

Universidad Nacional de Córdoba

Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Carrera de Ciencias Biológicas

Simbiosis en *Prosopis alba* como estrategia para la mejora de su tolerancia a estrés hídrico

Estudiante: Ezequiel Francisco Pozzi Tay

Director: Mariana Melchiorre

Codirector: Hernán Ramiro Lascano

Lugar: Córdoba, Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos Vegetales (IFRGV) del Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP)- INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria)

Fecha: Agosto 2016

Simbiosis en *Prosopis alba* como estrategia para la mejora de su tolerancia a estrés hídrico

Tribunal Examinador:

- Nombre y Apellido: Firma:
- Nombre y Apellido: Firma:
- Nombre y Apellido: Firma:
- Calificación:
- Fecha:.....

Introducción

La conversión de ambientes naturales en paisajes agrícolas, y en última instancia en tierras degradadas, es el impacto humano de mayor importancia sobre el medio natural, lo que representa una gran amenaza para la biodiversidad (Dobson, 1997). Argentina en particular, y América del Sur en general no es la excepción. Hacia fines del siglo veinte la tasa de pérdida anual de bosques fue de 2,2% en la región del Chaco, una de las más altas de deforestación registradas en la historia, debida a la expansión de la frontera agrícola principalmente para producción de maíz y soja (Zack et al. 2004). La expansión del modelo agroindustrial, reemplazando pasturas perennes y pastizales naturales por cultivos anuales, trae aparejado numerosos procesos negativos, que afectan no solo a la producción agrícola, sino también al desarrollo urbano, entre ellos el ascenso de la napa freática produciendo anegamientos e inundaciones, pérdida de fertilidad de los suelos e incremento de la erosión (Betram, 2014).

Prosopis alba (Griseb.) es una especie arbórea de la familia Fabaceae de gran importancia regional debido a la gran diversidad de usos tanto madereros como alimenticios, forrajeros y medicinales (Demaio, 2015). El género *Prosopis* se distribuye en gran parte del Chaco Semiárido y Húmedo, encontrándose en Argentina, Bolivia, Chile, Paraguay, Perú y Uruguay, donde las precipitaciones van desde los 500mm anuales en el sudoeste a los 1300mm anuales en el extremo oriental de la región (Burkart et al., 1999; Demaio, 2015). Es a su vez una especie apta para forestación en suelos salinos y con presencia de napa freática alta (Navall y Senillani, 2004), de modo que resulta importante entender las condiciones de producción de esta especie a fin de favorecer su utilización ya sea para restauración ambiental de áreas degradadas o en sistemas sustentables de producción forestal. Cabe mencionar que aun cuando posee gran capacidad de adaptación a condiciones ambientales restrictivas, una de las limitantes principales para la reforestación con *Prosopis*, es la capacidad de supervivencia y crecimiento inicial de los plantines llevados a campo, sobre todo cuando la implantación se realiza en áreas caracterizadas por la escasez de lluvia y temperaturas elevadas (Gupta, 1995).

La taxonomía convencional fundada en descriptores morfológicos, asociadas a caracterizaciones basadas en ensayos en sitios, junto con taxonomía numérica y marcadores moleculares han contribuido al ordenamiento del complejo algarrobo a nivel de ecotipo o subespecies, permitiendo diferenciar grupos morfológicos con adaptaciones particulares dentro del complejo (Verga et al., 2009). En este sentido, han sido diferenciados por características morfológicas dos morfotipos, que incluso podrían proponerse como dos subespecies (Verga, comunicación personal), el de origen Campo Duran que corresponde a la región Salta norte, cuya distribución continuaría hasta Bolivia, correspondiente a la región del Parque chaqueño en Salta y el de origen Santiagueño en Santiago del Estero. Si bien ambos orígenes se distribuyen en la región fitogeográfica del Chaco semiárido, el origen Campo Duran se ubica en un ecotono con las yungas donde las precipitaciones anuales son mayores, respecto de los de origen Santiago del Estero. Esto podría ser una de las razones que expliquen su comportamiento diferencial, frente a estrés abiótico (López Lauenstein et al., 2013). *P. alba* posee la habilidad de desarrollar un sistema radical profundo, lo cual potencia

su sobrevivencia y productividad en regiones marginales, donde la ocurrencia de eventos de restricciones hídricas y estrés salino son habituales (Acosta et al. 1994).

Como representante de la familia *Fabaceae*, *P. alba* puede establecer relaciones simbióticas con diferentes géneros de rizobacterias (Iglesias, 2007) formando nódulos de tipo indeterminado, en los cuales ocurre la fijación biológica del nitrógeno atmosférico (N_2).

En nuestro país, una nueva especie, *Mesorhizobium chacoense*, fue aislada de nódulos de *P. alba* de la región de Chancaní en Córdoba (Velázquez et al., 2001) y posteriormente Chávez Díaz et al. en 2013, identificaron por secuenciación de 16S rDNA, que rizobios obtenidos de muestras de suelo de algarrobales de cinco localidades del Chaco Árido, Semiárido y Húmedo de la región del Parque Chaqueño Argentino y pertenecientes a los géneros *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Sinorhizobium* fueron capaces de asociarse simbióticamente con *P. alba*. Estas rizobacterias no sólo fueron capaces de nodular *P. alba*, sino que además en algunos casos, estimularon el crecimiento de los plantines en condiciones de invernadero (Chávez Díaz et al. 2013).

