UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOMAS DE ZAMORA

FACULTAD DE CIENCIASAGRARIAS

Trabajo Final de Grado

Ingeniería Agronómica

“Efecto de la inoculación de semillas de *Cannabis sativa* L. con microorganismos PGPR sobre la calidad fisiológica y crecimiento de plantas”

Diestra Balboa Diego Alexis

Directora: Ing. Agr (Esp). Galian, Liliana Rosa

Codirectora: Ing. Agr. (Dra) Mgter. Olivera, María Elena

Lomas de Zamora, Julio de 2026

Trabajo de Investigación

"Efecto de la inoculación de semillas de *Cannabis sativa* L. con microorganismos PGPR sobre la calidad fisiológica y crecimiento de plantas"

Identificación del proyecto:

Carrera: Ingeniería Agronómica

Unidad ejecutora: Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Lomas de Zamora

Directora

Apellido y Nombre: Galian, Liliana Rosa

Cargo: Profesora Asociada, dedicación Exclusiva. Cátedra de Microbiología

Co-Directora

Apellido y Nombre: Olivera, María Elena

Cargo: Profesora Asociada, dedicación Exclusiva. Cátedra de Forrajicultura y Manejo de Recursos Forrajeros. Directora Técnica del Laboratorio de Análisis de Semillas FCA-UNLZ

“las opiniones expresadas por el autor de este Trabajo no representan necesariamente los criterios de la carrera de Ingeniería agronómica de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Lomas de Zamora”.

RESUMEN

Cannabis sativa L. es una hierba anual perteneciente a la familia *Cannabaceae*, originaria de Asia Central, con creciente interés medicinal e industrial, cuyo rendimiento y calidad de cannabinoides dependen del genotipo y de factores ambientales como la nutrición. Para mejorar la producción tanto de aceites, inflorescencias y fibra, se usan microorganismos promotores del crecimiento vegetal tanto en esta especie como en números cultivos. Estos microorganismos promueven la germinación, el enraizamiento y la absorción de nutrientes al fijar nitrógeno, solubilizar fosfatos y producir hormonas como las auxinas. Sin embargo, falta información sobre cómo la coinoculación con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal como *Azospirillum argentinense*, *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus subtilis* afectan la germinación y el crecimiento temprano de *C. sativa.* Los objetivos del presente trabajo fueron determinar el efecto de la coinoculación con *Azospirillum argentinense, Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus subtilis* sobre: I) la calidad fisiológica de las semillas y el crecimiento de las plántulas; y II) el crecimiento vegetativo de plantas en macetas; y (III) la colonización de estos microorganismos en la rizósfera durante la etapa vegetativa. Semillas de *C. sativa* se trataron con inoculantes comerciales en forma individual y conjunta, resultando en los siguientes tratamientos: T: testigo sin inocular, AZO: inoculado con *A. argentinense*, PSE: inoculado con *P. fluorescens*, BAC: inoculado con *B. subtilis*, ABP: coinoculado con *A. argentinense*, *P. fluorescens* y *B. subtilis*. Sobre cada tratamiento se determinaron las siguientes variables respuesta: porcentaje de germinación, longitud y peso seco aéreo y radicular de plántulas, en laboratorio de semillas (Ensayo 1). En el Ensayo 2, se midieron la longitud aérea y radicular, número de hojas, y peso seco de parte aérea y radicular, en

plantas creciendo en macetas a los 30 y 60 días desde la siembra (dds). A los 30 dds, durante el ensayo 2 se determinó la presencia de los microorganismos bajo estudio en la rizósfera mediante lavado de raíces y siembra en medios de cultivos diferencial y/o selectivo. Se aplicó un diseño completamente al azar (DCA) con cuatro repeticiones en Ensayo 1. En Ensayo 2 se aplicó un DCA con 10 repeticiones por tratamiento. Se realizó Análisis de varianza (ANAVA) y prueba de DGC ($p < 0.05$) mediante el programa Navure (2024). Los resultados mostraron que la coinoculación mejoró significativamente el porcentaje de germinación (61%) respecto al testigo (46%) y a las inoculaciones individuales (AZO: 53%, PSE: 50%, BAC: 43%). Además, mejoraron el largo radicular de las plántulas (ABP: 6,01 cm vs testigo: 3,44 cm), el peso seco radicular (ABP: 0,0021 g vs testigo: 0,0015 g) y el largo aéreo (ABP: 5,07 cm vs testigo: 4,15 cm); aunque sin diferencias significativas para el peso seco aéreo. En el Ensayo 2, a los 30 y 60 dds, no se observaron mejoras en el crecimiento con respecto al testigo en cuanto a largos y pesos aéreos y radiculares, como así también el número de ramificaciones. Sin embargo, presentaron una arquitectura foliar significativamente más densa, con mayor número de hojas por ramificación (ABP: 20,33 vs testigo: 14,50) y más hojas sin expandir (ABP: 3,3 vs testigo: 3). Se recuperaron los tres microorganismos en la rizósfera de *C. sativa* a los 30 dds. En este sentido, la recuperación de *A. argentinense*, *P. fluorescens* y *B. subtilis* en la rizósfera de *C. sativa* evidencia la compatibilidad entre las cepas y su capacidad para colonizar las raíces de las plantas. Se concluye que la coinoculación con *A. argentinense*, *P. fluorescens* y *B. subtilis* mejora la calidad fisiológica de semillas y crecimiento de plántulas, y modifica la arquitectura foliar en la etapa vegetativa.

PALABRAS CLAVE: *Cannabis*; colonización; coinoculación; PGPR; semillas

ABSTRACT

Cannabis sativa L. is an annual herb belonging to the family Cannabaceae, native to Central Asia, with growing medicinal and industrial interest, whose cannabinoid yield and quality depend on genotype and environmental factors such as nutrition. To improve the production of oils, inflorescences, and fiber, plant growth-promoting microorganisms are used both in this species and in numerous crops. These microorganisms promote germination, rooting, and nutrient uptake by fixing nitrogen, solubilizing phosphates, and producing hormones such as auxins. However, there is a lack of information on how co-inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria such as *Azospirillum argentinense*, *Pseudomonas fluorescens*, and *Bacillus subtilis* affects the germination and early growth of *C. sativa*. The objectives of the present study were to determine the effect of co-inoculation with *Azospirillum argentinense*, *Pseudomonas fluorescens*, and *Bacillus subtilis* on: I) the physiological quality of seeds and seedling growth; II) the vegetative growth of potted plants; and III) the colonization of these microorganisms in the rhizosphere during the vegetative stage. *C. sativa* seeds were treated with commercial inoculants individually and in combination, resulting in the following treatments: T: non-inoculated control, AZO: inoculated with *A. argentinense*, PSE: inoculated with *P. fluorescens*, BAC: inoculated with *B. subtilis*, ABP: co-inoculated with *A. argentinense*, *P. fluorescens*, and *B. subtilis*. The following response variables were determined for each treatment: germination percentage, shoot and root length, and shoot and root dry weight of seedlings, in a seed laboratory (Trial 1). In Trial 2, shoot and root length, number of leaves, and shoot and root dry weight were measured in plants growing in pots at 30 and 60 days after sowing (DAS). At 30 DAS, during Trial 2, the

presence of the microorganisms under study in the rhizosphere was determined by root washing and plating on differential and/or selective culture media. A completely randomized design (CRD) with four replications was applied in Trial 1. In Trial 2, a CRD with 10 replications per treatment was applied. Analysis of variance (ANOVA) and DGC test ($p < 0.05$) were performed using Navure software (2024). The results showed that co-inoculation significantly improved the germination percentage (61%) compared to the control (46%) and individual inoculations (AZO: 53%, PSE: 50%, BAC: 43%). In addition, it improved seedling root length (ABP: 6.01 cm vs. control: 3.44 cm), root dry weight (ABP: 0.0021 g vs. control: 0.0015 g), and shoot length (ABP: 5.07 cm vs. control: 4.15 cm); although no significant differences were found for shoot dry weight. In Trial 2, at 30 and 60 DAS, no improvements in growth were observed compared to the control for shoot and root lengths and weights, as well as the number of branches. However, plants showed a significantly denser leaf architecture, with a greater number of leaves per branch (ABP: 20.33 vs. control: 14.50) and more unexpanded leaves (ABP: 3.3 vs. control: 3). The three microorganisms were recovered from the *C. sativa* rhizosphere at 30 DAS. In this regard, the recovery of *A. argentinense*, *P. fluorescens*, and *B. subtilis* from the *C. sativa* rhizosphere demonstrates the compatibility among the strains and their ability to colonize plant roots. It is concluded that co-inoculation with *A. argentinense*, *P. fluorescens*, and *B. subtilis* improves the physiological quality of seeds and seedling growth and modifies leaf architecture during the vegetative stage.

KEYWORDS: *Cannabis sativa*; colonization; co-inoculation; PGPR; seeds

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN....4
ABSTRACT....6
INTRODUCCIÓN....17
HIPÓTESIS....29
Hipótesis I....29
Hipótesis II....29
Hipotesis III....29
OBJETIVOS....29
Objetivo general 1....29
Objetivo general 2....30
Objetivo general 3....31
MATERIALES Y METODOS....31
Lugar de investigación....31
Material vegetal....32
Material microbiológico: Inoculantes microbianos....32
Tratamientos....32
Procedimiento de inoculación....34
Materiales para el control de calidad de inoculantes y recuperación de microorganismos viables en semillas....34
Materiales para Ensayo 1: calidad fisiológica de semillas y crecimiento de plántulas....35
Materiales para Ensayo 2: crecimiento de plantas en macetas....35
Metodologías....36
Ensayo 1: efecto de la coinoculación e inoculaciones individuales sobre la calidad fisiológica de semillas y crecimiento de plántulas de *Cannabis sativa* L. 36
Metodología para el ensayo de germinación....36
Metodologías para la evaluación del crecimiento de plántulas....37
Metodología para la determinación de microorganismos viables sobre semillas post–inoculación....38
Ensayo 2: efecto de la coinoculación e inoculaciones individuales sobre el crecimiento de plantas de *Cannabis sativa* L. durante la etapa vegetativa. 40
Momento 1: Evaluación a los 30 días desde la siembra....41

Momento 2: Evaluación a los 60 días desde la siembra 45
Diseño Experimental y Análisis Estadístico 46
RESULTADOS Y DISCUSIÓN 47
Ensayo 1: efecto de la coinoculación e inoculaciones individuales sobre la calidad fisiológica de semillas y crecimiento de plántulas de *Cannabis sativa* L. 47
Germinación 47
Crecimiento de plántulas 52
Ensayo 2: efecto de la coinoculación e inoculaciones individuales sobre el crecimiento de plantas de *Cannabis sativa* L. durante la etapa vegetativa. 56
Momento 1: Evaluación a los 30 días desde la siembra 56
Momento 2: Evaluación a los 60 días desde la siembra 66
CONCLUSIONES 73
CONSIDERACIONES FINALES 74
INVESTIGACIONES FUTURAS 75
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 77
ANEXOS 88

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Montaje del ensayo de germinación de *C. sativa*.....37

Figura 2. Medición de largo aéreo y radicular de plántulas normales de *C. sativa* al final del ensayo de germinación.....38

Figura 3. Esquema del procedimiento de lavado de semillas y obtención de las diluciones seriadas.....39

Figura 4. Esquema de siembra por técnica de la microgota (10 µl).....39

Figura 5. Crecimiento de plantas de *C. sativa* en cámara de cultivo correspondientes a los tratamientos (Testigo, AZO, BAC, PSE y ABP) del Ensayo 2.....41

Figura 6. Secado de plantas de *C. sativa* en estufa y determinación del peso seco aéreo y radicular. 42

Figura 7. Lavado de raíces para determinar la colonización bacteriana 44

Figura 8. Medición de la longitud de la parte aérea y radicular de plantas de *C. sativa*. 45

Figura 9. Esquema general del ensayo de germinación de *C. sativa*. 46

Figura 10. Porcentajes de plántulas normales (PN: %G), plántulas anormales (PA), semillas muertas (SM) de *C. sativa* sometidas a inoculaciones simples y coinoculación con AZO: *A. argentinense*, BAC: *B. subtilis*, PSE: *P. fluorescens*.....47

Figura 11. Plántulas normales (izquierda) y anormales (derecha) originadas de semillas de *C. sativa* sometidas a inoculaciones simples y coinoculación con AZO: *A. argentinense*, BAC: *B. subtilis*, PSE: *P. fluorescens*. 51

Figura 12. Longitud radicular (LR) y longitud aérea (LA) de plántulas normales de *C. sativa* originadas de semillas sometidas a inoculaciones simples y coinoculación con AZO: *A. argentinense*, BAC: *B. subtilis*, PSE: *P. fluorescens*.....53

Figura 13. Peso seco aéreo (PSA) y peso seco radicular (PSR) de plántulas normales de *C. sativa* originadas de semillas sometidas a inoculaciones simples y coinoculación con AZO: *A. argentinense*, BAC: *B. subtilis*, PSE: *P. fluorescens*. 55

Figura 14. Longitud radicular (LR30) y longitud aérea (LA30) de plantas de *C. sativa* originadas de semillas sometidas a inoculaciones simples y coinoculación con AZO: *A. argentinense*, BAC: *B. subtilis*, PSE: *P. fluorescens* a los 30 dds. 57

Figura 15. Peso seco aéreo (PSA30) y peso seco radicular (PSR30) de plantas de *C. sativa* originadas de semillas sometidas a inoculaciones simples y coinoculación con AZO: *A. argentinense*, BAC: *B. subtilis*, PSE: *P. fluorescens*. a los 30 dds. 58

Figura 16. Número de hojas vivas por planta de *C. sativa* originadas de semillas sometidas a inoculaciones simples y coinoculación con AZO: *A. argentinense*, BAC: *B. subtilis*, PSE: *P. fluorescens* a los 30 dds 60

Figura 17. Determinación de la presencia de *A. argentinense* 62

Figura 18. Tinción de Gram de *P. fluorescens* (aumento 1000×) 62

Figura 19. Determinación de la presencia de *B. subtilis* 63

Figura 20. Determinación de la presencia de *P. fluorescens*. 64

Figura 21. Longitud radicular (LR60) y longitud aérea (LA60) de plantas *C. sativa* originadas de semillas sometidas a inoculaciones simples y coinoculación con AZO: *A. argentinense*, BAC: *B. subtilis*, PSE: *P. fluorescens* a los 60 dds. 67

Figura 22. Peso seco aéreo (PSA60) y peso seco radicular (PSR60) de plantas *C. sativa* originadas de semillas sometidas a inoculaciones simples y coinoculación con AZO: *A. argentinense*, BAC: *B. subtilis*, PSE: *P. fluorescens* a los 60 dss. 68

Figura 23. Número de ramificaciones (RAM) y número de hojas expandidas y sin expandir por ramificación (H/RAM) de plantas *C. sativa* originadas de semillas sometidas a inoculaciones simples y coinoculación con AZO: *A. argentinense*, BAC: *B. subtilis*, PSE: *P. fluorescens*. a los 60 dds. 69

Figura 24. Número de hojas expandidas (Hexp), hojas sin expandir (HSexp) y hojas muertas (HM) de plantas *C. sativa* originadas de semillas sometidas a inoculaciones simples y coinoculación con AZO: *A. argentinense*, BAC: *B. subtilis*, PSE: *P. fluorescens*. a los 60 dds....71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Anormalidades por fitotoxicidad observadas en plántulas de *C. sativa* según criterios ISTA (2025), para cada tratamiento de inoculación.....52

LISTA DE ABREVIATURAS O ACRÓNIMOS

- ABP: Coinoculación con *Azospirillum argentinense*, *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus subtilis*
- AIA: Ácido indol-3-acético
- AN: Medio de cultivo Agar Nutritivo
- ANAVA: Análisis de varianza
- AZO: Inoculación con *Azospirillum argentinense*
- BAC: Inoculación con *Bacillus subtilis*
- BPM: Buenas Prácticas de Manufactura
- CBD: Cannabidiol
- CIC: Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires
- dds: Días desde la siembra
- DCA: Diseño completamente al azar
- FBN: Fijación biológica de nitrógeno
- GACP: Buenas Prácticas Agrícolas y de Recolección (Good Agricultural and Collection Practices)
- H/RAM: Número de hojas expandidas y sin expandir por ramificación
- Hexp: Número de hojas expandidas

- HM: Número de hojas muertas
- HSexp: Número de hojas sin expandir
- HV: Número de hojas vivas
- INASE: Instituto Nacional de Semillas
- ISTA: International Seed Testing Association (Asociación Internacional de Ensayos de Semillas)
- LA: Longitud aérea de plántula
- LR: Longitud radicular de plántula
- NMP: Número más probable
- PA: Plántulas anormales
- PGPR: Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria).
- PN: Plántulas normales
- PSA: Peso seco de la parte aérea
- PSE: Inoculación con *Pseudomonas fluorescens*.
- PSR: Peso seco de la parte radicular
- RAM: Número de ramificaciones
- RC: Medio de cultivo Rojo Congo
- SM: Semillas muertas

- THC: Tetrahidrocannabinol
- TSA: Medio de cultivo Tripteína Soja Agar
- UFC: Unidades formadoras de colonias
- UV: Ultravioleta
- %PG: Porcentaje de germinación

INTRODUCCIÓN

Planteo del problema y estado actual del conocimiento

En *Cannabis sativa L.,* el rendimiento y la concentración de cannabinoides se encuentra influenciado por el genotipo y las condiciones ambientales tales como temperatura, disponibilidad de agua, nutrientes, fotoperiodo y calidad de luz (Caplan *et al*., 2017; Tipparat *et al*., 2012). Dentro de estos factores ambientales que condicionan el rendimiento y la producción de cannabinoides, estos nutrientes resultan de suma importancia. Los nutrientes pueden ser de origen sintético (fertilizantes de síntesis química) o biológicos. Dentro de estos, entre otros, se encuentran los inoculantes microbianos, formulados con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés), que pueden ser utilizados sobre semillas. Las PGPR, constituyen un grupo diverso de microorganismos del suelo que colonizan activamente la rizósfera y se asocian con las raíces de las plantas, promoviendo su crecimiento y desarrollo mediante diversos mecanismos (Nandal y Hooda, 2013; Ortiz-Castro *et al*., 2009). Estos mecanismos se clasifican en directos e indirectos. Entre los directos se incluyen la fijación biológica de nitrógeno (FBN), la solubilización de fosfatos, la producción de fitohormonas (auxinas, citoquininas y giberelinas) y la producción de sideróforos, que mejoran la disponibilidad de hierro. Los mecanismos indirectos comprenden el biocontrol de patógenos mediante la producción de compuestos antimicrobianos, la inducción de resistencia sistémica en la planta hospedadora y la mitigación de estreses bióticos y abióticos (Backer *et al*., 2018; Vejan *et al*., 2016).

No obstante, para que estos mecanismos se expresen y beneficien a la planta, los microorganismos fitobenéficos (entre ellos las PGPR) deben superar una serie de etapas previas a la colonización de la rizósfera. En primer lugar, deben ser competentes en la rizósfera y el rizoplano, es decir, capaces de colonizar estos ambientes durante un período prolongado en condiciones de fuerte competencia microbiana (Compant *et al*., 2010). Este proceso de colonización implica que estos microorganismos sean atraídos por los compuestos que libera la raíz (exudados) y moverse hacia ella mediante quimiotaxis; para luego adherirse firmemente a la superficie radicular y multiplicarse, estableciendo una población estable (Compant *et al*., 2010). Factores como la movilidad (flagelos), la capacidad de formar biopelículas y la producción de metabolitos que les otorgan ventajas competitivas frente a otros microorganismos son determinantes para una colonización exitosa (Compant *et al*., 2010). Además, el proceso de colonización no es aleatorio; los primeros microorganismos que colonizan la raíz ejercen un papel determinante en la configuración del microbioma posterior, fenómeno conocido como efecto de prioridad (Toju *et al*., 2018). Los colonizadores iniciales pueden modificar el ambiente de la rizósfera, por ejemplo, produciendo sustancias que inhiben a posibles patógenos o favoreciendo el establecimiento de otros microorganismos beneficiosos, generando interacciones de mutualismo o comensalismo (Toju *et al*., 2018). Por lo tanto, la capacidad de colonizar temprana y eficientemente la raíz es tan importante como los propios mecanismos de promoción del crecimiento.

