

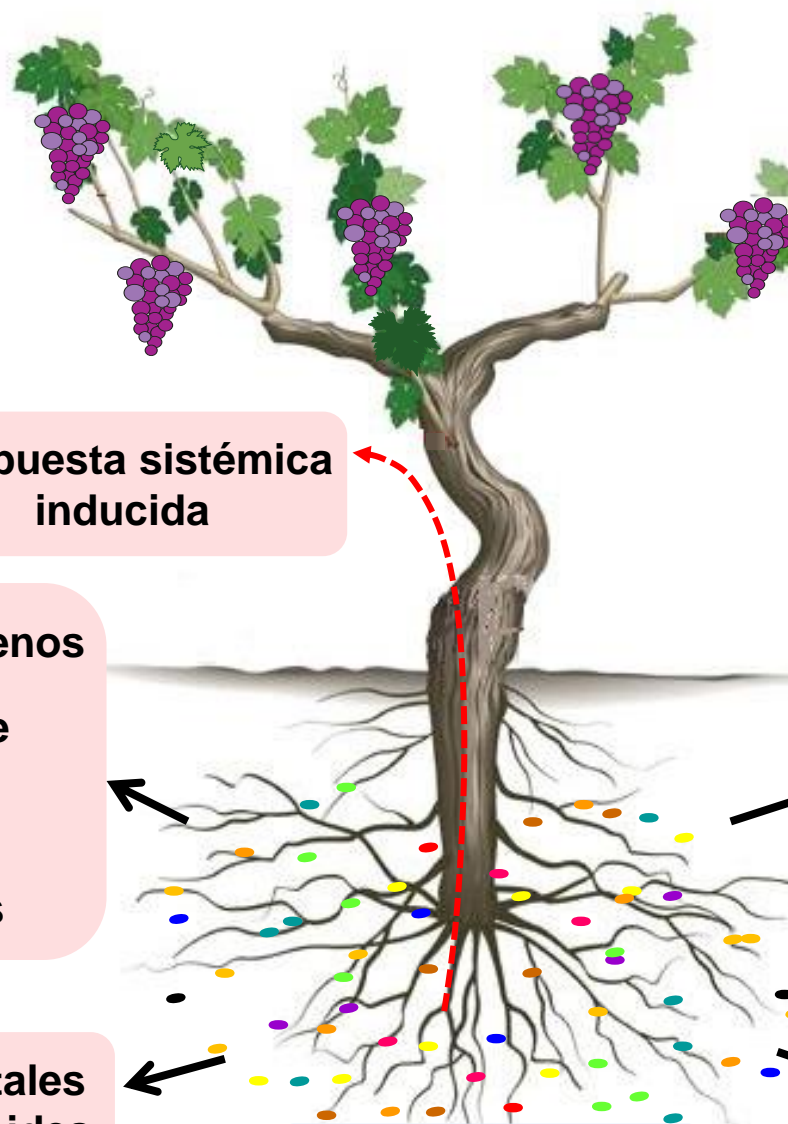
# **Microorganismos de suelo: alternativa sustentable para el cultivo de la vid**

**Dra. María Victoria Salomon**

**Dr. Iván Funes Pinter**



**Laboratorio de Bioquímica Vegetal  
Instituto de Biología Agrícola de Mendoza-Facultad de Ciencias Agrarias  
CONICET-UNCuyo**



## Defensa

**Respuesta sistémica inducida**

**Control de patógenos**

**Producción de antibióticos**

**Competencia por nutrientes**

**Remediación Metales Pesados y metaloides**

## Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR)

Bacterias de suelo que tienen la capacidad de colonizar la superficie de las raíces y el suelo que las rodea y, sin desarrollar una asociación simbiótica con la planta, producen un efecto benéfico sobre su crecimiento (Kloepper y Schroth 1978).

## Nutrición y desarrollo

**Solubilización de Fosfato**

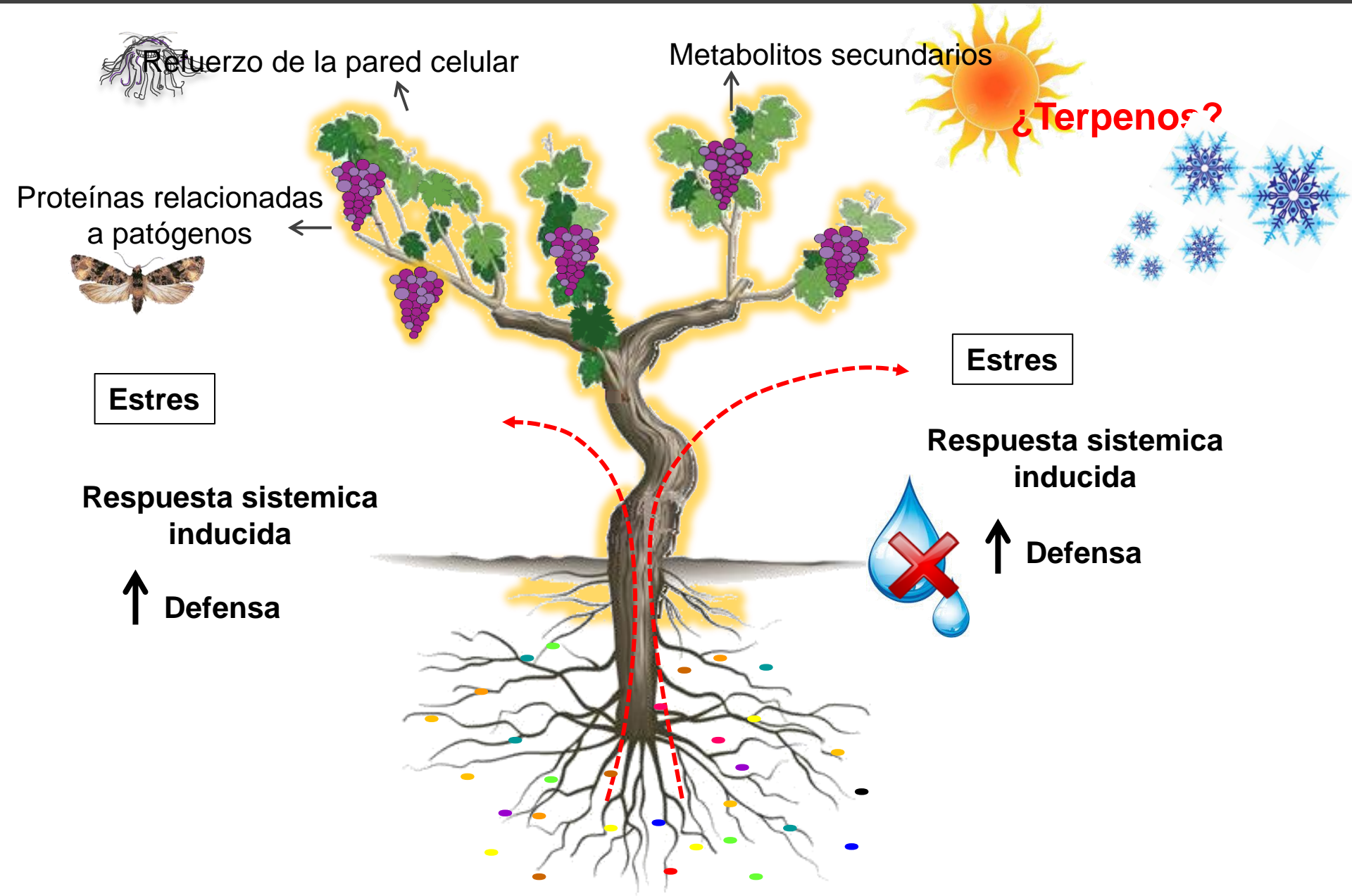
**Fijación de Nitrógeno**

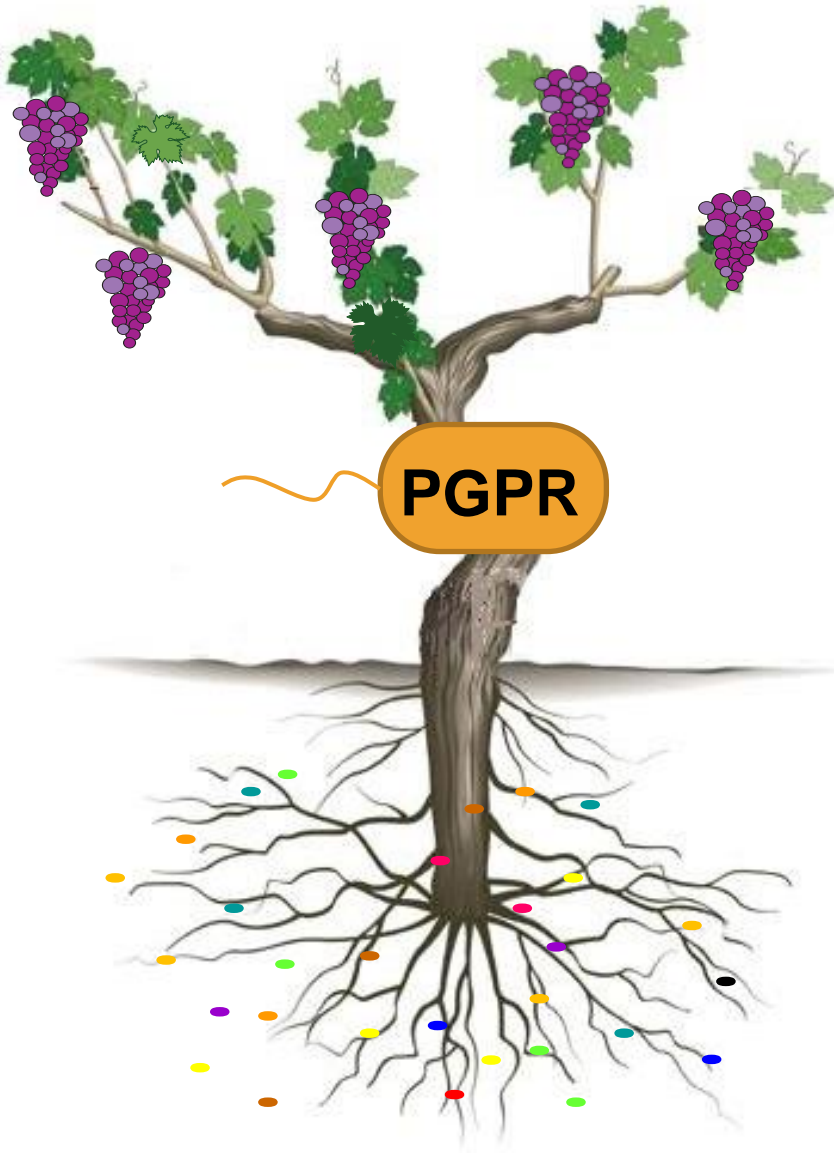
**Producción de Sideróforos**

**Producción de reguladores del crecimiento**

**Calidad del suelo**

# Introducción





→ • La vitivinicultura es una importante actividad económica en Argentina.







**Estudiar poblaciones bacterianas aisladas de rizósfera y raíces de *Vitis vinifera* L. cv. Malbec, analizando en la interacción planta-microorganismo los mecanismos de promoción del crecimiento y de control biológico involucrados, como alternativa ecológica para aumentar la producción.**



**Aislar y caracterizar** bacterias de un viñedo comercial



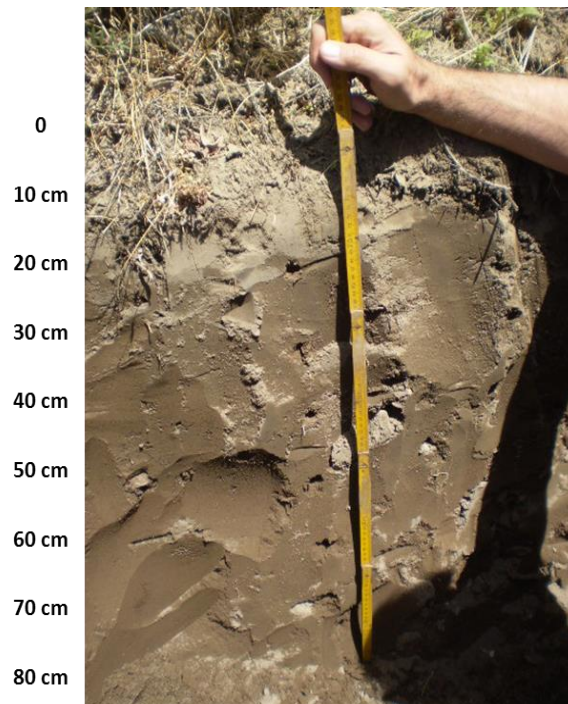
Estudiar las **respuesta fisiológica y metabólica** de la plantas



Evaluar su capacidad de **aumentar la defensa** de la planta frente a diferentes tipos de estrés.

- Escases de agua
- *Botrytis cinerea*
- Contaminación por Arsénico

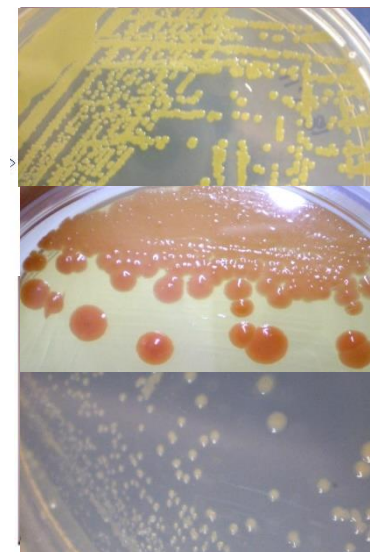
## Aislamiento y caracterización de bacterias



### Extracción de muestras

Viñedo comercial cv. Malbec  
1450m s.n.m

### Siembra



Rt5M10  
Rt6M10  
Rt9M10  
Rt17M10  
Rt4M10

**Aislamiento  
Colonias puras**

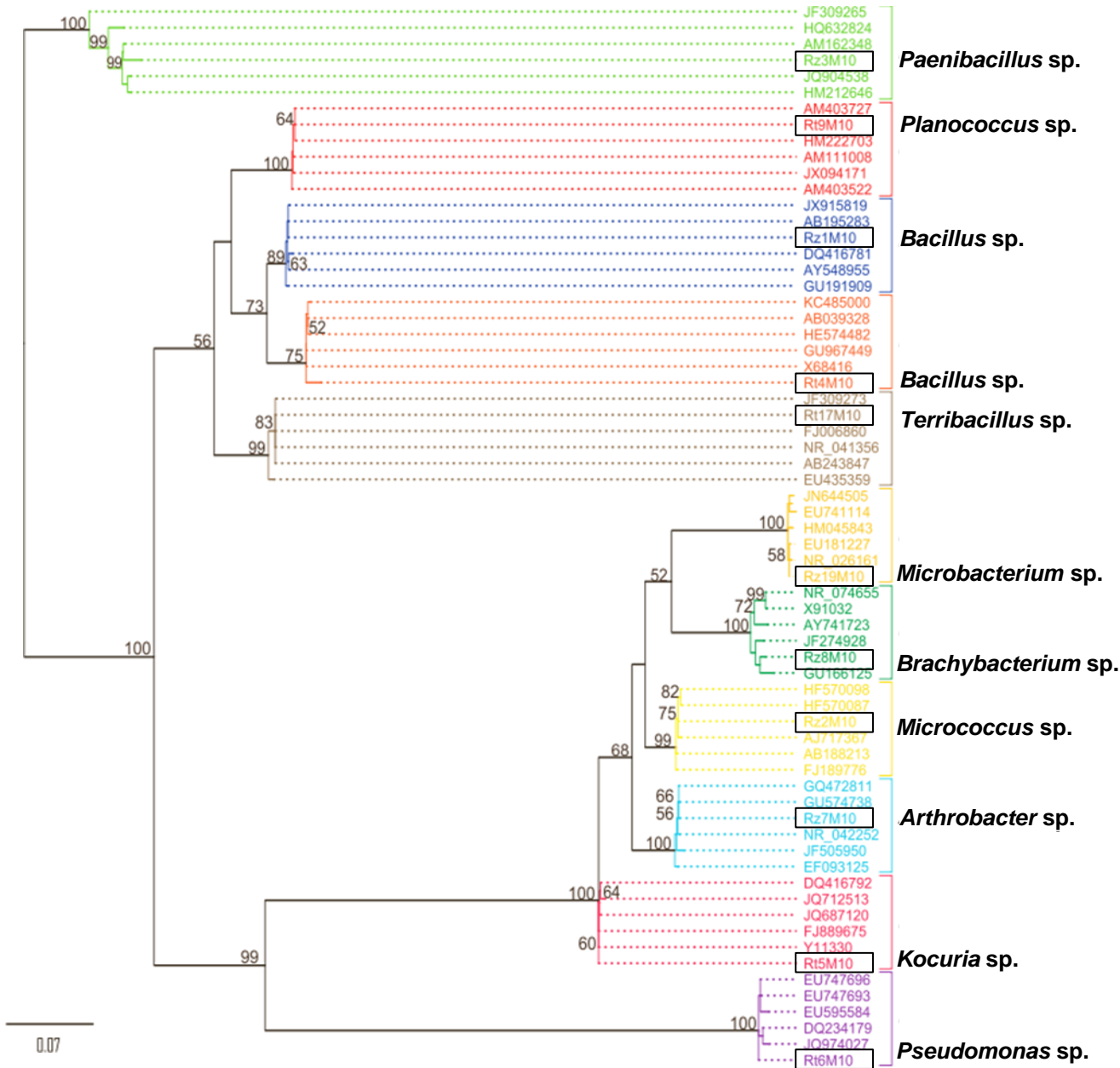
Rz7M10  
Rz1M10  
Rz19M10  
Rz2M10  
Rz3M10  
Rz8M10