El establecimiento de la simbiosis es un proceso altamente interactivo que incluye comunicación molecular entre los organismos de vida libre y requiere de varios pasos recíprocos de reconocimiento que implican el intercambio de moléculas señales entre los socios compatibles y la organización de un complejo programa de desarrollo, que lleva a la formación de nódulos en la raíz y a la diferenciación de los rizobios en bacteroides fijadores de N_2 en el interior de las células del nódulo. Durante el establecimiento de la simbiosis, se activan en las plantas respuestas de inmunidad, luego de la percepción de moléculas que provienen de los microorganismos con los que interacciona, sean patogénicos o beneficiosos, que se conocen como MAMP (microbe-associated molecular patterns) (Zamioudis y Pieterse, 2012). La activación de ciertos componentes de estas vías de señalización es parcialmente convergente con los inducidos por otros microorganismos no patogénicos con actividad promotora del crecimiento de plantas (PGPR) y con patógenos (Soto et al. 2006). Marulanda et al. (2009) demostraron que la actividad microbiana en la rizósfera genera efectos positivos en el desarrollo vegetal bajo condiciones de sequía.

Planteado este marco teórico, surge como pregunta en este proyecto: ¿Tiene la inoculación de plántulas de *P. alba* con rizobacterias nativas efecto en las respuestas frente a condiciones de estrés hídrico? ¿Existe efecto diferencial en las respuestas frente a estrés hídrico en distintos morfotipos de *P. alba*?

Objetivo general

Evaluar el efecto de la inoculación con rizobacterias nativas específicas en *Prosopis alba*, de distintas regiones de origen frente a condiciones de estrés hídrico.

Objetivos específicos

- 1- Determinar el efecto del estrés hídrico sobre el crecimiento de plántulas de *P. alba* de diferentes orígenes no inoculadas e inoculadas con rizobacterias nativas mediante la evaluación de variables morfo-métricas, fisiológicas y bioquímicas
- 2- Evaluar si existen respuestas sistémicas en *P. alba* inducidas por la inoculación con rizobacterias nativas que pueden relacionarse con tolerancia a condiciones de estrés hídrico en *P. alba* de distintos orígenes.

Metodología

Material vegetal:

Se utilizaron semillas de *P. alba* de dos rodales ubicados en:

1. Santiago del Estero (27°52'44"S, 64° 9'16"O). Esta población de algarrobos se ubica a 15 km al sudeste de la ciudad de Santiago del Estero a orillas del Río Dulce, donde la temperatura media anual es de 20.7°C y las precipitaciones medias de 579mm.
2. Campo Durán (22°12'01"S, 63°40'33"O) al norte de la provincia de Salta donde la temperatura media es de 21.9°C y las precipitaciones medias de 1054mm.

Preparación de los inóculos:

Para la preparación de los inóculos se utilizaron tres aislamientos obtenidos por Chávez Díaz et al., 2013 de muestras de suelo de las localidades Bolsa Palomo (BP), 24°13'15"S, 61°57'42" O en la provincia de Formosa, y Padre lozano (PL) 23°12'51" S, 63°50'39" O, en Salta. Estas localidades pertenecen al Chaco Semiárido. Los aislamientos se obtuvieron empleando plantas trampa de *P. alba*. Los aislamientos se mantuvieron conservados a -80°C. Estos aislamientos fueron caracterizados a nivel de género por Chávez Díaz et al. (2013) como *Mesorhizobium* spp. (Aislamiento Bolsa Palomo 2), *Bradyrhizobium* spp. (Aislamiento Padre Lozano 53) y *Sinorhizobium* spp. (aislamiento Bolsa Palomo 63). Cada aislamiento fue inoculado de modo individual en un tubo con 3 mL de medio YEM (Vincent, 1970) líquido y cultivado durante tres días a 28°C en agitador rotatorio a 200 rpm y posteriormente se transfirió a un Erlenmeyer con 50 mL de YEM líquido para crecimiento tres días más en iguales condiciones. Las células fueron colectadas por centrifugación durante 15 minutos a 4°C a 7741 x g (8000 rpm, Sorvall, JA20), se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en agua destilada. La cantidad de células de cada aislamiento se determinó mediante espectrofotometría a 600 nm considerando que un valor de 1 DO equivale a 1×10^9 células/mL. El inoculante se conformó con la mezcla de igual título de cada uno de los aislamientos a $4,57 \times 10^8$ células/ml. Para la inoculación de cada semilla de *P. alba*, se usaron 350 µL ($1,6 \times 10^8$ células).

Siembra, tratamientos de estrés e inoculación:

Semillas de *P. alba* de origen Santiago y Campo Durán (150 semillas de cada procedencia) se escarificaron con lija fina (100 g/cm²) y se desinfectaron por inmersión durante 15 minutos en

una solución de hipoclorito de sodio comercial (NaOCl) al 10% (v/v) (55 g/L de cloro activo). Se enjuagaron tres veces con agua destilada y se incubaron durante 16 h en heladera a 4-5 °C en presencia de una fina película de agua, a fin de hidratar las semillas y sincronizar la germinación.

Las semillas se sembraron en tubos forestales R400 de 400 cm³ de volumen, (Dassplastic Mercosur) conteniendo vermiculita de granulometría media, sustrato elegido a partir de ensayos previos en tierra que no presentaron nodulación, haciéndonos suponer una inhibición de la nodulación por altas concentraciones de nitrógeno. El peso del envase lleno se estandarizó a 80 g y se lo definió como peso seco (PS), posteriormente la vermiculita se regó a saturación con agua destilada y una vez escurrido el exceso se sembró una semilla por envase a 1 cm de profundidad. La mitad de los tubos fueron inoculados con 350 µL del inóculo mixto de rizobacterias ($1,6 \times 10^8$ células/semilla) (Tratamiento inoculado). Se realizó una reinoculación el día 21 desde la siembra aplicando en la corona de cada planta 350 µL de inoculante mixto ($6,48 \times 10^7$ células/plántula).

