

## CAPITULO 7

### Mitigación del estrés abiótico en *Digitaria eriantha* Steudel cvs. Sudafricana y Mejorada INTA por asociación con *Azospirillum brasilense* cepas Az39 e ipdC.

Romina OSSES, Oscar MASCIARELLI, Mariela QUIROGA, Hilda PEDRANZANI

#### Resumen

*Digitariaeriantha* Steudel es una especie forrajera adaptada a áreas de pastoreo, pero con sensibilidad a bajas temperaturas, estrés hídrico y salinidad. Las poblaciones bacterianas promotoras de crecimiento vegetal PGPR (Plantgrowth-promotingrhizobacteria) poseen la capacidad de colonizar el sistema radicular de plantas y mitigar los estreses. El objetivo del presente trabajo es estudiar el comportamiento de dos cultivares de *D. eriantha* cv. Sudafricana y Mejorada INTA, en asociación con *A. brasilense* cepa Az39 y *A. brasilense* cepa ipdC frente a diferentes estreses abióticos. Se sembraron semillas inoculadas y sin inocular en maceta y se colocaron en cámara 23:21°C (día: noche) con un fotoperiodo 16:8 (día: noche) con una densidad de flujo de fotones de 300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Cuando las plantas tuvieron diez cm de alto, se sometieron a los diferentes tipos de estrés (frío, sequía y salinidad). Finalizados los tratamientos de estrés, se midieron diferentes bioparámetros de crecimiento. Los dos cultivares de *D. eriantha* hicieron asociaciones con ambas bacterias, y la mejor respuesta se obtuvo con la cepa hipoproductora *A. brasilense* cepa ipdC con el cv. Mejorada INTA, donde se vieron incrementados todos los parámetros medidos, expresando esta asociatividad la habilidad de mitigar todos los estreses.

**Palabras clave** biomasa, crecimiento, mitigación del estrés, PGPR, simbiosis.

#### Abstract

*Digitariaeriantha* Steudel is a forage species adapted to grazing areas but sensitive to low temperatures, water stress and salinity. The promoter's bacterial populations of plant growth PGPR (Plant growth-promoting rhizobacteria) have the ability to colonize the root system of plants and mitigate stresses. The aim of this work is to study the behavior of two cultivars of *D. eriantha* cv. Sudafricana and Mejorada INTA, in association with *Azospirilumbrasilense*, strain Az39 and ipdC (hyper production and low production producer of auxins, respectively) and their behavior in different abiotic stresses. Inoculated and uninoculated seeds were planted in pots and placed in chamber C 23:21 (day: night) with a photoperiod 16:8 (day: night) with a photon flux density of 300  $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . When the plants were ten cm high they were subjected to different types of stress (cold, drought and salinity). Finalized stress treatments, growth parameters were measured. The two cultivars of *D. eriantha*, made association with both bacteria and the best combination was obtained with the strain *A. brasilense* strain ipdC with cv. Mejorada INTA, in which all measured parameters were increased expressing in this associativity the ability to mitigate all types of stresses that were studied.

**Key words**, biomass, growth, mitigation of stress, PGPR, symbiosis.

## INTRODUCCIÓN

La rizósfera es la zona localizada entre las raíces de la planta y el suelo que la rodea (Dijkstra *et al.*, 2014), la cual está conformada por tres áreas, que son la ectorizósfera, rizoplano y endorizósfera (Johansson *et al.*, 2004). La rizósfera es el ecosistema con mayor diversidad microbiana del suelo (Rovira y Davey, 1974; Lynch y Whipps, 1991). Los microorganismos presentes en la rizósfera intervienen en los ciclos de los nutrientes del sistema suelo-planta (Singh y Mukerji, 2006). Las poblaciones bacterianas de este microambiente se ven influenciadas principalmente por los compuestos orgánicos que segrega la planta como los ácidos orgánicos, aminoácidos, azúcares, ácidos fenólicos, flavonoides, enzimas, etc., así como por la disponibilidad de nutrientes, pH y textura del suelo (Stafford *et al.*, 2005; Singh y Mukerji, 2006; Raaijmakers *et al.*, 2009). Los microorganismos asociados a la raíz establecen sinergismos con las plantas de dos maneras principales: las que forman una relación simbiótica (*Rhizobium*-Leguminosas) y las de vida libre, las cuales se pueden encontrar en el suelo, sobre o dentro de los tejidos de la planta (Kloepper *et al.*, 1988a; Frommel *et al.*, 1991). Las bacterias de vida libre que promueven el desarrollo de la planta e incluso que actúan como control biológico de fitopatógenos, son usualmente conocidas como rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR de las siglas en inglés PlantGrowth-PromotingRhizobacteria) (Glick, 1995; Kloepper *et al.*, 1989; Bashan y Holguin, 1998). La escasez mundial de recursos hídricos en conjunto con la salinización del suelo, se vuelven factores abióticos que limitan el desarrollo de las plantas, se estima que un 50% de las tierras cultivables estarán afectadas por estos tipos de estrés para el 2050. Por lo anterior, los microorganismos juegan un papel muy importante en el ámbito agrícola al ser una alternativa importante para poder disminuir los efectos nocivos de estrés abiótico (sequía, altas y bajas temperaturas, salinidad, toxicidad por metales, etc.) en la producción de los cultivos (Milošević *et al.*, 2012).

La promoción de crecimiento en plantas producido por las PGPR puede ser multifactorial; como la solubilización de fosfatos, producción de sideróforos, fijación biológica de nitrógeno, producción de la enzima 1-Aminociclopropano- 1-ácido carboxílico (ACC) desaminasa, producción y regulación de fitohormonas, actividad de biocontrol, producción de componentes orgánicos volátiles (VOC's), activación de la resistencia sistémica inducida (ISR), etc. (Bhattacharyya y Jha, 2012). Las PGPR se pueden adaptar a diversas condiciones ambientales y además tienen la capacidad de ayudar a mitigar condiciones de estrés en plantas. En condiciones de sequía y/o salinidad el efecto de protección de las PGPR consiste en reducir la producción de etileno, incrementar las concentraciones de fitohormonas como el ácido abscísico y las auxinas, dar protección contra las especies reactivas de oxígeno (ROS), producir solutos

compatibles, solubilizar fosfatos, producir exopolisacáridos y controlar a los fitopatógenos. La presente revisión muestra un panorama general de los mecanismos empleados por las PGPR como respuesta a diversos tipos de estrés abióticos y cuál es su efecto protector sobre las plantas como un potencial de uso como biofertilizantes.

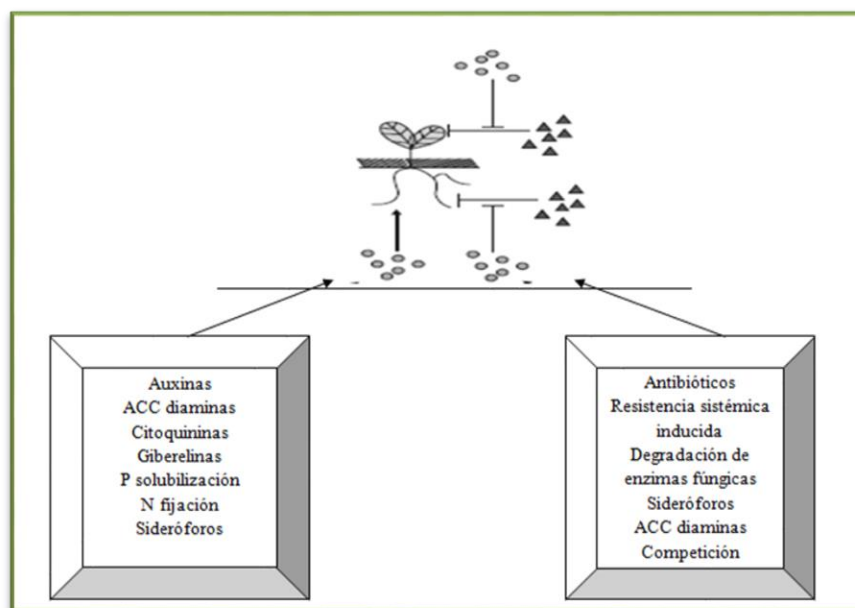
### **Regulación de hormonas**

Las plantas están expuestas a diversos factores ambientales adversos, por lo que han desarrollado mecanismos de adaptación complejos (Yang *et al.*, 2013), liberando compuestos químicos como las hormonas (Alazem y Lin, 2015). Las hormonas de las plantas se pueden clasificar de acuerdo a su estructura y actividad fisiológica en; auxinas (AUX), ácido abscísico (ABA), citoquininas (CTK), giberelinas (GA), etileno (ET), ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) y brasinosteroides (BR). Estas hormonas desempeñan diversas funciones en la planta, como controlar y coordinar la división, el crecimiento y la diferenciación de las células (Miransari y Smith, 2014); y en diferentes etapas del ciclo de vida de la planta; la germinación, el desarrollo de órganos, crecimiento del tallo, así como la habilidad para responder a estímulos de estrés como el daño por insectos, patógenos, sequía y baja disponibilidad de nutrientes.

