

Asociación simbiótica de dos cepas de *Azospirillum* con cultivares de *Digitaria eriantha*: respuestas al estrés abiótico

Symbiotic association of two strain of *Azospirillum* with cultivars of *Digitaria eriantha* Steudel: responses to abiotic stress

**Romina Gisel Osses,¹ Oscar Masciarelli,²
Andrea Mariela Quiroga,¹ Oscar Antonio Terenti¹
e Hilda Elizabeth Pedranzani^{3*}**

¹Laboratorio de Fisiología Vegetal, Departamento de Ciencias Agropecuarias
Facultad de Ingeniería y Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de San Luis
Autopista de las Serranías Puntanas No. 55 (5730). Villa Mercedes, San Luis, Argentina.

²Laboratorio de Fisiología Vegetal. Departamento de Ciencias Naturales
Universidad Nacional de Río Cuarto
RN 36 Km 601 (5800). Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

³Facultad de Química Bioquímica y Farmacia
Laboratorio de Fisiología Vegetal, Departamento de Bioquímica y Ciencias Biológicas.
Universidad Nacional de San Luis
Ejército de los Andes No. 950 (5700). San Luis, Argentina

*Correspondencia: hepedra@unsl.edu.ar

Resumen

Digitaria eriantha 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 simbiosis con *A. brasilense* cepa Az39 y *A. brasilense* cepa ipdC y su comportamiento 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

Abstract

Digitaria eriantha 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 symbiosis with *Azospirillum brasilense*, strain Az39 and ipdC- (hyper production and low production 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

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 parámetros de crecimiento, tales como longitud de hojas y raíces; como parámetro de biomasa se midió peso fresco y peso seco radicular y foliar. Los dos cultivares de *D. eriantha* hicieron simbiosis con ambas bacterias, y la mejor combinación 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 simbiosis la habilidad de mitigar todos los estreses.

Palabras clave

PGPR, crecimiento, biomasa, mitigación del estrés, simbiosis.

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 such as length of leaf and root; from biomass parameters we measured: fresh and dry weight from root and leaf. The two cultivars of *D. eriantha*, made symbiosis 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 symbiosis the ability to mitigate all types of stresses that were studied.

Keywords

PGPR, growth, biomass, alleviation of stress, symbiosis.

Introducción

La región semiárida central argentina se caracteriza por su clima continental seco con precipitaciones primavero-estivales y otoños e inviernos secos (Giulietti *et al.*, 2003). La principal actividad productiva en las áreas de secano es la cría y recría de bovinos, sobre recursos forrajeros naturales y unas pocas pasturas cultivadas; por lo que se han introducido gramíneas subtropicales estivales —como *Digitaria eriantha* Steudel— que se han implantado en suelos argentinos, aunque su sensibilidad a bajas temperaturas, estrés hídrico y salinidad aún son objeto de estudio (Veneciano *et al.*, 2002).

En Argentina, el cultivar más difundido de *Digitaria* es Irene (cv. Sudafricana) de origen sudafricano, público; el cual presenta dificultades para el establecimiento y la producción de semilla. En Australia, se han desarrollado otros cultivares con el objetivo de mejorar la calidad de la semilla, la homogeneidad de la forma de crecimiento, la floración temprana y una mejor relación hoja:tallo. En San Luis, se obtuvo el cv. Avanzada INTA, que tiene mejor adaptación a las condiciones edafo-climáticas de la región semiárida; aunque aún no se encuentra disponible comercialmente (Rimieri, 1997).

En la EEA-INTA Villa Mercedes se realizó el mejoramiento de esta especie, a partir de plantas del cv. Irene, que soportó las heladas de septiembre-octubre. A partir de esa subpoblación se produjeron semillas sintéticas, denominadas “Mejorada INTA”.

Estudios previos determinaron que el cv. Mejorada INTA disminuye el porcentaje y la velocidad de germinación, cuando se lo somete a bajas temperaturas (10°C) durante 7, 15 y 30 días de tratamiento (Quiroga, 2003). La metilación de los residuos de citocina

en el ADN genómico de plantas sometidas a bajas temperaturas mostró una variación en el cv. Mejorada INTA, y el cv. Sudafricana se mantuvo sin cambios; lo cual sugiere que los mecanismos de control que permite desreprimir genes que expresan proteínas de defensa asociadas al frío o la desecación están activados en el cv. Mejorada INTA (Quiroga *et al.*, 2004).