Desde la siembra y durante el período de crecimiento (45 días) se hicieron dos riegos semanales de 80 mL, alternando agua destilada con medio B y D (Broughton y Dilworth, 1971) para mantener el sustrato saturado. La preparación del medio B y D se hizo con una concentración de NH_4NO_3 de 2,5mM. Este valor se obtuvo de un ensayo previo que permitió determinar aquellas concentraciones de nitrógeno que permitieran sostener un desarrollo normal en plantas no inoculadas, como así también, un crecimiento comparable en plantas inoculadas sin inhibir la nodulación previo a la imposición del estrés.

El día 45 se realizó el último riego a saturación dejando escurrir el exceso durante 15 minutos y se registró el peso de cada tubo para obtener el valor del peso a capacidad de campo (PCC).

De la diferencia entre el PCC-PS se obtiene la cantidad máxima de agua contenida en cada tubo o capacidad de campo del tubo. Se mantiene el mismo modo de riego en los tratamientos de las plantas control (Tratamientos control inoculado y control no inoculado). En el tratamiento de sequía los tubos se pesaron dos veces por semana a fin de reducir progresivamente el contenido de agua de los tubos, reponiendo la cantidad de agua necesaria para ajustar inicialmente a 70%, luego 40% y finalmente a 30% del contenido de agua a capacidad de campo (CACC). La superficie de los tubos de los tratamientos sequía fue protegida con una bolsa de polietileno a fin de evitar la pérdida de agua por evaporación superficial. Cuando se alcanzó el 30% de agua respecto de CACC (día 64 desde la siembra) se considera el inicio del tratamiento de estrés que se mantuvo durante 42 días, mediante el riego cada tres días reponiendo alternadamente la cantidad de agua o ByD.

El ensayo se instaló en condiciones de invernadero con un fotoperiodo de 16 h de luz ($161,45 \mu\text{moles}/\text{cm}^2.\text{seg}$) y 8 de oscuridad con una temperatura promedio de 23,5°C.

Parámetros de crecimiento:

a-Variables no destructivas

Durante el experimento, cada planta fue identificada y seguida de modo individual a lo largo del tratamiento.

Desde el día del inicio del tratamiento de estrés, se midió semanalmente: altura de las plantas desde el cuello de raíz hasta el último nudo con hojas completamente expandidas, cantidad de nudos desde el cuello de raíz hasta el último nudo con hojas completamente expandidas inclusive, diámetro del tallo al borde del tubete con un calibre digital.

El rendimiento cuántico del PSII (PSII) indica la proporción de energía absorbida por el PSII que es utilizada en el transporte fotosintético de electrones y suele ser directamente proporcional a la tasa de fijación de CO₂ (Bilger y Björkman, 1990) bajo condiciones ambientales (200 μmol. m⁻².s⁻¹, 25 °C) Estas variables fueron medidas usando sistema de fluorescencia modulada (FMS2, Hansatech Instrumentos, Pentney King's Lynn, U.K.).

Al finalizar el período de estrés y previo a la toma de muestras destructivas se contó el número de nudos que conservaron las hojas (ya que muchas se pierden en condiciones de estrés hídrico).

b-Variables destructivas

Al finalizar el periodo de 42 días desde el inicio del estrés, de cada planta se extrajeron tres hojas a las que se les registró el peso fresco (PF) y se conservaron a -40 °C para realizar determinaciones bioquímicas. El resto de la plantas fue cosechada, se registró PF, y se puso a secar en estufa a 72 °C para obtener el peso seco (PS), manteniendo por separado la biomasa aérea y radicular. De las raíces provenientes de tratamientos inoculados, se extrajeron los nódulos, se registró el PF y fueron puestos a secar para determinar PS.

Contenido relativo de agua (CRA)

El contenido relativo de agua (CRA) de una hoja individual, fue medido de acuerdo a Ritchie et al., (1990). Brevemente, se registró el PF de una hoja inmediatamente extraída de la planta, se la sumergió en un tubo conteniendo 5mL de agua destilada con 0.05% V/V de Tween 20, a fin de disminuir la tensión superficial y se la incubó 16h a 4°C, luego de lo cual se secó con papel absorbente el exceso de agua sobre la superficie y se registró el peso saturado (PS). A posteriori se la incubó en estufa a 72°C para obtener el valor de PS. El CRA se calculó según la siguiente ecuación.

$$RWC = \frac{FW - DW}{SW - DW}$$

Permeabilidad de membrana.

Una hoja fue incubada en 5 ml de agua destilada durante 20 h y la conductividad eléctrica de la solución debido a la lixiviación a través de la membrana fue determinada usando un conductímetro mutile (Analizador automático de semillas SAD-9000-S). Las muestras fueron llevadas a ebullición en la misma solución de lixiviación a 100°C durante 10 min, y una vez enfriadas se determinó la conductividad total de la solución. La diferencia en $\mu\text{S}/\text{cm}$ de hoja entre el valor final y el inicial representa el nivel de integridad de las membranas de las hojas.

Contenido de clorofilas

Hojas enteras de peso fresco conocido se homogenizaron con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino en presencia de PVPP (polivinil polipirrolidona), que se suspendió en 1 o 1,5ml de etanol 96° al 80% V/V (manteniendo aproximadamente una relación 1:10 P:V).

El extracto se centrifugó 15 min a 12000xg a 4 °C (se separaron 100 μL del sobrenadante para determinación de FRAP) y el pellet con el resto del extracto se mezcló nuevamente usando un vortex, se incubó 30 minutos a 80°C y una vez frío se centrifugó 10 min. a 12000xg a 25°C.

El contenido de clorofilas se determinó según Wintermans y De Mots (1965) por lectura de la absorbancia a 654nm en espectrofotómetro. Dependiendo de la intensidad de color de las muestras se realizaron diluciones 1:3 o 1:4 usando de etanol 96° al 80%.