Estos microorganismos han cobrado gran relevancia en la agricultura moderna como una alternativa sustentable a los insumos químicos, ya que permiten reducir la dependencia de

fertilizantes sintéticos y agroquímicos, al tiempo que mejoran la eficiencia en el uso de nutrientes y la tolerancia de los cultivos a condiciones adversas.

Númerosos estudios han documentado efectos benéficos de las PGPR en una amplia variedad de cultivos. Głodowska *et al.*, (2016) encuentran efectos positivos en el crecimiento de plantas de maíz (*Zea mays* L), como así también Ramesh *et al*. (2014) y Egamberdieva y Kucharova. (2009) en soja (*Glycine max* (L.) Merr.) y trigo (*Triticum aestivum* L.) respectivamente.

Las PGPR, favorecen el crecimiento de raíces y la producción total de biomasa (Van Loon *et al*., 1998). Además, se relacionan positivamente con el aumento del porcentaje de germinación, como reportaron Gholami *et al*. (2009) al inocular con cepas de *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Azospirillum lipoferum* y *Azospirillum brasilense*, en maíz.

Diversos mecanismos han sido propuestos para explicar el efecto positivo de las PGPR sobre la germinación. Entre ellos, se destaca la producción de fitohormonas como el ácido indol-3-acético (AIA), las giberelinas y las citoquininas, las cuales, al ser aplicadas sobre las semillas, pueden penetrar la cubierta seminal junto con el agua y generar un “shock fitohormonal” que estimula los procesos metabólicos del embrión, favoreciendo la germinación (Cassán *et al.*, 2009). En este sentido, se ha demostrado que cepas de *Azospirillum brasilense* producen cantidades significativas de AIA, zeatina y ácido giberélico (GA3) en cultivo, y que estas fitohormonas son capaces de promover la germinación y el crecimiento temprano de plántulas de maíz y soja (Cassán *et al.*, 2009). Asimismo, la producción de giberelinas por parte de *Pseudomonas* y *Azospirillum* ha sido asociada con la activación de enzimas

hidrolíticas como la amilasa, lo que facilita la movilización de reservas del endospermo y acelera el proceso germinativo (Gholami *et al.*, 2009).

Por otra parte, estudios recientes han demostrado que *B. subtilis* puede promover la germinación a través de mecanismos específicos, como la formación de biofilms y la acción de componentes de su matriz extracelular, así como la inducción de enzimas hidrolíticas. En particular, Li y Hu (2020) observaron que el tratamiento de semillas de trigo con *B. subtilis* QM3 aumentó significativamente la actividad de β-amilasa y la expresión de sus isoenzimas durante la germinación temprana, lo que se correlacionó con una mayor licuefacción del endospermo y una germinación más rápida. Además, Berlanga-Clavero *et al*. (2022) descubrieron que componentes de la matriz extracelular de *B. subtilis*, como la proteína amiloide TasA y el lipopéptido fengicina, interactúan con los cuerpos lipídicos de las semillas de melón (*Cucumis melo* L.), promoviendo la movilización de reservas lipídicas y el crecimiento de la radícula.

Además de la producción bacteriana de fitohormonas, se ha demostrado que la aplicación exógena de AIA como tratamiento de priming en semillas de algodón (*Gossypium hirsutum* L.) mejora significativamente la germinación y el crecimiento temprano de plántulas. Este efecto se asocia con cambios favorables en el balance de fitohormonas endógenas y con un incremento en el contenido de azúcares y en la actividad de enzimas del metabolismo de la sacarosa (Zhao *et al*., 2020). Estos hallazgos refuerzan el papel del AIA como un regulador clave de la germinación, ya sea de origen bacteriano o aplicado de forma exógena, actuando en coordinación con otras fitohormonas.

La inoculación con PGPR también ha mostrado efectos positivos en la nutrición nitrogenada y fosforada de las plantas, atribuibles a la fijación biológica de nitrógeno y a la solubilización de fosfatos (Alagawadi y Gaur, 1992; Belimov *et al*., 1995; El-Komy, 2005). Asimismo, se ha observado que los PGPR pueden aliviar el estrés abiótico, como lo demostraron Omer *et al*. (2022) en lino (*Linum usitatissimum* L) bajo estrés salino, donde la inoculación con *Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas geniculata* mejoró significativamente el crecimiento (número de hojas, longitud y biomasa de tallos y raíces), el contenido de pigmentos fotosintéticos y la capacidad antioxidante de las plantas, reduciendo el daño oxidativo y la acumulación de sodio, en comparación con las plantas no inoculadas.

En los últimos años, el interés por el cultivo de *C. sativa* se ha incrementado notablemente, impulsado principalmente por sus aplicaciones medicinales e industriales. En este contexto, varios autores han abordado el estudio de las PGPR en esta especie. Lyu *et al*. (2023) trabajando con el cultivar de cannabis "CBD Kush" inoculado con *Bacillus* sp., *Mucilaginibacter* sp. y *Pseudomonas* spp., encontraron que la biomasa se correlacionó positivamente con la altura de la planta, número de yemas axilares, número de nudos y ramas, y también biomasa de tallos e inflorescencia. Pagnani *et al*. (2018) evaluando un consorcio de *Azospirillum argentinense*, *Gluconacetobacter diazotrophicus, Herbaspirillum seropedicae* y *Burkholderia ambifaria* observaron un incremento de la biomasa de cannabis y de la acumulación de metabolitos secundarios (CBD y THC). Por su parte, Comeau *et al.* (2021) reportaron que la inoculación conjunta de *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. produjo incrementos de biomasa total y rendimiento floral de hasta un 70 % en distintos sustratos comerciales, lo que evidencia un efecto sinérgico entre ambos géneros bacterianos. Más recientemente, Aunkam *et al*. (2024) demostraron que *Bacillus velezensis* incrementó

significativamente la longitud radicular, el peso seco de raíces y la biomasa total, además de aumentar la altura de la planta.

En cuanto a las etapas tempranas del cultivo, Corredor-Perilla *et al.* (2023) evaluaron cepas nativas de *Bacillus* spp. aisladas de la rizósfera de *C. sativa* en Colombia y encontraron que algunas cepas lograron porcentajes de germinación superiores al 80% en semillas almacenadas durante ocho meses, y además promovieron un aumento significativo en la longitud radicular de las plántulas. Sin embargo, este efecto promotor del crecimiento radicular no se tradujo en un incremento del peso fresco y seco de las plántulas durante los primeros cinco días de desarrollo.

Estos antecedentes indican que las PGPR no solo ejercen efectos benéficos en plantas establecidas, sino que también promueven el desarrollo durante la germinación y el establecimiento temprano (Comeau *et al.*, 2021; Lyu *et al*., 2019).

Entre los géneros bacterianos más estudiados como PGPR se encuentran, *Azospirillum spp*, *Pseudomonas spp* y *Bacillus spp*, cada uno con mecanismos de acción particulares.

El género *Azospirillum* comprende bacterias diazótrofas de vida libre capaces de crecer en condiciones microaerofílicas. Se caracterizan por ser bacilos Gram-negativos, no formadores de esporas. En cultivos líquidos, sus células son móviles, y en medios sólidos como el agar-Rojo Congo, desarrolla colonias de coloración rojo escarlata, de forma circular o irregular, convexas, con bordes elevados y ligeramente ondulados (Benintende *et al*., 2025; Rodríguez Cáceres, 1982). Hasta el momento, se han identificado más de 32 especies dentro de este género, entre las cuales se destaca *A. argentinense* (cepa Az39), que se emplea como referencia en Argentina para la formulación de inoculantes agrícolas (Benintende *et al*.,

2025). Entre sus principales mecanismos de acción se encuentra la biosíntesis de hormonas vegetales, como el AIA, giberelinas y citoquininas. Además, puede estimular la producción endógena de fitohormonas por parte de la planta. Y como diazótrofo, la fijación biológica de nitrógeno (FBN) en condiciones microaeróbicas. Otros mecanismos son la generación de óxido nítrico (NO), solubilización de fosforo y producción de sideróforos; estos últimos, sin evidencia en *A. argentinense* (Benintende *et al*., 2025).

Las bacterias del género *Pseudomonas spp*, que abundan en la rizósfera (Muleta *et al*.2009) son microorganismos saprófitos, aerobios y móviles, que se presentan como bacilos Gram-negativos, rectos o levemente curvados, sin la habilidad para formar esporas (Palleroni, 2005). En medios de cultivo deficitarios en hierro, como *Pseudomonas* Agar F, sus colonias presentan un aspecto cremoso y plano (Benintende *et al*., 2025); y especies como *Pseudomonas fluorescens* secretan un pigmento amarillo-verdoso llamado fluoresceína que actúa como sideróforo y emite un brillo celeste bajo luz ultravioleta. Dentro de este género se encuentran abundantes especies promotoras del crecimiento vegetal, tales como *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. protegens*, *P. chlororaphis*, *P. simiae* y *P. pergaminensis*, entre otras. Sin embargo, también se encuentran especies patógenas (Benintende et al., 2025). Actualmente, *P. fluorescens* destaca como la especie más utilizada en la elaboración de bioinsumos agrícolas en Argentina. Sus mecanismos de acción para la promoción del crecimiento vegetal son múltiples, como la síntesis de fitohormonas (como auxinas, giberelinas y citoquininas), la solubilización de fosfatos insolubles, mineralización de fosforo orgánico, la producción de enzimas y metabolitos antimicrobianos, la tolerancia a condiciones de estrés hídrico y salino, la emisión de sideróforos y la inducción de resistencia

sistémica contra enfermedades (Benintende et al., 2025; Podile y Kishore, 2007; Singh *et al*., 2022).

El género *Bacillus* incluye bacterias aerobias o anaerobias facultativas, con forma de bacilos Gram-positivos, móviles y formadoras de esporas. En medio Agar Nutritivo, especies como *Bacillus subtilis*, desarrolla colonias de forma circular a irregular, con bordes finamente lobulados (fimbriados), superficies opacas y rugosas, y un aspecto cremoso a granular consistente (Logan y De Vos, 2015).

Actualmente, las especies registradas y comercializadas en Argentina como bioinsumos bacterianos son: *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus velezensis*; siendo las dos primeras la de mayor utilización en formulaciones. Las PGPR de este género destacan en el biocontrol de plagas y patógenos vegetales mediante múltiples estrategias, como la producción de toxinas específicas, síntesis de antibióticos y secreción de enzimas que descomponen estructuras vitales de plagas y patógenos (Benintende *et al*., 2025) Otros mecanismo son la síntesis de sideróforos y la inducción de la resistencia sistémica en las plantas (Zhang *et al*., 2022). Entre los mecanismos directos de acción incluyen la fijación biológica de nitrógeno (FBN), la mineralización y la solubilización de fósforo. Además, especies como *B. subtilis* pueden producir fitohormonas, tales como auxinas, citoquininas y giberelinas, junto con compuestos orgánicos volátiles que estimulan el crecimiento de las plantas al alterar su homeostasis hormonal (Benintende *et al*., 2025; Tsotetsi *et al*., 2022)

La inoculación combinada de estos géneros bacterianos ha mostrado efectos sinérgicos en diversos cultivos. Miljaković *et al*. (2022) demostraron en soja que la coinoculación de

Bacillus megaterium con *Bradyrhizobium japonicum* produjo un porcentaje de germinación significativamente mayor que el testigo, sin antagonismo entre cepas, y también aumentó la longitud radicular y aérea, así como el peso seco radicular. Este tipo de sinergia entre las PGPR es consistente con lo observado por Comeau *et al.* (2021) en cannabis, donde los consorcios de *Pseudomonas spp* y *Bacillus spp* fueron más efectivos que los tratamientos con cada cepa por separado. Saeed *et al.* (2016) también reportaron efectos positivos de la coinoculación en tomate, donde la combinación de *Pseudomonas fluorescens* y *Azotobacter chroococcum* incrementó la longitud de planta, número de hojas y peso seco de la parte aérea superando significativamente a los tratamientos individuales y al testigo no inoculado. Así mismo, en varios cultivos, la inoculación combinada de *Azospirillum spp* con bacterias solubilizadoras de fósforo ha resultado exitosa para mejorar la nutrición nitrogenada y fosforada y el rendimiento de los cultivos (Alagawadi y Gaur, 1992; Belimov *et al*., 1995; El-Komy, 2005).

Diversos estudios han evidenciado que las bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* poseen la capacidad de establecerse y multiplicarse en la rizósfera, promoviendo el desarrollo vegetal mediante el incremento de la disponibilidad de nutrientes esenciales y la síntesis de fitohormonas, como el AIA, que regula positivamente el crecimiento radical y aéreo de las plantas (Berg *et al*., 2014; Qessaoui *et al*., 2019; Wei *et al*., 2019). Unos de los mecanismos que explica esta promoción del crecimiento es la capacidad de las especies de *Bacillus* para formar biopelículas; un proceso que se ve potenciado cuando interacciona con otros microorganismos de la rizósfera, como *Pseudomonas*. Esta interacción favorece una mayor competitividad y eficiencia en la colonización de la rizósfera (Ansari y Ahmad, 2019; Powers *et al*., 2015; Ren *et al*., 2015; Shank *et al*., 2011). En este sentido,

Ansari y Ahmad (2019) observaron que *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus licheniformis* no solo son compatibles entre sí, sino que además son capaces de formar biopelículas mixtas (tanto en condiciones de laboratorio como sobre raíces de trigo), lo que se tradujo en una colonización rizosférica significativamente mayor que con los inóculos individuales, presentando incrementos en parámetros fisiológicos (contenido de clorofila, la tasa neta de fotosíntesis, la conductancia estomática y la transpiración), y en la biomasa vegetal. De acuerdo con Lyu *et al*. (2019), la evidencia disponible en otros cultivos sugiere que *Pseudomonas* y *Bacillus* podrían ser PGPR prometedoras para *C. sativa*, con potencial para aumentar el rendimiento

A pesar de estos avances, no existen estudios que hayan evaluado la coinoculación de los tres géneros (*Azospirillum*, *Pseudomonas* y *Bacillus*) en semillas de *C. sativa*, ni su efecto sobre la germinación y el crecimiento temprano de plántulas y plantas.

Laanaya *et al*. (2025), en una revisión actualizada, destacan que las interacciones entre *C. sativa* y microorganismos benéficos están fuertemente moduladas por el genotipo de la planta, y que la respuesta depende del entorno y de los microorganismos involucrados. Tanney *et al*. (2023) observaron que la inoculación con *Bacillus spp* y *Pseudomonas spp* en *C. sativa* no mejoró ciertos parámetros bajo un régimen nutricional óptimo, pero sí se detectaron efectos positivos, como el aumento de la densidad de tricomas, cuando las plantas crecieron en condiciones ambientales subóptimas. Lyu *et al*. (2019) señalan que los beneficios de estas rizobacterias suelen manifestarse con mayor intensidad en situaciones de estrés abiótico. Por otro lado, la arquitectura foliar en *C. sativa* podría estar regulada

genéticamente, como lo sugiere Hesami *et al*. (2024), y no ser afectada por la inoculación en condiciones óptimas, aunque bajo estrés podrían observarse respuestas diferenciales.

Además de los aspectos biológicos, el éxito de la inoculación depende de factores técnicos como el volumen de caldo total (slurry) aplicado a la semilla. Brzezinski *et al*. (2017) y Olivera y Ferrari (2013) demostraron que volúmenes elevados de slurry pueden reducir la calidad fisiológica de las semillas de festuca alta (*Festuca arundinacea* Schreb), aunque formulaciones más densas y viscosas (como los polímeros adherentes) pueden contrarrestar este efecto negativo. Por lo tanto, la determinación de volúmenes adecuados de inoculación específicamente para *C. sativa* resulta esencial para maximizar los beneficios de los PGPR sin comprometer la germinación.

Justificación

En los últimos años, en Argentina ha surgido un creciente interés en el cultivo de *C. sativa*, principalmente para uso medicinal e industrial; impulsado por las leyes 27.350 (2017) y 27.669 (2020), que promueven la investigación, producción, comercialización e industrialización del cannabis. Estudios recientes estiman que, con una regulación funcional y estable, el mercado medicinal argentino podría crecer fuertemente y generar ingresos fiscales, empleo y encadenamientos industriales. Esto incluye la posibilidad de que empresas y asociaciones aumenten la escala productiva y agreguen valor local mediante procesos de industrialización y certificaciones de calidad (García Bernado y Rodríguez, 2024).

El cultivo de cannabis bajo estándares de calidad (flores libres de metales pesados, pesticidas y contaminantes) no sólo protege la salud de pacientes y consumidores, sino que además abre puertas de mercado. En particular, los productos farmacéuticos y fitoterapéuticos

destinados a la exportación suelen requerir certificaciones como Buenas Prácticas Agrícolas y de Recolección (GACP) y Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), además de garantías respecto de la ausencia de residuos de pesticidas (García Bernado y Rodríguez, 2024). Por lo tanto, estas certificaciones y prácticas de inocuidad son un factor clave para competir en mercados internacionales y para fomentar el desarrollo de la cadena de valor local. No obstante, alcanzar estos estándares productivos puede resultar costoso si se depende intensamente de insumos químicos (fertilizantes, fungicidas e insecticidas). Frente a este escenario, adquiere relevancia el uso de PGPR, capaces de mejorar el rendimiento y la calidad a través de distintos mecanismos, y de esta manera reducir la necesidad de agroquímicos, favoreciendo una producción más sustentable, menos dependientes de insumos costosos y competitiva en el mercado.

Si bien en la producción de *C. sativa* son números los productos utilizados como biofertilizantes, aún son limitados los estudios científicos sobre la aplicación de estos productos en base a bacterias PGPR como *A. argentinense*, *P. fluorescens* y *B. subtilis* para aumentar el rendimiento de la planta tanto vegetativo como reproductivo. Además, estudiar la aplicación de estos microorganismos en las variedades comerciales disponibles en el mercado de semillas de nuestro país, suma conocimientos para todos aquellos que quieran utilizarlos en forma conjunta.

Por lo anteriormente expuesto, en este trabajo se plantean las siguientes hipótesis y objetivos:

HIPÓTESIS

Hipótesis I

La coinoculación de semillas de *Cannabis sativa* L. con *Azospirillum argentinense*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens* mejora la calidad fisiológica y el crecimiento de plántulas respecto a las inoculaciones individuales y testigo sin inocular.

Hipótesis II

La coinoculación de semillas *de Cannabis sativa L. Azospirillum argentinense*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens* mejora el crecimiento de las plantas durante el estadio vegetativo con respecto a las inoculaciones individuales y testigo sin inocular.

Hipotesis III

La rizósfera de plantas de *Cannabis sativa* L. originada de semillas coinoculadas e inoculadas en forma individual con *Azospirillum argentinense*, *Bacillus subtilis y Pseudomonas fluorescens* se encuentra colonizada por dichas bacterias durante el periodo vegetativo.

OBJETIVOS

Objetivo general 1

Determinar el efecto de la coinoculación e inoculaciones individuales de semillas de *Cannabis sativa* L. con *Azospirillum argentinense*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens* sobre la calidad fisiológica y crecimiento de plántulas en laboratorio.

Objetivos específicos

Determinar el efecto de la coinoculación e inoculaciones individuales sobre:

- Germinación
- Largo aéreo y radicular de plántulas.
- Peso aéreo y radicular de plántulas

Objetivo general 2

Determinar el efecto de la coinoculación e inoculaciones individuales con *Azospirillum argentinense, Bacillus subtilis y Pseudomonas fluorescens* sobre el crecimiento de plantas obtenidas de semillas inoculadas de *Cannabis sativa* L. durante la etapa vegetativa.

Objetivos específicos

Determinar el efecto de la coinoculación e inoculaciones individuales en 2 momentos de la etapa vegetativa sobre:

Momento 1: 30 días desde la siembra

- Largo aéreo y radicular
- Peso aéreo y radicular
- Número de hojas vivas.