Muchas veces actúan individualmente, aunque también en conjunto; como en el caso de sequía o de estrés salino; cuando el ET acelera la senescencia de las hojas individualmente, pero en conjunto con el ABA son moléculas señalizadoras de estrés abiótico (Hassine y Lutts, 2010); en la absorción de nutrientes como el azufre (S), al transformar las formas no disponibles a disponibles intervienen las hormonas CTK y AUX, aunque también se ha mencionado que el ABA y el JA están involucrados (Honsel *et al.*, 2012). ABA y GA tienen actividad en conjunto para la regulación de la  $\alpha$  amilasa, compuesto necesario en la germinación de la semilla (Kondhare *et al.*, 2014). Y en la regulación de la respuesta contra fitopatógenos las hormonas involucradas son el SA, JA, ET y ABA (Alazem y Lin, 2015). Otra estrategia utilizada por las plantas para hacer frente a los daños causados por factores bióticos y abióticos, es la asociación con bacterias rizosféricas que pueden activar señales químicas que modifican la concentración de las hormonas vegetales (Bent *et al.*, 2001); por ejemplo el incremento en la concentración de ET, que tiene efectos positivos en la estimulación de raíces adventicias y otros no tan deseados como la disminución del crecimiento de la raíz (Saravanakumar y Samiyappan, 2007). La disminución en la concentración de ET, origina que la planta tenga mayor resistencia al estrés abiótico y la inoculación con PGPR que producen la enzima desaminasa del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC desaminasa) cuya función es desviar la ruta biosintética del etileno y de esta manera favorece el crecimiento y desarrollo vegetal, principalmente en plantas sensibles al ET (Penrose y Glick, 2003; Esquivel *et al.*, 2013). Las PGPR pueden promover el crecimiento de la planta hospedera por medio de las auxinas con la síntesis del ácido indolacético (IAA) mediante una ruta

alternativa que depende del triptófano proveniente de los exudados de la raíz aumentando su concentración en la rizósfera (Ali y Hasnain, 2007). Las concentraciones altas de IAA inducen el desarrollo de raíces adventicias y, por el contrario, a bajas concentraciones de IAA la elongación de la raíz principal se incrementa (Patten y Glick, 2002).

En las últimas décadas se han realizado algunos estudios que comprueban que ciertas PGPR le proporcionan a la planta un grado de tolerancia a diferentes tipos de estrés abiótico (sequía, salinidad, metales pesados, etc.). Algunos géneros de estas bacterias incluyen son: *Rhizobium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Paenibacillus*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Azospirillum*, *Microbacterium*, *Methylobacterium*, *Variovorax*, *Enterobacter*, etc. (Grover *et al.*, 2011) (Fig. 7.1)



**Fig. 7.1:** Facilitación del crecimiento de las plantas por bacterias promotoras del crecimiento (PGPR) (Grover *et al.*, 2011)

### Sequía.

Las PGPR son capaces de mitigar el estrés en plantas causado por sequías mediante diversos mecanismos. A) Ácido Abscísico y Citoquininas. Actualmente se sabe que la sequía afecta el balance hormonal incrementando el contenido de ABA en parte aérea y a su vez reduce los niveles de citoquininas endógenas, lo anterior activa el mecanismo de cierre de estomas, como respuesta a la sequía evitando la pérdida de agua (Yang *et al.*, 2009). El antagonismo entre citoquininas y ABA puede ser el resultado de interacciones metabólicas: las citoquininas comparten un origen biosintético común con ABA, creando claramente el potencial para el antagonismo en la formación de estos dos compuestos (Cowan *et al.*, 1999). Un alto contenido de citoquininas puede anular los efectos de ABA en la funcionalidad de los estomas bajo condiciones de estrés; por lo

tanto, una reducción en el suministro de esta hormona podría amplificar la respuesta y disparar a un contenido cada vez mayor de ABA (Davies y Zhang, 1991). Existen pocos reportes que ligan las PGPR en la respuesta ABA-CTK, *Paenibacillus polymyxa* se reportó como una PGPR que incrementa los niveles de CTK y a su vez reduce los niveles de ABA bajo condiciones de estrés abiótico (Timmusk y Wagner, 1999). B)

#### **Producción de antioxidantes.**

El estrés salino da lugar a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales afectan a las células de la planta, causando daño oxidativo en la membrana de lípidos, proteínas o DNA, sin embargo, Mitigación del estrés abiótico mediante PGPR 7 hay enzimas que se encargan de evitar dichos daños, por ejemplo, la superóxidodismutasa (SOD), catalasa (CAT) y ascorbatoperoxidasa (POX) y antioxidante no enzimático tal como ascorbato, glutatión y tocoferol. Las PGPR usan mecanismos similares para neutralizar el estrés oxidativo que es causado por ROS, a través de la inducción de enzimas antioxidantes tales como ascorbatoperoxidasa y superóxidodismutasa (Kohler *et al.*, 2009 a, b; Jha y Subramanian, 2014).

#### **Inhibición de la síntesis de etileno.**

El etileno es una hormona gaseosa que desempeña múltiples funciones en la regulación del crecimiento y desarrollo de la planta, también sirve como modulador clave entre la respuesta de la planta al estrés ambiental y crecimiento normal. Dicho estrés se puede contrarrestar mediante la degradación del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) mediante la enzima ACC desaminasa, ayudando a disminuir el estrés y por lo tanto promoviendo el crecimiento normal de la planta (Glick *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2009). En la ruta biosintética del etileno, la S-adenosilmetionina (SAM) es convertida por la enzima ACC sintasa a ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), el precursor inmediato del etileno. En presencia de ACC-desaminasa producida por la bacteria, el ACC de la planta es secuestrado y degradado por células bacterianas, la remoción de éste provoca que se disminuyan los efectos perjudiciales del etileno (Glick, *et al.*, 2007). La función de la enzima ACC desaminasa es convertir el ACC en  $\alpha$ -acetobutirato y amonio. Lo anterior trae dos ventajas en las plantas: disminuye el etileno por la degradación del precursor inmediato, pero además incrementa la disponibilidad de amonio en la rizósfera. Recientes estudios han mostrado que las PGPR que contienen ACC desaminasa inducen la producción de raíces más largas, ayudando a una mayor absorción de agua (Saleem *et al.*, 2007; Zahir *et al.*, 2008; Esquivel-Cote *et al.*, 2013).

#### **Salinidad.**

La salinidad de los suelos se ha convertido en uno de los principales problemas en el mundo, que afecta aproximadamente a 400 millones de hectáreas de cultivos de interés

económico (Bot *et al.*, 2000; FAO, 2002), interfiriendo en la germinación, crecimiento y el rendimiento de cultivos (Khan y Panda, 2008). Entre los efectos negativos de la salinidad se encuentran el incremento en la producción de etileno, plasmólisis (pérdida del líquido constituyente de las células, en condiciones hipertónicas), toxicidad de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>, incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y afectación de la fotosíntesis (Sairam y Tyagi, 2004; Gamalero *et al.*, 2009). Las PGPR usan diferentes mecanismos para contrarrestar el estrés salino, entre los que destacan A) Osmorregulación y acumulación de prolina. La prolina es un aminoácido que se encarga de proteger las membranas y proteínas contra efectos de iones inorgánicos, y su acumulación reduce el potencial redox en las células bajo ambientes salinos (Jain *et al.*, 2001; Wahid y Close, 2007). Además de llevar a cabo un importante papel en el mantenimiento de la homeostasis y funcionamiento de estructuras fotosintéticas, para combatir el impacto de la salinidad en plantas. Algunos iones como el sodio (Na<sup>+</sup>) y el cloro (Cl<sup>-</sup>) ayudan a la adaptación de la planta a la salinidad, contribuyendo al ajuste osmótico de las vacuolas, los exopolisacáridos también ayudan a aminorar el estrés ocasionado por la salinidad, evitando que el Na<sup>+</sup> esté disponible para la planta (Bano y Fatima, 2009).

#### **Transporte restringido de Na<sup>+</sup>.**

Se ha mostrado por análisis transcripcional que aproximadamente 600 genes de *Arabidopsis thaliana* modifican su expresión en presencia de salinidad, tal es el caso del Transportador de K<sup>+</sup> de Alta Afinidad 1 (HKT1, por sus siglas en inglés) encargado del ajuste de los niveles de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>. La expresión del gen HKT1 se disminuye reduciendo a su vez el ingreso de Na<sup>+</sup> a través de la raíz. El análisis transcripcional ha mostrado que los compuestos orgánicos volátiles (VOC's) que producen algunos microorganismos benéficos como las PGPR (Yang *et al.*, 2009), tal como 2,3 butaneidol (Xiao-Min y Huiming, 2015), disminuyen la expresión de HKT1 en la raíz, pero la aumentan en la parte aérea, manteniendo de este modo el balance en los niveles de Na<sup>+</sup> en toda la planta (Yang *et al.*, 2009).

#### **Solubilización de fosfatos.**

El fósforo es uno de los elementos más importantes para la planta ya que interviene en una serie de procesos metabólicos como la fotosíntesis, la respiración, y la síntesis del almidón, pero especialmente porque forma parte de los ácidos nucleicos (DNA y RNA), del trifosfato de adenosina (ATP), difosfato de adenosina (ADP) y del monofosfato de adenosina (AMP) (Rodríguez y Flores, 2004). La disponibilidad de fósforo en suelos salinos es limitada, por lo que las PGPR se encargan de solubilizar fosfatos. La solubilización de fosfatos por parte de las bacterias la realizan por

acidificación, quelación, reacción de intercambio iónico y la producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular tal como el ácido glucónico. La solubilización de los fosfatos realizada por las PGPR contribuyen a disminuir los efectos de la salinidad y en consecuencia a mejorar el desarrollo de la planta (Giri *et al.*, 2004; Turner *et al.*, 2006).

### **Síntesis de auxinas.**

La auxina endógena de más abundancia es el ácido indolacético (IAA), que cumple con la mayor parte de las acciones realizadas por las auxinas. Además del IAA sólo se han encontrado otros tres tipos de auxinas en las plantas; el ácido-indol-3- butírico, el ácido 4-cloroíndole-3-acético y el ácido fenil acético (Sauer *et al.*, 2013). Estas hormonas vegetales desempeñan una función relevante en el crecimiento, el desarrollo y la formación de tejidos vasculares en la planta mediante la regulación de la expresión de genes (Abel y Theologis, 1996; Miransari y Smith, 2014). Algunas de las PGPR reportadas con la capacidad de producir AIA son: *Azospirillum*, *Arthrobactersp.*, *Bacilluspumilus*, *Halomonassp.*, *Nitrinicolalacisaponensis*, *Pseudomonas mendocina* entre otras, las cuales pueden aminorar el estrés por salinidad en las plantas (Dodd *et al.*, 2010; Tiwari *et al.*, 2011).

