Artículo científico

Uso combinado de brasinoesteroides y *Azospirillum argentinense* como estrategia para aumentar la tolerancia a estrés salino en plantas de frutilla

Combined use of brassinosteroids and *Azospirillum argentinense* as a strategy to increase tolerance to saline stress in strawberry plants

Ramiro N. Furio[1]*; Nadia C. Lovaisa[2]; Yamilet Coll-García[3]; Juan C. Díaz-Ricci[4]; Sergio M. Salazar[1,2]

[1]Estación Experimental Agropecuaria Famaillá, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Ruta Prov. 301 km 32, (4132) Famaillá, Tucumán. Argentina.
[2]Facultad de Agronomía, Zootecnia y Veterinaria. UNT. Avenida Kirchner 1900, (4000) San Miguel de Tucumán. Tucumán, Argentina.
[3]Centro de Estudio de Productos Naturales, Facultad de Química, Universidad de La Habana, Cuba.
[4]Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (INSIBIO), CONICET-UNT, Instituto de Química Biológica "Dr. Bernabé Bloj", Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán. Batalla de Chacabuco 461, (4000) San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina.

*Correo electrónico: furio.ramiro@inta.gob.ar

Resumen

El uso de brasinoesteroides está siendo cada vez más estudiado, debido a sus efectos en las plantas como promotor de crecimiento e inductor de la defensa. En este trabajo se evaluó y caracterizó el efecto protector de un brasinoesteroide natural (EP24) y uno sintético (BB16) en combinación con la cepa REC3 de *Azospirillum argentinense*, en plantas de frutilla expuestas a estrés salino. Las plantas tratadas exhibieron un mejor estado fisiológico con respecto a las plantas control. Los resultados obtenidos mostraron que plantas de frutilla tratadas solo con BB16 presentaron valores mayores de peso fresco, peso seco, diámetro de corona, superficie radicular, área foliar, contenido relativo de agua en foliolos e índice de verdor al cabo de 40 días de estrés, en comparación con plantas control, sometidas a estrés, pero no tratadas. En cambio, combinando BB16 con REC3 sólo se apreciaron mejoras significativas con respecto al control en el contenido relativo de agua y en la longitud, peso seco y superficie radicular. Por su parte, la aplicación de EP24 dio lugar a una menor disminución del índice de verdor en relación a plantas control, mientras que al combinarse con REC3 se observaron aumentos significativos en otros parámetros: peso fresco y seco de raíz, peso fresco aéreo, superficie radicular y contenido relativo de agua. Con estos resultados podemos concluir que la combinación con *A. argentinense* REC3 resultó benéfica en el caso de EP24, no así con BB16, sugiriendo que la estructura de cada brasinoesteroide influye fuertemente en el comportamiento observado en las plantas.

Palabras clave: *Azospirillum*; Brasinoesteroides; *Fragaria ananassa*; Salinidad.

Abstract

The use of brassinosteroids is being increasingly studied, due to their effects in plants as a growth promoter and defense inducer. In this work, the protective effect of a natural brassinosteroid (EP24) and a synthetic one (BB16) in combination with the REC3 strain of *Azospirillum argentinense*, in strawberry plants exposed to saline stress, was evaluated and characterized. The treated plants exhibited a better physiological status in comparison with control plants. The results obtained showed that strawberry plants treated only with BB16 presented higher values of fresh and dry weight, crown diameter, root surface, leaf area, leaf relative water content and greenness index after 40 days of stress. Instead, combining BB16 with REC3 only showed improvements with respect to the control in root length, root dry weight, root surface and relative water content. The application of EP24, however, caused a smaller decrease in the greenness index in relation to control plants, while when combined with REC3, increases were observed in other additional parameters: root fresh and dry weight, aerial fresh weight, root surface and relative water content. Results obtained let us conclude that the combination with *A. argentinense* REC3 was beneficial in the case of EP24, but not with BB16, suggesting further that the structure of each brassinosteroid strongly influences the behavior of plants.

Keywords: *Azospirillum*; Brassinosteroids; *Fragaria ananassa*; Salinity.

Recibido: 06/06/2023; Aceptado: 23/06/2023 **https://doi.org/10.61914/ranar.4301.04**
Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Introducción

La interacción de las plantas con su entorno hace que las mismas estén expuestas a múltiples condiciones de estrés biótico y abiótico que deberán afrontar para poder crecer, siendo la salinidad de los suelos una de las situaciones más frecuentes dentro de los estreses abióticos. Por lo tanto, el crecimiento y desarrollo de las plantas dependerá de su capacidad para adaptarse a estas condiciones adversas.

La etapa de desarrollo de la planta es crucial en la respuesta frente al estrés, así como la severidad del estrés al que están expuestas (Talon *et al.*, 1991; Zeevaart *et al.*, 1993). En ocasiones, la respuesta de la planta para tolerar esas condiciones adversas y asegurar su supervivencia puede afectar los procesos de crecimiento, ya que los recursos energéticos estarían siendo empleados mayoritariamente para hacer frente a esas condiciones de estrés (Gillaspy *et al*., 1993).

Estudiar mecanismos para inducir tolerancia a estrés abiótico en las plantas de frutilla resulta necesario ya que las mismas son muy susceptibles al estrés salino. Esta característica se debe principalmente a su sistema radicular poco profundo, lo que sumado a una elevada superficie foliar y a un contenido alto de agua en los frutos (Zahedi *et al*., 2023), hace que la demanda de agua de las plantas sea muy elevada (Klamkowski y Treder, 2006; Undurraga y Vargas, 2013), siendo la misma severamente limitada en condiciones de estrés salino, que provoca una disminución en el crecimiento al afectar la actividad fotosintética (Munns, 2002; Stepien y Klobus, 2006), causando una marcada reducción en los rendimientos del cultivo (Adak *et al*., 2018).

Con el objetivo de mitigar los efectos provocados por el estrés salino, la aplicación de diversos compuestos inductores o reguladores del crecimiento de las plantas ha ido ganando relevancia como estrategia de manejo de cultivos, existiendo, particularmente, múltiples informes e investigaciones sobre el papel de unos compuestos naturales denominados brasinoesteroides (BRs), para aliviar el estrés salino en las plantas (Bajguz y Hayat, 2009; Manghwar *et al*., 2022). Los BRs son compuestos de naturaleza esteroidal esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas, que fueron descubiertos en la década del 70 (Mitchell *et al.*, 1970).

