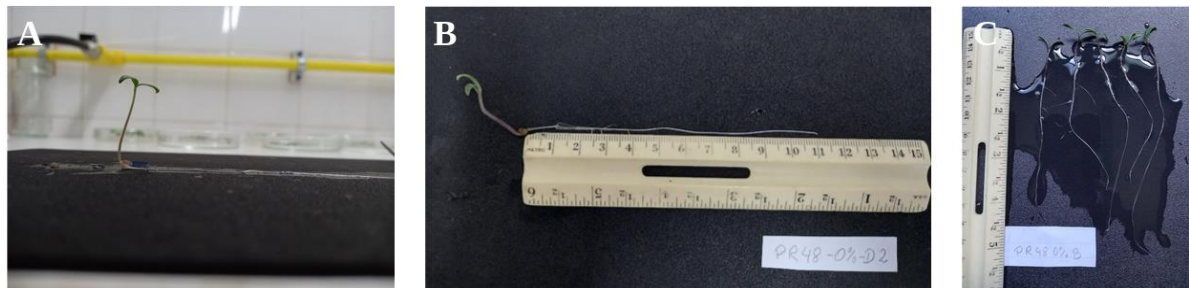


Figura 14: A. Plántula de tomate. B. Medición de largo de raíz. C. Registro fotográfico de las plántulas por repetición.

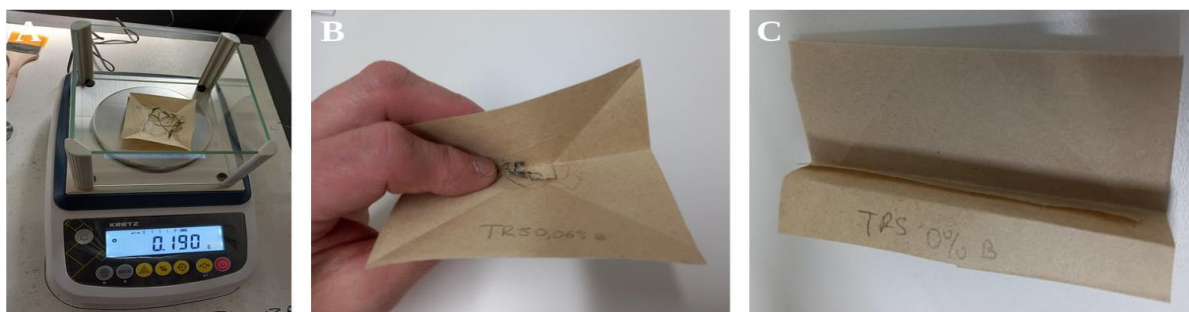


Figura 15: Plántulas de tomate por placa. A. Peso en fresco por placas. B y C. Envoltura para reservar y hacer peso en seco de las repeticiones.

3.2. Puesta a punto del método a utilizar

Para ajustar el método a utilizar como primer factor de análisis en los ensayos, se utilizaron dos tipos de levaduras en estudio más un testigo sin microorganismos.

Como segundo factor de análisis, se realizaron dos concentraciones de cloruro de sodio con un control sin sal. La concentración de cloruro de sodio en los medios salinos del primer ensayo, se eligió por la tolerancia de los microorganismos a esas concentraciones, observándose la no germinación de las semillas de tomate platense. A partir del segundo ensayo se ajustó la concentración de cloruro de sodio por la tolerancia de la especie utilizada en los ensayos (Tabla 2).

Tabla 2: Diseño experimental del 1° y 2° ensayo: Microorganismos, levaduras (x2): *Candida sake* (TR5) y *Lachancea nothofagi* (PR48) más control sin inóculo (Y-). Concentración salina de NaCl, repeticiones (rep) o placas por tratamiento, semillas por repetición, semillas y placas totales por ensayo y posición de las mismas. Las flechas indican cambios con respecto al ensayo anterior.

Ensayo	Microorganismos x 3	Salinidad: NaCl x 3 (%)	Repeti ciones (rep.)	N° Se x rep.	Total de Se (n)	N° de placas	Posición de la placa
1°	Y-						
	PR48	0 3 5	5	10	450	45	Horizontal
	TR5						
2°	Y-						
	PR48	0 0,06 0,125	4	7	252	36	Horizontal
	TR5						

3.2.1. Medios de cultivo y concentración de cloruro de sodio

El cálculo y pesaje de los medios de cultivo se realizó días previos a plaquear, se calculó en base a 20 ml por placa de vidrio, por medio y por tratamiento, según la concentración de sales para cada ensayo y se reservó en botellas rotuladas para esterilizar en autoclave.

Las diferentes concentraciones de cloruro de sodio (% p/v) estaban incorporadas al medio de cultivo empleado (Fig. 16).