Las poblaciones bacterianas promotoras de crecimiento vegetal PGPR (*Plantgrowth-promotingrhizobacteria*) poseen la capacidad de colonizar el sistema radicular de las plantas o su entorno más cercano. Dentro de las PGPR más referenciadas está *Azospirillum*( $\alpha$ -subclase de las proteobacterias) (Cassán *et al.*, 2009; Bashan *et al.*, 2012). Ésta es una bacteria Gram negativa, de vida libre, fijadora de nitrógeno y asociada a la rizósfera de las plantas. En nuestro país, la práctica de inoculación con *Azospirillumbrasilense* cepa Az39 se ha extendido desde el cultivo de maíz (Fulchieri y Frioni, 1994), trigo (Thuar *et al.*, 2005) a otras especies vegetales, como gramíneas forrajeras (Vella *et al.*, 2005), entre otras. En esta investigación se usaron dos cepas de la bacteria *Azospirillumbrasilense* con el fin de estudiar el comportamiento de los dos cultivares de *D. eriantha* en simbiosis con *A. brasilense* cepa Az39 y *A. brasilense* cepa *ipdC*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material biológico y condiciones de crecimiento del cultivo:

Semillas de *Digitariaerianthacv.* Mejorada INTA y *D. erianthacv.* Sudafricanase sembraron sobre un soporte constituido por una mezcla de suelo y perlita (2:1, v/v) en maceta de 300 cc a razón de 5 g. de semillas en cada uno por cuadruplicado. Las macetas se colocaron en cámara de crecimiento a 23:21 °C (día: noche) con un fotoperíodo 16:8 (día: noche) con una densidad de flujo de fotones de 300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y se dividieron en cuatro grupos: **1)** 23 °C y soporte a capacidad de campo (control); **2)** 4 °C por 72 h.; **3)** regadas con 200 mM de NaCl y **4)** regadas con 100 ml de PEG cada dos días, en tres concentraciones 0,5; 1,0 y 1,5 Mpa (Fig. 7.2)

**Cepas Bacterianas y medios de cultivos:** las cepas de *A. brasilense* utilizadas fueron *A. brasilenseAz39* y la mutante *ipdC*.

**Ensayos de inoculación:** las semillas de *Digitaria* se agruparon en bolsas plásticas, a razón de 50 g por cada grupo para ser inoculadas con 5 ml de cada estirpe bacteriana a razón de  $1 \times 10^7$  ufc/ml previo a la siembra.

**Tratamientos de inoculación para cada grupo de macetas:** se utilizó un tratamiento control medio NFb (medio de cultivo libre de nitrógeno y con malato como fuente de carbono, usado por excelencia para el enriquecimiento de *Azospirillum*), un control negativo (*A. brasilense* cepa *ipdC*) y *A. brasilense* cepa *Az39*.

Cada grupo de macetas fue tratado con el inóculo correspondiente. El sistema de riego utilizado fue por capilaridad, colocando las macetas de cada tratamiento sumergidos en bandejas que contenían un volumen constante de solución nutritiva de Hoagland 25% hasta el inicio del tratamiento del estrés.

### Crecimiento

En las muestras controles (sin bacterias) y tratadas (con bacterias) bajo condiciones normales y de estreses abióticos se evaluaron parámetros de crecimiento como: longitud radicular y foliar, tomándose como muestra un pool de 10 plantas, con tres repeticiones.

### Biomasa

En cada tratamiento de simbiosis y estrés se evaluó PF y PS radicular y foliar, tomándose como muestra un pool de 10 plantas, con tres repeticiones.

### Tratamiento estadístico de los datos

Los datos fueron analizados por el método estadístico INFOSTAT (Universidad Nacional de Córdoba) y los rangos múltiples de DUNCAN. Este test controla errores de tipo I



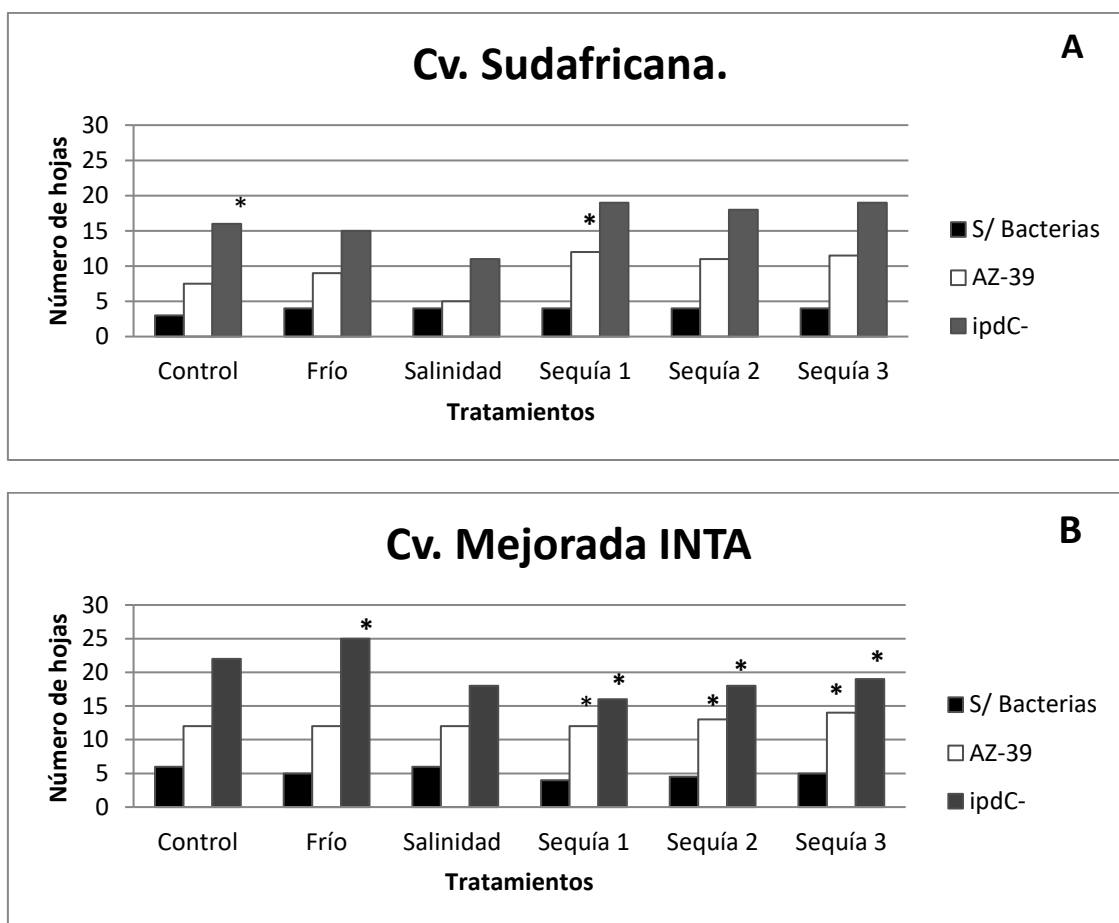
donde  $\alpha=0,05$   $df=16$  y  $MSE=6.208333$ , para un número de medias = 8 y un rango crítico de 4.305 a 4.893.



**Fig. 7.2:** Plantas de *Digitaria eriantha* cv. Sudafricana creciendo en invernáculo

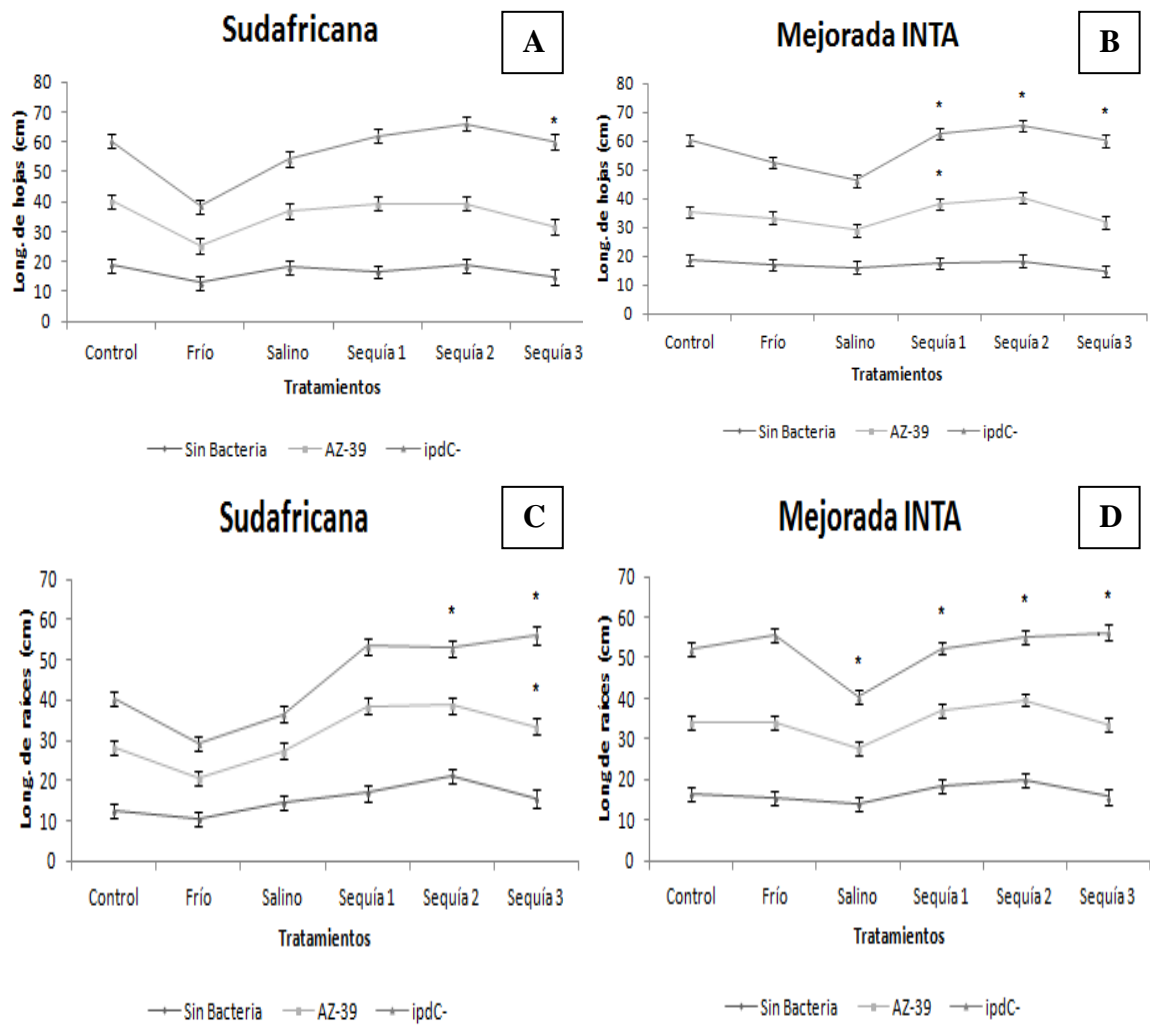
(Foto: Romina Osses)