El contenido de clorofila se calculó como sigue:

$$\text{Clorofilas a+b } \mu\text{g}/\text{mg} = \frac{(1000 * A_{654} * \text{volumen de EtOH extracción ml})}{39,8 \mu\text{g}/\text{ml} * \text{peso fresco mg}}$$

FRAP

La capacidad antioxidante se estimó a través de la reducción de iones férricos a ferrosos y la formación del complejo coloreado de hierro-tripiridyltriazina en pH ácido y la evaluación de cambios en la absorbancia a 600nm en comparación con una solución que contiene iones de Fe de concentración conocida (Trolox) (Benzie y Strain, 1996).

A cien (100) μL del extracto alcohólico (polvo de hojas homogenizado en N_2 líquido y suspendido en etanol 80% V/V) se le adicionaron 100 μL de etanol 96° al 80% V/V. De esa dilución se emplearon 30 μL de extracto que se incubaron durante 30 min a 25°C con 270 μL de una mix que contenía (300mM de buffer acetato pH 3,6; 10mM de TPTZ disuelto en 40mM HCl y 200mM de FeCl_3). Las determinaciones de FRAP se realizaron por lectura de la absorbancia a 600nm usando lector de placas de ELISA Labysystem en 300 μL de volumen final por duplicado. Las absorbancias se compararon contra una curva patrón entre 0 y 15nmoles de Trolox (se usó una sol madre de Trolox de 250 μM) Benzie y Strain (1996).

MDA

Para la determinación de los lípidos peroxidados, mediante la formación de malón dialdehído en ácido tio-barbitúrico (Heath yPacker, 1968) la mezcla de reacción estuvo compuesta por 300 μL del extracto alcohólico (polvo de hojas homogenizado en N_2 líquido y suspendido en etanol 80% V/V) que se mezclaron con 300 μL de mix conteniendo 0.5% TBA y 20% TCA. Se incubaron 20 min a 92°C, luego se enfriaron en hielo y se centrifugaron 10 min a 12000xg a 25°C. El contenido de MDA se determinó por lectura de la diferencia de absorbancias entre 540 y 600nm usando lector de placas de ELISA Labysystem en 300 μl de volumen final x duplicado. El contenido de MDA se calculó usando un coeficiente de extinción molar de 155mM.cm⁻¹.

$$\text{MDA } \mu\text{g/mg} = \frac{(\text{DO532}-\text{DO600}) * 2 * \text{vol.}(\mu\text{L})}{155\text{mM.cm}^{-1} * \text{Peso fresco en el vol. usado}}$$

Contenido de Prolina

Hojas enteras de peso fresco conocido, se incubaron en agua destilada durante 30 minutos en baño a 100°C. Se usaron entre 700 y 1500 μL para mantener aproximadamente una relación 1:10 P:V. Una vez frías, las muestras se centrifugaron a 12000xg durante 20 minutos. El sobrenadante (150 μL) se incubó durante 20 minutos en baño a 80°C con 1mL de reactivo de ninhidrina (0.5g de ninhidrina, 30mL de ácido acético glacial y 20mL de agua destilada), protegido de la luz. Una vez enfriada, se adicionó a esa mezcla 1mL de tolueno, se agitó en vortex a fin de separar la fase acuosa (superficial) de la orgánica. La fase acuosa se empleó para determinar la absorbancia a 520nm de la fase superior y se comparó con una curva patrón de entre 5 y 20 μM de prolina, (Troll y Lindsley 1954)

Diseño experimental y análisis de datos

Las plantas se dispusieron según un diseño de bloque, considerando cada planta (27 individuos) como una repetición.

Los datos se analizaron considerando la condición (control/sequía) como parcela principal, la inoculación (inoculado/no inoculado) como sub-parcela y el origen de las semillas (Santiago/Campo Duran) como sub-sub parcela.

Las plantas se dispusieron según el siguiente esquema:

Control		
	Inoculado	No Inoculado
Santiago		

Sequía		
	Inoculado	No Inoculado
Santiago		

Campo Durán			Campo Durán		
-------------	--	--	-------------	--	--

Para el análisis de la varianza y test de comparación de medias se usó el software Infostat (Di Rienzo et al. 2016). Para el caso en que los datos de la variable tuvieron distribución normal (ej. peso, altura etc.), se emplearon modelos lineales generales (MLG), mientras que para las variables cuya distribución no fue normal (ej. Número de nódulos, número de nudos con hojas etc.) se usaron modelos lineales generalizados (MLGI) de Infostat.

Resultados

Con los datos obtenidos del ensayo de plantas de *P. alba*, de orígenes Santiago del Estero y Campo Durán, inoculadas y no inoculadas con una mezcla de rizobacterias específicas y sometidas a condiciones de estrés hídrico, se realizó un análisis de componentes principales a fin de obtener un primer enfoque global acerca de las relaciones entre las variables relevadas respecto de los tratamientos aplicados, de modo que orientara los análisis posteriores. La componente principal 1 (CP1) explicó el 27,5% de la variabilidad observada, mientras que la componente principal 2 (CP2) el 15, 2%. Sobre la CP1 se separaron, como podría esperarse, los ejemplares sometidos a estrés respecto de los controles. Sobre la CP2 se diferencian los individuos inoculados de los no inoculados. Las variables que mayoritariamente explican la distribución sobre la CP1 son el peso seco aéreo y de raíces, diámetro, altura final, proporción de hojas conservadas y porcentaje de crecimiento durante el período de estrés, este último se calculó como la proporción de incremento de la altura total respecto de la altura al inicio del estrés (altura final sobre altura inicial). Sobre la CP2 se separan los individuos inoculados de los no inoculados. Sobre esta CP2, la variabilidad observada, está mayoritariamente explicada por el número y peso seco de nódulos, y en menor medida por la eficiencia del fotosistema II. Otras dos variables asociadas a la inoculación son el contenido de clorofilas y de antioxidantes FRAP). En un análisis preliminar del comportamiento de la variabilidad en los diferentes tratamientos, no fue posible discriminar los genotipos estudiados, por lo cual, a fin de facilitar su lectura, los individuos incluidos en el gráfico no han sido identificados de acuerdo a su origen. (Figura 1)