Terenti (2004) definió que las temperaturas óptimas para la germinación de esta especie es de 25 a 30°C y Digiambatista *et al.* (2010) determinaron que el estrés hídrico (-1,5 MPa), en combinación con las altas temperaturas (35°C), promueven descensos en el porcentaje de germinación.

Giulietti *et al.* (2007) determinaron que los lombricompuestos pecuarios en proporciones entre 40 a 100% mejoraron la germinación, producción, crecimiento y biomasa de las plantas de *Digitaria eriantha* cvs. Sudafricana y Mejorada INTA.

Pedranzani *et al.* (2005) indagaron sobre el efecto bajas temperaturas (4°C) durante 48 hs, 96 hs y 3 semanas en plántulas de *Digitaria eriantha* cv. Mejorada INTA; y observaron que la producción de materia seca aérea decreció significativamente a partir de la segunda semana de exposición; mientras que en raíces lo hizo a partir de la tercer semana, demostrando que el frío afecta la actividad fotosintética en esta especie y la producción de biomasa.

Garbero *et al.* (2011) expusieron que la tolerancia al frío en cv. Mejorada INTA está asociada al incremento de ácido abscísico y disminución de Jasmonatos, mayor estabilidad en las membranas, actividad de superóxidodismutasa y concentración de Glutación.

Además, Garbero *et al.* (2012), demostraron que, asociado a la tolerancia al frío, el cv. Mejorada INTA presenta estabilidad en los niveles de clorofilas y de citoquininas y un importante aumento de la auxina, ácido indol-3-acético (AIA).

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* (α -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 *Azospirillum brasilense* 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 *Azospirillum brasilense* 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*. La cepa *ipdC* es una cepa hipoproductora de ácido indol acético; por lo cual, se espera menos inducción de crecimiento, pero aún no hay literatura especializada publicada que describa sus efectos reales.

Materiales y métodos

1. Material biológico y condiciones de crecimiento del cultivo

Semillas de *Digitaria eriantha* cv. Mejorada INTA y *D. eriantha* cv. Sudafricana se 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 fotoperiodo 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 con agua destilada (control).
2. 4°C por 72 h. y soporte a capacidad de campo con agua destilada.
3. Regadas con 200 mM de NaCl durante un mes.
4. Regadas con 100 ml de Polietilen glicol 6000 PEG 6000 cada dos días, en tres concentraciones 0,5; 1,0 y 1,5 Mpa durante un mes.

Los tratamientos de estrés se aplicaron cuando las plantas tuvieron 10 cm de alto, a los 30 días de la siembra. Las mediciones tanto en el control como en los tratados se realizaron en el mismo momento, una vez finalizados los tratamientos de estrés.

Cepas bacterianas y medios de cultivos: las cepas de *A. brasilense* utilizadas fueron *A. brasilense* Az39 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 1×10^7 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, sumergiendo las macetas durante dos horas, en bandejas que contenían un volumen constante de solución nutritiva de Hoagland 25%, hasta el inicio del tratamiento del estrés. Una vez iniciado el estrés, las macetas de los tratamientos control y frío se regaron con agua destilada; y las otras dos, como se describió en los tratamientos.

2. 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 foliar (LF) y longitud radicular (LR), tomándose como muestra un *pool* de 10 plantas, con tres repeticiones.

3. Biomasa

En cada tratamiento de simbiosis y estrés se evaluó: peso fresco foliar (PFF), peso fresco radical (PFR), peso seco foliar (PSF) y peso seco radical (PSR), tomándose como muestra un *pool* de 10 plantas, con tres repeticiones.