Diversos trabajos permitieron demostrar el efecto protector de distintos brasinoesteroides contra el estrés salino en diversos cultivos tales como: arroz, maní y lechugas (Serna *et al.*, 2015; Li *et al*., 2022; Hussain *et al*., 2023). En plántulas de arroz se demostró que el tratamiento con BB16 o EP24 provoca una mejora en el crecimiento, una disminución del daño de los lípidos y un aumento en el contenido de proteína soluble, en comparación con plántulas control tratadas sólo con NaCl. (Nuñez *et al*., 2003; Özdemir *et al*., 2004). También se demostró que el tratamiento con EP24 permite superar la inhibición de la germinación de las semillas causada por el NaCl en *Arabidopsis thaliana* y *Brassica napus* (Kagale *et al*., 2007). La aplicación de BRs da lugar, además, a un aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes y la acumulación de prolina en garbanzos y porotos sometidos a estrés salino (Ali *et al*., 2007; Hayat *et al*., 2010).

Por su parte, se sabe que *Azospirillum* es un género de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (*Plant Growth Promoting Bacteria*, PGPB) con marcados efectos benéficos en plantas de frutilla, actuando como promotores de crecimiento e inductores de la defensa contra patógenos (Pedraza *et al*., 2010; Viejobueno *et al*., 2021). Si bien, existe evidencia del efecto protector de cepas de *Azospirillum* en plantas sometidas a estrés salino (Abdel Latef *et al*., 2020), específicamente sobre el cultivo de frutilla no existe demasiada evidencia ni están completamente caracterizados los mecanismos involucrados.

Por todo lo mencionado, se vuelve imprescindible desarrollar alternativas agrícolas que permitan mejorar los rendimientos, reduciendo el impacto negativo de las condiciones de estrés salino en plantas de frutilla. El objetivo de este trabajo fue caracterizar no solo el efecto de dos brasinoesteroides, BB16 y EP24, sino, además, la combinación de dichos compuestos con la cepa REC3 de *Azospirillum argentinense* (dos Santos Ferreira *et al*., 2022), sobre la tolerancia al estrés salino en plantas de frutilla, con el fin de estudiar su efecto y poder desarrollar nuevas estrategias para el manejo sustentable, basadas en el tratamiento combinado de fitohormonas con bacterias promotoras del crecimiento vegetal.

Materiales y métodos

Material vegetal

Se emplearon plantas de *Fragaria ananassa* de la variedad 'Pájaro' obtenidas de cultivos *in vitro*, que fueron provistas por el BGA (Banco de Germoplasma Activo de INSIBIO, UNT-CONICET). Las mismas fueron implantadas en sustrato sólido (humus y perlita, 2:1), y mantenidas durante 14 semanas en cámaras de cultivo a 26 °C, 70 % de humedad relativa y 16 horas diarias de ciclo de luz (200 $\mu mol.s^{-1}.m^{-2}$). No se utilizó fertilizante ni fungicida durante el crecimiento de las mismas, ni tampoco durante los ensayos realizados.

Inoculación con Azospirillum argentinense

Se utilizó un cultivo puro de *Azospirillum argentinense* REC3 aislada de plantas de frutilla en Tucumán, Argentina (Pedraza *et al*., 2007). La misma se cultivó durante 24 h a 30 °C y 120 rpm en medio NFb (Baldani *et al*., 2014). Luego, las células se centrifugaron a 2000 g durante 10 min y se lavaron dos veces con agua bidestilada estéril pH 7,0 para eliminar los residuos del medio de cultivo que pudieran interferir con el ensayo. Posteriormente, las células se resuspendieron en agua bidestilada estéril. Las plantas de frutilla se inocularon por riego con 100 ml de la suspensión bacteriana (10^6 UFC/ml; DO_{600nm} 0,2) de *A. argentinense* REC3. Las plantas control fueron regadas con 100 ml de agua destilada estéril. La inoculación se realizó 48 horas antes de realizar el tratamiento con BRs, que se detalla a continuación.

Tratamiento con BRs

Las plantas se asperjaron 3 días antes de someterlas a estrés salino, con el brasinoesteroide natural (EP24) o con el brasinoesteroide obtenido por síntesis química (BB16), a una concentración de 0,1 $mg.l^{-1}$ hasta punto de goteo. Posteriormente, las plantas se incubaron en las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Después de 40 días, las plantas se evaluaron como se describe a continuación.

Estrés abiótico

Para el estrés salino, las plantas se regaron con 100 ml de NaCl 100 mM cada 3 días, basándonos en resultados previos obtenidos en nuestro grupo de trabajo, en los que pudimos observar que éstas condiciones de estrés salino resultan severamente perjudiciales para las plantas de frutilla (Furio *et al*., 2022a) y de petunia (Furio *et al*., 2022b). El control utilizado en estos ensayos consistió en plantas no tratadas con BRs y sin inocular con *A. argentinense* REC3 y sometidas a las condiciones de estrés salino previamente mencionadas.

Parámetros analizados en raíz y parte aérea

Después de 40 días de estrés, se midió la longitud de las raíces (cm) y los diámetros de corona (cm) con un calibre digital Wembley-5940, y se determinó el peso fresco y seco de las raíces (g) después de secarlas en un horno a 60 °C hasta peso constante. La superficie radicular se determinó mediante el método del nitrato de calcio (Carley y Watson, 1966).

En la parte aérea de las plantas, se evaluó luego de 40 días de estrés, el peso fresco y seco, el área foliar y el contenido relativo de agua en la hoja (CRA). Por su parte, se midió cada 10 días el contenido relativo de clorofila utilizando un medidor de clorofila Minolta SPAD-502 (Güler *et al*., 2006). Estos datos se expresaron como valores SPAD (valor numérico proporcional a la cantidad de clorofila en la hoja). Para determinar el área foliar se realizaron mediciones utilizando el programa ImageJ (Schneider *et al*., 2012). El contenido relativo de agua de la hoja se determinó según González y González-Vilar (2001).

Las mediciones se realizaron empleando 10 plantas por tratamiento y el experimento se llevó a cabo por triplicado.

Análisis estadístico

Se utilizó el software InfoStat (Di Rienzo *et al*., 2013) para realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos. Estos datos se obtuvieron de tres experimentos independientes y se expresaron como media ± error estándar. Se realizó la prueba de análisis de varianza unidireccional (ANOVA) y las medias se separaron mediante la prueba de Tukey para $p < 0,05$. Por su parte, para el análisis de la cantidad de hojas en función de los tratamientos se utilizó un modelo lineal generalizado con el programa R a través de InfoStat (GLMM). El número de hojas fue la variable respuesta. Se utilizó la familia Binomial negativa y la función de enlace logit. El ajuste del modelo se evaluó mediante la razón entre Deviance y gl residuales.