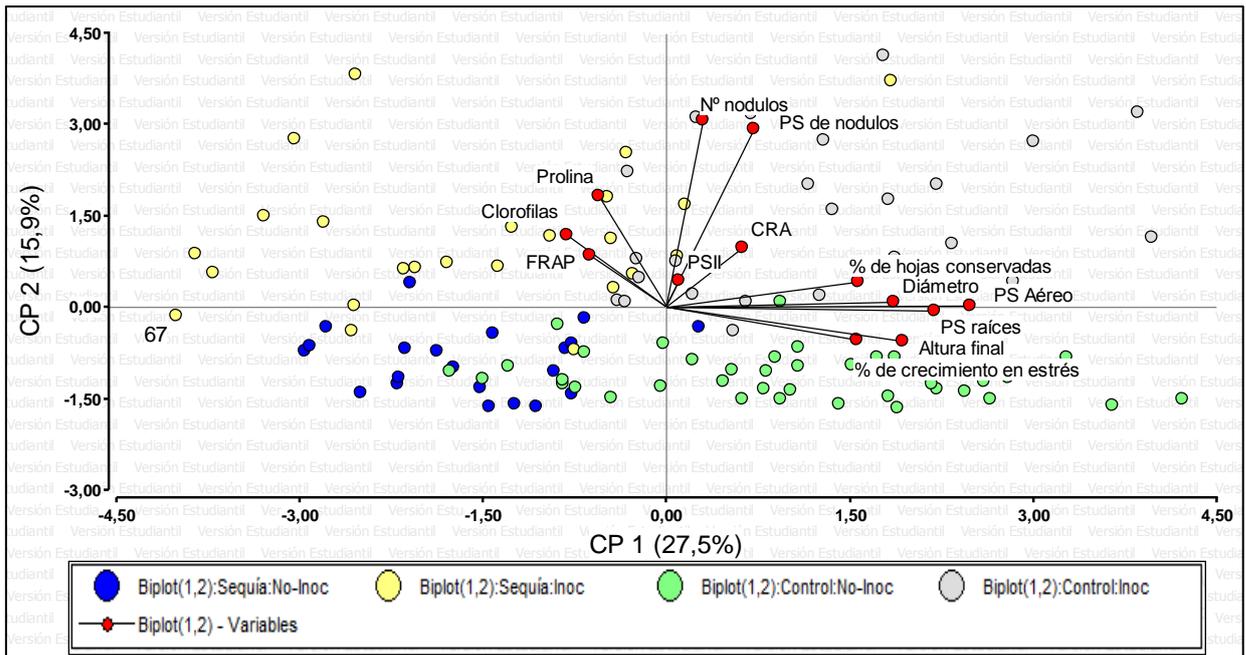


Figura 1: Análisis de componentes principales de variables determinadas en tratamientos de *P. alba* de dos orígenes sometidas a condiciones de estrés hídrico e inoculadas.

Peso seco aéreo

El peso seco aéreo de las plantas mostró diferencias significativas (p -valor $< 0,0001$) entre los tratamientos control y sequía, donde se observó una reducción del 64% en el peso seco de plantas sometidas a sequía mostrando una evidencia clara de la severidad que representó esta condición. No obstante, no se observaron diferencias respecto de los orígenes evaluados ni efecto de la inoculación. (Figura 2).

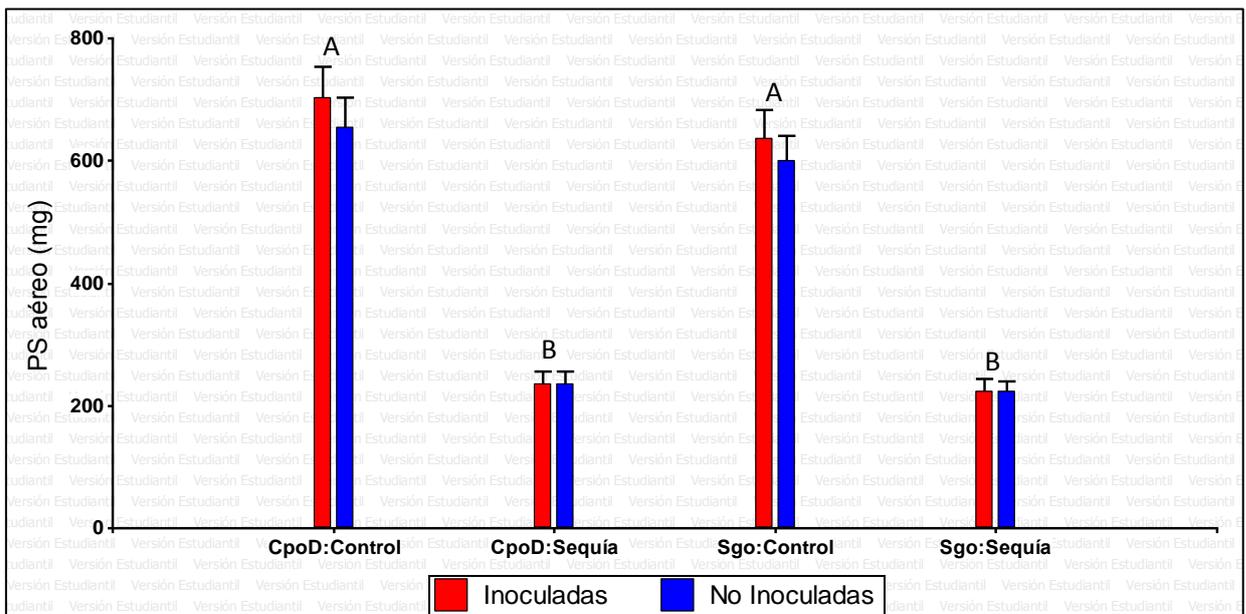


Figura 2: Peso seco aéreo de plantas de *P. alba* de orígenes Campo Durán y Santiago

sometidas a estrés hídrico e inoculadas. Letras diferentes indican diferencias significativas (p -valor $< 0,05$).