4. Tratamiento estadístico de los datos

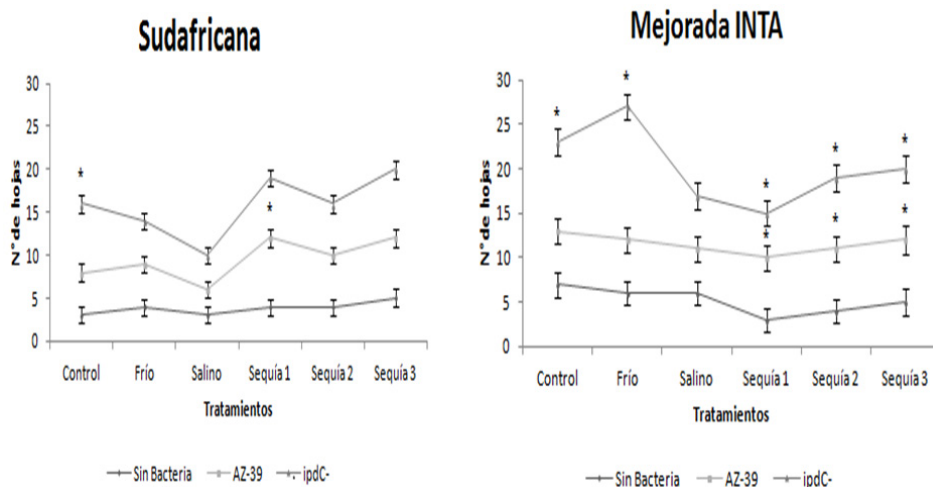
Los datos fueron analizados por el método estadístico INFOSTAT (Universidad Nacional de Córdoba) y los rangos múltiples de DUNCAN. Este test controla errores de tipo I, donde: $\alpha=0,05$ $df=16$ y $MSE=6.208333$, para un número de medias = 8 y un rango crítico de 4.305 a 4.893.

Resultados

En *Digitaria eriantha* cv. Sudafricana inoculada con la cepa ipdC, el número de hojas mostró aumentos significativos en el tratamiento control y en plantas inoculadas con la cepa AZ-39, en el tratamiento de estrés por sequía 0,5 Mpa, siempre respecto de las plantas sin bacteria. En el cv. Mejorada INTA, inoculada con la cepa ipdC, el número de hojas se vio incrementado en los tratamientos control y frío; por otro lado, en los tratamientos con sequía a presiones osmóticas de 0,5 Mpa, 1,0 y 1,5 Mpa, también aumentó el número de hojas, en las plantas inoculadas con ambas cepas, respecto de las plantas sin bacterias, y fue más significativo en plantas inoculadas con la cepa ipdC (figura 1).

Figura 1

Número de hojas de *Digitaria eriantha* 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).



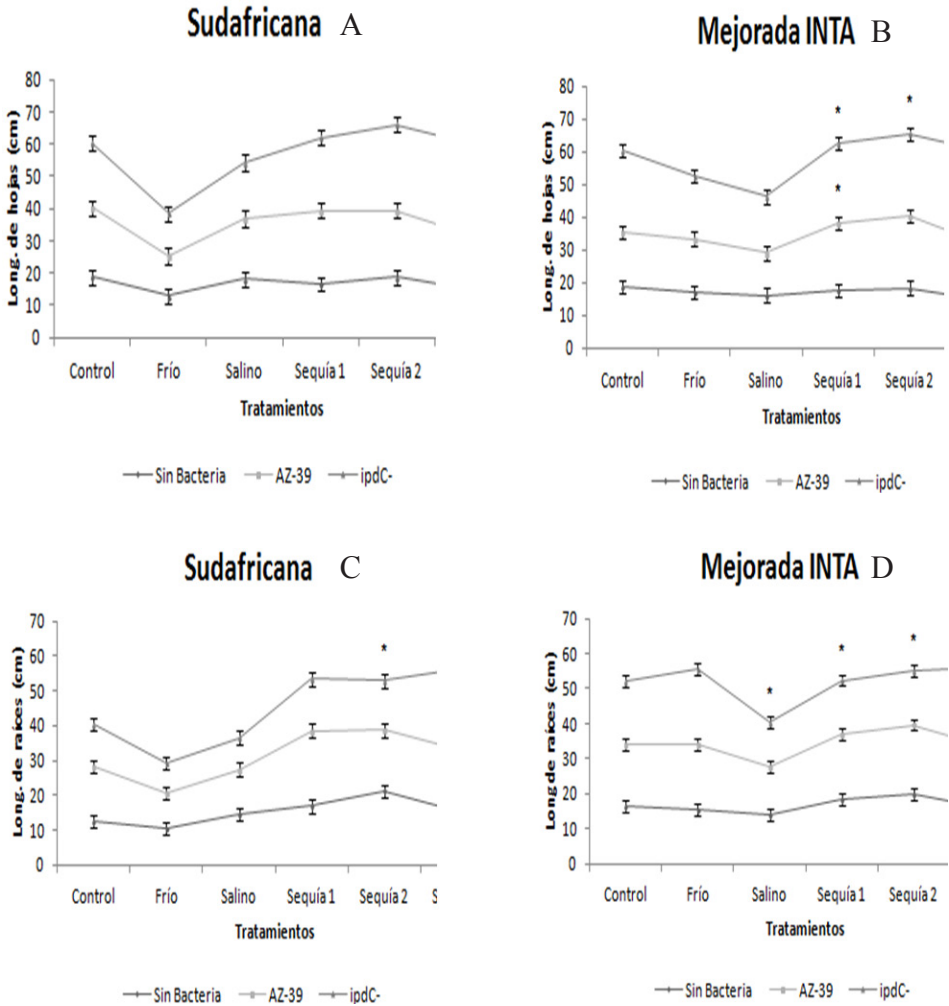
NOTA: Los valores representan la media \pm SE a partir de experimentos por triplicado; las letras indican diferencias significativas a un $p \leq 0,05$.