La prueba de comparación de medias se realizó mediante la prueba DGC (5 %) (Di Rienzo *et al*., 2002).

Resultados

Después de tratar las plantas de frutilla con BB16 o EP24, en combinación o no con *A. argentinense*, y someterlas a estrés salino, se evaluó el estado fisiológico de las plantas y se comparó con plantas control no tratadas y sometidas a estrés. Se observó un claro efecto protector por parte de todos los tratamientos empleados, ya que las plantas tratadas no mostraron efectos adversos notorios como las plantas control, que se vieron severamente afectadas. Sin embargo, las plantas tratadas con EP24 son las que evidencian una menor protección, ya que se puede apreciar un mayor deterioro en comparación con los otros tratamientos ensayados (Figura 1).

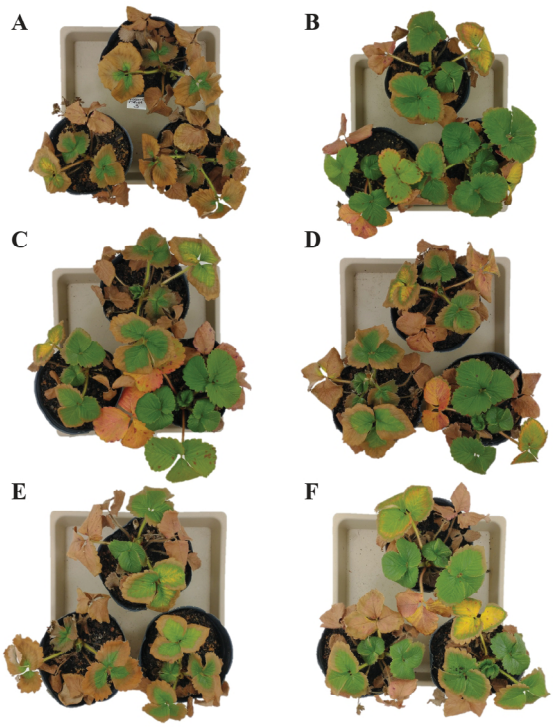

Figura 1. Aspecto de las plantas de frutilla sometidas a estrés salino después de 40 días. **(A)** Plantas control, **(B)** plantas inoculadas con *Azospirillum argentinense* REC3, **(C)** plantas tratadas con BB16, **(D)** plantas inoculadas con *A. argentinense* REC3 y luego tratadas con BB16, **(E)** plantas tratadas con EP24, y **(F)** plantas inoculadas con *A. argentinense* REC3 y luego tratadas con EP24.

Al estudiar el contenido de clorofila, las plantas tratadas mostraron una menor disminución del índice de verdor en comparación con las plantas control (F = 10,55; gl = 5; p < 0,0001). Este efecto se empieza a observar a partir del día 20 desde el inicio del estrés, haciéndose claro y notorio al finalizar el ensayo tras 40 días de estrés salino, cuando las plantas control ya presentan deterioro foliar y menor coloración verde. En relación a los distintos tratamientos realizados, se puede apreciar que la combinación con REC3 aumenta el efecto del tratamiento con EP24, observándose un mayor índice de verdor en comparación con las plantas tratadas sólo con el brasinoesteroide (Figura 2).

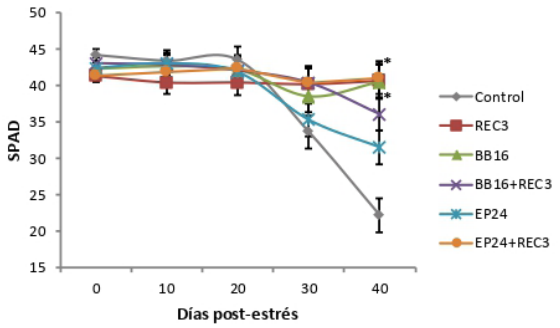

Figura 2. Cambios en el índice de verdor durante los 40 días de estrés al que fueron sometidas las plantas de frutilla, previamente tratadas con BRs y/o inoculadas con *Azospirillum argentinense* REC3. Los valores medios ± ES se obtuvieron de tres experimentos independientes (n = 10). El análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba de Tukey se realizó con el software InfoStat/L (p < 0,05). Los asteriscos indican una diferencia estadísticamente significativa entre las plantas de control y las tratadas con BRs o inoculadas con REC3.

Al evaluar parámetros de la parte área de la planta, se pudo comprobar que el peso fresco fue mayor en las plantas tratadas con BB16, EP24+REC3 y REC3, en relación a las plantas control (F = 13,74; gl = 5; p < 0,0001); mientras que el peso seco no presentó diferencias significativas en repuesta a ningún tratamiento (F = 1,77; gl = 5; p = 0,1376) (Figura 3A). No se observó diferencia significativa en cuanto al número de hojas en plantas tratadas con BRs, ya sea en combinación o no con REC3, mientras que la inoculación con REC3 dio lugar a plantas con mayor número de hojas con respecto a las plantas control (F = 5,46; gl = 5; p = 0,0008). A su vez, se observó que solo las plantas tratadas con BB16 exhibieron un área foliar mayor que las plantas control (F = 8,05; gl = 5; p < 0,0001) (Figura 3B). Al estudiar el efecto de los tratamientos, sobre el contenido relativo de agua foliar (CRA), se pudo apreciar que el CRA fue significativamente mayor con todos los tratamientos realizados, a excepción del tratamiento con EP24 en el que se observa un aumento del CRA con respecto a las plantas

control, pero que no llega a ser estadísticamente significativo (F = 5,02; gl = 5; p = 0,0013) (Figura 3C).

