



**Universidad Nacional del Nordeste
Facultad de Ciencias Agrarias
Maestría en Producción Vegetal**

Tesis de Maestría

**INOCULACIÓN CON RIZOBACTERIAS
EN *Paspalum atratum* CV. CAMBÁ FCA.
EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO, PRODUCCIÓN
DE BIOMASA Y MICORRIZACIÓN.**

Tesista

Ing. Agr. Analía Mango

Directora: Ing. Agr. (M. Sc.) María C. Iglesias

Co-Director: Ing. Agr. (Dr.) Mario H. Urbani

Año 2019

ÍNDICE GENERAL

Agradecimientos	V
Índice de Tablas	VI
Índice de Figuras	VII
Abreviaturas	IX
Resumen	XI
Palabras clave	XI
Abstract	XII
Keywords	XII
CAPÍTULO I - INTRODUCCIÓN GENERAL	1
Hipótesis	2
Objetivos	2
Objetivo General	2
Objetivos Específicos	2
CAPÍTULO II - MARCO TEÓRICO Y REVISIÓN DE LITERATURA	3
1. Importancia de las pasturas cultivadas en la provincia de Corrientes	3
2. El fósforo como limitante de la producción forrajera	3
3. <i>Paspalum atratum</i> cv. Cambá FCA	4
4. Empleo de microorganismos benéficos para una agricultura sustentable	5
5. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal	6
5.a. Conceptos generales	6
5.b. Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal	6
5.b.1. PGPR como fitoestimuladores	7
5.b.2. PGPR como biofertilizantes	9
5.c. Potencial de <i>Azospirillum</i> , <i>Pseudomonas</i> y <i>Bradyrhizobium</i> como PGPR	10
5.c.1. <i>Azospirillum</i> sp.: características y usos	10
5.c.2. Uso de <i>Pseudomonas fluorescens</i> como PGPR	11
5.c.3. <i>Bradyrhizobium</i> sp. como PGPR con no-leguminosas	12
6. Micorrizas arbusculares	13
6.a. Generalidades	13
6.b. Papel de las micorrizas arbusculares en la nutrición fosfórica de las plantas	15
7. Interacciones entre PGPR y micorrizas arbusculares	15
CAPÍTULO III – EFECTO DE LA INOCULACIÓN CON RIZOBACTERIAS SOBRE EL CRECIMIENTO, PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y MICORRIZACIÓN DE <i>Paspalum atratum</i> cv. Cambá FCA - ENSAYO EN MACETAS	18
1. Materiales y métodos	18
1.1. Material biológico.....	18
1.2. Contenedores y sustrato	18

1.3. Tratamientos.....	18
1.4. Instalación del ensayo	19
1.5. Diseño experimental y variables evaluadas	19
1.6. Análisis estadístico	20
2. Resultados obtenidos.....	20
2.1. Colonización de raíces	20
2.2. Crecimiento, producción de biomasa y micorrización espontánea	20
2.2.a. Micorrización espontánea.....	21
2.2.b. Altura.....	21
2.2.c. Número de macollos.....	22
2.2.d. Volumen radical	22
2.2.e. Contenido de biomasa.....	23
2.3. Concentración de P en brotes.....	24
3. Discusión.....	24
3.1. Colonización de raíces	24
3.2. Micorrización espontánea.....	24
3.2.a. Efecto de la fertilización fosfórica sobre la micorrización espontánea	24
3.2.b. Relación entre la micorrización espontánea y concentración de P en brotes...	25
3.2.c. Efecto de la inoculación con PGPR sobre la micorrización espontánea	25
3.3. Crecimiento y producción de biomasa	26
3.4. Concentración de P en brotes.....	27
CAPÍTULO IV – EFECTO DE LA INOCULACIÓN CON RIZOBACTERIAS SOBRE EL CRECIMIENTO, PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y MICORRIZACIÓN DE <i>Paspalum atratum</i> cv. Cambá FCA - ENSAYO A CAMPO	28
1. Materiales y métodos	28
1.1. Material biológico.....	28
1.2. Sitio de estudio	28
1.3. Tratamientos y diseño experimental	28
1.4. Preparación del suelo y establecimiento de las parcelas	29
1.5. Variables evaluadas	30
1.6. Análisis estadístico	31
2. Resultados obtenidos.....	32
2.1. Colonización de raíces	32
2.2. Crecimiento, producción de biomasa y micorrización espontánea	32
2.2.a. Micorrización espontánea.....	33
2.2.b. Altura.....	33
2.2.c. Cobertura	34
2.2.d. Macollos.....	35
2.2.e. Volumen radical	35
2.2.f. Contenido de biomasa.....	35

2.2.g. Concentración de P en brotes	37
2.2.h. Tallos fértiles	38
3. Discusión	38
3.1. Colonización de raíces	38
3.2. Micorrización espontánea.....	39
3.2.a. Efecto de la fertilización fosfórica sobre la micorrización espontánea	39
3.2.b. Relación entre la micorrización espontánea y concentración de P en brotes...	39
3.2.c. Efecto de la inoculación con PGPR sobre la micorrización espontánea	40
3.3. Crecimiento y producción de biomasa	40
CAPÍTULO V – CONCLUSIONES	43
BIBLIOGRAFÍA.....	45
ANEXOS.....	56
1. Resultados del análisis realizado al suelo utilizado en los experimentos y metodología de medición	56
2. Recomendación de fertilización con fósforo para la implantación de <i>P. atratum</i> cv. Pojuca	56
3. Fotografías del experimento en macetas.....	56
4. Fotografías del experimento a campo.....	59

AGRADECIMIENTOS

A Dios, que me acompaña cada día de mi vida.

A mi Directora de tesis, la Ing. Agr. (M. Sc.) María Cándida Iglesias por los conocimientos y asesoramientos brindados a cada instante del desarrollo de esta tesis, por su constante predisposición y tiempo brindado incondicionalmente.

A mi Co-director de tesis, Ing. Agr. (Dr.) Mario H. Urbani por las recomendaciones, conocimientos y apoyo brindados y la gran predisposición manifestada.

A la Cátedra de Microbiología de la FCA de la UNNE por brindarme el espacio y los insumos necesarios para realizar los análisis de laboratorio. En especial a Amalia y Marcela por enseñarme y guiarme en cada paso.

A la cátedra de Forrajicultura de la FCA-UNNE por otorgarme las semillas para concretar la experiencia que avaló este trabajo.

Al Instituto Agrotécnico "Pedro M. Fuentes Godo" por permitirme llevar a cabo los análisis foliares requeridos en esta investigación.

A mis padres, principales promotores de mis sueños, por la posibilidad de concretar esta carrera y por todos los consejos, valores y principios que me inculcaron.

A Lucas y Amanda, razones de mi vida, por su paciencia, por el tiempo de espera, por el amor y la fuerza que me hicieron sentir capaz de seguir adelante y culminar este proyecto.

A mi padrino y su familia, por recibirme en su hogar con tanto cariño y predisposición mientras cursé las maestrías y realicé los análisis de laboratorio.

A Cecilia y Analía, mis incondicionales compañeras de banco, con quienes construí una amistad sincera y duradera.

A mis otros compañeros de Maestría, en especial a Anabell, Belén, Gustavo, Aldo, Julio y Ema, por tantos buenos momentos que hemos compartido y por el intercambio de risas y experiencias.

ÍNDICE DE TABLAS

1. Inoculación de <i>P. atratum</i> cv. Cambá FCA con PGPR - Tratamientos aplicados en el ensayo en macetas.....	18
2. Variables evaluadas en el ensayo en macetas y metodologías empleadas	19
3. Resultados del ANAVA factorial para los efectos de la inoculación con PGPR bajo dos niveles de fertilización fosfórica de <i>P. atratum</i> cv. Cambá FCA. Ensayo en macetas	21
4. Inoculación de <i>P. atratum</i> cv. Cambá FCA con PGPR - Tratamientos aplicados en el ensayo a campo	29
5. Variables evaluadas en el ensayo a campo y momento de evaluación	31
6. Resultados del ANAVA factorial para los efectos de la inoculación con PGPR bajo dos niveles de fertilización fosfórica de <i>P. atratum</i> cv. Cambá FCA. Ensayo a campo	32
7. Características químicas y clase textural del suelo utilizado en los experimentos.	56

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Porcentaje de micorrización espontánea de plantas de <i>P. atratum</i> cv. Cambá FCA inoculadas con PGPR bajo dos niveles de fertilización fosfórica. Ensayo en macetas.....	21
2. Altura de plantas de <i>P. atratum</i> cv. Cambá FCA inoculadas con PGPR. Ensayo en macetas.....	22
3. Macollos de plantas de <i>P. atratum</i> cv. Cambá FCA bajo dos niveles de fertilización fosfórica. Ensayo en macetas	22
4. Efecto de la inoculación con PGPR (a) y fertilización fosfórica (b) sobre el volumen radical de plantas de <i>P. atratum</i> cv. Cambá FCA. Ensayo en macetas	23
5. Producción de biomasa total, aérea y radicular de plantas de <i>P. atratum</i> cv. Cambá FCA inoculadas con PGPR bajo dos niveles de fertilización fosfórica. Ensayo en macetas.....	23
6. Concentración de P de plantas de <i>P. atratum</i> cv. Cambá FCA inoculadas con PGPR bajo dos niveles de fertilización fosfórica. Ensayo en macetas	24
7. Esquema de las unidades experimentales del ensayo a campo y detalle de una parcela.	29
8. Esquema de una unidad experimental con sus áreas de muestreo	30
9. Porcentaje de micorrización espontánea en plantas de <i>P. atratum</i> cv. Cambá FCA inoculadas con PGPR bajo dos niveles de fertilización fosfórica. Valores obtenidos en el primer muestreo del ensayo a campo	33
10. Altura de plantas de <i>P. atratum</i> cv. Cambá FCA inoculadas con PGPR bajo dos niveles de fertilización fosfórica. Valores obtenidos en el primer y segundo muestreo del ensayo a campo	34
11. Altura de plantas de <i>P. atratum</i> cv. Cambá FCA inoculadas con PGPR. Valores obtenidos en el tercer muestro del ensayo a campo	34
12. Cobertura registrada para parcelas de plantas de <i>P. atratum</i> cv. Cambá FCA inoculadas con PGPR. Valores obtenidos en el tercer muestro del ensayo a campo	35
13. Número de macollos de plantas de <i>P. atratum</i> cv. Cambá FCA inoculadas con PGPR. Valores obtenidos en el primer y tercer muestro del ensayo a campo	35
14. Biomasa de la parte aérea de plantas de <i>P. atratum</i> cv. Cambá FCA inoculadas con PGPR bajo dos niveles de fertilización fosfórica. Valores obtenidos en el primer y segundo muestro del ensayo a campo	36
15. Efecto de la inoculación con PGPR (a) y fertilización fosfórica (b) sobre la biomasa de la parte aérea de plantas de <i>P. atratum</i> cv. Cambá FCA. Valores obtenidos en el tercer muestro del ensayo a campo	36
16. Efecto de la inoculación con PGPR (a) y fertilización fosfórica (b) sobre la biomasa total de plantas de <i>P. atratum</i> cv. Cambá FCA. Valores obtenidos en el primer muestro del ensayo a campo	37
17. Efecto de la inoculación con PGPR (a) y fertilización fosfórica (b) sobre la biomasa radical de plantas de <i>P. atratum</i> cv. Cambá FCA. Valores obtenidos en el primer muestro del ensayo a campo	37

18. Concentración de P de <i>P. atratum</i> cv. Cambá FCA bajo dos niveles de fertilización fosfórica. Valores obtenidos en el primer muestreo del ensayo a campo.....	38
19. Número de tallos fértiles de plantas de <i>P. atratum</i> cv. Cambá FCA inoculadas con PGPR. Valores obtenidos en el tercer muestro del ensayo a campo	38
20. Inoculación de semillas de <i>P. atratum</i> cv. Cambá FCA (izq.) y preparación de macetas (der.)	56
21. Siembra de semillas de <i>P. atratum</i> cv. Cambá FCA (izq.) y posterior disposición de las macetas en diseño completamente aleatorizado (der.)	56
22. Plantas de <i>P. atratum</i> cv. Cambá FCA en macetas al momento de cosecha (30 días desde la emergencia)	57
23. Medición de altura (izq.) y recuento de macollos (der.) de plantas de <i>P. atratum</i> cv. Cambá FCA en macetas a los 30 días desde la emergencia.	57
24. Cosecha de plantas de <i>P. atratum</i> cv. Cambá FCA (izq.) y medición del volumen radical (der.) a los 30 días desde la emergencia en el ensayo en macetas	57
25. Separación parte aérea-sistema radical (izq.) y medición de peso seco (der.) luego de secado en estufa hasta peso constante de plantas de <i>P. atratum</i> cv. Cambá FCA del ensayo en macetas	57
26. Tinción de raíces de plantas de <i>P. atratum</i> cv. Cambá FCA del ensayo en macetas para evaluar micorrización espontánea.....	58
27. Presencia de estructuras micorrízicas en raíces de plantas de <i>P. atratum</i> cv. Cambá FCA observadas con microscopio óptico. Ensayo en macetas.....	58
28. Preparación de medio de cultivo (izq), siembra de raíces (medio) y selección de colonias para repique para evaluar la colonización de raíces por PGPR. Ensayo en macetas	58
29. Tinción de Gram (izq) y observación en microscopio óptico (medio y der.) para evaluar la colonización de raíces por PGPR. Ensayo en macetas.....	58
30. Delimitación de parcelas (izq) e inocupalción de semillas de <i>P. atratum</i> cv. Cambá FCA (der.) para la instalación del ensayo a campo.....	59
31. Siembra de semillas de <i>P. atratum</i> cv. Cambá FCA (izq). Detalle de las semillas y del fertilizante dispuestos en la línea de siembra (der.). Ensayo a campo	59
32. Primer muestreo a campo. Vista de las parcelas a los 30 días desde la emergencia (izq.-der.)	59
33. Primer muestreo a campo. Cosecha de plantas de <i>P. atratum</i> cv. Cambá FCA (izq) y limpieza de raíces para separar partículas grandes de suelo (der.)	59
34. Primer muestreo a campo. Medición de altura de plantas de <i>P. atratum</i> cv. Cambá FCA (izq.) y evaluación de la cobertura (der.)	60
35. Siembra de raíces (izq), repique (medio) y observación en microscopio óptico (der.) para evaluar la colonización de raíces por PGPR. Ensayo a campo.....	60
36. Segundo muestreo a campo. Vista de las parcelas a los 90 días desde la emergencia (izq.) y medición de altura de plantas de <i>P. atratum</i> cv. Cambá FCA (der.)	60
37. Tercer muestreo a campo. Vista de las parcelas a los 150 días desde la emergencia (izq) y detalle de una inflorescencia de <i>P. atratum</i> cv. Cambá FCA (der.)	60

ABREVIATURAS

%	Porcentaje
%.m ⁻²	Porcentaje por metro cuadrado
°C	Grados Celsius
ACC	1-amino-ciclopropano-1-carboxilato
AIA	Ácido indol-3-acético
ANAVA	Análisis de la Varianza
AzP0	Tratamiento inoculado con <i>Azospirillum brasilense</i> Az39 sin fertilizar
AzP1	Tratamiento inoculado con <i>Azospirillum brasilense</i> Az39 fertilizado
BrP0	Tratamiento inoculado con <i>Bradyrhizobium japonicum</i> E109 sin fertilizar
BrP1	Tratamiento inoculado con <i>Bradyrhizobium japonicum</i> E109 fertilizado
Ca	Calcio
CK	Citoquininas
cm	Centímetros
Ed./ Eds.	Editor/es
EMA	Extracto de malta-agar
Et al	Et alii, expresión latina que significa 'y otros'
FCA	Facultad de Ciencias Agrarias
g	gramos
GA	Giberelinas
H ₂ O	Agua
H ₂ O ₂	Agua oxigenada
H ₂ PO ₄ ⁻	Anión dihidrogenofosfato
HCl	Cloruro de hidrógeno
HMA	Hongos formadores de micorrizas arbusculares
HPO ₄ ²⁻	Anión hidrogenofosfato
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
K	Potasio
Kg.ha ⁻¹	Kilogramos por hectárea
Km ²	Kilómetros cuadrados
KOH	Hidróxido de potasio
l.ha ⁻¹	Litros por hectárea
m	Metros
m ²	Metros cuadrados
Mg	Magnesio

MHB	Bacterias colaboradoras de micorrizas (siglas del Inglés Mycorrhiza Helper Bacteria)
MO	Materia Orgánica
N°	Número
N°.pl ⁻¹	Número por planta
N ₂	Gas dinitrógeno
NFb	Nitrogen-free semisolid malate
NH ⁴⁺	Catión amonio
N-P-K	Nitrógeno - Fósforo y Potasio
P	Fósforo
P ₂ O ₅	Pentaóxido de difósforo
PGPR	Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (siglas del inglés <i>Plant Growth-Promoting Rhizobacteria</i>)
pH	Potencial Hidrógeno
pp.	Páginas
PSB	Bacterias Solubilizadoras de Fósforo (siglas del inglés <i>Phosphate Solubilizing Bacteria</i>)
PSM	Microorganismo Solubilizador de Fósforo (siglas del inglés <i>Phosphate Solubilizing Microorganisms</i>)
PSP0	Tratamiento inoculado con <i>Pseudomonas fluorescens</i> sin fertilizar
PSP1	Tratamiento inoculado con <i>Pseudomonas fluorescens</i> fertilizado
SFT	Super fosfato triple de calcio
TeF0	Testigo sin inoculación sin fertilizar
TeF1	Testigo sin inoculación fertilizado
UFC.ml ⁻¹	Unidades formadoras de colonias por mililitro
UNNE	Universidad Nacional del Nordeste
vol.	Volumen

RESUMEN

Paspalum atratum cv Cambá FCA es una gramínea perenne de ciclo estival con alto potencial forrajero para el nordeste argentino. Los bajos contenidos de fósforo en los suelos de esta región pueden afectar el crecimiento y productividad del forraje, siendo preciso mejorar la eficiencia de la fertilización fosfórica utilizando las mejores combinaciones de microorganismos benéficos. Se destacan las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), que actúan mediante la producción de fitohormonas y la solubilización de fósforo, y los hongos micorrízicos arbusculares, que permiten explorar mayor volumen de suelo mejorando la captación de agua y fósforo. Se evaluó la respuesta a la inoculación con PGPR y su interacción con la micorrización espontánea sobre el crecimiento y producción de biomasa del cv. Cambá FCA, con y sin el agregado de fósforo. Se realizaron dos experimentos factoriales, uno en macetas y otro a campo, cuyos factores fueron inoculantes (*Azospirillum brasilense* Az39, *Pseudomonas fluorescens*, *Bradyrhizobium japonicum* E109 y testigo), y fertilización fosfórica (sin fertilizar y fertilizado con 60 kg.ha⁻¹ de P₂O₅), utilizando un suelo con bajo contenido de fósforo (1,06 ppm). Se evaluó en ambos experimentos la colonización radical, micorrización espontánea, altura, volumen radical, biomasa radical, aérea y total, macollos y porcentaje de fósforo y a campo cobertura y tallos fértiles. Se realizó un ANAVA y Test de Tukey. En ambos experimentos, pudo comprobarse la colonización de raíces. Sin el agregado de fósforo, *A. brasilense* promovió la micorrización espontánea, la cual disminuyó en tratamientos fertilizados. El tenor de fósforo aumentó con la fertilización y no estuvo relacionado con la micorrización. En general, los tratamientos inoculados y fertilizados mostraron una mejor respuesta. *B. japonicum* promovió el crecimiento y la producción de biomasa del cv. Cambá FCA en macetas y a campo, sin embargo no se encontró una interacción constante entre esta PGPR y la fertilización por lo que no puede afirmarse que la inoculación con esta cepa podría mejorar la eficacia de la fertilización fosfórica. La realización de pruebas similares y la obtención de resultados comparables a los presentes en sistemas productivos reales bajo pastoreo con diferentes dosis de fertilización fosfórica determinarán adecuadamente la ventaja de usar a la cepa E109 como PGPR en cultivos de especies forrajeras en la región nordeste de Argentina.

Palabras clave: PGPR; HMA; *Paspalum atratum*; Cambá FCA; *Azospirillum brasilense*; *Bradyrhizobium japonicum*; *Pseudomonas fluorescens*; micorrización espontánea; crecimiento; biomasa.

ABSTRACT

Paspalum atratum cv Cambá FCA is a summer cycle perennial grass with high forage potential for the northeast of Argentina. The low phosphorus content in the soils of this region can affect the growth and productivity of the forage, being necessary to improve the efficiency of the phosphoric fertilization using the best combinations of beneficial microorganisms. The plant growth promoting rhizobacteria (PGPR), which act by the production of phytohormones and the solubilization of phosphorus, and the arbuscular mycorrhizal fungi, which allow to explore a greater volume of soil improving water and phosphorus uptake, are highlighted. The response to inoculation with PGPR and its interaction with spontaneous mycorrhization on the growth and biomass production of Cambá, with and without the addition of phosphorus, was evaluated. Two factorial experiments were performed, one in pots and another in field conditions, whose factors were inoculants (*Azospirillum brasiliense* Az39, *Pseudomonas fluorescens*, *Bradyrhizobium japonicum* E109 and control), and phosphoric fertilization (without fertilization and fertilized with 60 kg.ha⁻¹ of P₂O₅), using a soil with low phosphorus content (1,06 ppm). In both experiments, radical colonization, spontaneous mycorrhization, height, root volume, radical, aerial and total biomass, tillers and percentage of phosphorus were evaluated, and fertile stems and cover were also evaluated in field conditions. ANAVA and Tukey Test were performed. In both experiments, the colonization of roots could be verified. Without the addition of phosphorus, *A. brasiliense* promoted spontaneous mycorrhization, which decreased in fertilized treatments. The phosphorus content increased with fertilization and was not related to mycorrhization. In general, the inoculated and fertilized treatments showed a better response. *B. japonicum* promoted the growth and production of biomass of cv. FCA changes in pots and field, however no constant interaction between this PGPR and fertilization was found, so it can not be affirmed that inoculation with this strain could improve the efficiency of phosphorus fertilization. Performing similar tests and obtaining results comparable to those present in real productive systems under grazing with different doses of phosphorus fertilization will adequately determine the advantage of using strain E109 as PGPR in forage species crops in the northeast region of Argentina.

Keywords: PGPR; HMA; *Paspalum atratum*; Cambá FCA; *Azospirillum brasiliense*; *Bradyrhizobium japonicum*; *Pseudomonas fluorescens*; spontaneous mycorrhization; growth; biomass.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

La base de la alimentación de la ganadería en la provincia de Corrientes son los pastizales naturales y un bajo porcentaje de pasturas cultivadas (Royo Pallarés y Goldfarb, 2000; Méndez et al., 2016). La mayoría de los suelos del territorio correntino se caracterizan por su contenido deficitario de fósforo (P) (Porta et al., 2008; Borrajo et al., 2011), debido a su alta fijación como fosfatos de hierro y aluminio (Gyaneshwar et al., 2002; Plante, 2007; Smith y Read, 2008; Sharma et al., 2013).

La disponibilidad de P en el sistema suelo-planta-animal juega un rol fundamental definiendo la productividad del mismo, ya que su deficiencia provoca una marcada reducción en el crecimiento y calidad del forraje con bajos tenores de P en tejidos, causando una nutrición mineral deficiente en el ganado (Pizzio et al., 2004; Porta et al., 2008). El uso inadecuado de los fertilizantes químicos pueden contaminar el ambiente y su utilización representa un costo para el sistema productivo, por ello se torna esencial mejorar su eficiencia mediante el empleo de las mejores combinaciones de microorganismos benéficos (Pérez-Montaño et al., 2014; Kaur et al., 2016).

En este contexto se destacan los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) y las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal o "PGPR" (del inglés plant growth-promoting rhizobacteria), que pueden contribuir a una mayor eficiencia de absorción y de utilización tanto del P del suelo como de aquel agregado en forma de fertilizante mejorando el estado nutricional de las plantas (Gyaneshwar et al., 2002; Antoun, 2012; Pérez-Montaño et al., 2014; Satyaprakash et al., 2017).

Las pasturas actualmente implantadas en Corrientes son originarias en su mayoría de regiones tropicales de África y manifiestan problemas de adaptación y ataque de plagas (Urbani et al., 1996). Se hace necesaria la diversificación de las forrajeras con especies productivas y de calidad adaptadas a las condiciones edafoclimáticas de la región (Leite et al., 2001). *Paspalum atratum* es una especie nativa de Brasil, Paraguay y Bolivia con alto potencial como forrajera en el noreste de Argentina (Quarin et al., 1997; Leite et al., 2001). El cv. Cambá FCA fue logrado por selección a partir de semillas de esta especie introducidas a la Facultad de Ciencias Agrarias (FCA) de la Universidad Nacional del Nordeste (UNNE) en el año 1990 (Urbani et al., 1996).

P. atratum cv. Cambá FCA es una gramínea perenne de ciclo estival que forma matas de abundante macollaje, fácil para sembrar y rápida para instalarse, formando plantas vigorosas con tallos que pueden pasar los 2 metros de altura en floración. Es palatable tanto para bovinos, equinos y ovinos y muy buena productora de semillas y se resiembraba con facilidad. Produce forraje desde septiembre a mayo con rendimientos comúnmente entre 10-15 y hasta 22 t.ha⁻¹.año⁻¹ de materia seca. No tiene plagas ni enfermedades importantes y ha demostrado buen desarrollo en lomas arenosas o franco-arcillosas (Urbani et al., 1996). Presenta reproducción apomíctica y por lo tanto está garantizada la estabilidad genotípica (Quarin et al., 1997).

En la producción de pasturas de la provincia de Corrientes no es común la utilización de inoculantes con PGPR y, si bien la forrajera *P. atratum* cv. Cambá FCA está teniendo creciente difusión y adopción por parte de los productores ganaderos del nordeste argentino (Urbani, com. pers.), a la fecha no se encontraron antecedentes de utilización de estos inoculantes ni de su interacción con la micorrización espontánea y la disponibilidad de P en la pastura en consideración.

Las PGPR son bacterias benéficas de la rizosfera que pueden estimular el crecimiento y desarrollo de la planta huésped (Vessey, 2003; Bhattacharyya y Jha, 2012). Actúan

mediante mecanismos como la producción de fitohormonas, solubilización de fosfatos, fijación de nitrógeno o la supresión de fitopatógenos (Bhattacharyya y Jha, 2012; Kaur et al., 2016; Gouda et al., 2018). Entre las principales PGPR empleadas en la agricultura se encuentran bacterias de los géneros *Azospirillum* sp. (Cassán y García de Salamone, 2008; Bashan y de-Bashan, 2010) y *Pseudomonas* sp. (Valverde y Ferraris, 2009). También los rizobios tienen la capacidad de actuar como PGPR con especies no-leguminosas (Mehboob et al., 2012; Gopalakrishnan et al., 2015; Patil et al., 2017; Vargas et al., 2017).