**Secuenciación del gen  
que codifica ARNr 16 S**

**Caracterización fenotípica y  
bioquímica**



## Aislamiento y caracterización de bacterias



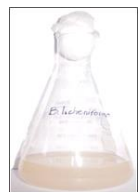
99%

100%

**Base de datos**  
Nacional Center for  
Biotechnology Information

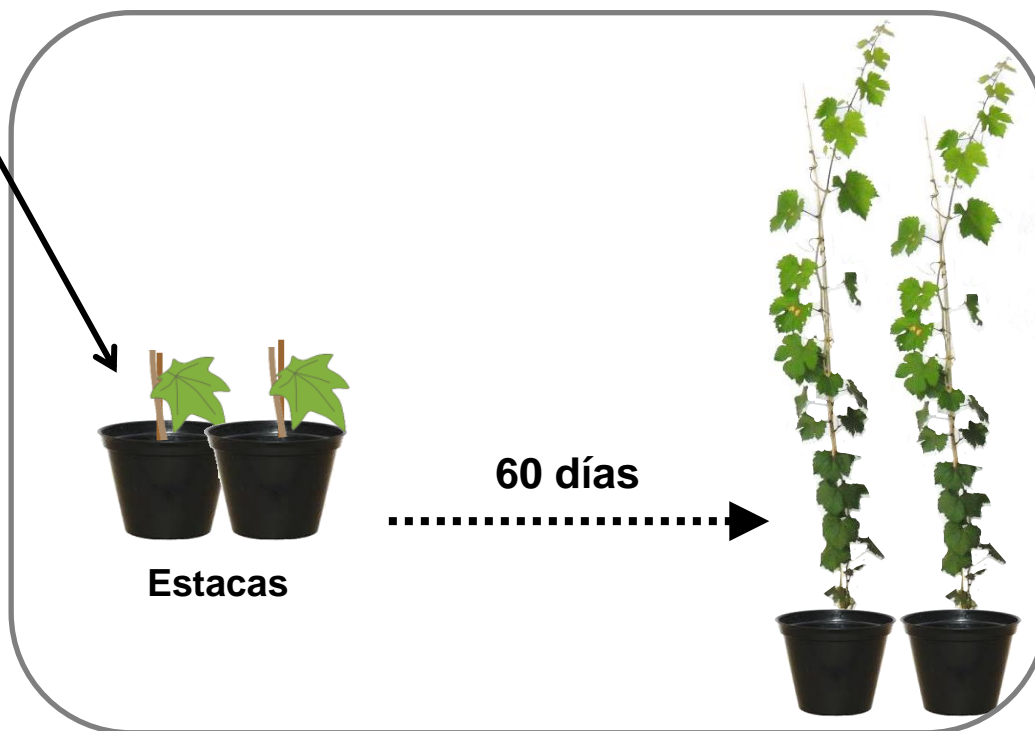
## Respuesta fisiológica y metabólica de vid cv. Malbec

**In vitro**



Cultivo bacteriano

**Maceta**



- Parámetros crecimiento

- Metabolitos secundarios (terpenos)

-Reguladores del crecimiento



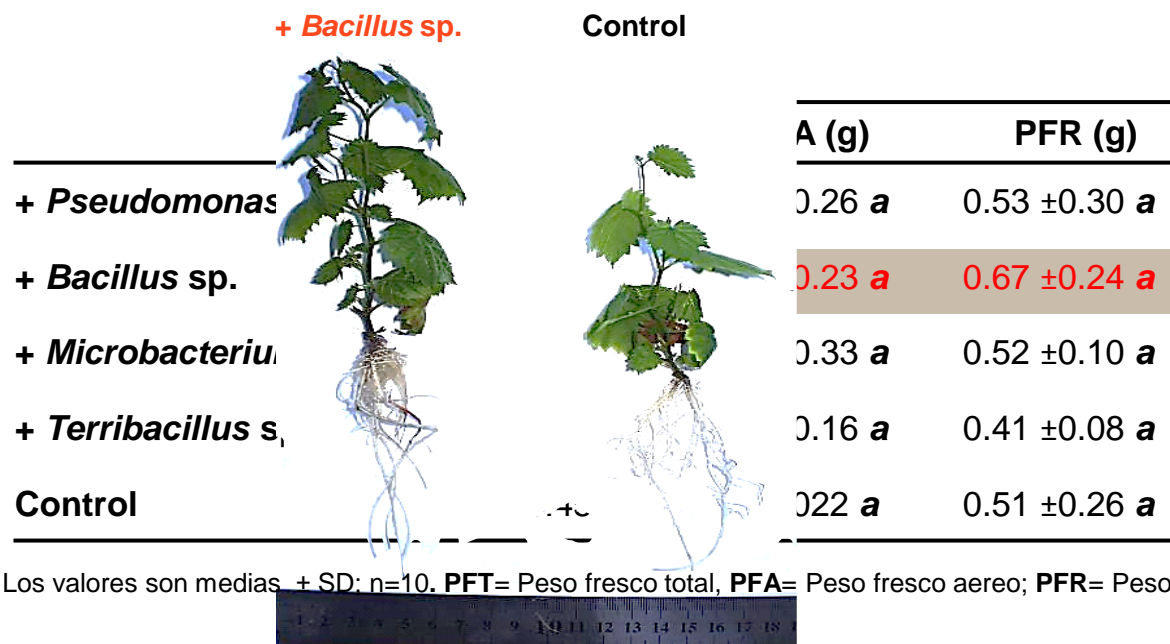
## Crecimiento

Ensayo *in vitro*

	30 dpb				
	LB (cm)	LR (cm)	AF (cm <sup>2</sup> )	Nº N	LE (cm)
+ <i>Pseudomonas</i> sp.	9.23 ±1.80 <i>ab</i>	9.04 ±2.70 <i>b</i>	6.68 ±1.89 <i>ab</i>	7.3 ±1.6 <i>a</i>	1.04 ±0.14 <i>a</i>
+ <i>Bacillus</i> sp.	10.43 ±1.80 <i>a</i>	13.70 ±1.20 <i>a</i>	7.72 ±1.85 <i>a</i>	8.3 ±1.3 <i>a</i>	1.16 ±0.19 <i>a</i>
+ <i>Microbacterium</i> sp.	8.76 ±1.07 <i>b</i>	11.62 ±3.55 <i>ab</i>	6.80 ±2.48 <i>ab</i>	7.9 ±1.7 <i>a</i>	1.06 ±0.22 <i>a</i>
+ <i>Terribacillus</i> sp.	7.76 ±1.10 <i>b</i>	10.36 ±1.80 <i>b</i>	6.17 ±1.42 <i>b</i>	7.3 ±1.4 <i>a</i>	1.01 ±0.16 <i>a</i>
Control	8.35 ±1.80 <i>b</i>	9.33 ±2.78 <i>b</i>	5.22 ±0.88 <i>b</i>	7.3 ±2.0 <i>a</i>	1.09 ±0.18 <i>a</i>

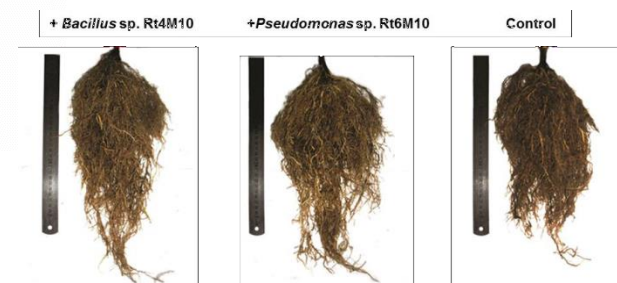
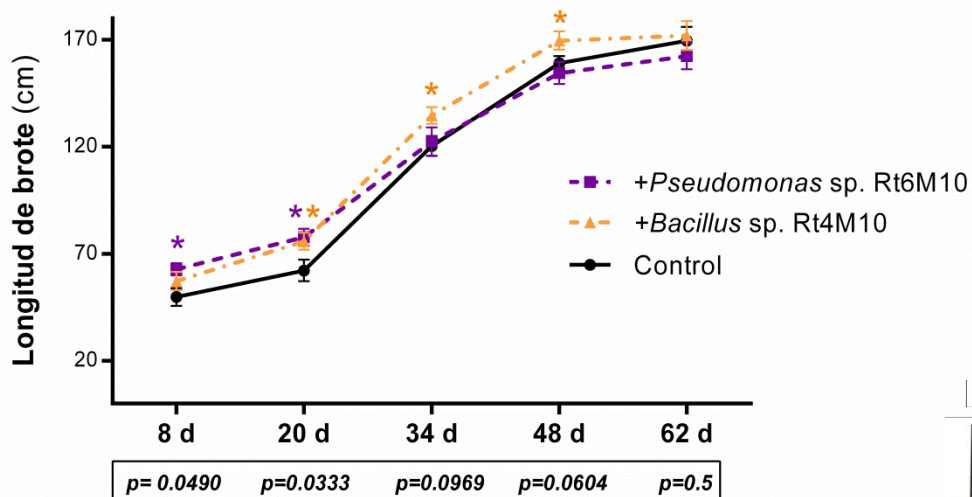
Peso Fresco Total  
Peso Fresco Aéreo  
Peso Fresco Raíz  
Nº hojas  
Long. Entrenudos  
Pigmentos

Los valores son medias ± SD; n=10. LB=Largo de brote; LR= largo de raíz; AF= área foliar; NºN= número de entrenudos; LE= largo de entrenudos



## Crecimiento

## Ensayo en maceta



	PFT (g)	PFA (g)	PFR (g)
<b>+ Pseudomonas sp.</b>	175.41 ±0.55 <b>ab</b>	71.41 ±19.10 <b>a</b>	104.00 ±32.08 <b>ab</b>
<b>+ Bacillus sp.</b>	<b>212.05 ±40.90 a</b>	<b>79.25 ±12.11 a</b>	<b>132.80 ±32.45 a</b>
<b>Control</b>	164.31 ±46.19 <b>b</b>	70.31 ±9.49 <b>a</b>	94.00 ±22.64 <b>b</b>
<i>p</i>	0.1	0.5681	0.1

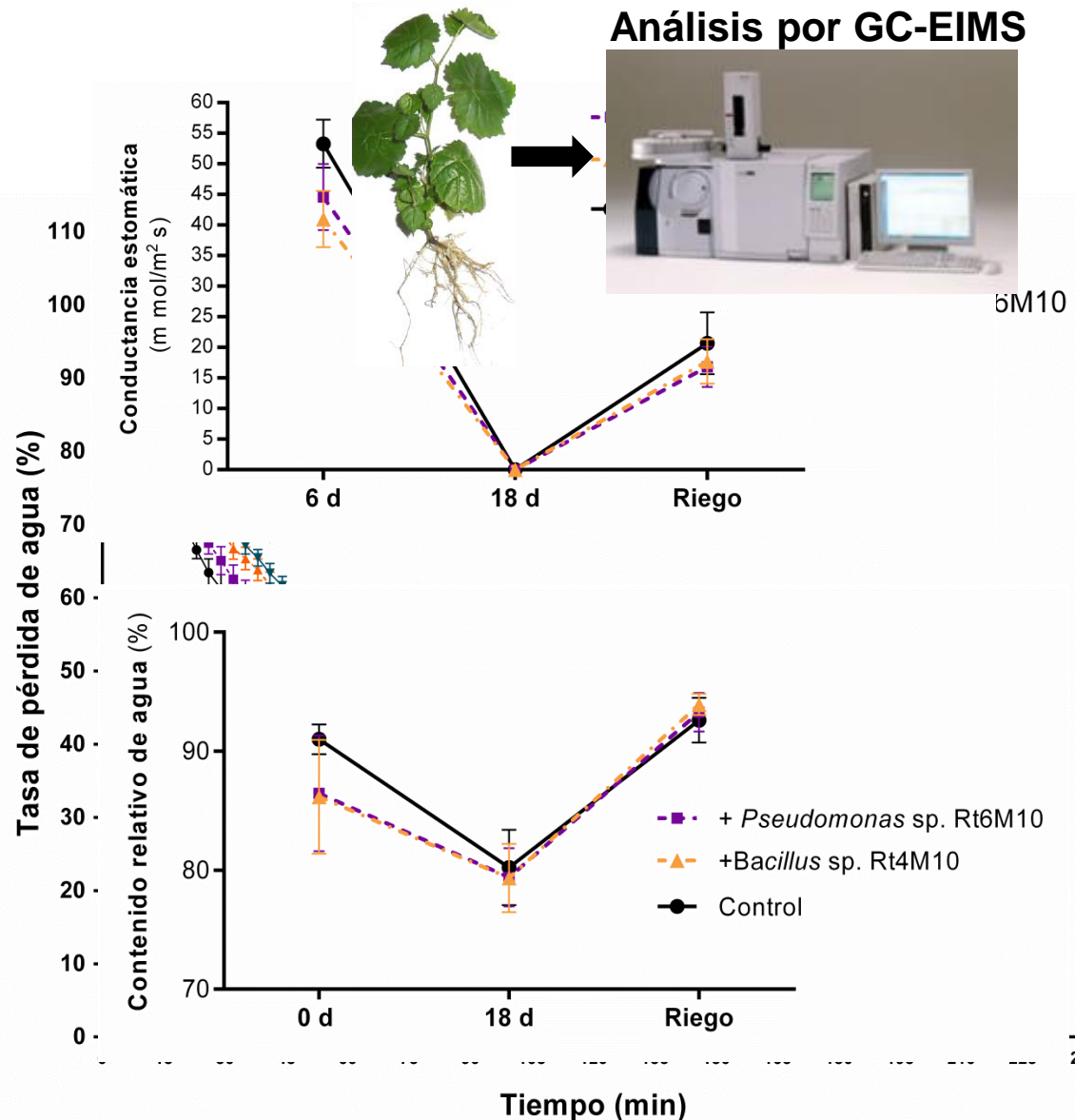
PFT= Peso fresco total, PFA= Peso fresco aereo; PFR= Peso fresco radical

## Defensa frente estrés hídrico

30 d pb		ABA
		Hoja
+ <i>Bacillus</i>		1.93±0.75 a
+ <i>Pseudomona</i>		2.10±0.26 b
Control		1.05±0.01 c



## Ensayo *in vitro*    Ensayo en maceta



## Defensa frente a Patógenos

Análisis por GC-EIMS



Monoterpenos

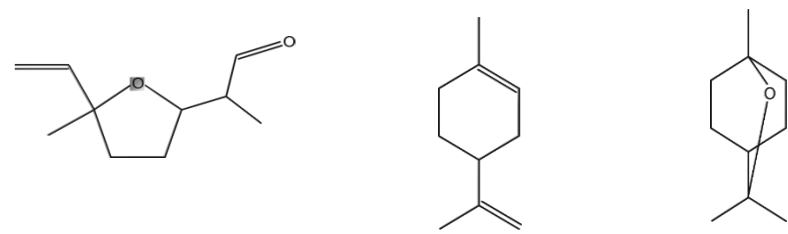
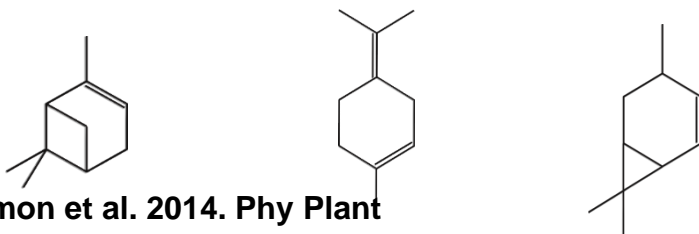
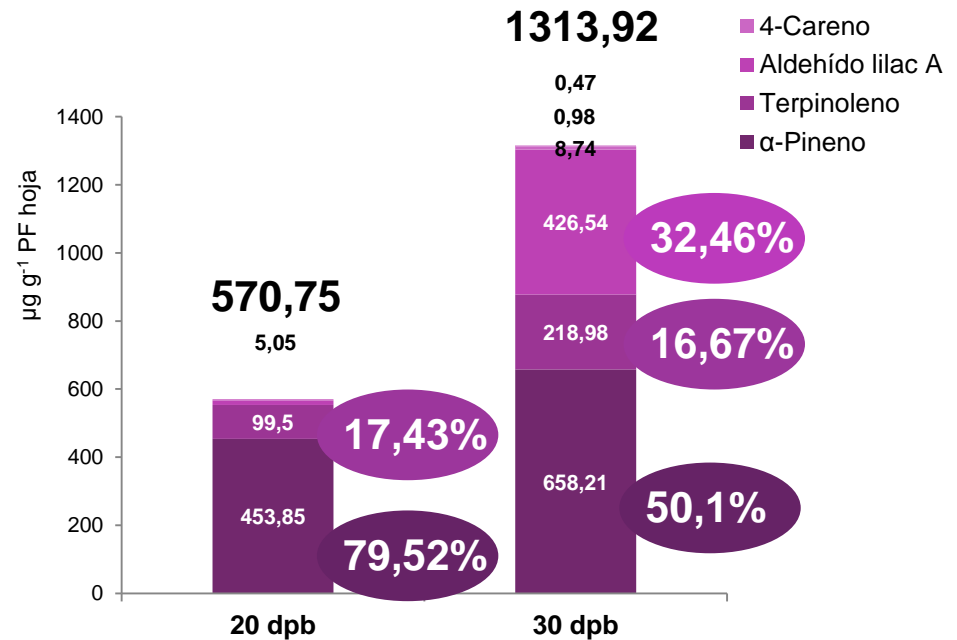
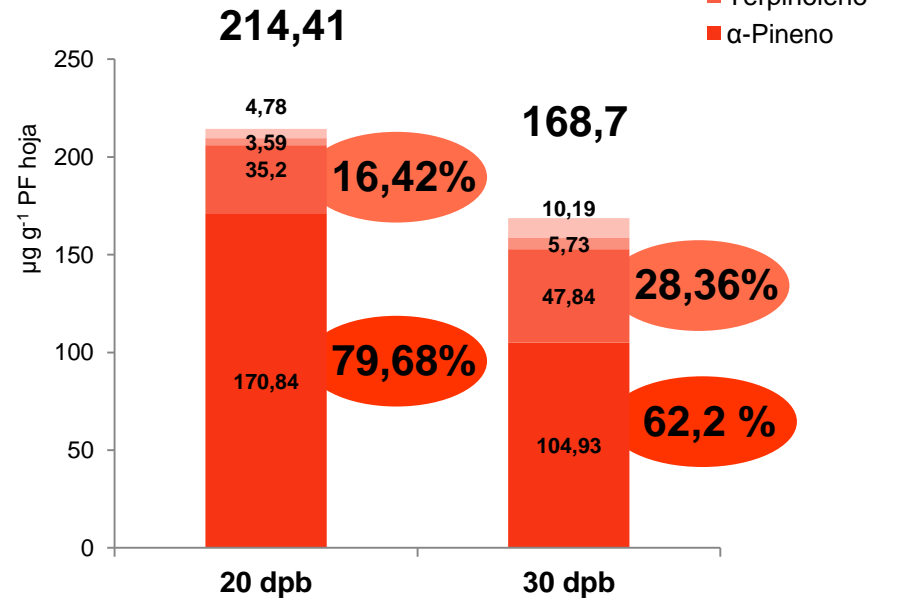
Ensayo *in vitro*

+ *Bacillus*

- Aldehído lilac A
- 4-Careno
- Terpinoleno
- $\alpha$ -Pinoeno

+ *Pseudomonas* sp.

