

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Departamento de Agronomía

**Evaluación de la biomasa inicial de dos
variedades de *Lolium perenne* L.
utilizadas como césped y del efecto causado
por la aplicación de *Azospirillum brasilense***

Marianela Armillei

Docente tutor: Dra. María de las Mercedes Longás

Docente consejero 1: Dr. Gastón Alejandro Iócoli

Docente consejero 2: Ing. Agr. María Celeste Detzel



Proyecto final de carrera

Tecnicatura Universitaria en Parques y Jardines

Bahía Blanca, 14 de Julio de 2023

ÍNDICE

RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	4
<i>Lolium perenne</i>	5
Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal	6
<i>Azospirillum</i> spp.	7
Caracterización zonal	8
OBJETIVOS	9
Objetivo general	9
Objetivos específicos	9
MATERIALES Y MÉTODOS	10
Material biológico	10
Ensayo	11
Determinación de cobertura del suelo (%)	12
Materia seca de la biomasa aérea y radical (g)	12
Longitud total del material aéreo (cm), cantidad de hojas y número de macollos	13
Análisis estadísticos	13
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
Peso seco radical (g)	14
Peso seco aéreo (g)	14
Cobertura del suelo (%)	15
Largo aéreo (cm)	16
Cantidad de hojas	16
Cantidad de macollos	17
CONCLUSIÓN	18
BIBLIOGRAFÍA	19

RESUMEN

El césped es considerado la base de un jardín permitiendo que tanto el diseño general como árboles y canchales se destaquen, además de tener una gran importancia en campos deportivos. Generalmente integrado por plantas de la familia gramíneas, otorga beneficios al medio ambiente y contribuye a mantener un equilibrio natural por permitir la absorción y acumulación de agua, amortiguar ruidos, generar pulmones de intercambio gaseoso, entre otros.

El raigrás perenne (*Lolium perenne* L.) es una especie de ciclo otoño-inverno-primaveral, cespitoso, con hojas finas color verde oscuro brillante, de crecimiento rápido y alta tolerancia al frío, la sequía, la salinidad y algunas enfermedades.

Las bacterias rizosféricas tienen un efecto benéfico para el crecimiento vegetal, por este motivo los biofertilizantes han sido ampliamente difundidos como alternativa para reducir el uso de agroquímicos con la finalidad de reducir la contaminación ambiental y disminuir costos en pos de una producción más sustentable. A diferencia de las bacterias simbióticas que se encuentran dentro de la raíz como es el caso de los rizobios en leguminosas, la colonización por estos organismos rizosféricos está fuertemente afectada por las condiciones del medio ambiente edáfico y este es un prerrequisito para el éxito de la inoculación. Las cepas de *Azospirillum brasilense* actúan promoviendo el aumento de la biomasa aérea e incrementando el peso seco radical, evidenciándose en los estadios tempranos del desarrollo vegetal.

El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto de la aplicación de *Azospirillum brasilense* sobre el crecimiento inicial de dos variedades de raigrás en el campus de Palihue de la Universidad Nacional del Sur, ubicada en Bahía Blanca.

Se evaluaron mediante tres tratamientos las variedades de raigrás Lolium® y Leon® en presencia y ausencia de la bacteria, incluyendo un tratamiento con bioprotector de esta última.

El ensayo se realizó con un diseño experimental en bloques al azar, y se tomó registro de datos de cobertura del suelo, peso seco de biomasa aérea y radical, largo total de hojas por plantas y cantidad de hojas y macollos por planta. La comparación de medias entre tratamientos se realizó por análisis de la varianza y test LSD de Fisher.

El análisis de la biomasa inicial mostró poca variabilidad entre los tratamientos analizados, donde solo siete de los 46 casos evaluados presentaron diferencias significativas entre plantas inoculadas y testigos, no se logró detectar un patrón definido que permita explicar la heterogeneidad de resultados.

Las situaciones de estrés provocan una mayor competencia en la rizosfera y las cepas nativas se ven favorecidas por su adaptación al medio pudiendo dificultar el establecimiento de la cepa inoculada. Es necesario continuar con estudios en el tema evaluando distintas condiciones y ambientes.

Palabras clave. *Azospirillum brasilense*, *Lolium perenne* L., biofertilizante, biomasa inicial, césped.

*“en el área central de todos los jardines existe una zona de césped. Ya sea una alfombra verde perfecta o un área descontracturada [...]. Un césped planificado y atendido es una combinación única de lo funcional y lo ornamental”
(Anónimo, 1995).*

INTRODUCCIÓN

El césped es una parte esencial del paisaje urbano y residencial desempeñando un papel fundamental en la estética y funcionalidad de los espacios exteriores. Su presencia en parques, jardines, campos deportivos y áreas recreativas brinda beneficios significativos tanto a nivel socio cultural como ambiental. La alfombra verde no solo proporciona un entorno visualmente agradable, sino que también contribuye a la promoción de las actividades al aire libre, a la calidad del aire y la regulación térmica, absorbe, acumula y filtra agua hacia las napas, amortigua ruidos y absorbe polvo y smog (Parracia, 2012). Adicionalmente, dado que disciplinas deportivas como el fútbol, polo, tenis, golf, hockey y rugby exigen céspedes de calidad que se adapten a sus demandas, se ha desarrollado un movimiento económico que involucra a mejoradores, viveros, fábricas y distribuidoras de máquinas, agroquímicos y semillas (Parracia, 2012).

Al diseñar un espacio donde habrá una alfombra verde, en primer lugar debe definirse su uso, el cual orientará en gran medida la elección de la especie más propicia para tal fin.

Las características que presentan los céspedes según su utilización son las siguientes (Parracia, 2012):

- ➔ Uso ornamental: poseen un alto nivel estético dado que sus hojas son muy finas y se encuentran en alta densidad, lo cual le otorga un aspecto homogéneo. Toleran cortes bajos y frecuentes demandando un mantenimiento recurrente. Entre las desventajas se puede mencionar la baja tolerancia al pisoteo frecuente y el tiempo que le demanda formar una cubierta tupida.
- ➔ Uso deportivo: poseen cierto nivel estético caracterizándose por ser muy resistentes al pisoteo y uso diario. A su vez, presentan un buen comportamiento ante enfermedades y plagas necesitando un mantenimiento medio a alto.
- ➔ Uso familiar: es el césped más común en los jardines por tolerar el pisoteo y requerir un escaso mantenimiento.
- ➔ Rústico: este césped se utiliza cuando así lo demanda el ambiente dado que posee una alta resistencia a situaciones extremas: sequía, altas temperaturas, salinidad, pisoteo, suelos de baja fertilidad y enfermedades. Su calidad estética es media-alta presentando hojas anchas. Necesitan muy poco mantenimiento.

En función del uso y las características ambientales del espacio (asoleamiento, drenaje, sombreado, clima) se seleccionan la/las especies más idóneas por belleza, duración, resistencia al desgaste y facilidad de adaptación al tipo de terreno y clima local.