## RESULTADOS Y DISCUSION



**Fig. 7.3:** Número de hojas de *Digitariaeriantha* cv. Sudafricana y cv. Mejorada INTA sin bacterias e inoculadas con *A. brasilense* cepa Az-39 y *A. brasilense* cepa ipdC<sup>-</sup>, en condiciones de control y estrés por frío (4 °C), salinidad (200 mM) y tres niveles de sequía (1: 0,5 Mpa; 2: 1,0 Mpa; 3: 1,5 Mpa) (Osses *et al.*, 2017)

En *Digitaria eriantha* cv. Sudafricana, se encontraron aumentos significativos en el tratamiento control, inoculado con la cepa ipdC<sup>-</sup> y en el tratamiento de estrés por sequía 0,5 Mpa, en plantas inoculadas con la cepa AZ-39, (Fig. 7.3 A). En el cv. Mejorada INTA, se encontraron aumentos significativos en el número de hojas en el tratamiento control, frío y los tres tratamientos de sequía con la inoculación de la cepa ipdC<sup>-</sup>. La cepa AZ-39 promovió un aumento significativo del número de hojas en condiciones de sequía con 0,5 Mpa, 1,0 y 1,5 Mpa. y la salinidad afectó al crecimiento y ninguna de las dos cepas promovió el aumento del número de hojas. (Fig. 7.3 B).



**Fig. 7.4:** Longitud foliar y radical de *Digitaria ariantha* cv. Sudafricana y cv. Mejorada INTA sin bacterias e inoculadas con *A. brasilense* cepa Az-39 y *A. brasilense* cepa ipdC-, en condiciones de control y estrés por frío (4 °C), salinidad (200 mM) y tres niveles de sequía (1: 0,5 Mpa; 2: 1,0 Mpa; 3: 1,5 Mpa). (Osses *et al.*, 2017)



**Fig. 7.5:** *D. eriantha* cv. Mejorada INTA sin bacteria, con 4 tratamientos: control (sin estrés); estrés salino; estrés por frío y estrés por sequía (1,5 Mpa) (Foto: Romina Osses)



**Fig. 7.6:** *D. eriantha* cv. Mejorada INTA inoculadas con *A. brasilense* cepa AZ-39, con 4 tratamientos: control (sin estrés); estrés salino; estrés por frío y estrés por sequía (1,5 Mpa) (Foto: Romina Osses)



**Fig. 7.7:** *D. eriantha* cv. Mejorada INTA inoculadas con *A. brasilense* cepa *ipdC*, con 4 tratamientos: control (sin estrés); estrés salino; estrés por frío y estrés por sequía (1,5 Mpa) (Foto: Romina Osses)

En el cv. Sudafricana, en los tratamientos control, frío y salinidad no se observaron diferencias significativas con ninguna bacteria; sólo se observó un aumento significativo del largo de hojas en el tratamiento de estrés por sequía con una presión osmótica de -1,5 Mpa, inoculado con la cepa *ipdC*- (Fig.7. 4 A). En Mejorada INTA, igualmente no hubo cambios significativos para plantas control, bajo frío o salinidad, solo hubo un aumento significativo en la longitud de hojas en los tres tratamientos de estrés por sequía; para presiones osmóticas de -0,5 Mpa se observó en plantas inoculadas con ambas cepas y sólo con la cepa *ipdC*- para presiones de -1,0 y -1,5 Mpa (Fig. 7. 4 B). La longitud de raíces varió según el tipo de inoculación y estrés aplicado. En el cv. Sudafricana, las plantas control, sometidas a estrés por frío y salinidad, no presentaron diferencias significativas en la longitud radical. Los tratamientos de sequía incrementaron la longitud de la raíces cuando fueron inoculados con la cepa *ipdC*- y soportaron presiones osmóticas de -1 Mpa o cuando fueron inoculados con ambas cepas para presiones -1,5 Mpa, existiendo un mayor crecimiento en plantas inoculadas con la cepa *ipdC* (Fig. 7. 4 C). En el cv. Mejorada INTA, la longitud de raíces incrementó en forma significativa bajo estrés salino y sequia bajo presiones osmóticas de -0,5, 1,0 y 1,5Mpa, inoculados con la cepa *ipdC*- (Fig.7.4 D)

En el cv. Sudafricana el peso fresco foliar (PFF) aumentó en forma significativa con respecto al control en los tratamientos con inoculación con la cepa AZ-39 y con *ipdC*-. El PFF incrementó de forma significativa en los tres tratamientos de estrés por sequía

(0,5, 1 y 1,5 Mpa) en las plantas inoculadas con ambas cepas, en forma cuantitativamente mayor con la cepa ipdC<sup>-</sup>. Bajo frío y salinidad, el PFF no varió en ninguno de los tratamientos sin inoculación y con ninguna de las dos cepas (Tabla 7.1A).

En el cv. Mejorada INTA, se encontraron aumentos significativos en el tratamiento control, inoculado con la cepa ipdC<sup>-</sup> y una disminución significativa en el PFF en plantas inoculadas con la cepa AZ-39. En el tratamiento de estrés por frío, se observaron aumentos significativos en plantas inoculadas con ambas cepas, siendo más notorio con la cepa ipdC<sup>-</sup>. En el tratamiento salino se observó una disminución significativa de PFF en las plantas inoculadas con AZ-39, manteniéndose las inoculadas con la cepa ipdC<sup>-</sup> cercanos al control. En los tratamientos de estrés por sequía inoculados con ambas bacterias existieron incrementos significativos a 0,5, 1,0 y 1,5 Mpa; en todos los casos la cepa ipdC<sup>-</sup> respondió con mayores valores de PFF que AZ-39 (Tabla 7.1A) (Fig. 7.5; Fig. 7.6; Fig. 7.7)

En raíces del cv. Sudafricana, el peso fresco de raíces (PFR) se incrementó significativamente en el tratamiento control, inoculados con ambas cepas: AZ-39 e ipdC<sup>-</sup>. El estrés por frío y por salinidad no produjo variación en el PFR en ninguno de los casos de la inoculación y sin ella. Hubo aumentos significativos en los tres tratamientos de estrés por sequía, en la concentración 0,5 Mpa sólo hubo aumento en las plantas inoculadas con la cepa AZ-39; lo contrario ocurrió en la concentración 1,0 Mpa, donde se vieron aumentos en las plantas inoculadas con la cepa ipdC<sup>-</sup>; en cambio, en la concentración 1,5 Mpa se vieron aumentos en las plantas inoculadas con ambas cepas, en mayor medida con la cepa ipdC<sup>-</sup> (Tabla 7.1B)

En el cv. Mejorada INTA, el PFR en el tratamiento sin estrés se incrementó con la cepa ipdC<sup>-</sup> y disminuyó con la cepa AZ-39; con frío el PFR aumento en forma significativas con ambas cepas; con salinidad no existieron diferencias significativas. También hubo aumentos significativos en los tres tratamientos de estrés por sequía, en la concentración 0,5 Mpa fue más notorio en la cepa AZ-39; en las concentraciones 1,0 Mpa y 1,5 Mpa, fue en mayor medida con la cepa ipdC<sup>-</sup> (Tabla 7.1B).

El peso seco foliar (PSF) en el cv. Sudafricana, aumentó en forma significativa en el tratamiento control, inoculados con ambas cepas. El frío y la salinidad no produjeron cambios en la acumulación de PSF en ningún caso. Existieron aumentos significativos en los tres tratamientos de estrés por sequía, en las concentraciones 0,5 y 1,0 Mpa fueron aquellos inoculados con la cepa ipdC<sup>-</sup>; en la concentración 1,5 Mpa en aquellas plantas inoculadas con ambas cepas. En el cv. Mejorada INTA, se encontraron aumentos significativos de PSF en el tratamiento control, inoculado con la cepa ipdC<sup>-</sup> y disminuciones significativas en las plantas con la cepa AZ-39. En el tratamiento de frío existió un incremento significativo en plantas inoculadas con ipdC<sup>-</sup> y en los tratamientos con sequía se observaron incrementos significativos en todos los potenciales inoculados con la cepa ipdC<sup>-</sup> (Tabla 7.1C)

**Tabla 7.1:** Peso fresco y peso seco foliar y radical de *Digitariaeriantha* cv. Sudafricana y cv. Mejorada INTA sin bacterias e inoculadas con *A. brasilense* cepa Az-39 y *A. brasilense* cepa ipdC<sup>-</sup>, en condiciones de control y estrés por frío (4 °C), salinidad (200 mM) y tres niveles de sequía (1: 0,5 Mpa; 2: 1,0 Mpa; 3: 1,5 Mpa). (Osses *et al.*, 2017)