Sin embargo respecto de este último parámetro, se encontró que en plantas inoculadas el peso seco aéreo está correlacionado positivamente con el peso seco de nódulos, siendo el coeficiente de correlación de Pearson 0,69 (p -valor $< 0,0001$) (Tabla 1) Esta relación se mantiene tanto en plantas de ambos orígenes, como en condiciones de sequía y control, que podría sugerir un mecanismo de promoción del crecimiento vegetal modulado por el tamaño y grado de desarrollo del nódulo radical. (Figura 3)

Correlación de Pearson

Variable(1)	Variable(2)	n	Pearson	p-valor
PS Aereo (mg)	PS nodulos	100	0,69	$<0,0001$

Tabla 1: Correlación de Pearson entre peso seco aéreo y peso seco de nódulos

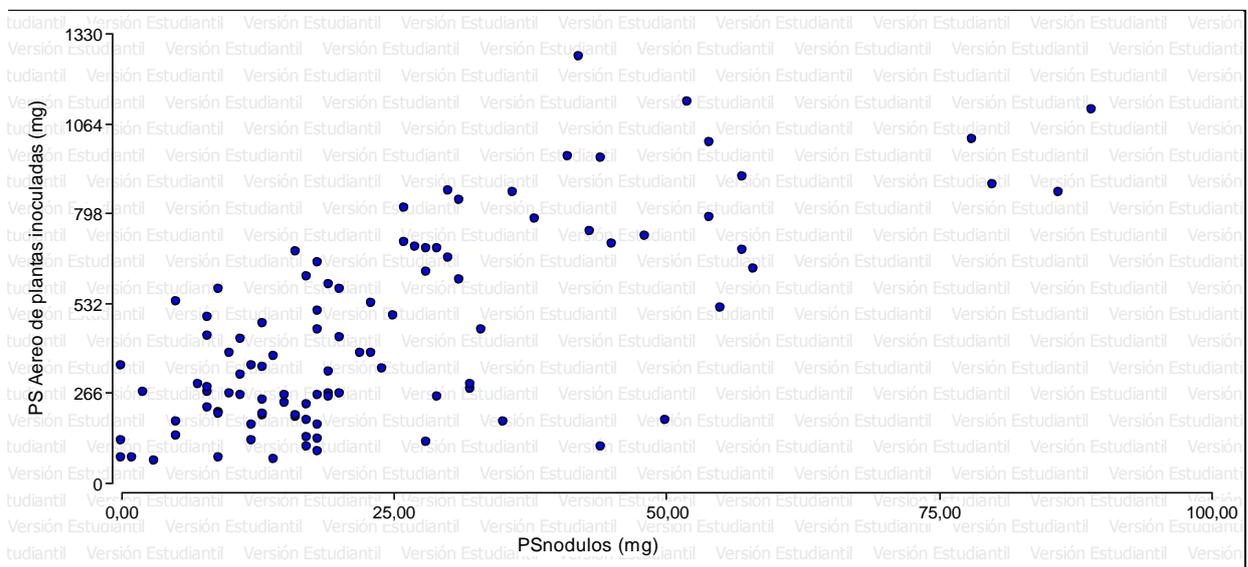


Figura 3: Dispersión de las variables peso seco de nódulos vs. peso seco aéreo en plantas de *P. alba* de orígenes Campo Duran y Santiago, inoculadas en control y estrés hídrico.

Peso seco de raíces

El peso seco de raíces exhibió diferencias significativas respecto de las condiciones de sequía y origen de las plantas (p -valor $< 0,01$), observando que en los tratamientos de sequía disminuyó el valor de esta variable sin efecto de la inoculación. A su vez, las plantas de Campo Durán presentaron un desarrollo del sistema radical mayor que las de origen Santiago.

Tratamiento	Medias	n	E.E.			
Cpo. Durán - Control - Inoculado	0,62	26	0,03	C	D	
Cpo. Durán - Control - No inoculado	0,64	27	0,03		D	
Cpo. Durán - Sequía - Inoculado	0,55	26	0,03	A	B	C
Cpo. Durán - Sequía - No inoculado	0,55	27	0,03	A	B	C
Santiago - Control - Inoculado	0,57	24	0,03	B	C	D
Santiago - Control - No inoculado	0,53	26	0,03	A	B	
Santiago - Sequía - Inoculado	0,47	25	0,03	A		
Santiago - Sequía - No inoculado	0,5	27	0,03	A	B	

Tabla 2: Peso seco de raíces de plantas de *P.alba* de orígenes Campo Durán y Santiago sometidas a sequía e inoculadas con rizobios. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Peso seco de nódulos

Los nódulos radicales se cosecharon al final del período de estrés y se evaluó el peso seco (PS), (luego de secarlos durante 72hs en estufa a 70°C). En consonancia con la correlación observada en Peso seco aéreo, la condición de sequía afectó el desarrollo de los nódulos, provocando una disminución en el peso seco de alrededor del 46% respecto del control, y no se observan diferencias respecto de los orígenes ensayados (Figura 4)