Momento 2: 60 días desde la siembra

- Largo aéreo y radicular
- Peso aéreo y radicular
- Número de ramificaciones
- El total de hojas en las ramificaciones.
- Número de hojas vivas expandidas y sin expandir, y hojas muertas

Objetivo general 3

Determinar la colonización microbiológica de los 3 géneros mencionados en las raíces de plantas de *Cannabis sativa* L. durante la etapa vegetativa en el momento 1 a los 30 días desde la siembra (dds)

Objetivos específicos

Determinar:

- La colonización de *A. argentinense en la* rizósfera *de C. sativa*
- La colonización de *B. subtilis en la* rizósfera *de C. sativa*
- La colonización de *P. fluorescens en la* rizósfera *de C. sativa*
- *colonización conjunta de A. argentinense., P. fluorescens.* y *B subtilis en la* rizósfera *de C. sativa*

MATERIALES Y METODOS

Lugar de investigación

El presente trabajo de investigación se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología y Laboratorio de Análisis de Semillas, del Instituto de Investigación sobre Producción Agropecuaria, Ambiente y Salud (IIPAAS), de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Lomas de Zamora, emplazada en la Reserva Natural Santa Catalina sobre Av. Juan XXIII y Ruta Provincial Nº 4, partido de Lomas de Zamora, provincia de Buenos Aires (34° 46' 27,8" S y 58° 27' 26,1" O).

Material vegetal:

Para el desarrollo de la investigación se llevaron a cabo dos ensayos, en los que se utilizaron semillas de un lote (blend) de *C. sativa* L. Las semillas se almacenaron en heladera a 5-7°C en frascos cerrados hasta su uso.

Material microbiológico: Inoculantes microbianos:

Se emplearon tres inoculantes comerciales en formulación líquida de las empresas Koppert y Barenbrug

- *Azospirillum argentinense.*
- *Bacillus subtilis.*
- *Pseudomonas fluorescens.*

Los productos se conservaron a temperatura ambiente (entre 20°C y 25°C) y en oscuridad desde su recepción hasta su utilización. Además, se utilizó un bioprotector comercial de la empresa Kopper compatible con los tres microorganismos.

Tratamientos

En laboratorio de Microbiología se inocularon las semillas de *C. sativa* en forma individual con cada PGPR y en forma conjunta (coinoculación), conformando los siguientes tratamientos:

- Testigo: semillas sin inocular
- AZO: semillas inoculadas con *Azospirillum argentinense*
- BAC: semillas inoculadas con *Bacillus subtilis*
- PSE: semillas inoculadas con *Pseudomonas fluorescens*

- ABP: semillas coinoculadas con *Azospirillum argentinense*, *Bacillus subtilis*, y *Pseudomonas fluorescens*

En base al peso de mil semillas de *C. sativa*, se estableció la dosis de inoculante y bioprotector para cada tratamiento. Para ello se adaptó la dosis recomendada por el fabricante para semillas de trigo (1000 µl de inoculante por cada 100 g de semilla).

De esta forma, la dosis final aplicada por tratamiento fue:

- Inoculación simple (AZO, BAC y PSE) con 1000 µl de inoculante comercial especifico + 1000 µl de bioprotector.
- Coinoculación (ABP) con 1000 µl de cada inoculante (*A. argentinense, B. subtilis, P. fluorescens*) + 1000 µl de bioprotector.

El volumen final del caldo, en los tratamientos de inoculación y coinoculación, mantienen, el mismo número de bacterias por semilla de cada especie de microorganismo. Inmediatamente de la inoculación correspondiente se procedió a sembrar en los contenedores, regándolas con agua destilada.

Previo a la aplicación y evaluación de los tratamientos se realizaron las siguientes determinaciones:

- Peso de mil semillas (para el cálculo de la dosis a aplicar) según ISTA (2025).
- Control del Porcentaje de germinación del lote de semillas según ISTA (2025).
- Control de la calidad de los inoculantes comerciales según protocolo consenso de la REDCAI (Benintende *et al*., 2025), para comprobar su viabilidad, título (UFC/ml) y ausencia de contaminantes (ver Anexo I).

Procedimiento de inoculación

Las semillas se colocaron en tubos de ensayo, se añadió bioprotector y, posteriormente, el volumen correspondiente de inoculante según el tratamiento. Luego, con una espátula se mezclaron las semillas hasta lograr un recubrimiento homogéneo y completo del inoculante.

Las semillas se sembraron en los ensayos correspondientes, dejando una muestra de diez semillas por tratamiento para luego determinar el número de bacterias viables por semilla, expresado en unidades formadoras de colonias/semilla (UFC/semilla).

Materiales para el control de calidad de inoculantes y recuperación de microorganismos viables en semillas:

- Solución fisiológica estéril con Tween 80 al 0,01 %, para las diluciones seriadas correspondientes.
- Pipetas de vidrio graduadas, Micropipetas automáticas, tubos de ensayo, gradillas, matraz Erlenmeyer, vasos de precipitado, probetas, varillas de vidrio,
- Medios de cultivo:
    - Medio agar-RC (agar-Rojo Congo), para el crecimiento de *A. argentinense* (Rodríguez Cáceres, 1982).
    - Medio agar Nutritivo (AN), Para el crecimiento de *B. subtilis.*
    - Medio *Pseudomonas* Agar F, para el crecimiento de *P. fluorescens*.
    - Medio agar tripteína soja (TSA), para detección de bacterias heterótroficas contaminantes.
    - Medio agar Sabouraud, para detectar contaminación con hongos saprofíticos.

- Medio NFb semisólido, para determinar actividad diazotrófica microaerofílica (Döbereiner *et al*., 1995).

- placas de Petri, espátulas, ansa rulo, portaobjetos y cubreobjetos, pinzas, mechero Bunsen, bandejas, bolsas (plásticas y de papel madera), regla.

Para confirmar morfología y características citológicas de los microorganismos PGPR empleados, se realizó tinción de Gram, utilizando como colorantes cristal violeta, safranina, Lugol (mordiente), y como decolorante alcohol 96°.

Materiales para Ensayo 1: calidad fisiológica de semillas y crecimiento de plántulas

- papel de germinación
- bandejas plásticas
- agua corriente
- bolsas plásticas

Materiales para Ensayo 2: crecimiento de plantas en macetas

- una mezcla estéril de vermiculita, perlita, arena y suelo, en proporción 3:1:3:3.
- Macetas de 392 cm^3
- Solución nutritiva de Hewitt para el riego

Equipos e instrumentos

Entre los equipos se utilizaron: autoclave, cabina de flujo laminar, agitador magnético, agitador orbital, vortex, sonicador, baño termostático, lupa estereoscópica, microscopio óptico, lámpara de luz ultravioleta (UV), Balanza analítica de precisión, divisor de semillas, estufa de secado e incubación, cámara de germinación y cámara de cultivo.

Metodologías

Para responder a los objetivos planteados se realizaron dos ensayos.

Ensayo 1: efecto de la coinoculación e inoculaciones individuales sobre la calidad fisiológica de semillas y crecimiento de plántulas de *Cannabis sativa* L.

Para responder al Objetivo 1, en el Laboratorio de Análisis de Semillas, se contabilizaron y/o midieron las siguientes variables respuesta:

- Porcentaje de germinación
- Crecimiento de plántulas (largo y peso aéreo y radicular)

Metodología para el ensayo de germinación

Tanto en el testigo como en las semillas tratadas se realizaron los ensayos de germinación según las normas ISTA para *C. sativa* (2025), modificada de acuerdo a la disponibilidad de semillas.

Las semillas inoculadas se colocaron en bandejas de plástico con papel absorbente como sustrato. Se realizaron cuatro repeticiones por tratamiento, depositando 15 semillas por bandeja (Figura 1). El papel absorbente se humedeció completamente con agua y las bandejas se cubrieron con bolsas plásticas para mantener la humedad. Se incubaron en una cámara de germinación a 20 °C, con conteos de plántulas normales a los tres y siete días (conteo final).

Al finalizar el período de incubación, se contabilizaron para cada tratamiento y repetición, el número de plántulas normales (PN), plántulas anormales (PA) y semillas muertas (SM), siguiendo los criterios del Handbook para plántulas ISTA (2018). El porcentaje de plántulas normales (PN) se consideró como el porcentaje de germinación (%PG)

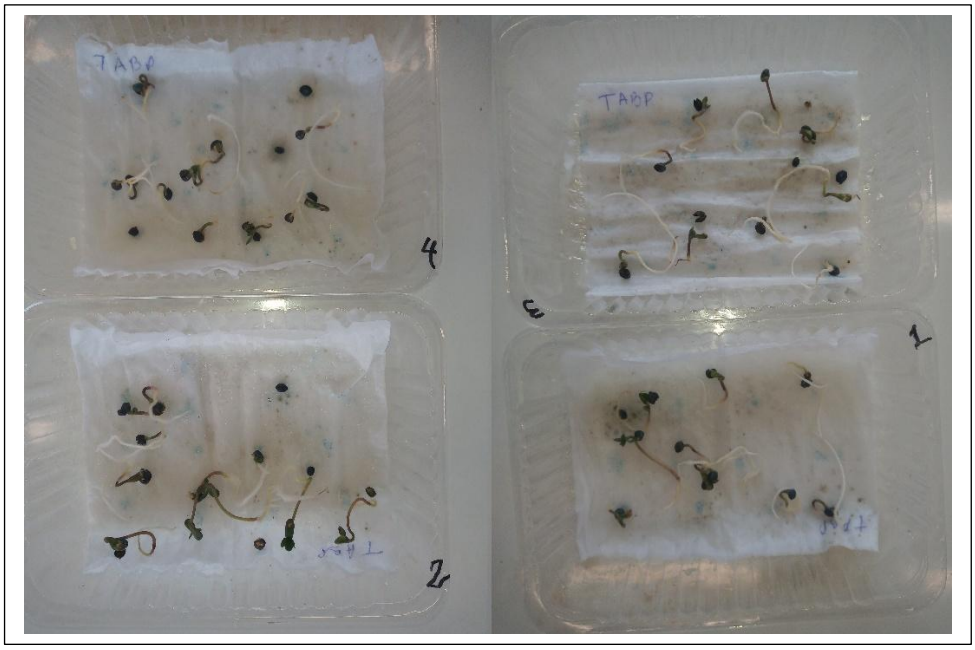


Figura 1. Ensayo de germinación de *C. sativa*. Se observan cuatro bandejas de plástico con papel absorbente, que representan las repeticiones de cada tratamiento. Sobre el papel se aprecian las plántulas de *C. sativa* originadas a partir de semillas inoculadas con las PGPR bajo estudio.

Metodologías para la evaluación del crecimiento de plántulas

De cada tratamiento del ensayo de germinación se tomaron todas las plántulas normales de cada repetición y se midió el largo aéreo (LA) y largo radicular (LR) en centímetros (Figura 2). Luego, las partes aéreas y radiculares de las plántulas de cada repetición y tratamiento se colocaron en bolsitas de papel individuales y se llevaron a estufa de secado de aire forzado a 65°C hasta peso constante. Finalmente, se pesó en balanza analítica cada fracción (aérea y radicular) obteniéndose el peso seco aéreo (PSA) y radicular (PSR) de cada una en gramos (adaptado de Peretti, 1994).

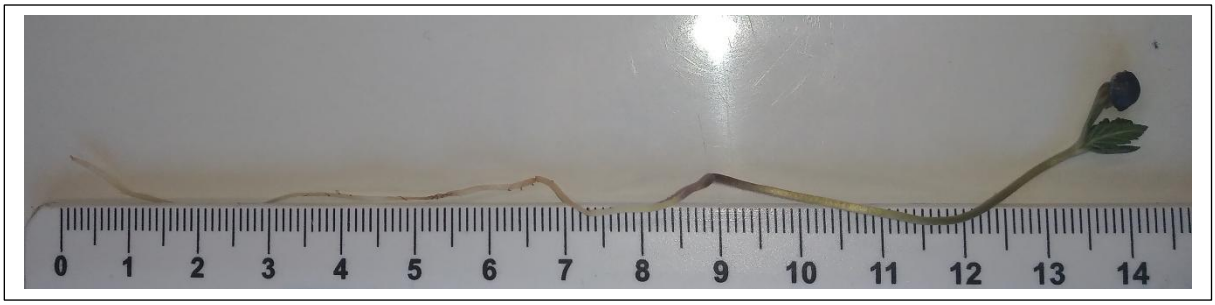


Figura 2. Medición de largo aéreo y radicular de plántulas normales de *C. sativa* al final del ensayo de germinación.

Metodología para la determinación de microorganismos viables sobre semillas post–inoculación

En el Laboratorio de Microbiología, para determinar la cantidad de microorganismos viables adheridos a las semillas post-inoculación, se siguió el siguiente procedimiento (modificado de Benintende et al., 2025):

Lavado: se tomaron diez semillas inoculadas de los tratamientos AZO, PSE y BAC se colocaron en tubos de ensayo con 10 ml de solución fisiológica estéril, luego se sometieron al efecto de un sonicador durante tres minutos, para obtener las suspensiones microbianas, al desprender las células bacterianas de la superficie de las semillas (Figura 3).

Diluciones seriadas: a partir de estas suspensiones, se extrajo 1 ml y se depositó en tubos de ensayo con 9 ml de solución fisiológica. Luego se agito con vortex durante 20 segundos para homogenizar. A partir del mismo tubo se extrajo 1 ml para volcarlo en otro tubo con 9 ml de solución fisiológica con posterior agitación. El procedimiento se repitió hasta obtener la dilución 10^{-4} (Figura 3).

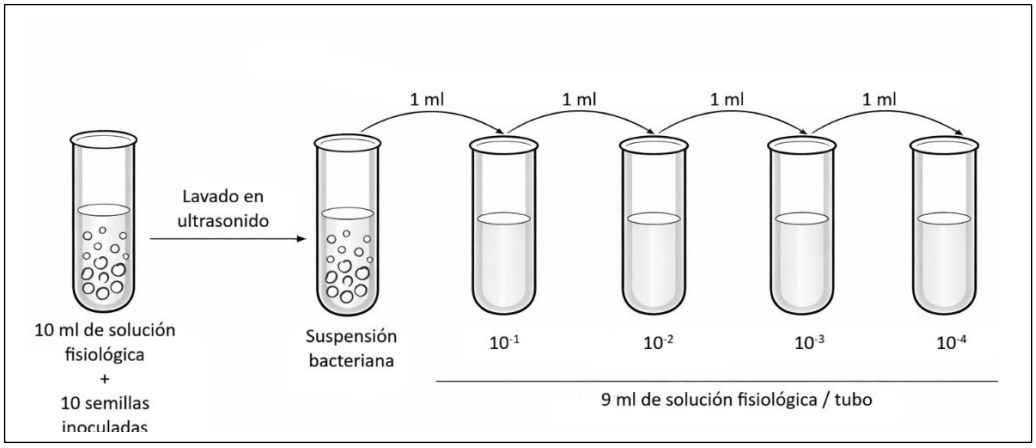


Figura 3. Esquema del procedimiento de lavado de semillas y obtención de las diluciones seriadas. Imagen generada con inteligencia artificial (Microsoft Copilot) y editada con Paint.

Siembra: para la siembra se empleó la técnica de la microgota de 10 µl (Figura 4), adaptada del método descrito por Di Salvo *et al*. (2022) para la enumeración de células viables de *Azospirillum* spp. Se utilizó medio RC para *A. argentinense*, Agar F para *P. fluorescens* y medio AN para *B. subtilis*. Todas las diluciones se sembraron por triplicado y las placas se incubaron a 28-30 °C.

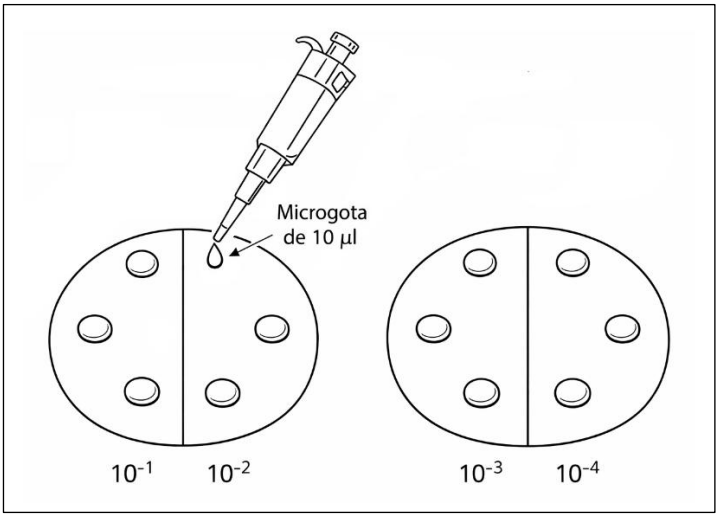


Figura 4. Esquema de siembra por técnica de la microgota (10 µl) de las diluciones 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} y 10^{-4} en placas de Petri con medio de cultivo Agar-Rojo Congo, *Pseudomonas* Agar F o Agar Nutritivo, según corresponda. Imagen generada mediante inteligencia artificial (Microsoft Copilot) y editada con Paint.

Lectura: En *A. argentinense* a los cuatro días para el recuento de colonias. Para *P. fluorescens* y *B. subtilis* a las 24 y 48 horas. Se expresaron los resultados como UFC/semilla (ver Anexo I) También se observaron características culturales en lupa y citológicas en el microscopio óptico.

Ensayo 2: efecto de la coinoculación e inoculaciones individuales sobre el crecimiento de plantas de *Cannabis sativa* L. durante la etapa vegetativa.

Para responder al Objetivo 2, inmediatamente a la inoculación de las semillas, según los tratamientos (AZO, BAC, PSE, ABP, Testigo) se sembraron en macetas plásticas de 392 cm^3, que contenían un sustrato estéril compuesto por vermiculita, perlita, arena y suelo (3-1-3-3). Se sembraron dos semillas por maceta, con diez repeticiones por tratamiento. Las macetas se colocaron en cámara de cultivo con control de temperatura (22 °C ± 2 °C) y fotoperiodo (18 h luz/6 h oscuridad). Las plantas se regaron con 20 ml de solución nutritiva de Hewitt cada siete días.

En los casos en que ambas semillas germinaron en una misma maceta, una de las plántulas se repicó a macetas donde no hubo germinación, para mantener diez plantas por tratamiento.



Figura 5. Crecimiento de plantas de *C. sativa* en cámara de cultivo correspondientes a los tratamientos (Testigo, AZO, BAC, PSE y ABP) del Ensayo 2.

A los 30 dds (Momento 1) y a los 60 dds (Momento 2, durante la etapa vegetativa, se determinaron las siguientes variables respuesta:

Momento 1: Evaluación a los 30 días desde la siembra

A los 30 dds se tomaron cinco plantas de cada tratamiento, dejando las restantes para una segunda evaluación a los 60 dds (Momento 2)

- Largo aéreo (LA30) y radicular (LR30)
- Peso seco aéreo (PSA30) y radicular (PSR30)
- Número de hojas vivas (HV30)

Metodología para determinación de Largo y Peso aéreo y radicular

Sobre cada planta descalzada de cada maceta, se separaron dos fracciones: la parte aérea y la parte radicular. Sobre ellas se determinó:

- Largo aéreo y radicular: Cada fracción fue medida registrándose los valores en centímetros.
- Peso seco aéreo y radicular: Una vez medida y contabilizada cada fracción, se colocaron en bolsas de papel rotuladas y se llevaron a estufa de aire forzado a 65°C hasta que el material llego a peso constante para obtener peso seco de parte aérea y radicular.



Figura 6. Secado de plantas de *C. sativa* en estufa y determinación del peso seco aéreo y radicular.

Metodología para determinación de número de hojas vivas

Se contabilizó la cantidad total de hojas vivas adultas totalmente expandidas y jóvenes en expansión en cada planta por repetición y tratamiento.

Para responder al Objetivo 3 se realizó la:

Determinación de la colonización de los microorganismos inoculados

Luego de realizarse las mediciones y conteos, y antes de llevar las raíces (fracción radicular) a la estufa de secado, se procedió al lavado de las mismas para verificar presencia/ausencia de los microorganismos inoculados como se detalla a continuación:

Lavado de raíces: La totalidad de las raíces de cada planta se lavaron con agua del grifo hasta eliminar la mayor cantidad posible de sustrato. Posteriormente se colocaron en tubos de ensayos de boca ancha con 20 ml de solución fisiológica estéril (Figura 7) y se agitaron con el sonicador durante tres minutos, obteniéndose las suspensiones bacterianas (modificado de Baldani *et al.,* 2014).

Diluciones seriadas: se realizaron utilizando la misma metodología descripta en el apartado: "Metodología para la determinación de las UFC /semillas post–inoculación", con la excepción que para *B. subtilis* se sometieron las diluciones a un tratamiento térmico con calor a 80°C durante 12 minutos (Benintende *et al*., 2025).