		<u>cv. Sudafricana</u>			<u>cv. Mejorada INTA</u>		
<b>A</b>		Peso Fresco Foliar (g)			Peso Fresco Foliar (g)		
<i>Tratamientos</i>	SB	AZ-39	ipdC <sup>-</sup>	SB	AZ-39	ipdC <sup>-</sup>	
Control	3,35±2,08d	<b>9,22±2,18b</b>	<b>10,61±2,16b</b>	11,22±2,3b	<b>6,95±2,45c</b>	<b>22,82±2,4a</b>	
Frío	1,91±2,04d	3,64±2,20d	3,73±2,18d	4,86±2,31d	<b>8,30±2,43b</b>	<b>12,74±2,3b</b>	
Salinidad	4,70±2,05d	3,56±2,19d	4,48±2,12d	6,60±2,30c	<b>3,58±2,47d</b>	5,69±2,2cd	
Sequía 0,5 Mpa	2,90±2,06d	<b>5,57±2,21c</b>	<b>10,78±2,15b</b>	2,42±2,28d	<b>5,24±2,49c</b>	<b>12,05±2,4b</b>	
Sequía 1,0 Mpa	4,16±2,08d	<b>5,86±2,22c</b>	<b>9,87±2,18b</b>	4,73±2,27d	<b>6,39±2,40c</b>	<b>11,10±2,4b</b>	
Sequía 1,5 Mpa	4,22±2,35d	<b>12,77±2,37b</b>	<b>23,74±2,4a</b>	4,34±2,60d	<b>12,70±2,63 b</b>	<b>23,75±2,6a</b>	
<b>B</b>		Peso Fresco de Raíces (g)			Peso Fresco de Raíces (g)		
Control	0,38±1,634ef	<b>7,16±1,72b</b>	<b>8,22±1,72b</b>	7,81±1,87b	<b>5,61±1,9c</b>	<b>15,94±1,8a</b>	
Frío	0,29±1,65ef	0,42±1,72ef	0,27±1,73ef	1,83±1,88d	<b>4,45±1,9c</b>	<b>9,61±1,9b</b>	
Salinidad	0,64±1,66ef	0,45±1,70ef	0,59±1,74ef	3,13±1,87d	1,59±1,9de	2,95±1,9d	
Sequía 0,5 Mpa	0,51±1,67ef	<b>2,59±1,71d</b>	1,50±1,79e	0,57±1,87ef	<b>2,00±1,9d</b>	<b>1,82±2,0d</b>	
Sequía 1,0 Mpa	2,55±1,63d	3,44±1,74d	<b>5,94±1,72c</b>	2,12±1,87d	2,94±1,8d	<b>5,90±1,8c</b>	
Sequía 1,5 Mpa	2,52±1,86d	<b>8,05±1,87b</b>	<b>15,79±1,86a</b>	2,500±2,14d	<b>8,05±2,1b</b>	<b>15,78±2,1a</b>	
<b>C</b>		Peso Seco Foliar (g)			Peso Seco Foliar (g)		
Control	0,84±0,84d	<b>2,86±0,89c</b>	<b>3,26±0,81c</b>	3,41±0,83c	<b>1,92±0,8d</b>	<b>6,61±0,84b</b>	
Frío	0,40±0,82de	0,58±0,87de	0,60±0,86de	1,51±0,82d	2,79±0,8d	<b>4,31±0,83c</b>	
Salinidad	1,29±0,83d	0,85±0,86d	0,96±0,90d	1,97±0,80d	1,27±0,8d	1,63±0,85d	
Sequía 0,5 Mpa	1,15±0,90d	1,69±0,80d	<b>3,63±0,87c</b>	1,06±0,81d	1,29±0,8d	<b>3,80±0,86c</b>	
Sequía 1,0 Mpa	1,79±0,89d	2,35±0,81d	<b>3,13±0,85c</b>	1,88±0,79	2,24±0,8d	<b>3,39±0,85c</b>	
Sequía 1,5 Mpa	1,66±0,94d	<b>4,38±0,94c</b>	<b>10,53±0,94 a</b>	1,67±0,93d	<b>4,40±0,9c</b>	<b>1067±0,92<sup>a</sup></b>	
<b>D</b>		Peso Seco de Raíces (g)			Peso Seco de Raíces (g)		
Control	0,21±0,31d	<b>0,90±0,33c</b>	<b>1,08±0,33c</b>	1,69±0,78d	<b>1,30±0,8c</b>	<b>2,88±0,82b</b>	
Frío	0,11±0,31d	0,13±0,33d	0,10±0,33d	0,46±0,78d	<b>0,96±0,8c</b>	<b>1,76±0,82c</b>	
Salinidad	0,30±0,31d	<b>0,06±0,33e</b>	0,23±0,33d	0,59±0,78d	0,41±0,8d	0,63±0,82d	
Sequía 0,5 Mpa	0,28±0,31d	0,61±0,33d	0,56±0,33d	0,28±0,78d	0,31±0,8d	<b>0,92±0,82c</b>	
Sequía 1,0 Mpa	0,87±0,31d	0,79±0,33d	<b>1,17±0,33c</b>	0,37±0,78d	<b>0,90±0,8c</b>	<b>1,37±0,82c</b>	
Sequía 1,5 Mpa	0,74±0,36d	<b>1,82±0,36b</b>	<b>4,11±0,36a</b>	0,74±0,89d	<b>1,82±0,8b</b>	<b>4,18±0,89<sup>a</sup></b>	

El peso seco de raíces (PSR) en *Digitariaeriantha* cv. Sudafricana, se vio incrementado significativamente en plantas inoculadas con ambas cepas. El frío no provocó diferencias significativas PSR entre plantas control e inoculadas. La salinidad provocó una significativa disminución del PSR en plantas inoculadas con la cepa AZ-39, no así en las inoculadas con la cepa ipdC<sup>-</sup>. La cepa AZ-39 tuvo un efecto mitigatorio en la sequía severa incrementando el valor de PSR y la cepa ipdC<sup>-</sup> lo hizo con niveles de sequía de 1,0 y 1,5 Mpa siempre respecto de las plantas sin bacteria.

En Mejorada INTA, las plantas inoculadas con la cepa AZ-39 disminuyeron su PSR con diferencias significativas respecto al control en cambio la cepa ipdC<sup>-</sup> incrementó el PSR significativamente. Ante el frío el PSR se vio incrementado con ambas cepas. Bajo tratamiento salino, no existieron diferencias significativas entre las plantas control y las inoculadas con ambas cepas. Las plantas inoculadas con ipdC<sup>-</sup>; mostraron incrementos significativos en todos los tratamientos de sequía, con respecto al control. Las plantas inoculadas con AZ-39 también respondieron favorablemente, con 1,0 Mpa y 1,5 Mpa.

**Tabla 7.2:** Resumen del efecto de la inoculación con *A. brasilense* cepa Az-39 y *A. brasilense* cepa ipdC-, en *Digitaria eriantha* cv. Sudafricana y cv. Mejorada INTA en condiciones de control y condiciones de estrés por frío, salinidad y tres niveles de sequía. **Referencias:**+: Incremento; -: Descenso; **Blanco:** Sin cambios. (Osse *et al.*, 2017)

	<b>cv. Sudafricana</b>			<b>cv. Mejorada INTA</b>		
<b>A</b>	<b>Peso Fresco Foliar (g)</b>			<b>Peso Fresco Foliar (g)</b>		
<b>Tratamientos</b>	SB	AZ-39	ipdC-	SB	AZ-39	ipdC-
Control		+	+		-	+
Frío					+	+
Salinidad					-	
Sequía 0,5 Mpa		+	+		+	+
Sequía 1,0 Mpa		+	+		+	+
Sequía 1,5 Mpa		+	+		+	+
<b>B</b>	<b>Peso Fresco de Raíces (g)</b>			<b>Peso Fresco de Raíces (g)</b>		
Control		+	+		-	+
Frío					+	+
Salinidad						
Sequía 0,5 Mpa		+			+	
Sequía 1,0 Mpa			+			+
Sequía 1,5 Mpa		+	+			+
<b>C</b>	<b>Peso Seco Foliar (g)</b>			<b>Peso Seco Foliar (g)</b>		
Control		+	+		-	+
Frío						+
Salinidad						
Sequía 0,5 Mpa			+			+
Sequía 1,0 Mpa			+			+
Sequía 1,5 Mpa		+	+			+
<b>D</b>	<b>Peso Seco de Raíces (g)</b>			<b>Peso Seco de Raíces (g)</b>		
Control		+	+		-	+
Frío					+	+
Salinidad		-				
Sequía 0,5 Mpa						+
Sequía 1,0 Mpa			+		+	+
Sequía 1,5 Mpa		+	+		+	+
<b>E</b>	<b>Número de hojas</b>			<b>Número de hojas</b>		
Control			+			+
Frío						
Salinidad						
Sequía 0,5 Mpa		+			+	+
Sequía 1,0 Mpa					+	+
Sequía 1,5 Mpa					+	+
<b>F</b>	<b>Largo de hojas (cm)</b>			<b>Largo de hojas (cm)</b>		



Control			
Frío			
Salinidad			
Sequía 0,5 Mpa		+	+
Sequía 1,0 Mpa			+
Sequía 1,5 Mpa		+	+
<i>G</i>	<b>Largo de raíces (cm)</b>		<b>Largo de raíces (cm)</b>
Control			
Frío			
Salinidad			+
Sequía 0,5 Mpa			+
Sequía 1,0 Mpa		+	+
Sequía 1,5 Mpa	+	+	++

Las plantas de *D. eriantha* bajo condiciones de estrés abiótico ven afectados los parámetros morfofisiológicos, la producción de hormonas y pigmentos fotosintéticos (Garbero *et. al.*, 2011). El propósito de este trabajo fue establecer si *D. erianthacvs.* Sudafricana y Mejorada INTA mostraban respuestas favorables cuando se asociaban a bacterias PGPR, mitigando el estrés y disminuyendo los efectos negativos de los mismos.

Bajo situaciones de estrés, tales como escasez de recursos o bajas temperaturas, el crecimiento de los organismos se ralentiza, pero al desaparecer el factor de estrés los organismos pueden incrementar sus tasas de crecimiento llegando a alcanzar tallas idénticas a organismos no sometidos a estrés, este proceso ocurre tanto en plantas como animales y se denomina crecimiento compensatorio. Sin embargo, las plantas presentan peculiaridades morfológicas y fisiológicas que las hacen capaces de mantener crecimiento compensatorio incluso en presencia del factor que provoca el estrés (Retuerto *et al.*, 2003).