En el cv. Sudafricana, la LF —en los tratamientos control, frío y salinidad— no manifestó diferencias significativas con ninguna bacteria; sólo se observó un aumento significativo en el tratamiento de estrés por sequía con una presión osmótica de -1,5 Mpa, inoculado con la cepa ipdC- (figura 2A). En Mejorada INTA, la LF no presentó cambios significativos para plantas control, bajo frío o salinidad; aunque sí hubo un aumento significativo bajo 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 (figura 2B).

La LR 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 LR 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; existió un mayor crecimiento en plantas inoculadas con la cepa ipdC- (figura 2C). En el cv. Mejorada INTA, la LR incrementó en forma significativa bajo estrés salino y sequía bajo presiones osmóticas de -0,5, 1,0 y 1,5 Mpa, inoculados con la cepa ipdC- (figura 2D).

Figura 2

Longitud foliar y radical de *Digitaria eriantha* 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).



NOTA: Los valores representan la media \pm SE a partir de experimentos por triplicado; las letras indican diferencias significativas a un $p \leq 0,05$.

Cuadro 1

Peso fresco y peso seco foliar y radical de *Digitaria eriantha* cv. Sudafricana y cv. Mejorada INTA sin bacterias (SB) 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). Los valores son media \pm SE a partir de experimentos por triplicado, las letras indican diferencias significativas a un $p \leq 0,05$.