Siembra: se empleó la técnica de la microgota (10 µl) (Di Salvo et al., 2022) para determinar la colonización de *P. fluorescens* y *B. subtilis* en los tratamientos simples (PSE, BAC) y en el tratamiento coinoculado (ABP). Para ello se sembraron todas las diluciones (10^{-1}, 10^{-2} y 10^{-3}), incluida la suspensión inicial, por triplicado con dos repeticiones en los medios de cultivo agar F para *P. fluorescens* y agar nutritivo para *B. subtilis.* Posteriormente se llevaron a estufa a 28-30 °C.

Para determinar la colonización de *A. argentinense* se aplicó la técnica del número más probable (NMP). Para lo cual se sembró por triplicado 0,1 ml de las diluciones (10^{-1}, 10^{-2} y 10^{-3}) y la suspensión inicial en tubos pequeños con 2 ml de medio Nfb semisólido. Luego, los tubos se incubaron sin agitación, a una temperatura de entre 28 y 30°C durante siete días (adaptado de Baldani *et al*., 2014). A partir de los tubos positivos se repicaron en placas con medio de cultivo RC para verificar presencia de *A. argentinense* mediante sus características culturales.

Lectura: Para *P. fluorescens* y *B. subtilis* a las 24 y 48 horas para el recuento de colonias. Se observaron características culturales en lupa y citológicas en el microscopio. También se comprobó fluorescencia de las colonias de *Pseudomonas* con lampara UV.

Para *A. argentinense*, transcurrido el periodo de incubación, se realizó la observación y se consideraron positivos los tubos que presentaron una película subsuperficial típica en forma de nube y un cambio de color del medio de verde a azul (alcalinización) (Di Salvo y García De Salamone, 2019). También se realizaron tinciones de Gram a partir de los tubos positivos y observación in vivo en el microscopio para confirmar características citológicas y movilidad, respectivamente.

Los recuentos de microorganismos se expresaron por gramo de peso fresco de raí

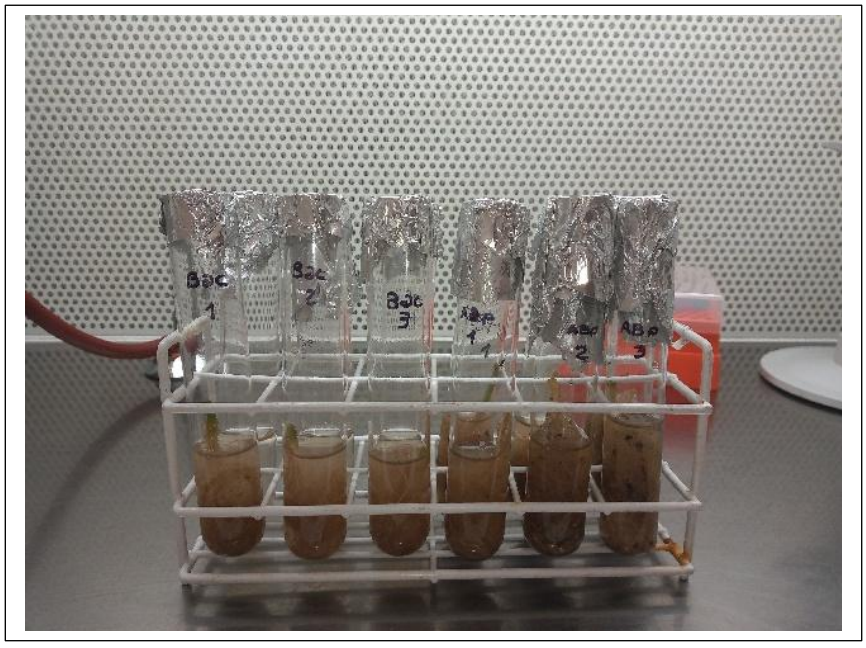


Figura 7. Lavado de raíces para determinar la colonización bacteriana. Se observan las raíces de las plantas de *C. sativa* sumergidas en solución fisiológica dentro de tubos de ensayo.

Momento 2: Evaluación a los 60 días desde la siembra

A los 60 dds se descalzaron cinco plantas por tratamiento y testigo, y se midieron las siguientes variables respuesta:

- Largo y peso aéreo y radicular (igual metodología que en Momento 1)
- Número de ramificaciones (RAM)
- Total de hojas expandidas y sin expandir en las ramificaciones (H/RAM)
- Número de hojas expandidas (Hexp) y sin expandir (HSexp) (igual metodología que en Momento 1 incluyendo las no expandidas).

Se decidió el momento de evaluación a los 60 dds debido a la observación de estructuras morfológicas que evidenciaban el paso del estadio vegetativo al reproductivo. De acuerdo con la escala fenológica BBCH para el cáñamo (*Cannabis sativa* L.) de Mishchenko *et al*. (2017), el 90% del largo final del tallo corresponde de manera exacta al código fenológico 39. Esta fase marca el final de la elongación del tallo principal antes de la transición hacia la emergencia de las inflorescencias.



Figura 8. Medición de la longitud de la parte aérea y radicular de plantas de *C. sativa.*

Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Para ensayo 1 se aplicó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con cuatro repeticiones de 15 semillas cada una (Figura 9), el análisis se realizó con previa trasformación por ArcSin para variables en porcentaje. Ensayo 2 se aplicó un DCA con diez repeticiones por tratamiento (Figura 5). Se realizó Análisis de varianza (ANAVA) y prueba de DGC ($p < 0.05$) mediante el programa Navure (2024). Para todas las variables se comprobaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas.

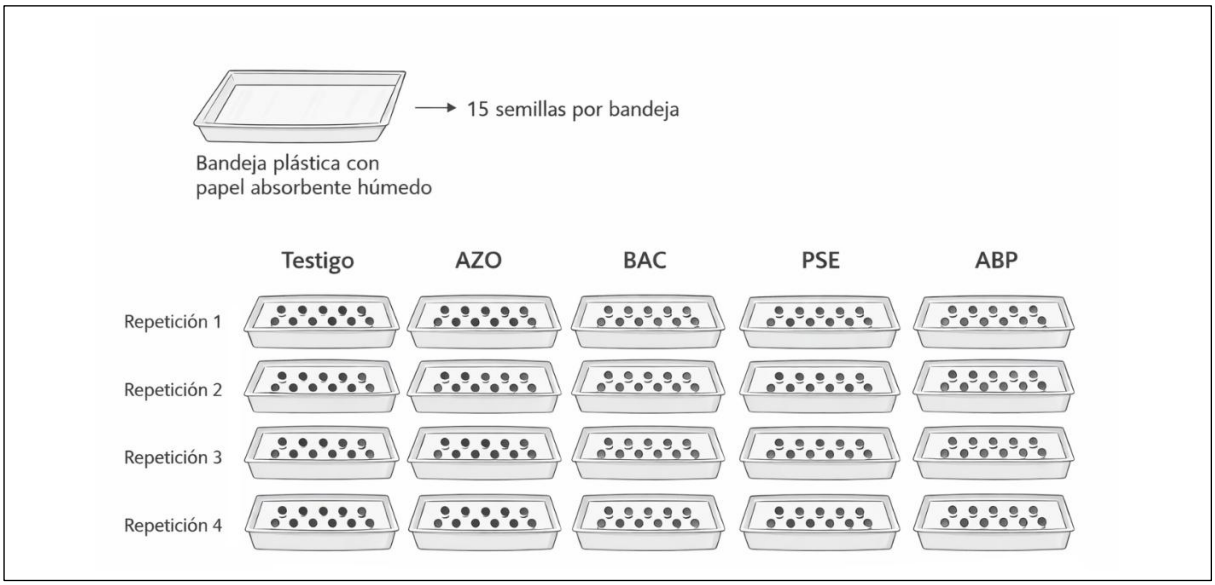


Figura 9. Esquema general del ensayo de germinación de *C. sativa*. Imagen generada con inteligencia artificial (Microsoft Copilot) y editada con Paint.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayo 1: efecto de la coinoculación e inoculaciones individuales sobre la calidad fisiológica de semillas y crecimiento de plántulas de *Cannabis sativa* L.

Germinación

En la Figura 10 se presentan los resultados del ensayo de germinación de semillas de *C. sativa* sometidas a los diferentes tratamientos y testigo. Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos para él %PN=%PG, el %PA y %SM.

ABP presentó un valor significativamente mayor de PN=%PG (61%), seguido por AZO, PSE, Testigo y BAC (53%, 50%, 46% y 43% respectivamente).

ABP y AZO presentaron valores significativamente menores de %PA, (22 y 20%), seguido por PSE (35%) y testigo (36%). BAC presentó el mayor valor.

A excepción de AZO que presentó el mayor valor de %SM (27%), los demás tratamientos no presentaron diferencias significativas entre sí.

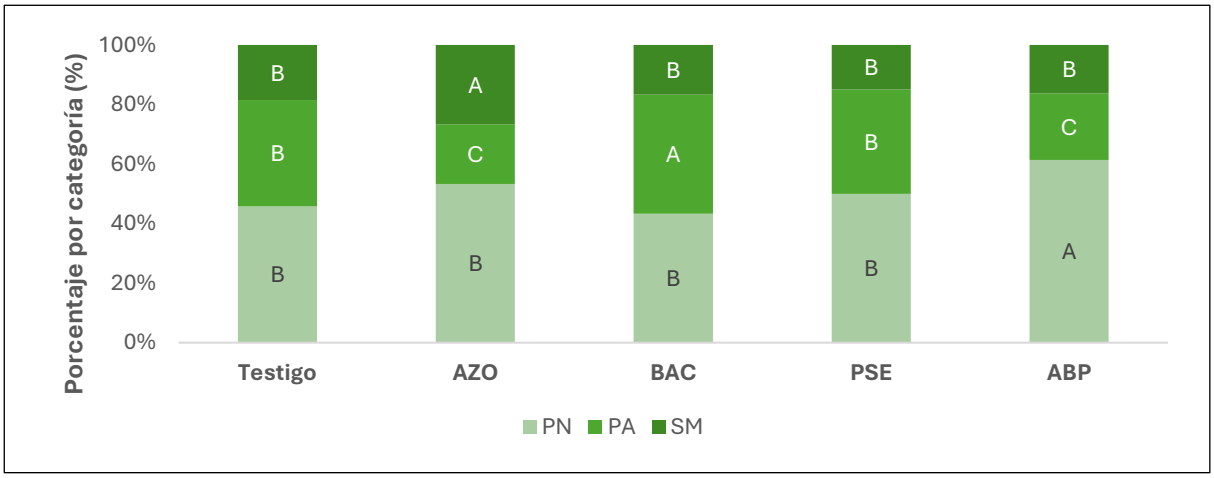


Figura 10. Porcentajes de plántulas normales (PN: %PG), plántulas anormales (PA), semillas muertas (SM) de *C. sativa* sometidas a inoculaciones simples y coinoculación con AZO: *A. argentinense*, BAC: *B. subtilis*, PSE: *P. fluorescen,* ABP*: A. argentinense, B. subtilis* y *P. fluorescens.* Letras distintas representan diferencias significativas entre tratamientos dentro de cada categoría ($p \leq 0,05$).

En primer lugar, se puede afirmar que la inoculación con estos tres microorganismos, tanto de manera individual o en conjunto, no afectó negativamente la germinación. Es decir, que él %PG no presento valores por debajo del testigo sin inocular. Con este resultado, se puede afirmar la inocuidad del producto para este lote de semillas de *C. sativa*.

El %PG aumentó (61%) respecto al testigo (46%) cuando las semillas de *C. sativa* fueron coinoculadas con los tres géneros de PGPR bajo estudio (ABP). Esto fue acompañado con un menor %PA en ABP. El %SM fue similar entre ABP y testigo. Si bien BAC presento el mayor %PA, cuando se inoculó junto a AZO y PSE en ABP este efecto posiblemente negativo no se evidencio. Del mismo modo, AZO presentó el mayor valor de %SM y no repercutió en el resultado de ABP.

Tanto *Azospirilum, como Pseudomonas y Bacillus*, podrían haber aportado un beneficio individual y que, al actuar de forma conjunta, podría haber generado un efecto positivo y sinérgico, aumentando significativamente el %PG. Este resultado coincide con Gholami *et al*. (2009) quienes encontraron un aumento del porcentaje de germinación en semillas de maíz, al inocular con las cepas *Pseudomonas putida* R-168, *Pseudomonas fluorescens* R-93, *Pseudomonas fluorescens* DSM 50090, *Pseudomonas putida* DSM 291, *Azospirillum lipoferum* DSM 1691 y *Azospirillum brasilense* DSM 1690. Miljaković *et al*., (2022) encuentran también porcentajes de germinación significativamente mayores que el testigo en semillas de soja (*Glycine max*), en este caso coinoculadas con *Bacillus megaterium* + *Bradyrhizobium japonicum.* Sin presentar antagonismo entre las cepas.

El caldo (slurry) o volumen total (inoculante + bioprotector) aplicado en las semillas, calculado según la recomendación para semillas de trigo (1000 µl de inoculante/100 g

semilla) y teniendo en cuenta el peso de mil semillas (ISTA, 2025) influyeron de manera positiva sobre el % PG. En este sentido, Olivera y Ferrari (2013), entre otros, demostraron que volúmenes elevados de slurry total aplicado a semillas de festuca alta (*Festuca arundinacea* Schreb) pueden reducir la calidad fisiológica de las semillas. En númerosos casos reportados para diferentes especies, cuando las semillas son tratadas con volúmenes excesivos, se puede desencadenar el proceso germinativo (Bewley y Black, 1994). Esto no sería un problema si estas semillas son sembradas inmediatamente al tratamiento, sin embargo, es un grave problema si luego son secadas para su almacenamiento y posterior siembra, ya que se interrumpe la germinación por la desecación y el embrión podría morir (Bewley y Black, 1994).

Según los resultados obtenidos en este trabajo, el tratamiento ABP presentó un porcentaje de germinación significativamente mayor que el tratamiento testigo y las inoculaciones individuales. Esto podría explicarse por la acción combinada de los tres microorganismos, los cuales, a través de diversos mecanismos, habrían estimulado los procesos metabólicos del embrión favoreciendo la germinación. En primer lugar, la producción de fitohormonas como AIA, giberelinas y citoquininas por parte de *A. argentinense*, *P. fluorescens* y *B. subtilis* (Benintende et al., 2025; Cassán et al., 2009; Gholami et al., 2009; Tsotetsi et al., 2022) podría haber generado un “shock fitohormonal” al penetrar la cubierta seminal junto con el agua, estimulando la división y elongación celular en el embrión (Cassán *et al.*, 2009). En este sentido, Zhao *et al*. (2020) demostraron que el AIA mejora la germinación al modificar el balance de fitohormonas endógenas (aumento de giberelinas, y reducción de ácido abscísico) y al estimular el metabolismo de sacarosa en las semillas en germinación.

En segundo lugar, la producción de giberelinas por parte de *Pseudomonas* y *Azospirillum* ha sido asociada con la activación de enzimas hidrolíticas como la amilasa, facilitando la movilización de reservas del endospermo en cultivos como maíz (Gholami *et al.*, 2009). De manera similar, se ha demostrado que *Bacillus subtilis* puede aumentar la actividad de β-amilasa y la expresión de sus isoenzimas durante la germinación temprana en trigo, lo que se correlaciona con una mayor licuefacción del endospermo y una germinación más rápida (Li y Hu, 2020).

Aunque las semillas de *C. sativa* son oleaginosas, con un contenido de aceite que oscila entre el 30 y el 40%, y almacenan principalmente lípidos como reserva (Kim *et al*., 2023), estos hallazgos muestran la capacidad de las PGPR para estimular la movilización de reservas. En este sentido, resulta relevante que componentes de la matriz extracelular de *B. subtilis*, como la proteína amiloide TasA y el lipopéptido fengicina, interactúen con los cuerpos lipídicos de las semillas, promoviendo la movilización de reservas lipídicas y el crecimiento de la radícula (Berlanga-Clavero *et al*., 2022). De hecho, en *C. sativa* se ha descrito que durante la germinación los cuerpos lipídicos se desestabilizan y degradan mediante la acción de proteínas asociadas al retículo endoplasmático rugoso, liberando los lípidos de reserva para el embrión (Kim *et al*., 2023).

Tanto las dosis finales de inoculantes como el tipo de bioprotector utilizado no interfirieron en la germinación de modo negativo. Por lo tanto, para semillas de *C. sativa* según los resultados obtenidos podrían recomendarse trabajar con volumen de caldos totales de inoculantes entre los 2000 µl y 4000 µl cada 100 g de semilla. De este modo, el efecto potenciador observado en ABP podría explicarse por el efecto del tratamiento en general.

Con respecto a la variable PA, a pesar de que el testigo, BAC y PSE presentaron los mayores valores de %PA, estos no se trasladaron a los tratamientos de coinoculación ABP. De hecho, el tratamiento ABP fue el que presentó la menor cantidad de PA, junto con AZO. Estos resultados coinciden con los reportados por Miljaković *et al.* (2022) en soja.

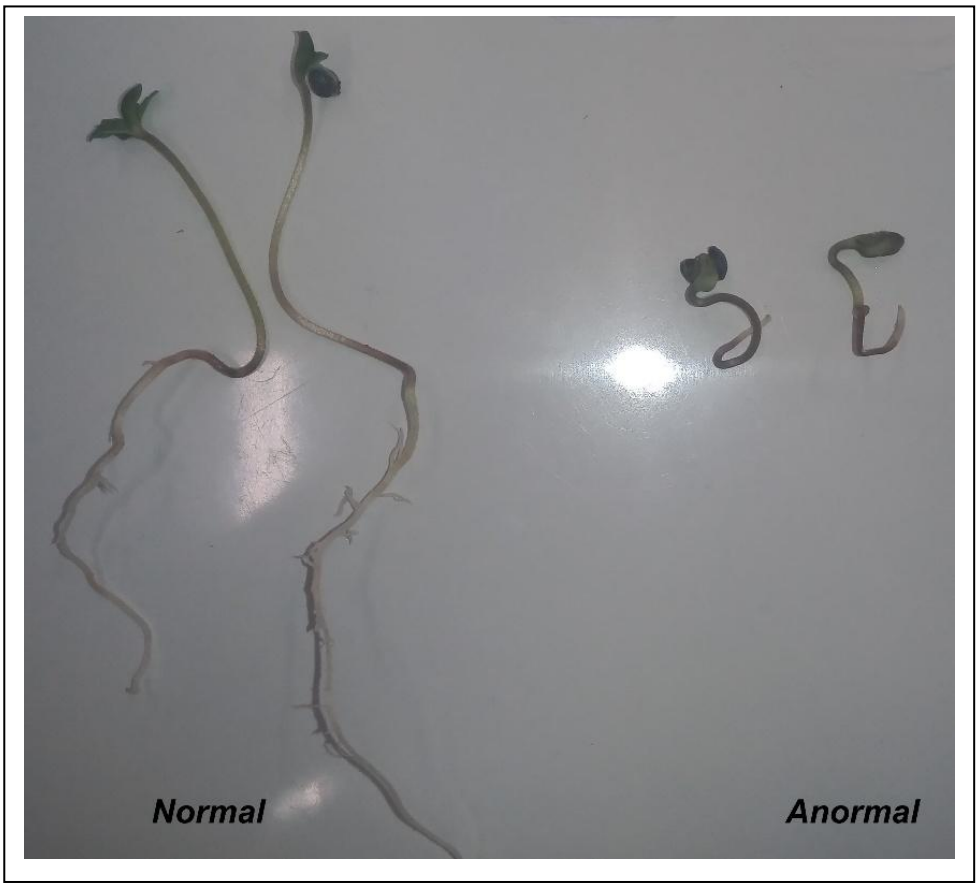


Figura 11. Plántulas normales (izquierda) y anormales (derecha) originadas de semillas de *C. sativa* sometidas a inoculaciones simples y coinoculación con AZO: *A. argentinense*, BAC: *B. subtilis*, PSE: *P. fluorescens, ABP: A.*

Además, los tratamientos no mostraron anormalidades atribuibles a fitotoxicidad. Por lo tanto, no se observó ningún efecto negativo de los productos aplicados en el %PA (Tabla I).

Tabla I. Anormalidades por fitotoxicidad observadas en plántulas de *C. sativa* según criterios ISTA (2025), para cada tratamiento de inoculación.