Existen numerosas especies Poáceas empleadas como césped siendo una de las populares el *Lolium perenne* conocida vulgarmente como “raigrás perenne”, “raigrás inglés” o “ballica”. El raigrás suele utilizarse como alfombra ornamental y en áreas de recreación, campos deportivos y terrenos pobres con buen drenaje.

Lolium perenne

El género *Lolium* fue descrito por Linneo en 1753, y taxonómicamente se clasifica dentro del reino Plantae, división Magnoliophyta, clase Liliopsida, orden Poales, familia Poaceae, subfamilia Pooideae, tribu Poeae (Cabrera & Zardini, 1993). Incluye varias especies entre las que destacan *L. perenne* L. y *L. multiflorum* Lam. por sus características forrajeras y su uso como tapiz vegetal, aunque también son consideradas malezas en cultivos de cereales invernales como cebada y trigo (Istilart & Yaniccari, 2011; Polok, 2007).

La planta de *Lolium perenne* es cespitosa y puede alcanzar los 80 cm de altura (Fig. 1d). Presenta hojas glabras, estriadas en el haz y brillantes en el envés (Fig. 1a,b), cuyas láminas miden entre 20-30 cm de largo y hasta 6 mm de ancho y la base de las vainas suelen tomar una coloración rojiza. La lígula corta y trunca es acompañada por aurículas pequeñas (Fig. 1c). Su prefoliación es de tipo conduplicada (plegada a lo largo de la nervadura central) y durante su ciclo produce varios macollos (Fig. 1d).

La inflorescencia es una espiga delgada erguida o ligeramente curva que puede alcanzar los 20 cm de largo (Fig. 1e-g). En ella se desarrollan los frutos uniseminados: cariopses fuertemente envueltos por la palea y la lemma (Fig. 1h). La semilla es relativamente pesada y no se dispersa a gran distancia (Beddows, 1967; Cabrera & Zardini, 1993).

La perpetuidad de la especie depende casi exclusivamente de la producción de semilla, debido a su baja frecuencia de propagación vegetativa. Yaniccari & Acciaresi (2013) definen a la especie como hemicriptófita, con requerimientos de vernalización y días largos para su desarrollo.



Figura 1. Morfología del *Lolium perenne*. Adaptado de Handbook of Meadow Grasses, Walter Dietl *et al.* (1998); Darwinion 1.1Lolium perenne_INTA.jpg (1100×1409) (darwin.edu.ar) www.darwin.edu.ar/ImagenesIris/Lolium%20perenne_INTA.jpg

La tasa de crecimiento inicial en plántulas es baja, pero aumenta luego de la expansión de la cuarta hoja cuando comienza el periodo de macollaje. En verano, esta tasa desciende y avanza la senescencia en órganos aéreos mientras que los subterráneos se mantienen en latencia, rebrotando vigorosamente con las primeras lluvias del otoño.

Cuando se utiliza la especie como césped, para su perpetuidad se requiere una siembra de renuevo cada 3 a 4 años evitando la desaparición por competencia con otras plantas. La especie es inmejorable como protectora de la alfombra de césped en implantación debido a que sus semillas germinan rápidamente, observándose los primeros brotes a partir de los cinco días siempre que la siembra se realice en la fecha óptima y en las condiciones ideales de humedad y temperatura para la especie. Cuando se la siembra en mezcla con otras gramíneas cespitosas de germinación más lenta otorga estabilidad al terreno y resulta óptimo en suelos propensos a la erosión, con pendientes y escarpados.

Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal

Las bacterias benéficas que promueven el desarrollo vegetal se reconocen con la abreviación PGPR por sus siglas en inglés (*Plant Growing Promotin Rhizobacteria*) y promueven el crecimiento vegetal por varios mecanismos como la fijación biológica del nitrógeno (FBN), la liberación de fitohormonas y la protección frente a organismos patógenos (Frioni, 2011). Estos organismos de vida libre habitan y colonizan la rizósfera, región de intensa actividad microbiana impulsada por la exudación radicular (Echevarria, 2011).

Las PGPR más conocidas incluyen a los géneros *Rhizobium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* y *Azospirillum* (de Zelicourt *et al.*, 2013). Las mismas son utilizadas para estimular el crecimiento de varios cultivos de importancia agronómica tanto en condiciones de invernadero como de campo (Bashan *et al.*, 2004). *Azospirillum* es una de las PGPR más estudiadas y utilizadas a nivel comercial, incrementando los rendimientos en peso seco y producción de semillas (Veresoglou & Menexes, 2010).

Tabla 1. Principales géneros de bacterias heterótrofas fijadoras de nitrógeno (Frioni, 2011).

HETERÓTROFOS			
	Asociaciones		
	Vida libre	Sin nódulos	Con nódulos
↓		↓	
Aerobios	<i>Azotobacter</i> <i>Azotococcus</i> <i>Azomonas</i> <i>Bejerinckia</i> <i>Denia</i>	endofitos	Leguminosas <i>Rhizobium lupini</i> <i>R. leguminosarum</i> bv <i>viciae</i> , <i>trifolii</i> , <i>phaseoli</i> <i>Sinorhizobium meliloti</i> <i>S. fredii</i> <i>S. terangae</i> <i>Bradyrhizobium japonicum</i> <i>B. elkani</i> <i>Azorhizobium cualinodans</i>
↓		↓	↓
Anaerobios facultativos (aerobios cuando no fijan N₂)	<i>Klebsiella</i> <i>Bacillus</i> <i>Enterobacter</i> <i>Escherichia</i> <i>Propionibacterium</i>	rizosfera	
↓		↓	
Microaerófilos (aerobios cuando no fijan N₂)	<i>Mycobacterium</i> <i>Azospirillum</i> <i>Aquaspirillum</i> <i>Rhizobium</i> <i>Frankia</i>	filosfera	No leguminosas <i>Frankia</i> , con: <i>Alnus</i> , <i>Casuarina</i> <i>Eleagnus</i> , <i>Myrica</i> <i>Dryas</i> , <i>Ceanothus</i>
↓		↓	↓
Anaerobios estrictos	<i>Clostridium</i> <i>Desulfovibrio</i>	con animales (tracto digestivo termitas)	

***Azospirillum* spp.**

Este grupo de bacterias Gram negativas, con forma de bacilo y cocos, se ha investigado con profundidad por su capacidad promotora del crecimiento vegetal y se convirtió en un modelo para estudiar la interacción planta-microorganismo (Fig. 2).

Frioni (2011), clasifica al género *Azospirillum* como heterótrofos de vida libre, aerobios cuando no fijan N₂, pero que se comportan como microaerófilos al fijarlo (Tabla 1). Pertenece a la subclase α -proteobacteria, que incluye un gran número de bacterias simbiotas asociadas a las plantas y se ha encontrado colonizando la rizosfera de cultivos como maíz y trigo, y pastos como poa y festuca (Patriquin *et al.*, 1983; Sundaram *et al.*, 1988).