En condiciones control (sin estrés), ambos cultivares mostraron un aumento en el NH, PFF, PFR, PSF y PSR cuando fueron inoculados con *Azospirillum brasilense* cepa *ipdC*, esto indicaría lo beneficioso de la simbiosis con esta bacteria. Cuando las plantas se inocularon con la cepa *AZ-39*, sólo resultó beneficiosa la simbiosis con el cv. Sudafricana, mostrando un aumento de PFF, PFR, PSF y PSR; en el cv. Mejorada INTA, se observaron disminuciones en el PFF, PFR, PSF y PSR al inocularse con *AZ-39*, lo que demuestra una simbiosis no beneficiosa. Cassanet *al.*, 2009 en cultivos de soja (*Glycine max* L.) y de maíz (*Zea mays* L.) en simbiosis con *A. brasilense*, también cepa *AZ-39*, logró incrementos significativos en la longitud de raíces.

El efecto de las bajas temperaturas sobre una planta puede causar alteraciones metabólicas que determinen diferentes grados de sensibilidad a este factor de estrés. Algunos autores sugieren que el incremento del PF refleja con más precisión el efecto de las bajas temperaturas en el crecimiento de los órganos de una planta. Esto es debido a que durante la aclimatación al frío una importante fracción del incremento en PF

corresponde a la deposición de muchos solutos, incluyendo carbohidratos no estructurales, proteínas, lípidos y aminoácidos (Levitt, 1980). Las plantas de *D. eriantha* cv. Sudafricana detuvieron su crecimiento por efecto del frío, con las dos cepas de *Azospirillum*, lo que quedó demostrado en los parámetros de PFF y PFR; PSF y PSR y longitud de los órganos vegetativos. Dado que *D. eriantha* es una especie forrajera, la reducción del crecimiento de las hojas es un efecto desfavorable que afecta el rendimiento futuro del cultivo (Terenti, 2004). En el cv. Mejorada INTA inoculados con la cepa *ipdC*, el NH, PFF y PFR, PSF y PSR se incrementaron frente al frío, y en las plantas inoculadas con la cepa AZ-39, solo PFF, PSF y PSR, evidenciando mejor respuesta de este cv. a la simbiosis bacteriana y la respuesta frente a este estrés. Garbero *et al.*, 2011, demostraron que frente al frío esta especie desarrolla mecanismos de respuesta antioxidantes y hormonales probablemente incrementados por estas asociaciones simbióticas.

Para combatir las condiciones de salinidad, las plantas han desarrollado diferentes mecanismos y estrategias, que implican la acción de diferentes mecanismos (transporte de solutos compatibles, señalización de procesos en desarrollo, etc.) que intervienen para conseguir que la planta crezca, se desarrolle y llegue a producir en condiciones de elevada salinidad (Breckle, 2002). Las plantas del cv. Sudafricana y cv. Mejorada INTA mostraron pocas variaciones en sus parámetros de crecimiento con las dos cepas bacterianas lo que probablemente pondría en evidencia que el nivel de salinidad al cual fueron sometidas las plantas, no produce injuria alguna en ambos cultivares, por lo cual se mantienen cercanos al control.

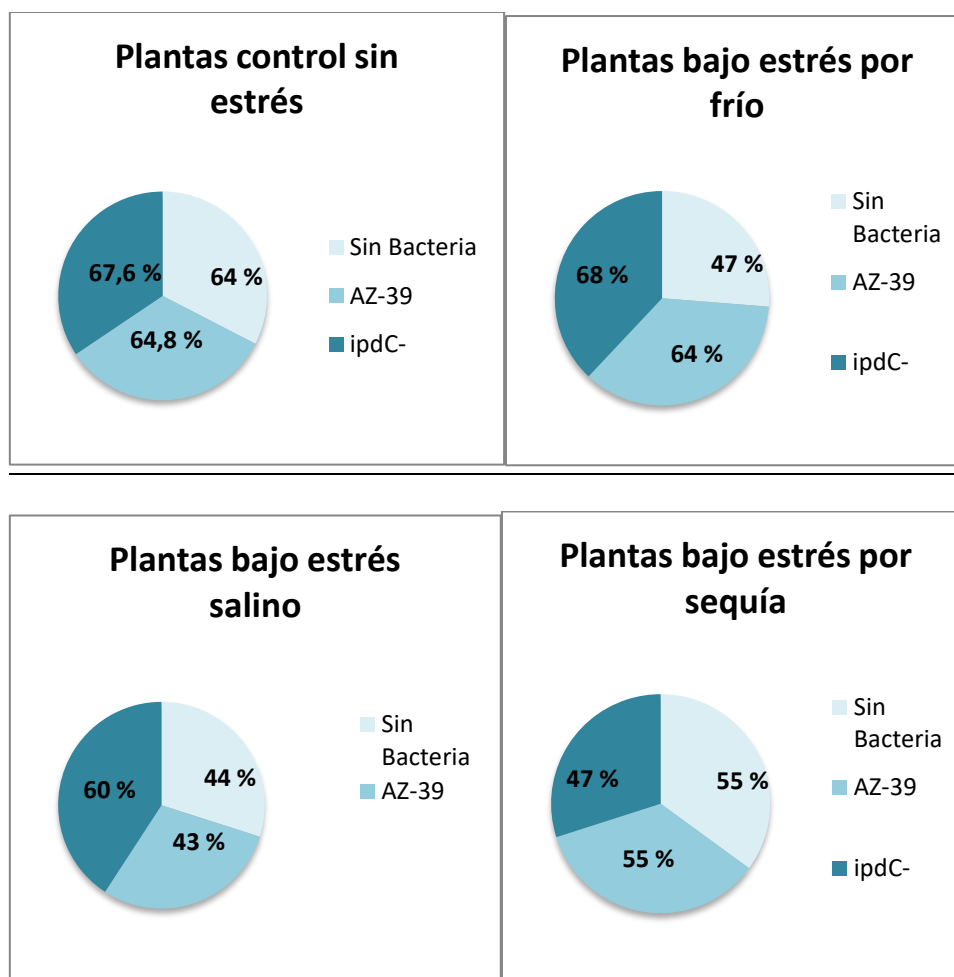
Las plantas muestran ante el estrés hídrico respuestas que tienden a evitarlo o bien mecanismos o adaptaciones que permiten tolerarlo (Valladares *et al.*, 2004). Cuando el déficit hídrico se desarrolla lentamente, las plantas pueden presentar respuestas de aclimatación que tienen efectos sobre el crecimiento, como la disminución de la expansión foliar y el aumento del crecimiento radicular (Potter *et al.*, 2007; Shao *et al.*, 2008). Otro mecanismo de resistencia a nivel fisiológico es el cierre de estomas, estructuras responsables de la mayor proporción de pérdida de agua en las plantas (Taiz y Zeiger, 2006). Ambos cultivares presentaron respuestas favorables en la mitigación de los tres niveles de sequía impuestos. En los tres casos se mostraron aumentos en todos los parámetros evaluados en plantas inoculadas con *A. brasilense* cepa *ipdC*; en contraposición a la cepa AZ-39, donde el efecto mitigador se observó solo en algunos parámetros. La cepa *ipdC* es más eficiente en la mitigación del estrés por sequía, más aún en altas concentraciones (1,5 Mpa). El parámetro longitud de raíces (LR) sufrió disminuciones en concentraciones de PEG de 0,5 y 1,0 Mpa, no así a la mayor concentración, esto corroboraría el efecto compensatorio. Giuletiet *al.*, 2008, demostraron que *D. eriantha* cv. Sudafricana y Mejorada INTA incrementaban su biomasa en los parámetros PSF y PSR cuando crecían en contacto con sustratos que contenían vermicompuestos. Por su lado, Pedranzani *et al.*, 2015, informaron que cuando *D. eriantha* cv. Sudafricana desarrollaba simbiosis con micorrizas arbusculares los niveles de defensas antioxidantes y las hormonas ácido jasmónico y su precursor ácido oxofitodienoico aumentaban en forma significativa cuando la planta se encontraba en situaciones de estrés abiótico.

En este estudio se demostró que el cv. Mejorada INTA presentó mayores beneficios en la mitigación del estrés por sequía que el cv. Sudafricana, evidenciando una vez más la superioridad del cv Mejorada INTA en forma independiente y en simbiosis con *A. brasilense* inoculado con ambas cepas.

### **Variación en el contenido de agua y nitrógeno en *D.eriantha* cv. Mejorada INTA**

En las figuras 7.8 y 7.9 se presentan las variaciones del porcentaje de agua y nitrógeno en muestras de follaje procedentes de plantas sin bacterias y en simbiosis con *A. brasilense* cepa AZ-39 y *A. brasilense* cepa *ipdC*, en condiciones de control y estrés por frío (4°C), salinidad (200 mM) y sequía (1,5 Mpa). Y en las tablas 7.3 y 7.4 se presentan las variaciones del porcentaje de agua y nitrógeno en relación a los tratamientos de estrés.