- Eucaliptol
- D-limoneno
- 4-Careno
- Aldehído lilac A
- Terpinoleno
- $\alpha$ -Pinoeno







## Defensa frente a Patógenos

## Monoterpenos y Sesquiterpenos

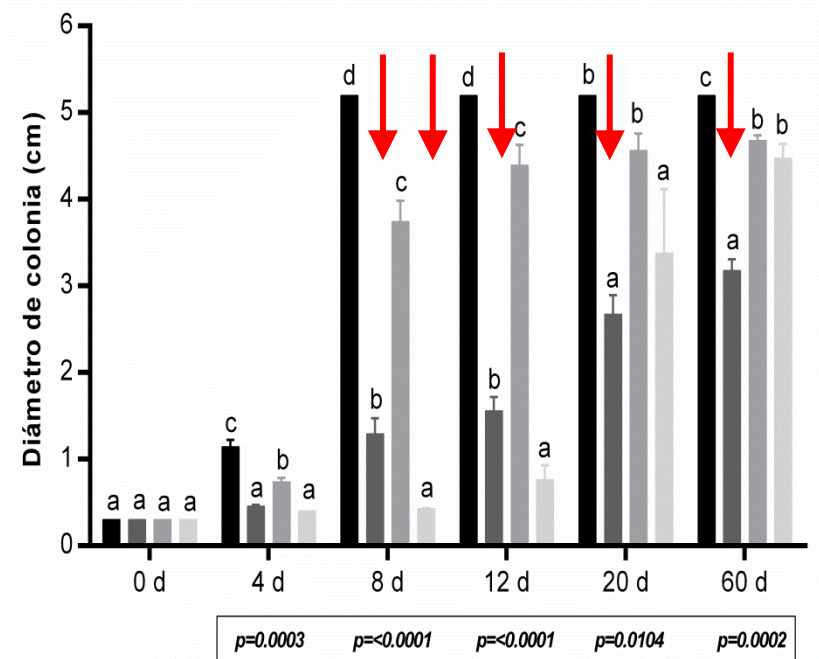
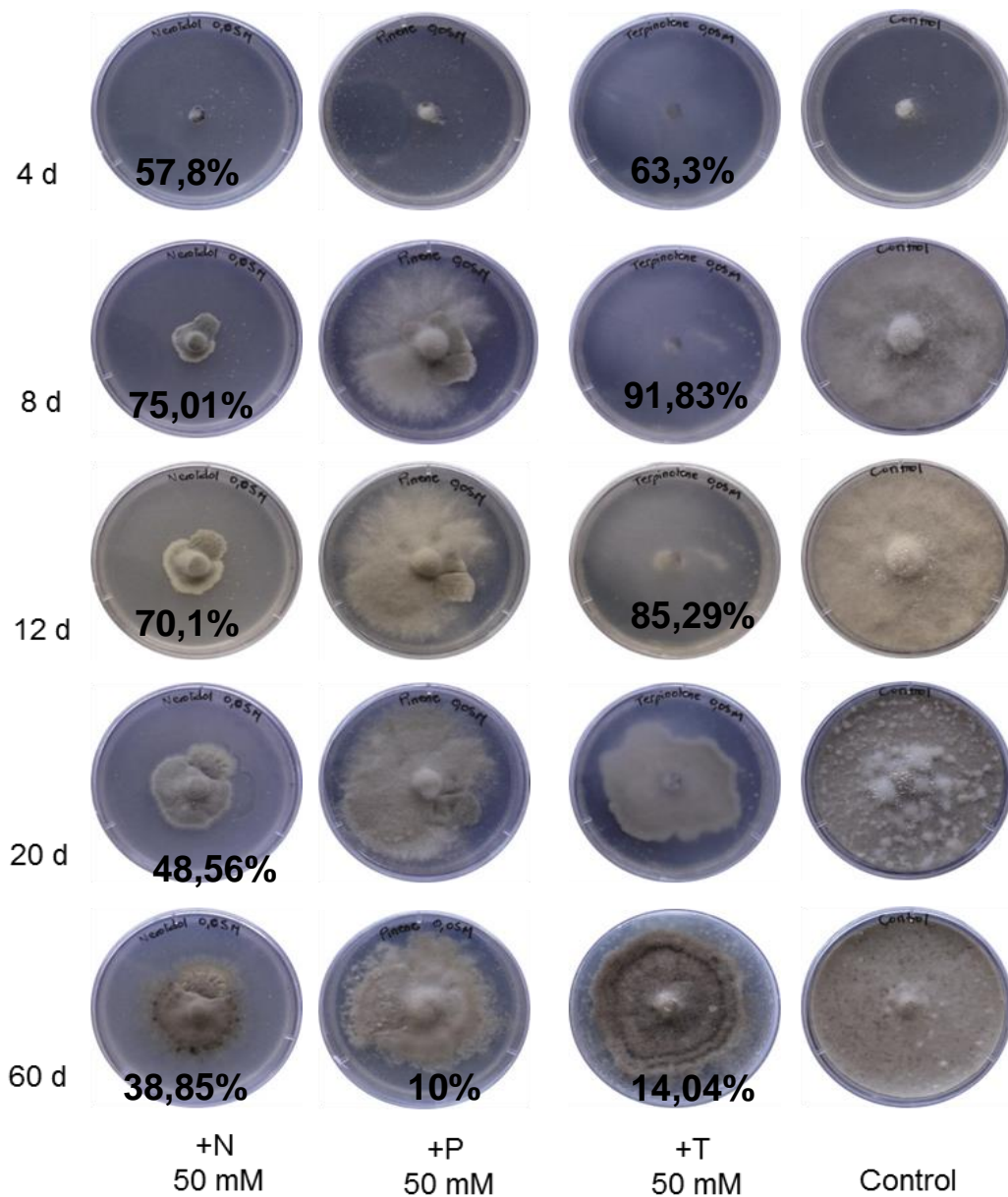
Ensayo en maceta

 $\mu\text{g g}^{-1}$  PF Hoja

	<i>+ Bacillus sp.</i>		<i>+ Pseudomonas sp.</i>		Control	
	15 d	62 d	15 d	62 d		
<b>MONOTERPENOS</b>						
<b><math>\alpha</math>-Pino</b>	340.19 $\pm$ 35.83 <b>b</b>	120.26 $\pm$ 23.69 <b>b</b>	1982.93 $\pm$ 535.23 <b>a</b>	241.93 $\pm$ 70.86 <b>a</b>	Nd	Nd
<b>Eucaliptol</b>	5.79 $\pm$ 2.41 <b>b</b>	5.07 $\pm$ 1.87 <b>a</b>	54.64 $\pm$ 26.15 <b>a</b>	5.02 $\pm$ 4.39 <b>a</b>	Nd	Nd
<b>4-Careno</b>	-	0.68 $\pm$ 0.70 <b>a</b>	25.56 $\pm$ 5.42 <b>ab</b>	0.38 $\pm$ 0.66 <b>a</b>	Nd	Nd
<b>Terpinoleno</b>	287.10 $\pm$ 90.23 <b>b</b>	61.56 $\pm$ 24.10 <b>a</b>	1291.47 $\pm$ 21.57 <b>a</b>	86.05 $\pm$ 16.75 <b>a</b>	Nd	Nd
<b>SESQUITERPENOS</b>						
<b>Nerolidol</b>	206.38 $\pm$ 57.00 <b>b</b>	78.08 $\pm$ 26.77 <b>b</b>	677.45 $\pm$ 169.97 <b>a</b>	138.47 $\pm$ 15.84 <b>a</b>	Nd	Nd
<b>Total</b>	839.46	265.65	4032.05	471.85	Nd	Nd



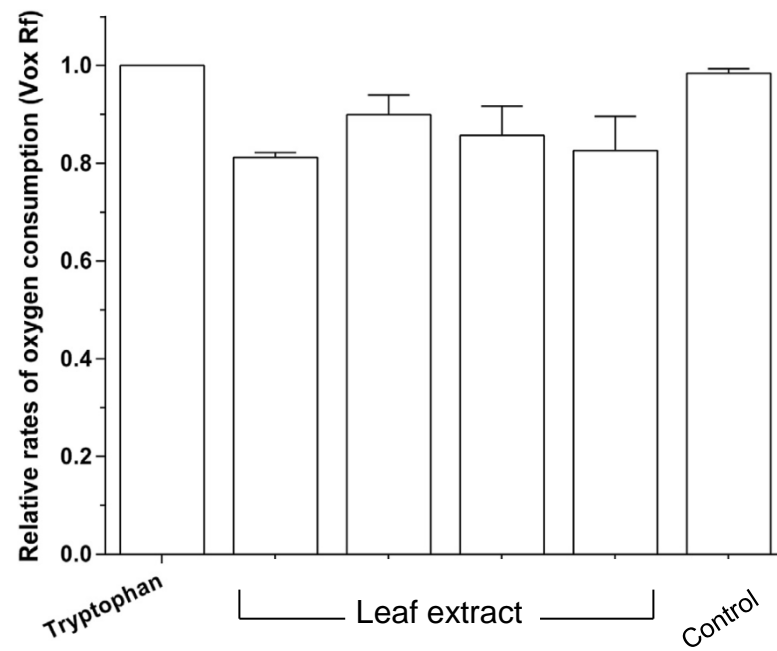
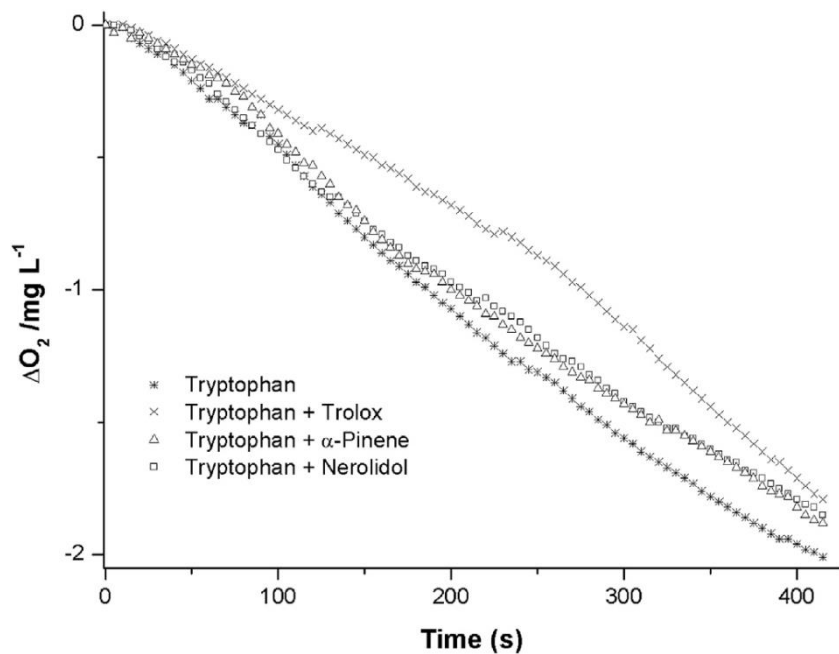
## Defensa frente a Patógenos



Control  
 +N 50 mM  
 +P 50 mM  
 +T 50 mM

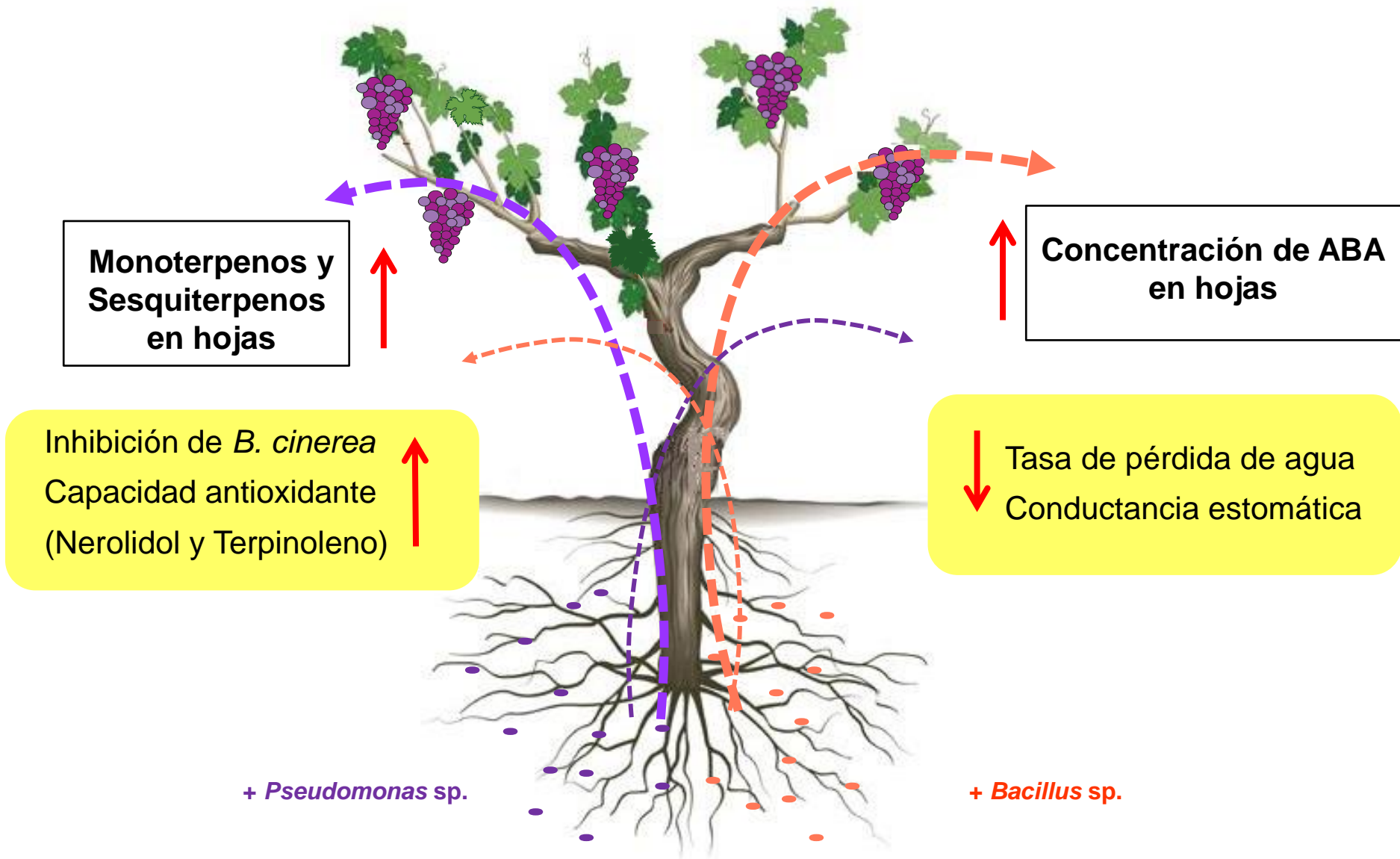
Nerolidol  
 Pineno  
 Terpinoleno

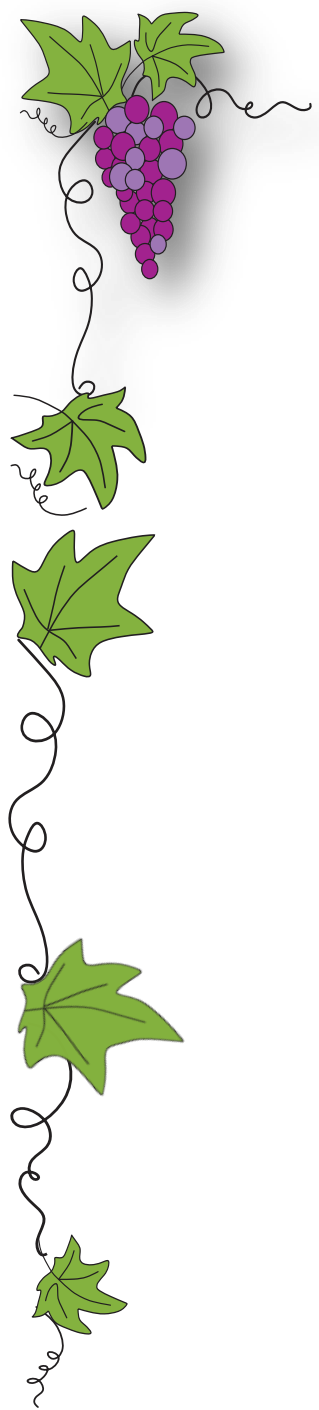
## Defensa frente a Patógenos






# Conclusiones





Muchas gracias  
por su atención



# **Estudio de bacterias aisladas de raíces y suelo aledaño de plantas de vid (*Vitis vinifera* L.) capaces de proteger a la planta ante contaminación con As**