En la actualidad se han descrito 12 especies para este género, la mayoría aisladas de raíces de plantas silvestres y cultivadas, en suelos de regiones templadas, subtropicales y tropicales a nivel mundial (Gunarto *et al.*, 1999). Las dos primeras especies en ser descritas y las más estudiadas son *A. lipoferum* y *A. brasilense* (Tarrand *et al.*, 1978).

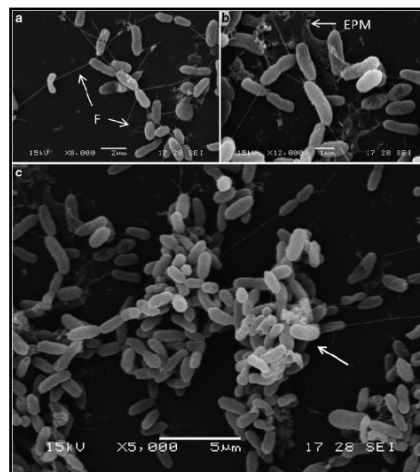


Figura 2. Células de *A. brasilense* visualizadas en microscopio electrónico de barrido.

La colonización del sistema radical ocurre a través de un proceso llamado quimiotaxis en el cual la planta secreta exudados hacia la rizosfera atrayendo las rizobacterias, que utilizan dichos exudados como fuente de carbono. El establecimiento de la bacteria en la raíz es una etapa crítica para lograr la promoción del crecimiento vegetal (Patriquin *et al.*, 1983). Los cambios morfológicos que ocurren en la planta luego de la inoculación se atribuyen a la producción de fitohormonas reguladoras de crecimiento como auxinas, citoquininas y giberelinas, entre otras. (Bottini *et al.*, 1989; Burdman *et al.*, 2000; Tien *et al.*, 1979). El efecto de la inoculación se evidencia principalmente en los estadios tempranos del desarrollo vegetal, luego de una colonización correcta de raíces, aunque la intensidad de dichos efectos depende de la especie vegetal y de la concentración del inoculo (Frioni, 2011).

Se han registrado casos donde la inoculación con *Azospirillum* produce un incremento en longitud y número de raíces laterales, mayor número de pelos radicales, incremento en peso seco de raíz, entre otros (Hadas & Okon, 1987; Kapulnik *et al.*, 1985), además de aumentar la biomasa aérea y acelerar la germinación (Canto *et al.*, 2004; Saubidet *et al.*, 2002). Estos efectos sobre el crecimiento de raíces resultan en el incremento del consumo de agua y nutrientes del suelo. La contribución de la FBN es baja y no juega un papel importante en el crecimiento vegetal (Helman *et al.*, 2011). Otros antecedentes incluyen lo reportado por Criollo *et al.*, (2013) en

plantas de *Pennisetum clandestinum* (kikuyo) donde la inoculación con PGPR promovió el crecimiento y la producción de biomasa 100 días después de la siembra. Hegazi *et al.*, (1979), mediante la inoculación a campo con *A. brasilense* en gramíneas, demostró aumentos en la altura y el rendimiento de grano de las plantas estudiadas. Lazarovits (1997) evaluó el efecto promotor de crecimiento de PGPR aisladas de *L. perenne* confirmando la capacidad bacteriana de producir AIA, sideróforos y amonio, entre otros.

Además de favorecer el crecimiento vegetal, este género induce una resistencia sistémica en contra de patógenos por activación del sistema inmune innato de las plantas (Bashan & Bashan, 2010).

Caracterización zonal

La ciudad de Bahía Blanca se encuentra emplazada en el sur de la Provincia de Buenos Aires, sector meridional de la pampa subhúmeda y próxima al litoral atlántico. El paisaje es de llanura, accidentada por niveles excavados por erosión fluvial de los cursos de agua que la disectan y la sucesión escalonada labrada por el mar (Fig. 3). El relieve general del área no muestra grandes irregularidades ni ondulaciones marcadas definiéndose como “planicie” y por su altitud respecto al nivel del mar encuadra en la clase de “llanura Pampeana”.

De acuerdo con la clasificación climática de Thornthwaite el clima de la región es subhúmedo-seco, mientras que Köpen, clasifica a la ciudad dentro del tipo climático semiárido, con veranos e inviernos bien marcados y primaveras y otoños moderados. La temperatura media anual ronda los 15 °C, con máximas medias mensuales que superan los 30 °C en verano y mínimas medias mensuales alrededor de los 0 °C en invierno. El periodo de aparición de heladas se ubica entre los meses de abril y octubre, con máximos de ocurrencia entre junio y agosto.

La precipitación media anual es de 580 mm, con picos bien definidos en otoño y primavera. Durante el verano se observa una deficiencia hídrica marcada, con reposición de agua que se extiende de abril a octubre. El mínimo anual de evapotranspiración se produce en junio y el máximo en enero. El balance hidrológico presenta un déficit hídrico marcado en el suelo a partir de noviembre, prolongándose hasta marzo. El resto de los meses ocurre una reposición parcial de agua en el suelo sin llegar a cubrir las necesidades de los cultivos.

Los vientos predominantes provienen del cuadrante noroeste con una velocidad media anual de 27 km/h, de gran importancia en la región por la alta frecuencia e intensidad que le otorgan un carácter erosivo y desecante (Paoloni, 2010).



Figura 3. Ubicación del Partido de Bahía Blanca.

OBJETIVOS

Objetivo general

Comparar el crecimiento inicial de dos variedades de *Lolium perenne* utilizadas como césped en la ciudad de Bahía Blanca y evaluar el posible efecto de la aplicación de *Azospirillum brasilense* sobre su biomasa.

Objetivos específicos

- ➔ Comparar la biomasa en las primeras semanas de implantación de *Lolium perenne* var. Lolius® y *L. perenne* var. León®.
- ➔ Evaluar el efecto de la aplicación en solución de riego de *A. brasilense* con y sin protector sobre el porcentaje de cobertura de suelo, la materia seca aérea y radical, el largo de las hojas y el número de macollos de *Lolium perenne* var. Lolius® y *L. perenne* var. León® a los 30, 44 y 58 días post siembra.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Para evaluar el efecto de *Azospirillum brasilense* en céspedes se inocularon plántulas de dos variedades de Raigrás “Turf type” (*Lolium perenne* L., enano) comercializadas por la empresa semillera Guasch S.R.L.¹ Las semillas se encontraban pretratadas con VMTBiz[®], un curasemilla con propiedades antifúngicas que protege las plántulas durante la emergencia y otorga mayor velocidad de implantación e incrementa la cantidad de ejemplares logrados (Fig. 4).