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son microorganismos del suelo capaces de desarrollar asociaciones simbióticas inespecíficas con las raíces de plantas terrestres (Smith y Read, 2008; Miransari, 2011) que proporcionan múltiples beneficios a su hospedador entre los que se incluyen un incremento de la captación de agua y minerales, principalmente P y otros elementos poco móviles, mayor resistencia a las enfermedades y mejora de la estructura del suelo (Goltapeh et al., 2008; Miransari, 2011; Nath y Meena, 2018).

Existe evidencia de que las PGPR pueden contribuir al establecimiento de la simbiosis micorrízica y a su vez la actividad de las rizobacterias puede verse influida por la presencia de HMA en la rizosfera (Barea et al., 2005; Artursson et al., 2006; Bruzos, 2017; Lies et al., 2018). Estas interacciones pueden conducir a una mejora en el crecimiento y la nutrición de las plantas (Dames y Ridsdale, 2012) contribuyendo a la obtención de una producción con mayor rendimiento, que al mismo tiempo puede ser sostenible desde el punto de vista agrícola (Miransari, 2011).

Hipótesis

En condiciones de baja disponibilidad de P en el suelo, la inoculación con PGPR mejora el crecimiento y producción de biomasa de *Paspalum atratum* cv. Cambá FCA y estimula la micorrización espontánea.

Objetivos

▪ Objetivo General

Evaluar la respuesta a la inoculación con PGPR (*Pseudomonas*, *Azospirillum* y *Bradyrhizobium*) y su interacción con la micorrización espontánea sobre el crecimiento y la producción de biomasa de *Paspalum atratum* cv. Cambá FCA, con y sin el agregado de fertilización fosfórica.

▪ Objetivos Específicos

- Comprobar la presencia de las rizobacterias inoculadas en la rizosfera de *Paspalum atratum* cv. Cambá FCA.
- Determinar la colonización micorrízica de *Paspalum atratum* cv. Cambá FCA en respuesta a la inoculación con rizobacterias y a la fertilización fosfórica.
- Establecer el efecto de la inoculación con PGPR sobre el crecimiento y la producción de biomasa de *Paspalum atratum* cv. Cambá FCA, bajo dos niveles de fertilización fosfórica.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO Y REVISIÓN DE LITERATURA

1. Importancia de las pasturas cultivadas en la provincia de Corrientes

La provincia de Corrientes se encuentra emplazada dentro de la región mesopotámica, cuenta con una superficie de 88.199 Km², se halla ocupada por una llanura con creciente elevación de Sur a Norte y posee un clima subtropical húmedo (Méndez et al., 2016). Los suelos son heterogéneos y van desde arenosos en el norte hasta arcillosos en el sur, siendo los principales órdenes Entisoles, Alfisoles, Molisoles y Vertisoles, todos ácidos y con marcada deficiencia de P (Pizzio y Royo Pallares, 1994).

La estructura productiva de la provincia de Corrientes está centrada fundamentalmente en el sector agropecuario, siendo la actividad ganadera (cría de ganado bovino en forma extensiva) una de las actividades económicas más relevantes y con mayor tradición (Pizzio y Royo Pallares, 1994; Porta et al., 2006; Méndez et al., 2016). La existencia de bovinos en el año 2016 se ubicó en 5.007.915 cabezas distribuidas entre las actividades de cría, recría e internada, con predominancia de establecimientos dedicados a la cría en la provincia (Méndez et al., 2016).

La ganadería correntina se caracteriza por un extenso sistema de producción, basado en el aprovechamiento de pastizales naturales, con escasa participación de las pasturas cultivadas y de otras fuentes de alimentación complementarias (Royo Pallares y Goldfarb, 2000; Méndez et al., 2016). La implantación de especies forrajeras perennes comprende una práctica tecnológica, disponible en general para la mayoría de los sistemas de producción, que permite iniciar o profundizar procesos de intensificación de los sistemas ganaderos, sin embargo, representa una inversión y como tal, es necesario asegurarse que la misma sea exitosa (Secanell et al., 2016).

En los últimos años, ha existido una tendencia creciente en el uso de forrajeras cultivadas como herramientas válidas para mejorar la producción y productividad de la empresa (Altuve y Bendersky, 2003; Kurtz et al. 2015). No obstante, las pasturas implantadas actualmente en la provincia de Corrientes son originarias en su mayor parte de regiones tropicales de África y manifiestan problemas de adaptación y ataque de plagas (Urbani et al., 1996). Es por ello que se hace necesaria la diversificación de las forrajeras con especies productivas y de calidad adaptadas a las condiciones edafoclimáticas de la región (Leite et al., 2001).

2. El fósforo como limitante de la producción forrajera

El P es un macronutriente esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas ya que está involucrado en varias funciones claves como el metabolismo energético, la fotosíntesis, la respiración, la regulación de enzimas, el movimiento de nutrientes dentro de la planta y la transferencia de características genéticas de una generación a otra (Viruel et al., 2014). La planta lo obtiene de la solución del suelo en forma de aniones fosfato, predominando los iones monobásicos (H₂PO₄) a pH <7,2 y dibásico (HPO₄²⁻) a pH >7,2 (Plante, 2007). En comparación con otros macronutrientes esenciales, es el elemento menos móvil tanto en el suelo como en la planta (Shen et al., 2011; Satyaprakash et al., 2017).

En las forrajeras tropicales, la etapa de germinación y establecimiento es crítica por su lento crecimiento inicial y un buen desarrollo determina el éxito de su competencia con las malezas (Tomei et al., 2003). El suministro de P es esencial para el crecimiento del

sistema radical y demás órganos, siendo sustancial contar con este elemento durante el establecimiento de las pasturas (Vilela et al., 1998).

A pesar de que los suelos pueden tener un gran depósito de P total, las cantidades disponibles para las plantas comprenden generalmente una pequeña proporción de este total (Shen et al., 2011; Bhattacharyya y Jha, 2012). Es así que suelos de todo el mundo pueden mostrar algún tipo de deficiencia de este elemento debido a que la concentración de P libre disponible para las plantas generalmente es baja, aún en suelos fértiles (Gyaneshwar et al., 2002).

Los bajos niveles de P se deben a su lenta difusión y alta fijación en los suelos (Shen et al., 2011). El P en solución reacciona con calcio, hierro o aluminio con los que forma una gran cantidad de complejos químicos insolubles disminuyendo la cantidad de ortofosfato presente en la solución del suelo (Gyaneshwar et al., 2002). Es así como el P soluble precipita rápidamente como fosfatos de hierro y aluminio en suelos ácidos o como fosfatos de calcio en suelos alcalinos o se adsorbe en óxidos de hierro y aluminio o superficies minerales de arcilla (Gyaneshwar et al., 2002; Plante, 2007; Smith y Read, 2008; Sharma et al., 2013). Incluso el P aplicado como fertilizante se inmoviliza por estas reacciones químicas activas y rápidas (Sharma et al., 2013).

Esta situación es común en los suelos de la provincia de Corrientes que se caracterizan por su contenido deficitario de P, encontrándose valores menores a 3 ppm (Porta et al., 2008; Borrajo et al., 2011). En este escenario, la adopción de prácticas de manejo racionales y eficientes, que incrementen y/o mantengan la fertilidad, a través del uso óptimo de los nutrientes, requiere conocimiento acerca de los mecanismos responsables de la dinámica de dichos elementos (Sharma et al., 2013). La fertilización química con P se convierte en una herramienta disponible para corregir la restricción impuesta por el suelo a las plantas (Shen et al., 2011) pero debido al alto costo de la misma, no es una práctica comúnmente adoptada por los productores ganaderos de la provincia de Corrientes (Giancola et al., 2013).

En el sistema suelo-planta-animal este nutriente juega un rol fundamental definiendo la productividad del mismo (Porta et al., 2008). En consecuencia, la deficiencia de P en el suelo determina una marcada reducción en el crecimiento y calidad del forraje que alcanza un bajo contenido del nutriente en sus tejidos causando una deficiente nutrición mineral del ganado, lo que implica que durante todo el año los animales tengan una dieta pobre en este elemento, limitando su normal desarrollo (Pizzio et al., 2004). Por lo tanto, la identificación de aquellas especies forrajeras menos exigentes o más eficientes en la absorción y utilización de P puede ser una alternativa para asegurar la productividad de los pastos cultivados durante largos períodos de tiempo (Costa et al., 2008).

3. *Paspalum atratum* cv. Cambá FCA

Paspalum es un género de gramíneas ampliamente distribuido en regiones templadas a tropicales, especialmente del hemisferio occidental, y es particularmente abundante en el centro y sur de Brasil, este de Bolivia, Paraguay, norte de Argentina y Uruguay (Quarin et al., 1997). Pertenece a la tribu *Panicaceae* de la subfamilia *Panicoideae*, familia *Gramineae* y consta de aproximadamente 330 especies (Zuloaga y Morrone, 2005). La mayoría de sus especies son perennes y constituyen la base de la alimentación del ganado en los campos naturales de esa región aunque apenas una docena de esas especies se han llevado a cultivo para uso forrajero (Urbani y Quarin, 2017).

La apomixis es el sistema reproductivo predominante en el género, lo que significa un escollo para el mejoramiento genético por métodos tradicionales. Sin embargo, décadas de investigación sobre apomixis y sobre otros aspectos biológicos de especies de

Paspalum abrieron caminos para sortear este obstáculo para la transferencia de genes con fines de mejoramiento (Urbani y Quarin, 2017). En la FCA de la UNNE se desarrollaron tres cultivares apomícticos de *Paspalum* mediante diferentes estrategias: el cultivar Cambá FCA de *P. atratum*, material vegetal de este estudio inscripto en el INASE en 1997, el cv. Chané FCA de *P. guenoarum* y el cv. Boyero UNNE de *Paspalum notatum* inscriptos en 2002 y 2012, respectivamente (Urbani y Quarin, 2017).

Paspalum atratum es una gramínea perenne nativa de Brasil, Paraguay y Bolivia, con un alto potencial para la producción de forraje y es particularmente interesante en el noreste de Argentina por sus condiciones como forrajera y por ser muy buena productora de semillas (Quarin et al., 1997; Leite et al., 2001). La especie es de reproducción apomíctica y por lo tanto está garantizada la estabilidad genotípica (Quarin, 1981). Produce rizomas cortos que dan origen a las cañas, tiene una base muy frondosa con brotes gruesos comprimidos o subcompresos y con vainas notablemente aquilladas. Posee un hábito de crecimiento erecto con un dosel de hojas que alcanza los 75 a 90 cm de altura y los tallos florales alcanzan hasta 2 m de altura, las láminas foliares tienen una longitud de 30 a 45 cm, una anchura de 1,5 a 2,0 cm y son muy escabrosas en los márgenes (Evers y Burson, 2004).

El cultivar Cambá FCA es una forrajera perenne de ciclo estival que forma matas de abundante macollaje, fácil para sembrar y rápida para instalarse, es palatable para bovinos, equinos y ovinos, es muy buena productora de semillas y se resiembraba con facilidad; produce forraje desde septiembre a mayo con rendimientos comúnmente entre 10-15 y hasta 22 t.ha-1.año-1 de materia seca; no tiene plagas ni enfermedades importantes y ha demostrado buen desarrollo en lomas arenosas o franco-arcillosas (Urbani et al., 1996).

4. Empleo de microorganismos benéficos para una agricultura sustentable

Los microorganismos del suelo juegan un rol sustancial en los ciclos bioquímicos de nutrientes orgánicos e inorgánicos y en el mantenimiento de la salud y calidad del medio edáfico (Jeffries et al., 2003). Muchos de ellos participan activamente en la transformación, movilización y solubilización de los nutrientes y en la posterior absorción de los mismos por las plantas para desarrollar todo su potencial genético (Hayat et al., 2010).

Ante el uso indiscriminado de fertilizantes químicos y sus costos cada vez mayores, la utilización de microorganismos benéficos para una agricultura sustentable y segura ha aumentado en todo el mundo durante las últimas décadas (Kaur et al., 2016). Los bioinoculantes elaborados con microorganismos debidamente seleccionados por su alta eficiencia e inocuidad permiten reducir los insumos externos y mejorar la cantidad y calidad de los recursos internos, además de ser económicos y ecológicamente amigables (Maza et al., 2017).

En el marco de la intensificación de los sistemas ganaderos, el uso de bioinoculantes presenta ventajas en la germinación y crecimiento vegetal, convirtiéndolos en una alternativa para favorecer la implantación e incrementar la producción de pasturas megatérmicas (Maza et al., 2017).

Algunos microorganismos edáficos pueden contribuir a aumentar la absorción no solo del P del suelo sino también de aquel agregado como fertilizante mejorando el estado nutricional de las plantas aún en condiciones de baja fertilidad (Plante, 2007; Sharma et al., 2013). Estas habilidades son de gran importancia agrícola en términos de mejorar la fertilidad del suelo y el rendimiento de los cultivos, reduciendo así el impacto negativo de los fertilizantes químicos en el medio ambiente (Pérez-Montaño et al., 2014).

En este contexto se destacan los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) y algunas rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), que pueden desempeñar un papel fundamental en el uso razonable de los fertilizantes fosfóricos promoviendo un incremento en la eficiencia de absorción y de utilización de las fuentes solubles, favoreciendo el desarrollo de sistemas sostenibles en la producción de cultivos (Gyaneshwar et al., 2002; Antoun, 2012; Pérez-Montaño et al., 2014; Satyaprakash et al., 2017).

5. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal

5.a. Conceptos generales

El término rizosfera fue introducido por Hiltner en 1904 para definir la parte del suelo que es influenciada por el sistema radical (Hartmann, 2008). Comprende la estrecha zona de suelo que rodea a la raíz y que es rica en nutrientes debido a la acumulación de compuestos orgánicos liberados por las raíces por exudación, secreción y deposición, compuestos que pueden ser utilizados como fuentes de carbono y energía por microorganismos, resultando en un crecimiento microbiano y actividad intensos en la rizosfera (Dobbelaere et al., 2003). Las bacterias asociadas a las plantas que pueden colonizar las raíces se llaman rizobacterias y pueden ser beneficiosas, nocivas o neutras en función de sus efectos sobre el crecimiento de las plantas (Dobbelaere et al., 2003; Bhattacharyya y Jha, 2012).

Las rizobacterias benéficas se conocen como PGPR, término que fue acuñado por primera vez por Kloepper y Schroth (1978) para describir a la población bacteriana de la rizosfera que coloniza las raíces y muestra actividad de promoción del crecimiento de las plantas. De las rizobacterias que habitan el suelo, las PGPR comprenden una porción muy pequeña (2 - 5%) (Antoun y Kloepper, 2001). Esta población representa una amplia variedad de bacterias que, cuando se cultivan en asociación con una planta huésped, dan como resultado la estimulación del crecimiento de su hospedador mediante diferentes mecanismos (Vessey, 2003; Bhattacharyya y Jha, 2012), siendo sus características distintivas inherentes: ser competentes para colonizar la superficie o interior de la raíz, promover el crecimiento de las plantas, y sobrevivir, multiplicarse y competir con la microbiota, al menos durante el tiempo necesario para expresar sus actividades de promoción del crecimiento de las plantas (Kloepper, 1994).

Los PGPR se relacionan de diferentes maneras con las plantas hospederas siendo las dos clases principales de relaciones las rizosféricas, que consisten en colonizar la superficie de la raíz o los espacios intercelulares superficiales de la planta huésped, y las relaciones endofíticas, que involucran a las PGPR que residen y crecen dentro de la planta huésped en el espacio apoplástico (Vessey, 2003). Pertenecen al primer grupo los géneros bacterianos tales como *Azospirillum* sp., *Pseudomonas* sp., entre otros, mientras que son considerados endofíticos a los géneros *Bradyrhizobium* sp. y *Rhizobium* sp., que pueden fijar simbióticamente el nitrógeno atmosférico con las plantas superiores (Kaur et al., 2016). Algunos rizobios también pueden comportarse como PGPR con plantas no leguminosas (Sessitsch et al., 2002).

5.b. Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal

La actividad de promoción del crecimiento de las PGPR puede manifestarse mediante mecanismos directos alterando el desarrollo vegetal a través de la producción de fitohormonas, solubilización de fosfatos, fijación de nitrógeno, incremento de la absorción de agua y minerales, entre otros procesos, o indirectamente mediante la supresión de fitopatógenos, ayudando a otros microorganismos beneficiosos a mejorar

su acción sobre las plantas o degradando contaminantes orgánicos en los suelos (Bhattacharyya y Jha, 2012; Kaur et al., 2016; Gouda et al., 2018).

De acuerdo con el objetivo de su aplicación las PGPR se clasifican en *biofertilizantes*, que actúan aumentando la disponibilidad de nutrientes para la planta, *fitoestimuladores*, que promueven el crecimiento de las plantas a través de la producción de fitohormonas, *rizorremediadores*, que degradan contaminantes y *agentes de biocontrol* (Lugtenberg et al., 2002; Bhattacharyya y Jha, 2012). Este último grupo incluye bacterias que reducen la incidencia o la gravedad de las enfermedades de las plantas a través de diversos mecanismos tales como la competencia por nutrientes y sitios de infección, la inducción de resistencia sistémica y la producción de antibióticos, sideróforos, cianuro de hidrógeno o enzimas hidrolíticas (Bhattacharyya y Jha, 2012; Dames y Ridsdale, 2012; Kaur et al., 2016).

Las PGPR pueden usar más de un mecanismo benéfico ya que la evidencia experimental sugiere que la estimulación del crecimiento de las plantas es el resultado de múltiples mecanismos que pueden activarse simultáneamente (Martínez-Viveros et al., 2010). Empero, el modo de acción de los diferentes PGPR varía de acuerdo con una serie de factores bióticos como el genotipo y la etapa de desarrollo de la planta, mecanismos de defensa, presencia de otros microorganismos y factores abióticos tales como composición y manejo del suelo o condiciones climáticas (Gouda et al., 2018).

5.b.1. PGPR como fitoestimuladores

Las fitohormonas o reguladores del crecimiento de las plantas son sustancias orgánicas que influyen en los procesos bioquímicos, fisiológicos y morfológicos participando en el crecimiento y desarrollo de células, tejidos y órganos (Dobbelaere et al., 2003). Desempeñan un papel clave en la respuesta de las plantas a su medio ambiente (García de Salamone et al., 2005) y son activas en plantas en pequeñas cantidades (Fuentes-Ramírez y Caballero-Mellado, 2005). Pertenecen a una amplia variedad de compuestos entre los que se encuentran auxinas, giberelinas, citoquininas, etileno y ácido abscísico (Davies, 2010).

Las fitohormonas no solo son sintetizadas por las plantas sino que también influyen en su síntesis numerosas bacterias (Dobbelaere et al., 2003). Estas fitohormonas bacterianas alteran el metabolismo y la morfología de las plantas, lo que conduce a una mejor absorción de minerales y agua, por ende, plantas más grandes y más saludables (Bashan y de-Bashan, 2010). Los microorganismos promotores del crecimiento vegetal con la capacidad de modificar la concentración de las fitohormonas se denominan fitoestimuladores y pueden actuar produciendo reguladores del crecimiento o disminuyendo la concentración de etileno en el interior de la planta (Lugtenberg et al., 2002).

El efecto de las PGPR como fitoestimuladores proviene de la manipulación de la red compleja y equilibrada de las hormonas vegetales que participan directamente en el crecimiento y desarrollo (Pérez-Montaño et al., 2014). Debido a que la concentración de señales hormonales es crítica para la regulación de diversos procesos fisiológicos, los cambios locales en los niveles de fitohormonas pueden conducir a cambios característicos en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Dobbelaere et al., 2003).

Las principales moléculas de síntesis bacteriana propuestas para la promoción del crecimiento de las plantas por PGPR incluyen auxinas, citoquininas y giberelinas y la enzima 1-amino-ciclopropano-1-carboxilato desaminasa (ACC- desaminasa) que participa en la descomposición del etileno (Lugtenberg et al., 2002; Jha y Saraf, 2015).

- Auxinas

Se conoce con el nombre genérico de auxinas a un grupo de compuestos químicos asociados con diferentes procesos en las plantas tales como la elongación del tallo y la raíz, estimulación de la división celular, iniciación de raíz lateral y adventicia, diferenciación de tejido vascular, dominancia apical, gravitropismo y fototropismo (Teale et al., 2006; Davies, 2010). La auxina natural más crucial y la más común es el ácido indol-3-acético (AIA), producido por bacterias, plantas y hongos (Duca et al., 2014). Las bacterias productoras de AIA que interactúan con las plantas tienen el potencial de interferir con cualquiera de estos procesos al cambiar de manera espaciotemporal el conjunto de auxinas de las plantas (Spaepen et al., 2007).

Muchos géneros de bacterias son productores de auxinas incluyendo *Azospirillum* sp., *Bradyrhizobium* sp. y *Pseudomonas* sp. (Spaepen et al., 2007; Duca et al., 2014), entre otros. Las auxinas liberadas por las rizobacterias afectan principalmente al sistema radical, aumentando su tamaño y peso, el número de ramificaciones y el área de superficie en contacto con el suelo lo que puede conducir a un aumento en su capacidad de sondear el suelo para el intercambio de nutrientes, mejorando así la nutrición de las plantas y la capacidad de crecimiento (Jha y Saraf, 2015).

- Giberelinas

Las giberelinas (GA) constituyen un amplio grupo de compuestos naturales producidos por plantas, hongos y bacterias, que regulan diversos aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas como la germinación, el alargamiento caulinar, la floración y la fructificación (Davies, 2010). Se ha observado la capacidad de sintetizar GA en *Bradyrhizobium* sp. (Boiero et al., 2007), *Azospirillum* sp. (Bottini et al., 2004; Bashan y De-Bashan, 2010), *Pseudomonas* sp. (Sivasakthi et al., 2013), entre otros. *Azospirillum brasilense* Az39 y *Bradyrhizobium japonicum* E109, solos o en combinación, mostraron aumentos del porcentaje de germinación y longitud del brote de plántulas de maíz y soja, en concordancia con la producción de GA detectada para ambas bacterias (Cassán et al., 2009).

- Citoquininas

Las citoquininas (CK) comprenden reguladores importantes de muchos procesos fisiológicos como la división celular, la senescencia foliar, la movilización de nutrientes, el dominio apical y la germinación de las semillas (Sakakibara, 2006). Pueden ser producidas por bacterias y se usan principalmente como señal química para comunicarse con la planta o como una herramienta para invadir la planta huésped (Castillo et al., 2015). Son capaces de producir CK diversos géneros bacterianos como *Pseudomonas* sp. (García de Salamone et al., 2001), *Azospirillum* sp. y *Bradyrhizobium* sp. (Cassán et al., 2009).

- ACC-desaminasa

El etileno afecta el crecimiento de la planta al inhibir la elongación de la raíz (Dames y Ridsdale, 2012). Algunos PGPR tienen la capacidad de sintetizar ACC-desaminasa, una enzima que hidroliza al 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) que es el precursor del etileno, lo que disminuye la producción de este último promoviendo el alargamiento de la raíz (Bashan y de-Bashan, 2010). La actividad ACC desaminasa se ha descrito en los géneros *Azospirillum* sp. y *Pseudomonas* sp., entre otros (Vessey, 2003). La enzima ACC-desaminasa puede actuar como un mecanismo para asegurar que el nivel de

etileno en los tejidos de la planta no se eleve hasta el punto donde el crecimiento de la raíz o de los brotes se vea perjudicado (Jha y Saraf, 2015).

5.b.2. PGPR como biofertilizantes

Los biofertilizantes comprenden sustancias que contienen microorganismos vivos que, cuando se aplican sobre la semilla, la superficie de la planta o el suelo, colonizan la rizosfera o el interior de la planta y promueven el crecimiento a través de un mayor suministro o disponibilidad de nutrientes para la planta huésped (Vessey, 2003). Se consideran una alternativa o complemento de la fertilización química para aumentar la producción de cultivos en sistemas agrícolas de bajos insumos (Martínez-Viveros et al., 2010).

Las PGPR pueden mejorar el estado nutricional de las plantas a través de mecanismos que facilitan la absorción de nutrientes o aumentan su disponibilidad en la rizosfera (Lugtenberg et al., 2002; Bhattacharyya y Jha, 2012). Estos mecanismos incluyen la fijación de nitrógeno, solubilización de nutrientes minerales como por ejemplo formas insolubles de P y mineralización de compuestos orgánicos (Martínez-Viveros et al., 2010). La mayor disponibilidad de nutrientes también puede ser causada indirectamente por las PGPR al influir positivamente en el crecimiento y la morfología de la raíz o al ayudar a otras relaciones simbióticas beneficiosas (Vessey, 2003).

- Solubilización de fósforo

Los microorganismos son un componente integral en el ciclo del P ya que participan en la transferencia de este elemento entre diferentes pools de P edáfico (Sharma et al., 2013). Varias bacterias, hongos y actinomicetos solubilizan fosfatos a través de diversos mecanismos convirtiendo el P inorgánico y orgánico del suelo en una forma biodisponible que facilita la absorción por las raíces de las plantas (Khan et al., 2014).

Muchas PGPR que se han identificado como bacterias solubilizadoras de P o "PSB" - del inglés Phosphate Solubilizing Bacteria- mejoran el suministro de P a las plantas debido a su capacidad para reponer este mineral en la solución del suelo mediante la solubilización de este elemento en la rizosfera, lo que resulta en una contribución fundamental a la nutrición vegetal y, en consecuencia, a la mejora del rendimiento de las plantas (Rodríguez y Fraga, 1999). Una gran cantidad de cepas de los géneros *Rhizobium* sp. y *Bradyrhizobium* sp. pueden solubilizar el fosfato inorgánico (Antoun et al., 1998; Sharma et al., 2013) al igual que especies del género *Azospirillum* sp. (García et al., 2017; Bashan y de-Bashan, 2010). Por su parte, *Pseudomonas* sp. también se encuentra entre las PSB más potentes del suelo (Rodríguez y Fraga, 1999; Jeon et al., 2013; Khan et al., 2014).

La solubilización del P inorgánico se produce por la acción de ácidos orgánicos sintetizados por las PSB como productos de su metabolismo, principalmente por respiración oxidativa o fermentación de fuentes de carbono orgánico como la glucosa (Satyaprakash et al., 2017). La acción de estos ácidos resulta de tres procesos generales: (i) la disociación de los ácidos orgánicos libera protones que contribuyen a reducir el pH del suelo y favorecen la disolución de los minerales fosfóricos, (ii) las reacciones de quelatación en las cuales los componentes aniónicos de los ácidos orgánicos se intercambian por el grupo ortofosfato de los fosfatos de Ca^{2+} , Fe^{3+} y Al^{3+} , liberándolo en la solución del suelo, y (iii) el desplazamiento de los fosfatos adsorbidos no específicamente sobre las partículas del suelo, por las componentes aniónicas de los ácidos orgánicos (Rodríguez y Fraga, 1999; Plante, 2007; Khan et al., 2014).

Por otro lado, la conversión de todos los tipos de P orgánico a forma inorgánica y la consecuente disponibilidad para las plantas depende de la mineralización por

microorganismos (Smith y Read, 2008). Este proceso está dirigido por enzimas, entre ellas se encuentran fosfatasas y fitasas, que hidrolizan el P orgánico o dividen el P de los residuos orgánicos, lo que resulta en la disponibilidad de este elemento en la solución del suelo (Satyaprakash et al., 2017). Una vez que el P es mineralizado, puede ser absorbido por las plantas, inmovilizado por la biomasa microbiana, precipitado en complejos inorgánicos o adsorbido en superficies minerales (Plante, 2007).