Tratamientos	Raíces acortadas	Ápices descoloridos	Raíces levantadas sobre el medio de crecimiento	Abundantes pelos radiculares	Hipocótilos cortos y gruesos
Testigo	-	-	-	-	-
AZO	-	-	-	-	-
BAC	-	-	-	-	-
PSE	-	-	-	-	-
ABP	-	-	-	-	-

Nota: Los guiones (-) indican ausencia de anormalidad por fitotoxicidad.

Por otro lado, el tratamiento ABP presentó la menor cantidad de SM en comparación con el testigo. Por lo tanto, la aplicación de estos productos no influyó negativamente en este componente; atribuyéndose a semillas que ya estaban muertas en el lote de semillas (sin tratar).

Crecimiento de plántulas

En las Figura 12 y 13 se presentan los resultados de crecimiento en plántulas normales originadas en el ensayo de germinación para los diferentes tratamientos y testigo. Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos para LA, LR y PSR. No se encontraron diferencias significativas para PSA.

En cuanto al LA, BAC presentó el mayor valor (5,53 cm), seguido por ABP (5,07 cm), AZO (4,85 cm) y PSE (4,83 cm); testigo presentó el menor valor (4,15 cm). En cuanto al LR, ABP presentó el mayor valor (6,01 cm), seguido por BAC y PSE (5,03 y 4,88 cm), AZO (4,41 cm). El Testigo presentó el menor valor (3,44 cm).

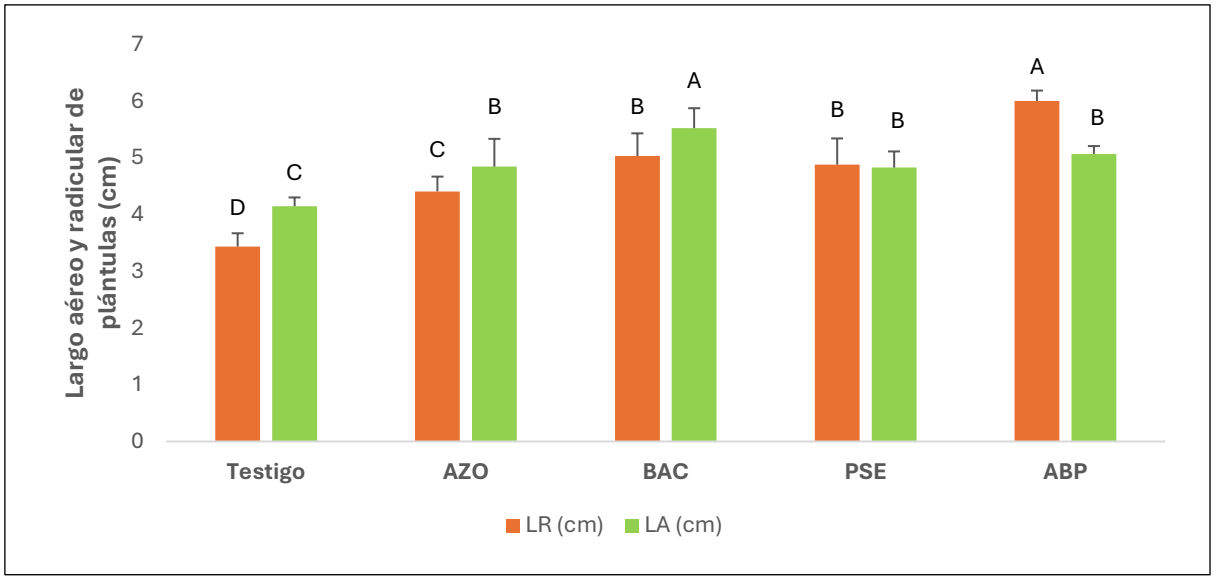


Figura 12. Longitud radicular (LR) y longitud aérea (LA) de plántulas normales de *C. sativa* originadas de semillas sometidas a inoculaciones simples y coinoculación con AZO: *A. argentinense*, BAC: *B. subtilis*, PSE: *P. fluorescens*, ABP*: A. argentinense, B. subtilis* y *P. fluorescens.* Letras distintas representan diferencias significativas entre tratamientos dentro de cada categoría ($p \leq 0{,}05$).

Los resultados encontrados en este trabajo muestran que *A. argentinense*, *P. fluorescens* y *B. subtilis* en forma individual como en conjunto, no solo ejercerían efectos positivos sobre el largo radicular de plantas establecidas (Comeau *et al*., 2021; Lyu *et al*., 2019), sino que también promueven el desarrollo en estadios tan tempranos como el de plántula, a los siete días desde la siembra en *C. sativa*. Según Berg *et al*., 2014; Qessaoui *et al*., 2019 y Wei *et al*., 2019 entre otros, encuentran que *Pseudomonas* y *Bacillus* colonizan activamente la rizósfera y promueven el crecimiento vegetal al aumentar la producción de fitohormonas beneficiosas, entre ellas el AIA. *Azospirilum* podría haber contribuido también a la producción de fitohormonas y la fijación biológica de nitrógeno (Backer *et al*., 2018; Vejan *et al.*, 2016). Los valores de LR fueron superiores en todos los tratamientos con PGPR respecto al testigo. En particular, el ABP presentó los mayores valores.

Si bien los resultados obtenidos fueron en condiciones controladas en laboratorio, es una gran aproximación para comprobar el comportamiento en etapas iniciales del cultivo como son la germinación y la formación de la plántula. Este beneficio individual o conjunto de los PGPR *A. argentinense*, *P. fluorescens* y *B. subtilis* y especialmente la coinoculación con los tres, podría mejorar potencialmente a campo la exploración radicular, favoreciendo una mayor captación de agua y nutrientes. Corredor-Perilla *et al*. (2023) también reportan aumentos significativos en la longitud radicular de plántulas de *C. sativa* inoculadas con cepas de *Bacillus*.; como así también Miljaković *et al.* (2022) con coinoculación de *Bacillus* + *Bradyrhizobium* en soja.

Al igual que lo observado para la LR, todos los tratamientos mejoraron los valores de longitud aérea (LA) de las plántulas a los siete días desde la siembra. Estos resultados para LA coinciden con Miljaković et al. (2022) en soja, donde la misma coinoculación produjo un aumento significativo de la longitud aérea. Esto podría influir en una mayor generación de área foliar que aumente la intercepción de la luz y la convierta, junto con el agua, en un mayor crecimiento general de la planta.

En este periodo de siete días de evaluación bajo condiciones controladas en laboratorio no hubo diferencias significativas entre tratamientos y testigo respecto al PSA.

En el caso del PSR, tanto ABP como PSE presentaron los mayores valores (0,0021 g), seguidos por BAC y AZO (0,0019 g), sin diferencias significativas entre sí. El testigo presentó el menor valor.

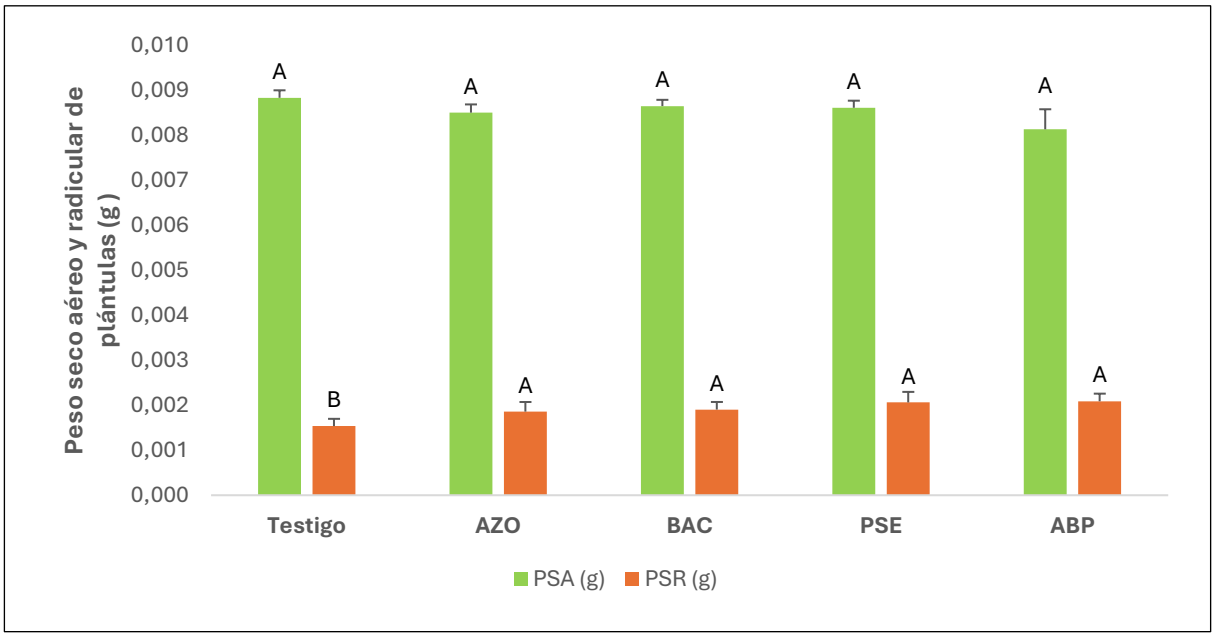


Figura 13. Peso seco aéreo (PSA) y peso seco radicular (PSR) de plántulas normales de C. sativa originadas de semillas sometidas a inoculaciones simples y coinoculación con AZO: *A. argentinense*, BAC: *B. subtilis*, PSE: *P. fluorescens,* ABP*: A. argentinense, B. subtilis* y *P. fluorescens.* Letras distintas representan diferencias significativas entre tratamientos dentro de cada categoría ($p \leq 0,05$).

En cuanto al PSR de las plántulas analizadas, en este ensayo de germinación, la inoculación con cada una de las bacterias PGPR, tanto de manera individual como en coinoculación, mejoró esta variable respecto al testigo (Figura 13). Por lo tanto, las plántulas no solo presentaron mayor LR (Figura 12), sino también mayor PSR, señalando un mayor crecimiento, con potencial de exploración para la toma de agua y nutrientes. Estos resultados coinciden con Miljaković *et al*. (2022) en soja, donde la coinoculación de *Bacillus megaterium* + *Bradyrhizobium japonicum* aumentó el peso seco radicular respecto al testigo.

Por el contrario, al analizar el peso seco aéreo (PSA) en relación con la longitud aérea (LA) de las plántulas, se observó que las plántulas generadas por el testigo fueron de menor longitud (Figura 12), pero de igual peso que los tratamientos inoculados (Figura 13). Esto podría

indicar que las plántulas del testigo, si bien presentaron PSA similar, distribuyeron menos recursos hacia el alargamiento de la parte aérea. Estos hallazgos también coinciden con Miljaković *et al*. (2022), quienes reportaron que, si bien el peso aéreo no siempre mostró diferencias significativas, la coinoculación generó plántulas con mayor longitud aérea.

Durante los siete días, desde la emergencia y durante el crecimiento de las plántulas, el efecto positivo de la coinoculación ABP que mostro el mayor valor final %PG podría deberse a la producción de factores promotores de crecimiento que, según Pedraza *et al*., (2020) además podrían haber presentado actividad biocontroladora contra fitopatógenos que podrían haber venido con las semillas.

Ensayo 2: efecto de la coinoculación e inoculaciones individuales sobre el crecimiento de plantas de *Cannabis sativa* L. durante la etapa vegetativa.

Momento 1: Evaluación a los 30 días desde la siembra

Largo y peso seco aéreo y radicular de plantas de *C. sativa*

En las Figura 14 y 15 se presentan los resultados de crecimiento en macetas de plantas de *C. sativa* para los diferentes tratamientos y testigo a los 30 dds.

Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos para LA30. No se encontraron diferencias significativas para LR30. Para LA30, el Testigo presentó el mayor valor (13,44 cm), seguido por ABP (12,3 cm), BAC (11,5 cm) y AZO (10,8 cm); PSE presentó el menor valor.

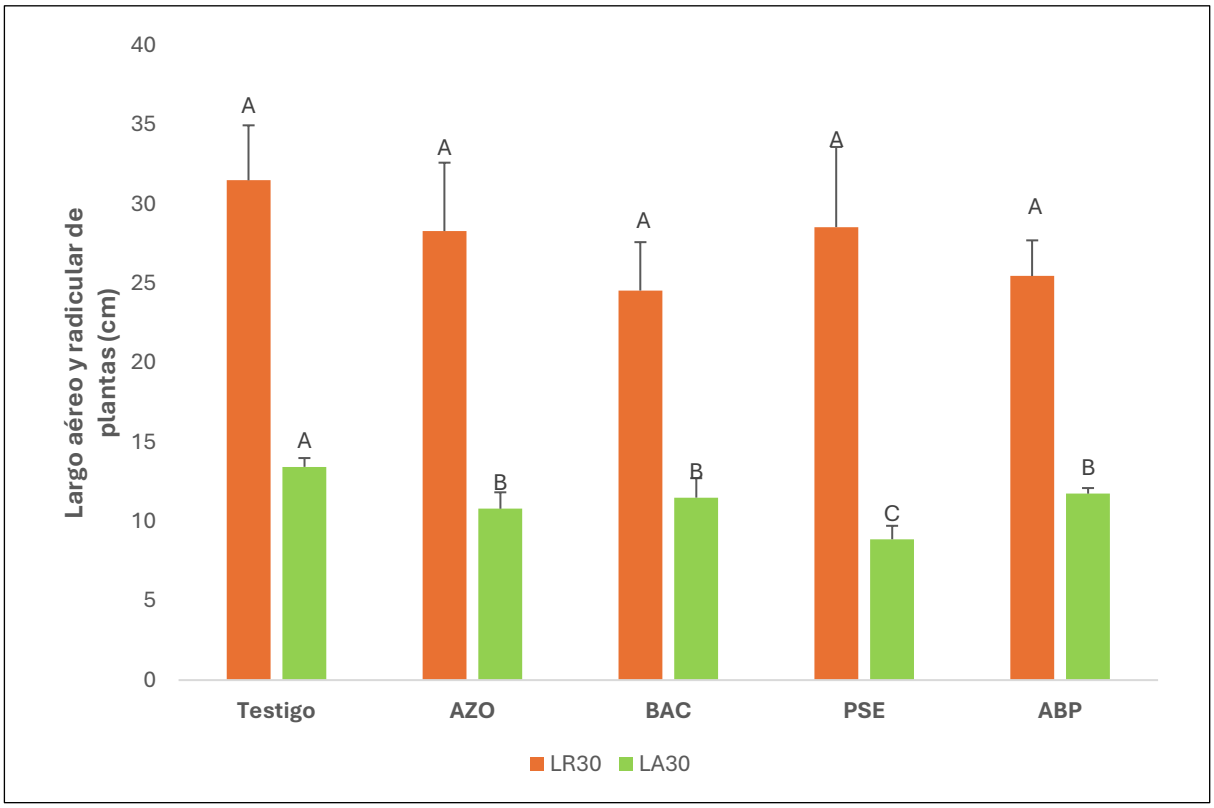


Figura 14. Longitud radicular (LR30) y longitud aérea (LA30) de plantas de *C. sativa* originadas de semillas sometidas a inoculaciones simples y coinoculación con AZO: *A. argentinense*, BAC: *B. subtilis*, PSE: *P. fluorescens,* ABP*: A. argentinense, B. subtilis* y *P. fluorescens*, a los 30 dds. Letras distintas representan diferencias significativas entre tratamientos dentro de cada categoría ($p \leq 0,05$).

También se encontraron diferencias significativas entre tratamientos para PSA30 y PSR30. Para PSA30, el testigo y ABP presentaron los mayores valores (0,72 y 0,68 g respectivamente), seguidos por BAC (0,46 g) y AZO (0,44 g); PSE presentó el menor valor. En cuanto a PSR30, el Testigo presentó el mayor valor (0,33 g), seguido por ABP (0,25 g). AZO, BAC y PSE presentaron menores valores.

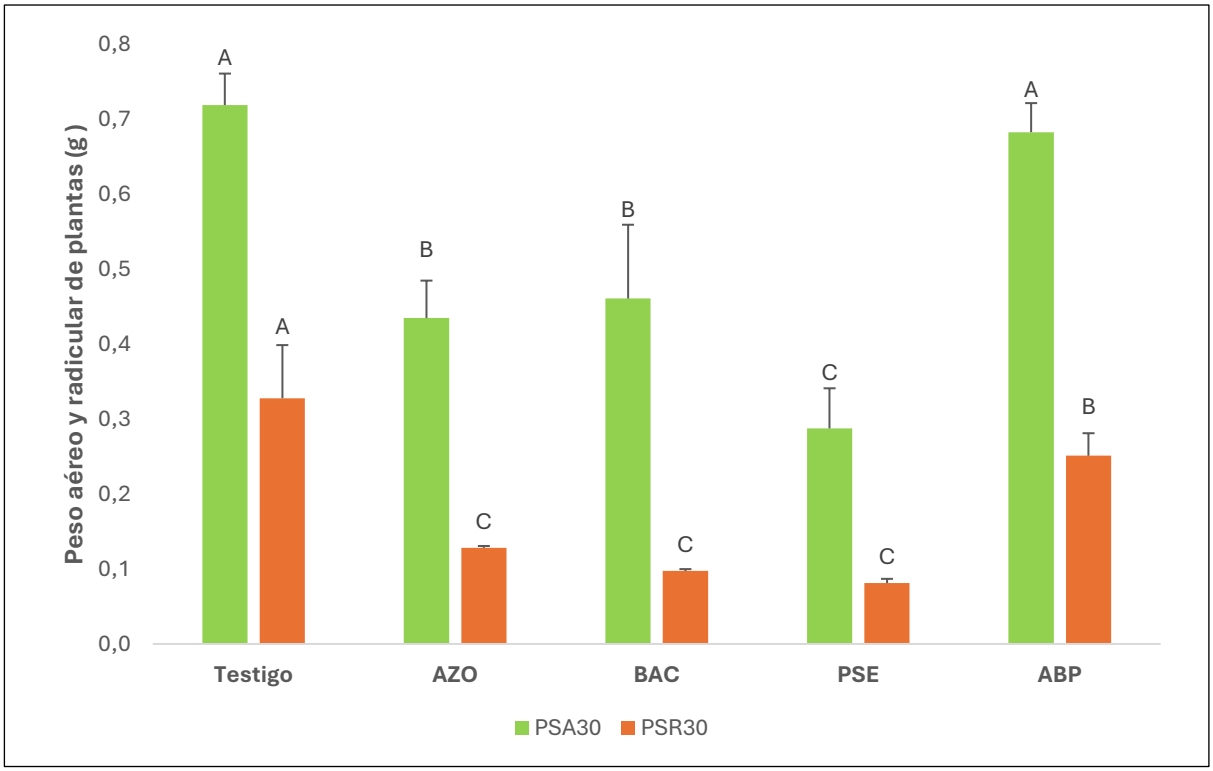


Figura 15. Peso seco aéreo (PSA30) y peso seco radicular (PSR30) de plantas de *C. sativa* originadas de semillas sometidas a inoculaciones simples y coinoculación con AZO: *A. argentinense*, BAC: *B. subtilis*, PSE: *P. fluorescens*, ABP*: A. argentinense, B. subtilis* y *P.*

A pesar de que las PGPR, *A. argentinense, P. fluorescens y B. subtilis* poseen mecanismos reconocidos de promocion de crecimiento, como la producción de fitohormonas, la fijación biológica de nitrógeno y la solubilización de fosfatos (Benintende *et al.*, 2025; Backer *et al.*, 2018; Vejan *et al.*, 2016), no se observaron incrementos significativos en el peso seco aéreo ni radicular de las plantas inoculadas en comparación con el testigo.

Por otra parte, varios autores, entre ellos Lyu *et al.* (2019), en una revisión sobre PGPR en *C. sativa*, destacan que los beneficios de estas rizobacterias suelen manifestarse con mayor intensidad en situaciones de estrés abiótico, como sequía, salinidad o deficiencia de nutrientes. Tanney *et al*. (2023) encuentran también que la inoculación con *Bacillus* y

Pseudomonas en *C. sativa* no mejoró la densidad de tricomas bajo un régimen nutricional óptimo, incluso con tendencia a la disminucion, mientras que sí se detectaron efectos positivos cuando las plantas crecieron en condiciones subóptimas. Si bien se evaluan variables totalmente distintas a las presentadas en este trabajo, es posible que la respuesta (aumento/disminucion) a la inoculacion con PGPR en condiciones con o sin estrés se extrapolen a otras variables de estudio.