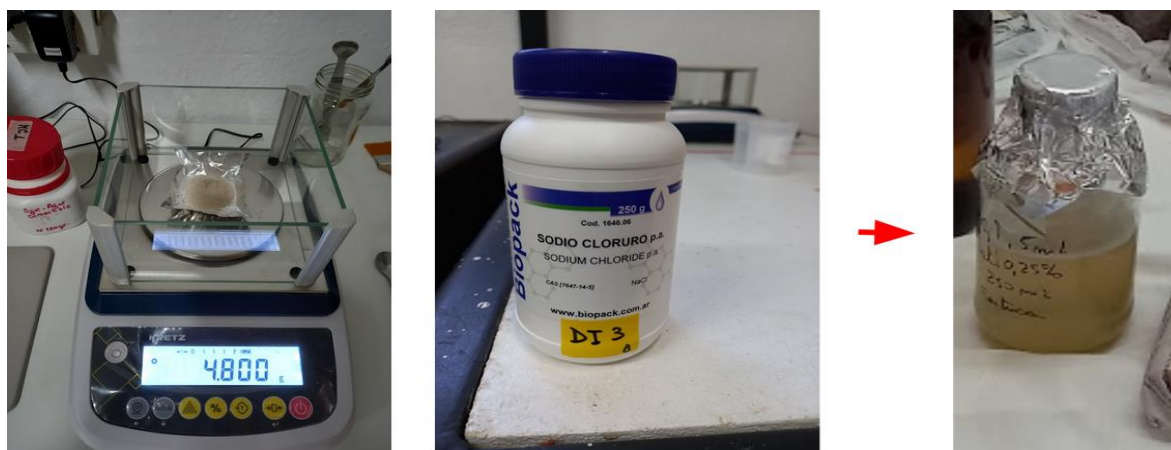


Figura 16: Preparación de medios de cultivo.

-Agar comestible 1,5% (p/v) y las diferentes concentraciones de NaCl* fueron: 0%, 3% y 5% (en el 1° ensayo) y 0%, 0,06% y 0,125% (en el 2°, 3° y 4° ensayo).

* La concentración de NaCl se ajustó por la medición de la conductividad eléctrica de los medios salinos utilizados, para que se ajuste a lo requerido por la especie según la bibliografía Goykovic Cortés & Saavedra del Real (2007).

Se realizaron diluciones seriadas de la solución inicial de cloruro de sodio de 0,5 % hasta llegar a concentraciones toleradas por la especie a cultivar (Fig. 17) y (Tabla 3).

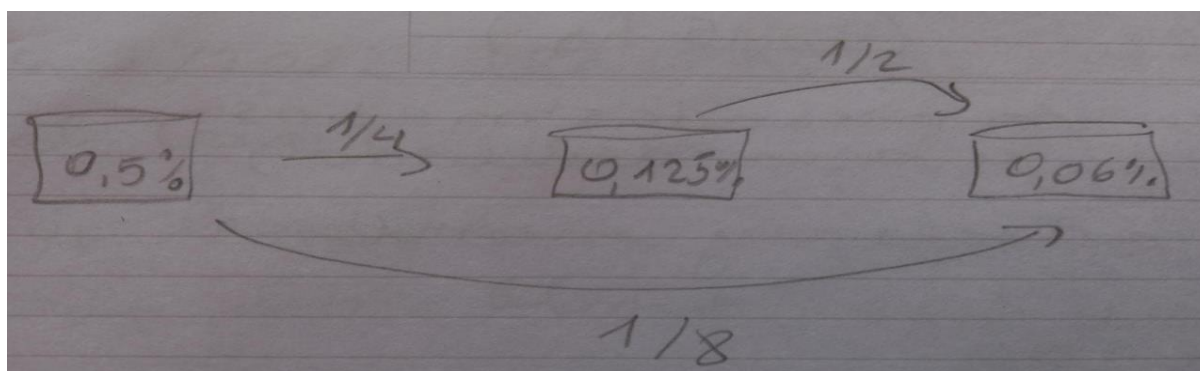


Figura 17: Esquema de las diluciones seriadas de Cloruro de Sodio.

Tabla 3: Valores de conductividad eléctrica en (uS/cm) y (dS/m) para las diferentes concentraciones salinas. Resaltadas con color están las soluciones finales utilizadas en el 2°, 3° y 4° ensayo.

[NaCl] (% p/v)	CE(uS/cm)	Temperatura (°C)	CE/1000=CE(dS/m)
0	92	19	0,092
0,06	1413	20	1,413
0,125	2592	19	2,592
0,5*	7890	19,9	7,890

*Solución 0,5% NaCl de la que se realizaron las diluciones a 0,125 y 0,06 (% p/v).

3.2.2. Disposición y elección de las placas en ambiente controlado

Las placas dentro de la cámara de germinación, se colocaron aleatoriamente y se rotaron después de cada control. En tanto que la posición en el primer y segundo ensayo fue de forma horizontal y en el tercer y cuarto ensayo, estuvieron en posición vertical. Esto se puede observar en el esquema de la figura 18.

Las condiciones de luz y temperatura dentro de la cámara de germinación estuvieron dadas con iluminación artificial, con un fotoperíodo 16 horas de luz a 25 °C y 8 horas de oscuridad a 22 °C durante 7 días. Se utilizaron tiras de luces led por encima de las bandejas (menos en el 2° ensayo*) y 5 tubos fluorescentes Growlux 300W, en la puerta de la cámara.