- Fijación biológica de nitrógeno

El nitrógeno es un nutriente esencial en el crecimiento de las plantas y su mayor reserva se encuentra en la atmósfera como gas N_2 , sin embargo, aunque constituye el 78% del volumen del aire, las plantas no pueden acceder directamente a él (Santi et al., 2013; Ahemad y Kibret, 2014). El elemento es absorbido del suelo a través de las raíces en forma de amonio y nitratos (Pérez-Montaña et al., 2014).

El N_2 atmosférico se convierte en formas utilizables por la planta mediante la fijación biológica de nitrógeno que es la reducción enzimática del N_2 a amonio NH_4^+ realizada por microorganismos denominados diazotrófos y que se lleva a cabo mediante interacciones simbióticas o no simbióticas con las plantas (Santi et al., 2013; Gouda et al., 2018). La fijación simbiótica de N_2 incluye a los rizobios que forman simbiosis con plantas leguminosas (Vessey, 2003). Entre las PGPR simbióticas más estudiadas se encuentran *Bradyrhizobium* sp., *Rhizobium* sp., *Sinorhizobium* sp. y *Mesorhizobium* sp. (Bhattacharyya y Jha, 2012).

La fijación biológica no simbiótica es realizada por diazotrófos de vida libre como las PGPR del género *Azospirillum* (Bashan y De-Bashan 2010; Ahemad y Kibret, 2014). Los diazotrófos que tienen la capacidad de desarrollar asociaciones estrechas con las raíces de diferentes plantas se denominan bacterias "asociativas" fijadoras de nitrógeno (Santi et al., 2013). Aunque la cantidad de nitrógeno fijado es muy variable y depende del genotipo de la planta y las condiciones ambientales, las contribuciones de este tipo de fijación biológica de N_2 tienen importancia agronómica para muchas gramíneas como el arroz, maíz, caña de azúcar y algunos pastos (Dobbelaere et al., 2003).

5.c. Potencial de *Azospirillum*, *Pseudomonas* y *Bradyrhizobium* como PGPR

Entre las principales PGPR empleadas en la agricultura se encuentran bacterias de los géneros *Azospirillum* (Cassán y García de Salamone, 2008; Bashan y de-Bashan, 2010) y *Pseudomonas* (Valverde y Ferraris, 2009). También los rizobios tienen la capacidad de actuar como PGPR con especies no-leguminosas, entre ellos, bacterias del género *Bradyrhizobium* (Mehboob et al., 2012; Gopalakrishnan et al., 2015; Patil et al., 2017; Vargas et al., 2017). En esta sección, se resume el potencial de estos géneros para actuar como PGPR y se describen sus características y mecanismos de acción.

5.c.1. *Azospirillum* sp.: características y usos

Azospirillum sp. son bacterias aeróbicas gramnegativas con forma vibrioide pertenecientes a la familia *Rhodospirillaceae*, orden *Rhodospirillales*, clase *Alfaproteobacteria*, que pueden fijar nitrógeno como diazotrófos de vida libre en el suelo o asociados a raíces, tallos y hojas (Baldani et al., 2005). Fueron aislados de la rizosfera de muchas gramíneas en todo el mundo, tanto en climas tropicales como templados (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000). Comprenden una de las PGPR más ampliamente estudiadas y utilizadas comercialmente en la agricultura (Cassán et al., 2015).

Azospirillum sp. tiene la capacidad de modificar el crecimiento, desarrollo y comportamiento de varias plantas, incluso en condiciones de estrés (Cassán et al.,

2013; García et al., 2017). Los mecanismos mediante los cuales esta PGPR actúa incluyen mecanismos directos como la producción de fitohormonas (AIA, GA, CK, poliaminas) y ACC-desaminasa, fijación de nitrógeno y solubilización de fosfatos (García et al., 2017) y mecanismos indirectos de control biológico como competencia ambiental y desplazamiento de patógenos, inhibición de la germinación de semillas de malezas parasitarias, mejora general de las plantas para resistir la infección de patógenos y posible inhibición del crecimiento fúngico a través de la producción (al menos in vitro) de sustancias tóxicas microbianas (Bashan y de-Bashan, 2010).

Se considera que el modo de acción de *Azospirillum* sp. es el resultado de la combinación de algunos o muchos mecanismos pudiendo variar de acuerdo con la cepa, la especie de la planta y las condiciones ambientales (Bashan y de-Bashan, 2010). Sin embargo, la producción de fitohormonas se ha sugerido como el principal mecanismo de acción de *Azospirillum* (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000; Bashan y de-Bashan, 2010; Cassán et al., 2013; Castillo et al., 2015). Luego de la inoculación con este PGPR se observa como fenómeno fenotípico más común en la mayoría de las especies una mejoría en el crecimiento de la raíz que sería atribuido a la producción de fitohormonas y que a su vez lleva a una absorción mejorada de agua y minerales (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000; Bashan y de-Bashan, 2010).

En Argentina, la cepa Az39 de *A. brasilense* aislada de raíces de trigo, fue seleccionada por su eficiencia para promover el crecimiento de este cereal y se recomienda su uso en formulaciones comerciales (Rodríguez Cáceres et al., 2008). La capacidad promotora del crecimiento de plantas de Az39 ha sido confirmada agrónomicamente por su efectividad durante los últimos 30 años para aumentar la productividad de los cultivos inoculados en un gran número de ensayos en condiciones de campo (Díaz-Zorita y Fernández Canigia, 2009).

También se confirmó la capacidad de Az39 de producir in vitro moléculas bioactivas importantes que intervienen en la promoción del crecimiento de la planta tales como AIA, GA, CK, ácido abscísico, producción de sideróforos, etileno y poliaminas (Perrig et al., 2007; Cassán et al., 2009; García et al., 2017). No obstante, la actividad de solubilización de fosfatos in vitro resultó débil (García et al., 2017) o nula (Perrig et al., 2007). Esta cepa fue capaz de promover la germinación de las semillas y el crecimiento temprano en la soja, el trigo y el maíz, cambios morfológicos y fisiológicos que se atribuyen a la producción de fitohormonas (Cassán et al., 2009).

5.c.2. Uso de *Pseudomonas fluorescens* como PGPR

Pseudomonas sp. son bacilos gramnegativos rectos o levemente curvos, aerobios, no esporulantes, polarmente flagelados y ampliamente distribuidos en la naturaleza, pertenecientes a la familia *Pseudomonadaceae*, orden *Pseudomonadales*, clase Gammaproteobacteria (Palleroni, 2005). Incluyen especies patógenas para humanos, animales o plantas, así como cepas que promueven el crecimiento de las plantas, entre ellas, *P. fluorescens* (Palleroni, 2005; Valverde y Ferraris, 2009). Varias propiedades las hacen candidatas interesantes como PGPR como ser alta tasa de crecimiento, amplia utilización de fuentes de carbono, gran capacidad de colonización en la rizosfera, producción importante de metabolitos bioactivos, competencia agresiva para nichos y una buena adaptación a una variedad de estreses (Agaras y Valverde, 2013).

La potencialidad de *P. fluorescens* como herramienta biotecnológica que permitiría aumentar la producción agrícola ya ha sido reconocida y existe un importante número de reportes y estudios científicos sobre aislamientos de *Pseudomonas* con diferentes capacidades de mejorar el desarrollo vegetal (Valverde y Ferraris, 2009). Entre los diversos modos de acción de *P. fluorescens* se destaca su actividad antagonista ante un amplio número de fitopatógenos (Bhattacharyya y Jha, 2012). Además, la especie se ha señalado capaz de solubilizar P inorgánico (Rodríguez y Fraga, 1999; Jeon et al.,

2013; Khan et al., 2014; Satyaprakash et al., 2017), producir fitohormonas (Spaepen et al., 2007; Duca et al., 2014; Sivasakthi et al., 2013; García de Salamone et al., 2001) y actividad ACC desaminasa (Vessey, 2003).

En la Argentina no se dispone de cepas de *Pseudomonas* con propiedades PGPR de referencia o recomendadas para la formulación de inoculantes, no obstante ello, existe un importante número de productos comerciales disponibles y en desarrollo formulados con aislamientos obtenidos por el sector privado (Valverde y Ferraris, 2009).

5.c.3. *Bradyrhizobium* sp. como PGPR con no-leguminosas

Bradyrhizobium sp. son bacilos gramnegativos, aeróbicos y quimioorganotróficos del suelo pertenecientes a la familia *Bradyrhizobiaceae*, orden *Rhizobiales*, clase *Alfaproteobacteria* (Kuykendall, 2005). Fueron ampliamente estudiados debido a su asociación simbiótica con las leguminosas y la capacidad de fijación biológica de nitrógeno (Boiero et al., 2007). No obstante, se ha señalado que algunos rizobios de este género son capaces de inducir el crecimiento y desarrollo de plantas a través de mecanismos bioquímicos o fisiológicos distintos de la fijación de nitrógeno (Mehboob et al., 2012).

En los últimos años ha habido una creciente evidencia de que los rizobios son frecuentes colonizadores de la rizosfera de una amplia gama de plantas y también pueden habitar endófitamente plantas no leguminosas (Sessitsch et al., 2002). En este campo, los estudios se centraron principalmente en los efectos de estas bacterias como endofíticos de cereales (Matiru y Dakora, 2004; Dazzo y Yanni, 2006; Baset Mia y Shamsuddin, 2010).

En estos hábitats rizosféricos y endofíticos pueden desempeñar un papel importante como PGPR en especies no leguminosas utilizando uno o más mecanismos de acción directos o indirectos (Mehboob et al., 2012; Gopalakrishnan et al., 2015; Patil et al., 2017; Vargas et al., 2017). La evidencia indica que los rizobios son cuantitativa y cualitativamente interesante en la rizosfera ya que pueden influir en el crecimiento de las plantas y proteger a las mismas contra la invasión de organismos perjudiciales (Zaim et al., 2017).

Entre los efectos directos de los rizobios sobre la promoción del crecimiento de especies no leguminosas se pueden citar la producción de fitohormonas como AIA, citoquininas, ácido abscísico y GA, solubilización de P precipitado a través de la liberación de ácidos orgánicos y mineralización de P orgánico a través de la liberación de enzimas fosfatasas, disminución del nivel de etileno a través de la enzima ACC-desaminasa (Mehboob et al., 2012; Gopalakrishnan et al., 2015; Patil et al., 2017; Zaim et al., 2017).

Respecto a los mecanismos indirectos, los rizobios pueden mejorar el crecimiento de las no leguminosas mediante el control biológico a través de la competencia por nutrientes y espacio, la producción de antibióticos, producción de enzimas que degradan las paredes celulares de otros microorganismos y la producción de sideróforos y además inducen resistencia sistémica en la planta huésped (Mehboob et al., 2012; Gopalakrishnan et al., 2015; Patil et al., 2017; Zaim et al., 2017).

En general, los metabolitos producidos como resultado de una interacción beneficiosa entre rizobios y plantas no leguminosas aumentan la germinación de semillas, la tasa de elongación radical, el vigor de las plántulas, la arquitectura de la raíz (longitud, ramificación, volumen, superficie), crecimiento de brotes, actividad fotosintética, área foliar, contenido de clorofila, conductancia estomática, índice de cosecha, rendimiento de grano, absorción de nutrientes, contenido de proteína, tolerancia al estrés abiótico (Mehboob et al., 2012).

B. japonicum es la especie utilizada como inoculante comercial de la soja y la cepa E109 es considerada la más adecuada para la formulación de inoculantes para esta especie vegetal en Argentina (Cassán et al., 2009; Torres et al., 2015). Junto con esta capacidad, se han propuesto mecanismos alternativos para explicar la promoción del crecimiento, especialmente en las no leguminosas, como la biosíntesis de fitohormonas, la producción de sideróforos y la inducción de resistencia sistémica (Boiero et al., 2007; Cassán et al., 2009; Torres et al., 2015).

6. Micorrizas arbusculares

6.a. Generalidades

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son hongos del suelo pertenecientes al phylum *Glomeromycota* (Schüßler et al., 2001) capaces de desarrollar una asociación simbiótica con las raíces de las plantas terrestres y generalmente su simbiosis con la planta huésped no es específica del hospedador (Miransari, 2011). Los HMA comprenden el tipo más común de micorriza en varios ecosistemas en simbiosis con una variedad enormemente amplia de plantas hospedantes que incluye angiospermas, gimnospermas pteridófitas y hepáticas (Smith y Read, 2008).

Los HMA se encuentran entre los microorganismos edáficos más importantes e influyentes que afectan significativamente el desarrollo de las plantas y otros microorganismos del suelo (Miransari, 2011). Son simbioses obligados y colonizan la corteza de la raíz para obtener carbono de su planta huésped, mientras ayudan a la planta con la absorción de nutrientes minerales, predominantemente fosfato (Lugtenberg et al., 2002). Las simbiosis son biotróficas y normalmente mutualistas, las interacciones compatibles a largo plazo se basan principalmente en la transferencia de nutrientes bidireccionales entre los simbioses (Smith y Read, 2008).

Estudios de inoculación con micorrizas en condiciones de campo y de laboratorio resaltan la importancia de la influencia simultánea de las características funcionales de las plantas hospedadoras, la fertilidad del suelo y la complejidad de la comunidad edáfica, que incluye tanto hongos micorrízicos como otros microorganismos, sobre la respuesta de las plantas a las simbiosis micorrízicas (Hoeksema et al., 2010).

Los HMA son una parte integral de los ecosistemas de pastizales templados y tropicales ya que influyen en las jerarquías competitivas dentro de las comunidades vegetales y pueden contribuir al éxito o fracaso de la introducción de especies de plantas exóticas (Miller et al., 2012). El conocimiento de las interacciones de HMA y las condiciones edáficas puede llevar al establecimiento de poblaciones mejor adaptadas y más efectivas que garanticen los beneficios de la simbiosis micorrízica ya que, aunque ha sido definida como inespecífica, existe evidencia de que estas asociaciones presentan “especificidad ecológica”, la cual consiste en la posibilidad de encontrar en un inóculo mixto o bajo condiciones nativas un tipo particular de HMA que colonice preferentemente a un hospedero (McGonigle y Fitter, 1990).

En general, las gramíneas perennes con metabolismo fotosintético C4 de estación cálida se benefician más de la simbiosis con HMA y alcanzan niveles más altos de colonización de raíces que las especies C3 perennes de estación fría y que las gramíneas anuales, lo que sugiere que las simbiosis con HMA son más efectivas cuando el flujo de radiación es alto y hay tiempo suficiente para saldar la inversión en carbono que tienen las plantas para el desarrollo de HMA (Hoeksema et al., 2010; Miller et al., 2012). Los pastos de estación cálida son plásticos y pueden ajustar la arquitectura de la raíz para aumentar la dependencia de la simbiosis en respuesta a las limitaciones en la disponibilidad de nutrientes al tiempo que disminuyen el gasto metabólico (Miller et al., 2012).

Una micorriza arbuscular tiene tres componentes importantes: la raíz misma, las estructuras fúngicas intraradicales y un micelio extraradical en el suelo (Smith y Read, 2008). Las plantas adquieren nutrientes inorgánicos a través del hongo, mientras que el hongo obtiene carbohidratos de la planta con un intercambio entre los socios que tiene lugar a través de complejas interfaces simbióticas intracelulares (Schüßler et al., 2001). Al mismo tiempo, la extensa red de hifas extraradicales que desarrollan los HMA con el sistema de raíces contribuye significativamente a la mejora de la agregación del suelo (Miller et al., 2012) y permite mejores relaciones hídricas (Goltapeh et al., 2008).

Las asociaciones con HMA proporcionan muchos beneficios a su huésped que incluyen un incremento en la adquisición de P y otros nutrientes y una mayor capacidad de absorción general de las raíces, mayor área de suelo explorada (ya que el hongo actúa como una extensión de la raíz), una mayor longevidad de las raíces absorbentes, una mejor utilización de nutrientes de baja disponibilidad y una mejor retención/almacenamiento de nutrientes solubles, reduciendo la reacción de éstos con los coloides del suelo o pérdidas por lixiviación (Nath y Meena, 2018).

Sumado a lo anterior, los cambios morfológicos y fisiológicos que ocurren en la planta debido a la presencia de HMA permiten al huésped expresar una mayor tolerancia al estrés hídrico y una mayor resistencia a las enfermedades (Goltapeh et al., 2008; Miransari, 2011; Nath y Meena, 2018). Respecto a esto último, los HMA pueden actuar como agentes de control biológico a través de mecanismos de interacción tales como nutrición mejorada, competencia, cambios morfológicos, inducción de mecanismos de defensa y sitios de infección reducidos (Dames y Ridsdale, 2012).

La colonización intraradical se produce tanto intra como intercelularmente y culmina con la formación de arbusculos, pequeños árboles fúngicos, dentro de las células corticales internas (Nath y Meena, 2018). Además de los arbusculos, forman dentro de la raíz estructuras tales como hifas intra e intercelulares y vesículas (Goltapeh et al., 2008). Los arbusculos son estructuras finamente ramificadas que se forman dentro de la luz de la célula del huésped y sirven como un importante sitio de intercambio metabólico entre la planta y el hongo (Nath y Meena, 2018), mientras que las vesículas son los orgánulos de almacenamiento especializados con numerosas vacuolas grandes (Miransari, 2011). Las vesículas pueden ser esféricas, ovales o lobuladas y son ricas en lípidos (Goltapeh et al., 2008).

El micelio que se extiende en el suelo está involucrado en la búsqueda de nuevas plantas y en la adquisición de nutrientes minerales que son utilizados por los HMA y por las plantas, mientras que la interface intraradical está relacionada con la transferencia de nutrientes entre los simbioses, siendo el primero altamente variable influido por la heterogeneidad del suelo, mientras que las estructuras intraradicales son relativamente constantes y controladas a través de la homeostasis de la raíz (Smith y Read, 2008).

El término micorriza vesicular-arbuscular, que se usó durante muchas décadas, se ha descartado porque las vesículas solo están formadas por miembros de *Glomineae* pero el nombre 'arbuscular' se conserva actualmente, independientemente de la diversidad estructural (Franken, 2010). Sin embargo, se reconoce una amplia gama de estructuras intraradicales formadas por HMA, que incluyen bobinas de hifas intracelulares bien desarrolladas, que a veces ocurren en ausencia de cualquier arbusculo (Smith y Read, 2008).

Las simbiosis micorrízicas en sistemas de campo natural a menudo se establecen en una planta objetivo a través del crecimiento de una red micelial existente en contraste con un experimento de inoculación donde la colonización generalmente se realiza a partir de esporas o micelios fragmentados dando como resultado que los costos de carbono para establecer la simbiosis en sistemas de campo no manipulados pueden ser "pagados" con mayor frecuencia por la planta huésped o que la colonización puede ser más rápida desde una red micelial existente, incrementando los beneficios netos

proporcionados por los hongos micorrízicos a las plantas hospedadoras en relación con los experimentos de inoculación (Hoeksema et al., 2010).

6.b. Papel de las micorrizas arbusculares en la nutrición fosfórica de las plantas

Una de las principales ventajas de la simbiosis micorrízica es una mejora en la nutrición fosfórica de las plantas ya que los hongos extienden en el suelo la superficie de absorción a través de sus hifas incrementando la captación de P y otros nutrientes minerales (Smith y Read, 2008). Los micelios extraradicales acceden a fosfatos en la solución del suelo a distancias de hasta varios centímetros desde la raíz y luego los transfieren a la planta (Osorio y Habte, 2009; Smith et al., 2011).

Debido a su baja solubilidad y movilidad en el suelo, el P puede agotarse rápidamente en la rizosfera por la absorción de la raíz dando como resultado el desarrollo de zonas de agotamiento alrededor de las raíces (Goltapeh et al., 2008). Los HMA proporcionan una vía muy efectiva mediante la cual el P se extrae de grandes volúmenes de suelo y se envía rápidamente a las células corticales dentro de la raíz, sin pasar por la vía de absorción directa de las plantas (Smith et al., 2011).

La rápida propagación de hifas micorrízicas a muchos centímetros de las raíces y el recambio de hifas exploratorias mantiene una gran superficie para la absorción (Smith y Read, 2008) reduciendo el impacto del agotamiento de P en la rizosfera (Smith et al., 2011). Además, la alta densidad de las hifas les permite a los HMA abarcar un área considerablemente mayor y, debido a su menor diámetro y mayor longitud en relación con las raíces y los pelos radicales, pueden penetrar en los poros del suelo que son inaccesibles por las raíces, aumentando efectivamente el volumen de solución de suelo disponible para la absorción (Smith y Read, 2008).

La colonización micorrízica puede verse afectada por la disponibilidad de P en el suelo y se ha observado que aumenta con bajos tenores y se reduce con altos contenidos de este elemento (Treseder, 2004; Smith y Read, 2008). La limitación relativa de los recursos del suelo en comparación con la fotosíntesis puede determinar si las micorrizas son una estrategia rentable para la absorción de nutrientes por parte de las plantas lo que explica que con alta disponibilidad de P se reduzca la distribución de carbohidratos de las plantas a los hongos (Miller et al., 2012). Es por ello que la aplicación de fertilizantes fosfóricos tiende a reducir el porcentaje de micorrización (Smith et al., 2011). Sin embargo, aunque los efectos de la colonización micorrízica en la captación son frecuentemente mayores cuando el suministro de P es bajo, pueden aparecer efectos significativos incluso cuando los niveles son adecuados para un crecimiento casi máximo de la planta (Smith y Read, 2008).

Conjuntamente con el incremento en la absorción de P, los HMA ayudan a la planta en la captación de micronutrientes, elementos que se consideran relativamente inmóviles, a la vez que toman estos elementos y los almacenan para evitar que sus concentraciones alcancen niveles tóxicos (Goltapeh et al., 2008). En condiciones de sequía, la contribución de las hifas a la absorción de nutrientes es ventajosa para las plantas micorrizadas (Goltapeh et al., 2008).

7. Interacciones entre PGPR y micorrizas arbusculares

El establecimiento simbiótico de los HMA en las raíces de las plantas se ve afectado de diversas maneras por otros microorganismos de la rizosfera y más especialmente por las bacterias (Lies et al., 2018). Es por ello que la simbiosis micorrízica no debe considerarse simplemente como una interacción bipartita planta-hongo, sino que se debe incorporar a los organismos asociados (Tarkka y Frey-Klett, 2008).

Las interacciones entre bacterias y HMA se producen naturalmente ya que comparten hábitats comunes, como la superficie de la raíz, y pueden conducir a una mejora en el crecimiento y la nutrición de las plantas (Dames y Ridsdale, 2012). Con interacciones sinérgicas puede obtenerse una producción de mayor rendimiento, que al mismo tiempo puede ser sostenible desde el punto de vista agrícola (Miransari, 2011).

Las rizobacterias que promueven consistentemente el desarrollo de micorrizas son denominadas bacterias colaboradoras de micorrizas o "MHB" -del inglés Mycorrhiza Helper Bacteria"- (Tarkka y Frey-Klett, 2008). Algunas PGPR pueden comportarse como MHB al promover el establecimiento y el funcionamiento de la simbiosis entre las plantas y los HMA (Artursson et al., 2006; Antoun, 2012; Bruzos, 2017). Se ha demostrado que las proteobacterias gramnegativas tienen propiedades como MHB, entre ellas *Azospirillum*, *Pseudomonas* y *Bradyrhizobium* (Frey-Klett et al., 2007; Miransari, 2011; Lies et al., 2018).

Los MHB actúan mediante diversos mecanismos y pueden estimular el desarrollo de las micorrizas en diferentes fases durante la interacción bacteria-hongo-raíz, tanto en etapas presimbióticas como durante la colonización de la raíz (Tarkka y Frey-Klett, 2008; Bruzos, 2017). Las MHB pueden mejorar la germinación de las esporas fúngicas y el crecimiento del micelio a través de la producción de factores de crecimiento o también desintoxicando sustancias antagónicas o inhibiendo a los competidores y reduciendo de esta forma las tensiones que podrían afectar a la simbiosis micorrízica (Frey-Klett et al., 2007).

La producción de compuestos por MHB que mejoran las cantidades de exudados de la raíz resulta en la activación de las hifas de HMA y, por consiguiente, en una mayor tasa de colonización de la raíz (Barea et al., 2005). Además, algunas bacterias indirectamente ayudan a la penetración del hongo al modificar la permeabilidad de la pared celular de la raíz (Lies et al., 2018). Esto último podría ocurrir a través de la producción controlada por la MHB de las enzimas de digestión de la pared celular, permitiendo la penetración mejorada de las raíces por las hifas fúngicas y facilitando su propagación dentro de los tejidos de la raíz (Tarkka y Frey-Klett, 2008).

La estimulación del desarrollo de la raíz es también otra forma de promover la colonización micorrízica por MHB al aumentar el número de entradas de penetración para las hifas a través de la ramificación de la raíz mediante la producción de fitohormonas (Miransari, 2011; Lies et al., 2018). La formación de nuevas puntas de raíz, probablemente debido a la producción de auxinas o sustancias relacionadas con auxinas por parte de las bacterias, puede conducir al establecimiento de más micorrizas, a medida que aumenta la densidad de los sitios de colonización por volumen de suelo (Tarkka y Frey-Klett, 2008).

Los MHB pueden promover el crecimiento de las hifas mediante la producción de compuestos metabólicos secundarios que pueden afectar el metabolismo de los hongos derivando en la promoción del crecimiento micelial (Tarkka y Frey-Klett, 2008). El aumento de la biomasa micelial en el suelo conduce a un aumento de los encuentros de hongo-raíz, lo que resulta en una micorrización más rápida (Bruzos, 2017).

También se han informado los efectos sinérgicos de PSB y HMA en la nutrición fósforica de las plantas (Osorio y Habte, 2009). En suelos con baja disponibilidad de P, las PSB pueden liberar iones fosfato de compuestos inorgánicos y orgánicos escasamente solubles en el suelo, contribuyendo así con un aumento del P en el suelo absorbido por las hifas de HMA que luego pasa a la planta (Artursson et al., 2006; Osorio y Habte, 2009; Dames y Ridsdale, 2012).

Las plantas micorrizadas liberan cantidades más altas de sustancias carbonosas en la rizosfera que son utilizadas como fuente de carbono por microorganismos solubilizadores de P o "PSM" -del inglés Phosphate Solubilizing Microorganisms-, a la vez que la extensa red de hifas formada alrededor de las raíces puede absorber

eficazmente el P liberado por PSM, minimizando así su refijación (Osorio y Habte, 2009). El P soluble que ingresa al suelo después de la mineralización por parte de dichas bacterias da como resultado aumentos localizados y de corto plazo en la concentración de iones fosfato en la solución del suelo, de lo que pueden beneficiarse las hifas fúngicas y, posteriormente, las plantas (Barea et al., 2005; Artursson et al., 2006).