Por lo tanto, se propone realizar ensayos a posteriori en condiciones de estrés (ej. salino, hídrico, nutricional) para evaluar si los PGPR empleados logran mejorar el largo y el peso aereo y radicular en etapas tempranas del cultivo. Y además, estudiar otras variedades de *C. sativa* para descartar tambien el efecto de las variedades.

Si bien el testigo presentó valores similares o superiores a los tratamientos inoculados en la mayoría de las variables evaluadas, se observó que el tratamiento coinoculado (ABP) fue superior a los tratamientos con inoculación individual (AZO, BAC y PSE) en cuanto a PSA30 y PSR30 (Figuras 15). Esto concuerda con lo reportado por Comeau *et al*. (2021), quienes demostraron que los consorcios de *Pseudomonas* y *Bacillus* aumentaron significativamente el crecimiento aereo y radicular, y peso seco total en plantas de cannabis en comparación con los tratamientos con una sola cepa, los cuales fueron ineficaces. Esto sugire que la coinoculación triple puede ofrecer efectos sinérgicos incluso en condiciones óptimas.

Número de hojas vivas

En las Figura 16 se presentan los resultados de crecimiento de la variable HV en plantas de *C. sativa* a los 30 dds para los diferentes tratamientos y testigo.

No se encontraron diferencias significativas para HV (p=0,0605).

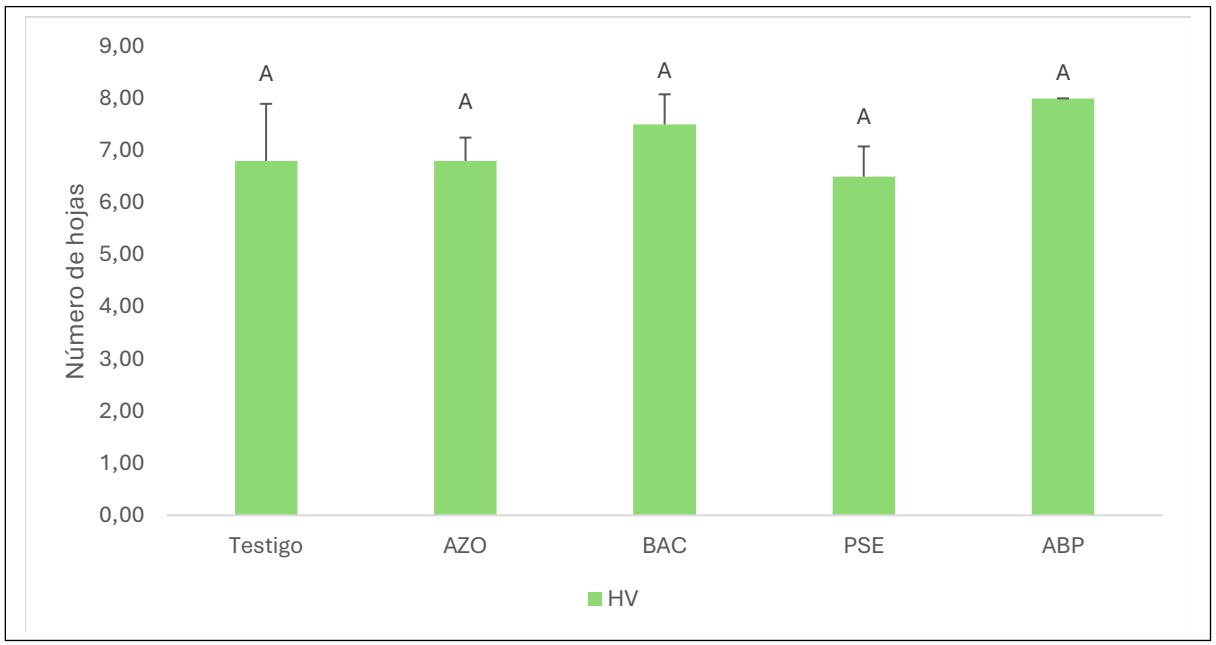


Figura 16. Número de hojas vivas por planta de *C. sativa* originadas de semillas sometidas a inoculaciones simples y coinoculación con AZO: *A. argentinense*, BAC: *B. subtilis*, PSE: *P. fluorescens*, ABP*: A. argentinense, B. subtilis* y *P. fluorescens*, a los 30 dds. Letras distintas representan diferencias significativas entre tratamientos dentro de cada categoría ($p \leq 0,05$).

En cuanto al número HV, al no hallarse diferencias significativas entre los tratamientos inoculados y el testigo, este resultado sugiere que, bajo las condiciones de cultivo ensayadas, la inoculación con *A. argentinense*, *B. subtilis* y *P. fluorescens* no afecto la expresión de este rasgo en esta etapa de desarrollo.

Determinación de la colonización de los microorganismos en raíces de *Cannabis sativa* L. a los 30 desde la siembra.

Se recuperaron de la rizósfera de *C. sativa*:

- *A. argentinense*, en tratamiento individual y coinoculado (>1,7×10^7 bacterias/g húmedo de raíz)
- *P. fluorescens* en tratamiento individual (1,7×10^6 UFC/g húmedo de raíz) y coinoculado (1,4×10^7 UFC/g húmedo de raíz)
- *B. subtilis* en tratamiento individual (1,4×10^6 UFC/g húmedo de raíz) y coinoculado (2×10^6 UFC/g húmedo de raíz)

Para *A. argentinense*, los tubos con medio NFb semisolido presentaron resultados positivos, evidenciados por la formación de una nube de crecimiento subsuperficial y un viraje del medio de cultivo de verde a azul (Figura 17 a), debido a la alcalinización de este (Di Salvo y García De Salamone, 2019). Esto indica la capacidad de estos microorganismos de fijar nitrógeno en condiciones de microaerofilia, de acuerdo con (Döbereiner *et al*., 1995). El posterior repique de estos tubos positivos en medio RC permitió obtener colonias con las características culturales propias de la especie (Figura 17 b), de acuerdo con Rodríguez Cáceres (1982). Asimismo, la tinción de Gram reveló bacilos (bastones) gran-negativos ligeramente curvados (Figura 18), confirmando su presencia.

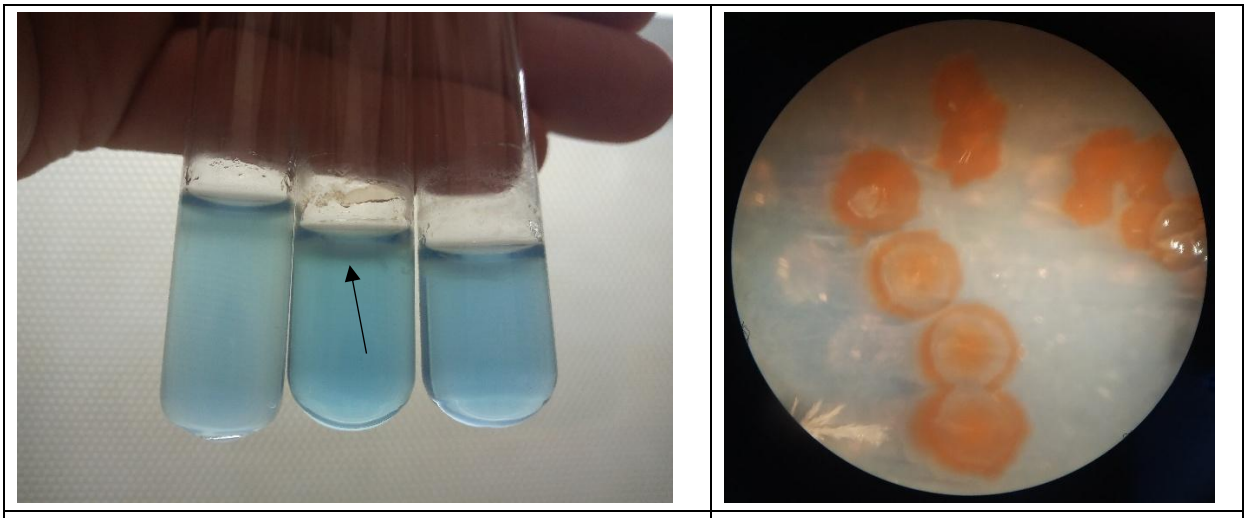


Figura 17. Determinación de la presencia de *A. argentinense*, obtenidos de la rizósfera de *C. sativa* en medio NFb semisólido y medio Agar-Rojo Congo. a) Se observan resultados positivos por el viraje del medio NFb al color azul, por la alcalinización del medio y el crecimiento subsuperficial en forma de nube. b) Se observan colonias de color rojo (por absorción del Rojo Congo), convexas, de forma redonda o irregular, con bordes elevados y ligeramente ondulados, en medio Agar-Rojo Congo (aumento 10x).

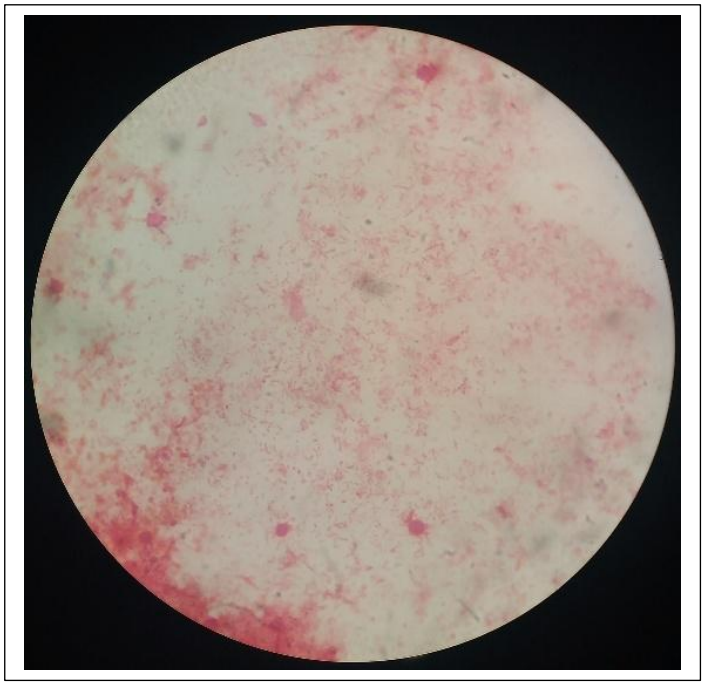
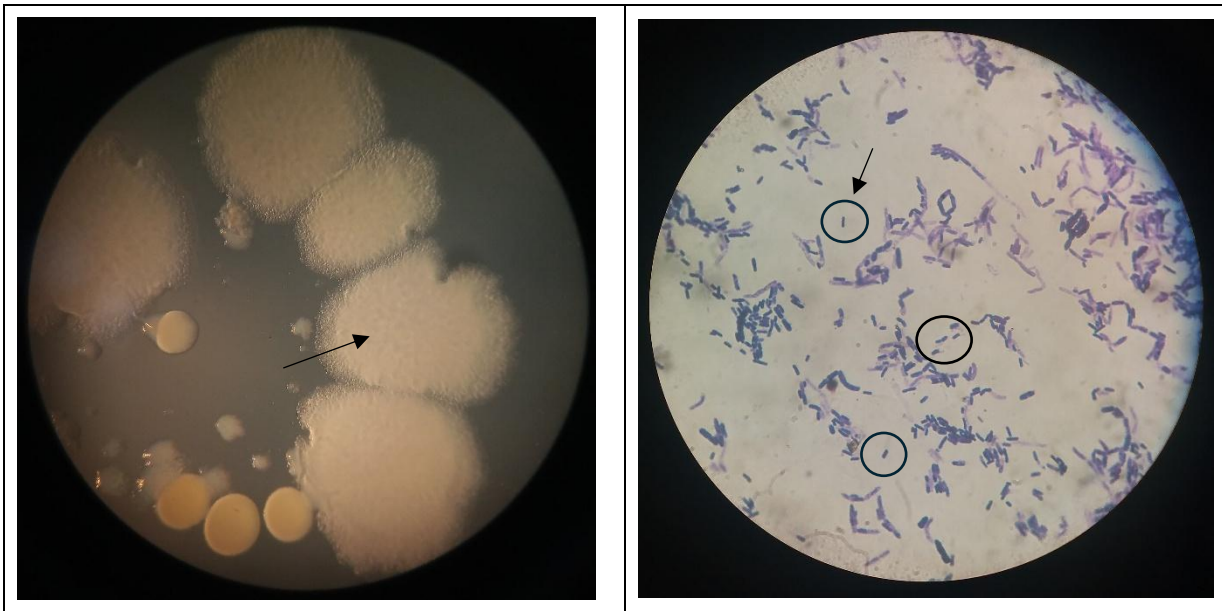


Figura 18. Tinción de Gram de *P. fluorescens* (aumento 1000×). Se observan bacilos Gram-negativos ligeramente curvados.

B. subtilis fue recuperado en medio Agar Nutritivo (AN), donde desarrolló colonias con morfología típica de la especie (Figura 19 a). Estas colonias presentaron forma circular a irregular, bordes finamente lobulados (fimbriados), y superficies opacas y rugosas, con un aspecto cremoso a granular consistente (Logan y De Vos, 2015). La observación microscópica de estas colonias, tras la tinción de Gram, mostró bacilos rectos, Gram-positivos (Figura 19 b)



a b

Figura 19. Determinación de la presencia de *B. subtilis*. a) Se observan en medio Agar Nutritivo colonias de forma circular a irregular, con bordes finamente lobulados (fimbriados), de textura rugosa y aspecto granular opaco, convexas, de bordes elevados (aumento 10×). b) Tinción de Gram (aumento 1000×). Se observan bacilos rectos teñidos de color violeta (Gram-positivos).

En el caso de *P. fluorescens*, las colonias aisladas en medio *Pseudomonas* Agar F presentaron un aspecto cremoso y plano (Figura 20 a). La tinción de Gram evidenció bacilos rectos o ligeramente curvados, Gram-negativos (Figura 20 b). Un rasgo distintivo que permitió confirmar su identidad fue la producción del pigmento fluorescente (fluoresceína). Al exponer las placas de cultivo a luz ultravioleta (UV), se observó una intensa fluorescencia de color celeste característica (Figura 20 c), lo cual es un indicador fenotípico relevante en

medios con limitación de hierro, como el *Pseudomonas* Agar F, y coincide con las propiedades de la especie (Palleroni, 2005).

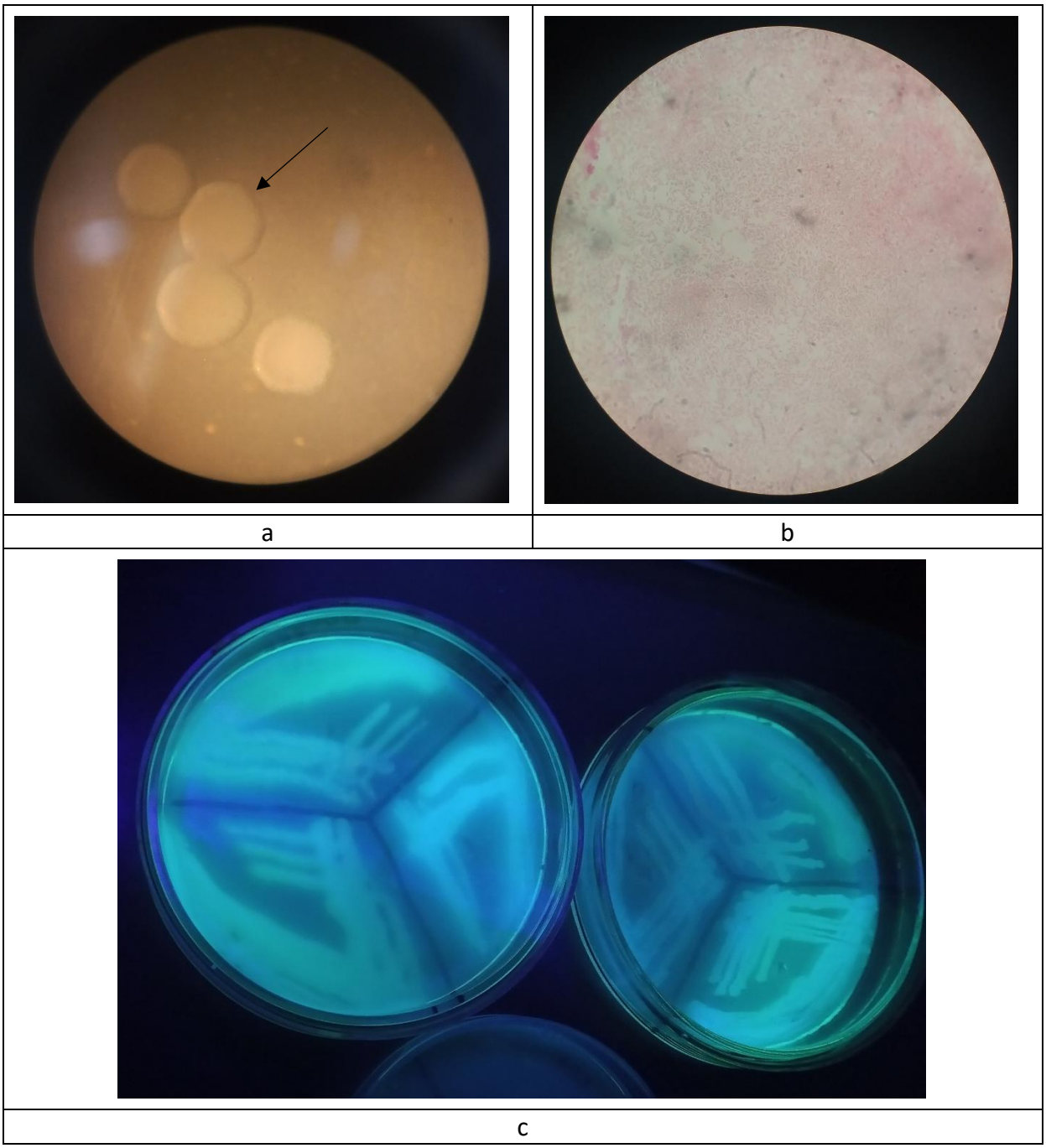


Figura 20. Determinación de la presencia de *P. fluorescens*. a) Se observan colonias cremosas, planas, típicas de *P. fluorescens* (aumento 10×). b) Tinción de Gram (aumento 1000×). Se observan bacilos rectos o ligeramente curvados, Gram-negativos (teñidos de rosa/rojo). c) Placas de Petri con medio *Pseudomonas* Agar F expuestas a luz ultravioleta (UV). Se observa una intensa fluorescencia de color celeste verdoso en toda la superficie sembrada.

Estos resultados nos permiten deducir, que la recuperación de *A. argentinense*, *P. fluorescens* y *B. subtilis* en la rizósfera de *C. sativa*, evidencia, en primer lugar, la capacidad de los tres géneros de microorganismos para colonizar las raíces de *C. sativa*. Y en segundo lugar la compatibilidad entre ellos para colonizar en forma asociativa en la coinoculación. Tal como lo reflejan los valores obtenidos en los tratamientos de inoculación individual/coinoculación asociativa, donde han mantenido el mismo orden en el número de bacterias /gramo de raíz. A continuación, se detallan comparativamente los valores obtenidos:

A. argentinense: AZO >1,7**×10^{7}** /ABP >1,7**×10^{7}**

B. subtilis: BAC 1,4**×10^{6}** / ABP 2**×10^{6}**

P. fluorescens: PSE 1,7**×10^{6}** / ABP 1,4**×10^{7}**

Esta investigación, demuestra que los géneros inoculados (*Azospirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas*) sobre las semillas de *C. sativa* colonizan exitosamente la rizósfera, cumpliendo las etapas de reconocimiento quimiotáctico, adherencia y multiplicación en la superficie radicular, como los señala el trabajo de Compant *et al*. (2010), al recuperarse cantidades similares tanto en los tratamientos individuales (AZO, BAC, PSE) como en el consorcio (ABP).