**Dr. Iván Funes Pinter**



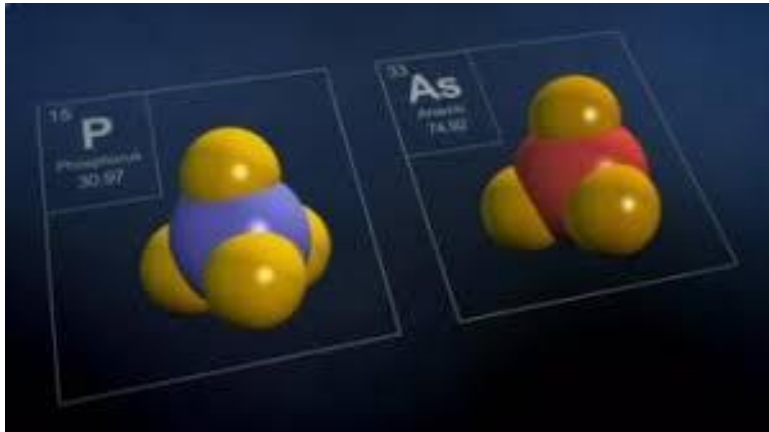
**Laboratorio de Bioquímica Vegetal  
Instituto de Biología Agrícola de Mendoza-Facultad de Ciencias Agrarias  
CONICET-UNCuyo**

## Metales pesados y metaloides





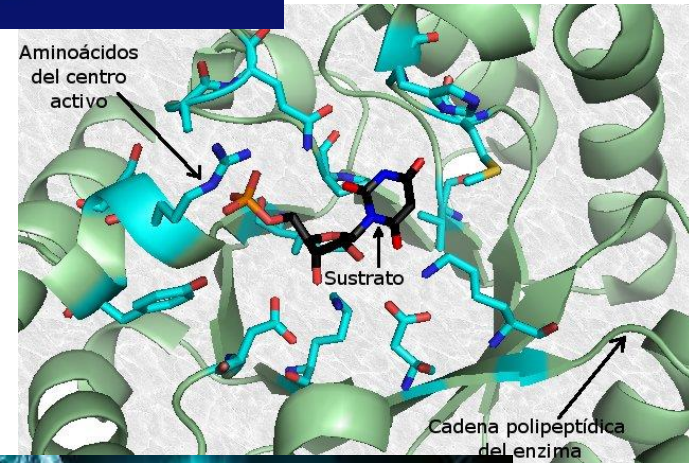
# Toxicidad del As



Similitud con el P

**Generación de ROS  
Estrés oxidativo**

# Alta afinidad con los grupos SH



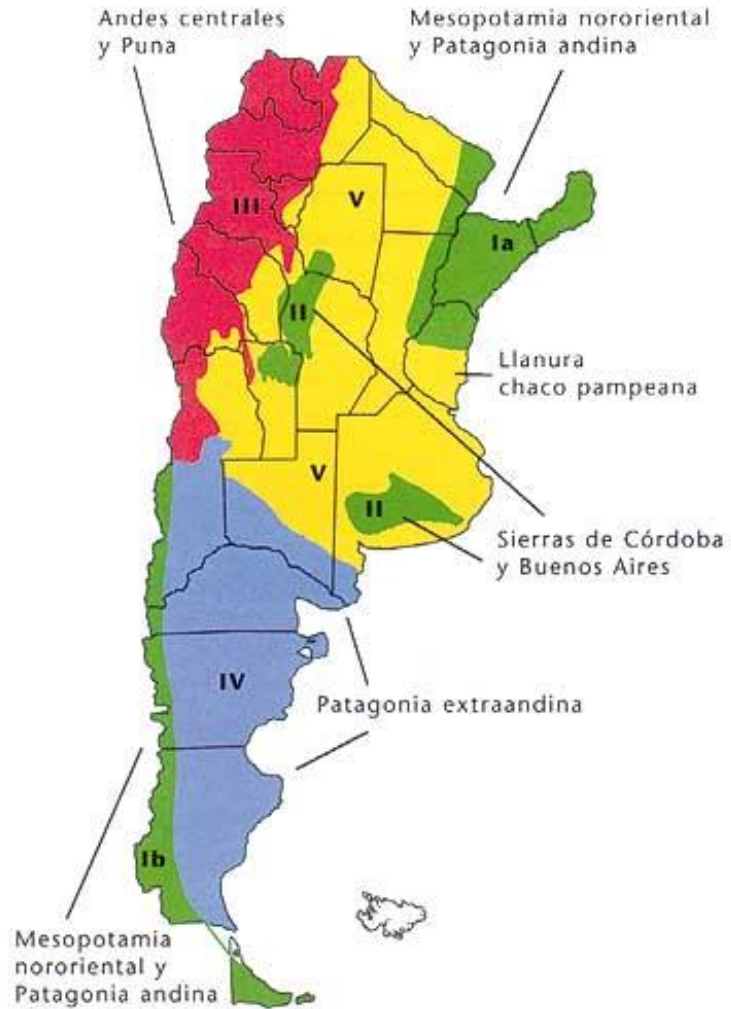
# Arsénico en el ambiente

*Áreas documentadas del mundo con problemas de arsénico en aguas por contaminación natural de acuíferos mayores y por problemas relacionados a la minería y fuentes geotermales.*





# Arsénico en el ambiente



Zonas Ia, Ib y II: sin contaminación natural con arsénico  
Zonas III, IV y V: Aguas con contaminación natural de arsénico

## Cuesta del Viento - Jáchal



## Viñedo La Ciénaga





# Arsénico en viñedos



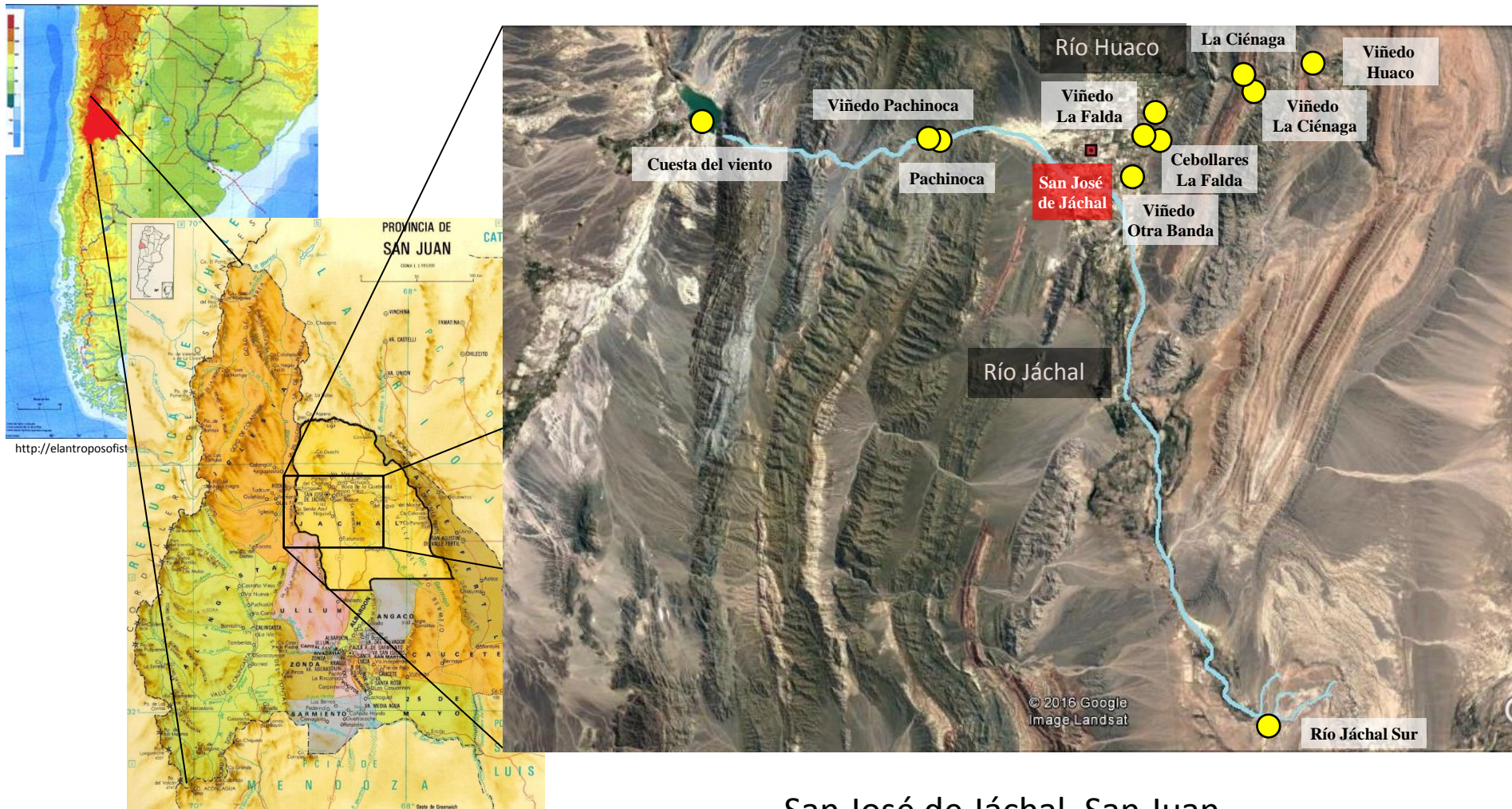
# Objetivo general

**Determinar la capacidad de bacterias PGPR de reducir los efectos tóxicos y la concentración de  $As^{III}$  en *Vitis vinifera* L. cv. Malbec.**





# Área de referencia



San José de Jáchal, San Juan



# Muestreo de suelo y material vegetal



# Análisis edáfico fisicoquímico



Muestras de suelo



C.E. Extracto  
( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )

Textura

MO

P

pH



# Análisis edáfico fisicoquímico

**C.E. Extracto**  
( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )

**Culto < 4000**  
**Inculto > 4000**

**Textura**

**Franco – areno franco**

**MO**

**< 1%**

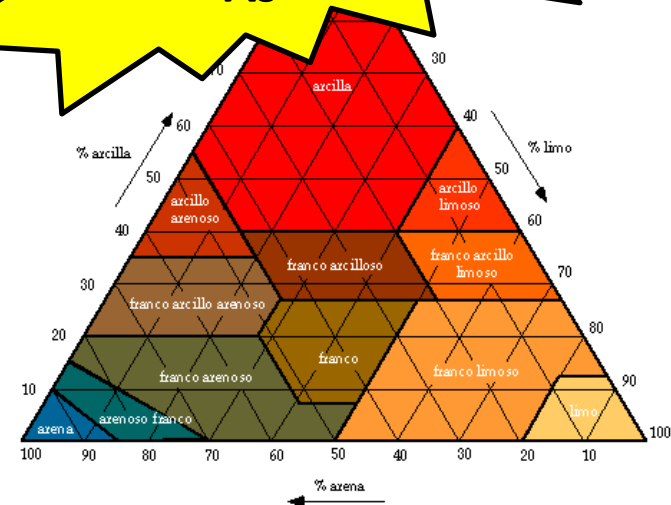
**P**

**Bajo**

**pH**

**7,46 – 8,00**

**Alta**  
**movilidad del**  
**As**





# Determinación As en suelos y material vegetal de Jáchal





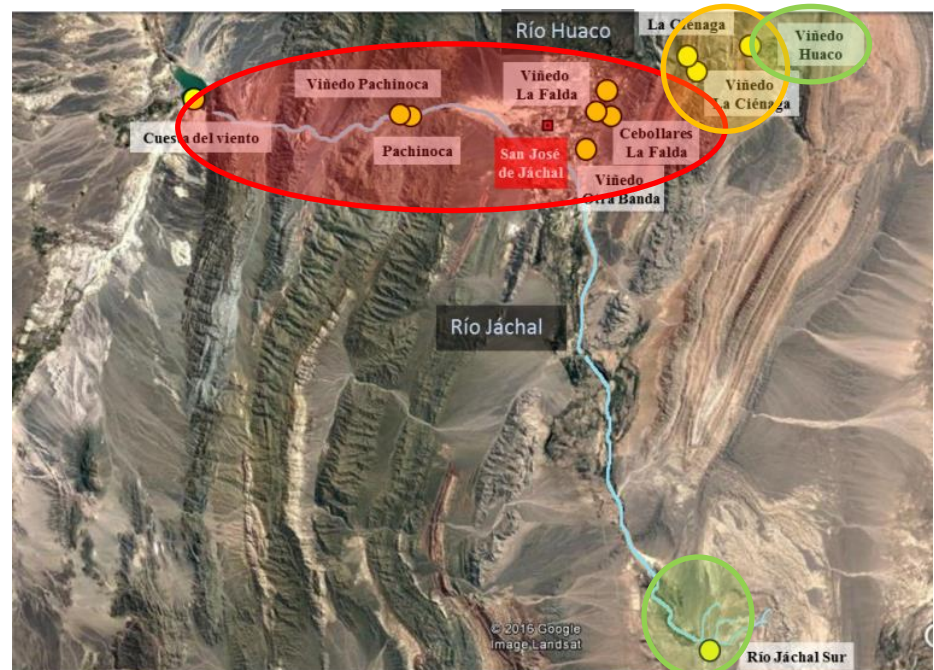
## Contenido de As total en suelos de Jáchal

Lugar	Profundidad (cm)	[As] (ppm)
Embalse Iglesia	15 cm	99,82 ±1,36
	30 cm	125,71 ±2,34
Pachinoca	15 cm	48,07 ±19,85
	30 cm	66,30 ±13,76
La Falda (Cebolla)	15 cm	71,18 ±5,57
	30 cm	75,32 ±6,50
La Falda (Viñedo)	15 cm	81,70 ±2,14
	30 cm	71,05 ±22,38
La Ciénaga (Viñedo)	15 cm	14,61 ±3,18
	30 cm	13,66 ±1,04
La Ciénaga	15 cm	5,885 ±0,39
	30 cm	5,31 ±0,16
Río Jáchal Sur	15 cm	6,59333 ±1,99
	30 cm	7,38 ±0,28