A	cv. Sudafricana				cv. Mejorada INTA			
	Peso Fresco Foliar (g)		Peso Fresco Raíces (g)		Peso Fresco Foliar (g)		Peso Fresco Raíces (g)	
Tratamientos	SB	AZ-39	ipdC-	ipdC-	SB	AZ-39	ipdC-	ipdC-
Control	3,3503 \pm 2,08d	9,2244 \pm 2,18b	10,6164 \pm 2,16b	10,6164 \pm 2,16b	11,2217 \pm 2,29b	6,9584 \pm 2,45c	22,8237 \pm 2,40a	22,8237 \pm 2,40a
Frío	1,9132 \pm 2,04d	3,6410 \pm 2,20d	3,7384 \pm 2,18d	3,7384 \pm 2,18d	4,8601 \pm 2,31d	8,3087 \pm 2,43b	12,7405 \pm 2,33b	12,7405 \pm 2,33b
Salinidad	4,7063 \pm 2,05d	3,5612 \pm 2,19d	4,4829 \pm 2,12d	4,4829 \pm 2,12d	6,6056 \pm 2,30c	3,5854 \pm 2,47d	5,6928 \pm 2,23cd	5,6928 \pm 2,23cd
Sequía 0,5 Mpa	2,9018 \pm 2,06d	5,5712 \pm 2,21c	10,7804 \pm 2,15b	10,7804 \pm 2,15b	2,4294 \pm 2,28d	5,2485 \pm 2,49c	12,0599 \pm 2,43b	12,0599 \pm 2,43b
Sequía 1,0 Mpa	4,1652 \pm 2,08d	5,8638 \pm 2,22c	9,8758 \pm 2,18b	9,8758 \pm 2,18b	4,7348 \pm 2,27d	6,3972 \pm 2,40c	11,1095 \pm 2,42b	11,1095 \pm 2,42b
Sequía 1,5 Mpa	4,2254 \pm 2,35d	12,7703 \pm 2,37b	23,7431 \pm 2,36 ^a	23,7431 \pm 2,36 ^a	4,3454 \pm 2,60d	12,7003 \pm 2,63 b	23,7561 \pm 2,64a	23,7561 \pm 2,64a
B	Peso Fresco de Raíces (g)				Peso Fresco de Raíces (g)			
Control	0,3843 \pm 1,634ef	7,1607 \pm 1,72b	8,2284 \pm 1,72b	8,2284 \pm 1,72b	7,8153 \pm 1,87b	5,6115 \pm 1,98c	15,9414 \pm 1,98a	15,9414 \pm 1,98a
Frío	0,2931 \pm 1,65ef	0,4232 \pm 1,72ef	0,2738 \pm 1,73ef	0,2738 \pm 1,73ef	1,8347 \pm 1,88d	4,4575 \pm 1,98c	9,6122 \pm 1,99b	9,6122 \pm 1,99b
Salinidad	0,6438 \pm 1,66ef	0,4578 \pm 1,70ef	0,5978 \pm 1,74ef	0,5978 \pm 1,74ef	3,1345 \pm 1,87d	1,5976 \pm 1,96de	2,9578 \pm 1,98d	2,9578 \pm 1,98d
Sequía 0,5 Mpa	0,5181 \pm 1,67ef	2,5915 \pm 1,71d	1,5016 \pm 1,79e	1,5016 \pm 1,79e	0,5722 \pm 1,87ef	2,0006 \pm 1,95d	1,8239 \pm 2,08d	1,8239 \pm 2,08d
Sequía 1,0 Mpa	2,5591 \pm 1,63d	3,4423 \pm 1,74d	5,9489 \pm 1,72c	5,9489 \pm 1,72c	2,1223 \pm 1,87d	2,9424 \pm 1,89d	5,9065 \pm 1,87c	5,9065 \pm 1,87c
Sequía 1,5 Mpa	2,5245 \pm 1,86d	8,0513 \pm 1,87b	15,7997 \pm 1,86 ^a	15,7997 \pm 1,86 ^a	2,500 \pm 2,14d	8,0500 \pm 2,14b	15,788 \pm 2,14a	15,788 \pm 2,14a

Continúa en la página 27

Viene de la página 26

		<i>cv. Sudafricana</i>				<i>cv. Mejorada INTA</i>			
		Peso Fresco Foliar (g)		ipdC		Peso Fresco Foliar (g)		ipdC	
Tratamientos	SB	AZ-39	SB	AZ-39	SB	AZ-39	SB	AZ-39	ipdC
C									
Control	0,8434±0,84d	2,8621±0,89c	3,4185±0,83c	3,2622±0,81c	3,4185±0,83c	1,9273±0,86d	6,6119±0,84b		
Frío	0,4037±0,82de	0,5819±0,87de	1,5106±0,82d	0,6034±0,86de	1,5106±0,82d	2,7961±0,89d	4,3186±0,83c		
Salinidad	1,2926±0,83d	0,8531±0,86d	1,9744±0,80d	0,966±0,90d	1,9744±0,80d	1,2728±0,88d	1,6384±0,85d		
Sequía 0,5 Mpa	1,1522±0,90d	1,6923±0,80d	1,065±0,81d	3,6357±0,87c	1,065±0,81d	1,299±0,89d	3,8034±0,86c		
Sequía 1,0 Mpa	1,7968±0,89d	2,3549±0,81d	1,8896±0,79	3,1378±0,85c	1,8896±0,79	2,2469±0,85d	3,3988±0,85c		
Sequía 1,5 Mpa	1,6628±0,94d	4,3855±0,94c	1,6700±0,93d	10,5309±0,94 ^a	1,6700±0,93d	4,4005±0,92c	106780±0,92a		
D									
		Peso Seco de Raíces (g)		Peso Seco de Raíces (g)		Peso Seco de Raíces (g)		Peso Seco de Raíces (g)	
Control	0,2106±0,31d	0,9047±0,33c	1,694±0,78d	1,0895±0,33c	1,694±0,78d	1,3001±0,82c	2,8899±0,82b		
Frío	0,1184±0,31d	0,1311±0,33d	0,4626±0,78d	0,1040±0,33d	0,4626±0,78d	0,9686±0,82c	1,7682±0,82c		
Salinidad	0,3076±0,31d	0,0649±0,33e	0,5983±0,78d	0,2327±0,33d	0,5983±0,78d	0,4198±0,82d	0,6342±0,82d		
Sequía 0,5 Mpa	0,2831±0,31d	0,6115±0,33d	0,2826±0,78d	0,5644±0,33d	0,2826±0,78d	0,3183±0,82d	0,9202±0,82c		
Sequía 1,0 Mpa	0,8721±0,31d	0,7975±0,33d	0,3711±0,78d	1,1798±0,33c	0,3711±0,78d	0,9021±0,82c	1,3722±0,82c		
Sequía 1,5 Mpa	0,7493±0,36d	1,8266±0,36b	0,7400±0,89d	4,1159±0,36 ^a	0,7400±0,89d	1,8270±0,89b	4,1890±0,8a		