Estos resultados son consistentes con estudios previos que demuestran la capacidad de *Pseudomonas* y *Bacillus* para formar biopelículas mixtas y colonizar de manera sinérgica la rizósfera (Ansari y Ahmad, 2019; Powers *et al*., 2015; Ren *et al*., 2015; Shank *et al*., 2011). En este sentido, al inocular con *A. argentinense*, *P. fluorescens* y *B. subtilis* sobre semillas en un sustrato estéril, estas bacterias habrían actuado como colonizadores iniciales, lo que podría haber ejercido un efecto de prioridad según Toju *et al*. (2018). Bajo estas condiciones, es

probable que una o más de las bacterias se establecieran tempranamente, modificando el ambiente rizosférico y favoreciendo el establecimiento de las tres PGPR en la rizósfera de *C. sativa*.

Es importante señalar que el método de lavado de raíz empleado en este trabajo proporciona una estimación global de la población bacteriana recuperada, pero no permite distinguir los patrones de distribución espacial en todo el sistema radicular. Diversos estudios han demostrado que la colonización bacteriana en la rizósfera no es homogénea, sino que se concentra en micrositios específicos como la zona de elongación, la base de los pelos radiculares o las zonas de emergencia de raíces laterales (Compant *et al*., 2010). Por esta razón, en futuras investigaciones se propone estudiar la colonización de las PGPR en *C. sativa* con técnicas de muestreo que permitan caracterizar con mayor precisión la distribución y localización de las bacterias en la rizósfera.

Momento 2: Evaluación a los 60 días desde la siembra

En las Figuras 21, 22, 23 y 24 se presentan los resultados del ensayo de crecimiento en macetas de plantas de *C. sativa* para los diferentes tratamientos y testigo.

Largo aéreo y radicular

Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos para LA60, LR60. Para LA60, el testigo presentó el mayor valor (27,5 cm), seguido por AZO (24,75 cm); BAC, ABP y PSE presentaron menores valores. En el caso del LR60, PSE, BAC, ABP y Testigo presentaron los mayores valores (32; 31,4; 29,5 y 29,3 cm) sin diferencias significativas entre sí; AZO presentó el menor valor.

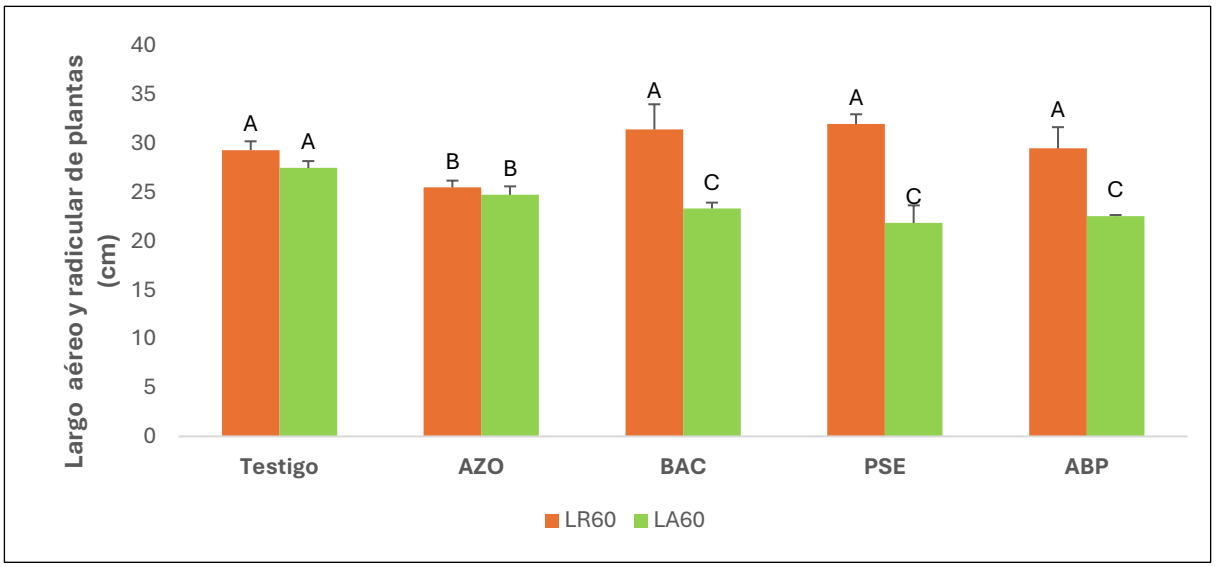


Figura 21. Longitud radicular (LR60) y longitud aérea (LA60) de plantas *C. sativa* originadas de semillas sometidas a inoculaciones simples y coinoculación con AZO: *A. argentinense*, BAC: *B. subtilis*, PSE: *P. fluorescens*, ABP: *A. argentinense*, *B. subtilis* y *P. fluorescens*, a los 60 dds. Letras distintas representan diferencias significativas entre tratamientos dentro de cada categoría (p≤0,05).

En esta segunda instancia, a diferencia de la primera evaluacion (30 dds) LR60 presento diferencias significativas, difrenciadoce solamente AZO con menores valores respecto a los demas tratamientos y testigo. Los tratamientos PSE, BAC, ABP y Testigo no presentaron diferencias significativas entre si.

En cuanto a LA60, ningun tratamiento supero al testigo. Sin embargo, AZO mostró el mejor desempeño respecto al resto de tratamientos inoculados.

Estos resultados son consistentes con el patron observado en la primera evaluación (30 dds) y refuerza la hipotesis de que bajo condiciones de cultivo no limitantes, los PGPR empleados en cannabis no necesariamente incrementan el crecimiento vegetativo, tal como fue discutido previamente (Lyu *et al*., 2019; Tanney *et al*., 2023)

Peso seco aéreo y radicular

No se encontraron diferencias significativas para PSA60, PSR60.

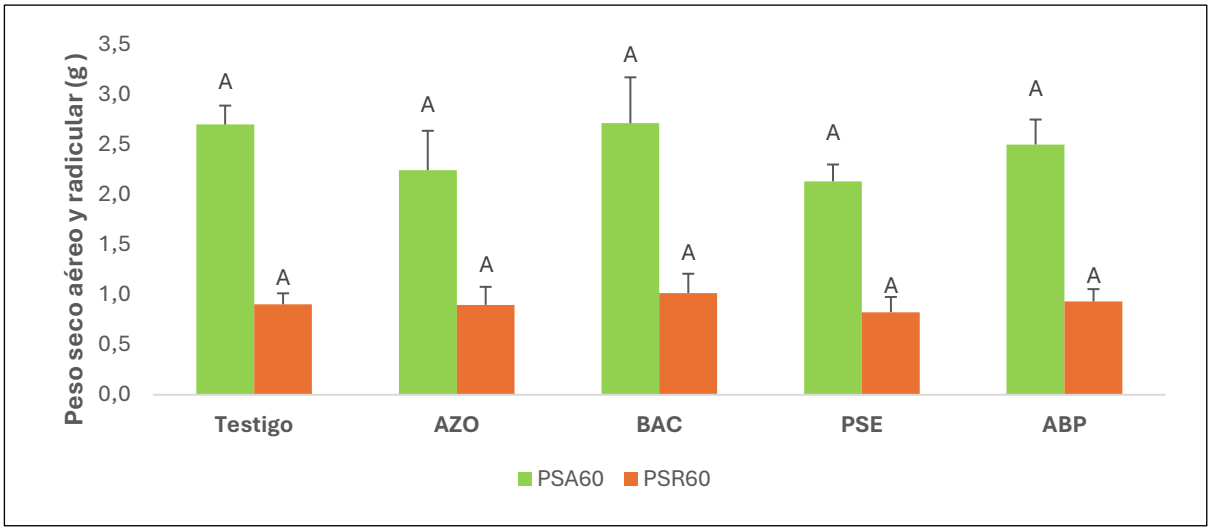


Figura 22. Peso seco aéreo (PSA60) y peso seco radicular (PSR60) de plantas *C. sativa* originadas de semillas sometidas a inoculaciones simples y coinoculación con AZO: *A. argentinense*, BAC: *B. subtilis*, PSE: P. *fluorescens,* ABP: *A. argentinense*, *B. subtilis* y *P. fluorescens,* a los 60 dss. Letras distintas representan diferencias significativas entre tratamientos dentro de cada categoría (p≤0,05).

A los 60 dds, el peso seco aéreo (PSA60) y el peso seco radicular (PSR60) no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos inoculados y el testigo. En comparación con los resultados observados a los 30 dds, los tratamientos lograron igualar los valores del testigo. Por lo tanto, bajo las condiciones de este ensayo y en esta etapa de evaluación, no se evidenció un beneficio claro de la aplicación del consorcio de microorganismos sobre el peso seco aéreo y radicular.

Sin embargo, es posible que la falta de diferencias significativas en PSA60 se deba a que la medición de la biomasa total enmascara efectos específicos en componentes particulares de la planta. Estudios en cannabis han demostrado que los efectos de la inoculación con PGPR

pueden ser específicos de cada órgano, por ejemplo, Lyu *et al*. (2023) encontraron aumentos significativos en el peso seco de flores y tallos, pero no en el peso seco de hojas.

Número de Ramificaciones (RAM) y Hojas totales/ramificación

No se encontraron diferencias significativas para RAM. Si se encontraron diferencias significativas para las H/RAM.

En H/RAM, PSE, BAC y ABP presentaron los mayores valores (21,67; 20,75 y 20,33 respectivamente); AZO y Testigo presentaron menores valores.

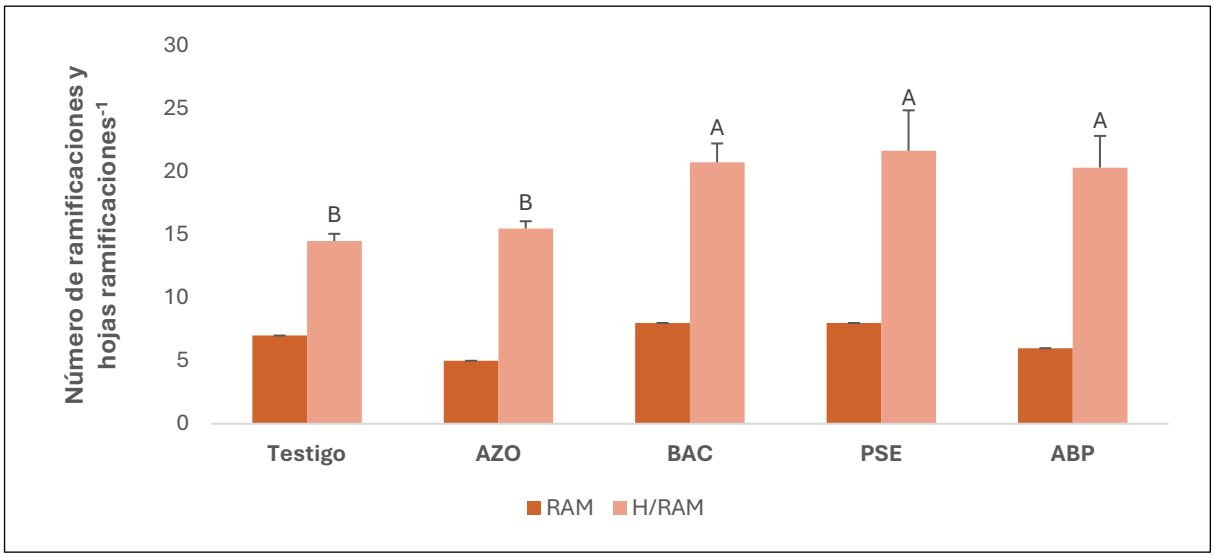


Figura 23. Número de ramificaciones (RAM) y número de hojas expandidas y sin expandir por ramificación (H/RAM) de plantas *C. sativa* originadas de semillas sometidas a inoculaciones simples y coinoculación con AZO: *A. argentinense*, BAC: *B. subtilis*, PSE: *P. fluorescens,* ABP*: A. argentinense, B. subtilis* y *P. fluorescens*, a los 60 dds. Letras distintas representan diferencias significativas entre tratamientos dentro de cada categoría (p≤0,05).

La variable H/RAM presentó diferencias significativas, con valores superiores al testigo en los tratamientos individuales con *Bacillus* (BAC), *Pseudomonas* (PSE) y en el consorcio ABP. Estos

tratamientos mostraron una mayor cantidad de hojas por ramificación, lo que sugiere una arquitectura vegetal más densa y potencialmente más productiva.

Los resultados muestran la plasticidad fenotípica de *C. sativa* frente a la inoculación con estos microorganismos PGPR. Aunque el testigo y el consorcio ABP no difirieron significativamente en el número total de ramificaciones (resultado consistente con lo mencionado por Lyu *et al*. (2022) donde el número de ramas, entre otras variables, rara vez fueron diferentes al grupo control) las plantas inoculadas con el consorcio presentaron un mayor número de hojas por cada ramificación. Esto indica que la coinoculación favorece una estructura de planta más compacta y con mayor densidad foliar.

Número de Hojas expandidas (Hexp), hojas sin expandir (HSexp) y hojas muertas (HM)

Se encontraron diferencias significativas para Hexp, HSexp y HM.

Para Hexp, ABP, PSE y testigo presentaron los mayores valores (12; 11,3 y 11,3 respectivamente); BAC y AZO presentaron menores valores.

A excepción de BAC que presentó el mayor valor de HM (5), los demás tratamientos no presentaron diferencias significativas entre sí.

Para HSexp, BAC, AZO y ABP presentaron mayores valores (4; 3,5 y 3,3 respectivamente); Testigo y PSE presentaron menores valores.

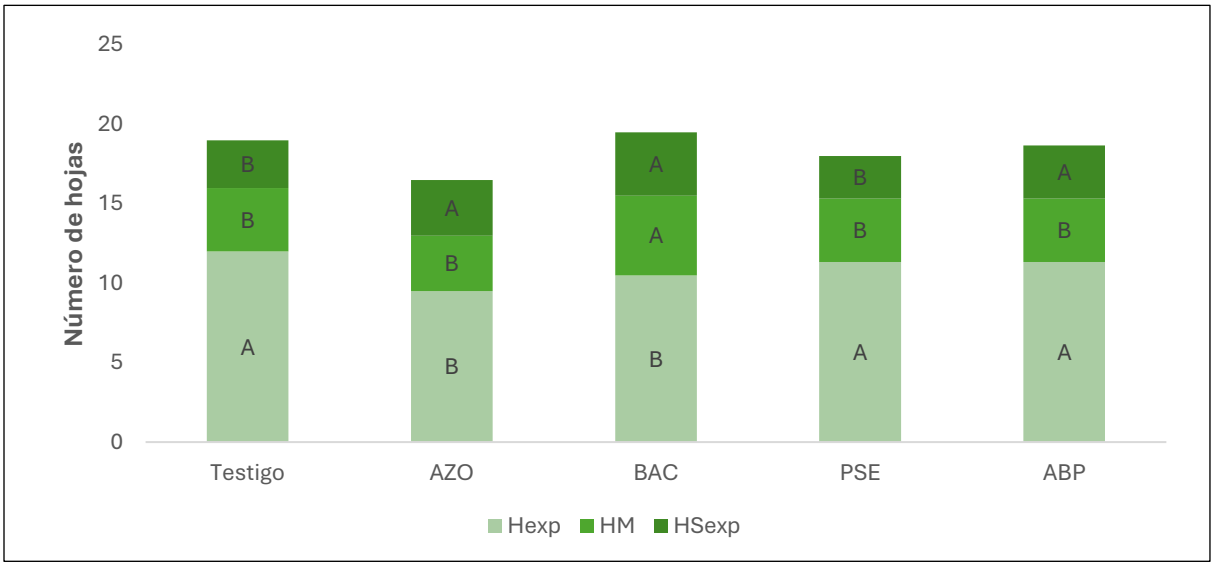


Figura 24. Número de hojas expandidas (Hexp), hojas sin expandir (HSexp) y hojas muertas (HM) de plantas *C. sativa* originadas de semillas sometidas a inoculaciones simples y coinoculación con AZO: *A. argentinense*, BAC: *B. subtilis*, PSE: *P. fluorescens*, ABP: *A. argentinense, B. subtilis* y *P. fluorescens*, a los 60 dds. Letras distintas representan diferencias significativas entre tratamientos dentro de cada categoría (p≤0,05).

A pesar de que el testigo presento mayor longitud aérea, la suma de Hexp, Hsexp y H/RAM (hojas totales) supero significativamente al control. Un resultado similar fue reportado por Saeed *et al*. (2016) en tomate, donde la aplicación de PGPR aumentó significativamente el número de hojas, siendo la coinoculación con *Pseudomonas fluorescens* y *Azotobacter chroococcum* la que produjo el mayor valor, superando al control no inoculado.

En particular, aunque el testigo y el consorcio ABP no difirieron en el número de hojas expandidas, el consorcio mostró una mayor cantidad de hojas sin expandir. Esto sugiere que las plantas inoculadas con el consorcio podrían alcanzar un área foliar fotosintéticamente activa superior en el corto plazo, dando lugar a plantas más compactas, pero con mayor potencial fotosintético, lo cual podría favorecer el rendimiento de la parte reproductiva.

Por lo tanto, los resultados de las variables foliares indican, al menos para este ensayo, que, bajo condiciones óptimas de cultivo, las PGPR no estimularon la variable Hexp por encima del testigo. Sin embargo, los tratamientos BAC, AZO y ABP presentaron un mayor número de hojas sin expandir, lo que podría interpretarse como una promoción en la iniciación de nuevas hojas, posiblemente mediada por la producción de fitohormonas como auxinas y citoquininas por parte de los PGPR (Backer *et al*., 2018; Ortíz-Castro *et al*., 2009; Vejan *et al*., 2016), las cuales estimulan la división y elongación celular, promoviendo la generación de nuevo tejido foliar. De esta manera, estos microorganismos estarían favoreciendo la generación anticipada de área foliar en *C. sativa*.

CONCLUSIONES

En conclusión, los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación demuestran que:

- La coinoculación de semillas de *Cannabis sativa* L. con *Azospirillum argentinense*, *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus subtilis* mejora la calidad fisiológica mediante el incremento del porcentaje de germinación respecto a inoculaciones individuales y el testigo sin inocular. Además, los inoculantes utilizados no producen fitotoxocidad ni registran antagonismo entre las cepas. Por otra parte, la coinoculación mejora el crecimiento al promover plántulas con mayores largos y pesos radiculares, al igual que los tratamientos con inoculaciones individuales con respecto al testigo.

- A los 30 y 60 días desde la siembra, creciendo en la cámara de cultivo, las plantas de *C. sativa* originadas de semillas coinoculadas con *A. argentinense*, *P. fluorescens* y *B. subtilis*, si bien no presentaron mejoras, en el crecimiento expresado largo y peso aéreo y radicular, y número de ramificaciones, las plantas inoculadas y coinoculadas desarrollaron mayor número de hojas por ramificación (expandidas + sin expandir) respecto al tratamiento sin inocular, promoviendo una arquitectura vegetal más densa y mayor potencial de superficie fotosintéticamente activa.

- La rizósfera de *Cannabis sativa* L. es susceptible de ser favorablemente colonizadas por *Azospirillum argentinense*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens* cuando sus

semillas son inoculadas en forma individual y asociativa (coinoculadas) por dichas bacterias, mostrando compatibilidad entre los microorganismos inoculados.

CONSIDERACIONES FINALES

Este proyecto conto con una Beca de Entrenamiento BENTRE24 otorgado por la CIC (Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires). Directora: Maria Elena Olivera, Codirectora: Liliana Rosa Galian.

Esta Beca se originó en el marco del proyecto RIDEE CIC-PBA23 (Red de investigación y Desarrollo en Ejes Estratégicos de la Provincia de Buenos Aires): Estudio del efecto de microorganismos promotores de crecimiento (*Glomus* spp. y *Azospirillum* spp) sobre semillas y vitroplantas de *Cannabis sativa* L. Directora: Maria Elena Olivera

INVESTIGACIONES FUTURAS

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo se sugieren algunas líneas de investigación que permitirán profundizar en el conocimiento de la interacción entre *Cannabis sativa* L. y los microorganismos PGPR, *Azospirillum argentinense*, *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus subtilis*.