Lolium perenne L. var. *Lolius*[®] (R1) presenta un color verde muy oscuro y hojas finas que no forman mata, destaca por su rápido establecimiento fuerte enraizamiento y buena tolerancia a la sequía, el estrés hídrico y las bajas temperaturas. Por sus características morfo-fisiológicas se integra perfectamente al uso profesional en campos deportivos y jardines exigentes, permitiendo de ser necesaria una resiembra con Bermuda (*Cynodon dactylon*) a fines de verano.

Lolium perenne L. var. *León*[®] (R2) es un césped desarrollado en Holanda que presenta hojas finas y crecimiento bajo, destaca por su rápida velocidad de implantación, buena sanidad y tolerancia a las heladas. Tiene un excelente comportamiento en campos deportivos por soportar el tránsito intenso; en verano puede utilizarse en resiembras con Bermuda.

El inoculante líquido para gramíneas utilizado fue el Graminsoil-L[®] comercializado por LAGE y Cía. S.A.² formulado con *Azospirillum brasilense*.

Como bioprotector se utilizó una formulación líquida estéril que garantiza protección, adherencia y nutrición de las bacterias sobre la semilla.



Figura 4. Semillas de *Lolium perenne* L. observadas bajo lupa (Imagen de autoría propia).

¹ <https://guasch.com.ar/>

² <https://www.lageycia.com/>

Ensayo

Con el objetivo de evaluar el efecto biofertilizante de *A. brasilense* sobre céspedes, en presencia y ausencia de un bioprotector, se realizó un ensayo en contenedores, siguiendo un diseño en bloques (b = 4). El estudio se llevó a cabo en una parcela experimental, previamente acondicionada, del campus de Palihue de la Universidad Nacional del Sur, ubicada en Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires.

El día 23 de marzo de 2023 se realizó la siembra en macetas sopladas de 3l de capacidad y 0,15m de diámetro, rellenas con suelo extraído del mismo campus (textura arenoso-franco; bien drenado; MO: 1,1%; pH: 7,7).

Las semillas se sembraron al voleo dentro de cada maceta, utilizando una densidad de 0,88 g/maceta, y luego se cubrieron con un mantillo del mismo suelo tamizado. Las plántulas emergieron a los cinco días post siembra, razón por la cual los tratamientos se aplicaron una semana después de iniciado el ensayo. Tanto el biofertilizante como el bioprotector se aplicaron siguiendo las instrucciones del marbete correspondiente, teniendo en cuenta la densidad de semillas sembradas por maceta (Fig. 6).

El riego se realizó con regularidad y en forma manual cada 2 a 3 días, a fin de mantener un estado hídrico óptimo para el crecimiento del cultivo.

Los tratamientos evaluados fueron:

- **T:** testigo, semillas de *Lolium perenne*, regadas con agua de red.
- **Az:** semillas de *L. perenne* + *Azospirillum brasilense*, 2 ml/maceta aplicados en solución a modo de riego.
- **Az+P:** semillas de *L. perenne* + *A. brasilense* + bioprotector, 1 ml/maceta aplicado en solución a modo de riego.

En cada tratamiento se realizaron tres evaluaciones en el tiempo (t = 3) a los 30, 44 y 58 días post siembra, elevando el número de unidades experimentales (UE) a 72 (Fig. 5). En cada oportunidad se tomó registro de los datos de cobertura del suelo (CS), peso seco de la biomasa aérea (PSA) y radical (PSR), largo total de hojas por planta (LT) y cantidad de hojas (NH) y de macollos por planta (NM).

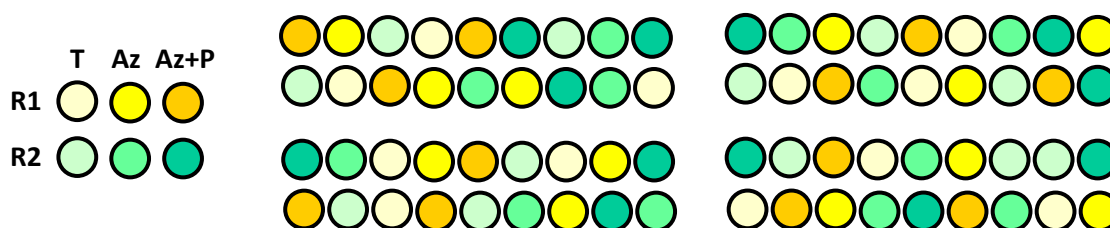


Figura 5. Representación esquemática del diseño en bloques completamente aleatorizado. En cada bloque se contó con los tres tratamientos para cada variedad de raigrás. Cada tratamiento a su vez se realizó en triplicado para su cuantificación de manera destructiva a los 30, 44 y 58 días post siembra.

$$N: 72 \text{ UE} = 2 \text{ variedades} * 4 \text{ bloques} * 3 \text{ tratamientos} * 3 \text{ tiempos de corte}$$



Figura 6. A. siembra de semillas; B y C. cobertura con suelo tamizado; D. emergencia del raigrás; E. preparación de la solución de biofertilizante y bioprotector; F. Aplicación de biofertilizante y bioprotector con pipeta graduada (Imágenes de autoría propia).

Determinación de cobertura del suelo (%)

Las macetas se fotografiaron semanalmente y luego se utilizó la aplicación móvil Canopeo^{®3}. Para mayor precisión al momento de fotografiar se colocó sobre cada maceta un marco de polietileno que enmarcaba un cuadrado de 144 cm², evaluándose el área contenida dentro del mismo (Fig. 7).

Materia seca de la biomasa aérea y radical (g)

Se realizaron tres cortes en el tiempo. En cada uno de ellos se tomaron seis UE de cada bloque, correspondientes a cada uno de los tratamientos ensayados sobre ambas variedades de *Lolium* spp. Manualmente se cortó con tijera al ras del suelo toda la biomasa aérea incluyendo coleoptile y primeras hojas. La porción subterránea se extrajo por lavado total del pan de tierra separando las raíces de las impurezas contenidas en el sustrato.

Ambas muestras se colocaron en sobres debidamente identificados y fueron llevadas a estufa a 70 °C por 48 h hasta peso constante, para luego ser pesado en balanza de precisión ($\pm 0,0001$ g; Fig. 8).

³ <https://canopeoapp.com/#/login>

Longitud total del material aéreo (cm), cantidad de hojas y número de macollos

Previo al corte de biomasa aérea para el cálculo de PSA, se tomaron al azar cinco muestras de plántulas de cada UE. Las plantas extraídas se colocaron en sobres de papel dentro de una bolsa para mantener su contenido de humedad hasta ser fotografiadas sobre una base de medida graduada en cm. Las fotos se analizaron con el programa ImageJ®⁴. El valor LT se obtuvo por sumatoria de la longitud del total de las hojas por planta (Fig. 9).

Análisis estadísticos

Los tratamientos se evaluaron mediante el análisis de la varianza (ANOVA) seguido por el test LSD de Fisher, mediante el software estadístico Infostat®⁵.

En los casos donde no se cumplieron los supuestos de homocedasticidad y/o normalidad requeridos por el test, los datos de CS se transformaron con ArcoSeno(Raíz(p)), mientras que para PSA, PSR, LT, NH y NM se utilizó Raíz cuadrada.