* En el 2° ensayo se compartió la cámara de germinación con ensayos de otros investigadores y se quitaron las luces led.

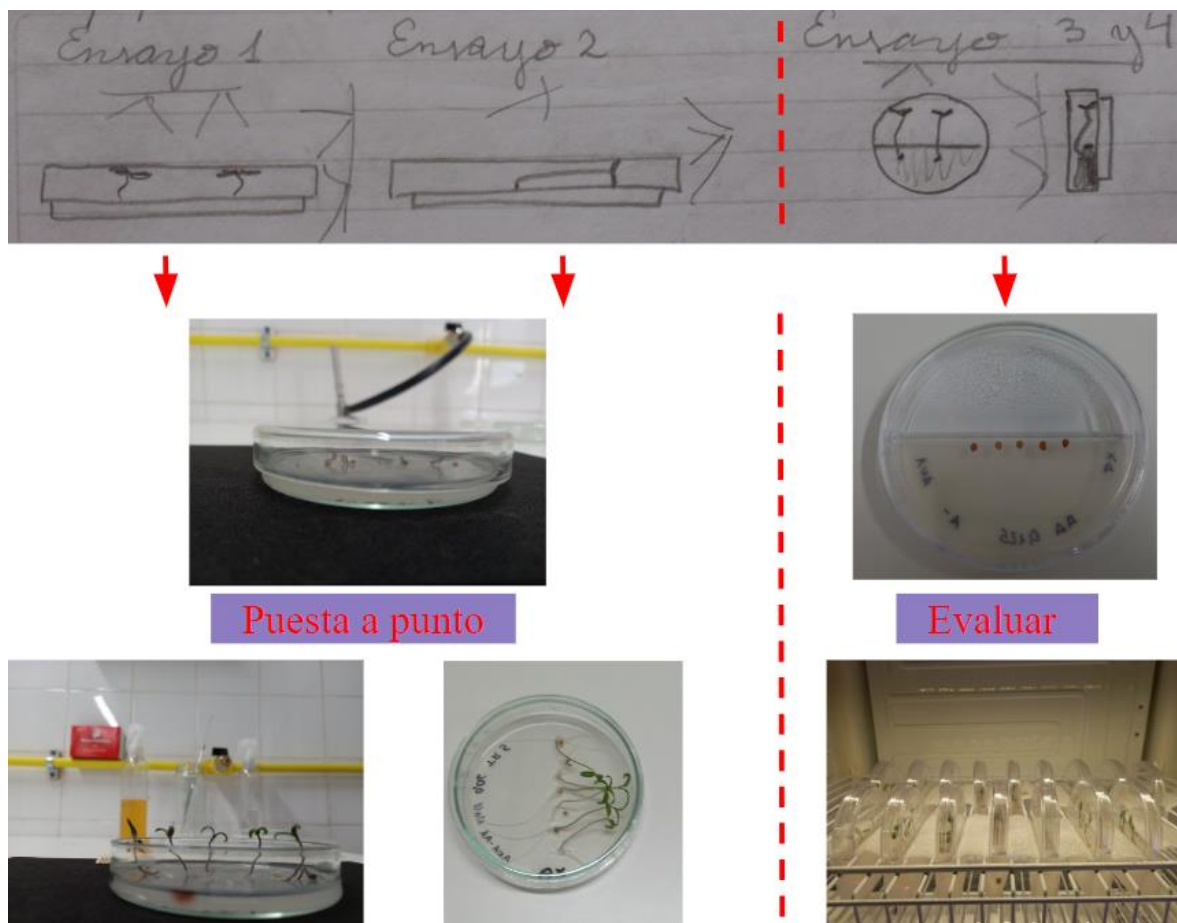


Figura 18: Esquema del cuaderno de campo y fotografías donde se observa la posición de las placas, condiciones de luz, para el 1°, 2°, 3° y 4° ensayo. Crecimiento de las plántulas dentro de las cajas de Petri.

3.3. Evaluación de los ensayos con levaduras y actinobacterias

En esta etapa de la práctica en el tercer y cuarto ensayo, se puso a prueba el método con los microorganismos en estudio, levaduras y actinobacterias (Tabla 4).

Parte de la puesta a punto, implicó la reducción a cinco semillas por réplica, para facilitar los tiempos en el cierre de los ensayos. Se pasó de cajas de Petri de vidrio a cajas de plástico divididas por tabique plástico descartables, con el medio de cultivo en una sola mitad de las mismas, con un cálculo de 17 ml por placa. También se modificó la posición de las mismas dentro de la cámara de germinación, que pasaron de la posición horizontal a vertical (sostenidas verticalmente en una rejilla de heladera puesta al revés y con tiras de plex 2 ml) como se observa en las figuras 19, 20 y 21.

De esta forma se buscó optimizar el espacio dentro de la cámara de germinación y un mejor desarrollo de las plántulas.