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 se 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. Bajo frío y salinidad, el PFF no varió en ninguno de los tratamientos sin inoculación y con ninguna de las dos cepas (cuadro 1A).

En el cv. Mejorada INTA, se encontraron aumentos significativos en el tratamiento control, inoculado con la cepa ipdC 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, fue más notorio con la cepa ipdC.

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, 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 respondió con mayores valores de PFF que AZ-39 (cuadro 1A).

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. 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; 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 (cuadro 1B).

En el cv. Mejorada INTA, el PFR en el tratamiento sin estrés se incrementó con la cepa ipdC y disminuyó con la cepa AZ-39; con frío, el PFR aumentó en forma significativa 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 (cuadro 1B).

El peso seco foliar (PSF) en el cv. Sudafricana, aumentó en forma significativa en el tratamiento control, inoculado 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; 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 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; y en los tratamientos con sequía se observaron incrementos significativos en todos los potenciales inoculados con la cepa ipdC (cuadro 1C).

El peso seco de raíces (PSR) en *Digitaria eriantha* 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. La cepa AZ-39 tuvo un efecto mitigatorio en la sequía severa, incrementando el valor de PSR; y la cepa ipdC 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 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 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.

Cuadro 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 (-); sin cambios (en blanco).

A	<i>cv. Sudafricana</i>			<i>cv. Mejorada INTA</i>		
	SB	<i>Peso Fresco Foliar (g)</i>		SB	<i>Peso Fresco Foliar (g)</i>	
<i>Tratamientos</i>	SB	AZ-39	ipdC	SB	AZ-39	ipdC
Control		+	+		-	+
Frío					+	+
Salinidad					-	
Sequía 0,5 Mpa		+	+		+	+
Sequía 1,0 Mpa		+	+		+	+
Sequía 1,5 Mpa		+	+		+	+
B		<i>Peso Fresco de Raíces (g)</i>			<i>Peso Fresco de Raíces (g)</i>	
Control		+	+		-	+
Frío					+	+
Salinidad						
Sequía 0,5 Mpa		+			+	
Sequía 1,0 Mpa			+			+
Sequía 1,5 Mpa		+	+			+

Continúa en la página 30

Viene de la página 29

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

Discusión

Las plantas de *Digitaria eriantha* bajo condiciones de estrés abiótico ven afectados los parámetros morfo-fisiológicos, la producción de hormonas y pigmentos fotosintéticos (Garbero *et al.*, 2011). El propósito de este trabajo fue establecer si *D. eriantha* cvs. 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 PFF, PFR, PSF y PSR cuando fueron inoculados con *Azospirillum brasilense* cepa *ipdC*; lo cual indica el beneficio de la asociación 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. Cassán *et 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 LR.

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 cual quedó demostrado en los parámetros de PFF y PFR; PSF y PSR y longitud de los órganos vegetativos. Dado que *Digitaria 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*, PFF y PFR, PSF y PSR incrementaron frente al frío, y en las plantas inoculadas con la cepa AZ-39, sólo 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 antioxidante y hormonal, probablemente incrementados por estas asociaciones simbióticas.