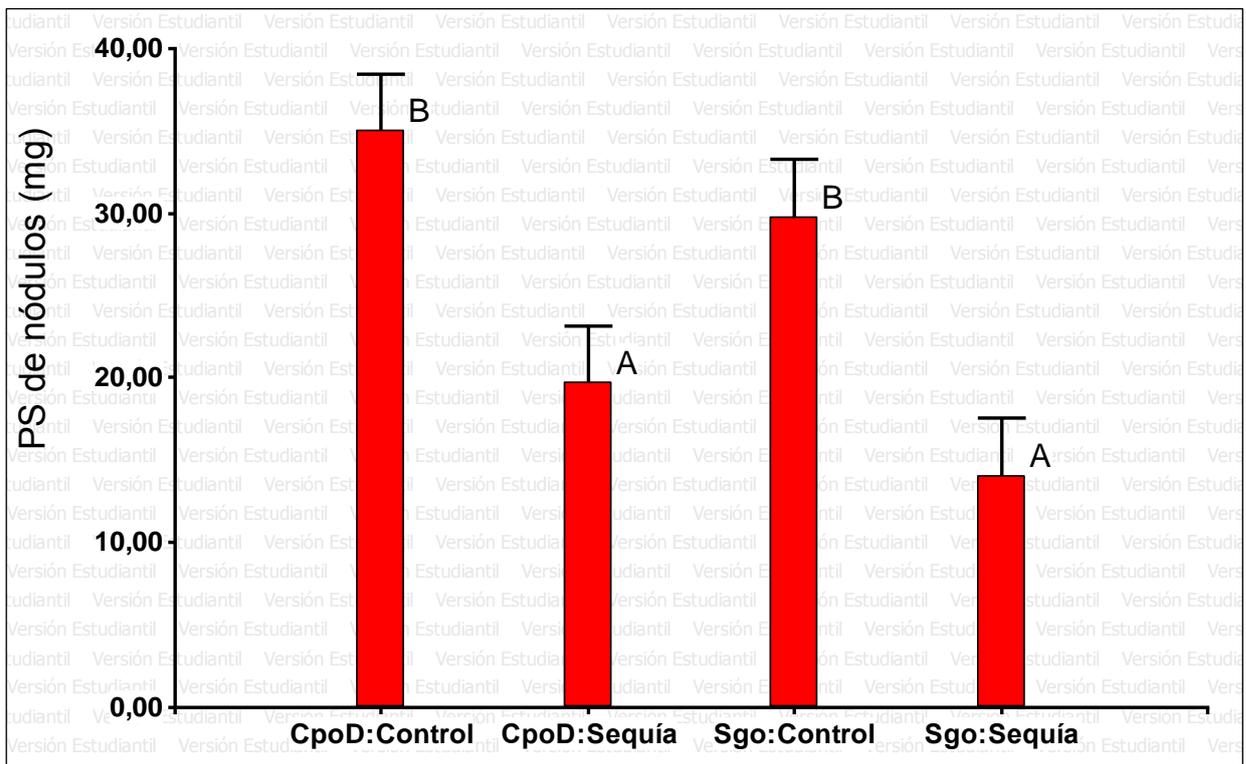


Figura 4: Peso seco de nódulos de plantas de *P. alba* de orígenes Campo Durán y Santiago sometidas a estrés hídrico. Letras distintas indican diferencias significativas (p -valor $< 0,05$)

Diámetro y altura

Desde el inicio del estrés y hasta el último día de crecimiento se registró semanalmente el diámetro de los plantines con calibre y la altura desde el cuello de raíz hasta el último nudo con hojas completamente expandidas.

La altura de los individuos de origen Santiago en control difirió de los del origen Campo Durán en la misma situación, aunque no se observaron diferencias asociadas a la inoculación. Junto al grupo de individuos de origen Santiago control se observaron los de Santiago en sequías no inoculadas. El tratamiento de inoculación en los individuos provenientes de Santiago en sequía mostró alturas promedios inferiores respecto del mismo grupo en sequía sin inocular. Contrariamente, la respuesta en altura no evidenció diferencias en los tratamientos de sequía e inoculación en el origen Campo Durán, cuya longitud promedio fue inferior a los de Santiago. (Figura 5)