Tabla 4: Diseño experimental del 3° y 4° ensayo: Microorganismos, levaduras (x2): *Candida sake* (TR5) y *Lachancea nothofagi* (PR48) más control sin inóculo (Y-) y Actinobacterias (x2): *Streptomyces* sp. (MM 40), *Micromonospora* sp. (MM 18) más control sin inóculo (A-). Concentración de Cloruro de Sodio; repeticiones por tratamiento, semillas por repetición, semillas y placas totales por ensayo y posición de las mismas en la cámara de germinación. Las flechas indican cambios con respecto al ensayo anterior (en este caso del 2° al 3° ensayo y del 3° al 4° ensayo).

Ensayo	Microorganismos x 3		Salinidad: NaCl x 3 (%)			Repeti ciones (rep.)	Nº Se x rep.	Total de Se (n)	Nº de placas	Posición de la placa
3º	Levaduras	Y-	0	0,06	0,125	4	5	180	36	Vertical
		PR48								
		TR5								
4º	Actino- bacterias	A-	0	0,06	0,125	4	5	180	36	Vertical
		MM40								
		MM18								

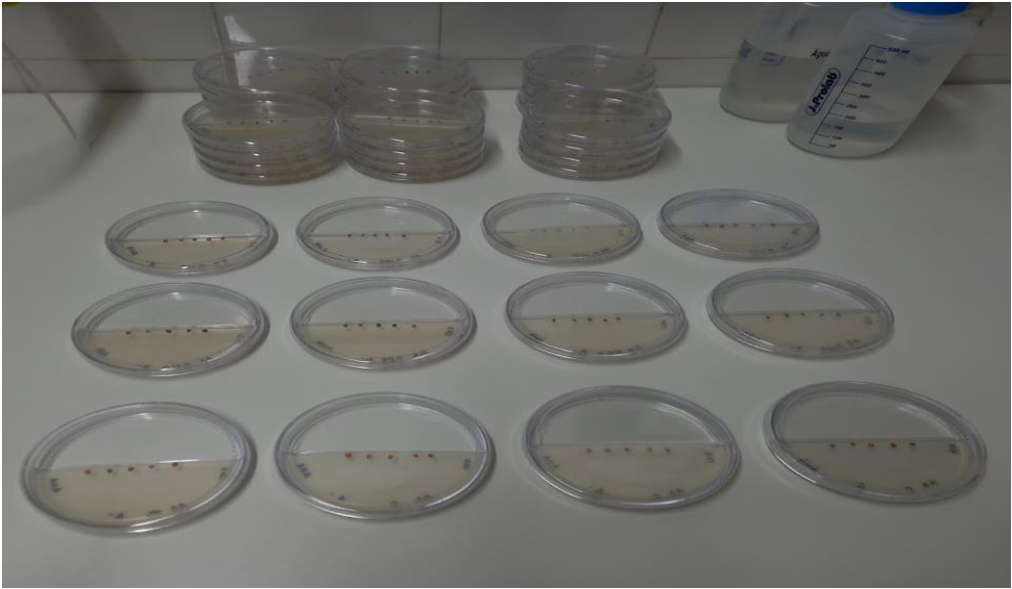


Figura 19: Placas de Petri partidas, con cinco semillas de tomate en sus respectivos medios e inóculos.

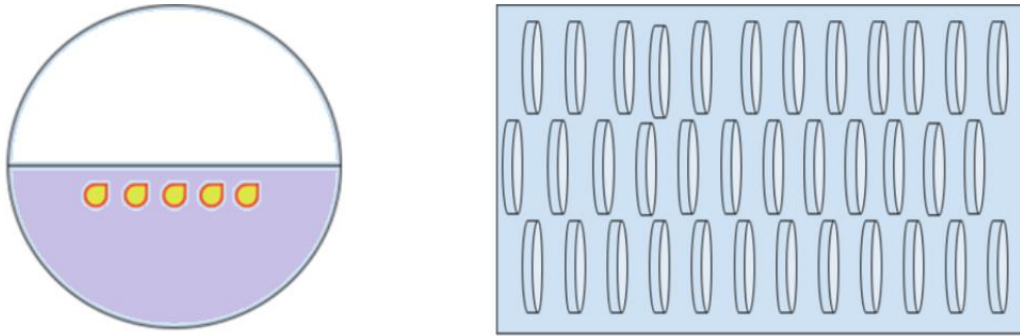


Figura 20: Esquema de disposición de semillas de tomate en las placas y posición vertical de las placas dentro de la cámara de germinación.