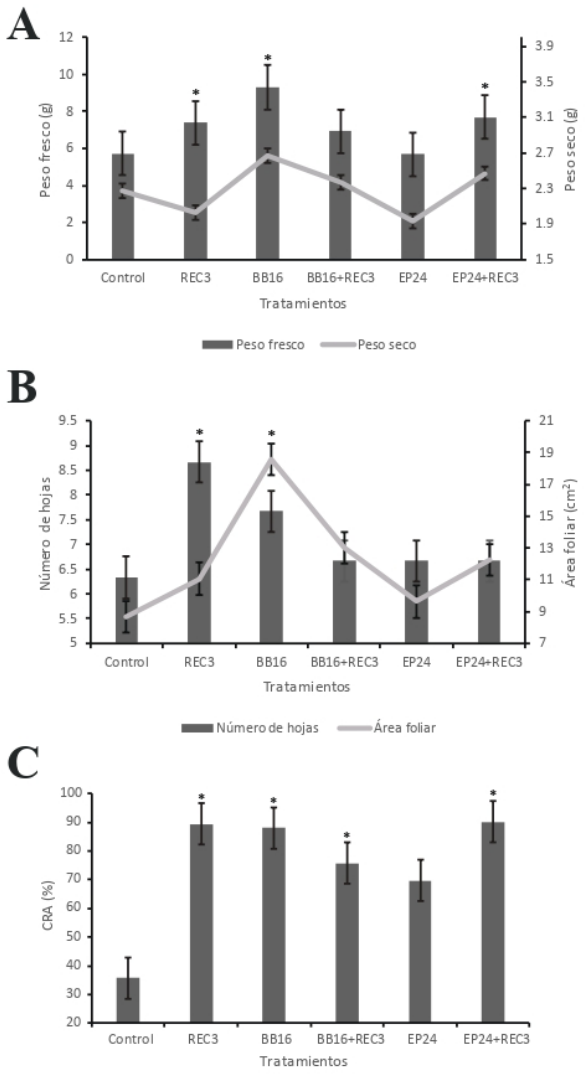

Figura 3. Peso de las plantas **(A),** número de hojas y área foliar **(B)**, y contenido relativo de agua de los foliolos (CRA) **(C)** de las plantas sometidas a estrés salino después de 40 días. Los valores medios ± ES se obtuvieron de tres experimentos independientes (n = 10). El análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba de Tukey se realizó con el software InfoStat/L (p < 0,05). Los asteriscos indican una diferencia estadísticamente significativa entre las plantas control y las tratadas con BRs o inoculadas con *Azospirillum argentinense* REC3.

Al estudiar la respuesta inducida en parámetros radiculares, se pudo apreciar que las plantas tratadas con BB16 y EP24+REC3 exhibieron un aumento del peso fresco con respecto a las plantas control (F = 3,15; gl = 5; p < 0,0155). Por su parte, todos los tratamientos, a excepción de EP24, dieron lugar a un mayor peso seco con respecto a las plantas control (F = 19,38; gl = 5; p < 0,0001) (Figura 4A). También, se pudo comprobar un aumento en la longitud radicular solamente en plantas tratadas con BB16+REC3 y con REC3 (F = 22,23; gl = 5; p < 0,0001), mientras que un aumento en el diámetro de corona pudo ser observado solamente en respuesta al tratamiento con BB16 (F = 5,07; gl = 5; p = 0,0012) (Figura 4B). Finalmente, al evaluar la superficie radicular, se pudo comprobar que todos los tratamientos analizados, a excepción de EP24, indujeron una mayor superficie radicular con respecto a plantas control (F = 8,60; gl = 5; p < 0,0001) (Figura 4C).

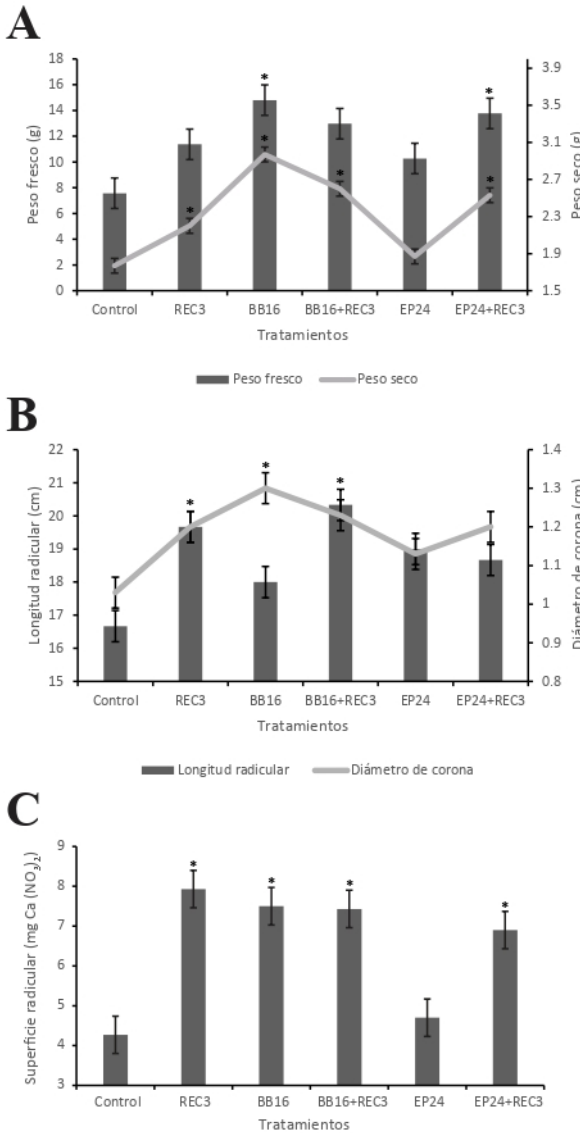

Figura 4. Efecto de los brasinoesteroides y de *Azospirillum argentinense* REC3 sobre: peso fresco y seco de la raíz **(A)**, longitud radicular y diámetro de la corona **(B)** y superficie radicular **(C)** en plantas de frutilla sometidas a estrés salino después de 40 días. Los valores medios ± ES se obtuvieron de tres experimentos independientes (n = 10). El análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba de Tukey se realizó con el software InfoStat/L (p < 0,05). Los asteriscos indican una diferencia estadísticamente significativa entre las plantas control y los tratamientos con DI31 y EP24.

Discusión

La salinidad es uno de los principales estreses abióticos que afectan la producción vegetal, siendo la frutilla una de las especies más sensibles. Esto último se debe a la acumulación de iones Na^+ y Cl^- (Barroso y Alvarez, 1997; Saied *et al*., 2005) que provoca una reducción en el número y área de las hojas, el peso seco del brote y el rendimiento (Pirlak y Esitken, 2004).

Las plantas regulan su estado fisiológico y los procesos biológicos en respuesta a diversos estímulos mediante señales activadas por hormonas específicas, tales como auxinas, giberelinas, citoquininas, ácido abscísico, etileno y BRs (Teale *et al*., 2008). Varios trabajos demostraron que la aplicación de hormonas u otros compuestos químicos en las plantas aumenta su tolerancia al estrés salino (Shahid *et al*., 2014). Entre estos compuestos, los BRs se utilizaron para conferir tolerancia contra diversos estreses, entre ellos, la salinidad (Chaudhuri *et al*., 2022).