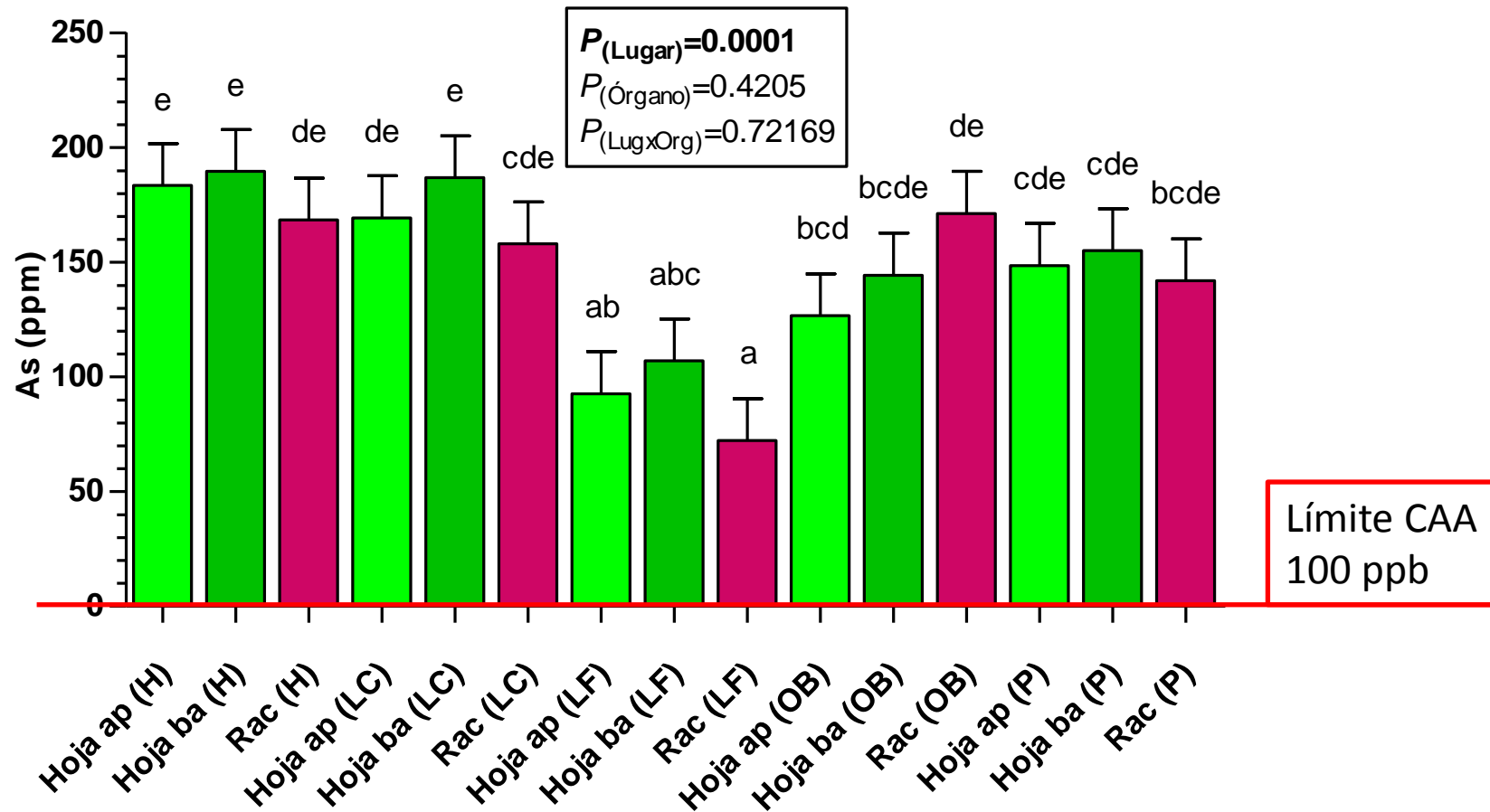
Ley 24.585 de Protección Ambiental para la Actividad Minera

Ley 24.051 Residuos Peligrosos Decreto 831/93

**As 20 ppm**  
**Uso agrícola**



## Contenido de As total en vid

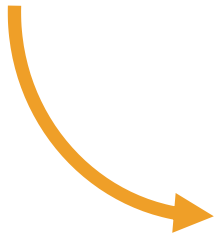




**Análisis edáfico**



**Alta movilidad  
del As**



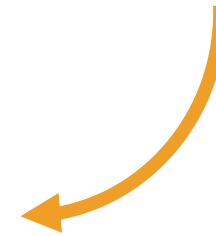
**Alta [As]  
en vid**



**Análisis elemental**



**Alta [As]  
en suelos**



El contenido de As total en suelos de Jáchal supera los límites establecidos para uso agrícola.

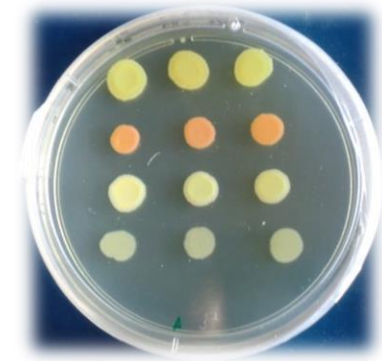
**Establecer niveles de referencia (Jáchal) de la concentración de As en suelos para ensayos con plantas de vid en maceta.**



**As 100 ppm**

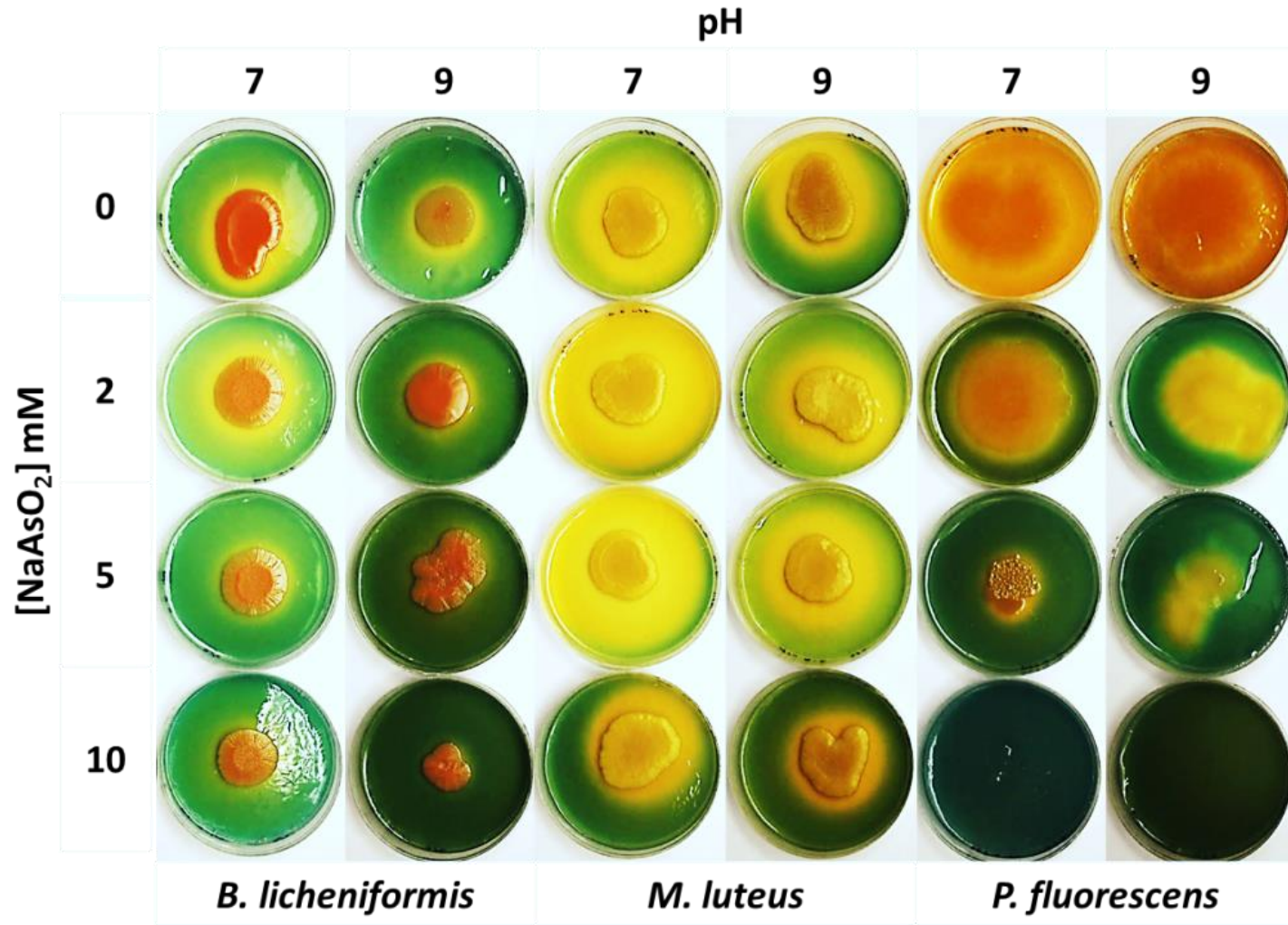
# Selección de PGPR resistentes a As<sup>III</sup>

Cepas	pH	[NaAsO <sub>2</sub> ] (mM)					
		0	5	10	20	30	40
<i>Arthrobacter parietes</i>	7	+++	---	---	---	---	---
	9	+++	---	---	---	---	---
<i>Bacillus licheniformis</i>	7	+++	+++	+++	+++	---	---
	9	+++	+++	+++	+++	++-	---
<i>Brachybacterium faecium</i>	7	+++	+++	---	---	---	---
	9	+++	+++	+++	---	---	---
<i>Kocuria erythromyxa</i>	7	+++	---	---	---	---	---
	9	+++	+--	---	---	---	---
<i>Microbacterium imperiale</i>	7	+++	+++	---	---	---	---
	9	+++	+++	++-	---	---	---
<i>Micrococcus luteus</i>	7	+++	+++	+++	+++	+++	---
	9	+++	+++	+++	+++	+++	++-
<i>Planococcus sp.</i>	7	+++	+++	---	---	---	---
	9	+++	+++	---	---	---	---
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	7	+++	+++	---	---	---	---
	9	+++	+++	---	---	---	---
<i>Terribacillus saccharophilus</i>	7	+++	+++	---	---	---	---
	9	+++	+++	---	---	---	---

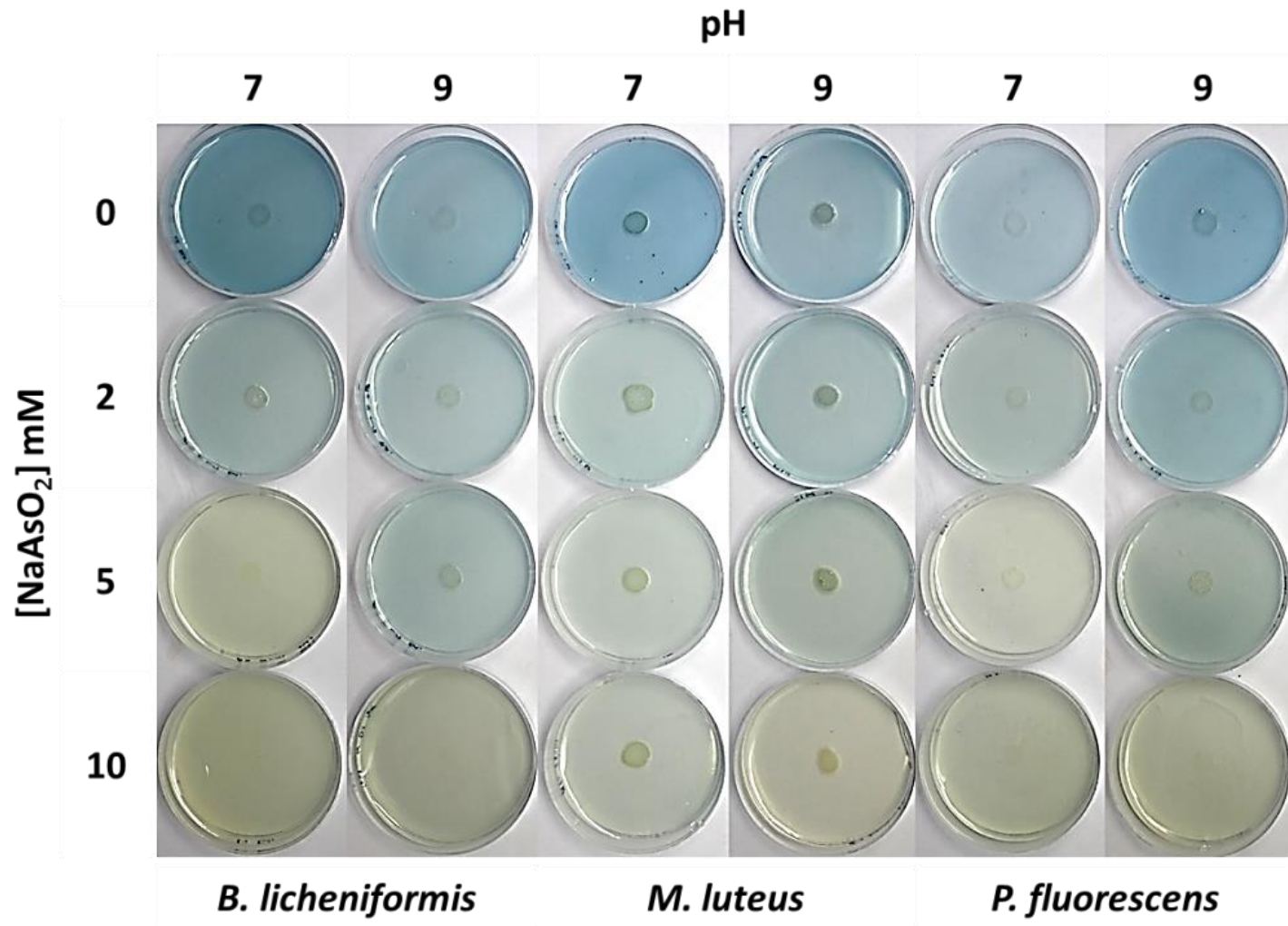




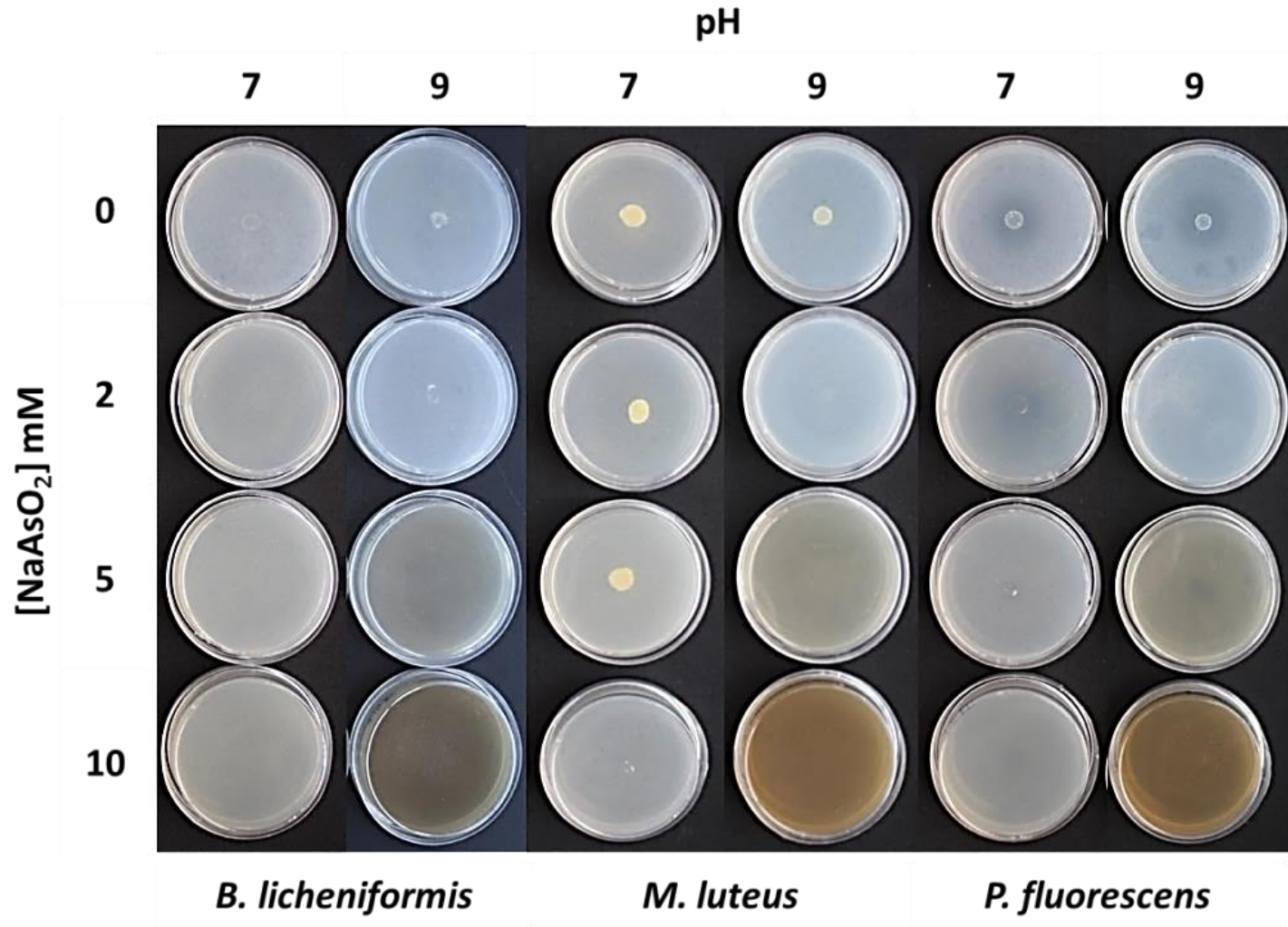
## Producción de sideróforos - medio CAS modificado



## Fijación de $N_2$ - medio NFB

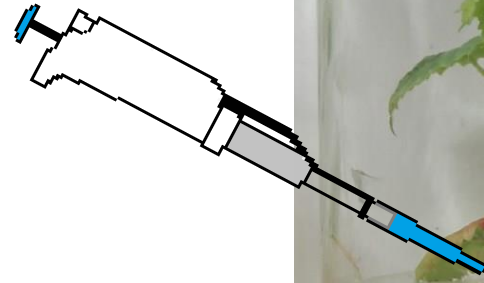


## Solubilización de fosfato - medio NBRIP



# Inoculación de plantas *in vitro*

100  $\mu\text{L}$   
Cultivo 48 hs ( $10^6$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ )

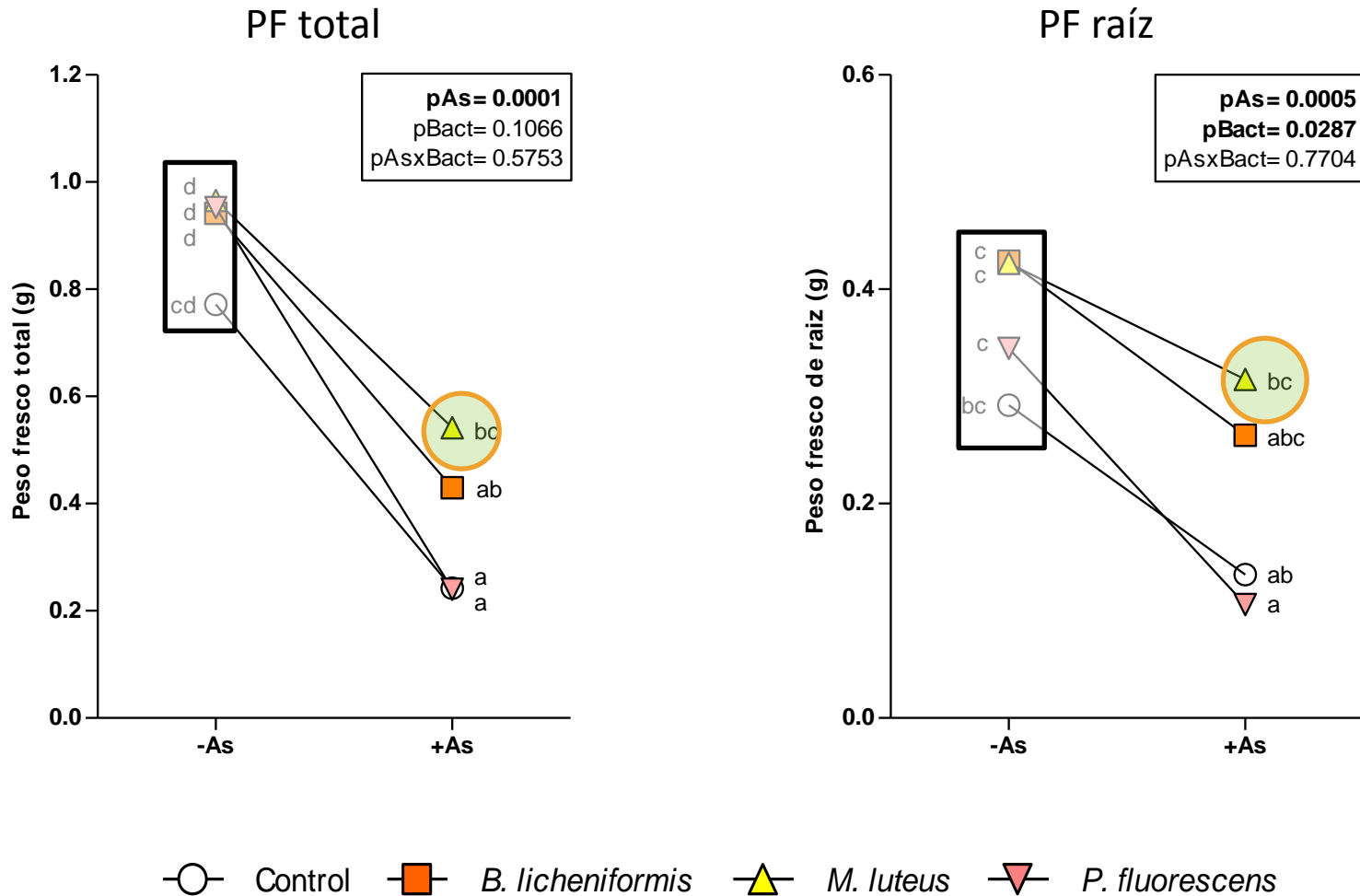


- *Bacillus licheniformis*
- *Micrococcus luteus*
- *Pseudomonas fluorescens*

*Vitis vinifera* L. cv. Malbec  
Medio MS + As 150  $\mu\text{M}$



## Biomasa de plantas inoculadas





# Inoculación de plantas *in vitro*



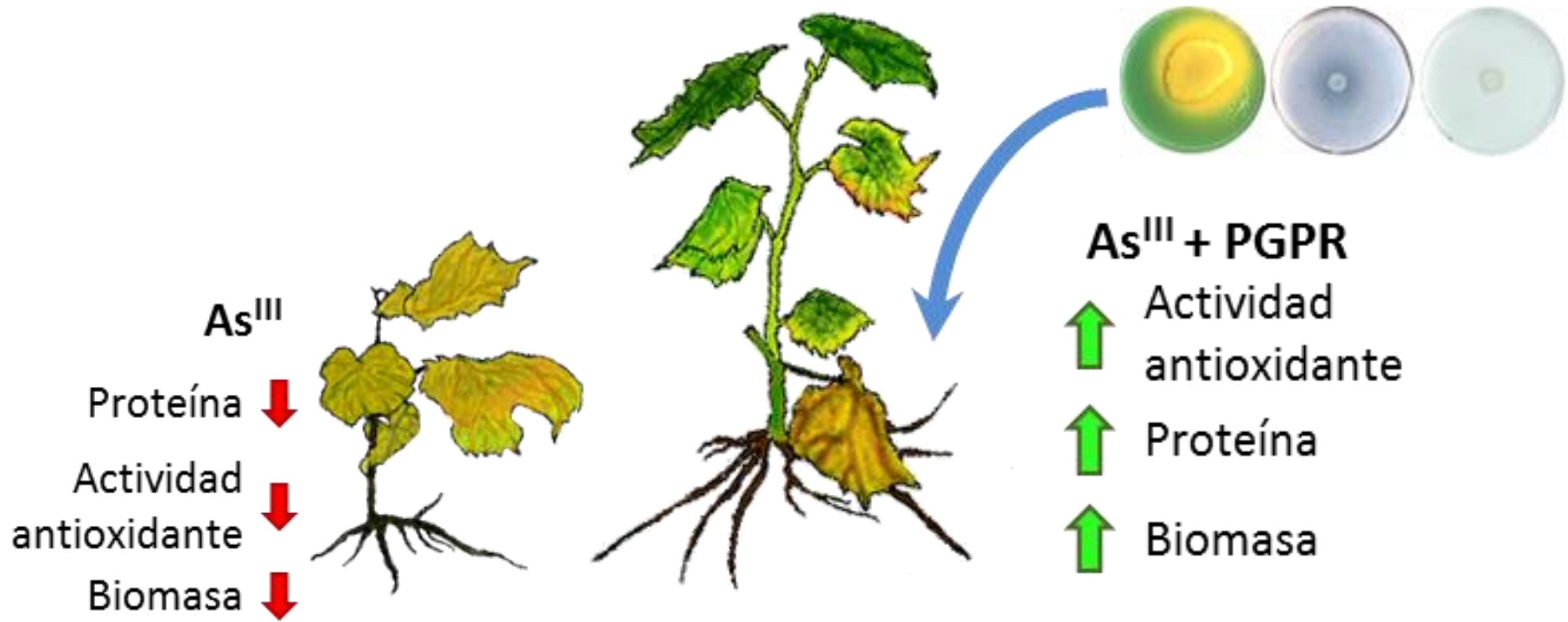
**Control**

***B. licheniformis***

***M. luteus***

***P. fluorescens***

# Conclusiones



# Inoculación de plantas de vid con PGPR resistentes a $As^{III}$



Asperjado cada 14 días

Bacterización en  
cuello cada 14  
días



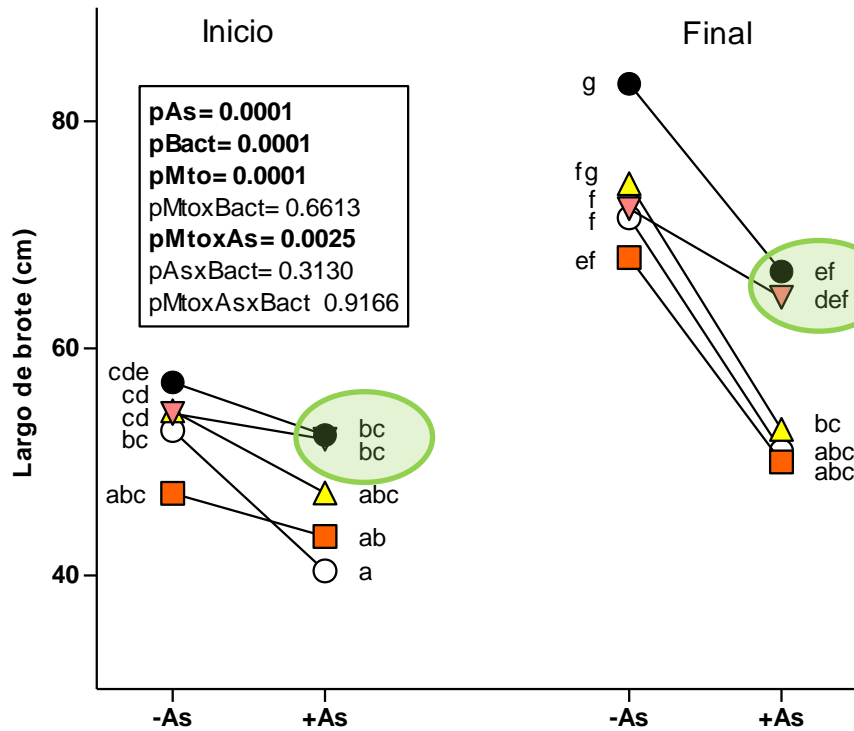
*Vitis vinifera* L. cv. Malbec



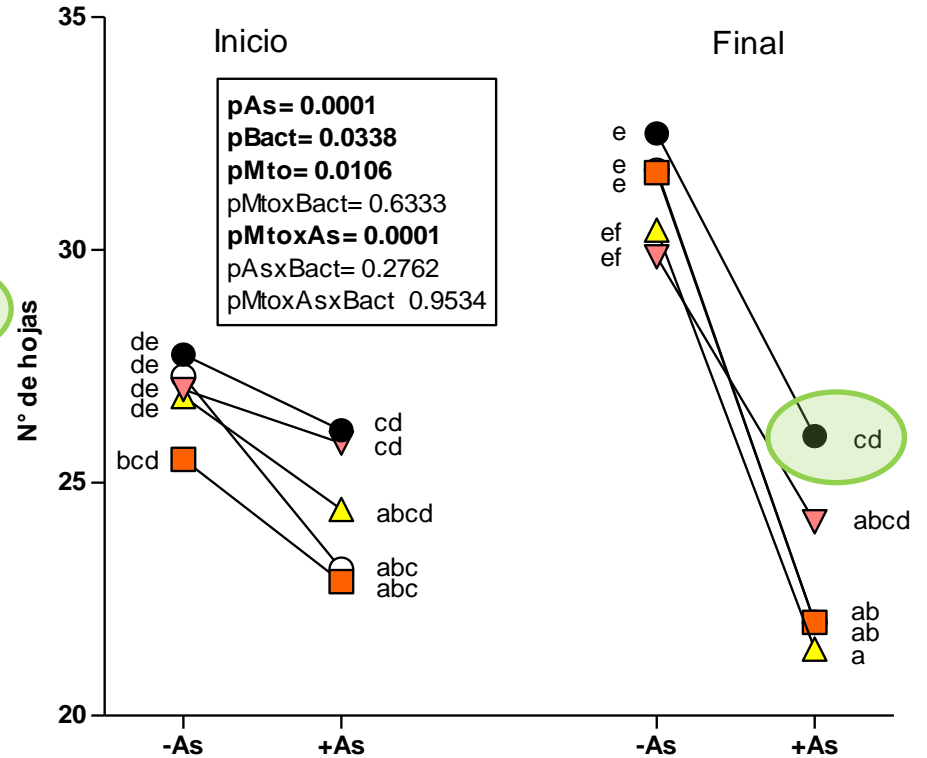
Riego con  $H_2O + NaAsO_2$

100 ppm

## Largo de brote



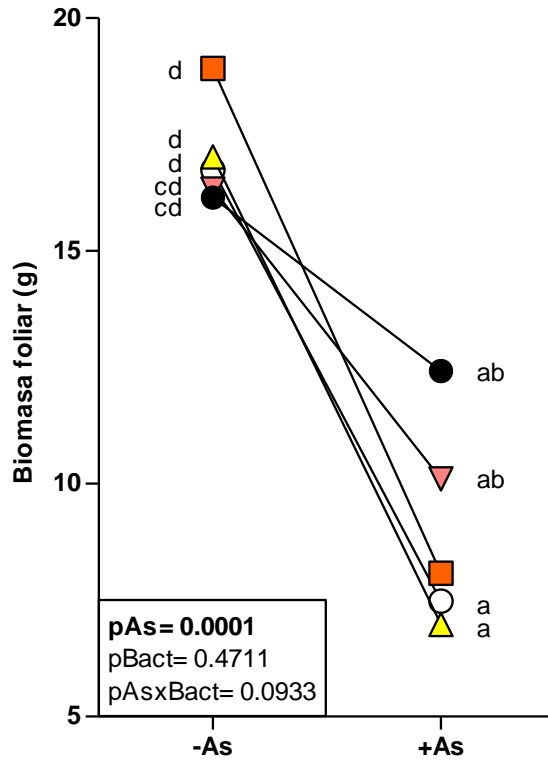
## Cantidad de hojas



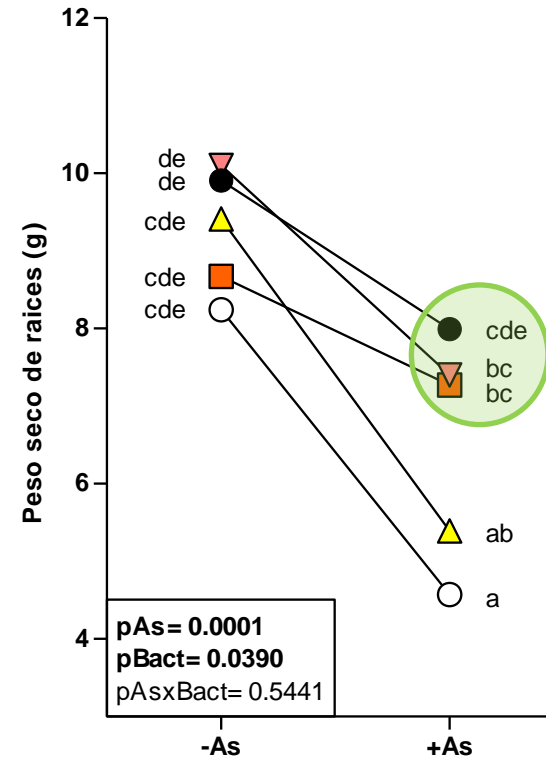
○ Control    ■ *B. licheniformis*    ▲ *M. luteus*    ▼ *P. fluorescens*    ● Consorcio



## Biomasa foliar

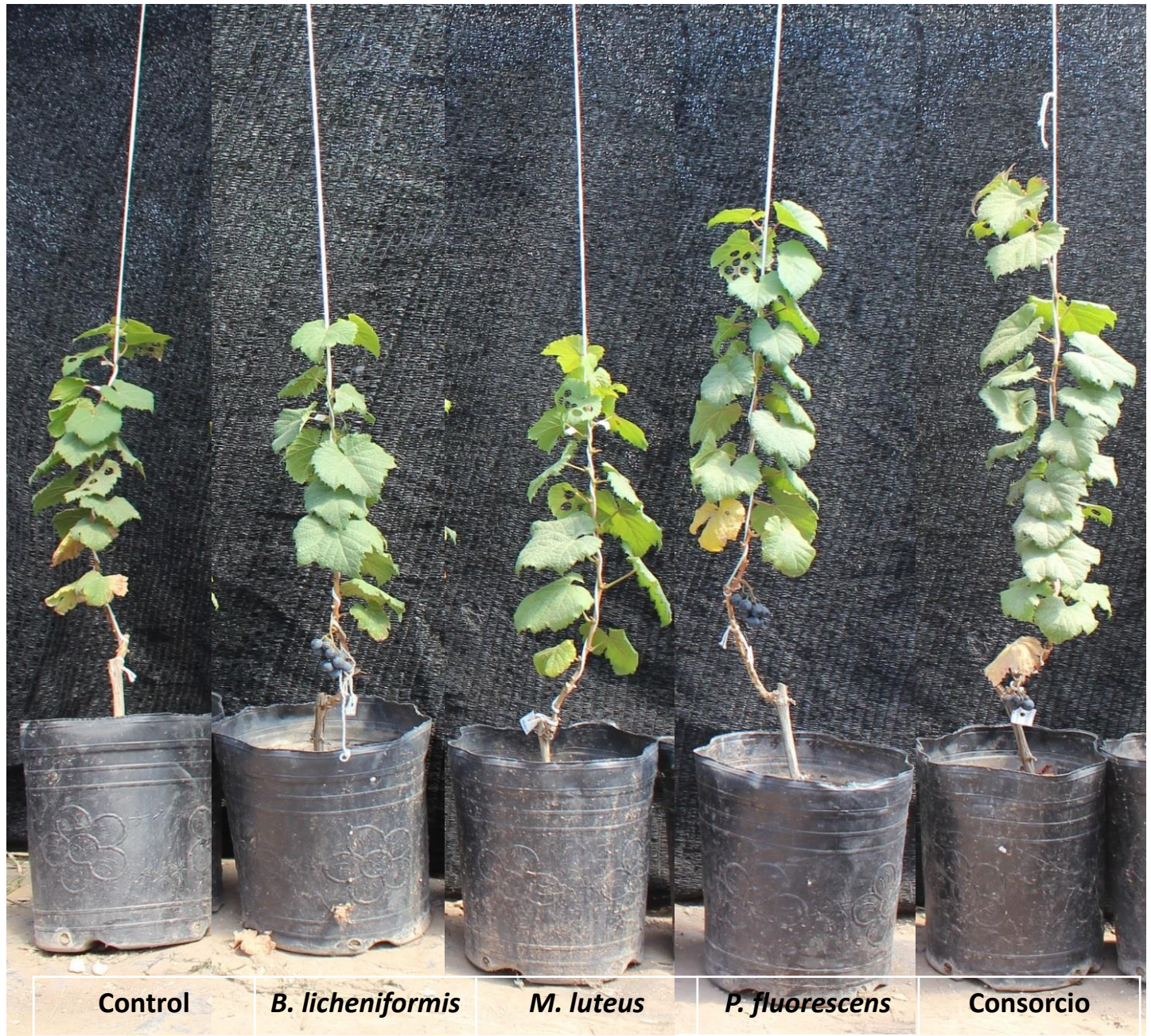


## Biomasa radical



○ Control    ■ *B. licheniformis*    ▲ *M. luteus*    ▼ *P. fluorescens*    ● Consortio