Por otro lado, se ha demostrado que las micorrizas pueden influir en la interacción entre la planta y las comunidades microbianas en las raíces (Barea et al., 2005; Artursson et al., 2006; Bruzos, 2017). El establecimiento de las micorrizas cambia la composición química de los exudados de las raíces, mientras que el desarrollo del micelio en el suelo, que puede actuar como fuente de carbono para los microorganismos edáficos, introduce modificaciones físicas en el entorno de las raíces (Barea et al., 2005).

CAPÍTULO III

EFECTO DE LA INOCULACIÓN CON RIZOBACTERIAS SOBRE EL CRECIMIENTO, PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y MICORRIZACIÓN DE *Paspalum atratum* cv. Cambá FCA ENSAYO EN MACETAS

1. Materiales y métodos

1.1. Material biológico

Como material vegetal se utilizaron semillas de la especie vegetal *Paspalum atratum* cv. Cambá FCA.

En los tratamientos inoculados, se utilizaron las formulaciones comerciales de PGPR que se describen a continuación:

- *Azospirillum brasilense* Az39, inoculante líquido en medio estéril con más de 2×10^9 UFC.ml⁻¹.
- *Pseudomonas fluorescens*, inoculante líquido en medio estéril con más de 2×10^8 UFC.ml⁻¹.
- *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculante líquido en medio estéril con más de 3×10^9 UFC.ml⁻¹.

1.2. Contenedores y sustrato

Se ocuparon macetas de plástico soplado de color negro de 3 litros de capacidad. Se utilizó como sustrato el suelo de hasta una profundidad de 20 cm de un pastizal natural utilizado para el pastoreo de ganado bovino perteneciente al orden Alfisol (Escobar et al., 1996), de textura franco arenoso y pH 4,52.

El nivel de P en el suelo utilizado fue de 1,06 ppm y el tenor de N del 0,12% (calculado en base al porcentaje de materia orgánica según Gros y Domingues, 1992). Las características químicas del análisis de suelo y la metodología de medición utilizada se muestran en el Anexo 1 (tabla 7).

1.3. Tratamientos

Se utilizó un arreglo factorial (4x2), con dos factores A) Inoculantes, con cuatro niveles (tres inóculos de PGPR más un testigo sin inocular); y B) Fertilización fosfórica, con dos niveles (fertilizado y sin fertilizar), sumando un total de ocho tratamientos (tabla 1).

Tabla 1. Inoculación de *P. atratum* cv. Cambá FCA con PGPR -
Tratamientos aplicados en el ensayo en macetas

Tratamientos	Fertilización fosfórica	Inoculante
AzF0	Sin fertilizar	<i>Azospirillum brasilense</i> Az39
AzF1	Fertilizado	
PsF0	Sin fertilizar	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
PsF1	Fertilizado	
BrF0	Sin fertilizar	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> E109
BrF1	Fertilizado	
TeF0	Sin fertilizar	Testigo sin inoculación
TeF1	Fertilizado	

En los tratamientos fertilizados se aplicó 60 Kg.ha⁻¹ de P₂O₅ a la siembra, suministrados en forma de superfosfato triple de calcio (SFT). La cantidad aplicada fue definida en función del tenor de arcilla y de la cantidad de P del suelo y se pretende elevar la disponibilidad de fósforo a más de 7 ppm, siguiendo las recomendaciones de Vilela et al. (2001) para *P. atratum* cv. Pojuca (consultar la tabla 8 en el Anexo 2).

1.4. Instalación del ensayo

La investigación se llevó a cabo en un establecimiento ganadero ubicado en la localidad de Tapebicuá, Departamento de Paso de los Libres, Provincia de Corrientes, Argentina (29° 28' Sur y 57° 00' Oeste).

El clima de la región es subtropical, con precipitaciones medias anuales de 1.485 mm. El invierno es la estación más seca. La temperatura media anual es de 19,7°C, con valores máximos promedio de 25,6°C y mínimos de 14,3°C (EEA INTA Mercedes).

Los inoculantes se aplicaron a las semillas en las dosis recomendadas en el marbete de cada producto, realizando una mezcla homogénea y dejando orear a la sombra. Los tratamientos sin inoculación se humedecieron con agua simulando una inoculación.

La inoculación se realizó el mismo día de la siembra. El ensayo se instaló el 6 de noviembre de 2013.

La siembra fue superficial. Las semillas se cubrieron con una fina capa de suelo bien mullido. Se sembraron 10 semillas por maceta y a los 10 días desde la emergencia se ralearon las plántulas dejando 3 ejemplares por contenedor.

Las macetas fueron rotadas al azar y regadas periódicamente hasta el momento de la cosecha, manteniendo un nivel de humedad constante. Las malezas se controlaron manualmente y se revisó diariamente la sanidad de las plantas.

1.5. Diseño experimental y variables evaluadas

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con seis repeticiones para cada tratamiento. Cada maceta comprendió una unidad experimental, disponiéndose en total de cuarenta y ocho unidades experimentales.

A los 30 días desde la emergencia se midieron las variables descriptas en la tabla 2. En el Anexo pueden observarse fotografías del ensayo (figuras 20-24).

Tabla 2. Variables evaluadas en el ensayo en macetas y metodologías empleadas

Variable	Metodología empleada
Colonización de raíces	<p>Se evaluó la colonización únicamente en los tratamientos inoculados, utilizando medios de cultivo específicos según la PGPR en cuestión.</p> <p>Las raíces se removieron de las plantas cosechadas, se agitaron vigorosamente para eliminar el suelo suelto, se lavaron en agua destilada estéril para eliminar las partículas de suelo adheridas y se sumergieron durante 10 minutos en una solución amortiguadora de fosfatos y sal (Kremer et al, 1990).</p> <p>Se cortaron las raíces en trozos pequeños, se colocaron en medios de crecimiento específicos: Congo red-NFb para <i>Azospirillum</i> (Rodríguez Cáceres, 1982; Bashan et al., 1993); King's B para <i>Pseudomonas</i> (Bashan et al., 1993) y medio EMA para <i>Bradyrhizobium</i> (Vincent, 1970), y se pusieron a incubar a 25-30°C hasta que el crecimiento fue evidente.</p> <p>Para caracterizar macro y microscópicamente los cultivos generados se recurrió al Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Brenner et al., 2005) y se realizó la tinción de Gram para determinar morfotipos celulares (Gram, 1884).</p>
Micorrización espontánea	<p>Las raíces se lavaron y sumergieron durante un día en KOH al 10%, luego en H₂O₂ 10 vol. por 15 minutos, se lavaron con agua corriente y se sumergieron en HCl. Por último se transfirieron a recipientes con lactofenol a los que se adicionó el colorante azul de tripán (Phillips y Hayman, 1970).</p>

Tabla 2 (continuación). Variables evaluadas en el ensayo en macetas y metodologías empleadas

Micorrización espontánea (continuación)	<p>Para la determinación del porcentaje de micorrización se utilizó el método por observación en láminas de Sieverding (1983). Fragmentos de 2 cm de raíz fueron colocados paralelamente sobre un portaobjetos y tapados con cubreobjetos.</p> <p>Se evaluó mediante observación con microscopio la colonización en cada campo con raíz a lo largo de cada transecto por presencia o ausencia de estructuras fúngicas (hifas, arbusculos, vesículas).</p> <p>Se calculó el porcentaje de micorrización mediante la siguiente fórmula:</p> $\% \text{ Micorrización} = (\text{N}^\circ \text{ de campos colonizados} / \text{N}^\circ \text{ total de campos observados}) * 100$
Altura	Las plantas se midieron con una regla graduada desde el suelo hasta el punto más alto de las mismas, sin estirarlas.
Macollos	Se contaron los macollos de cada planta.
Volumen radical	Las raíces se lavaron en agua corriente y se sumergieron en una probeta graduada con agua. Por desplazamiento se obtuvo el volumen radical.
Biomasa total, de la parte aérea y radical	Las plantas se lavaron, se separaron en dos fracciones (aérea y radical), y se colocaron en bolsas de papel sulfito y secaron en estufa a 50-60°C hasta peso constante. Luego se pesaron en balanza digital electrónica. Se evaluó la biomasa total, de la porción aérea y radical.
Concentración de P en brotes	La biomasa aérea secada en estufa se molió y se determinó el porcentaje de P con el método Murphy – Riley (Jackson, 1964).

1.6. Análisis estadístico

Los datos se analizaron estadísticamente mediante un Análisis de la Varianza (ANAVA) factorial, siendo los factores principales la inoculación con PGPR y la fertilización con P. Las diferencias entre las medias se compararon mediante el Test de Tukey ($P \leq 0,05$). La normalidad y homocedasticidad de los datos fueron previamente probadas. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico InfoStat versión 2014 (Di Rienzo et al., 2014).

2. Resultados obtenidos

2.1. Colonización de raíces

Mediante el cultivo de raíces y posterior caracterización sobre la base de la morfología de la colonia, la tinción de Gram y la forma de las células, se comprobó la colonización de raíces por las PGPR inoculadas en la rizosfera de *P. atratum* cv. Cambá FCA, para cada tratamiento correspondiente.

Los aislados provenientes de las raíces de plantas de los tratamientos AzP0 y AzP1 fueron compatibles con las características descritas para *Azospirillum* sp., aquellos que se obtuvieron de las raíces de los tratamientos PsP0 y PsP1 se identificaron como miembros del género *Pseudomonas* sp. y aquellos aislados obtenidos a partir de raíces de los tratamientos BrP0 y BrP1 se encontraron semejantes a los descriptos para el género *Bradyrhizobium* sp.

2.2. Crecimiento, producción de biomasa y micorrización espontánea

El ANAVA mostró diferencias significativas para la interacción entre los factores fertilización con P e inoculación con PGPR para la micorrización espontánea, contenido de biomasa (aérea, radical y total) y concentración de P (tabla 3).

Tabla 3. Resultados del ANAVA factorial para los efectos de la inoculación con PGPR bajo dos niveles de fertilización fosfórica de *P. atratum* cv. Cambá FCA. Ensayo en macetas

Variables Evaluadas	Efectos principales		Interacción
	Inoculación	Fertilización	Inoculación x fertilización
Micorrización espontánea (%)	0,0003 **	<0,0001 **	0,0060 **
Altura (cm)	0,0023 **	0,2603 ns	0,6693 ns
Macollos (N°.pl ⁻¹)	0,3391 ns	<0,0001 **	0,4611 ns
Volumen radical (ml)	<0,0001 **	0,0247 *	0,3217 ns
Biomasa de la parte aérea (g)	0,0006 **	0,0002 **	0,0289 *
Biomasa radical (g)	<0,0001 **	0,0001 **	0,0011 **
Biomasa total (g)	0,0001 **	<0,0001 **	0,0077 **
Concentración de P (%)	0,0083 **	<0,0001 **	0,0106 *

Se presentan los p-valores obtenidos para cada fuente de variación. Diferencias significativas: *, P <0.05; **, P <0.01; ns (no significativo), p > 0,05.

2.2.a. Micorrización espontánea

Se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos en la respuesta a la micorrización espontánea, siendo el tratamiento AzF0 el que expresó el mayor porcentaje de colonización diferenciándose estadísticamente de todos los demás.

Todos los tratamientos mostraron una respuesta positiva a la micorrización espontánea aunque aquellas plantas fertilizadas manifestaron en general un porcentaje menor de micorrización en comparación con las no fertilizadas (figura 1).

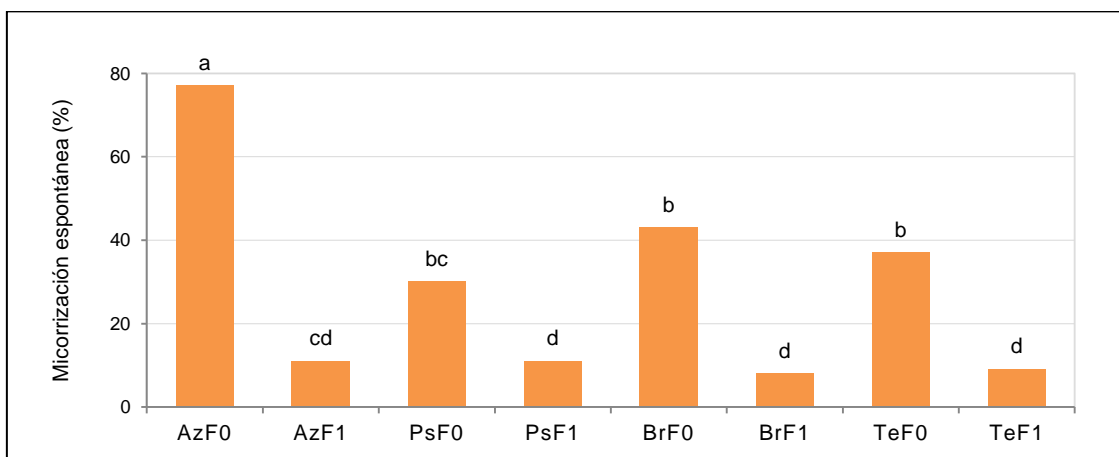


Figura 1. Porcentaje de micorrización espontánea de plantas de *P. atratum* cv. Cambá FCA inoculadas con PGPR bajo dos niveles de fertilización fosfórica. Ensayo en macetas. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, P≤0,05)

2.2.b. Altura

La respuesta en altura fue influenciada positivamente por la inoculación con PGPR. Aquellos tratamientos inoculados con *A. brasilense* Az39 y *B. japonicum* E109 se diferenciaron significativamente superando a los testigos sin inoculación (figura 2).

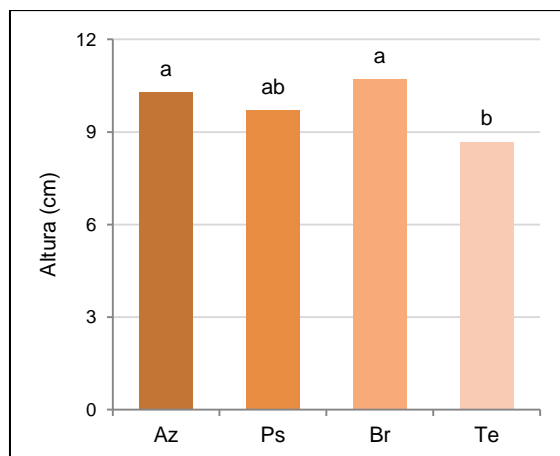


Figura 2. Altura de plantas de *P. atratum* cv. Cambá FCA inoculadas con PGPR. Ensayo en macetas. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0,05$)

2.2.c. Número de macollos

El ANAVA determinó un efecto significativo de la fertilización fosfórica para la cantidad de macollos existentes por planta y el Test de Tukey indicó que los tratamientos fertilizados tuvieron mejor comportamiento que los tratamientos no fertilizados (figura 3).

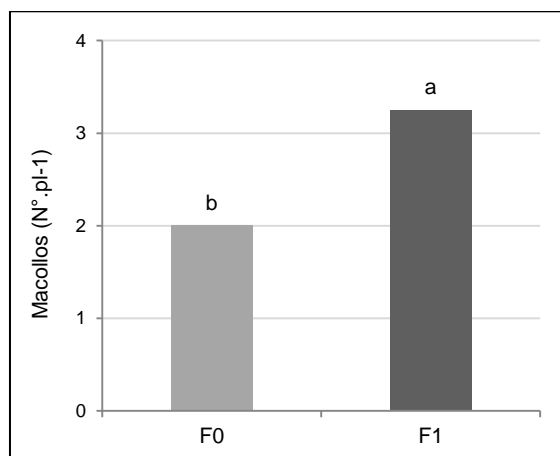


Figura 3. Macollos de plantas de *P. atratum* cv. Cambá FCA bajo dos niveles de fertilización fosfórica. Ensayo en macetas. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0,05$)

2.2.d. Volumen radical

Los resultados del ANAVA sugieren que no hubo interacción entre factores para el volumen radical sino que existió un efecto directo del inoculante y del fertilizante sobre la acumulación de biomasa en los brotes. Al evaluar el efecto del inoculante se observó que los tres tratamientos inoculados obtuvieron valores superiores y se diferenciaron significativamente del testigo sin inocular (figura 4 a).

Respecto a la fertilización fosfórica, aquellos tratamientos con agregado de fósforo superaron significativamente a los tratamientos sin fertilización (figura 4 b).

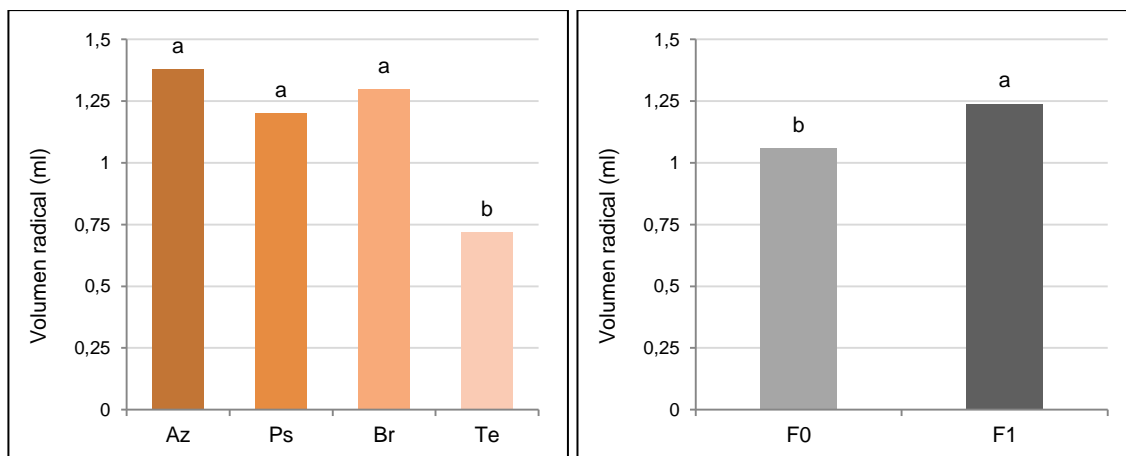


Figura 4. Efecto de la inoculación con PGPR (a) y fertilización fosfórica (b) sobre el volumen radical de plantas de *P. atratum* cv. Cambá FCA. Ensayo en macetas.

Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0,05$)

2.2.e. Contenido de biomasa

El análisis estadístico mostró diferencias significativas para la interacción entre fertilización con P e inoculación con PGPR para el contenido de biomasa radical, de la parte aérea y total. Las plantas de los tratamientos inoculados y fertilizados manifestaron los mayores valores en general, siendo el tratamiento de mejor comportamiento BrF1 seguido de PsF1 y luego AzF1 para las tres variables de respuesta, mientras que los dos testigos presentaron los valores más bajos en cada evaluación (figura 5).

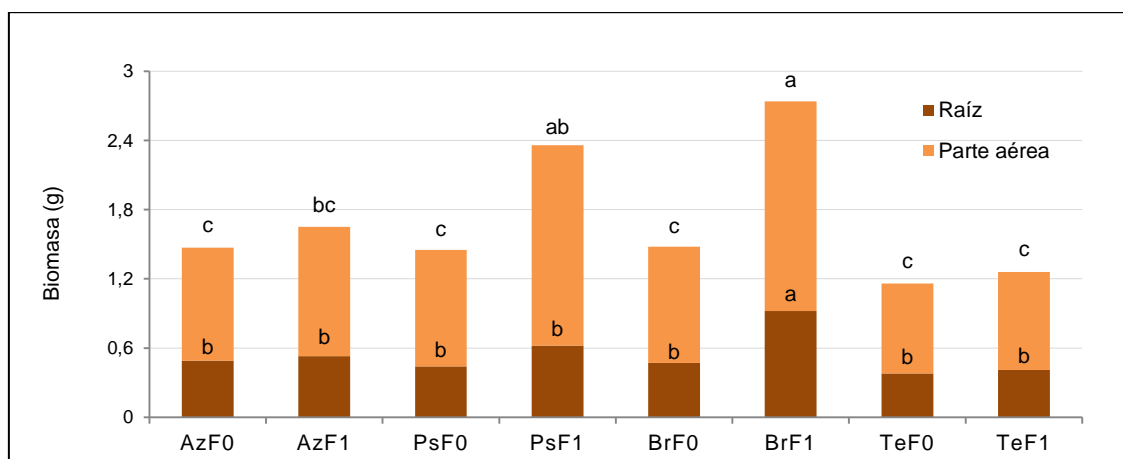


Figura 5. Producción de biomasa total, aérea y radicular de plantas de *P. atratum* cv. Cambá FCA inoculadas con PGPR bajo dos niveles de fertilización fosfórica. Ensayo en macetas.

Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0,05$)

El tratamiento BrF1 se diferenció significativamente de los demás en contenido de biomasa radical y de la parte aérea (en este caso sin diferencias significativas con PsF1). Se observa que las plantas del cv. Cambá FCA inoculadas con *B. japonicum* E109 mostraron un incremento en la acumulación de biomasa aérea en los tratamientos con agregado de P a la siembra.

También hubo un incremento significativo en plantas inoculadas con *P. fluorescens* que fueron fertilizadas con fósforo en contraste con PsF0.

2.3. Concentración de P en brotes

El porcentaje de P en brotes también arrojó diferencias significativas entre tratamientos para la interacción entre factores. En general, los tratamientos fertilizados registraron una concentración mayor de este nutriente, independientemente de la inoculación con PGPR (figura 6).

BrF1 demostró el porcentaje más alto de P en tejidos al igual que PsF1 aunque no se diferenciaron significativamente de TeF1.

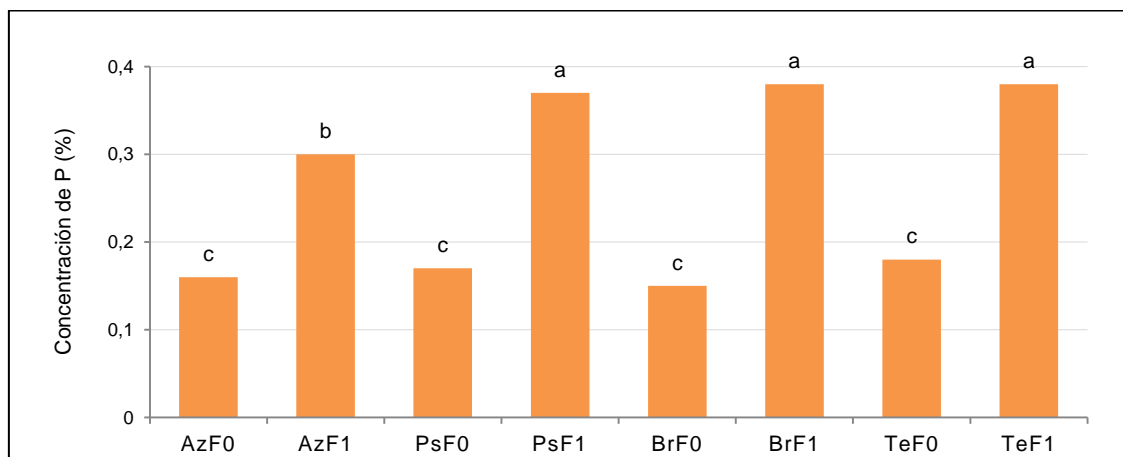


Figura 6. Concentración de P de plantas de *P. atratum* cv. Cambá FCA inoculadas con PGPR bajo dos niveles de fertilización fosfórica. Ensayo en macetas.

Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0,05$)

3. Discusión

3.1. Colonización de raíces

La asociación de una PGPR con la raíz de la planta solo puede tener éxito si la bacteria puede sobrevivir en el suelo y alcanzar poblaciones significativas en el sistema radical del huésped (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000). La presencia de las rizobacterias inoculadas en plantas de *P. atratum* cv. Cambá FCA sugiere que las respuestas significativas observadas en la micorrización espontánea y en el crecimiento y producción de biomasa de la gramínea podrían atribuirse en parte al accionar de estos microorganismos en la rizosfera, sin dejar de lado la influencia de la fertilización fosfórica como se explicará más adelante.

3.2. Micorrización espontánea

La respuesta positiva del cv. Cambá FCA a la micorrización espontánea es consistente con estudios previos que han señalado una mayor respuesta a la colonización micorrízica por gramíneas C4 perennes en general (Hoeksema et al., 2010; Miller et al., 2012).

3.2.a. Efecto de la fertilización fosfórica sobre la micorrización espontánea

De acuerdo con Smith y Read (2008) y Smith et al. (2011), el grado de efectividad de la simbiosis con HMA depende tanto de la planta como de las especies de hongos asociadas y está inversamente relacionado con el P disponible en el suelo. En esta investigación, se observó la infección de raíces del cv. Cambá FCA con HMA nativos en

todos los tratamientos estudiados. Sin embargo quedó en evidencia el efecto negativo de la fertilización fosfórica sobre la micorrización, ya que los tratamientos fertilizados mostraron un porcentaje menor de colonización.

Dos Santos Pessoa et al. (2000) evaluaron la acción de las micorrizas en la eficiencia agronómica de diferentes fuentes de P, entre ellas SFT, y verificaron que la colonización micorrízica de *P. notatum* presentó variaciones de acuerdo con la disponibilidad de P en el suelo siendo menor en el tratamiento con SFT, debido a una mayor disponibilidad de este elemento. Del mismo modo, otros experimentos realizados con gramíneas cultivadas en macetas también han informado un menor porcentaje de colonización de la raíz por HMA debido al agregado de P al sustrato (Pacovsky, 1989; Hetrick et al., 1990; Carneiro et al., 2007; Carneiro et al., 2011; Řezáčová et al., 2018).

Treseder (2004) señala que si la disponibilidad de P aumenta es de esperarse un descenso en la abundancia de micorrizas ya que las plantas asignan carbohidratos en otros lugares y los hongos micorrízicos se vuelven carbono limitados. En este sentido, Řezáčová et al. (2018) informaron que la asignación de carbono por parte de *Panicum maximum* a las estructuras de HMA fueron más bajas con alta disponibilidad de P (tratamientos fertilizados) que con baja disponibilidad (tratamientos sin fertilización).

3.2.b. Relación entre la micorrización espontánea y concentración de P en brotes

En numerosos estudios se ha informado una mayor recuperación de P agregado al suelo por plantas que forman asociaciones eficientes con HMA, principalmente cuando la disponibilidad de P se encuentra en niveles subóptimos o cuando la fuente agregada es de menor solubilidad (dos Santos Pessoa et al., 2000). Cooperband et al. (1994) señalaron un incremento en la concentración de P en plantas de *Paspalum conjugatum* que mostraron un alto grado de infección micorrízica, al igual que Rocha et al. (2015) que estudiaron la influencia de la inoculación con HMA en *Lolium multiflorum*, *Brachiaria dictyonera*, *Brachiaria brizantha*, *P. máximum* y observaron mayores porcentajes de infección micorrízica acompañados por mayores concentraciones de P en brotes en tratamientos inoculados. Rheinheimer y Kaminski (1995) también observaron que la corteza de raíces de *P. notatum* se presentó densamente colonizada por las estructuras fúngicas en condiciones de baja disponibilidad de P, coincidiendo con las mayores absorciones de este nutriente.