Se sabe que el déficit hídrico provoca una reducción del contenido de agua en las plantas, lo que afecta el crecimiento, el cierre de estomas y la fotosíntesis, provocando una alteración severa del metabolismo e incluso la muerte de la planta (Jaleel *et al*., 2008). Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron efectos similares como consecuencia del estrés salino, ya que la presencia de sales en la solución del suelo ocasiona una disminución de los potenciales hídrico y osmótico, lo que lleva a que las plantas cierren sus estomas para evitar esta pérdida de agua, situación que, a su vez, provoca un aumento de radicales libres y la degradación de lípidos, proteínas y componentes celulares como la clorofila (Makale *et al*., 1999). Cuando ocurre esto último, las hojas de las plantas se vuelven amarillas (Wise y Naylor, 1987), como se observó en plantas de frutilla sometidas a estrés. Sin embargo, cuando las plantas fueron tratadas previamente, mostraron un mejor estado fisiológico de sus hojas, las cuales no presentaron una caída de su índice de verdor. En este sentido, ya se había logrado observar una reducción del contenido de clorofila en plantas de frutilla expuestas a estrés salino y se sugirió que esta reducción podía atribuirse al aumento de la actividad de la clorofilasa, una enzima que degrada la clorofila, en condiciones salinas (Reddy y Vora, 1986; Yildirim *et al*., 2009). El efecto positivo que ejercieron los distintos tratamientos en las plantas también podría deberse a un aumento de la síntesis de pigmentos fotosintéticos inducida por los BRs y por la cepa REC3 de *Azospirillum argentinense* (Bajguz, 2000; Omar *et al*., 2009). Se ha reportado que el tratamiento con EP24 indujo un aumento de la fluorescencia de la clorofila, la actividad de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa y el rendimiento cuántico máximo del fotosistema II (PS II) (Yu *et al*., 2004; Zhang *et al*., 2008).

Como se mencionó anteriormente, la salinidad reduce la capacidad de la planta para absorber agua, provocando una disminución de la turgencia celular y el potencial hídrico (Lovisolo *et al*., 2010; Meggio *et al*., 2014) que afecta el crecimiento y el área foliar (Flexas *et al*., 2002; Flexas *et al*., 2004). Este fenómeno es consistente con la reducción del área foliar observada en plantas sometidas a estrés, lográndose evitar cuando las mismas fueron tratadas con BB16. También se observó que los distintos tratamientos, a excepción del tratamiento con EP24, dieron lugar a plantas que presentaron mayor contenido relativo de agua con respecto al control. Este resultado se correlaciona con el mayor peso húmedo observado en respuesta a los tratamientos, a diferencia del peso seco que no presentó diferencias significativas, poniendo en evidencia el mayor contenido de agua que presentaron las plantas que fueron tratadas con BRs o *A. argentinense*. Estos resultados permiten comprobar claramente la importancia de los distintos tratamientos en la reducción de los efectos perjudiciales que estas condiciones de estrés tienen en la absorción de agua.

Otro efecto indeseado del estrés salino es la producción de plantas con menor peso (Kim *et al*., 2008, Zapata *et al*., 2008). En el presente trabajo observamos que plantas de frutilla expuestas a estrés salino, pero previamente tratadas con BB16, EP24+REC3 o REC3 exhibieron un mayor peso fresco tanto aéreo como radicular, en comparación con plantas control. Por su parte, el peso seco radicular fue mayor en las plantas sometidas a dichos tratamientos y también en plantas tratadas con BB16+REC3. Este efecto positivo concuerda con observaciones anteriores, como la realizada en plantas de soja, en las que se pudo comprobar que el tratamiento con BRs permitió aumentar la acumulación de biomasa y el rendimiento de semillas en plantas de soja expuestas al estrés (Zhang *et al*., 2008). Se han reportado resultados similares en arabidopsis, arroz, garbanzo y otras especies (Vardhini y Rao, 1997; Anuradha y

Rao, 2003; Ali *et al*., 2007; Hayat *et al*., 2007). Se sugirió que el efecto positivo que ejercen los BRs en plantas expuestas a una alta salinidad puede deberse a la acción de varios osmolitos que contribuirían a aumentar la tolerancia al estrés salino, entre los osmolitos compatibles que se ven significativamente incrementados en respuesta a estos compuestos podemos mencionar la prolina, glicina betaína, aminoácidos libres y sacarosa (Zeng *et al*., 2010; Shahid *et al*., 2014). Además, existe evidencia de que la inoculación con *Azospirillum* en momentos previos a situaciones de estrés salino, aumenta significativamente el peso seco de los brotes y los rendimientos cuando se emplea en plantas de trigo y tomate (Mayak *et al*., 2004; Nia *et al*., 2012; El-Akhdar *et al*., 2019). Otro aspecto importante que se pudo comprobar es que la inoculación con *A. argentinense* REC3 dio lugar a plantas con mayor número de hojas con respecto a plantas control sometidas a estrés salino. Este resultado es consiste con los reportados por varios autores, que demostraron como la inoculación con *Azospirillum* produce un incremento en muchos parámetros relacionados con el crecimiento, entre los que se encuentra el número de hojas (Omer *et al*., 2022; Santos *et al*., 2022).

Al analizar las raíces de plantas de frutilla se pudo observar que los distintos tratamientos (a excepción de EP24) dieron lugar a una mayor superficie radicular con respecto a los controles. Se conoce que el estrés salino ocasiona una reducción de la superficie radicular, que se evidencia en una disminución en la densidad, longitud y diámetro de los pelos radiculares (Robin *et al*., 2016; Arif *et al*., 2019). Por lo tanto, los tratamientos ensayados cobran vital importancia, ya que lograron revertir los efectos adversos que el estrés salino ocasiona sobre la morfología radicular. Estos resultados, a su vez, son consistentes con los resultados obtenidos por varios autores, que reportaron que la inoculación con PGPB en plantas expuestas a estrés salino, da lugar a cambios morfológicos que permiten un mayor desarrollo radicular (Niu *et al*., 2016; Orozco-Mosqueda *et al*., 2019). Podemos especular que este cambio morfo-anatómico radicular minimiza la zona de la rizósfera que sufre agotamiento hídrico, permitiendo una mayor absorción de agua y nutrientes bajo estas condiciones.