- Realizar estas evaluaciones en distintos cultivares de *C. sativa*
- Evaluaciones en condiciones de estrés abiótico para corroborar si los beneficios de las PGPR se manifiestan con mayor intensidad en situaciones de estrés. Por ello, se propone realizar ensayos en condiciones de estrés salino, hídrico o nutricional
- Estudiar la colonización rizosférica distinguiendo patrones de distribución espacial en el sistema radicular con técnicas de muestreo por zonas (zona de elongación, pelos radiculares, zonas de emergencia de raíces laterales) y metodologías que permitan cuantificar con precisión la colonización de cada cepa.
- Estudios de interacciones microbianas y efecto de prioridad: La recuperación de los PGPR en presencia de endófitos nativos de la semilla sugiere compatibilidad, pero se desconoce si existe sinergia o competencia. Futuras investigaciones podrían analizar la dinámica de colonización y el efecto de prioridad, para entender cómo los PGPR aplicados modifican el microbioma nativo de la rizósfera.
- Evaluación del efecto a la inoculación con PGPR sobre compuestos bioactivos de *C. sativa*: Dado que se observaron cambios en la arquitectura foliar (mayor número de hojas por ramificación y hojas sin expandir) en los tratamientos con PGPR, sería relevante investigar si

estas modificaciones estructurales se traducen en alteraciones en la concentración y perfil de cannabinoides y terpenos, especialmente en la etapa reproductiva, que es la de mayor interés comercial.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Alagawadi, A. R., & Gaur, A. C. (1992). Inoculation of *Azospirillum brasilense* and phosphate-solubilizing bacteria on yield of sorghum [Sorghum bicolor (L.) Moench] in dry land. Tropical Agriculture, 69(4), 347-350.

Argentina. (2017). Ley N.º 27.350 de investigación médica y científica del uso medicinal de la planta de cannabis y sus derivados. Boletín Oficial de la República Argentina.

Argentina. (2022). Ley N.º 27.669. Marco regulatorio para el desarrollo de la industria del cannabis medicinal y del cáñamo industrial. Boletín Oficial de la República Argentina

Ansari, F. A., & Ahmad, I. (2019). Fluorescent Pseudomonas -FAP2 and Bacillus licheniformis interact positively in biofilm mode enhancing plant growth and photosynthetic attributes. *Scientific Reports*, *9*(1), 4547. https://doi.org/10.1038/s41598-019-40864-4

Aunkam, P., Sibponkrung, S., Limkul, S., Seabkongseng, T., Mahanil, K., Umnajkitikorn, K., Boonkerd, N., Teaumroong, N., Sato, S., Tittabutr, P., & Boonchuen, P. (2024). Mechanisms of Cannabis Growth Promotion by Bacillus velezensis S141. *Plants*, *13*(21), 2971. https://doi.org/10.3390/plants13212971

Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., Subramanian, S., & Smith, D. L. (2018). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, Mechanisms of Action, and Roadmap to Commercialization of Biostimulants for Sustainable Agriculture. *Frontiers in Plant Science*, *9*, 1473. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01473

Baldani, J. I., Reis, V. M., Videira, S. S., Boddey, L. H., & Baldani, V. L. D. (2014). The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: A practical guide for microbiologists. *Plant and Soil*, *384*(1-2), 413-431. https://doi.org/10.1007/s11104-014-2186-6

Belimov, A. A., Kojemiakov, A. P., & Chuvarliyeva, C. V. (1995). Interaction between barley and mixed cultures of nitrogen fixing and phosphate-solubilizing bacteria. *Plant and Soil*, *173*(1), 29-37. https://doi.org/10.1007/BF00155515

Benintende, S., Perticari, A., Rossi, A., & Toresani, S. (Eds.). (2025). Manual de procedimientos microbiológicos para la evaluación de calidad de inoculantes, bioestimulantes y biocontroladores. Asociación Argentina de Microbiología. https://www.aam.org.ar/publicaciones/libros/923

Berg, G., Grube, M., Schloter, M., & Smalla, K. (2014). Unraveling the plant microbiome: Looking back and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, *5*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00148

Berlanga-Clavero, M. V., Molina-Santiago, C., Caraballo-Rodríguez, A. M., Petras, D., Díaz-Martínez, L., Pérez-García, A., De Vicente, A., Carrión, V. J., Dorrestein, P. C., & Romero, D. (2022). Bacillus subtilis biofilm matrix components target seed oil bodies to promote growth and anti-fungal resistance in melon. *Nature Microbiology*, *7*(7), 1001-1015. https://doi.org/10.1038/s41564-022-01134-8

Bewley, J. D., & Black, M. (1994). *Seeds: Physiology of Development and Germination*. Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1002-8

Brzezinski, C. R., Abati, J., Henning, F. A., Henning, A. A., França Neto, J. D. B., Krzyzanowski, F. C., & Zucareli, C. (2017). Spray volumes in the industrial treatment on the physiological quality of soybean seeds with different levels of vigor. *Journal of Seed Science*, *39*(2), 174-181. https://doi.org/10.1590/2317-1545v39n2175179

Cáceres, E. A. R. (1982). Improved Medium for Isolation of *Azospirillum* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, *44*(4), 990-991. https://doi.org/10.1128/aem.44.4.990-991.1982

Caplan, D., Dixon, M., & Zheng, Y. (2017). Optimal Rate of Organic Fertilizer during the Flowering Stage for Cannabis Grown in Two Coir-based Substrates. *HortScience*, *52*(12), 1796-1803. https://doi.org/10.21273/HORTSCI12401-17

Cassán, F., Perrig, D., Sgroy, V., Masciarelli, O., Penna, C., & Luna, V. (2009). Azospirillum brasilense Az39 and Bradyrhizobium japonicum E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (Zea mays L.) and soybean (Glycine max L.). *European Journal of Soil Biology*, *45*(1), 28-35. https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2008.08.005

Comeau, D., Balthazar, C., Novinscak, A., Bouhamdani, N., Joly, D. L., & Filion, M. (2021). Interactions Between Bacillus Spp., Pseudomonas Spp. And Cannabis sativa Promote Plant Growth. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 715758. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.715758

Compant, S., Clément, C., & Sessitsch, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, *42*(5), 669-678. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.024

Corredor-Perilla, I. C., Cuervo Andrade, J. L., Olejar, K. J., & Park, S.-H. (2023). Beneficial properties of soil bacteria from Cannabis sativa L.: Seed germination, phosphorus solubilization and mycelial growth inhibition of Fusarium sp. *Rhizosphere*, *27*, 100780. https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2023.100780

Di Salvo, L. P., & García De Salamone, I. E. (2019). Veil-like pellicle development by Azospirillum brasilense in semisolid NFb medium. *Revista Argentina de Microbiología*, *51*(2), 184-185. https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.04.002

Di Salvo, L. P., García, J. E., Puente, M. L., Amigo, J., Anríquez, A., Barlocco, C., Benintende, S., Bochatay, T., Bortolato, M., Cassán, F., Castaño, C., Catafesta, M., Coniglio, A., Díaz, M., Galián, L. R., Gallace, E., García, P., García De Salamone, I. E., Landa, M., … Vallejo, D. (2022). The drop plate method as an alternative for Azospirillum spp. Viable cell enumeration within the consensus protocol of the REDCAI network. *Revista Argentina de Microbiología*, *54*(2), 152-157. https://doi.org/10.1016/j.ram.2021.05.002

Döbereiner, J., Baldani, V.L., & Reis, V.M. (1995). Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crops. In Azospirillum VI and related microorganisms: genetics-physiology-ecology (pp. 3-14). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Don, R., & Ducournau, S. (Eds.). (2018). *ISTA handbook on seedling evaluation* (4th ed.). International Seed Testing Association (ISTA).

Dumigan, C. R., & Deyholos, M. K. (2024). Soil and seed both influence bacterial diversity in the microbiome of the Cannabis sativa seedling endosphere. *Frontiers in Plant Science*, *15*, 1326294. https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1326294

Egamberdieva, D., & Kucharova, Z. (2009). Selection for root colonising bacteria stimulating wheat growth in saline soils. *Biology and Fertility of Soils*, *45*(6), 563-571. https://doi.org/10.1007/s00374-009-0366-y

El-Komy, H. M. A. (2005). *Coimmobilization of Azospirillum lipoferum and Bacillus megaterium for Successful Phosphorus and Nitrogen Nutrition of Wheat Plants*.

García Bernado, R., & Rodríguez, N. (2024). El otro blanqueo: el impacto del cannabis en Argentina y cómo regularlo. Informe sectorial para CAINCCA. Buenos Aires, Argentina: Observatorio de Cannabis UNPAZ.

Gholami, A., Shahsavani, S., & Nezarat, S. (2009). *The Effect of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) on Germination, Seedling Growth and Yield of Maize*. *3*(1).

Głodowska, M., Husk, B., Schwinghamer, T., & Smith, D. (2016). Biochar is a growth-promoting alternative to peat moss for the inoculation of corn with a pseudomonad. *Agronomy for Sustainable Development*, *36*(1), 21. https://doi.org/10.1007/s13593-016-0356-z

Hesami, M. (2024). *Morphological and Genetic Dynamics in Cannabis sativa L.: Transcriptomic Insights into Leaf Morphogenesis, Phase Transition, and Somatic Embryogenesis*.

International Seed Testing Association. (2025). International rules for seed testing.

Kang, S.-M., Radhakrishnan, R., Lee, K.-E., You, Y.-H., Ko, J.-H., Kim, J.-H., & Lee, I.-J. (2015). Mechanism of plant growth promotion elicited by *Bacillus* sp. LKE15 in oriental melon. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science*, *65*(7), 637-647. https://doi.org/10.1080/09064710.2015.1040830

Kim, E.-S., Han, J.-H., Olejar, K. J., & Park, S.-H. (2023). Degeneration of oil bodies by rough endoplasmic reticulum (rER)-associated protein during seed germination in *Cannabis sativa* L. *AoB PLANTS*, *15*(6), plad082. https://doi.org/10.1093/aobpla/plad082

Laanaya, J., Msairi, S., Touhami, A. O., & Douira, A. (2025). Unlocking the potential of *Cannabis sativa* L. – interactions with microorganisms for growth, protection, and cannabinoid production: A review. *Ecological Engineering & Environmental Technology*, *26*(9), 364-375. https://doi.org/10.12912/27197050/209642

Li, Y.-J., & Hu, Q.-P. (2020). Studying of the promotion mechanism of Bacillus subtilis QM3 on wheat seed germination based on β-amylase. *Open Life Sciences*, *15*(1), 553-560. https://doi.org/10.1515/biol-2020-0062

Logan, N. A., & Vos, P. D. (2015). *Bacillus*. En M. E. Trujillo, S. Dedysh, P. DeVos, B. Hedlund, P. Kämpfer, F. A. Rainey, & W. B. Whitman (Eds.), *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (1.ª ed., pp. 1-163). Wiley. https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00530

Lyu, D., Backer, R., Berrué, F., Martinez-Farina, C., Hui, J. P. M., & Smith, D. L. (2023). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) with Microbial Growth Broth Improve Biomass and Secondary Metabolite Accumulation of *Cannabis sativa* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *71*(19), 7268-7277. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c06961

Lyu, D., Backer, R., Robinson, W. G., & Smith, D. L. (2019). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria for Cannabis Production: Yield, Cannabinoid Profile and Disease Resistance. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 1761. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01761

Lyu, D., Backer, R., & Smith, D. L. (2022). Three plant growth-promoting rhizobacteria alter morphological development, physiology, and flower yield of *Cannabis sativa* L. *Industrial Crops and Products*, *178*, 114583. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114583

Miljaković, D., Marinković, J., Tamindžić, G., Đorđević, V., Tintor, B., Milošević, D., Ignjatov, M., & Nikolić, Z. (2022). Bio-Priming of Soybean with Bradyrhizobium japonicum and Bacillus megaterium: Strategy to Improve Seed Germination and the Initial Seedling Growth. *Plants*, *11*(15), 1927. https://doi.org/10.3390/plants11151927

Mishchenko, S., Mokher, J., Laiko, I., Burbulis, N., Kyrychenko, H., & Dudukova, S. (2017). Phenological growth stages of hemp (Cannabis sativa L.): Codification and description according to the BBCH scale. *Žemės Ūkio Mokslai*, *24*(2). https://doi.org/10.6001/zemesukiomokslai.v24i2.3496

Muleta, D., Assefa, F., Hjort, K., Roos, S., & Granhall, U. (2009). Characterization of Rhizobacteria Isolated from Wild *Coffea arabica* L. *Engineering in Life Sciences*, *9*(2), 100-108. https://doi.org/10.1002/elsc.200700031

Nandal, M., & Hooda, R. (2013). Plant growth promoting rhizobacteria: A review article. International Journal of Current Research, 5(12), 3863-3871.

Navure Software. (2026). *Navure* (Versión 5.0.2) [Software]. https://www.navure.com/

Olivera, M. E. (2013). *VOLUME OF LIQUID IN COATING AND ENCRUSTING TALL FESCUE SEEDS (Festuca arundinacea Schreb.).*

Omer, A. M., Osman, M. S., & Badawy, A. A. (2022). Inoculation with Azospirillum brasilense and/or Pseudomonas geniculata reinforces flax (Linum usitatissimum) growth by improving

physiological activities under saline soil conditions. *Botanical Studies*, *63*(1), 15. https://doi.org/10.1186/s40529-022-00345-w

Ortíz-Castro, R., Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., & López-Bucio, J. (2009). The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signaling & Behavior*, *4*(8), 701-712. https://doi.org/10.4161/psb.4.8.9047

Pagnani, G., Pellegrini, M., Galieni, A., D'Egidio, S., Matteucci, F., Ricci, A., Stagnari, F., Sergi, M., Lo Sterzo, C., Pisante, M., & Del Gallo, M. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in Cannabis sativa 'Finola' cultivation: An alternative fertilization strategy to improve plant growth and quality characteristics. *Industrial Crops and Products*, *123*, 75-83. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.06.033

Palleroni, N. J. (2005). Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894. En D. J. Brenner, N. R. Krieg, & J. T. Staley (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Vol. 2, *The Proteobacteria, Part B, The Gammaproteobacteria*, pp. 323-379). Springer.

Pedraza, R. O., Filippone, M. P., Fontana, C., Salazar, S. M., Ramírez-Mata, A., Sierra-Cacho, D., & Baca, B. E. (2020). Azospirillum. En *Beneficial Microbes in Agro-Ecology* (pp. 73-105). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00006-X

Peretti A. 1994. Manual para analisis de semillas. 1a.ed. Buenos Aires; Hemisferio Sur.

Podile, A. R., & Kishore, G. K. (2007). Plant growth-promoting rhizobacteria. In S. S. Gnanamanickam (Ed.), Plant-associated bacteria (pp. 195–230). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4538-7_6

Powers, M. J., Sanabria-Valentín, E., Bowers, A. A., & Shank, E. A. (2015). Inhibition of Cell Differentiation in Bacillus subtilis by Pseudomonas protegens. *Journal of Bacteriology*, *197*(13), 2129-2138. https://doi.org/10.1128/JB.02535-14

Qessaoui, R., Bouharroud, R., Furze, J. N., El Aalaoui, M., Akroud, H., Amarraque, A., Vaerenbergh, J. V., Tahzima, R., Mayad, E. H., & Chebli, B. (2019). Applications of New Rhizobacteria Pseudomonas Isolates in Agroecology via Fundamental Processes Complementing Plant Growth. *Scientific Reports*, *9*(1), 12832. https://doi.org/10.1038/s41598-019-49216-8

Ramesh, A., Sharma, S. K., Sharma, M. P., Yadav, N., & Joshi, O. P. (2014). Inoculation of zinc solubilizing Bacillus aryabhattai strains for improved growth, mobilization and biofortification of zinc in soybean and wheat cultivated in Vertisols of central India. *Applied Soil Ecology*, *73*, 87-96. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.08.009

Ren, D., Madsen, J. S., Sørensen, S. J., & Burmølle, M. (2015). High prevalence of biofilm synergy among bacterial soil isolates in cocultures indicates bacterial interspecific cooperation. *The ISME Journal*, *9*(1), 81-89. https://doi.org/10.1038/ismej.2014.96

Saeed, F. H., Alwan, U. A., Zamil, Q. M., & Suhail, A. A.-R. (2016). Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on growth and yield components of tomato (Lycopersicon esculentum). European Academic Research, 4(6), 1-8.

Shank, E. A., Klepac-Ceraj, V., Collado-Torres, L., Powers, G. E., Losick, R., & Kolter, R. (2011). Interspecies interactions that result in *Bacillus subtilis* forming biofilms are mediated mainly by members of its own genus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(48). https://doi.org/10.1073/pnas.1103630108

Singh, P., Singh, R. K., Zhou, Y., Wang, J., Jiang, Y., Shen, N., Wang, Y., Yang, L., & Jiang, M. (2022). Unlocking the strength of plant growth promoting *Pseudomonas* in improving crop productivity in normal and challenging environments: A review. *Journal of Plant Interactions*, *17*(1), 220-238. https://doi.org/10.1080/17429145.2022.2029963

Tanney, C. A. S., Lyu, D., Schwinghamer, T., Geitmann, A., Ruan, E. D., & Smith, D. L. (2023). Sub-optimal nutrient regime coupled with Bacillus and Pseudomonas sp. Inoculation influences trichome density and cannabinoid profiles in drug-type Cannabis sativa. *Frontiers in Plant Science*, *14*, 1131346. https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1131346

Tipparat, P., Natakankitkul, S., Chamnivikaipong, P., & Chutiwat, S. (2012). Characteristics of cannabinoids composition of Cannabis plants grown in Northern Thailand and its forensic application. *Forensic Science International*, *215*(1-3), 164-170. https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.05.006

Toju, H., Peay, K. G., Yamamichi, M., Narisawa, K., Hiruma, K., Naito, K., Fukuda, S., Ushio, M., Nakaoka, S., Onoda, Y., Yoshida, K., Schlaeppi, K., Bai, Y., Sugiura, R., Ichihashi, Y., Minamisawa, K., & Kiers, E. T. (2018). Core microbiomes for sustainable agroecosystems. *Nature Plants*, *4*(5), 247-257. https://doi.org/10.1038/s41477-018-0139-4

Tsotetsi, T., Nephali, L., Malebe, M., & Tugizimana, F. (2022). Bacillus for Plant Growth Promotion and Stress Resilience: What Have We Learned? *Plants*, *11*(19), 2482. https://doi.org/10.3390/plants11192482

Van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M., & Pieterse, C. M. J. (1998). SYSTEMIC RESISTANCE INDUCED BY RHIZOSPHERE BACTERIA. *Annual Review of Phytopathology*, *36*(1), 453-483. https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.36.1.453

Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S., & Nasrulhaq Boyce, A. (2016). Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability—A Review. *Molecules*, *21*(5), 573. https://doi.org/10.3390/molecules21050573

Wei, Z., Gu, Y., Friman, V.-P., Kowalchuk, G. A., Xu, Y., Shen, Q., & Jousset, A. (2019). Initial soil microbiome composition and functioning predetermine future plant health. *Science Advances*, *5*(9), eaaw0759. https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw0759

Zhang, D., Qiang, R., Zhou, Z., Pan, Y., Yu, S., Yuan, W., Cheng, J., Wang, J., Zhao, D., Zhu, J., & Yang, Z. (2022). Biocontrol and Action Mechanism of Bacillus subtilis Lipopeptides' Fengycins Against Alternaria solani in Potato as Assessed by a Transcriptome Analysis. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 861113. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.861113

Zhao, T., Deng, X., Xiao, Q., Han, Y., Zhu, S., & Chen, J. (2020). IAA priming improves the germination and seedling growth in cotton (Gossypium hirsutum L.) via regulating the endogenous phytohormones and enhancing the sucrose metabolism. *Industrial Crops and Products*, *155*, 112788. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112788

ANEXOS

ANEXO I

Tabla A I. Recuento de microorganismos viables (UFC/semilla) recuperados de semillas de *Cannabis sativa* L. a las 20 horas posteriores a la inoculación con *Azospirillum argentinense* (AZO), *Bacillus subtilis* (BAC) y *Pseudomonas fluorescens* (PSE).

Tratamientos	UFC/semilla
AZO	$8{,}3\times 10^{2}$
PSE	$4{,}3 \times 10^{2}$
BAC	$1{,}6 \times 10^{4}$

Tabla A II. Recuento de microorganismos viables (UFC/ml) de los inoculantes comerciales.

Inoculante comercial	UFC/ml
Azospirillum argentinense	$1x10^{8}$
Bacillus subtilis	$2{,}2x10^{8}$
Pseudomonas fluorescens	$3x10^{8}$