Para combatir las condiciones de salinidad, las plantas han desarrollado diferentes estrategias, que implican la acción de diferentes mecanismos (transporte de solutos compatibles, señalización de procesos en desarrollo, etcétera) 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 daño alguno 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, 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 (Potters *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 sólo en algunos parámetros. La cepa *ipdC* es más eficiente en la mitigación del estrés por sequía, más aún en altas concentraciones (1,5 Mpa). La LR disminuyó en concentraciones de PEG de 0,5 y 1,0 Mpa, no así a la mayor concentración; esto corroboraría el efecto compensatorio.

Giulietti *et al.* (2008), demostraron que *Digitaria 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 *Digitaria 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.

Conclusiones

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 la superioridad del cv Mejorada INTA en forma independiente; y en simbiosis, con *A. brasilense*, inoculado con ambas cepas.

Agradecimientos

Agradecemos a la Secretaria de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de San Luis; quien, mediante el Proyecto consolidado PROICO 2-2914, suministró las instalaciones y elementos para el desarrollo de la investigación. A la Universidad Nacional de Río Cuarto; quien desarrolló los inóculos bacterianos. Y al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Villa Mercedes, San Luis, quien suministró las semillas de los dos cultivares de *Digitaria eriantha*.

Literatura citada

- Bashan, Y.; Salazar, B.G.; Moreno, M.; López, B.R. y Linderman, R.G. (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.
- Breckle, J.W. (2002). *Walter's Vegetation of the Earth. The Ecological Systems of the Geo-Biosphere*. Springer, Berlin Heidelberg. Berlin, Alemania. 300 pp.
- Cassán, F.; Perrig, D.; Sgroy, V.; Masciarelli, O.; Penna, C. y 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.). *Eur. J. Soil Biol.* 45(1):28-35.
- Digiambatista, G.A.; Garbero, M.; Ruiz, M.; Giulietti, A. y Pedranzani, H.E (2010). Germination of *Trichloris crinita* and *Digitaria eriantha* in abiotic stress conditions. *Revista Pastos y Forrajes* 33(4):1-9.
- Fulchieri, M. y Frioni, L. (1994). *Azospirillum* inoculation on maize (*Zea mays*): effect on yield in experiment in central Argentina. *Soil. Biol. Biochem.* 26 (2): 921-923.
- Garbero, M.; Pedranzani, H.E.; Zirulnik, F.; Molina, A.; Pérez-Chaca, M.V.; Vigliocco, A. y Abdala, G. (2011). Short term cold stress in two cultivars of *Digitaria eriantha*: effects on stress-related hormones and antioxidants defense system. *Acta Phys. Plant* 33(2):497-507.
- Garbero, M.; Andrade, A.; Reinoso, H.; Fernández, B.; Cuesta, C.; Granda, V. y Pedranzani, H. (2012). Short-term cold stress differentially affect growth, anatomy and hormone levels in two cultivars of *Digitaria eriantha*. *Acta Physiol. Plant.* 34(6):2079-2091.
- Giulietti, J.D.; Echeverría, J.C. y Collado, A.D. (2003). Condicionantes históricos de la desertificación en San Luis. En: Aguilera M.O. y Panigatti J.L. (Eds. INTA). *Con las metas claras. La Estación Experimental Agropecuaria San Luis: 40 años a favor del desarrollo sustentable*. INTA. Buenos Aires, Argentina. 228 pp.
- Giulietti, A.; Pedranzani, H.E.; Ruiz, O.M.; Garbero, M.M. y Terenti, O. (2007). Biological response of *Digitaria eriantha* cultivars to soil amendment with earth worm humus. *Revista Pastos y Forrajes* 30(1):119-131.
- Giulietti, A.L.; Ruiz, O.M.; Pedranzani, H.E. y Terenti, O. (2008). Efecto de cuatro lombricompuestos en el crecimiento de plantas de *Digitaria eriantha*. *Revista Internacional de Botánica Experimental Phytol. Fundación Rómulo Raggio*. Argentina. 77(1):137-149.
- Levitt, J. (1980). *Response of plants to environmental stresses*. Volume II. Water, radiation, salt, and other stresses. 1980. Second Ed. 607 pp.