En cuanto a las diferencias observadas en plantas tratadas con uno u otro BR, podemos especular que la diferencia estructural entra ambos es la causa del comportamiento específico de cada BR. El anillo espirocetálico presente en la estructura de BB16 pero ausente en la estructura EP24 podría producir que la señalización inducida sea distinta en cada caso.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran un claro efecto protector que ambos BRs tienen sobre las plantas de frutilla frente al estrés salino. Sin embargo, al emplearse el tratamiento con BRs en combinación con *A. argentinense* REC3, se puede observar que el efecto protector de BB16 disminuye, no así el efecto de EP24 que se ve fuertemente incrementado. Se necesitan más ensayos y determinaciones para comprender los mecanismos mediante los cuales los BRs ejercen este papel protector frente a condiciones de estrés salino y poder explicar la diferencia observada entre ambos compuestos, al combinarlos con la cepa REC3 de *A. argentinense*. Dado que el estrés salino es uno de los factores más perjudiciales para el desarrollo de la actividad agrícola, estos resultados contribuyen a disminuir las pérdidas que este factor causa en la agricultura.

Agradecimientos

Este trabajo fue parcialmente financiado por subsidios otorgados por la Universidad Nacional de Tucumán (PIUNT 26 / D621), e INTA (2019-PD-E4-I069-001 y 2023-PE-I073). Los autores agradecen al Banco Activo de Germoplasma de frutilla de la Universidad Nacional de Tucumán y a la Ing. Agr. Cecilia Lemme por proporcionar las plantas.

Referencias bibliográficas

Abdel-Latef A.A.H., Abu-Alhmad M.F., Kordrostami M., Abo-Baker A.B.A.E., Zakir A. (2020). Inoculation with *Azospirillum lipoferum* or *Azotobacter chroococcum* reinforces maize growth by improving physiological activities under saline conditions. Journal of Plant Growth Regulation 39: 1293-1306. https://doi.org/10.1007/s00344-020-10065-9

Adak N., Gubbuk H., Tetik N. (2018). Yield, quality and biochemical properties of various strawberry cultivars under water stress. Journal of the Science of Food and Agriculture 98 (1): 304-311. https://doi.org/10.1002/jsfa.8471

Ali B., Hayat S., Ahmad A. (2007). 28-Homobrassinolide ameliorates the saline stress in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Journal of Experimental Botany 59: 217-223. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.12.002

Anuradha S., Rao S.S.R. (2003). Application of brassinosteroids to rice seeds (*Oryza sativa* L.) reduced the impact of salt stress on growth, prevented photosynthetic pigment loss and increased nitrate reductase activity. Plant Growth Regulation 40: 29-32. https://doi.org/10.1023/A:1023080720374

Arif M.R., Islam M.T., Robin A.H.K. (2019). Salinity stress alters root morphology and root hair traits in *Brassica napus*. Plants 8(7): 192. https://doi.org/10.3390/plants8070192

Bajguz A., Hayat S. (2009). Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. Plant Physiology and Biochemistry 47: 1-8. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.10.002

Bajguz A. (2000). Effect of brassinosteroids on nucleic acid and protein content in cultured cell of *Chlorella vulgaris*. Plant Physiology and Biochemistry 38: 209-215.https://doi.org/10.1016/S0981-9428(00)00733-6

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

Barroso M.M., Alvarez C.E. (1997). Toxicity symptoms and tolerance of strawberry to salinity in the irrigation water. Scientia Horticulturae 71: 177-188. https://doi.org/10.1016/S0304-4238(97)00082-4

Carley H.E., Watson, T.W. (1966). A new gravimetric method for estimating root-surface areas. Soil Science 102: 289-291.

Chaudhuri A., Halder K., Abdin M.Z., Majee M., Datta A. (2022). Abiotic Stress Tolerance in Plants: Brassinosteroids Navigate Competently. International Journal of Molecular Sciences 23 (23): 14577. https://doi.org/10.3390/ijms232314577

Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. (2013). InfoStat version 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL http://www.infostat.com.ar

Di Rienzo J.A., Guzmán A.W., Casanoves F. (2002). A multiple-comparisons method based on the distribution of the root node distance of a binary tree. Journal of agricultural, biological, and environmental statistics 7 (2), 129-142. https://doi.org/10.1198/10857110260141193

dos Santos Ferreira N., Coniglio A., Puente M., Sant'Anna F.H., Maroniche G., García J., Molina R., Nievas S., Gazolla-Volpiano C., Ambrosini A., Passaglia L.M.P., Pedraza R.O., Massena Reis V., Zilli J.E., Cassán F. (2022). Genome-based reclassification of *Azospirillum brasilense* Az39 as the type strain of *Azospirillum argentinense* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 72: 005475. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005475

El-Akhdar I., El-Sheekh M., Allam N.G., Kamal F., Abou-Shanab R., Staehelin C. (2019). Evaluation of salt-tolerant *Azospirillum lipoferum* and its role in improvement of wheat growth parameters. Environment, Biodiversity and Soil Security 3: 163-178. https://dx.doi.org/10.21608/jenvbs.2019.16428.1069

Flexas J., Bota J., Loreto F., Cornic G., Sharkey T.D. (2004). Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. Plant Biology 6 (3): 269-279. https://doi.org/10.1055/s-2004-820867

Flexas J., Bota J., Escalona J.M., Sampol B., Medrano H. (2002). Effects of drought on photosynthesis in grapevines under field conditions: an evaluation of stomatal and mesophyll limitations. Functional Plant Biology 29 (4): 461-471. https://doi.org/10.1071/PP01119

Furio R.N., Salazar S.M., Mariotti-Martínez J.A., Martínez-Zamora G.M., Coll Y., Díaz-Ricci J.C. (2022a). Brassinosteroid Applications Enhance the Tolerance to Abiotic Stresses, Production and Quality of Strawberry Fruits. Horticulturae 8 (7): 572. https://doi.org/10.3390/horticulturae8070572

Furio R.N., Medrano N.N., Coll Y., Pérez G.A., Díaz-Ricci J.C., Salazar S.M. (2022b). Uso de brasinoesteroides como estrategia para aumentar la tolerancia a estrés salino en plantas de petunia. Revista Agronómica del Noroeste Argentino 42 (1): 38-47.

Gillaspy G., Ben-David H., Gruissem W. (1993). Fruits: a developmental perspective. Plant Cell 5: 1439-1451. https://doi.org/10.1105/tpc.5.10.1439

González L., González-Vilar M. (2001). Determination of relative water content. In Handbook of plant ecophysiology techniques 207-212. https://doi.org/10.1007/0-306-48057-3

Güler S., Macit I., Koc A., Ibrikci H. (2006). Estimating leaf nitrogen status of strawberry by using chlorophyll meter reading. Journal of Biological Sciences 6 (6): 1011-1016.