Sin embargo, un incremento en la colonización micorrízica no siempre se correlaciona en forma positiva con la cantidad de P absorbido (Rheinheimer y Kaminski, 1995). En efecto, en el presente estudio se observó que los tratamientos que registraron el mayor porcentaje de colonización fueron los que manifestaron el menor porcentaje de P en brotes de *P. atratum* cv. Cambá FCA. Aún así, debe señalarse que la falta de una respuesta positiva en el porcentaje de P en brotes no significa que la vía de absorción de HMA no contribuye a la adquisición de P ya que tal como lo describen Smith y Read (2008), los HMA hacen contribuciones altamente significativas a la absorción de este elemento independientemente de la respuesta global de las plantas, ya que la colonización micorrízica puede resultar en la inactivación completa de la vía directa de captación de P a través de pelos radicales y epidermis.

3.2.c. Efecto de la inoculación con PGPR sobre la micorrización espontánea

En esta investigación, *A. brasilense* Az39 se comportó como MHB estimulando el establecimiento y el funcionamiento de la simbiosis entre *P. atratum* cv. Cambá FCA y los HMA. Resultados similares fueron obtenidos por Djonova et al. (2016) para plantas de *Phleum pratense*, *Dactylis glomerata* y *Festuca arundinacea* cultivadas en macetas, las cuales manifestaron un incremento en el porcentaje de micorrización cuando se coinocularon con un biofertilizante micorrízico y *A. brasilense* en comparación con el

testigo sin inocular y el tratamiento únicamente inoculado con HMA. Rao et al. (1985) documentaron que la inoculación de semillas de *Pennisetum americanum* con *A. brasilense* aumentó significativamente la infección de la raíz por HMA sobre el control no inoculado en plantas creciendo en macetas.

De igual manera, Pacovsky et al. (1985) y Pacovsky (1989) señalaron que para el *Sorghum bicolor* inoculado con HMA y *A. brasilense*, la presencia de esta rizobacteria en la rizosfera se correlacionó positivamente con el porcentaje de colonización por HMA. Domínguez-Núñez et al. (2015) subrayan que la combinación de *Azospirillum* y HMA en la rizósfera parece adecuada para las prácticas de agricultura sostenible, ya que ambos microorganismos son compatibles entre sí.

3.3. Crecimiento y producción de biomasa

En este ensayo, *B. japonicum* E109 se comportó como PGPR de *P. atratum* cv. Cambá FCA promoviendo la producción de biomasa en general y el crecimiento en altura, con o sin el agregado de fósforo a la siembra, respectivamente. En este sentido, la capacidad de los rizobios de actuar como PGPR en no leguminosas se atribuye principalmente a la producción de sustancias promotoras del crecimiento vegetal tales como auxinas, citoquininas y giberelinas y con la solubilización de fosfatos (Baset Mia y Shamsuddin, 2010; Mehboob et al., 2012; Gopalakrishnan et al., 2015). Cassán et al. (2009) demostraron la facultad de la cepa E109 de producir fitohormonas in vitro (auxinas y giberelinas) y luego observaron que esta PGPR promovía un incremento en el desarrollo temprano de las plántulas de maíz, las cuales obtuvieron un mayor peso seco de la parte aérea, peso seco radical y altura de plantas en relación al testigo sin inocular. Esta PGPR podría haber empleado alguno de estos mecanismos para explicar el efecto positivo sobre el crecimiento y desarrollo del cv. Cambá FCA.

En consistencia con ello, otros experimentos también han citado la capacidad de los rizobios de asociarse y promover el crecimiento de gramíneas como pastos (Machado et al., 2017; Machado et al., 2018) y cereales (Matiru y Dakora, 2004; Dazzo y Yanni, 2006; Baset Mia y Shamsuddin, 2010). Bécquer et al. (2007) observaron en un ensayo en invernadero que *Bradyrhizobium* sp. logró un mayor peso seco aéreo, peso seco raíces y longitud del tallo que el control sin inoculación. También, Machado et al. (2013) verificaron que *Bradyrhizobium* sp. promovió un incremento en la masa seca de *Paspalum sauriae* y mayor peso seco de raíces y brotes y un aumento del volumen radical en plantas de *P. maximum* en comparación con el testigo fertilizado con N.

En cuanto al efecto de la fertilización fosfórica en particular, en esta investigación se evidenció el efecto positivo de la misma sobre el número de macollos, producción de biomasa y volumen radical de *P. atratum* cv. Cambá FCA, respuesta que se correlaciona con trabajos anteriores realizados con el cv. Pojuca de la misma especie, que mostraron consistentemente al P como el nutriente más limitante cuya ausencia en la fertilización completa proporcionó drásticas reducciones en el rendimiento en forraje (Costa et al., 2008). También cabe señalar que los tratamientos fertilizados que demostraron una respuesta significativamente positiva en contenido de biomasa fueron aquellos inoculados con *B. japonicum* E109 y *P. fluorescens*, pudiendo atribuirse esto a la capacidad de estas PGPR de solubilizar fosfatos y aumentar el P edáfico disponible para la gramínea.

Las plantas inoculadas mostraron valores superiores de volumen radicular, aumento que podría atribuirse a la producción de AIA explicada para las PGPR en estudio (Spaepen et al., 2007; Duca et al., 2014). El mayor volumen se observó en plantas tratadas con *A. brasilense* Az39, siendo el sistema de raíz mejorado el efecto fenotípico más común de la inoculación con *Azospirillum* en la mayoría de las especies de plantas (Bashan y de-Bashan, 2010) y que probablemente se deba a las sustancias reguladoras del crecimiento secretadas por la bacteria (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000). En este

sentido, Dobbelaere et al. (1999) demostraron que la inhibición de la longitud de la raíz junto con el aumento del volumen y el peso de la raíz son respuestas típicas a la producción bacteriana de AIA y pueden imitarse mediante la aplicación exógena de AIA en la semilla. Barbieri et al. (1991) evaluaron la participación del AIA en la promoción del crecimiento del trigo comparando los efectos de la inoculación con dos cepas de *A. brasilense*: SpM7918, mutante con baja producción de AIA en comparación con la cepa de tipo salvaje Sp6 y observaron que el mutante mostró una reducida capacidad de promoción del desarrollo del sistema radical en lo que respecta tanto al número como a la longitud de las raíces laterales y la distribución de los pelos radicales.

3.4. Concentración de P en brotes

Se ha informado que las PGPR utilizadas en este ensayo pueden promover un aumento en la disponibilidad de P en la solución del suelo debido a su capacidad para solubilizar fosfatos inorgánicos (Rodríguez y Fraga, 1999). Esto podría explicar por qué las plantas inoculadas con *B. japonicum* E109 y *P. fluorescens* que fueron fertilizadas con P a la siembra demostraron una mayor concentración de este mineral en brotes en contraste con los tratamientos no fertilizados. Sin embargo, el tratamiento testigo fertilizado mostró las plantas con mayor porcentaje de P junto a BrF1 y PsF1 por lo que el incremento en la absorción de P pudo deberse simplemente a una mayor disponibilidad del nutriente en el suelo por la adición de SFT.

Las variaciones en la concentración de un nutriente en la planta reflejan la eficiencia de absorción y de uso y dependen de su disponibilidad en el suelo, así como de su influencia sobre el crecimiento vegetal, que puede resultar en el efecto de dilución o concentración del mismo en la materia seca producida (Fonseca et al., 2000). En este ensayo, la incorporación de P al suelo proporcionó un incremento en la concentración de este elemento en los brotes del cv. Cambá FCA pero a la vez causó una disminución en la eficiencia de utilización biológica de este nutriente, medida como la cantidad de materia seca producida por tenor de P absorbido (Costa et al., 2008). Costa et al. (2005) también registraron que la eficiencia de utilización de P por *P. atratum* BRA-009610 variaba en función de la fertilización fosfórica siendo los valores obtenidos inversamente proporcionales a las dosis de P y al tenor de este nutriente en la planta.

La eficiencia de uso del P está directamente relacionada a la capacidad de la planta de absorber este elemento del suelo y utilizarlo más eficientemente en su metabolismo y a la vez depende de la velocidad de crecimiento, de la exigencia en P y de la capacidad de desarrollo del sistema radical (Costa et al., 2008). En esta investigación, los tenores de P medidos en la parte aérea se encuentran expresados en porcentaje por lo que se puede apreciar que aquellas plantas que presentaron una menor concentración de P a la vez mostraron mayor eficiencia de utilización. Los tratamientos inoculados sin fertilización fosfórica (BrF0, PsF0 y AzF0) fueron más eficientes en la absorción y utilización del P disponible para la producción de biomasa. Al respecto, Costa et al. (2008) señala que una mayor eficiencia en la absorción de P es sustancial para asegurar a lo largo del tiempo la productividad de los pastos cultivados.

Por otro lado, debido a que la gramínea en estudio tiene como destino principal su utilización como forrajera, es importante considerar la concentración de P absorbido en la pastura desde el punto de vista de los requerimientos nutricionales del ganado. Sousa (1985) describe la importancia de conocer el tenor de este nutriente en el forraje al momento de definir la suplementación animal y establece que los requerimientos de bovinos para carne estarían por sobre un 0,18% de P en la dieta pudiendo llegar a 0,44% en vacas en lactancia. En este estudio, los tenores de P en brotes de plantas del cv. Cambá FCA de los tratamientos fertilizados fueron superiores al nivel considerado satisfactorio en forrajeras tropicales, no siendo así en los tratamientos sin fertilización fosfórica.

CAPÍTULO IV

EFFECTO DE LA INOCULACIÓN CON RIZOBACTERIAS SOBRE EL CRECIMIENTO, PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y MICORRIZACIÓN DE *Paspalum atratum* cv. Cambá FCA ENSAYO A CAMPO

1. Materiales y métodos

1.1. Material biológico

Se utilizaron semillas de la especie vegetal *Paspalum atratum* cv. Cambá FCA inoculadas y sin inocular, según el tratamiento en cuestión. Los inoculantes empleados corresponden a tres formulaciones comerciales de PGPR:

- *Azospirillum brasilense* Az39, inoculante líquido en medio estéril con más de 2×10^9 UFC.ml⁻¹.
- *Pseudomonas fluorescens*, inoculante líquido en medio estéril con más de 2×10^8 UFC.ml⁻¹.
- *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculante líquido en medio estéril con más de 3×10^9 UFC.ml⁻¹.

1.2. Sitio de estudio

La investigación se llevó a cabo en un establecimiento ganadero ubicado en la localidad de Tapebicuá, Departamento de Paso de los Libres, Provincia de Corrientes, Argentina (29° 28' Sur y 57° 00' Oeste). El clima de la región es subtropical, con precipitaciones medias anuales de 1.485 mm. El invierno es la estación más seca. La temperatura media anual es de 19,7°C, con valores máximos promedio de 25,6°C y mínimos de 14,3°C (EEA INTA Mercedes).

El lugar corresponde a un pastizal natural utilizado para el pastoreo de ganado bovino, cuyo suelo pertenece al orden Alfisol (Escobar et al., 1996) de clase textural franco arenoso. El análisis del suelo mostró las siguientes características químicas: pH (H₂O) 4,52; P 1,06 ppm; MO 2,33%; N total 0,12% (calculado en base al porcentaje de MO según Gros y Domínguez, 1992). Para un mayor detalle de las características químicas y clase textural del suelo utilizado ver tabla 7 en Anexo 1.

La vegetación del lugar es herbácea, con un marcado predominio de gramíneas megatérmicas, de ciclo primavero-estival. La especie dominante en el tapiz vegetal es *Andropogon lateralis*, acompañada por otras gramíneas de porte bajo.

1.3. Tratamientos y diseño experimental

El experimento fue realizado utilizando un arreglo factorial en un diseño de bloques completos al azar con cuatro repeticiones. Los tratamientos resultaron de la combinación de dos factores AxB donde A fue la *inoculación con PGPR* y cuyos cuatro niveles correspondieron a tres inóculos diferentes más un testigo sin inocular y B correspondió al factor de *fertilización fosfórica* cuyos dos niveles fueron sin fertilizar y fertilizado con P₂O₅ a la siembra, dando un total de ocho tratamientos (tabla 4).

Tabla 4. Inoculación de *P. atratum* cv. Cambá FCA con PGPR -
Tratamientos aplicados en el ensayo a campo

Tratamientos	Fertilización fosfórica	Inoculante
AzF0	Sin fertilizar	<i>Azospirillum brasilense</i> Az39
AzF1	Fertilizado	
PsF0	Sin fertilizar	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
PsF1	Fertilizado	
BrF0	Sin fertilizar	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> E109
BrF1	Fertilizado	
TeF0	Sin fertilizar	Testigo sin inoculación
TeF1	Fertilizado	

1.4. Preparación del suelo y establecimiento de las parcelas

Se trató de un planteo de siembra directa y para controlar la vegetación herbácea presente en el área se aplicó glifosato ($2,5 \text{ l.ha}^{-1}$ de producto comercial 48% p.a.). El ensayo se llevó a cabo en un lote de 2.009 m^2 (41 m por 49 m), Se utilizaron 32 parcelas (unidades experimentales), cada una de 9 m de largo por 5 m de ancho, con un área de 45 m^2 cada una. La separación entre las parcelas (calles) fue de 1 m (figura 7).

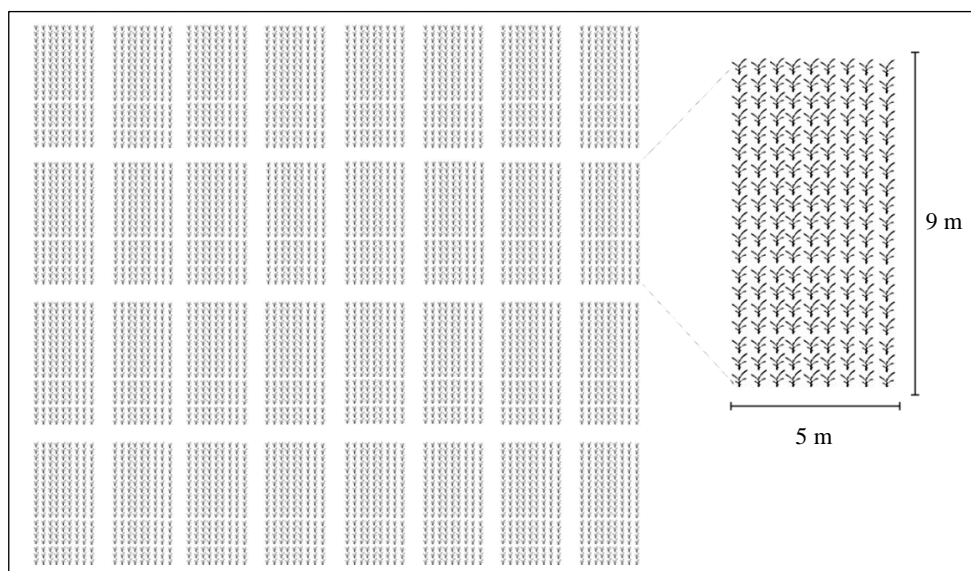


Figura 7. Esquema de las unidades experimentales del ensayo a campo y detalle de una parcela.

En los tratamientos fertilizados se aplicó 60 Kg.ha^{-1} de P_2O_5 a la siembra, suministrados en forma de SFT. La cantidad aplicada fue definida en función del tenor de arcilla y de la cantidad de P del suelo y se pretende elevar la disponibilidad de fósforo a más de 7 ppm, siguiendo las recomendaciones de Vilela et al. (2001) para *P. atratum* cv. Pojuca (consultar la tabla 8 en el Anexo 2).

Los inoculantes se aplicaron a las semillas en las dosis recomendadas en el marbete de cada producto, realizando una mezcla homogénea y dejando orear a la sombra. Los tratamientos sin inoculación se humedecieron con agua simulando una inoculación. La inoculación se realizó el mismo día de la siembra. El ensayo se instaló el 5 de noviembre de 2013.

El pasto se sembró a chorrillo continuo a una distancia de 50 cm entre líneas, con una densidad de 5 Kg.ha^{-1} de semilla (Urbani et al., 1996). En cada parcela quedaron 9

líneas de plantas. A los 10 días desde la emergencia las plantas se ralearon dejando 10 cm de separación entre individuos de la misma línea.

1.5. Variables evaluadas

Se realizaron 3 muestreos: a los 30, 90 y 150 días desde la emergencia, para los cuales se delimitaron previamente al azar 3 áreas en cada parcela, sin incluir dos líneas en los bordes ni 0,5 m en los extremos, dejando 0,5 m de relleno entre áreas (figura 8).

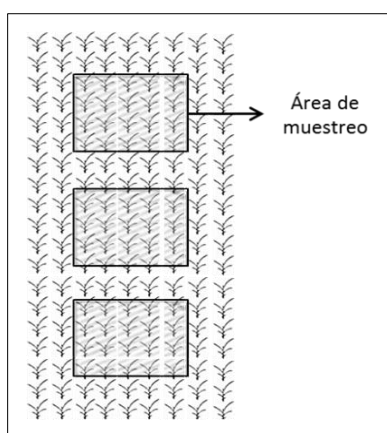


Figura 8. Esquema de una unidad experimental con sus áreas de muestreo.

Las variables evaluadas y la metodología empleada en cada caso se describen a continuación:

- *Colonización de raíces:*

Se evaluó la colonización únicamente en los tratamientos inoculados, utilizando medios de cultivo específicos según la PGPR en cuestión.

Las raíces se agitaron vigorosamente para eliminar el suelo suelto y luego se removieron de las plantas cosechadas, se lavaron en agua destilada estéril para eliminar las partículas de suelo adheridas y se sumergieron durante 10 minutos en una solución amortiguadora de fosfatos y sal (Kremer et al, 1990).

Se cortaron las raíces en trozos pequeños, se colocaron en medios de cultivo específicos: Congo red-NFb para *Azospirillum* (Rodríguez Cáceres, 1982; Bashan et al., 1993); King's B para *Pseudomonas* (Bashan et al., 1993) y medio EMA para *Bradyrhizobium* (Vincent, 1970), y se pusieron a incubar a 25-30°C hasta que el crecimiento fue evidente.

Para caracterizar macro y microscópicamente los cultivos generados se recurrió al Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology (Brenner et al., 2005) y se realizó la tinción de Gram para determinar morfotipos celulares (Gram, 1884).

- *Micorrización espontánea:*

Las raíces se lavaron y sumergieron durante un día en KOH al 10%, luego en H₂O₂ 10 vol. por 15 minutos, se lavaron con agua corriente y se sumergieron en HCl. Por último se transfirieron a recipientes con lactofenol a los que se adicionó el colorante azul de tripán (Phillips y Hayman, 1970).

Para la determinación del porcentaje de micorrización se utilizó el método por observación en láminas de Sieverding (1983). Fragmentos de 2 cm de raíz fueron colocados paralelamente sobre un portaobjetos y tapados con cubreobjetos.

Mediante observación con microscopio en cada campo con raíz a lo largo de cada transecto se evaluó la presencia o ausencia de estructuras fúngicas (hifas, arbuscúlos, vesículas). Se calculó el porcentaje de micorrización con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Micorrización} = (\text{N}^\circ \text{ de campos colonizados} / \text{N}^\circ \text{ total de campos observados}) * 100$$

- *Variables de crecimiento y producción de biomasa:*
 - Volumen radical: Las raíces se lavaron en agua corriente y se sumergieron en una probeta graduada con agua. Por desplazamiento se obtuvo el volumen radical.
 - Biomasa total, de la parte aérea y radical: Las plantas se lavaron, se separaron en dos fracciones (aérea y radical), y se colocaron en bolsas de papel sulfito y secaron en estufa a 50-60°C hasta peso constante. Luego se pesaron en balanza digital electrónica expresando los valores obtenidos en g.
 - Macollos: Se contaron los macollos de cada planta.
 - Altura: Las plantas se midieron en cm con una regla graduada desde el suelo hasta el punto más alto de las mismas, sin estirarlas.
 - Cobertura: Utilizando un marco cuadrado de 1 x 1 m, dividido en 25 cuadrados de 0,2 x 0,2 m, se estimó la proporción aparente en que el pasto cubre cada área de la retícula, luego se sumaron los valores y se multiplicó por 4 para obtener el valor en porcentaje por m² (Toledo y Schultze-Kraft, 1982).
- *Concentración de P en brotes:* La biomasa aérea secada en estufa se molió y se determinó el porcentaje de P con el método Murphy-Riley (Jackson, 1964).
- *Tallos fértiles:* Se determinó el número de macollos fértiles por planta (aquellos que desarrollaron una inflorescencia).

La frecuencia de medición no fue la misma para todas las variables, siendo que algunas se midieron en todos los muestreos y otras solamente en el primer o último muestreo. La tabla 5 resume los momentos de evaluación para todas las variables estudiadas. En el Anexo pueden observarse fotografías del ensayo (figuras 30-37).

Tabla 5. Variables evaluadas en el ensayo a campo y momento de evaluación.

Variable	Momento de evaluación		
	1° muestreo (30 dde)	2° muestreo (90 dde)	3° muestreo (150 dde)
Colonización de raíces	X		
Micorrización espontánea	X		
Altura	X	X	X
Macollos	X		X
Cobertura	X	X	X
Volumen radical	X		
Biomasa de la parte aérea	X	X	X
Biomasa radical	X		
Biomasa total	X		
Concentración de P	X		
Tallos fértiles			X

dde: días desde la emergencia

1.6. Análisis estadístico

Los datos se analizaron estadísticamente mediante un ANAVA factorial, siendo los factores principales la inoculación con PGPR y la fertilización con P. Las diferencias

entre las medias se compararon mediante el Test de Tukey ($P \leq 0,05$). La normalidad y homocedasticidad de los datos fueron previamente probadas. Se utilizó el paquete estadístico InfoStat versión 2014 (Di Rienzo et al., 2014).

2. Resultados obtenidos

2.1. Colonización de raíces

Para la colonización de raíces, mediante la caracterización macro y microscópica de los aislados obtenidos se observó la presencia de las PGPR estudiadas en la rizosfera de *P. atratum* cv. Cambá FCA para todos los tratamientos inoculados. Las cepas aisladas de los tratamientos AzP0 y AzP1 se identificaron como miembros del género *Azospirillum* sobre la base de la morfología de la colonia, la tinción de Gram y la forma de las células, mientras que en los cultivos obtenidos a partir de raíces de los tratamientos PsP0 y PsP1, las cepas aisladas se encontraron semejantes a aquellas descritas para el género *Pseudomonas* sp. Por último, para los aislados provenientes de las raíces de plantas de los tratamientos BrP0 y BrP1, las características macro y microscópicas fueron compatibles con las descritas para *Bradyrhizobium* sp.

2.2. Crecimiento, producción de biomasa y micorrización espontánea

Respecto a los efectos sobre el *crecimiento, producción de biomasa y micorrización espontánea*, los resultados del ANAVA factorial mostraron la existencia de interacción entre la fertilización con fósforo e inoculación con PGPR para la micorrización espontánea, altura y biomasa de la parte aérea de plantas de *P. atratum* cv Cambá FCA en el primer y segundo muestreo. No se observó interacción entre factores para las demás variables evaluadas, sin embargo, en algunos casos se obtuvieron diferencias significativas para los efectos principales de uno u otro factor (tabla 6).

Tabla 6. Resultados del ANAVA factorial para los efectos de la inoculación con PGPR bajo dos niveles de fertilización fosfórica de *P. atratum* cv. Cambá FCA. Ensayo a campo

Variables evaluadas	Efectos principales		Interacción Inoculación x fertilización
	Inoculación	Fertilización	
<i>1° muestreo</i>			
Micorrización espontánea (%)	<0,0001 **	<0,0001 **	<0,0001 **
Altura (cm)	0,0026 **	0,5021 ns	0,0015 **
Cobertura (%.m ⁻²)	0,2402 ns	0,0690 ns	0,7533 ns
Macollos (N°.pl ⁻¹)	0,0188 *	0,4259 ns	0,8537 ns
Volumen radical (ml)	0,2609 ns	0,2156 ns	0,8374 ns
Biomasa de la parte aérea (g)	<0,0001 **	<0,0001 **	0,0361 *
Biomasa radical (g)	0,0140 *	0,0288 *	0,6381 ns
Biomasa total (g)	0,0001 **	<0,0001 **	0,0596 ns
Concentración de P (%)	0,2144 ns	<0,0001 **	0,3263 ns
<i>2° muestreo</i>			
Altura (cm)	<0,0001 **	<0,0001 **	0,0230 *
Cobertura (%.m ⁻²)	0,1677 ns	0,9213 ns	0,8740 ns
Biomasa de la parte aérea (g)	0,0011 **	0,0001 **	0,0377 *
<i>3° muestreo</i>			
Altura (cm)	0,0353 *	0,2250 ns	0,1717 ns
Cobertura (%.m ⁻²)	<0,0001 **	0,7878 ns	0,4024 ns
Biomasa de la parte aérea (g)	<0,0001 **	0,0003 **	0,3451 ns
Macollos (N°.pl ⁻¹)	<0,0001 **	0,1221 ns	0,6721 ns
Tallos fértiles (N°.pl ⁻¹)	0,0296 *	0,6079 ns	0,9737 ns

Se presentan los p-valores obtenidos para cada fuente de variación. Diferencias significativas: *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ns (no significativo), $p > 0,05$.

2.2.a. Micorrización espontánea

El análisis estadístico mostró la existencia de una interacción altamente significativa entre la inoculación y la fertilización sobre la micorrización espontánea, indicando que los factores estudiados no actuaron independientemente.

En las raíces de las plantas del tratamiento AzF0, inoculadas con *A. brasilense* Az39 y sin el agregado de P, se registró el grado más elevado de colonización micorrízica (figura 9).

No hubo diferencias entre los demás tratamientos sin fertilización y tampoco se observó diferencias entre tratamientos fertilizados. En general se observó una mayor infección en las plantas que no fueron fertilizadas a la siembra.

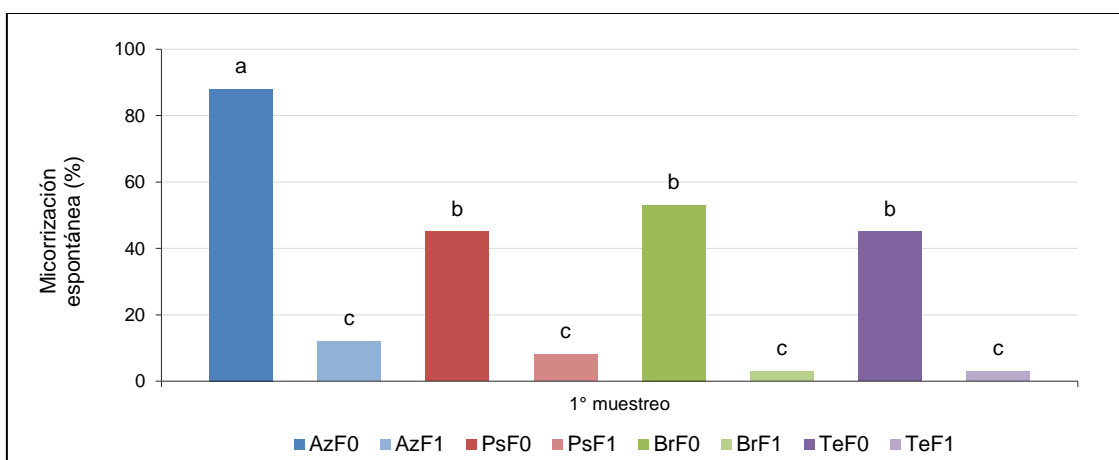


Figura 9. Porcentaje de micorrización espontánea en plantas de *P. atratum* cv. Cambá FCA inoculadas con PGPR bajo dos niveles de fertilización fosfórica. Valores obtenidos en el primer muestreo del ensayo a campo.

Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0,05$).

2.2.b. Altura

Tanto en el primer muestreo a campo como en el segundo, el ANAVA indicó que hubo interacción entre factores para altura de plantas. Seguidamente, el Test de Tukey demostró que la parcela sin fertilización fosfórica inoculada con *P. fluorescens* (PsF0) registró una mayor altura inicial de plantas en el primer muestreo seguida del tratamiento fertilizado e inoculado con *A. brasilense* Az39 (AzF1), diferenciándose ambos significativamente de los dos testigos (TeF0 y TeF1).

En el segundo muestreo el tratamiento que alcanzó una mayor altura fue el inoculado con *B. japonicum* E109 fertilizado a la siembra (BrF1) diferenciándose significativamente de los demás a excepción del tratamiento PsF1 (figura 10).

En el tercer muestro, no se determinó la existencia de la interacción entre factores para altura de plantas registrando solamente un efecto estadísticamente significativo de la inoculación. Al respecto, al comparar los tratamientos se observó que las plantas inoculadas con la cepa E109 de *B. japonicum* mostraron una altura mayor diferenciándose significativamente de las plantas del tratamiento testigo sin inoculación (figura 11).

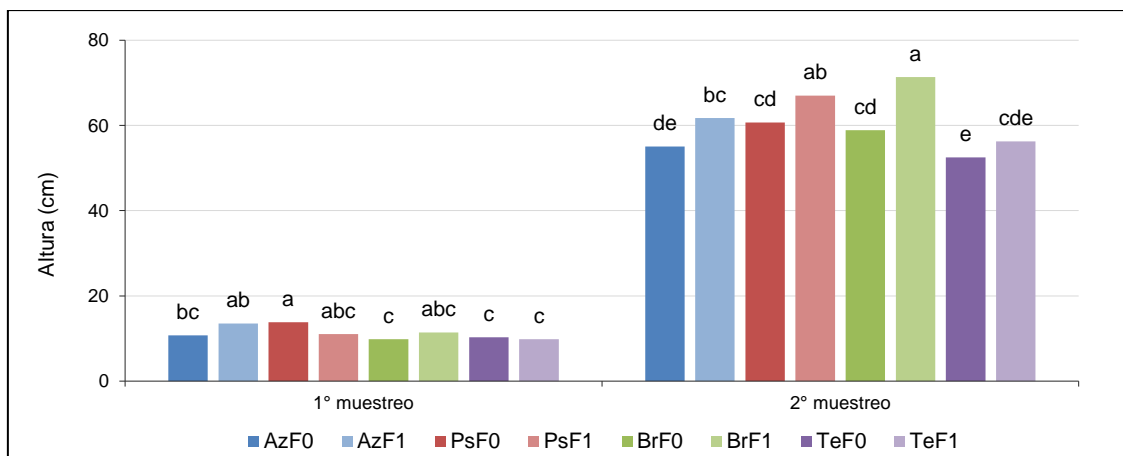


Figura 10. Altura de plantas de *P. atratum* cv. Cambá FCA inoculadas con PGPR bajo dos niveles de fertilización fosfórica. Valores obtenidos en el primer y segundo muestreo del ensayo a campo. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0,05$)

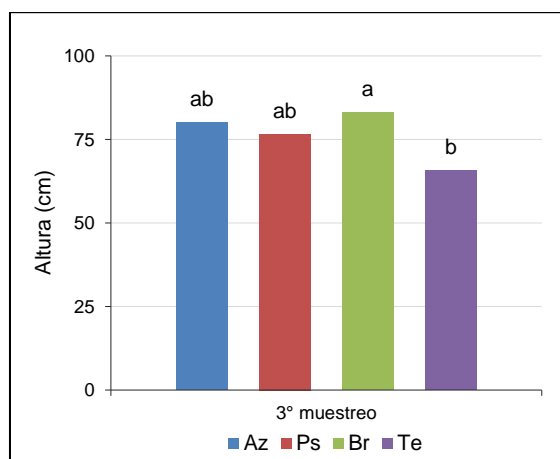


Figura 11. Altura de plantas de *P. atratum* cv. Cambá FCA inoculadas con PGPR. Valores obtenidos en el tercer muestreo del ensayo a campo. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0,05$)

2.2.c. Cobertura

No se observaron diferencias significativas para la interacción entre factores ni para los efectos principales en ninguno de los muestreos realizados para la variable cobertura, a excepción del efecto significativo observado en el tercer muestreo para la inoculación con PGPR donde las plantas inoculadas superaron significativamente a las plantas testigos a los 150 días de la emergencia (figura 12).

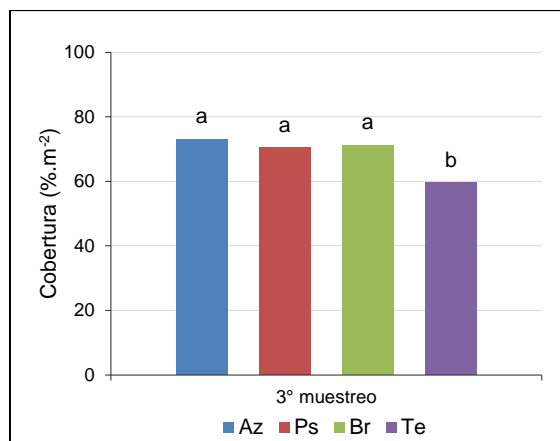


Figura 12. Cobertura registrada para parcelas de plantas de *P. atratum* cv. Cambá FCA inoculadas con PGPR. Valores obtenidos en el tercer muestro del ensayo a campo. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0,05$)

2.2.d. Macollos

No se obtuvieron diferencias significativas en la interacción entre factores al evaluar la cantidad de macollos por planta en ninguno de los muestreos realizados. Sin embargo, tanto en el primer muestreo como en el último, la inoculación influyó positivamente en el número de macollos observándose que todos los tratamientos inoculados tuvieron un mejor comportamiento que los testigos (figura 13).

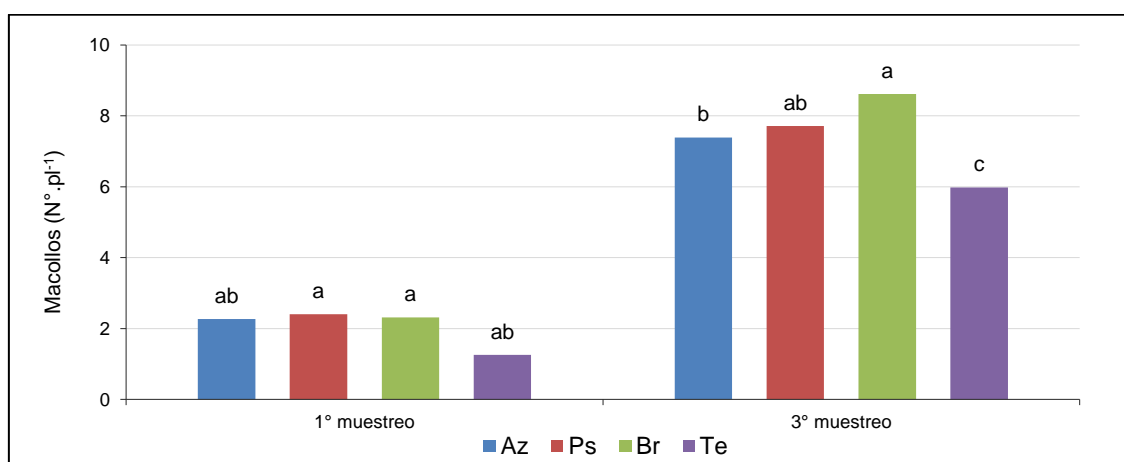


Figura 13. Número de macollos de plantas de *P. atratum* cv. Cambá FCA inoculadas con PGPR. Valores obtenidos en el primer y tercer muestro del ensayo a campo. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0,05$)

2.2.e. Volumen radical

El análisis estadístico no evidenció diferencias significativas para la interacción entre factores ni para los efectos principales de los mismos para el volumen radical de las plantas.

2.2.f. Contenido de biomasa

Los resultados del primer y segundo muestreo indicaron una interacción estadísticamente significativa entre los factores en estudio para la biomasa de la parte

aérea, para la cual el Test de Tukey determinó que los tratamientos inoculados y fertilizados (BrF1, PsF1 y AzF1) mostraron los valores más altos diferenciándose significativamente de los dos testigos (figura 14).

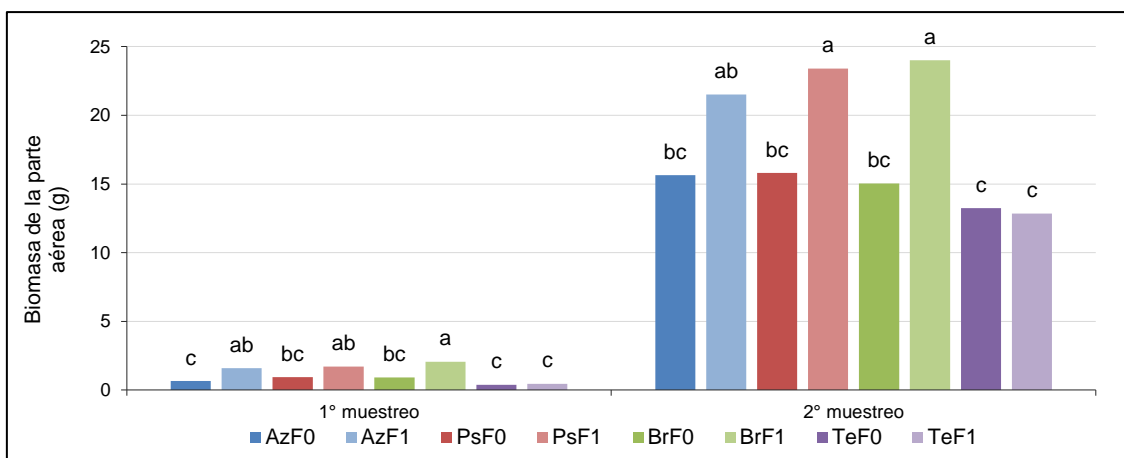


Figura 14. Biomasa de la parte aérea de plantas de *P. atratum* cv. Cambá FCA inoculadas con PGPR bajo dos niveles de fertilización fosfórica. Valores obtenidos en el primer y segundo muestreo del ensayo a campo.

Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0,05$)

El ANAVA del tercer muestreo sugirió que no hubo interacción entre factores para la biomasa de la parte aérea sino que existió un efecto directo del inoculante y del fertilizante sobre la acumulación de biomasa en los brotes.

Al evaluar el efecto del inoculante se observó que los tres tratamientos inoculados obtuvieron valores superiores y se diferenciaron significativamente del testigo sin inocular (figura 15 a).

Respecto a la fertilización fosfórica, aquellos tratamientos con agregado de fósforo superaron significativamente a los tratamientos sin fertilización (figura 15 b).

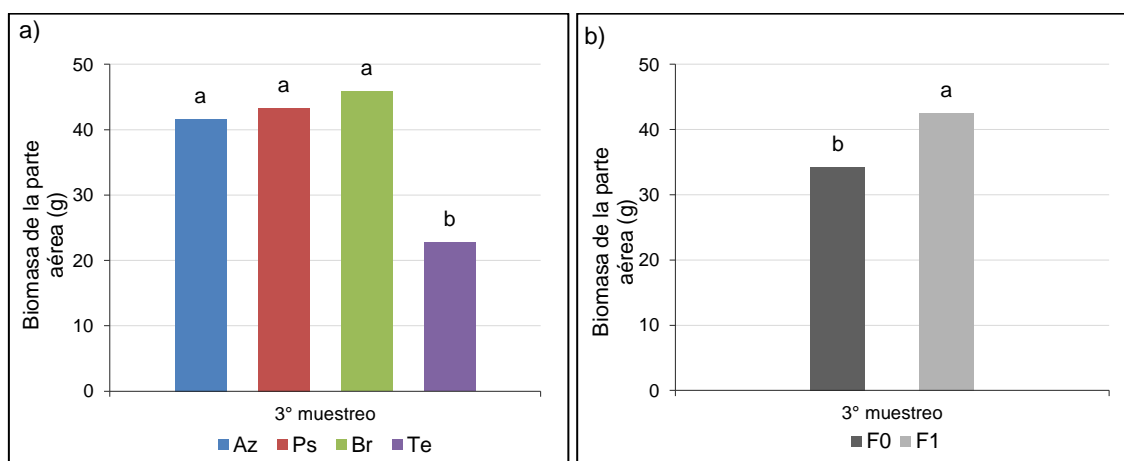


Figura 15. Efecto de la inoculación con PGPR (a) y fertilización fosfórica (b) sobre la biomasa de la parte aérea de plantas de *P. atratum* cv. Cambá FCA. Valores obtenidos en el tercer muestreo del ensayo a campo.

Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0,05$)

El ANAVA no mostró la existencia de interacción entre factores para las variables biomasa radical y total, ambas evaluadas durante el primer muestreo, en cambio

determinó un efecto individual significativo para los factores inoculación y fertilización. Todos los tratamientos inoculados con PGPR se diferenciaron significativamente del testigo en el contenido de biomasa total (figura 16 a) y biomasa radical (figura 17 a) a excepción del tratamiento con *A. brasilense* Az39 para esta última variable.

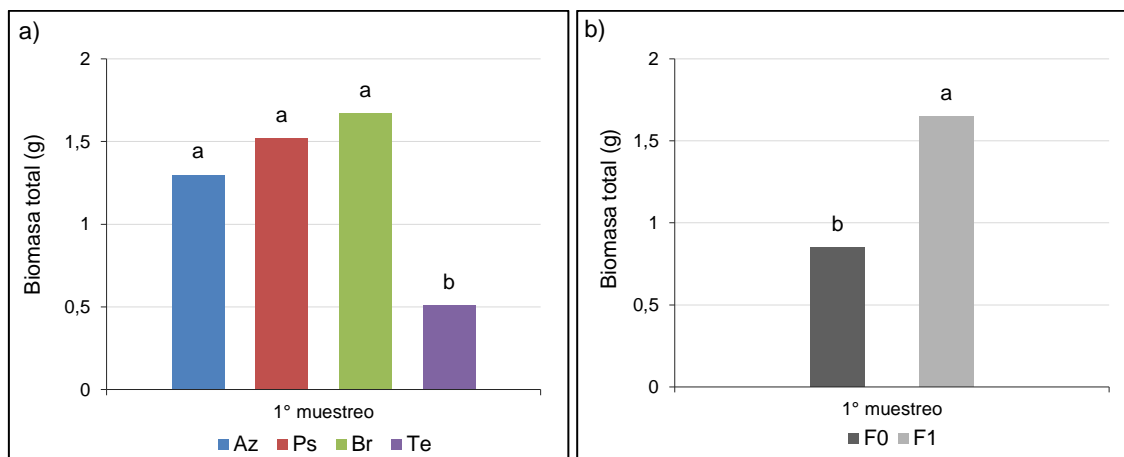


Figura 16. Efecto de la inoculación con PGPR (a) y fertilización fosfórica (b) sobre la biomasa total de plantas de *P. atratum* cv. Cambá FCA. Valores obtenidos en el primer muestreo del ensayo a campo. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0,05$)

Respecto a la fertilización fosfórica, tanto para la biomasa radical como para la biomasa total se observó que los tratamientos fertilizados superaron significativamente a los no fertilizados (figuras 16 b y 17 b).

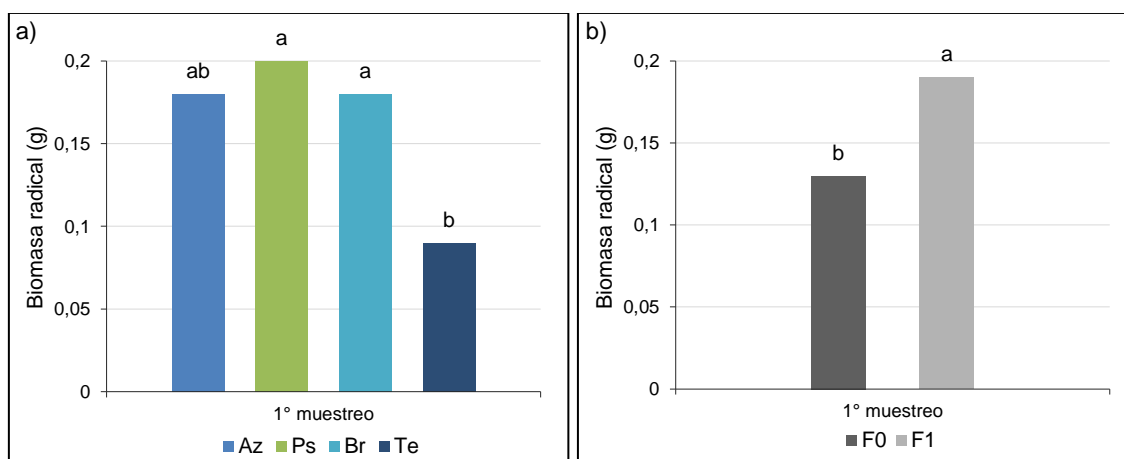


Figura 17. Efecto de la inoculación con PGPR (a) y fertilización fosfórica (b) sobre la biomasa radical de plantas de *P. atratum* cv. Cambá FCA. Valores obtenidos en el primer muestreo del ensayo a campo. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0,05$)

2.2.g. Concentración de P en brotes

El porcentaje de P en brotes, evaluado en el primer muestreo, solamente se vio influenciado significativamente por la fertilización fosfórica. Los tratamientos a los que se les agregó P a la siembra exhibieron un porcentaje mayor de este nutriente en los tejidos, diferenciándose significativamente de los tratamientos sin fertilización (figura 18).

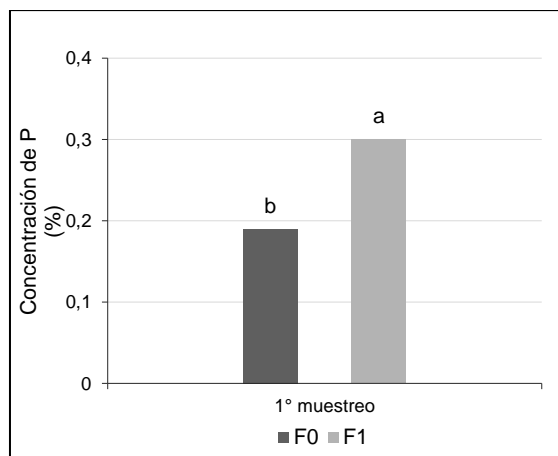


Figura 18. Concentración de P de *P. atratum* cv. Cambá FCA bajo dos niveles de fertilización fosfórica. Valores obtenidos en el primer muestreo del ensayo a campo. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0,05$)

2.2.h. Tallos fértiles

Por último, el ANAVA señaló un efecto significativo de la inoculación sobre la cantidad de tallos fértiles por planta medida en el tercer muestreo. El test de comparación de medias reveló que los tratamientos inoculados con *B. japonicum* E109 se diferenciaron significativamente de los testigos sin inoculación (figura 19).

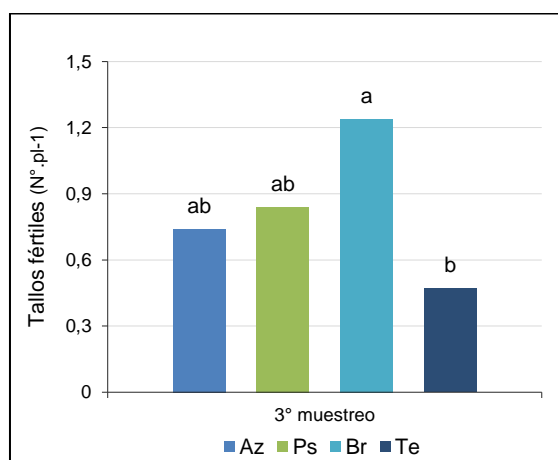


Figura 19. Número de tallos fértiles de plantas de *P. atratum* cv. Cambá FCA inoculadas con PGPR. Valores obtenidos en el tercer muestreo del ensayo a campo. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0,05$)

3. Discusión

3.1. Colonización de raíces

En este trabajo de investigación, los resultados de la caracterización macro y microscópica de los aislados obtenidos de raíces de *P. atratum* cv. Cambá FCA, demostraron la presencia de las PGPR inoculadas para cada tratamiento correspondiente. Las respuestas observadas en la micorrización espontánea y en el crecimiento y producción de biomasa de las plantas fueron variables y en muchos casos se podrían atribuir a la incidencia de las rizobacterias. Aun así, como se describirá a lo largo de esta discusión, el P jugó un papel clave en el nivel de respuesta ya que en

muchas variables estudiadas los tratamientos inoculados y fertilizados se destacaron en su comportamiento, no siendo el caso de la micorrización espontánea.

3.2. Micorrización espontánea

Se ha indicado que las simbiosis micorrízicas pueden constituir un mecanismo efectivo para la implantación exitosa de nuevas especies en ecosistemas de pastizales naturales ayudándolas en la adaptación a las condiciones ambientales locales (Miller et al., 2012). En este estudio se observó una respuesta positiva a la micorrización de raíces del cv. Cambá FCA con HMA nativos en todas las parcelas estudiadas en mayor o menor grado dependiendo del tratamiento en cuestión, lo que podría significar que los HMA estarían interviniendo en el éxito de la implantación de esta pastura en el campo natural del sitio de estudio.

3.2.a. Efecto de la fertilización fosfórica sobre la micorrización espontánea

Se observó marcadamente cómo en tratamientos fertilizados, y por lo tanto con mayor contenido de P edáfico disponible para las plantas, el porcentaje de micorrización espontánea fue inferior. Se han informado efectos negativos similares de la aplicación de fertilizantes fosforados sobre la colonización micorrízica en numerosos estudios de campo recopilados en un meta-análisis por Treseder (2004). Al respecto, García et al. (2016) advirtieron esta tendencia para *Paspalum dilatatum* y *Coelorhachis seloana*, cuya presencia de micorrizas fue significativamente menor en las parcelas con fertilización en comparación con el campo natural no fertilizado. También Chen et al. (2014) establecieron un ensayo de campo para examinar el efecto de 6 años de fertilización con P en la estructura de la comunidad de HMA en suelos y raíces de gramíneas en una estepa, obteniendo como respuesta una disminución significativa en la tasa de colonización micorrízica inducida por la fertilización fosfórica. Ryan et al. (2000) asimismo observaron que la colonización de HMA en *Lolium perenne* y *P. dilatatum* fue menor en los pastos con manejo convencional que aplicaron fertilización fosfórica, que en los pastos de granjas biodinámicas sin fertilizar.

Esta situación puede explicarse tal como lo indica Miller et al. (2012): cuando las micorrizas no resultan un método rentable para la absorción de minerales debido al enriquecimiento de nutrientes edáficos, las plantas pueden prevenir la colonización de sus raíces por HMA. En este sentido, Chen et al. (2014) indicaron que dependencia de la simbiosis con HMA para la captación de P podría reducirse cuando el P disponible en el suelo es alto, permitiendo que la colonización se establezca en situaciones de escasez de nutrientes en las que las micorrizas aumentarían la capacidad de acceder a los mismos. Asimismo, Ryan et al. (2000) señalaron que el efecto negativo de la disponibilidad de P sobre los niveles de colonización puede deberse a que, cuando las concentraciones de P en el suelo son lo suficientemente altas para las plantas, estas lo obtengan fácilmente, y por lo tanto habría menos energía disponible para los hongos y su crecimiento se vería reducido.

3.2.b. Relación entre la micorrización espontánea y concentración de P en brotes

Numerosos estudios analizados por Hoeksema et al. (2010) demuestran que las simbiosis micorrízicas son fundamentales para la nutrición fosfórica en muchas especies de plantas y que los beneficios de los HMA en la absorción de P a menudo se relacionan inversamente con la disponibilidad de P en el suelo. En contraste con estos hallazgos, los resultados obtenidos en esta investigación no demostraron que mayores porcentajes de micorrización en condiciones de baja disponibilidad de P promuevan un incremento significativo en la absorción de este nutriente por parte de la forrajera, viéndose ello

influenciado solamente por la fertilización. La retención de la simbiosis micorrízica en las gramíneas, cuando la misma no es esencial para la adquisición de nutrientes y la escasa relación entre la concentración de P en los brotes y los niveles de colonización de HMA, pueden reflejar que los hongos podrían estar proporcionando beneficios no nutricionales para la planta huésped y que los HMA sean deseables por razones distintas a la mejora directa de la absorción de nutrientes y el crecimiento de los pastos (Ryan et al., 2000).

3.2.c. Efecto de la inoculación con PGPR sobre la micorrización espontánea

En los últimos años se han publicado estudios específicos de la interacción de *Azospirillum*-HMA y su efecto sobre la colonización de ambos grupos de microorganismos. Bellone y Carrizo de Bellone (2012) informaron que *A. brasilense* y HMA fueron capaces de colonizar y coexistir tanto intra como intercelularmente en raíces de caña de azúcar coinoculadas, promoviendo un incremento en la producción de biomasa de las plantas. En este ensayo, las plantas de las parcelas inoculadas con *A. brasilense* sin el agregado de fertilización fosfórica manifestaron el mayor porcentaje de micorrización espontánea lo que podría estar relacionado con la capacidad de esta PGPR de comportarse como MHB y mejorar la colonización de los HMA tal cual lo sugieren Ratti et al. (2001), quienes observaron que la doble inoculación con HMA-*A. brasilense* incrementó la colonización micorrízica de la gramínea *Cymbopogon martinii* en condiciones de bajo y medio contenido de P en comparación con plantas inoculadas únicamente con HMA.

Similarmente, en otro estudio realizado por Bhowmik y Singh (2004) se obtuvo un incremento en el número de esporas y en el porcentaje de infección por micorrizas en raíces de *Chloris gayana* tratadas con cultivos puros de *Azospirillum* o con sobrenadantes de las cepas bacterianas libres de células. Los autores atribuyen estos resultados a la capacidad de esta PGPR de sintetizar cantidades considerables de sustancias biológicamente activas, entre ellas las fitohormonas, que aumentan la germinación de esporas de HMA y la elongación de las hifas, lo que a su vez acelera la colonización micorrízica de la raíz.

3.3. Crecimiento y producción de biomasa

Se observó en general que las plantas de *P. atratum* cv. Cambá FCA inoculadas con las diferentes PGPR obtuvieron mejores respuestas que los testigos sin inoculación, con algunas excepciones. Los valores obtenidos para los tratamientos inoculados con *Pseudomonas*, *Bradyrhizobium* o *Azospirillum* para biomasa radical, aérea y total, cobertura, número de macollos y cantidad de tallos fértiles, superaron en todos los casos al crecimiento alcanzado por las plantas no inoculadas, pudiendo atribuirse estos resultados a la capacidad de estas PGPR de sintetizar fitohormonas.