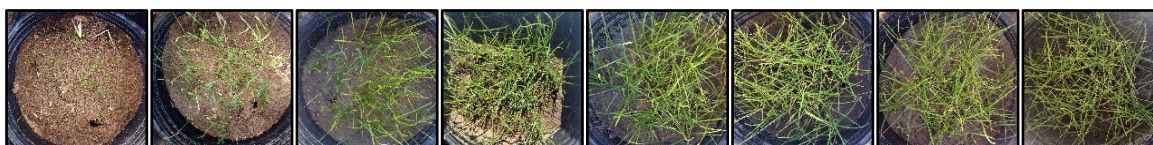


Figura 7. Fotografías tomadas para el análisis de porcentaje de suelo cubierto durante ocho semanas seguidas (Imágenes de autoría propia).

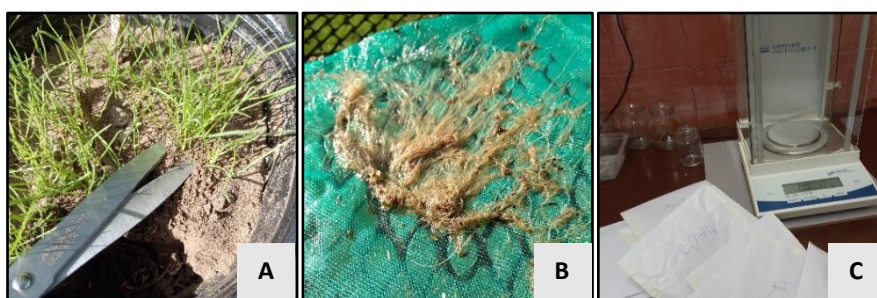


Figura 8. A. corte de biomasa aérea; B. lavado y limpieza de biomasa subterránea; C. pesaje de materia seca aérea y subterránea en balanza de precisión (Imágenes de autoría propia).

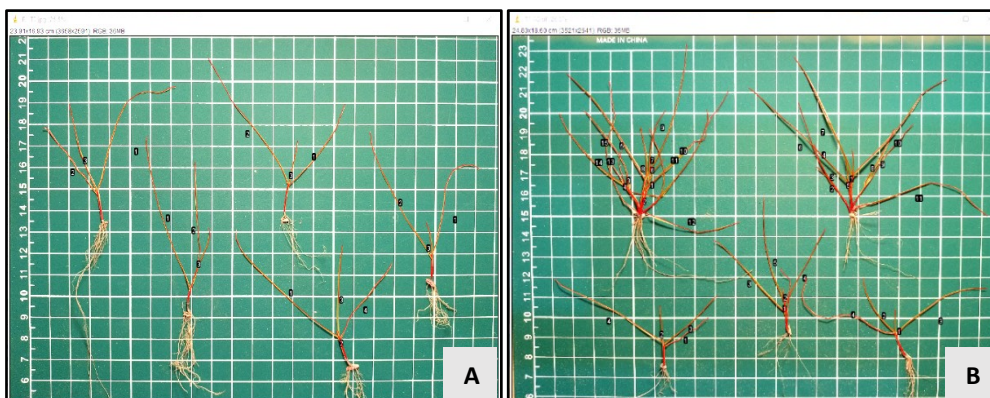


Figura 9. Capturas de pantalla de las mediciones realizadas mediante el programa ImageJ® para determinación de largo total aéreo y número de hojas y macollos por planta.

A. primer corte en el tiempo; B. tercer corte en el tiempo (Imágenes de autoría propia).

⁴ <https://imagej.net/ij/index.html>

⁵ infostat.com.ar

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de resultados estadísticos ANOVA y test LSD Fischer basados en los gráficos de barras que muestran las medias (\pm ES) con y sin diferencias significativas entre tratamientos para cada corte realizado en el tiempo de duración del ensayo.

Peso seco radical (g)

Solo se observaron diferencias en el peso radical entre tratamientos en el segundo corte ($p < 0,05$). En ambos casos no hubo diferencias de la aplicación de *Azospirillum* con el testigo y al aplicar el protector se observó una tendencia a disminuir la biomasa radical (Fig. 10).

En los tres cortes, la variedad R1 muestra la tendencia a un mayor peso seco en plantas testigo, seguidas por las tratadas con *A. brasilense* sin bioprotector ($p = 0,0738$). En la variedad R2 hubo una tendencia a aumentar la biomasa radical solo con *Azospirillum* en el segundo corte y con el agregado del protector en el tercero.

Durante el primer mes y medio, R1 desarrolló una mayor biomasa radical en comparación a R2, lo cual podría favorecer una mejor implantación en nuestra zona (Fig. 10).

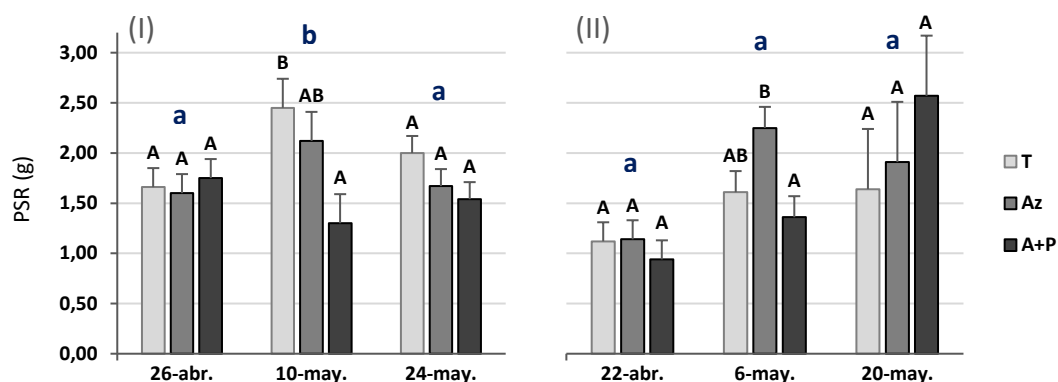


Figura 10. Valores medios (\pm ES) para la evaluación del peso seco radical (PSR) sobre los tratamientos aplicados a *Lolium perenne* var *Lolius* R1 (I) y var *León* R2 (II). Medias con una letra común no son significativamente diferentes según el test LSD de Fisher ($p > 0,05$). Letras mayúsculas comparan tratamientos en cada fecha para cada variedad; Letras minúsculas comparan las variedades de *Lolium* spp. entre sí.

Peso seco aéreo (g)

No se observaron diferencias significativas en los tratamientos de las variedades de raigrás estudiadas en ninguno de los tres cortes aéreos realizados ($p > 0,05$). Sin embargo, se puede apreciar un aumento gradual del peso seco aéreo en el tiempo, mayor en R1 durante los primeros 30 días post siembra (Fig. 11). Este resultado, en congruencia con el anterior, nos sugiere la utilización de R1 si se quiere lograr una mayor biomasa en menos tiempo en nuestra ciudad.