### Contenido de agua



**Fig. 7.8:** Variación del porcentaje de agua en muestras de follaje procedentes de plantas sin bacterias e inoculadas con *A. brasilense* cepa *Az39* y *A. brasilense* cepa *ipdC*<sup>-</sup>, en condiciones de control y estrés por frío (4°C), salinidad (200 mM) y sequía (1,5 Mpa) (Osses, 2014)

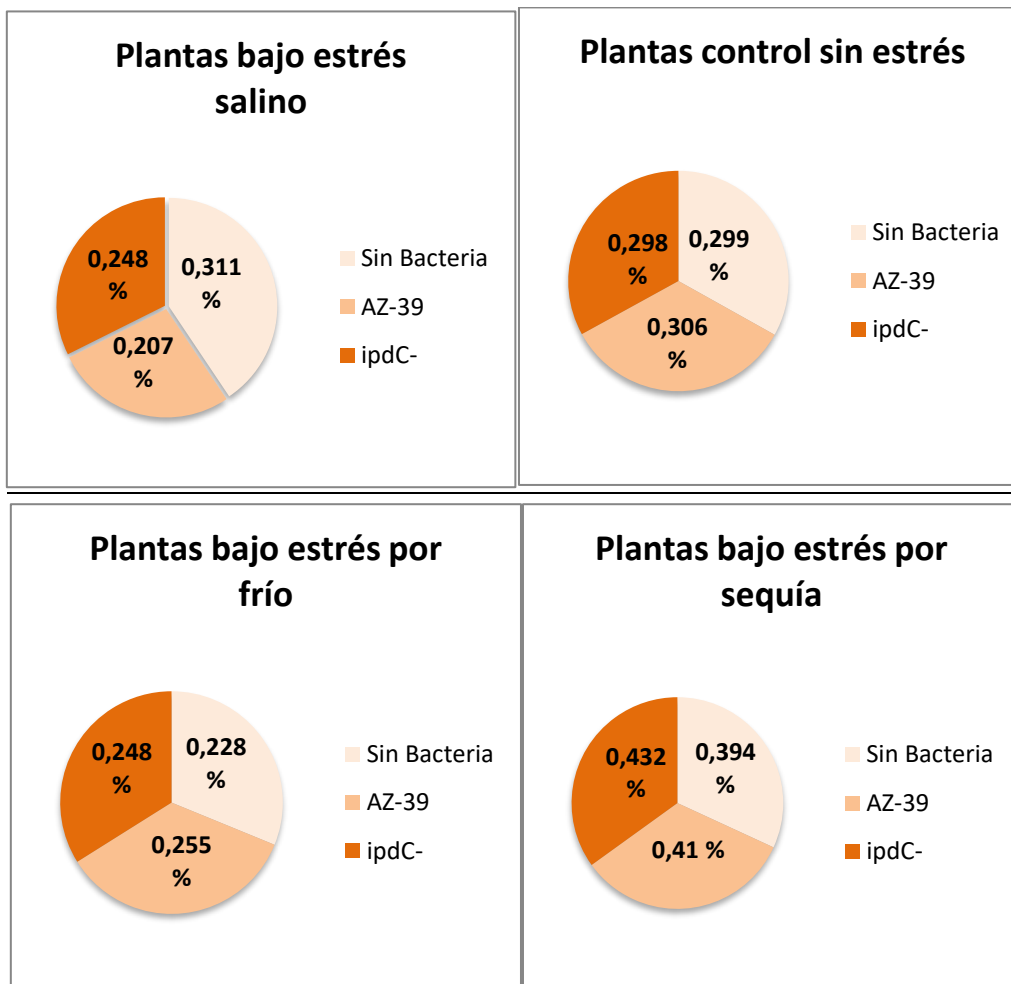
**Tabla 7.3:** Variación del porcentaje de agua en relación a los tratamientos de estrés. Letras diferentes en la misma columna expresan diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ )

Tratamiento	Control	Frío	Salino	Sequía
Sin Bacteria	64,0 a	47,0 c	44,0 d	55,0 b
AZ-39	64,8 a	64,0 a	43,0 c	55,0 b
ipdC <sup>-</sup>	67,6 a	68,0 a	60,0 b	47,0 c

El porcentaje de contenido de agua en follaje de plantas control y de plantas bajo estrés por frío y estrés salino, fue mayor en aquellas inoculadas con ambas cepas de *A. brasilense*. En aquellas plantas bajo estrés por sequía el porcentaje de agua fue similar (Fig. 7.8). Las plantas inoculadas con la cepa *AZ-39* e *ipdC*<sup>-</sup> mostraron un mayor

porcentaje de agua cuando fueron sometidas al frío. En aquellas bajo estrés salino, sólo se observó un porcentaje mayor de agua en aquellas plantas inoculadas con la cepa *ipdC* (Tabla 7.3).

### Contenido de Nitrógeno



**Fig. 7.9:** Variación del porcentaje de nitrógeno en muestras de follaje procedentes de plantas sin bacterias e inoculadas con *A. brasilense* cepa Az39 y *A. brasilense* cepa *ipdC*, en condiciones de control y estrés por frío (4°C), salinidad (200 mM) y sequía (1,5 Mpa) (Osses, 2014)

**Taba 7.4:** Variación del porcentaje de nitrógeno en relación a los tratamientos de estrés. Letras diferentes en la misma columna expresan diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ )

Tratamiento	Control	Frío	Salino	Sequía
Sin Bacteria	0,299 b	0,228 c	<b>0,311 a</b>	<b>0,394 a</b>
AZ-39	<b>0,306 b</b>	0,255 c	0,207 c	<b>0,410 a</b>
ipdC-	0,298 b	0,248 c	0,248 c	<b>0,432 a</b>

En los tratamientos control, estrés por frío y estrés salino, los porcentajes de nitrógeno se mantuvieron similares (Fig. 7.9). En las plantas sin bacteria, se observó un aumento en el porcentaje de nitrógeno en los tratamientos de estrés salino y estrés por sequía; lo contrario ocurrió en aquellas plantas que fueron sometidas a estrés por frío, en las cuales el porcentaje disminuyó, respecto a las plantas control. En *D. eriantha* en simbiosis con *A. brasilense* cepa AZ-39 y cepa *ipdC*<sup>-</sup>, hubo una disminución del contenido de nitrógeno en los tratamientos de estrés por frío y salino y un aumento en las plantas sometidas a estrés por sequía, respecto a plantas control (Tabla 7.4).

## AGRADECIMENTOS

Al Ms Cs. Oscar Terenti por el análisis estadístico de los datos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abel S, Theologis A (1996) Early genes and auxin action. *Plant Physiol.* 111:9-17.
- Alazem M, Lin NS (2015) Roles of plant hormones in the regulation of host-virus interactions. *Mol. Plant Pathol.* 16: 529-540.
- Ali B, Hasnain S (2007) Potential of bacteria indolacetic acid to induce adventitious shoots in plant tissue culture. *Lett. Appl. Microbiol.* 45:128-133.
- Bano A, Fatima M (2009) Salt tolerance in *Zea mays* (*L.*) following inoculation with *Rhizobium* and *Pseudomonas*. *Biol. Fert. Soils* 45: 405-413.
- Bashan Y, Holguin G (1998) Proposal for the division of plant promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth- promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biol. Biochem.* 30:1225–1228.
- Bashan Y, Salazar B, Moreno M, López R, Linderman R (2012) Restoration of eroded soil in the Sonoran Desert with native leguminous trees using plant growth-promoting microorganisms and limited amounts of compost and water. *J Environ Manag* 102:26-36.
- Bent E, Tuzun S, Chanway CP, Enebak S (2001) Alterations in plant growth and in root hormone levels of lodgepole pines inoculated with *Rhizobacterias*. *Can. J. Microbiol.* 47: 793-800.
- Bhattacharyya PN, Jha DK (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *Rev. World J. Microbiol. Biotechnol.* 28:1327-1350.
- Breckle JW (2002) Walter's Vegetation of the Earth. The Ecological Systems of the Geobiosphere. Springer, Berlin Heidelberg. New York.

Bot AJ, Natchtergaele FO, Yang A (2000) Land Resource Potential and Constraints at Regional and Country Levels. Land and Water Development Division Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. Pags. 1-114.

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* 45:28-35.

Cowan AK, Cairns AL, Bartels-Rham B (1999) Regulation of abscisic acid metabolism: towards a metabolic basis for abscisic acid-cytokinin antagonism. *J. Exp. Bot.* 50:595-603.

Davies J, Zhang H (1991) Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annu. Rev. Plant Phys.* 42, 55–76.

Dijkstra FA, Carrillo Y, Pendall E, Morgan JA (2014) Rhizosphere priming: a nutrient perspective. *The Microbial Regulation of Global Biogeochemical Cycles*, 183.

Dodd IC, Zinovkina NY, Safronova VI, Belimov AA (2010) Rhizobacterial mediation of plant hormone status. *Ann. Appl. Biol.* 157:361-379.

Esquivel-Cote R, Gavilanes-Ruíz M, Cruz-Ortega R, Huante P (2013) Importancia agrobiotecnológica de la enzima ACC desaminasa en rizobacterias, una Revisión. *Rev. Fitotec. Mex.* 36:251-258.

FAO (2002). Los Fertilizantes y Su USO una Guía de Bolsillo para los Oficiales de Extensión. IV Edición. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Asociación Internacional de la Industria de los Fertilizantes. Roma. Pp 1-77.

Frommel MI, Nowak J, Lazarovits G (1991) Growth enhancement and development modification of in vitro grown potato (*Solanum tuberosum* spp. *tuberosum*) as affected by a non-fluorescent *Pseudomonas* sp. *Plant Physiol.* 96:928-936.

Fulchieri M, Frioni L (1994) *Azospirillum* inoculation on maize (*Zea mays*): effect on yield in a field experiment in central Argentina. *Soil. Biol. Biochem.* 26:921-923.

Gamalero E, Berta G, Glick R (2009) The use of microorganisms to facilitate the growth of plants in saline soils. En: Khan MS, Zaidi A, Musarrat J (eds) *Microbial strategies for crop improvement*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 1-22.

Garbero M., Pedranzani H., Zirulnik F., Molina A., Pérez-Chaca M.V., Vigliocco A., Abdala G (2011). Short-term cold stress in two cultivars of *Digitaria eriantha*: Effects on stress-related hormones and antioxidant defense system. *Acta PhysiolPlant.* 33 (2):497-507

Garbero M, Andrade A, Reinoso H, Fernández-Muñíz B, Cuesta C, Granda V, Escudero C, Abdala G, Pedranzani H (2012). Short-term cold stress differentially affect growth, anatomy and hormone levels in two cultivars of *Digitaria eriantha*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34 (6): 2079-2091.