Tratamientos +As



Control

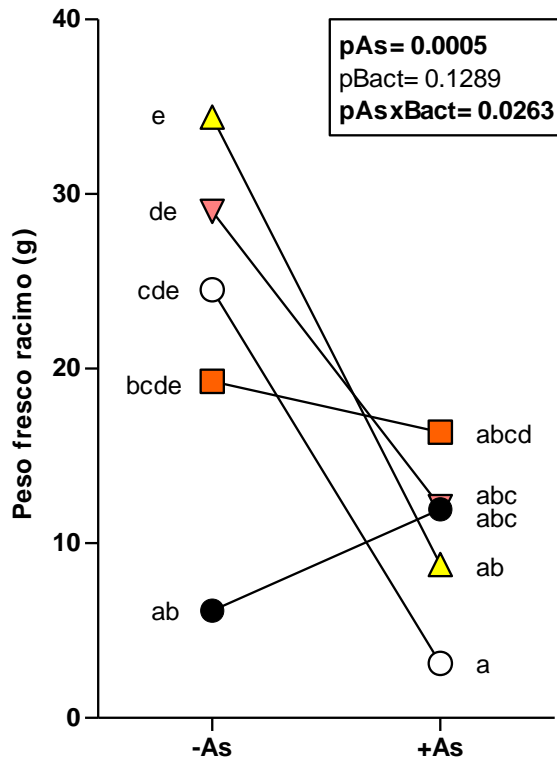
*B. licheniformis*

*M. luteus*

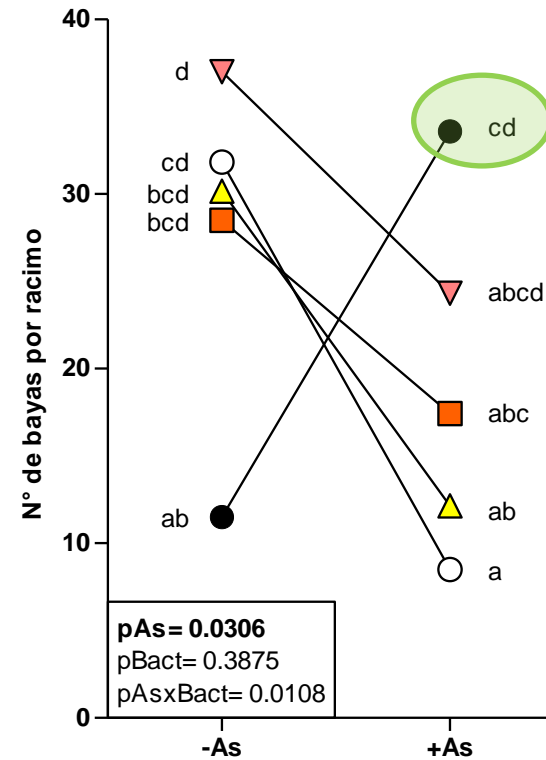
*P. fluorescens*

Consorcio

## Peso de racimo



## Bayas por racimo



○ Control    ■ *B. licheniformis*    ▲ *M. luteus*    ▼ *P. fluorescens*    ● Consortio



## Tratamientos + As



**Control**

***B. licheniformis***

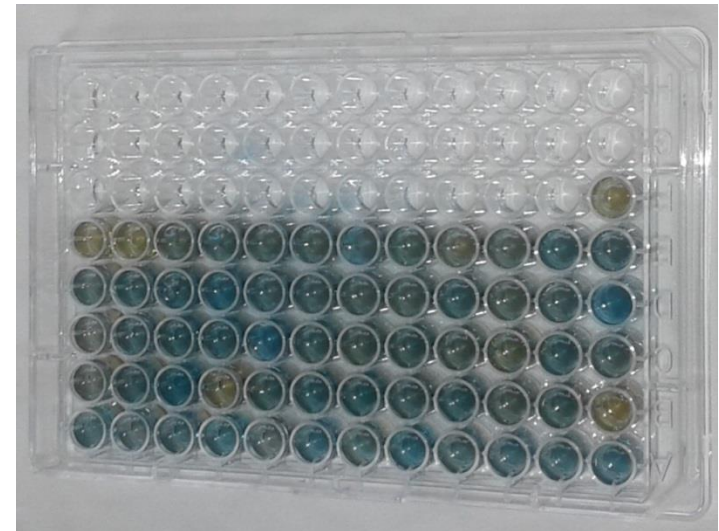
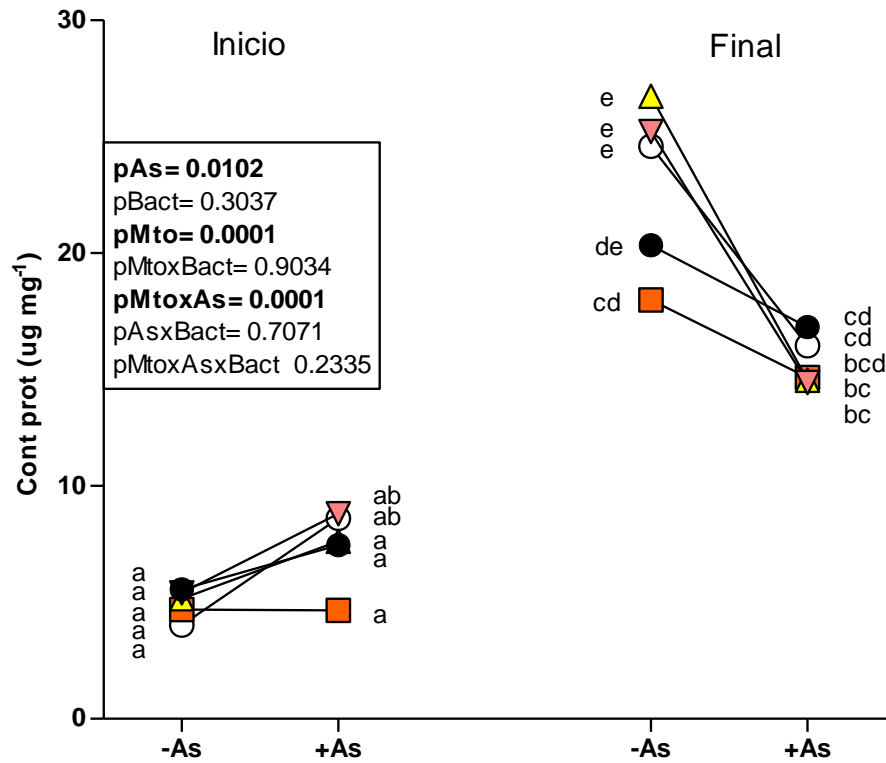
***M. luteus***

***P. fluorescens***

**Consorcio**



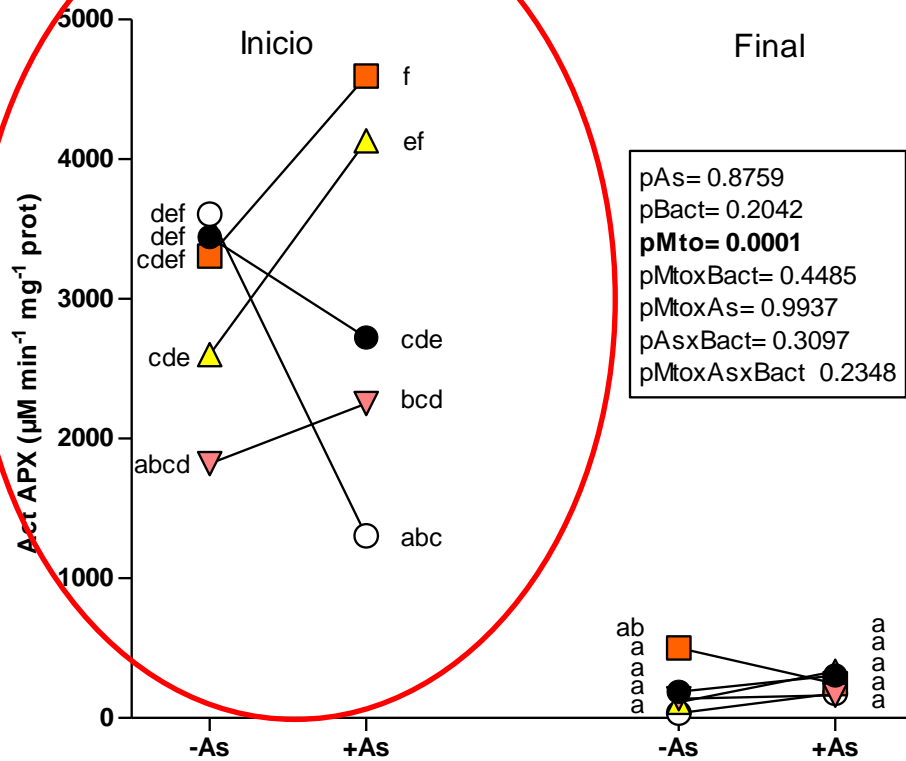
## Proteínas



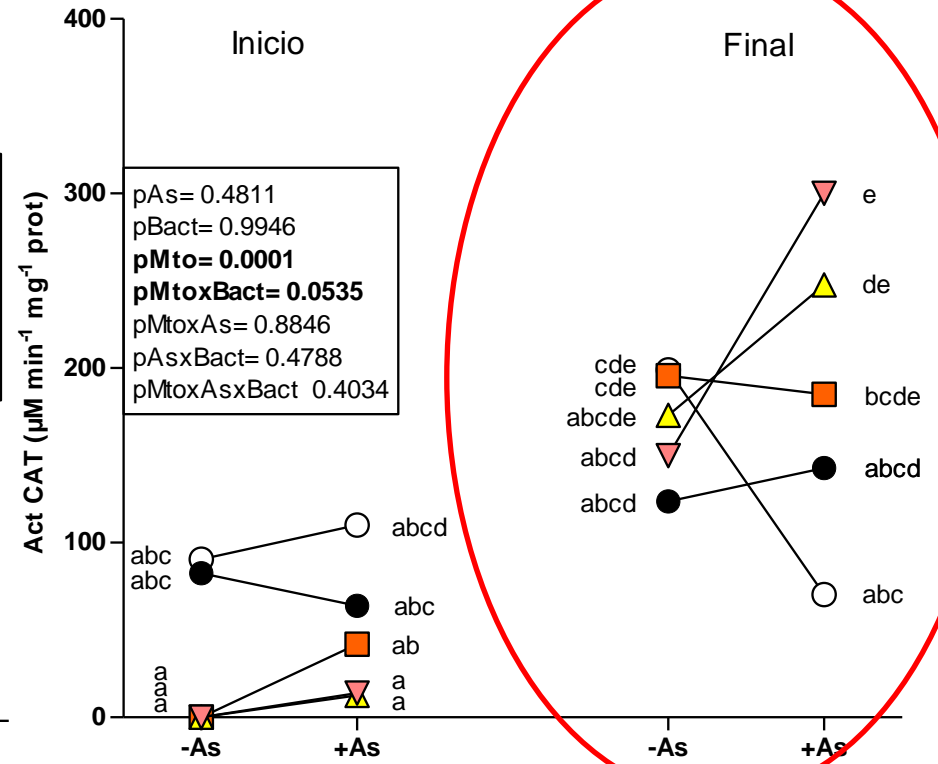
○ Control   ■ *B. licheniformis*   ▲ *M. luteus*   ▼ *P. fluorescens*   ● Consorcio

# Inoculación de plantas de vid con PGPR resistentes a As<sup>III</sup>

## APX

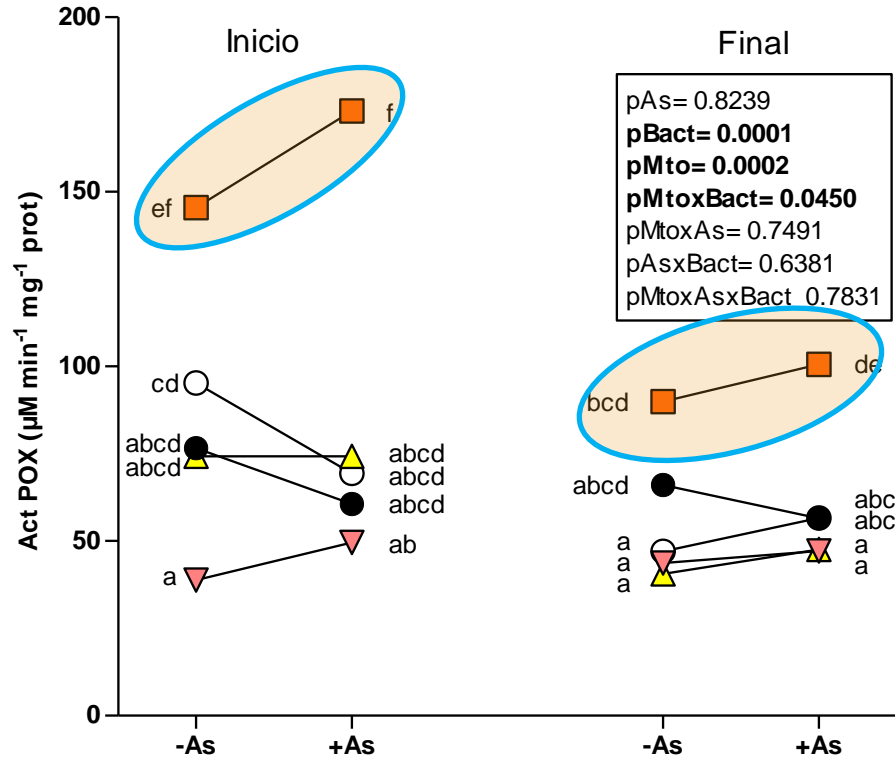


## CAT



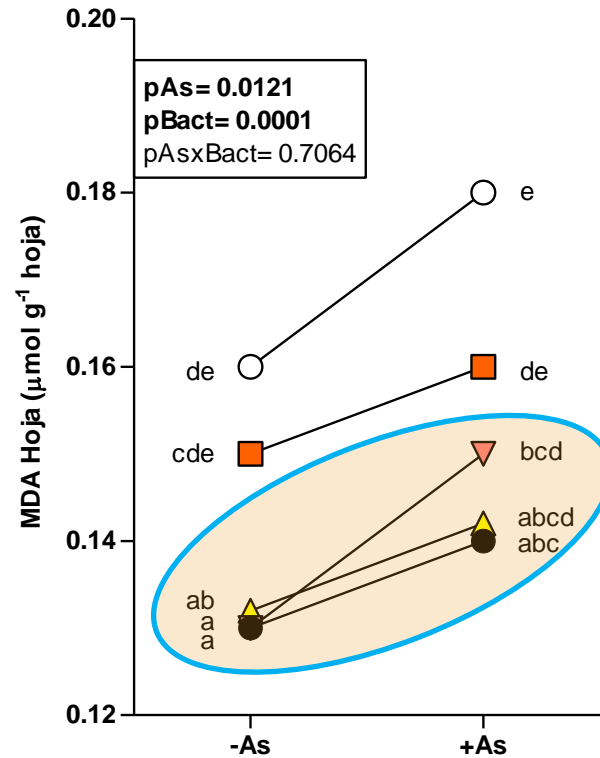
○ Control    ■ *B. licheniformis*    ▲ *M. luteus*    ▼ *P. fluorescens*    ● Consorcio

## POX



○ Control    ■ *B. licheniformis*    ▲ *M. luteus*    ▼ *P. fluorescens*    ● Consorcio