Hayat S., Hasan S.A., Yusuf M., Hayat Q., Ahmad A. (2010). Effect of 28-homobrassinolide on photosynthesis, fluorescence and antioxidant system in the presence or absence of salinity and temperature in *Vigna radiata*. Environmental and Experimental Botany 69 (2): 105-112. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.03.004

Hayat S., Ali B., Hasan S.A., Ahmad A. (2007). Brassinosteroid enhanced the level of antioxidants under cadmium stress in *Brassica juncea*. Environmental and Experimental Botany 60: 33-41.

https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2006.06.002

Hussain S., Nanda S., Ashraf M., Siddiqui A.R., Masood S., Khaskheli M.A., Suleman M., Zhu L., Zhu C., Cao X., Kong Y., Jin Q., Zhang J. (2023). Interplay Impact of Exogenous Application of Abscisic Acid (ABA) and Brassinosteroids (BRs) in Rice Growth, Physiology, and Resistance under Sodium Chloride Stress. Life 13 (2): 498. https://doi.org/10.3390/life13020498

Jaleel C.A., Manivannan P., Lakshmanan G.M.A., Gomathinayagam M., Panneerselvam R. (2008). Alterations in morphological parameters and photosynthetic pigment responses of Catharanthus roseus under soil water deficits. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 61 (2): 298-303. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.09.008

Kagale S., Divi U.K., Krochko J.E., Keller W.A., Krishna P. (2007). Brassinosteroid confers tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* to a range of abiotic stresses. Planta 225 (2): 353-364. https://doi.org/10.1007/s00425-006-0361-6

Kim H.J., Fonseca J.M., Choi J.H., Kubota C., Kwon D.Y. (2008). Salt in irrigation water affects the nutritional and visual properties of romaine lettuce (*Lactuca sativa* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry 56: 3772-3776. https://doi.org/10.1021/jf0733719

Klamkowski K., Treder W. (2006). Morphological and physiological responses of strawberry plants to water stress. Agriculturae Conspectus Scientificus, 71(4): 159-165.

Li W., Sun J., Zhang X., Ahmad N., Hou L., Zhao C., Pan J., Tian R., Wang X., Zhao S. (2022). The mechanisms underlying salt resistance mediated by exogenous application of 24-epibrassinolide in peanut. International Journal of Molecular Sciences 23 (12): 6376. https://doi.org/10.3390/ijms23126376

Lovisolo C., Perrone I., Carra A., Ferrandino A., Flexas J., Medrano H., Schubert A. (2010). Drought-induced changes in development and function of grapevine (Vitis spp.) organs and in their hydraulic and non-hydraulic interactions at the whole-plant level: a physiological and molecular update. Functional Plant Biology 37 (2): 98-116. https://doi.org/10.1071/FP09191

Makale P., Kontturi M., Pehu E., Somersalo S. (1999). Photosynthetic response of drought and salt-stressed tomato and turnip rape plants to foliar applied glycinebetaine. Phiysiologia Plantarum 105: 45-50. https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1999.105108.x

Manghwar H., Hussain A., Ali Q., Liu F. (2022). Brassinosteroids (BRs) role in plant development and coping with different stresses. International Journal of Molecular Sciences 23 (3): 1012. https://doi.org/10.3390/ijms23031012

Mayak S., Tirosh T., Glick B.R. (2004). Plant Growth-Promoting Bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. Plant physiology and Biochemistry 42: 565-572. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2004.05.009

Meggio F., Prinsi B., Negri A.S., Simone Di Lorenzo G., Lucchini G., Pitacco A., Espen L. (2014). Biochemical and physiological responses of two grapevine rootstock genotypes to drought and salt treatments. Australian Journal of Grape and Wine Research 20 (2): 310-323. https://doi.org/10.1111/ajgw.12071

Mitchell J.W., Mandava N.B., Worley J.F., Plimmer J.R., Smith M.V. (1970). Brassins: A new family of plant hormones from rape pollen. Nature 225: 1065-1066.

Munns R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. Plant Cell and Environment 25: 239-250. https://doi.org/10.1046/j.0016-8025.2001.00808.x

Nia S.H., Zarea M.J., Rejali F., Varma A. (2012). Yield and yield components of wheat as affected by salinity and inoculation with *Azospirillum* strains from saline or non-saline soil. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences 11 (2): 113-121. https://doi.org/10.1016/j.jssas.2012.02.001

Niu S.Q., Li H.R., Paré P.W., Aziz M., Wang S.M., Shi H., Li J., Han Q.Q., Guo S.Q., Li J.; Guo Q., Ma Q., Zhang J.L. (2016). Induced growth promotion and higher salt tolerance in the halophyte grass *Puccinellia tenuiflora* by beneficial rhizobacteria. Plant Soil 407: 217-230. https://doi.org/10.1007/s11104-015-2767-z

Nuñez M., Mazzafera P., Mazorra L.M., Siqueira W.J., Zullo M.A.T. (2003). Influence of brassinosteroid analogue on antioxidant enzymes in rice grown in culture medium with NaCl. Biologia Plantarum 47: 67-70. https://doi.org/10.1023/A:1027380831429

Omar, M.N.A., Osman, M.E.H., Kasim, W.A., Abd El-Daim, I.A. (2009). Improvement of Salt Tolerance Mechanisms of Barley Cultivated Under Salt Stress Using *Azospirillum brasilense*. In: Ashraf, M., Ozturk, M., Athar, H. (eds) Salinity and Water Stress. Tasks for Vegetation Sciences, vol 44. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9065-3_15

Omer A.M., Osman M.S., Badawy A.A. (2022). Inoculation with *Azospirillum brasilense* and/or *Pseudomonas geniculata* reinforces flax (*Linum usitatissimum*) growth by improving physiological activities under saline soil conditions. Botanical Studies 63 (1): 15. https://doi.org/10.1186/s40529-022-00345-w

Orozco-Mosqueda M.D.C., Duan J., Di Bernardo M., Zetter E., Campos-García J., Glick B.R., Santoyo G. (2019). The production of ACC deaminase and trehalose by the plant growth promoting bacterium *Pseudomonas* sp. UW4 synergistically protect tomato plants against salt stress. Frontiers in microbiology 10: 1392. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01392

Özdemir F., Bor M., Demiral T., Türkan İ. (2004). Effects of 24-epibrassinolide on seed germination, seedling growth, lipid peroxidation, proline content and antioxidative system of rice (Oryza sativa L.) under salinity stress. Plant Growth Regulation 42 (3): 203-211. https://doi.org/10.1023/B:GROW.0000026509.25995.13