- Pedranzani, H.E.; Ruiz, O.M.; Garbero, M. y Terenti, O. (2005). Efectos del frío sobre los parámetros de producción de *Digitaria eriantha*. *Revista Internacional de Botánica Experimental Phytón. Fundación Rómulo Raggio*. Argentina. 74 (1): 211-216.
- Pedranzani, H.E.; Rodríguez-Rivera, M.; Gutiérrez, M.; Porcel, R.; Hause, B. y Ruiz-Lozano, J.M. (2015). Arbuscular mycorrhizal symbiosis regulates physiology and performance of *Digitaria eriantha* plants subjected to abiotic stresses by modulating antioxidant and jasmonate levels. *Mycorrhiza* 26(2):141-152.
- Potters, G.; Pasternak, T.P.; Guisez, Y.; Palme, K.J. y Jansen, M.A. (2007). Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends Plant Sci.* 12(3): 99-105.
- Quiroga, A.M. (2003). Respuestas morfofisiológicas de *Digitaria eriantha* Steudel subs. *Eriantha* y producción de callos como germoplasma factible para seleccionar plantas resistentes al frío. Tesis de Ingeniería Agronómica. FICES. Universidad Nacional de San Luis, Argentina. 70 pp.
- Quiroga, A.M.; Pedranzani, H.E.; Rodríguez, R. y Abdala, G. (2004). Metilación de ADN genómico en dos cultivares de *Digitaria eriantha* a bajas temperaturas. *Pastos y Forrajes* 27(4):317-320.
- Retuerto, R.; Rodríguez-Roiloa, S.; Fernández-Lema, B. y Obeso, J.R. (2003). Respuestas compensatorias de plantas en situaciones de estrés. *Revista Ecosistemas* (1).
- Retuerto, R.; Rodríguez-Roiloa, S.; Fernández-Lema, B. y Obeso, J.R. (2003). Respuestas compensatorias de plantas en situaciones de estrés. *Ecosistemas* 2003/1. Disponible en: <http://www.aeet.org/ecosistemas/031/investigacion4.htm> (consultado en mayo de 2017).
- Rimieri, P. (1997). *Creación de cultivares mejorados e identificables de Poa ligularis y Digitaria eriantha*. (1997). Informe de convenio. En: INTA, EEA San Luis, Argentina. Informe técnico de proyectos (Área de Producción Animal). 183-184 pp.
- Shao, H.B.; Chu, L.Y.; Jaleel, C.A. y Zhao, C.X. (2008). Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *C.R. Biol.* 331(3): 215-225.
- Taiz, L. y Zeiger E. (2006). *Stress physiology. Plant Physiology*. 4a. Ed. Sinauer Associates. 690 pp.
- Terenti, O. (2004). Evolución del crecimiento y la calidad de la semilla en *Digitaria eriantha*. *Pastos y Forrajes* 27(1):21-24.
- Thuar, A.; Carlier, E. y 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. *Revista de las Jornadas Científico Técnicas de Biología del Suelo y V Encuentro sobre Fijación Biológica del Nitrógeno Revista*. San Salvador de Jujuy, Argentina. 37 pp.
- Valladares, F. (2004). Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante. Ministerio de Medio Ambiente. *Ecosistemas* 14 (2): 203-204.
- Vella, M.; Masciarelli, O.; Grion, H.; Peman, R.; Cassán, F. y Luna, V. (2005). *Evaluación de la germinación, establecimiento y crecimiento temprano de semillas de Chloris gayana y Panicum maximum inoculadas con A. brasilense Az39*. V Reunión Nacional de Biología de Suelos y V Encuentro sobre Fijación Biológica de Nitrógeno en San Salvador de Jujuy Argentina. 40 pp.
- Veneciano, J.H.; Terenti, O.A. y Federigi, M.E. (2002). Factores climáticos y pasturas megatérmicas perennes. *Revista de la Sociedad Rural de Jesús María* (Córdoba, Argentina) 130 (1): 39-42.

Recepción: 20 de junio de 2016

Envío arbitraje: 10 de septiembre de 2016

Dictamen: 25 de diciembre 2016

Aceptado: 18 de enero de 2017