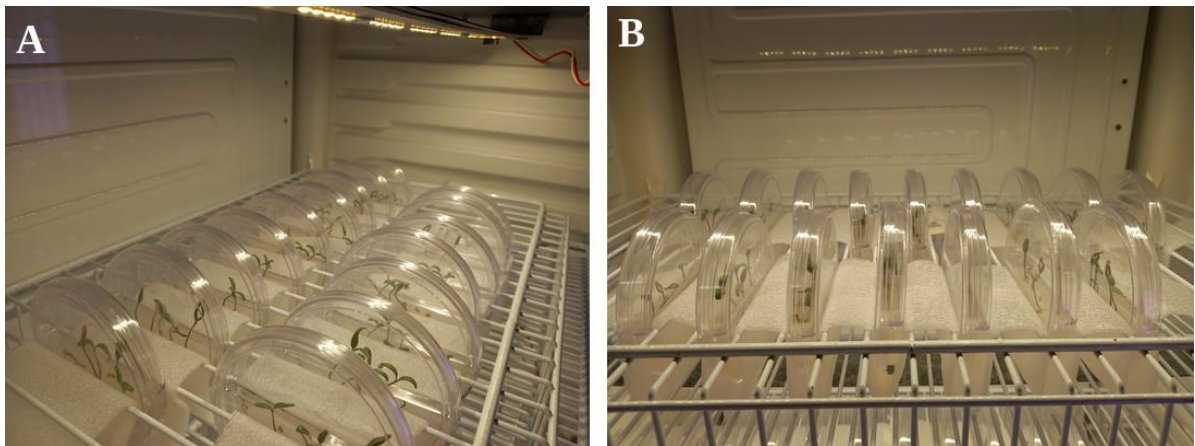


Figura 21: A y B. Placas en posición vertical con plántulas de tomate en la cámara de germinación.

4. Resultados

4.1. Asepsia, sanidad y medios de cultivo de los ensayos

Se observó contaminación en los primeros dos ensayos, no así en el tercero y cuarto ensayo. Respecto a la germinación, en el primer ensayo fue nula en los medios salinos, no así en resto de los ensayos en todas sus repeticiones (Fig. 22).

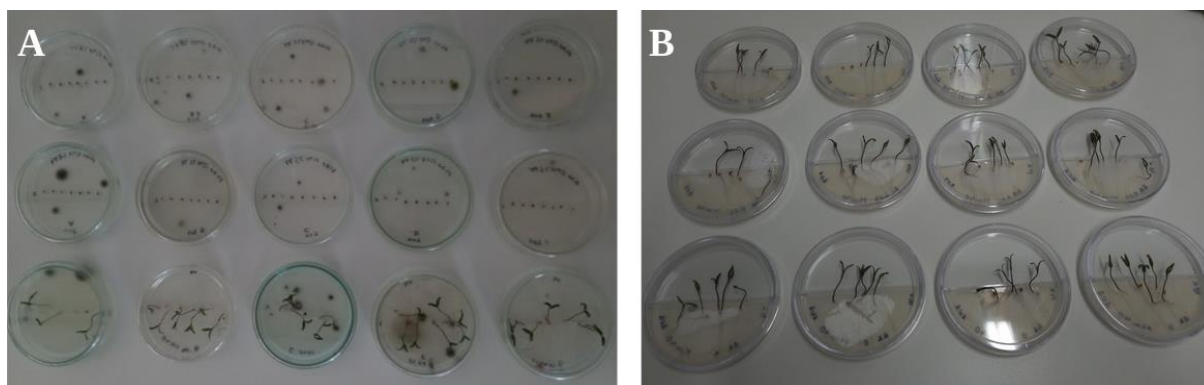


Figura 22: Placas. **A.** Placas al cierre del 1° ensayo. **B.** Placas al cierre del 4° ensayo.

4.2. Envases y posición de placas

En la figura 23 se puede observar que las plántulas del primer ensayo tocaban la tapa de las cajas de Petri, en el segundo ensayo por falta de luces led, las plántulas se hilaron hacia la puerta y por último se observa el crecimiento de las plántulas en el tercer y cuarto ensayo.

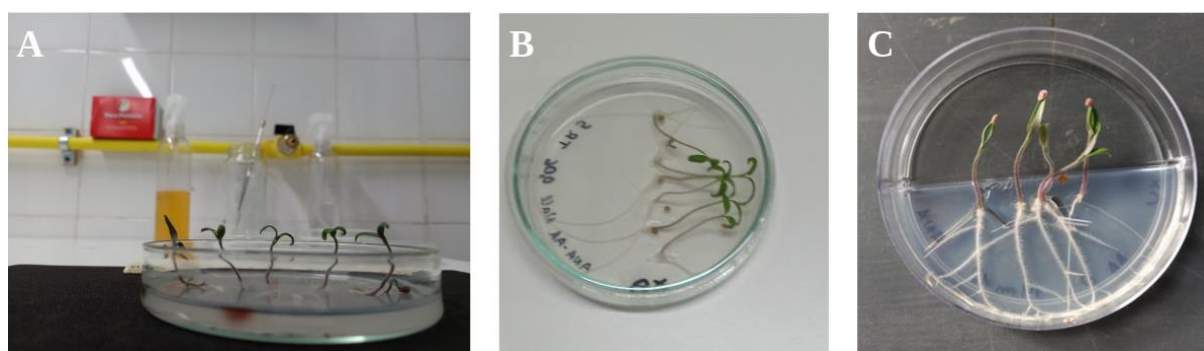


Figura 23: **A, B** y **C.** Plántulas al cierre del 1°, 2° y (3° y 4°) ensayos respectivamente.