Pedraza R.O., Motok J., Salazar S.M., Ragout A.L., Mentel M.I., Tortora M.L., Guerrero-Molina M.F., Winik B.C., Díaz-Ricci, J.C. (2010). Growth-promotion of strawberry plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 26: 265-272. https://doi.org/10.1007/s11274-009-0169-1

Pedraza R.O., Motok J., Tortora M.L., Salazar S.M., Díaz-Ricci J.C. (2007). Natural occurrence of *Azospirillum brasilense* in strawberry plants. Plant and Soil 295: 169-178. https://doi.org/10.1007/s11104-007-9273-x

Pirlak L., Esitken A. (2004). Salinity effects on growth, proline and ion accumulation in strawberry plants. Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil and Plant Science 54: 189-192. https://doi.org/10.1080/0906471040030249

Reddy M.P., Vora A.B. (1986). Changes in pigment composition, Hill reaction activity and saccharide metabolism in bajra (*Pennisetum typhoides* S&H) leaves under NaCl salinity. Photosynthetica 20: 50-55.

Robin A.H.K., Matthew C., Uddin M.J., Bayazid K.N. (2016). Salinity-induced reduction in root surface area and changes in major root and shoot traits at the phytomer level in wheat. Journal of Experimental Botany 67 (12): 3719-3729. https://doi.org/10.1093/jxb/erw064

Saied A.S., Keutgen A.J., Noga G. (2005). The influence of NaCl salinity on growth, yield and fruit quality of strawberry cvs 'Elsanta' and 'Korona'. Scientia Horticulturae 103: 289-303. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2004.06.015

Santos M.P., Martínez S.J., Yarte M.E., Carletti S.M., Larraburu E.E. (2022). Effect of *Azospirillum brasilense* on the in vitro germination of *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Schinn.(Gentianaceae). Scientia Horticulturae 299: 111041. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111041

Schneider C.A., Rasband W.S., Eliceiri K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis Nature Methods 9 (7): 671-675. https://doi.org/10.1038/nmeth.2089

Serna M., Coll Y., Zapata P.J., Botella M.A., Pretel M.T., Amorós A.A. (2015). Brassinosteroid analogue prevented the effect of salt stress on ethylene synthesis and polyamines in lettuce plants. Scientia Horticulturae 185: 105-112. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.01.005

Shahid M.A., Balal R.M., Pervez M.A., Garcia-Sanchez F., Gimeno V., Abbas T., Scott-Mattson N., Riaz A. (2014). Treatment with 24-epibrassinolide mitigates NaCl-induced toxicity by enhancing carbohydrate metabolism, osmolyte accumulation, and antioxidant activity in Pisum sativum. Turkish Journal of botany 38: 511-525. https://doi.org/doi:10.3906/bot-1304-45

Stepien P., Klobus G. (2006). Water relations and photosynthesis in *Cucumis sativus* L. leaves under salt stress. Biologia Plantarum 50: 610-616. https://doi.org/10.1007/s10535-006-0096-z

Talon M., Zeevaart J.A., Gage D.A. (1991). Identification of gibberellins in spinach and effects of light and darkness on their levels. Plant physiology 97 (4): 1521-1526. https://doi.org/10.1104/pp.97.4.1521

Teale W.D., Ditengou F.A., Dovzhenko A.D., Li X., Molendijk A.M., Ruperti B., Paponov I., Palme K. (2008). Auxin as a model for the integration of hormonal signal processing and transduction. Molecular Plant 1: 229-237. https://doi.org/10.1093/mp/ssn006

Undurraga P., Vargas S. (2013). Manual de Frutilla

Vardhini S.V., Rao S.S.R. (1997). Effect of brassinosteroids on salinity induced growth inhibition of groundnut seedlings. Indian Society of Plant Physiology 2: 156-157.

Viejobueno J., Albornoz P.L., Camacho M., de los Santos B., Martínez-Zamora M.G., Salazar S.M. (2021). Protection of strawberry plants against charcoal rot disease (*Macrophomina phaseolina*) induced by *Azospirillum brasilense*. Agronomy 11 (2): 195. https://doi.org/10.3390/agronomy11020195

Wise R.R., Naylor A.W. (1987). Chilling-enhanced photooxidation: evidence for the role of singlet oxygen and Superoxide in the Breakdown of Pigments and endogenous antioxidant. Plant Physiology 83: 278-282. https://doi.org/10.1104/pp.83.2.278

Yildirim E., Karlidag H., Turan, M. (2009). Mitigation of salt stress in strawberry by foliar K, Ca and Mg nutrient supply. Plant Soil and Environment 55: 213-221. https://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/07200.pdf

Yu J.Q., Huang L.F., Hu W.H., Zhou Y.H., Mao W.H., Ye S.F., Nogues S. (2004). A role for brassinosteroids in regulation of photosynthesis in *Cucumis sativus*. Journal of Experimental Botany 55: 1135-1143. https://doi.org/10.1093/jxb/erh124

Zahedi S.M., Hosseini M.S., Fahadi Hoveizeh N., Kadkhodaei S., Vaculík M. (2023). Physiological and Biochemical Responses of Commercial Strawberry Cultivars under Optimal and Drought Stress Conditions. Plants 12 (3): 496. https://doi.org/10.3390/plants12030496

Zapata P.J., Serrano M., Petrel M.T., Botella M.A. (2008). Changes in free polyamine concentration induced by salt stress in seedling of different species. Plant Growth Regulation 56: 167-177. https://doi.

org/10.1007/s10725-008-9298-z

Zeevaart J.A., Gage D.A. (1993). ent-Kaurene biosynthesis is enhanced by long photoperiods in the long-day plants *Spinacia oleracea* L. and *Agrostemma githago* L. Plant Physiology 101 (1): 25-29. https://doi.org/10.1104/pp.101.1.25

Zeng H., Tang Q., Hua X. (2010). Arabidopsis brassinosteroid mutants *det2-1* and *bin2-1* display altered salt tolerance. Journal of Plant Growth Regulation 29: 44-52. https://doi.org/10.1007/s00344-009-9111-x

Zhang M., Zhai Z., Tian X., Duan L., Li Z. (2008). Brassinolide alleviated the adverse effect of water deficits on photosynthesis and the antioxidant of soybean (*Glycine max* L.). Plant growth regulation 56 (3): 257-264. https://doi.org/10.1007/s10725-008-9305-4