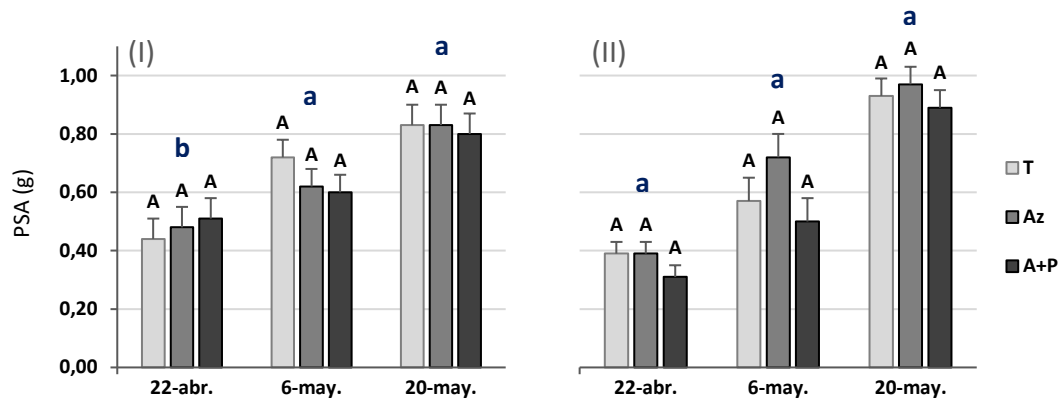


Figura 11. Medias (\pm ES) de peso seco aéreo (PSA) para la evaluación de diferencias entre tratamientos aplicados a aplicados a *Lolium perenne* var *Lolius* R1 (I) y var *León* R2 (II). Medias con una letra común no son significativamente diferentes según el test LSD de Fisher ($p > 0,05$). Letras mayúsculas comparan tratamientos en cada fecha para cada variedad; Letras minúsculas comparan las variedades de *Lolium* spp. entre sí.

Cobertura del suelo (%)

No se observaron diferencias significativas a lo largo de las ocho mediciones realizadas en el tiempo sobre los tratamientos aplicados a cada variedad de raigrás ($p < 0,05$). Las curvas de porcentaje de suelo cubierto tuvieron su pico máximo entre la cuarta y la quinta medición para luego comenzar a decrecer gradualmente (Fig. 12).

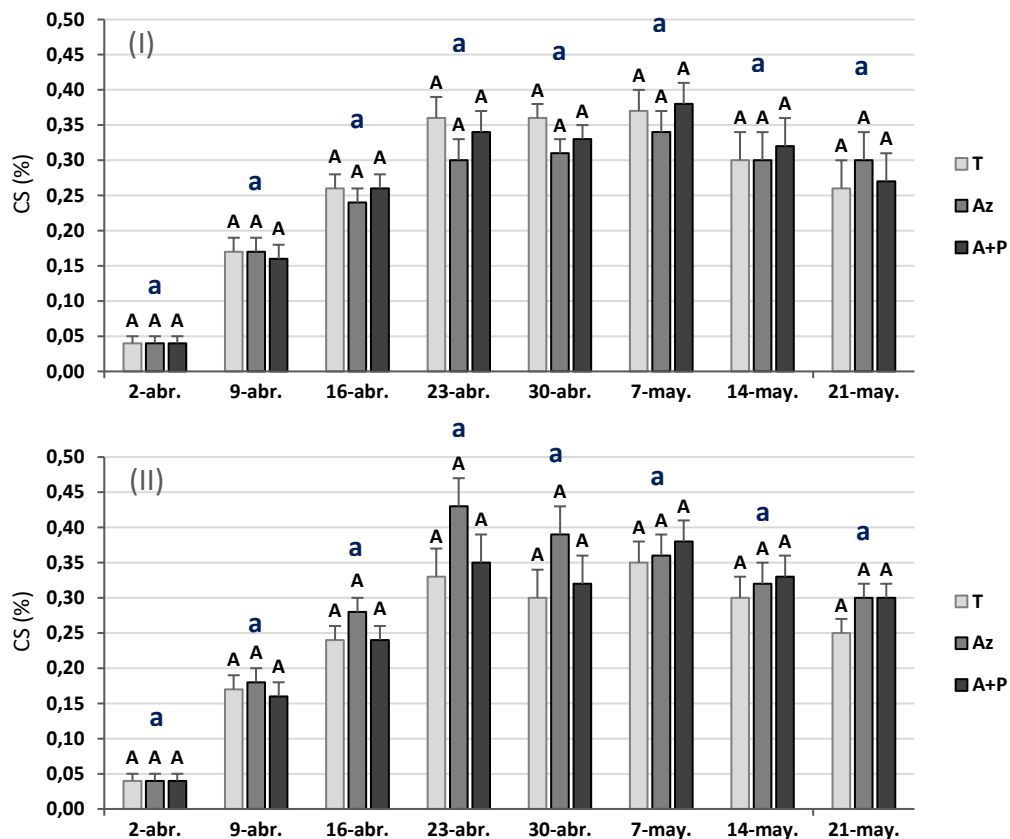


Figura 12. Evaluación de medias entre tratamientos para la evaluación de CS sobre *Lolium perenne* var *Lolius* R1 (I) y var *León* R2 (II). Medias con una letra común no son significativamente diferentes según el test LSD de Fisher ($p > 0,05$). Letras mayúsculas comparan tratamientos en cada fecha para cada variedad; Letras minúsculas comparan las variedades de *Lolium* spp. entre sí.

Largo aéreo (cm)

Al analizar el largo foliar de la variedad R1 se encontraron diferencias significativas entre tratamientos para el primer corte ($p < 0,05$), incrementándose el largo con el agregado de la bacteria, y en el segundo corte ($p = 0,0015$) en donde esta vez el tratamiento Az disminuyó el largo (Fig. 13). La variedad R2 no presentó diferencias entre tratamientos en ninguno de los cortes estudiados ($p > 0,05$; Fig.13). En este parámetro, no se apreciaron diferencias entre variedades.