Cabe considerar por otra parte la incidencia positiva de la fertilización fosfórica en el crecimiento y producción de biomasa en general de *P. atratum*. Al respecto, diversos autores han comunicado respuestas afines de esta especie a la fertilización fosfórica, entre ellos Costa et al. (1996), Royo Pallarés y Goldfarb (2000), Costa et al. (2005). Costa et al. (1996) observaron que el P fue el nutriente más limitante para la producción de forraje de *P. atratum* Accesoión BRA-09610, ya que la falta de este mineral significó un 70% de reducción en el rendimiento de materia seca constituyéndose, por lo tanto, en un factor indispensable para el establecimiento y la productividad de la pastura. Cabe señalar que la accesión BRA-09610 constituyó el material original a partir del cual se seleccionó el cv. Cambá FCA (Urbani, et al. 1996).

Si bien se ha documentado la capacidad de *P. fluorescens* de actuar como PSB aumentando el contenido de P disponible para las plantas en la solución del suelo

mediante la solubilización de fosfatos (Rodríguez y Fraga, 1999; Jeon et al., 2013; Khan et al., 2014), así como también se ha descrito a la solubilización de P como uno de los mecanismos promotores del crecimiento de las plantas utilizado por *Bradyrhizobium* sp. (Halder et al., 1990; Gopalakrishnan et al., 2015) y *Azospirillum* sp. (Bashan y de-Bashan, 2010; García et al., 2017), en este experimento no se observó un efecto significativo de la inoculación sobre la absorción de P en brotes siendo esta variable únicamente influenciada por la fertilización. Este resultado sugiere que los incrementos en la concentración de este mineral en las plantas fertilizadas serían consecuencia de una mayor disponibilidad de P en el suelo y no estaría en principio determinado por la acción solubilizadora de las PSB.

El incremento en la biomasa de raíces en plantas del cv. Cambá FCA inoculadas con *P. fluorescens* y *B. japonicum* E109 puede atribuirse a la capacidad de estas PGPR de producir auxinas descrita por Spaepen et al. (2007) y Duca et al. (2014). Estas fitohormonas actúan aumentando el tamaño y peso del sistema radical mejorando la absorción de nutrientes y por consiguiente, la capacidad de crecimiento de las plantas (Jha y Saraf, 2015). Cabe destacar además, la producción de ACC-desaminasa descrita para *P. fluorescens* (Shaharoon et al., 2008), que provoca una mejora en el crecimiento de la raíz como consecuencia de la disminución de la síntesis de etileno (Jha y Saraf, 2015).

Resultados similares fueron obtenidos por Shaharoon et al. (2008) quienes analizaron el efecto de dos cepas de *P. fluorescens* sobre el crecimiento y la eficiencia de uso de nutrientes en trigo bajo cinco niveles de N-P-K y observaron un incremento del peso de las raíces y de otras variables estudiadas en todos los tratamientos inoculados respecto al control y a los tratamientos no inoculados para todas las dosis de fertilizantes utilizadas. Los autores explicaron que estas *Pseudomonas* podrían emplearse en combinación con dosis adecuadas de fertilizantes para un mejor crecimiento de las plantas y un uso eficiente de la fertilización.

En el presente trabajo, el tratamiento inoculado con *P. fluorescens* sin el agregado de fertilización fosfórica mostró las plantas con mayor altura a los 30 días desde la emergencia. Este incremento inicial en altura podría significar que las parcelas alcancen con anticipación la altura ideal de pastoreo, definida por Costa et al. (2004) de entre 40-60 cm. Sin embargo, a los 90 días, momento a partir del cual se indicaría como el apropiado para iniciar el pastoreo en esta especie (Costa et al., 2004), PsF0 fue superado por los tratamientos inoculados y fertilizados.

En los tres momentos de medición, las plantas inoculadas con *B. japonicum* E109 exhibieron los ejemplares con mayor acumulación de biomasa de la parte aérea. De modo similar, Bécquer et al. (2008) estudiaron en un experimento de campo el comportamiento de 12 cepas nativas de *B. japonicum* en trigo y registraron un mayor peso seco aéreo para todos los tratamientos en comparación con el testigo absoluto sin inoculación. Barbera y Benítez (2017) consideran que el valor forrajero de un material no sólo depende de su capacidad de implantación y producción inicial, sino también de su aptitud para sostener la productividad en el tiempo.

Se ha descrito que los rizobios pueden actuar como PGPR con especies de plantas no leguminosas comportándose como organismos rizosféricos o endofíticos y empleando mecanismos de acción como la producción de fitohormonas, solubilización de P inorgánico, producción de sideróforos y actividad de la enzima ACC desaminasa (Mehboob et al., 2012; Gopalakrishnan et al., 2015; Patil et al., 2017; Vargas et al., 2017). En este sentido, varios autores han documentado la capacidad de diferentes cepas de *B. japonicum* de producir AIA in vitro (Antoun et al., 1998; Boiero et al., 2007; Cassán et al., 2009; Machado et al., 2013; Osório Filho et al., 2014; Tan et al., 2015), zeatina y GA3 (Boiero et al., 2007; Cassán et al., 2009). La promoción del crecimiento y producción de biomasa observada en plantas del cv. Cambá FCA inoculadas con *B.*

japonicum E109 podrían atribuirse a la producción de fitohormonas que ha sido verificada in vitro para esta cepa (Boiero et al., 2007; Cassán et al., 2009).

Por otro lado, el incremento en el número de macollos y el aumento en la cobertura observados en los tratamientos inoculados con las diferentes PGPR sugiere que las PGPR podrían influir en parte en la generación de nuevos retoños y en la ocupación de la superficie del suelo disponible por *P. atratum* cv. Cambá FCA. Pedreira et al. (2017) sostiene que la persistencia y la productividad de los pastos tropicales están garantizadas por la constante reposición de los individuos en la población y por lo tanto, la capacidad de la planta para producir nuevos retoños afecta directamente la densidad de la población y la adaptabilidad al pastoreo.

De forma similar, otros autores han evidenciado incrementos en el número de macollos de gramíneas atribuidos al efecto de la inoculación con las mismas especies de PGPR. Se ha evidenciado así el efecto positivo de *Pseudomonas* sp. sobre el macollaje del arroz (Sakthivel y Gnanamanickam, 1987), el trigo (Afzal et al., 2005; Shaharoon et al., 2008; Zabihi et al., 2011) y *Pennisetum glaucum* (Raj et al.; 2004). También se ha documentado un mayor incremento en el número de macollos en plantas de arroz inoculadas con *B. japonicum* (Osório Filho et al., 2014; Tan et al., 2015).

Además de obtener el mayor número de macollos a los 150 días, los tratamientos inoculados con *B. japonicum* E109 causaron un incremento en la cantidad de tallos fértiles superando ampliamente a los testigos. Machado et al., 2013 indicaron que la inoculación con la cepa Lc336 de *B. japonicum* aumentó el número de panículas en el pasto *Brachiaria decumbens*, mientras que las plantas del tratamiento control no produjeron panículas.

CAPÍTULO V CONCLUSIONES

Si bien en los capítulos referidos a cada experimento (macetas y a campo) se discutió particularmente la contribución específica de cada uno de ellos como respuesta a la inoculación con *A. brasilense* Az39, *P. fluorescens* y *B. japonicum* E109 y su interacción con la micorrización espontánea sobre el crecimiento y la producción de biomasa de *P. atratum* cv. Cambá FCA con y sin el agregado de fertilización fosfórica, se puede concluir que:

En ambos experimentos se comprobó la presencia de las PGPR estudiadas en la rizosfera del cv. Cambá FCA.

Tanto a campo como en macetas, se evidenció una respuesta positiva a la micorrización espontánea en todos los tratamientos y se observó que el porcentaje de colonización disminuyó significativamente con la fertilización fosfórica. En condiciones de baja disponibilidad de P en el suelo, la inoculación con *A. brasilense* Az39 estimuló significativamente el grado de colonización micorrízica.

El tenor de P en brotes aumentó con la disponibilidad de P en el suelo y no se encontró relacionado con el grado de micorrización ni con la presencia de las PGPR en las raíces.

La respuesta de la inoculación con PGPR sobre el crecimiento y la producción de biomasa de *P. atratum* cv. Cambá FCA bajo dos niveles de fertilización fosfórica fue variable de acuerdo con la cepa utilizada y la disponibilidad de P en el suelo.

En general, los tratamientos inoculados y fertilizados mostraron un mejor comportamiento que aquellos sin inoculación ni fertilización.

En el ensayo en macetas, la inoculación con *B. japonicum* E109 incrementó significativamente la producción de biomasa de la parte aérea, radical y total, en condiciones de alta disponibilidad de P a la siembra.

Los tratamientos inoculados promovieron un incremento en altura y en volumen radical de las plantas creciendo en macetas. Por su parte, la fertilización con fósforo también influyó significativamente sobre el volumen radical y además fue el único factor que afectó al número de macollos en este experimento.

En el ensayo a campo, en condiciones de baja disponibilidad de P, *P. fluorescens* causó un incremento significativo en la altura de plantas en el primer muestreo. Sin embargo fue superada en el segundo muestreo por *B. japonicum* E109 en interacción con la fertilización fosfórica. Esta última PGPR también fue la de mejor comportamiento durante el tercer muestreo pero sin interacción con la fertilización fosfórica.

La cepa *B. japonicum* E109 se comportó como PGPR de *P. atratum* cv. Cambá FCA en interacción con la fertilización fosfórica promoviendo significativamente la producción de biomasa de brotes en el primer y segundo muestreo a campo. La cepa E109 también se destacó a los 30 días desde la emergencia en biomasa total y a los 150 días en biomasa de la parte aérea, cobertura, número de macollos y porcentaje de tallos fértiles, con efectos independientes de la fertilización fosfórica.

Los resultados resaltan el potencial de *B. japonicum* E109 para promover el crecimiento y la producción de biomasa del cv. Cambá FCA. Sin embargo, no se encontró una interacción constante entre el efecto de la PGPR y del fertilizante por lo que no puede afirmarse que la inoculación con esta cepa puede mejorar la eficacia de la fertilización fosfórica.

La realización de pruebas similares y la obtención de resultados comparables a los presentes en sistemas productivos reales bajo pastoreo con diferentes dosis de

fertilización fosfórica determinarán adecuadamente la ventaja de usar a la cepa E109 como PGPR en cultivos de especies forrajeras en la región nordeste de Argentina.

BIBLIOGRAFÍA

- Afzal, A. F. T. A. B., Ashraf, M., Asad, S. A. & Farooq, M. (2005). Effect of phosphate solubilizing microorganisms on phosphorus uptake, yield and yield traits of wheat (*Triticum aestivum* L.) in rainfed area. *International Journal of Agriculture and Biology*, 7(2), 207-209.
- Agaras B. & Valverde C. (2013). El género *Pseudomonas* en suelos agrícolas y en rizosfera. De moléculas a comunidades. En: García de Salomone, I. E., Vázquez, S., Penna, C. & Cassan, F. E. (Eds.). *Rizosfera, biodiversidad y agricultura sustentable* Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología. Pp. 173-194.
- Ahemad, M. & Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King Saud University-Science*, 26(1), 1-20.
- Altuve, S. & Bendersky, D. (2003). Pasturas y verdeos en Corrientes. Establecimiento y Producción. *Noticias y Comentarios*, (379), 45-49.
- Antoun, H. & Kloepper, J. W. (2001). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). En: Brenner, S. & Miller, J. H. (Eds.) *Encyclopedia of Genetics*. Academic Press, N.Y. Pp. 1477-1480.
- Antoun, H. (2012). Beneficial microorganisms for the sustainable use of phosphates in agriculture. *Procedia Engineering*, 46, 62-67.
- Antoun, H., Beauchamp, C. J., Goussard, N., Chabot, R. & Lalande, R. (1998). Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). *Plant Soil*, 204, 57-67.
- Artursson, V., Finlay, R. D. & Jansson, J. K. (2006). Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environmental Microbiology*, 8(1), 1-10.
- Baldani, J. I., Krieg, N. R., Baldani, V. L. D., Hartmann, A. & Döbereiner, J. (2005). Genus II. *Azospirillum* Tarrand, Krieg and Dobereiner 1979, 79AL (Effective publication: Tarrand, Krieg and Dobereiner 1978, 978) emend. Falk, Dobereiner, Johnson and Krieg. En: Garrity, G. M., Brenner, D. J., Krieg, N. R. & Staley, J. T. (Eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2: The Proteobacteria. Part C: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria. Pp. 7-26.
- Barbera P. & Benítez J. (2017). Producción inicial de materiales del género *Paspalum* en Mercedes, Corrientes. *Memorias de la XXIV Reunión del Grupo Técnico en Forrajas del Cono Sur-Grupo Campos*. Tacuarembó-Uruguay.
- Barbieri, P., Baggio, C., Bazzicalupo, M., Galli, E., Zanetti, G. & Nuti, M. P. (1991). *Azospirillum*-gramineae interaction: effect of indole-3-acetic acid. En: M. Polsinelli, R. Materassi & M. Vincenzini (Eds.) *Nitrogen fixation*. Springer, Dordrecht. Pp. 161-168.
- Barea, J. M., Pozo, M. J., Azcon, R. & Azcon-Aguilar, C. (2005). Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 56(417), 1761-1778.
- Baset Mia, M. & Shamsuddin, Z. H. (2010). *Rhizobium* as a crop enhancer and biofertilizer for increased cereal production. *African Journal of Biotechnology*, 9(37), 6001-6009.
- Bashan, Y. & de-Bashan, L. E. (2010). How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth-a critical assessment. *Advances in Agronomy*. Academic Press. 108, 77-136.

- Bashan, Y., Holguin, G. & Lifshitz, R. (1993). Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria. En: Glick, B. R. & Thompson, J. E. (Eds.). *Methods in plant molecular biology and biotechnology*. USA: CRC Press. Pp. 331-345.
- Bécquer, C. J., Salas, B., Archambault, D., Slaski, J. & Anyia, A. (2007). Inoculación de trigo (*Triticum aestivum*, L.) con rizobios adaptados a ecosistemas ganaderos de Alberta, Canadá. *Pastos y Forrajes*, 30(1), 1-1.
- Bécquer, C. J., Salas, B., Ávila, U., Palmero, L., Nápoles, J. A. & Ulloa, L. (2008). Selección de cepas de rizobios aisladas de ecosistemas ganaderos de Cuba, inoculadas en trigo (*Triticum aestivum* L.). *Pastos y Forrajes*, 31(1), 63-72.
- Bellone, C. H. & Carrizo de Bellone S. (2012). Interaction of *Azospirillum brasilense* and *Glomus intrarradix* in sugar cane roots. *Indian Journal of Microbiology*, 52(1), 70-75.
- Bhattacharyya, P. N. & Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1327-1350.
- Bhowmik, S. N. & Singh, C. S. (2004). Mass multiplication of AM inoculum: effect of plant growth-promoting rhizobacteria and yeast in rapid culturing of *Glomus mosseae*. *Current Science*, pp. 705-709.
- Boiero, L., Perrig, D., Masciarelli, O., Penna, C., Cassán, F. & Luna, V. (2007). Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(4), 874-880.
- Borrajo, C. I., Barbera, P., Bendersky, D., Pizzio, R., Ramírez M., Maidana, C., ... & Fernández, J. R. (2011). Verdeos de invierno en Corrientes. INTA Mercedes, Corrientes. Serie técnica, 49.
- Bottini, R., Cassán, F. & Piccoli, P. (2004). Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(5), 497-503.
- Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T. & Garrity, G. M. (2005). *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2: The Proteobacteria. 2° Edition. Springer.
- Bruzos, M. M. (2017). 13 The Potential of Mycorrhiza Helper Bacteria as PGPR. *Advances in PGPR Research*, 246-354.
- Carneiro, R. F. V., Martins, M. A., Araújo, A. S. F. & Nunes, L. A. P. L. (2011). Inoculação micorrízica arbuscular e adubação fosfatada no cultivo de forrageiras consorciadas. *Archivos de Zootecnia*, 60(232), 1191-1202.
- Carneiro, R. F., Martins, M. A., Freitas, M. S., Detmann, E. & Vásquez, H. M. (2007). Inoculação micorrízica arbuscular e doses de fósforo na produção do capim-andropogon, em substrato não estéril. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 2(3).
- Cassán, F. D. & García de Salamone, I. (2008). *Azospirillum sp.*: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. *Asociación Argentina de Microbiología*, Argentina, 266 pp.
- Cassán, F. D., Okon, Y. & Creus, C. M. (2015). *Handbook for Azospirillum*. Springer, Switzerland. 514 pp.
- Cassán, F., Perrig, D., Sgroy, V., Masciarelli, O., Penna, C. & Luna, V. (2009). *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *European Journal of Soil Biology*, 45(1), 28-35.

- Cassán, F., Vanderleyden, J., Spaepen, S. (2013). Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. *J. Plant Growth Regul.* 33, 440-459.
- Castillo, P., Molina, R., Andrade, A., Vigliocco, A., Alemano, S. & Cassán, F. D. (2015). Phytohormones and other plant growth regulators produced by PGPR: the genus *Azospirillum*. En: Cassán, F. D., Okon, Y. & Creus, C. M. (Eds.) *Handbook for Azospirillum*. Springer, Cham. Edits: Cassán, F. D., Okon, Y. & Creus, C. M. Pp. 115-138.
- Chen, Y. L., Zhang, X., Ye, J. S., Han, H. Y., Wan, S. Q. & Chen, B. D. (2014). Six-year fertilization modifies the biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a temperate steppe in Inner Mongolia. *Soil Biology and Biochemistry*, 69, 371-381.
- Cooperband, L. R., Boerner, R. E. & Logan, T. J. (1994). Humid tropical leguminous tree and pasture grass responsiveness to vesicular-arbuscular mycorrhizal infection. *Mycorrhiza*, 4(5), 233-239.
- Costa, N. D. L., Paulino, V. T., Ramalho, C., Townsend, J. A. M., de Araújo Pereira, R. G., Vista, R., ... & Parnaíba, P. (2008). Calagem e adubação de pastagens na Amazônia. *PUBVET*, 2(43), 1-28.
- Costa, N. D. L., Gonçalves, C. A., Oliveira, M. A. S., Townsend, C. & Magalhães, J. (2004). Germoplasma forrageiro para a formação de pastagens. En: Costa, N. D. L. (Ed.). *Formação, manejo e recuperação de pastagens em Rondônia*. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 30-80.
- Costa, N. D. L., Paulino, V. T., Rodrigues, A. N. A. & Townsend, C. R. (1996). Nutrientes limitantes ao crescimento de *Paspalum atratum*. *Reunião brasileira de fertilidade de solo e nutrição de plantas*, 22, 498-499.
- Costa, N. D. L., Rodrigues, A. N. Paulino, V. T. (2005). Efeito da adubação fosfatada sobre o rendimento de forragem e composição química de *Paspalum Atratum* BRA-009610. *Revista Científica Eletrônica de Agronomia*. 4(8). 1-5.
- Dames, J. F. & Ridsdale, C. J. (2012). What we know about arbuscular mycorrhizal fungi and associated soil bacteria. *African Journal of Biotechnology*, 11(73), 13753-13760.
- Davies, P. J. (2010). The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. En: Davies, P. J. (Ed.) *Plant hormones* Springer, Dordrecht. Pp. 1-15
- Dazzo, F. B. & Yanni, Y. G. (2006). The natural *Rhizobium*-cereal crop association as an example of plant-bacteria interaction. *Biological approaches to sustainable soil systems*. CRC Press, Boca Raton, 109-127.
- Di Rienzo J. A., Casanoves F., Balzarini M. G., Gonzalez L., Tablada M. & Robledo C. W. (2014). *InfoStat versión 2014*. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Díaz-Zorita, M. & Fernández-Canigia, M. V. (2009). Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum brasilense* on dryland wheat productivity. *European Journal of Soil Biology*, 45(1), 3-11.
- Djonova, E., Petkova, G., Stancheva, I., Geneva, M. & Michovsky, T. (2016). Response of Pasture Grasses to Inoculation with Mycorrhizal Fungi and N-Fixing Bacteria. *Bulgarian Journal of Soil Science*, 64-77.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Broek, A. V. & Vanderleyden, J. (1999). Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant and Soil*, 212(2), 153-162.
- Dobbelaere, S., Vanderleyden, J. & Okon, Y. (2003). Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22(2), 107-149.

- Domínguez-Núñez, J. A., Berrocal-Lobo, M. & Albanesi, A. S. (2015). Interaction of *Azospirillum* and mycorrhiza. En: Cassán, F. D., Okon, Y. & Creus, C. M. (Eds.) Handbook for *Azospirillum*. Springer, Cham. Pp. 419-432.
- dos Santos Pessoa, A. C., Kaminski, J. & dos Santos Rheinheimer, D. (2000). Recuperação de fósforo de diferentes fontes por capim-pensacola colonizado por fungos micorrízicos arbusculares. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 22, 979-984.
- Duca, D., Lorv, J., Patten, C. L., Rose, D. & Glick, B. R. (2014). Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 106(1), 85-125.
- EEA INTA Mercedes (s.f). Información Meteorológica Mensual Histórica. Extraído de <http://anterior.inta.gov.ar/mercedes/info/met/InfoMetHist.htm>
- Escobar, E. H., Liger, H. D., Melgar, R., Matteio, H. R. & Vallejos O. (1996). Mapa de Suelos de la Provincia de Corrientes, 1:500.000. Subsecretaría de Recursos Naturales y Medio Ambiente. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Centro Regional Corrientes. Corrientes: Imprenta Vida Correntina.
- Evers, G. W. & Burson, B. L. (2004). Dallisgrass and other *Paspalum* species. Warm-season (C4) grasses, 681-713.
- Fonseca, D. M., Gomide, J. A., Alvarez, V. H., de Almeida, R. & Silva, D. D. N. J. (2000). Absorção, utilização e níveis críticos internos de fósforo e perfilhamento em *Andropogon gayanus* e *Panicum maximum*. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 29(6), 1918-1929.
- Franken, P. (2010). Molecular-Physiological Aspects of the AM Symbiosis Post Penetration. En: Koltai H. & Kapulnik Y. (Eds.) Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function. Springer, Dordrecht. Pp. 93-116.
- Frey-Klett, P., Garbaye, J. A. & Tarkka, M. (2007). The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New phytologist*, 176(1), 22-36.
- Fuentes-Ramirez, L. E. & Caballero-Mellado, J. (2005). Bacterial biofertilizers. En: Siddiqui Z. A. (Ed.) PGPR: Biocontrol and biofertilization. Springer, Dordrecht. Pp. 143-172.
- García de Salamone, I. E., Hynes, R. K. & Nelson, L. M. (2001). Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(5), 404-411.
- García de Salamone, I. E., Hynes, R. K. & Nelson, L. M. (2005). Role of cytokinins in plant growth promotion by rhizosphere bacteria. En: Siddiqui, Z. A. (Ed.) PGPR: biocontrol and biofertilization. Springer, Dordrecht. Pp. 173-195.
- García, J. E., Maroniche, G., Creus, C., Suárez-Rodríguez, R., Ramirez-Trujillo, J. A. & Groppa, M. D. (2017). In vitro PGPR properties and osmotic tolerance of different *Azospirillum* native strains and their effects on growth of maize under drought stress. *Microbiological Research*, 202, 21-29.
- García, S., Pezzani, F., Rodríguez, A. & del Pino, A. (2016). Micorrizas en gramíneas nativas: efecto de la fertilización fosfatada a largo plazo. *Agrociencia Uruguay*, 20(1), 7-16.
- Giancola, S., Calvo, S., Sampedro, D., Marastoni, A., Ponce, V., Di Giano, S. & Storti, M. (2013). Causas que afectan la adopción de tecnología en la ganadería bovina para carne de la provincia de Corrientes: enfoque cualitativo. Serie Estudios socioeconómicos de la adopción de tecnología, N° 2. Buenos Aires: Ediciones INTA, 60 pp.

- Goltapeh, E. M., Danesh, Y. R., Prasad, R. & Varma, A. (2008). Mycorrhizal fungi: What we know and what should we know? En: Varma A. (Ed.) Mycorrhiza. Springer, Berlin, Heidelberg. Pp. 3-27.
- Gopalakrishnan, S., Sathya, A., Vijayabharathi, R., Varshney, R. K., Gowda, C. L. & Krishnamurthy, L. (2015). Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. 3 Biotech, 5(4), 355-377.
- Gouda, S., Kerry, R. G., Das, G., Paramithiotis, S., Shin, H. S. & Patra, J. K. (2018). Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. Microbiological Research, 206, 131-140.
- Gram, H. C. (1884). The differential staining of schizomycetes in tissue sections and in dried preparations. Fortschritte der Medicin, 2, 185-189.
- Gros, A. y Domínguez, A. (1992). Abonos. Guía práctica de la fertilización. 8º Edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 420 pp.
- Gyaneshwar, P., Kumar, G. N., Parekh, L. J. & Poole, P. S. (2002). Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. Plant and Soil, 245(1), 83-93.
- Halder, A. K., Mishra, A. K., Bhattacharyya, P. & Chakrabarty, P. K. (1990). Solubilization of rock phosphate by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. The Journal of General and Applied Microbiology, 36(2), 81-92.
- Hartmann, A., Rothballer, M. & Schmid, M. (2008). Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. Plant and Soil, 312(1-2), 7-14.
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R. & Ahmed, I. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. Annals of Microbiology, 60(4), 579-598.
- Hetrick, B. D., Wilson, G. W. T. & Todd, T. C. (1990). Differential responses of C3 and C4 grasses to mycorrhizal symbiosis, phosphorus fertilization, and soil microorganisms. Canadian Journal of Botany, 68(3), 461-467.
- Hoeksema, J. D., Chaudhary, V. B., Gehring, C. A., Johnson, N. C., Karst, J., Koide, R. T., ... & Wilson, G. W. (2010). A meta-analysis of context-dependency in plant response to inoculation with mycorrhizal fungi. Ecology Letters, 13(3), 394-407.
- Jackson M. L. (1964). Análisis químicos de los suelos. 2º Edición. Barcelona: Editorial Omega S. A.
- Jeffries, P., Gianinazzi, S., Perotto, S., Turnau, K. & Barea, J. M. (2003). The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. Biology and Fertility of Soils, 37(1), 1-16.
- Jeon, J. S., Lee, S. S., Kim, H. Y., Ahn, T. S. & Song, H. G. (2003). Plant growth promotion in soil by some inoculated microorganisms. The Journal of Microbiology, 41(4), 271-276.
- Jha, C. K. & Saraf, M. (2015). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a review. Journal of Agricultural Research and Development, 5(2), 108-119.
- Kaur, H., Kaur, J. & Gera, R. (2016). Plant growth promoting rhizobacteria: a boon to agriculture. Int J Cell Science Biotechnology, 5, 17-22.
- Khan, M. S., Zaidi, A. & Ahmad, E. (2014). Mechanism of phosphate solubilization and physiological functions of phosphate-solubilizing microorganisms. En: Khan, M. S., Zaidi, A. & Musarrat, J. (Eds.) Phosphate Solubilizing Microorganisms. Springer, Cham. Pp. 31-62.