- Giri B, Kapoor R, Agarwal L, Mukerji KG (2004) Preinoculation with arbuscularmycorrhizae helps *Acacia auriculiformis* grow in a degraded Indian wasteland soil. *CommunSoilSci. Plant Anal.* 35:193-204.
- Giulietti A, Ruiz O, Pedranzani H, Terenti O (2008) Efecto de cuatro lombricompostos en el crecimiento de plantas de *Digitariaeriantha*, Fhyton (Buenos Aires). 77:137-149, 2008b.
- Giulietti JD, Echeverría JC, Collado AD (2003) Condicionantes históricos de la desertificación en San Luis. In: Aguilera M.O. and Panigatti J.L. (Eds). Con las Metas Claras. pp 11-24.
- Glick BR (1995) The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41: 109-117.
- Glick BR, Todorovic B, Czarny J, Cheng Z, Duan J, McConkey B (2007). Promoción de PlantGrowth por Bacterial ACC desaminasa. Revisiones críticas en ciencias de las plantas. 26: 227–242.
- Grover M, Ali SZ, Sandhya V, Rasul A, Venkateswarlu B (2011) Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27:1231-1240.
- Hassine AB, Lutts S (2010) Differential responses of saltbush *Atriplexhalimus L.* exposed to salinity and water stress in relation to senescing hormones abscisic acid and ethylene. *J. Plant Physiol.* 167:1448-1456.
- Honsel A, Kojima M, Haas R, Frank W, Sakakibara H, Herschbach C, Rennenberg H (2012) Sulphur limitation and early sulphur deficiency respons in poplar: significance of gene expression, metabolites and plant hormones. *J. Exp. Bot.* 63:1873-1893.
- Jain M., Mathur G, Koul S. (2001). Efectos de mejora de la prolina sobre la peroxidación lipídica inducida por estrés salino en líneas celulares de maní (*Arachis hypogaea L.*). *PlantCellRep* 20, 463-468.
- Jha, Y, Subramanian, RB (2014). PGPR regulan la actividad similar a la caspasa, la muerte celular programada y la actividad de la enzima antioxidante en el arroz bajo salinidad. *PhysiolMolBiol Plants* 20, 201-207.
- Johansson JF, Paul LR, Finlay RD (2004) Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiol. Ecol.* 48:1-13.
- Khan MH, Panda SK (2008). Alteraciones en la peroxidación de lípidos de la raíz y respuestas antioxidantes en dos cultivares de arroz bajo estrés por salinidad de NaCl. *Acta PhysiolPlant* 30, 81.
- Kugler A, Köhler, B, Palme, K. (2009). Regulación dependiente de la sal de una subfamilia de canales de GNC en *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol* 9, 140.
- Kloepper J W, Hume DJ, Scher FM, Singleton C, Tipping B, Laliberte M, Frauley K,
- Kutchaw T, Simonson C, Lifdhitz R, Zaleska I, Lee, L (1988). Plant growth-promoting rhizobacteria on canola (rapeseed). *Plant Dis*, 72(42), 10-1094.



Kloepper JW, Lifshitz R, Zablotowicz RM (1989). Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends. Biotechnol.* 7:39-44.

Kondhare KR, Hedden P, Kettlewell PS, Farrel AD, Monaghan JM (2014) Use of the hormone- biosynthesis inhibitors fluoridone and paclobutrazol to determine the effects of altered Abscicic Acid and Giberellin levels on pre-maturatya-Amilase Formation in Wheat Grains. *J. Cereal Sci.* 60:210-216.

Levitt J(1980) Responses of Plants to environmental stresses. Vol. 1, Acad. Press, 496.

Lynch JM, Whipps JM (1991) Substrate flow in the rhizosphere. In *The rhizosphere and plant growth* (pp. 15-24). Springer Netherlands.

Milošević A, Marinković B, Tintor B (2012) Mitigating abiotic stress in crop plants by microorganisms. *MaticaSrpska Proceedings for Natural Sciences* 123:17-26.

Miransari M, Smith DL (2014) Plant Hormones and seed germination. *Environ. Exp. Bot.* 99:110-121.

Osses, RG. Simbiosis *Digitaria eriantha* Steudel var. Mejorada INTA- *Azospirillum brasilense* : Efectos sobre producción, crecimiento y tolerancia a estreses. Tesis de Grado para optar al gardo de Ingeniera Agronoma. FICA. UNSL, 90pp

Osses RG, Masciarelli O, Quiroga AM, Terenti OA, Pedranzani HE 2017. *Symbiotic association of two strain of Azospirillum with cultivars of Digitaria eriantha Steudel: responses to abiotic stress.* Revista Avances en Invest. Agropecuaria. REVAIA 2017. 21(1): 19-34 ISSN 0188789-0

Patten CL, Glick BR (2002) Role of *Pseudomonas putida*indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl. Environ. Microb.* 68: 3795- 3801.

Pedranzani H, Rodríguez Rivera M, Gutiérrez M, Porcel R, House B, Ruiz Lozano JM (2015) Arbuscularmycorrhizal symbiosis regulates physiology and performance of *Digitaria eriantha* plants subjected to abiotic stresses by modulating antioxidant and jasmonate levels *Micorrhyza* 26 (2): 141-152. DOI: 10.1007/s 00572-015-0653-4.

Penrose DM, Glick BR (2003) Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiol. Plant.* 118: 10-15.

Potters G, Pasternak TP, Guisez Y, Palme KJ, Jansen MAK (2007) Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends Plant Sci.* 12(3), 99-105.

Raaijmakers JM, Paulitz TC, Steinberg C, Alabouvette C, Möenne- Loccoz Y (2009) The rhizosphere: a playground and battlefield for sailborne pathogens and beneficial microorganisms. *PlantSoil*321: 341-361.

Retuerto R, Rodríguez-Roiloa S, Fernández-Lema B, Obeso JR. (2003) Respuestas compensatorias de plantas en situaciones de estrés. *Ecosistemas* 2003/1 (URL: <http://www.aet.org/ecosistemas/031/investigacion4.htm>).

- Rodríguez M, Flores R (2004) Elementos esenciales y beneficiosos. Ferti-riego. Tecnologías y programación en agroplasticura, ed. Guzmán-Palomino JM y López-Galvez J, pp 17-24. Almeria: España. CYTED.
- Rovira D, Davey B (1974) Biology of the rhizosphere in The Plant Root and its Environment, ed. EW Carson, pp. 153–204. Charlottesville: Univ. Press VA.
- Sairam RK, Tyagi A (2004) Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Curr. Sci. India* 86:407-421.
- Saleem M, Arshad M, Hussain S, SaeedBhatti A. (2007). Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Volume 34, Issue 10, 1. pp 635–648,
- Saravanakumar D, Samiyappan R (2007) ACC deaminase from *Pseudomonas fluorescens* mediated saline resistance in groundnut (*Arachis hypogea*) plants. *J. Appl. Microbiol.* 102:1283-1292.
- Sauer M, Robert S, Kleine-Vehn J (2013) Auxin: simply complicated. *J Exp Bot*: 1-13.
- Shao HB., Chu LY, C.A. Jaleel y CX. Zhao. (2008) Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *C.R. Biol.* 331, 215-225.
- Singh G y Mukerji KG (2006) Root exudates as determinant of rhizospheric microbial biodiversity. In *Microbial Activity in the Rhizosphere* (pp. 39-53). Springer Berlin Heidelberg.
- Stafford WH, Baker GC, Brown SA, Burton SG, Cowan DA (2005) Bacterial diversity in the rhizosphere of *proteaceae* species. *Environ. Microbiol.* 7:1755-1768.
- Taiz L Zeiger E. (2006). *Plant Physiology*, 4ª edición. Sinauer Associates, Sunderland, MA. ISBN 0-87893-856-7.
- Terenti OA. Evolución del crecimiento y la calidad de la semilla en *Digitariaeriantha*. Pastos y Forrajes, [S.l.], v. 27, n. 1, feb. 2012. ISSN 2078-8452.
- Thuar A, Carlier E, Olmedo C (2005) Efecto de la promoción del crecimiento en un cultivo de trigo inoculado con *A. brasilense* Az39, en dos suelos de la región. VRN Científico Técnica de Biología del Suelo y V Encuentro sobre FBN, San Salvador de Jujuy, Argentina, pp. 37.
- Timmusk S, Wagner H (1999) The plant-growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression: a possible connection between biotic and abiotic stress responses. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12, 951–959.
- Tiwari S, Singh P, Tiwari R, Meena KK, Yandigeri M, Singh DP, Arora DK (2011) Salt-tolerant rhizobacteria-mediated induced tolerance in wheat (*Triticum aestivum*) and chemical diversity in rhizosphere enhance plant growth. *Biol. Fertil. Soils.* 47:907-916.
- Toribio MB, Laborde H, Brevendan RE, Terenti OA (1998) Growth and water relations of *Digitariaeriantha* under soil moisture stress and defoliation. In American Society of Agronomy. Annual Meeting. Abstracts. EE.UU. pp 113-114.

- Turner BL, Frossard E., Oberson A (2006) Enhancing phosphorus availability in low-fertility soils. *Biol. Approach to Sustain Soil. Syst.* pp: 191-205.
- Valladares F (2004) Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante. Ministerio de Medio Ambiente, EGRAF, S. A, Madrid, p. 191-223.
- Vella M, Masciarelli O, Grion H, Peman R, Cassán F, Luna V (2005) Evaluación de la germinación, establecimiento y crecimiento temprano de semillas de *Chloris gayana* y *Panicum maximum* inoculadas con *A. brasilense* Az39. VRN Científico Técnica de Biología del Suelo y V Encuentro sobre FBN, San Salvador de Jujuy, Argentina, pp. 40.
- Veneciano JH, Terenti OA, Federigi ME (2002) Factores climáticos y pasturas megatérmicas perennes. *Revista de la Sociedad Rural de Jesús María, Cba.* 130:39-42.
- Wahid, A., Close, TJ (2007). Expresión de deshidrinas bajo estrés por calor y su relación con las relaciones hídricas de las hojas de la caña de azúcar. *Biol Plant* 51, 104-109.
- Xiao-Min L, Huiming Z (2015) The effects of bacterial volatile emissions on plant abiotic stress tolerance. *Frontiers. in Plant. Sci.* 6:1-7.
- Yang DL (2009). Las vías de señalización fitohormonal en las respuestas inmunitarias del arroz y la vía de señalización del jasmonato reprimen la vía de señalización de la giberelina. Doctor. Tesis, Academia de Ciencias de China, China, págs. D2009 - D2118.
- Yang DL, Yang Y, He Z (2013) Roles of plant hormones and their interplay in rice immunity. *Mol. Plant.* 6:675-685.
- Zahir, ZA, Munir A, Asghar HN, Shaharoon B, Arsha M (2008). Effectiveness of Rhizobacteria Containing ACC Deaminase for Growth Promotion of Peas (*Pisum sativum*) Under Drought Conditions. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18(5), 958–963.