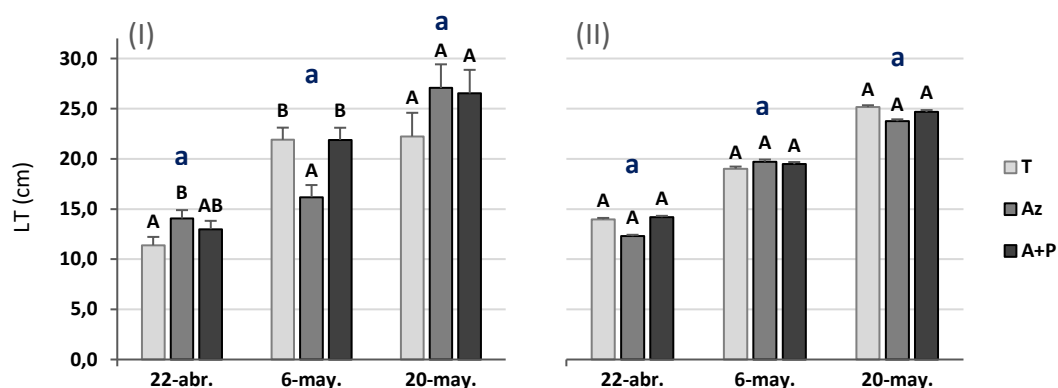


Figura 13. Datos de medias (\pm ES) de LT que identifican diferencias en los tratamientos a aplicados a *Lolium perenne* var *Lolius* R1 (I) y var *León* R2 (II). Medias con una letra común no son significativamente diferentes según el test LSD de Fisher ($p > 0,05$). Letras mayúsculas comparan tratamientos en cada fecha para cada variedad; Letras minúsculas comparan las variedades de *Lolium* spp. entre sí.

Cantidad de hojas

La variedad R1 presentó diferencias significativas entre tratamientos solo para el corte 2 ($p < 0,05$), mientras que en R2 no se observaron diferencias entre tratamientos en ninguno de los cortes estudiados (Fig. 14). A pesar de que R2 tuvo un mayor desarrollo de hojas durante el primer mes de crecimiento, la variedad R1 logró sobrepasarla hacia el final del ensayo ($p < 0,05$).

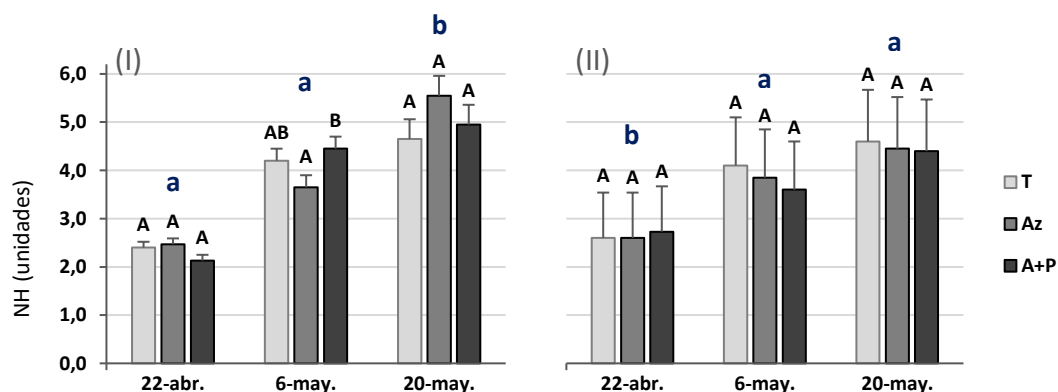


Figura 14. Valores medios (\pm ES) de NH que identifican diferencias en los tratamientos a *Lolium perenne* var *Lolius* R1 (I) y var *León* R2 (II). Medias con una letra común no son significativamente diferentes según el test LSD de Fisher ($p > 0,05$). Letras mayúsculas comparan tratamientos en cada fecha para cada variedad; Letras minúsculas comparan las variedades de *Lolium* spp. entre sí.

Cantidad de macollos

A la fecha del primer corte ninguna variedad había comenzado su macollaje. Se encontraron diferencias significativas solo para las medias del segundo corte en R1 ($p=0,0373$) y R2 ($p=0,0764$; Fig. 15). En cuanto a la comparación entre variedades, en R1 se observó una diferencia significativa mayor hacia el final del ensayo respecto a R2.

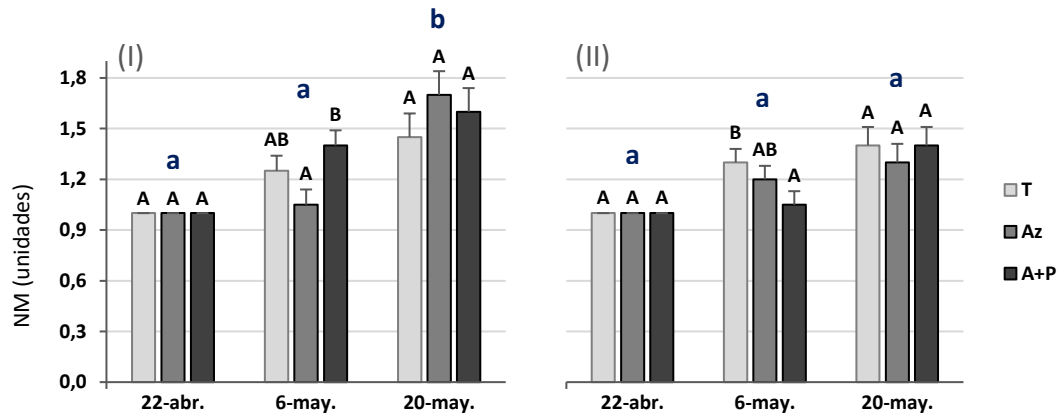


Figura 15. Diferencia de medias (\pm ES) entre tratamientos para la evaluación de NM a *Lolium perenne* var *Lolius* R1 (I) y var León R2 (II). Medias con una letra común no son significativamente diferentes según el test LSD de Fisher ($p > 0,05$). Letras mayúsculas comparan tratamientos en cada fecha para cada variedad; Letras minúsculas comparan las variedades de *Lolium* spp. entre sí.

En líneas generales, la variedad de raigrás *Lolius*® demostró rendimientos superiores con la aplicación de *Azospirillum* spp. en los análisis del largo de hojas y el número de hojas y macollos por planta mientras que para el peso seco radical las plantas testigo fueron las que mayores medias arrojaron.

En el análisis de la variedad de raigrás *Leon*® se apreciaron aumentos en el peso seco radical en las plantas tratadas con la bacteria y en el número de macollos sobre plantas testigo.

CONCLUSIÓN

Dados los mayores valores en biomasa alcanzados por la variedad *Lolius*[®], parecería ser que esta se adapta mejor o posee atributos que la favorecen para ser utilizada en la zona.

Bajo las condiciones ensayadas, no se observó un efecto positivo dado por la incorporación de *Azospirillum brasilense* con el agua de riego, por lo que tampoco se espera una mejora en la producción sustentable de dicho césped por reducción del uso de fertilizantes químicos. La falta de un patrón claro que justifique la heterogeneidad de resultados reafirma la necesidad de continuar las investigaciones a campo antes de que estos microorganismos puedan ser utilizados como bioinoculantes.

Sería conveniente la evaluación del establecimiento y permanencia de la bacteria en el sustrato/suelo, debido a que existe referencia sobre las posibles variaciones en la colonización de *Azospirillum* spp., en condiciones controladas de laboratorio e invernáculo, que pueden ser atribuidas al contenido de humedad del suelo (EL-Komi *et al.*, 2003), la distribución de las bacterias sobre la raíz (zonas con mayor tasa de crecimiento producen más exudados; Fischer *et al.*, 2000) y la competencia con organismos nativos donde Saubidet *et al.* (2002) mencionan una mayor colonización al inocular sobre suelo estéril; en conjunto con la evaluación de la incorporación del inoculante en la semilla.