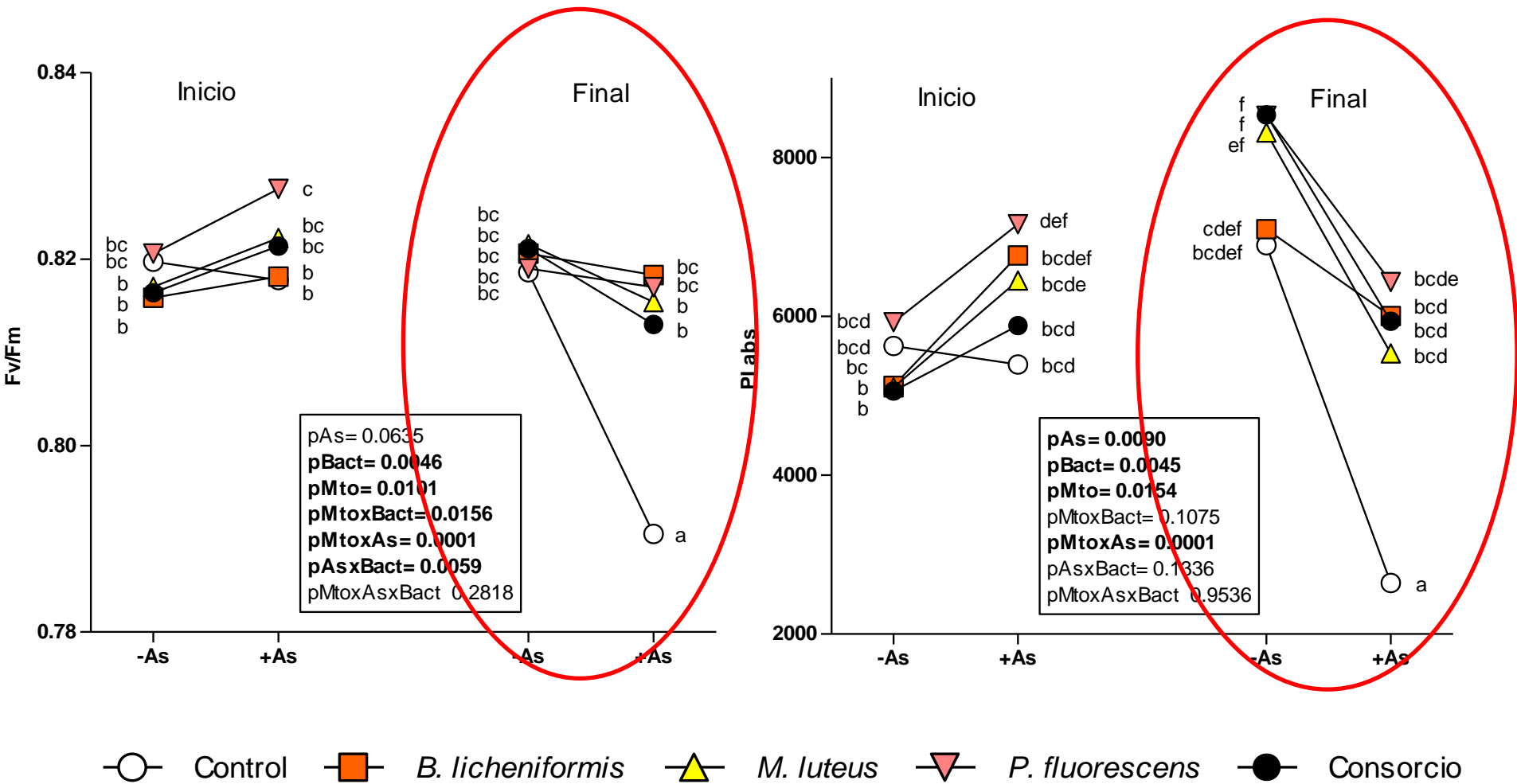
## Peroxidación de lípidos



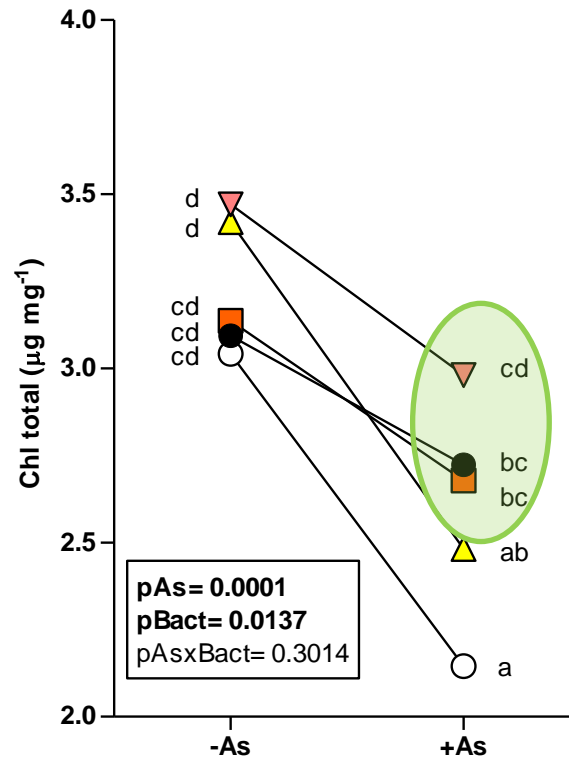
○ Control    ■ *B. licheniformis*    ▲ *M. luteus*    ▼ *P. fluorescens*    ● Consortio



## Rendimiento fotosintético y vitalidad



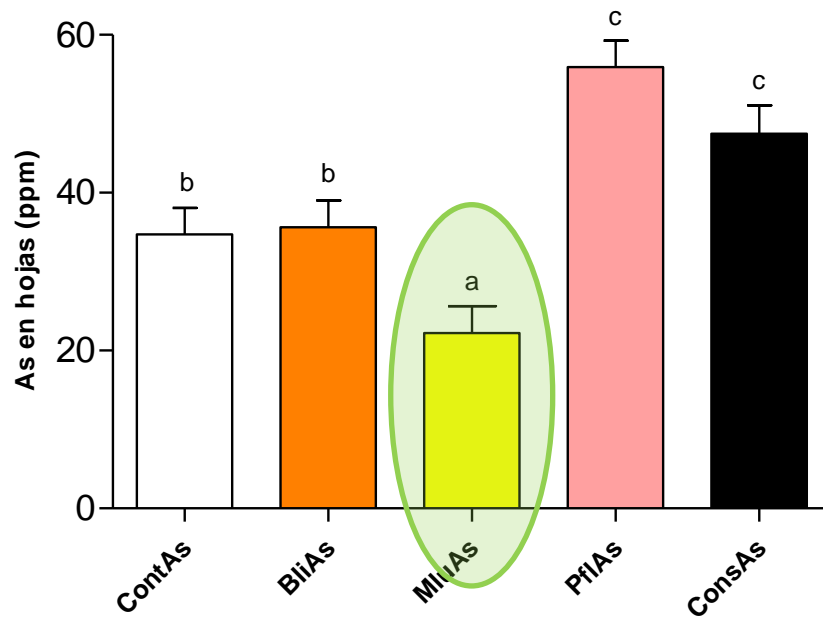
### Clorofilas



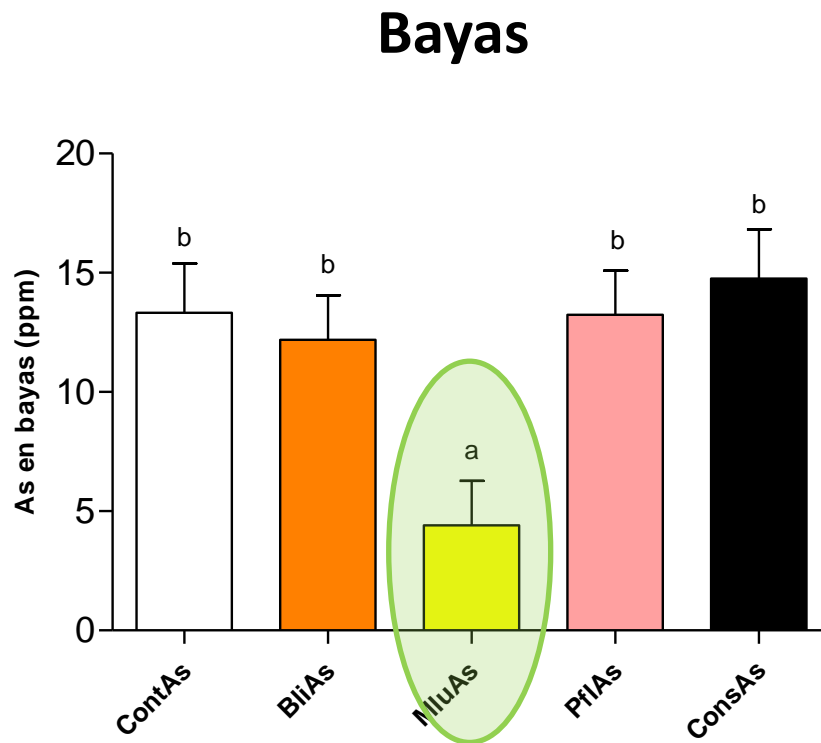
Control  
  *B. licheniformis*  
  *M. luteus*  
  *P. fluorescens*  
  Consorcio

## Contenido de As

### Hojas



## Contenido de As





La bacterización con las PGPR seleccionadas disminuyen los efectos tóxicos del metaloide en plantas de vid.

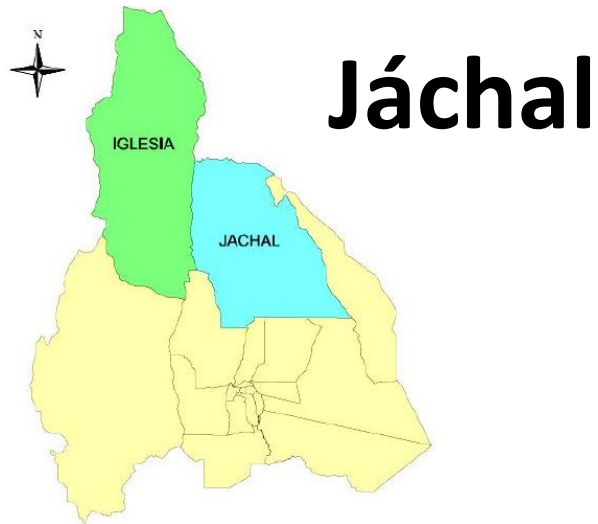


**Incremento de proteínas, actividad antioxidante, clorofilas y fotosíntesis**



**BIOMASA**

# **Discusión y perspectivas**



# Jáchal

Alta [As] en suelos y plantas



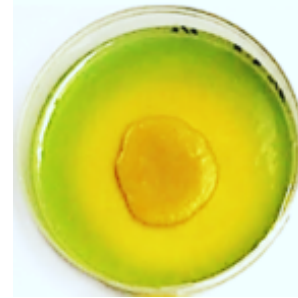
**¡¡¡Necesario  
realizar tareas de  
remediación!!!**



*Bacillus licheniformis*

*Micrococcus luteus*

*Pseudomonas fluorescens*



Producción de sideróforos

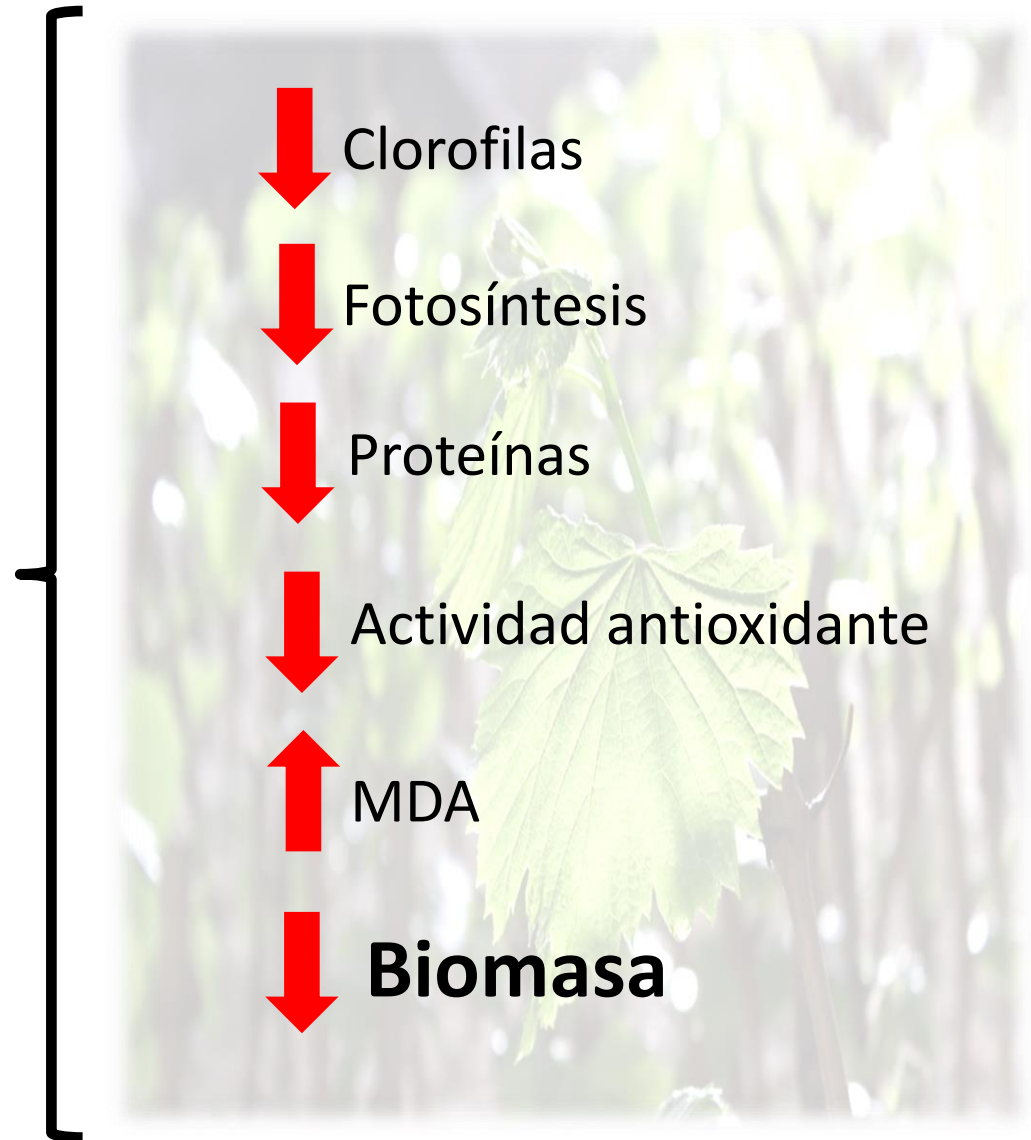


Fijación de N<sub>2</sub>

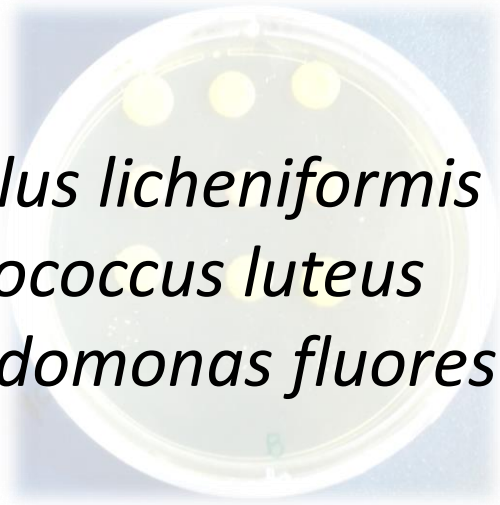


Solubilización de fosfatos

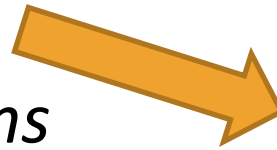
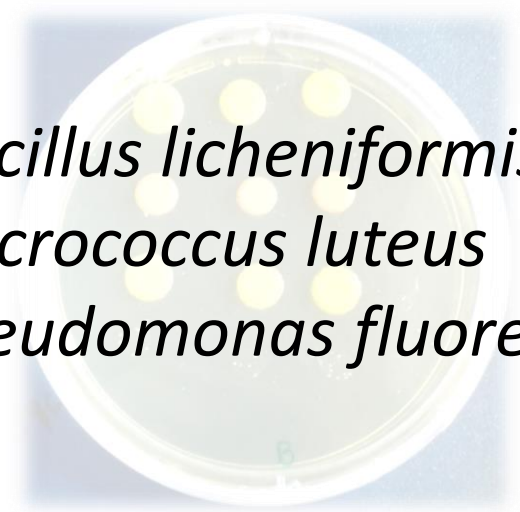




- *Bacillus licheniformis*
- *Micrococcus luteus*
- *Pseudomonas fluorescens*

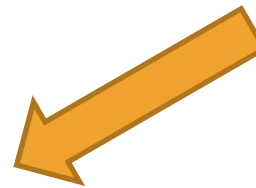


- *Bacillus licheniformis*
- *Micrococcus luteus*
- *Pseudomonas fluorescens*

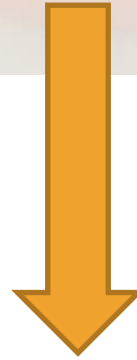


Reducen efectos  
tóxicos del  $\text{As}^{\text{III}}$  en  
vid

Candidatos para  
agentes de  
biorremediación



- La inoculación con el **consorcio** fue el tratamiento que incrementó la biomasa en mayor medida
- ***Micrococcus luteus*** reduce el contenido de As en la baya



Consorcio con mayor proporción de *M. luteus*





## Identificar mecanismos

- Determinaciones de ABA
- Especiación del As en la planta y el efecto de las bacterias
- Cantidad de bacterias, tiempos y formas de aplicación

## Aplicación en viñedo



# Muchas gracias por su atención

## Contactos

[msalomon@fca.uncu.edu.ar](mailto:msalomon@fca.uncu.edu.ar)

[ifunespinter@fca.uncu.edu.ar](mailto:ifunespinter@fca.uncu.edu.ar)

[ppiccoli@fca.uncu.edu.ar](mailto:ppiccoli@fca.uncu.edu.ar)



**Laboratorio de Bioquímica Vegetal  
Instituto de Biología Agrícola de Mendoza-Facultad de Ciencias Agrarias  
CONICET-UNCuyo**