4.3. Análisis estadísticos de resultados

Las tablas 5 y 6 muestran las medias de los datos finales para las plántulas resultantes de las semillas inoculadas con levaduras y actinobacterias respectivamente, para cada variable considerada al cierre de los ensayos según microorganismos y concentración de salinidad.

-Las levaduras registraron diferencias estadísticamente significativas en la variable **largo de tallo**, entre control y las levaduras ($p=0,0152$). No se encontraron diferencias significativas entre concentraciones de cloruro de sodio ($p=0,8993$) para esta variable tampoco se registraron diferencias significativas entre la combinación de concentración de salinidad y levaduras ($p=0,3335$).

También para la variable **diámetro de tallo**, se registraron diferencias estadísticamente significativas entre control y las levaduras ($p=0,0017$). No se encontraron diferencias significativas entre concentraciones de cloruro de sodio ($p=0,6409$) para esta variable tampoco se registraron diferencias significativas entre la combinación de concentración de salinidad y levaduras ($p=0,3612$). A simple vista se podía apreciar en el tratamiento con TR5 una mayor rigidez de las raíces y del tallo. En el resto de las variables analizadas no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 5: Media muestral de variables analizadas al cierre del tercer ensayo, por levaduras y concentración de cloruro de sodio. A la derecha de la media se indica el resultado del ANOVA y de la prueba de comparación de medias.

		Largo de tallo (cm)	Largo de raíz (cm)	Diámetro de cuello (mm)	N° de raíces laterales	Largo total de raíces laterales (mm)	Peso húmedo (mg)	Peso seco (mg)	Índice de Esbeltez (d/h)
Levadura	Y-	1,34 A	7,21	0,68 A	3,95	17,01	0,13	0,01	0,051
	PR48	1,62 B	7,41	0,81 B	4,62	20,17	0,15	0,01	0,050
	TR5	1,73 B	7,83	0,86 B	4,78	20,68	0,17	0,01	0,050
Salinidad	0%	1,59	8,01	0,78	5,67	26,08	0,15	0,01	0,050
	0,06%	1,56	7,27	0,77	3,82	15,24	0,15	0,01	0,049
	0,125%	1,53	7,17	0,81	3,87	16,54	0,16	0,01	0,049

Medias con letras diferentes son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Los tratamientos con **levaduras**, *Candida sake* (TR5) y *Lachancea nothofagi* (PR48), mostraron mejor respuesta de crecimiento para las variables, largo y diámetro de tallo con respecto al tratamiento control para esta etapa fenológica del cultivo.

-Las actinobacterias registraron diferencias estadísticamente significativas en la variable **largo total de raíces laterales**, entre control y MM18 y MM40 ($p=0,0354$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre concentraciones de cloruro de sodio ($p=0,1461$) para esta variable tampoco se registraron diferencias significativas entre la combinación de concentración de salinidad y actinobacterias ($p=0,8710$).

También para la variable **índice de esbeltez**, entre MM40 y el control y MM18 ($p=0,0479$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre concentraciones de cloruro de sodio ($p=0,3636$) para esta variable, tampoco se registraron diferencias

significativas entre la combinación de concentración de salinidad y actinobacterias ($p=0,5236$). Para la variable **diámetro de tallo**, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre concentraciones de cloruro de sodio ($p=0,0009$). No se encontraron diferencias significativas entre microorganismos ($p=0,1610$) para esta variable y tampoco se registraron diferencias significativas entre la combinación de concentración de salinidad y actinobacterias ($p=0,4471$). En el resto de las variables analizadas no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 6: Media muestral de variables analizadas al cierre del cuarto ensayo, por actinobacterias y concentración de cloruro de sodio. A la derecha de la media se indica el resultado del ANOVA y de la prueba de comparación de medias.

		Largo de tallo (cm)	Largo de raíz (cm)	Diámetro de cuello (mm)	Nº de raíces laterales	Largo total de raíces laterales (mm)	Peso húmedo (mg)	Peso seco (mg)	Índice de Esbeltez (d/h)
Actinobacteria	A-	1,64	7,50	0,92	4,63	26,38 A	0,14	0,01	0,056 B
	MM40	1,69	8,25	0,90	5,70	44,49 B	0,16	0,01	0,051 A
	MM18	1,74	8,03	0,94	5,89	34,08 A	0,16	0,01	0,056 B
Salinidad	0%	1,66	8,60	0,87 A	5,55	38,64	0,15	0,01	0,053
	0,06%	1,68	7,53	0,94 B	6,07	39,07	0,15	0,01	0,055
	0,125%	1,74	8,60	0,95 B	4,61	27,24	0,16	0,01	0,056

Medias con letras diferentes son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

5. Conclusiones

En el transcurso de los ensayos, se alcanzó el manejo de forma fluida y autónoma de todas las actividades de esterilización del lugar de trabajo y de los materiales a utilizar en cada ensayo.