- Kloepper, J. W. & Schroth, M. N. (1978). Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. *Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*, 2, 879-882.
- Kloepper, J. W. (1994). Plant growth-promoting rhizobacteria (other systems). En: Okon, Y. (Ed.). *Azospirillum/plant associations* CRC Press. Pp. 137-166.
- Kuykendall, L. (2005). *Bradyrhizobium* Jordan 1982, 137VP. En: Garrity, G. M., Brenner, D. J., Krieg, N. R. & Staley, J. T. (Eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2: The Proteobacteria. Part C: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria. Pp. 438-443.
- Leite, G. G., Silveira, L. F., Fernandes, F. D. & Gomes, A. C. (2001). Crescimento e composição química do capim *Paspalum atratum* cv. Pojuca. *Embrapa Cerrados. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*, 22 pp.
- Lies, A., Delteil, A., Prin, Y. & Duponnois, R. (2018). Using Mycorrhiza Helper Microorganisms (MHM) to Improve the Mycorrhizal Efficiency on Plant Growth. En: Meena V. S. (Ed.) *Role of Rhizospheric Microbes in Soil*. Springer, Singapore. Pp. 277-298.
- Lugtenberg, B. J., Chin-A-Woeng, T. F. & Bloemberg, G. V. (2002). Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81(1-4), 373-383.
- Machado, R. G. (2017). Analytical Interpretation of the Beneficial Interaction Between Microorganisms and Grasses. En: Almusaed, A. & Al-Samarraee, S. M. S. (Eds.). *Grasses-Benefits, Diversities and Functional Roles*. InTech. 13-27.
- Machado, R. G., de Sá, E. L. S. & Hahn. (2018). A interação entre rizóbios e pastagens cultivadas. En: Carvalho de Oliveira A. (Ed.). *Elementos da natureza e propriedades do solo*. Atena Editora. 7-22.
- Machado, R. G., de Sá, E. L. S., Bruxel, M., Giongo, A., da Silva Santos, N. & Nunes, A. S. (2013). Indoleacetic acid producing rhizobia promote growth of Tanzania grass (*Panicum maximum*) and Pensacola grass (*Paspalum sauriae*). *International Journal of Agriculture and Biology*, 15(5), 827-834.
- Martínez-Viveros, O., Jorquera, M. A., Crowley, D. E., Gajardo, G. M. L. M. & Mora, M. L. (2010). Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 10(3), 293-319.
- Matiru, V. N. & Dakora, F. D. (2004). Potential use of rhizobial bacteria as promoters of plant growth for increased yield in landraces of African cereal crops. *African Journal of Biotechnology*, 3(1), 1-7.
- Maza, M., Banegas, N. R., Parellada, E. A., Ferrero, M. A. & Viruel, E. (2017). Bioinoculación de *Chloris gayana* cv. Finecut con *Pseudomonas tolaasii* IEXb y *Bacillus atrophaeus* CN4: estudio preliminar en la Llanura Deprimida Salina de Tucumán, Argentina. *Revista Agronómica del Noroeste Argentino*, 37(1), 39-44.
- McGonigle, T. P. & Fitter, A. H. (1990). Ecological specificity of vesicular-arbuscular mycorrhizal associations. *Mycological research*, 94(1), 120-122.
- Mehboob, I., Zahir, Z. A., Arshad, M., Tanveer, A. & Khalid, M. (2012). Comparative effectiveness of different *Rhizobium* sp. for improving growth and yield of maize (*Zea mays* L.). *Soil & Environment*, 31(1), 37-46.
- Méndez, Y., Frugoni, M., Giordano V. & Martín F. (2016). *Informes Productivos Provinciales*. Ministerio de Hacienda y Finanzas Públicas de la Nación. 33 pp.

- Miller, R. M., Wilson, G. W. & Johnson, N. C. (2012). Arbuscular mycorrhizae and grassland ecosystems. En: Southworth, D. (Ed.) Biocomplexity of plant–fungal interactions. John Wiley & Sons, Lt Oxford, UK. Pp. 59-84.
- Miransari, M. (2011). Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and soil bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(4), 917-930.
- Nath, D. & Meena, V. S. (2018). Mycorrhizae: A Potential Microorganism and Its Implication in Agriculture. En: Meena, V. S. (Ed.) Role of Rhizospheric Microbes in Soil. Springer, Singapore. Pp. 251-276.
- Osório Filho, B. D., Gano, K. A., Binz, A., Lima, R. F., Aguilar, L. M., Ramirez, A., ... & Giongo, A. (2014). Rhizobia enhance growth in rice plants under flooding conditions. *American and Eurasian Journal of Agriculture & Environmental Science*, 14(8), 707-718.
- Osorio, N. W. & Habte, M. (2009). Strategies for utilizing arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing microorganisms for enhanced phosphate uptake and growth of plants in the soils of the tropics. En: Khan, M. S., Zaidi, A. & Musarrat, J. (Eds.) Microbial strategies for crop improvement. Springer, Berlin, Heidelberg. Pp. 325-351.
- Pacovsky, R. S. (1989). Diazotroph establishment and maintenance in the *Sorghum–Glomus–Azospirillum* association. *Canadian Journal of Microbiology*, 35(11), 977-981.
- Pacovsky, R. S., Fuller, G. & Paul, E. A. (1985). Influence of soil on the interactions between endomycorrhizae and *Azospirillum* in *Sorghum*. *Soil Biology and Biochemistry*, 17(4), 525-531.
- Palleroni, N.J. (2005) Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894. En: Brenner, D. J., Krieg, N. R., and Staley, J. T. (Eds) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2^o Edition, Vol. 2: The Proteobacteria, Part B, The Gammaproteobacteria. New York, USA: Springer. Pp. 323-379.
- Patil, A., Kale, A., Ajane, G., Sheikh, R. & Patil, S. (2017). Plant Growth-Promoting *Rhizobium*: Mechanisms and Biotechnological Prospective. En: Hansen, A. P., Choudhary, D. K., Agrawal, P. K. & Varma, A. (Eds.). *Rhizobium* Biology and Biotechnology. Springer, Cham. Pp. 105-134.
- Pedreira, B. C., Barbosa, P. L., Pereira, L. E. T., Mombach, M. A., Domiciano, L. F., Pereira, D. H. & Ferreira, A. (2017). Tiller density and tillering on *Brachiaria brizantha* cv. Marandu pastures inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 69(4), 1039-1046.
- Pérez-Montaño, F., Alías-Villegas, C., Bellogín, R. A., Del Cerro, P., Espuny, M. R., Jiménez-Guerrero, I., ... & Cubo, T. (2014). Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. *Microbiological Research*, 169(5-6), 325-336.
- Perrig, D., Boiero, M. L., Masciarelli, O. A., Penna, C., Ruiz, O. A., Cassán, F. D. & Luna, M. V. (2007). Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(5), 1143-1150.
- Phillips, J. M. & Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55, 158-161.
- Pizzio, R. M. & Royo Pallares, O. (1994). Utilización y manejo de los pastizales del ecosistema Campos de Argentina. En: Puignau, J. P. (Ed.) Dialogo XL: Utilización y manejo de pastizales. Montevideo (Uruguay): IICA – PROCISUR. Pp. 115-126.

- Pizzio, R. M., Delfino, D. O., Rivero, L. D. & Fernandez, J. G. (2004). Mejoramiento de campo natural en Curuzú Cuatiá, Corrientes. Fertilizando. 4 pp.
- Plante, A. F. (2007). Soil biogeochemical cycling of inorganic nutrients and metals. En: Paul, E. A. (Ed.), *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry* (Third Edition). Pp. 389-432.
- Porta, M., Hack, C. & Tomei, C. (2006). Efecto del agregado de fósforo sobre un pastizal de Corrientes. XXI Reunião do Grupo Técnico em Forrageiras do Cone Sul – Grupo Campos. Pelotas, Embrapa Clima Temperado. 3 pp.
- Porta, M., Hack, C. M., Tomei, C., Ciotti, E. M. & Castelán, M. E. (2008). Producción de materia seca y fósforo foliar en un pastizal del nordeste de la provincia de Corrientes. *Agrotecnia*, 18(1), 3-5.
- Quarin, C. L. (1981). La apomixis en la evolución y el mejoramiento del género *Paspalum*. Actas de las Jornadas de Genética aplicada del nordeste argentino. Corrientes, Argentina. Pp. 79-86.
- Quarin, C. L., Valls, J. F. M. & Urbani, M. H. (1997). Cytological and reproductive behaviour of *Paspalum atratum*, a promising forage grass for the tropics. *Tropical Grasslands*, 31, 114-116.
- Raj, S. N., Shetty, N. P. & Shetty, H. S. (2004). Seed bio-priming with *Pseudomonas fluorescens* isolates enhances growth of pearl millet plants and induces resistance against downy mildew. *International Journal of Pest Management*, 50(1), 41-48.
- Rao, N. S., Tilak, K. V. B. R. & Singh, C. S. (1985). Effect of combined inoculation of *Azospirillum brasilense* and vesicular-arbuscular mycorrhiza on pearl millet (*Pennisetum americanum*). *Plant and Soil*, 84(2), 283-286.
- Ratti, N., Kumar, S., Verma, H. N. & Gautam, S. P. (2001). Improvement in bioavailability of tricalcium phosphate to *Cymbopogon martinii* var. motia by rhizobacteria, AMF and *Azospirillum* inoculation. *Microbiological Research*, 156(2), 145-149.
- Řezáčová, V., Slavíková, R., Zemková, L., Konvalinková, T., Procházková, V., Šťoviček, V., ... Jansa, J. (2018). Mycorrhizal symbiosis induces plant carbon reallocation differently in C3 and C4 *Panicum* grasses. *Plant and Soil*, 425(1-2), 441-456.
- Rheinheimer, D. D. S. & Kaminski, J. (1995). Intensidade de colonização do córtex radicular e sua relação com a absorção de fósforo pelo capim-pensacola. *Ciênc. Rural*, 25(2), 223-228.
- Rocha, F., Muraoka, T., Scaramuzza, W. L. M. P. & Scaramuzza, J. F. (2015). Eficiência de Forrageiras e Efeito da Micorriza na Absorção de Fósforo Menos Disponível do Solo. *Uniciências*, 16(1), 17-24.
- Rodríguez Cáceres, E. A. (1982). Improved medium for isolation of *Azospirillum spp.* *Applied and Environmental Microbiology*, 44(4), 990-991.
- Rodríguez Cáceres, E., Di Ciocco, C. & Carletti, S. (2008). 25 años de Investigaciones de *Azospirillum brasilense* AZ39 en Argentina. In: Cassán, F., García de Salamone, I. (Eds.), *Azospirillum sp.: Cell Physiology, Plant Interactions and Agronomic Research in Argentina*. Asociación Argentina de Microbiología, Buenos Aires, Argentina, 179-188.
- Rodríguez, H. & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17(4-5), 319-339.
- Royo Pallarés, O. & Goldfarb, C. (2000). Experiencias con pasturas subtropicales cultivadas en la provincia de Corrientes. Actas de la Jornada de Actualización en Forrajerías Subtropicales. INTA E.E.A. Mercedes, Corrientes. 14 pp.

- Ryan, M. H., Small, D. R. & Ash, J. E. (2000). Phosphorus controls the level of colonisation by arbuscular mycorrhizal fungi in conventional and biodynamic irrigated dairy pastures. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 40(5), 663-670.
- Sakakibara, H. (2006). Cytokinins: activity, biosynthesis and translocation. *The Annual Review of Plant Biology*, 57, 431-449.
- Sakthivel, N. & Gnanamanickam, S. S. (1987). Evaluation of *Pseudomonas fluorescens* for suppression of sheath rot disease and for enhancement of grain yields in rice (*Oryza sativa* L.). *Applied and Environmental Microbiology*, 53(9), 2056-2059.
- Santi, C., Bogusz, D. & Franche, C. (2013). Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Annals of Botany*, 111(5), 743-767.
- Satyaprakash, M., Nikitha, T., Reddi, E. U. B., Sadhana, B. & Vani, S. S. (2017). Phosphorous and phosphate solubilising bacteria and their role in plant nutrition. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(4), 2133-2144.
- Schüßler, A., Schwarzott, D. & Walker, C. (2001). A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycological Research*, 105(12), 1413-1421.
- Secanell E., Castro C. G. & Saucedo M. E. (2016). Impactos de la implantación de pasturas megatérmicas en los sistemas de producción. *Voces y Ecos* 35, 50-53.
- Sessitsch, A., Howieson, J. G., Perret, X., Antoun, H. & Martinez-Romero, E. (2002). Advances in *Rhizobium* research. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21(4), 323-378.
- Shaharoona, B., Naveed, M., Arshad, M. & Zahir, Z. A. (2008). Fertilizer-dependent efficiency of Pseudomonads for improving growth, yield, and nutrient use efficiency of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(1), 147-155.
- Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H. & Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springer Plus*, 2(1), 2-14.
- Shen, J., Yuan, L., Zhang, J., Li, H., Bai, Z., Chen, X., ... & Zhang, F. (2011). Phosphorus dynamics: from soil to plant. *Plant Physiology*, 997-1005.
- Sieverding, E. (1983). Manual de métodos para la investigación de la micorriza vesículo-arbuscular en el laboratorio. 121 pp.
- Sivasakthi, S., Kanchana, D., Usharani, G. & Saranraj, P. (2013). Production of plant growth promoting substance by *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* isolates from paddy rhizosphere soil of Cuddalore District, Tamil Nadu, India. *International Journal of Microbiological Research*, 4(3), 227-233.
- Smith, S. E. & Read, D. J. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis* (Third Edition). London, UK: Academic Press. 815 pp.
- Smith, S. E., Jakobsen, I., Grønlund, M. & Smith, F. A. (2011). Roles of arbuscular mycorrhizas in plant phosphorus (P) nutrition: interactions between pathways of P uptake in arbuscular mycorrhizal (AM) roots have important implications for understanding and manipulating plant P acquisition. *Plant Physiology*, 62, 1050-1057.
- Sousa, J. C. (1985). Formulacao de misturas minerais para bovinos de corte. Embrapa Gado de Corte-Circular Técnica (INFOTECA-E). 28 pp.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J. & Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(4), 425-448.

- Steenhoudt, O. & Vanderleyden, J. (2000). *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(4), 487-506.
- Tan, K. Z., Radziah, O., Halimi, M. S., Khairuddin, A. R. & Shamsuddin, Z. H. (2015). Assessment of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and rhizobia as multi-strain biofertilizer on growth and N₂ fixation of rice plant. *Australian Journal of Crop Science*, 9(12), 1257-1264.
- Tarkka, M. T. & Frey-Klett, P. (2008). Mycorrhiza helper bacteria. En: Varma, A. (Ed.) *Mycorrhiza Springer*. Berlin, Heidelberg. Pp. 113-132.
- Teale, W. D., Paponov, I. A. & Palme, K. (2006). Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(11), 847-859
- Toledo, J. M. & Schultze-Kraft, R. (1982). Metodología para la Evaluación Agronómica de Pastos Tropicales. En: Toledo, J. M. (Ed.). *Manual para la Evaluación Agronómica Cali (Colombia): Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)*. Pp. 91-110.
- Tomei, C. E., Oreña, D., Ciotti, E. M., Castelán, M. E., Hack, C. M. & Iglesias, M. C. (2003). Efecto de la inoculación con *Azospirillum* y fertilización con fósforo en el establecimiento de *Setaria sphacelata*. *Agrotecnia-Instituto Agrotécnico Pedro M. Fuentes Godo (Argentina)* (11), 37-40.
- Torres, D., Revale, S., Obando, M., Maroniche, G., Paris, G., Peticari, A., ... & Cassán, F. (2015). Genome sequence of *Bradyrhizobium japonicum* E109, one of the most agronomically used nitrogen-fixing rhizobacteria in Argentina. *Genome Announcements*, 3(1), e01566-14.
- Treseder, K. K. (2004). A meta-analysis of mycorrhizal responses to nitrogen, phosphorus, and atmospheric CO₂ in field studies. *New Phytologist*, 164(2), 347-355.
- Urbani M. H. & Quarín C. L. (2017). *Paspalum*: un género con numerosas especies de gran potencial forrajero pero con pocas bajo cultivo. *Simposios. BAG. Journal of Basic & Applied Genetics*, 28(Supl. 1), 23-32.
- Urbani, M. H., Quarín, C. L., Espinoza, F. & Norrmann, G. A. (1996). Inscripción en el Registro de la Propiedad de Cultivares del Pasto "Cambá FCA"; una Forrajera para el Nordeste. *Actas de la Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. UNNE, Tomo III*, 81-84.
- Valverde, C. & Ferraris, G. (2009). Las *Pseudomonas*: un grupo heterogéneo con diversos mecanismos promotores del desarrollo vegetal. En: Puente, M. L., García, J. E. & Peticari, A. (Eds.). *Uso actual y potencial de microorganismos para mejorar la nutrición y el desarrollo en trigo y maíz, Proyecto Inocular PGPM. INTA*. Pp. 22-43.
- Vargas, L. K., Volpiano, C. G., Lisboa, B. B., Giongo, A., Beneduzi, A. & Passaglia, L. M. P. (2017). Potential of rhizobia as plant growth-promoting rhizobacteria. En: Zaidi, A., Khan, M. S. & Musarrat, J. (Eds.). *Microbes for legume improvement. Springer, Cham*. Pp. 153-174.
- Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255(2), 571-586.
- Vilela, L., Barcellos, A. de O. & Andrade, R. P. de. (2001). Calagem e adubacao para o plantio do Capim-Pojuca. *Embrapa Cerrados. Recomendação Técnica*, (25), 1-2.
- Vilela, L., Soares, W. V., Sousa, D. D. & Macedo, M. C. M. (1998). Calagem e adubação para pastagens na região do cerrado. *Embrapa Cerrados*, (37), 1-16.
- Vincent, J. M. (1970). *A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria.*

- Viruel, E., Erazzú, L. E., Martínez Calsina, L., Ferrero, M. A., Lucca, M. E. & Siñeriz, F. (2014). Inoculation of maize with phosphate solubilizing bacteria: effect on plant growth and yield. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 14(4), 819-831.
- Zabihi, H. R., Savaghebi, G. R., Khavazi, K., Ganjali, A. & Miransari, M. (2011). *Pseudomonas* bacteria and phosphorous fertilization, affecting wheat (*Triticum aestivum* L.) yield and P uptake under greenhouse and field conditions. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(1), 145-152.
- Zaim, S., Bekkar, A. A. & Belabid, L. (2017). *Rhizobium* as a Crop Enhancer and Biofertilizer for Increased Non-legume Production. En: Hansen, A. P., Choudhary, D. K., Agrawal, P. K. & Varma, A. (Eds.). *Rhizobium* Biology and Biotechnology. Springer, Cham. Pp. 25-37.
- Zuloaga F.O. & Morrone O. (2005). Revisión de las especies de *Paspalum* para América del Sur Austral (Argentina, Bolivia, sur del Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay). *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*, 102, 1-297.

ANEXOS

1. Resultados del análisis realizado al suelo utilizado en los experimentos y metodología de medición

Tabla 7. Características químicas y clase textural del suelo utilizado en los experimentos*.

Profundidad (cm)	pH (H ₂ O)	MO (%)	P (ppm)	Ca ---	Mg (meq / 100g)	K ---	Clase Textural
0-20	4,52	2,33	1,06	1,74	0,41	0,08	Franco Arenoso**

* Análisis realizado en el Laboratorio de Suelos de la FCA-UNNE. Métodos utilizados: para pH: potenciométrico, relación suelo:agua 1:2,5; para MO: Walkley-Black; para P: Bray I; y para Ca, Mg y K: Acetato de amonio.

** Composición: 65% de arena; 20% de limo y 15% de arcilla.

2. Recomendación de fertilización con fósforo para la implantación de *P. atratum* cv. Pojuca

Tabla 8. Cantidad de fósforo a ser aplicada por hectárea para la implantación de *P. atratum* cv. Pojuca definida en función del tenor de P y de arcilla. Extraído de Vilela et al, 2001.

Tenor de arcilla (%)	Tenor de fósforo en el suelo (ppm o mg.dm ⁻³)			
	Muy bajo	Bajo	Medio	Adecuado
> 60	0 – 0,5	0,6 – 1,5	1,6 – 3,0	> 3,0
36 – 60	0 – 1,5	1,6 – 3,0	3,1 – 4,5	> 4,5
15 – 35	0 – 2,5	2,6 – 5,0	5,1 – 7,0	> 7,0
< 15	0 – 3,0	3,1 – 6,0	6,1 – 9,0	> 9,0
Recomendación de fósforo (Kg.ha ⁻¹ de P ₂ O ₅)				
> 60	120	90	60	0
36 – 60	90	70	45	0
15 – 35	60	45	30	0
< 15	40	30	20	0

3. Fotografías del experimento en macetas



Figura 20. Inoculación de semillas de *P. atratum* cv. Cambá FCA (izq.) y preparación de macetas (der.).



Figura 21. Siembra de semillas de *P. atratum* cv. Cambá FCA (izq.) y posterior disposición de las macetas en diseño completamente aleatorizado (der.).

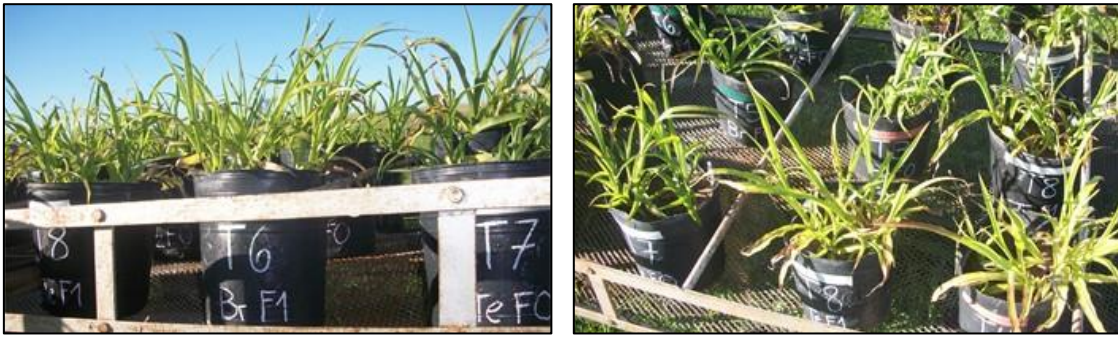


Figura 22. Plantas de *P. atratum* cv. Cambá FCA en macetas al momento de cosecha (30 días desde la emergencia).



Figura 23. Medición de altura (izq.) y recuento de macollos (der.) de plantas de *P. atratum* cv. Cambá FCA en macetas a los 30 días desde la emergencia.



Figura 24. Cosecha de plantas de *P. atratum* cv. Cambá FCA (izq.) y medición del volumen radical (der.) a los 30 días desde la emergencia en el ensayo en macetas

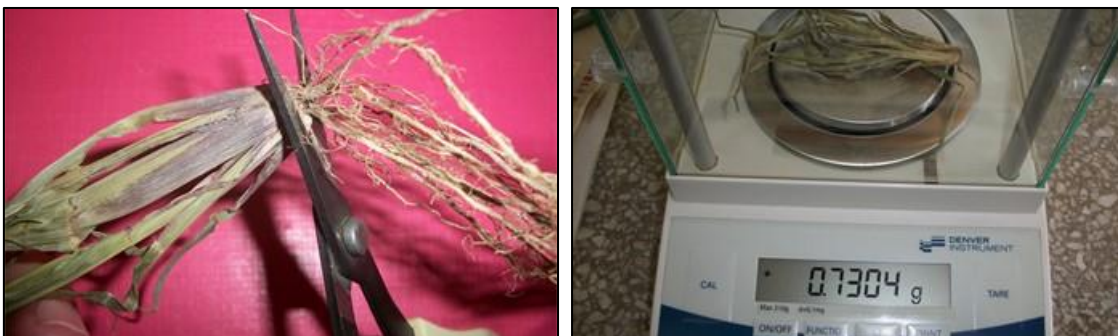


Figura 25. Separación parte aérea-sistema radical (izq.) y medición de peso seco (der.) luego de secado en estufa hasta peso constante de plantas de *P. atratum* cv. Cambá FCA del ensayo en macetas



Figura 26. Tinción de raíces de plantas de *P. atratum* cv. Cambá FCA del ensayo en macetas para evaluar micorrización espontánea.



Figura 27. Presencia de estructuras micorrízicas en raíces de plantas de *P. atratum* cv. Cambá FCA observadas con microscopio óptico. Ensayo en macetas



Figura 28. Preparación de medio de cultivo (izq), siembra de raíces (medio) y selección de colonias para repique para evaluar la colonización de raíces por PGPR. Ensayo en macetas.



Figura 29. Tinción de Gram (izq) y observación en microscopio óptico (medio y der.) para evaluar la colonización de raíces por PGPR. Ensayo en macetas.

4. Fotografías del experimento a campo



Figura 30. Delimitación de parcelas (izq) e inoculación de semillas de *P. atratum* cv. Cambá FCA (der.) para la instalación del ensayo a campo.



Figura 31. Siembra de semillas de *P. atratum* cv. Cambá FCA (izq). Detalle de las semillas y del fertilizante dispuestos en la línea de siembra (der.). Ensayo a campo.



Figura 32. Primer muestreo a campo. Vista de las parcelas a los 30 días desde la emergencia (izq.-der.).



Figura 33. Primer muestreo a campo. Cosecha de plantas de *P. atratum* cv. Cambá FCA (izq) y limpieza de raíces para separar partículas grandes de suelo (der.).

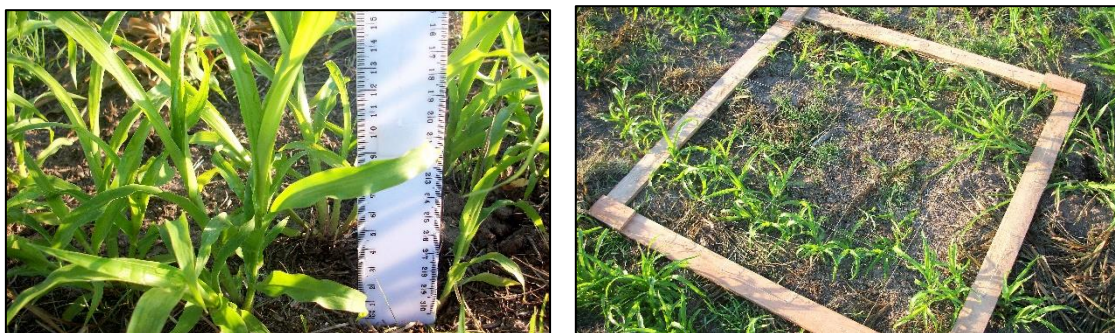


Figura 34. Primer muestreo a campo. Medición de altura de plantas de *P. atratum* cv. Cambá FCA (izq.) y evaluación de la cobertura (der.).



Figura 35. Siembra de raíces (izq), repique (medio) y observación en microscopio óptico (der.) para evaluar la colonización de raíces por PGPR. Ensayo a campo.



Figura 36. Segundo muestreo a campo. Vista de las parcelas a los 90 días desde la emergencia (izq.) y medición de altura de plantas de *P. atratum* cv. Cambá FCA (der.).



Figura 37. Tercer muestreo a campo. Vista de las parcelas a los 150 días desde la emergencia (izq) y detalle de una inflorescencia de *P. atratum* cv. Cambá FCA (der.).