Adicionalmente podría mejorarse las condiciones de cultivo de la especie vegetal estudiada, ya que hay autores que mencionan que, bajo condiciones de estrés de la planta, se cancela la emisión de exudados a la raíz, ocasionando una falta de alimento para las bacterias PGPR (Fischer *et al.*, 2000; Schulze & Pöschel, 2004).

BIBLIOGRAFÍA

- Bashan, Y., & Bashan, L. E. (2010). How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth - A critical assessment. In Sparks DL. *Advances in agronomy*. Elsevier Inc., 78-122, volume 108.
- Bashan, Y., Holguin G, & de-Bashan, L. E. (2004). *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Can. J. Microbiol.*, 50: 521-77.
- Beddows, A. R. (1967). Biological flora of the British Isles. *Lolium perenne* L. *Journal of Ecology*, 55: 567-587.
- Bottini, R., Fulchieri, M., Pearce, D., & Pharis, R. P. (1989). Identification of gibberellins A1, A3, and iso-A3 in cultures of *Azospirillum lipoferum*. *Plant Physiol.*, 90: 45-47.
- Burdman, S., Okon, Y., & Jurkevitch, E. (2000). Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant roots, CRC. *Microbiol.*, 26: 91-110.
- Cabrera, A. L., & Zardini, E. M. (1993). Manual de la flora de los alrededores de Buenos Aires. Segunda edición. Editorial ACME, Buenos Aires, 755pp.
- Canto, M. J., Medina, P. S., & Morales, A. D. (2004). Efecto de la inoculación con *Azospirillum* sp. en plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacquin). *Trop. Subtrop Agroecosys.*, 4: 21-27.
- Criollo, P. J., Obando M, Sánchez, M. L., & Bonilla, R. (2013). Efecto de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) asociadas a *Pennisetum clandestinum* en el altiplano cundiboyacense. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 13(2), 189.
- de Zelicourt, A., Al-Yousif, M., & Hirt, H. (2013). Rhizosphere microbes as essential partners for plant stress tolerance. *Mol. Plant*, 6: 242-45.
- Echevarria, R. (2011). Estudios de rizobacterias promotoras del crecimiento (PGPR) como alternativa de aplicación a suelos con limitantes abióticas. *Universidad Nacional de La Pampa*.
- EL-Komi, H. M., Hamdia, M. A., & EL-Baki, G. K. (2003). Nitrate reductase in wheat plants grown under water stress and inoculated with *Azospirillum* spp. *Biol. Plant*, 46:281-287.
- Fischer, S., Rivarola, V., & Mori, G. (2000). Colonization of wheat by *Azospirillum brasilense* Cd is impaired by saline stress. *Plant Soil*, 225:187-191.
- Froni, L. (2011). *Microbiología: básica, ambiental y agrícola (segunda edición)*. Buenos Aires: Orientación Gráfica Editora S.R.L.
- Gunarto, I., Adachi, K., & Senboku, T. (1999). Isolation and selection of indigenous *Azospirillum* spp. from a subtropical island and effect of inoculation on growth of lowland rice under several levels of N application. *Biol. Fertil. Soils*, 28: 129-135.
- Hadas, R., & Okon Y. (1987). Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on root morphology and respiration in tomato seedlings. *Biol. Fertil. Soils*, 5: 241-247.

- Hegazi, N. A., Eid, N., Faraq, R., & Monib, M. (1979). Asymbiotic N₂ fixation in the rhizosphere of sugarcane planted under semi-arid conditions of Egypt. *Ecol. Biol. Sol.*, 16: 232-237.
- Helman, Y., Burdman, S., & Okon Y. (2011). Plant growth promotion by rhizosphere bacteria through direct effects. *Beneficial microorganisms in multicellular life form. Heidelberg: Springer.*, 89-103.
- Istilart, C., & Yaniccari, M. (2011). Análisis de la evolución de malezas en cereales de invierno durante 27 años en la zona sur de la pampa húmeda argentina. *Revista Técnica Especial: Malezas problema (Aapresid)*: 47-50.
- Kapulnik, Y., Gafny, R., & Okon, Y. (1985). Effect of *Azospirillum* spp. inoculation on root development and NO₃ uptake in wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Miriam) in hydroponic systems. *Can. J. Bot.*, 63: 627-631.
- Lazarovits, G. (1997). Rhizobacteria for improvement of plant growth and establishment. *Department of Plant Science*.
- Paoloni, J. D. (2010). *Ambiente y recursos naturales del partido de Bahía Blanca: clima, geomorfología, suelos y aguas (sudoeste de la provincia de Buenos Aires)*. Bahía Blanca: EdiUNS, Editorial de la Universidad Nacional del Sur.
- Parracia, A. N. (2012). Césped: principales especies, manejo y métodos de propagación usados en parques y jardines [en línea]. Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Católica Argentina.
- Disponible en: <http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/tesis/cesped-principales-especies-manejo.pdf>
- Patriquin, D. G., Döbereiner, J., & Jain, D. K. (1983). Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. *Can. J. Microbiol.*, 29: 900-15.
- Polok, K. (2007). Molecular evolution of the genus *Lolium* L. Olsztyn. *Studio Poligrafii Komputerowej*, 318pp.
- Saubidet, M. I., Fatta, N., & Barneix, A. J. (2002). The effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on growth and nitrogen utilization by wheat plants. *Plant Soil*, 245: 215-22.
- Schulze, J., & Pöschel, G. (2004). Bacterial inoculation of maize affects carbon allocation to roots and carbon turnover in the rhizosphere. *Plant soil*, 267:235-241.
- Sundaram, S., Arunakumari, A., & Klucas, R. V. (1988). Characterization of azospirilla isolated from seeds and roots of turf grass. *Can. J. Microbiol.*, 34: 212-217.
- Tarrand, J. J., Krieg, N. R., & Döbereiner, J. (1978). A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group with descriptions of a new genus *Azospirillum* gen. nov. and two species *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can. J. Microbiol.*, 24: 967-80.
- Tien, T. M., Gaskins, M. H., & Hubbell, D. H. (1979). Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl. Environ. Microbiol.*, 37: 1016-1024.

- Veresoglou, S. D., & Menexes, G. (2010). Impact of inoculation with *Azospirillum* spp. on growth properties and seed yield of wheat: a meta-analysis of studies in the ISI Web of Science from 1981 to 2008. *Plant Soil*, 337: 469-80.
- Yaniccari, M., & Acciaresi, A. (2013). Perennial weeds in Argentinean crop systems: biological and ecological characteristics and basis for a rational weed management. *Agricultural Research Updates Vol 5*. Nova Science Publishers. Nueva York, 176pp.