Se prepararon correctamente las soluciones nutritivas, acomodando los valores de salinidad acorde a la especie, esta acción permitió evaluar los datos con los microorganismos en estudio. Los envases utilizados fueron adecuados para esta etapa del cultivo, en los ensayos tres y cuatro y fue novedosa la forma de ponerlos en posición vertical, donde las plántulas no vieron limitado su crecimiento, cosa que sí sucedió con las placas en posición horizontal, acción que además permitió optimizar el espacio que ocuparon las placas dentro de la cámara de germinación.

De acuerdo a los resultados presentados se observó una asociación simbiótica entre los microorganismos utilizados y las plántulas de tomate platense que benefició su desarrollo.

-La inoculación con **levaduras** en las semillas mostró mayor desarrollo de biomasa en las plántulas de tomate con respecto al testigo, esto es deseable para cualquier producción comercial.

-La inoculación con **actinobacterias**, generó mayor longitud de raíces laterales esto es beneficioso para el anclaje de la planta y la absorción de nutrientes.

6. Observaciones y sugerencias para futuros ensayos

Si bien no forma parte de la práctica laboral, me parece importante mencionar lo siguiente:

-La labor de un Técnico en Viveros en apoyo a la actividad de investigación potencia el trabajo de ambos complementando las tareas a realizar. Esto se vio plasmado al finalizar el primer ensayo, cuando a raíz de mi sugerencia con respecto a la concentración de cloruro de sodio, la misma fue ajustada a partir de la medición de la conductividad eléctrica, acorde a las características de la especie en estudio (tomate platense).

-Luego de realizar los ensayos observé que los microorganismos necesitan un tiempo de crecimiento y desarrollo, por lo tanto, la respuesta en los cultivos es diferente al comportamiento del agregado de fertilizantes de uso convencional. Con los datos obtenidos en esta práctica, se sugiere continuar con futuros ensayos de inoculación para evaluar la respuesta de la especie en otras etapas fenológicas del cultivo (Fig. 24). Se sugiere cuantificar otras variables, que complementen las realizadas en este ensayo como: peso en fresco y seco de la parte aérea y radicular, incremento relativo en altura e incremento relativo en diámetro de la planta de tomate a los 30, 60 o 90 días (De Caboteau & Morini, 2020).

-La correcta selección de las semillas es fundamental para que los resultados sean confiables. Esto implica que las semillas sean de marcas reconocidas y en el envase tengan número de lote y fecha de cosecha. Los ensayos en esta práctica, se hicieron con semillas que no cumplen con estos requisitos. Para futuros ensayos se compraron semillas marca “Florensa” (Fig. 24).

Me parece importante realizar ensayos de germinación del lote de semillas a utilizar, previo a los ensayos con los microorganismos, para así verificar la calidad y viabilidad de las semillas (aunque sea de cuatro repeticiones de 25 semillas cada uno).



Figura 24: A. Semillas marca Florensa. B. Esquema de las etapas fenológicas del cultivo de tomate.

-Además el IPATEC-MABB-ves tiene un invernadero en ejecución. Si bien no me tocó realizar actividades en el mismo, no pude dejar de observar lo siguiente.

El invernadero es del tipo capilla con techo a dos aguas de 23° de inclinación, con estructura de perfiles de acero galvanizado, recubierto con policarbonato alveolar, con una superficie de $22,36 \text{ m}^2$, con un volumen de $57,89 \text{ m}^3$. Orientado Norte-Sur, con las paredes Sur y Oeste de chapa acanalada de Zinc y dos puertas corredizas en los frentes Sur y Norte, de $1,08 \text{ m}$ por $2,08 \text{ m}$. El mismo cuenta con dos ventanas de $1,08 \text{ m}$ por $0,60 \text{ m}$ por encima de las puertas (con malla verde), cuya relación con la superficie es de $1,26 \text{ m}^2$. Tiene una ventilación forzada con extractor cenital y sistema de riego. Tiene seis mesadas elevadas de hierro con rejillas (12 m^2) y piso con canto rodado sobre el suelo (Fig. 25).

Desde mi rol de técnica en viveros no puedo dejar de observar que la orientación ideal debería ser con la ubicación Este - Oeste y con un ángulo de techo de 30° para una mejor captación de la luz del sol. La relación volumen superficie (v/sup) es de 2,6, que está por debajo de lo requerido que debería ser mayor a tres y el porcentaje de superficie de ventilación es de $1,26 \text{ m}^2$, cuando lo ideal debería ser $4,47 \text{ m}^2$ que es el 20 % de la superficie, necesarios para optimizar el manejo del clima dentro del invernadero. Se sugiere cambiar el lateral Oeste por policarbonato alveolar para optimizar la captación de luz solar y aumentar la superficie de ventanas.

-Por otra parte, quiero expresar que mi experiencia en esta actividad fue muy enriquecedora, por la posibilidad de trabajar y aprender en un laboratorio de microbiología y poner en práctica los conocimientos adquiridos durante la carrera.



Figura 25: A. Frente Norte. B. Fondo Sur y lateral Este C. Frente Norte y lateral Oeste.

7. Bibliografía

CONICET, Consultado en julio de 2022. <https://ipatec.conicet.gov.ar/mabves/>

De Caboteau A.M. & Morini M. (2020) Crecimiento de pies y copas para la producción de plantines de tomate injertado: efecto de siembra y las condiciones ambientales. Facultad de ciencias agrarias y forestales UNLP. Tesis de grado.

Di Rienzo J.A.; Casanoves F.; Balzarini M.G.; Gonzalez L.; Tablada M. & Robledo C.W. InfoStat (2020). Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>

Di Rienzo, J.A.; Guzmán A.W.; & Casanoves F. (2002). A Multiple Comparisons Method based on the Distribution of the Root Node Distance of a Binary Tree. Journal of Agricultural, Biological, and Environment Statistics, 7(2): 1-14.

El-Tarabily, Khaled A., (2003). Suppression of *Rhizoctonia solani* diseases of sugar beet by antagonistic and plant growth-promoting yeasts. Department of Biology, Faculty of Science, United Arab Emirates University, Al-Ain, 17551, United Arab Emirates - 2002/348.

El-Tarabily, Khaled A. & Sivasithamparam, K., (2006). Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. Mycoscience.,47, 25–35.

Esquema de las etapas fenológicas del cultivo de tomate, (2019). <https://doi.org/10.22490/21456453.4818>

Goykovic Cortés V. & Saavedra del Real G., (2007). Algunos efectos de la salinidad en el cultivo del tomate y prácticas agronómicas de su manejo.

IPATEC, Consultado en julio de 2022. <https://ipatec.conicet.gov.ar/unidades-ejecutoras/>

Mestre M.C.; Fontenla S.; Bruzone M.C.; Fernandez N.V. & Dames J., (2016). Detection of plant growth enhancing features in psychrotolerant yeasts from Patagonia (Argentina). <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01753-4>

Serrano Hernandez M. C.; Pérez Lavalle L.; Estrada-López H.; Benitez R. & Aranguren Díaz Y. C., (2022). Identificación y caracterización de rizobacterias nativas fijadoras de nitrógeno de *Capsicum sp.* de la región caribe colombiana. Revista de Investigación Agraria y Ambiental, 13(2), 81 – 92. <https://doi.org/10.22490/21456453.4818>

Solans M.; Pelliza Y.I. & Tadey M., (2022). Inoculation with Native Actinobacteria May Improve Desert Plant Growth and Survival with Potential Use for Restoration Practices. Microbial Ecology volume 83, pages 380–392. <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01753->

8. Anexo

El tercer ensayo de esta práctica fue presentado por Micaela Boenel en el III Reunión argentina de micología y II Simposio Internacional de Hongos Comestibles y de desarrollo sustentable, Córdoba, 17 al 21 de octubre de 2022.

Efecto de la inoculación con levaduras tolerantes a estrés osmótico sobre el desarrollo de plántulas de tomate platense

Effect of inoculation with osmotic stress tolerant yeasts on platense tomato seedling development.

Boenel M.1,2, Mari A. E. 3, Solans M.4, Mestre M. C. 1,2

1) Laboratorio de Microbiología Aplicada y Biotecnología, Centro Regional Universitario Bariloche (CRUB), UNCO. 2) IPATEC (Universidad Nacional del Comahue-CONICET). 3) Escuela de Producción Tecnología y Medio Ambiente. Universidad Nacional de Río Negro (UNRN). 4) Laboratorio de Actinomicetes, INIBIOMA-UNComahue-CONICET. Bariloche (8400), Río Negro, Argentina.

E-mail: marianasolans2005@hotmail.com

La salinidad de los suelos afecta la producción de alimentos, ya que el estrés salino reduce el crecimiento y desarrollo de las plantas, limitando su productividad. Los microorganismos tolerantes con potencial para promover el crecimiento vegetal se presentan como una estrategia para mitigar este efecto. Evaluamos la inoculación de dos levaduras con rasgos de promoción de crecimiento y tolerancia a salinidad, *Candida sake* (C.s.) y *Lachancea nothofagi* (L.n), sobre la germinación y emergencia de semillas de tomate en distintas concentraciones salinas. Inoculamos las semillas con cada levadura o con agua peptonada estéril y las colocamos en cajas de Petri con medio agar-agua adicionado con 0%, 0,06% y 0,125% P/V de NaCl. El ensayo fue llevado a cabo en cámara con condiciones controladas durante 7 días. Evaluamos las variables: largo de raíz principal, n° de raíces laterales, diámetro del cuello y altura del hipocótilo. Registramos que la longitud radical disminuyó con el aumento de la concentración salina. La inoculación de ambas levaduras produjo plantas con mayor diámetro de tallo que el control en todas las concentraciones salinas, y esto coincide con otros ensayos realizados en plantas adultas con las mismas levaduras. Además, las plantas inoculadas con C.s. fueron más largas que el control en todas las concentraciones salinas. No hubo diferencias en el número de raíces laterales ni en la biomasa fresca. Estas levaduras podrían aportar a la robustez de las plántulas, promoviendo un mejor desempeño de las plantas cultivadas en condiciones estresantes y fomentando la producción en regiones desfavorables.