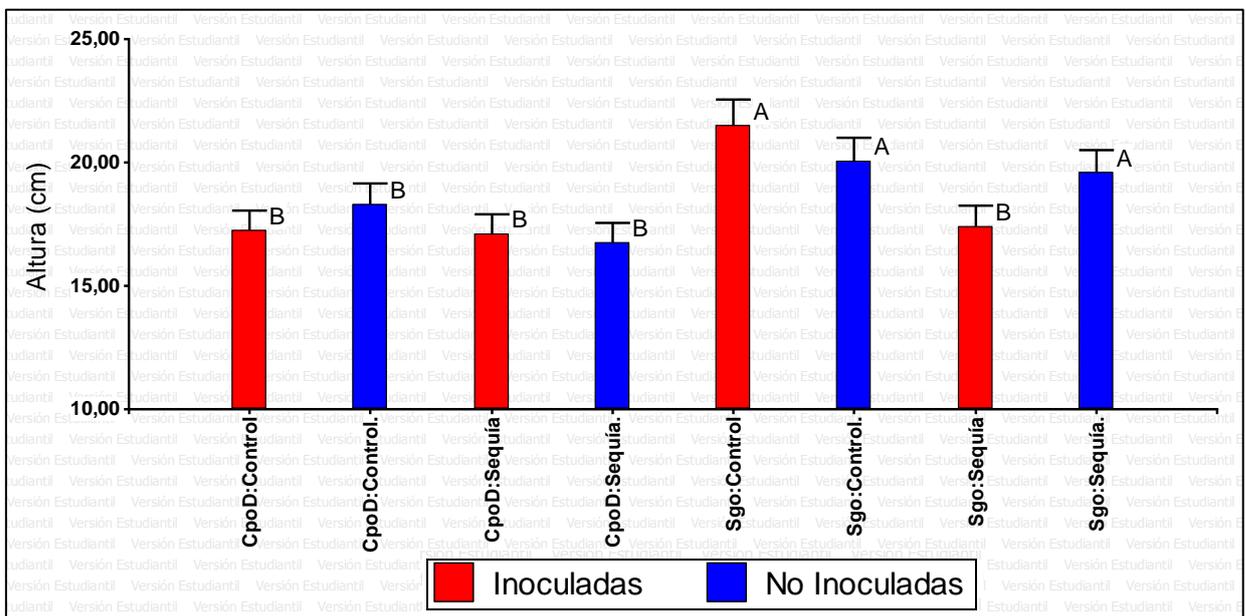


Figura 5: Altura promedio de *P. alba* de orígenes Campo Durán y Santiago sometidas a estrés hídrico e inoculadas con rizobios. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En el diámetro claramente se observa que las plantas de origen Santiago en sequía muestran los menores valores. Los resultados no muestran un efecto significativo de la inoculación sobre el diámetro a la altura del cuello en el período medido, encontrando que las principales diferencias se relacionan al origen de las plantas y condición de riego, independientemente de la inoculación. En control aunque sin diferencias significativas la plantas inoculadas de origen Santiago poseen mayor diámetro que las no inoculadas. Para el origen Campo Durán, sin diferencias significativas, las plantas en control, independientemente de la inoculación, desarrollaron mayor diámetro de tallo que los individuos en sequía. (Figura 6)

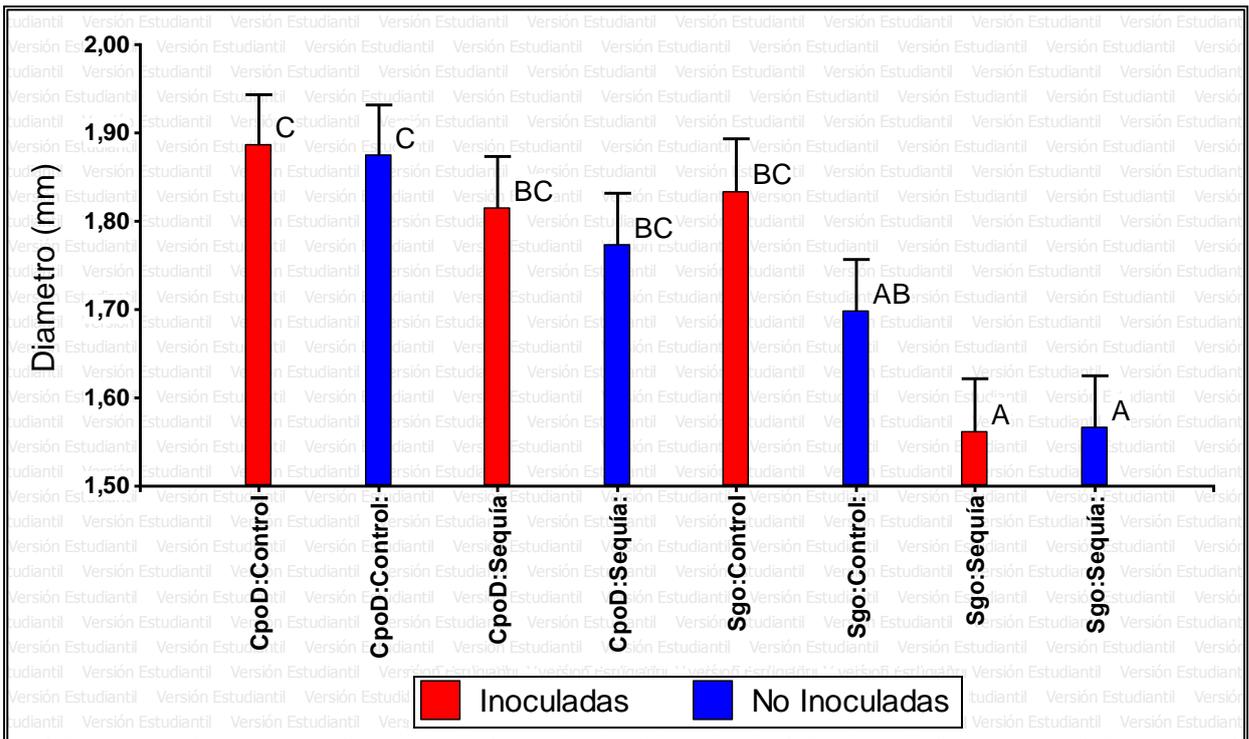


Figura 6: Diámetro del tallo de *P. alba* de orígenes Santiago y C. Duran sometidos a estrés hídrico e inoculados con rizobacterias específicas. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Hojas conservadas

En la cuarta semana del ensayo, y previo a la cosecha del material vegetal, se contó el número de nudos por planta y cantidad de hojas conservadas. Teniendo en cuenta la disposición alterna de las hojas en el tallo, se calculó la proporción de hojas conservadas como el cociente entre el número de nudos que preservaron hojas y cantidad de nudos totales. Las plantas de ambos orígenes en condiciones control conservaron significativamente más cantidad de hojas (por encima del 75%) que las sometidas a estrés hídrico, sin efecto de la inoculación. En estrés hídrico, la pérdida de hojas fue atenuada en plantas inoculadas del origen Santiago, que exhibieron un 55% de hojas conservadas, en tanto que plantas no inoculadas de la misma población conservaron solo el 39% de las hojas. En plantas de Campo Durán no se encontraron diferencias significativas entre inoculadas y no inoculadas, donde la proporción de hojas conservadas fue del 44%, similar a plantas no inoculadas de Santiago. (Figura 7) Se observa para plantas de origen Santiago efecto positivo debido a la simbiosis con rizobacterias específicas en condiciones de estrés.

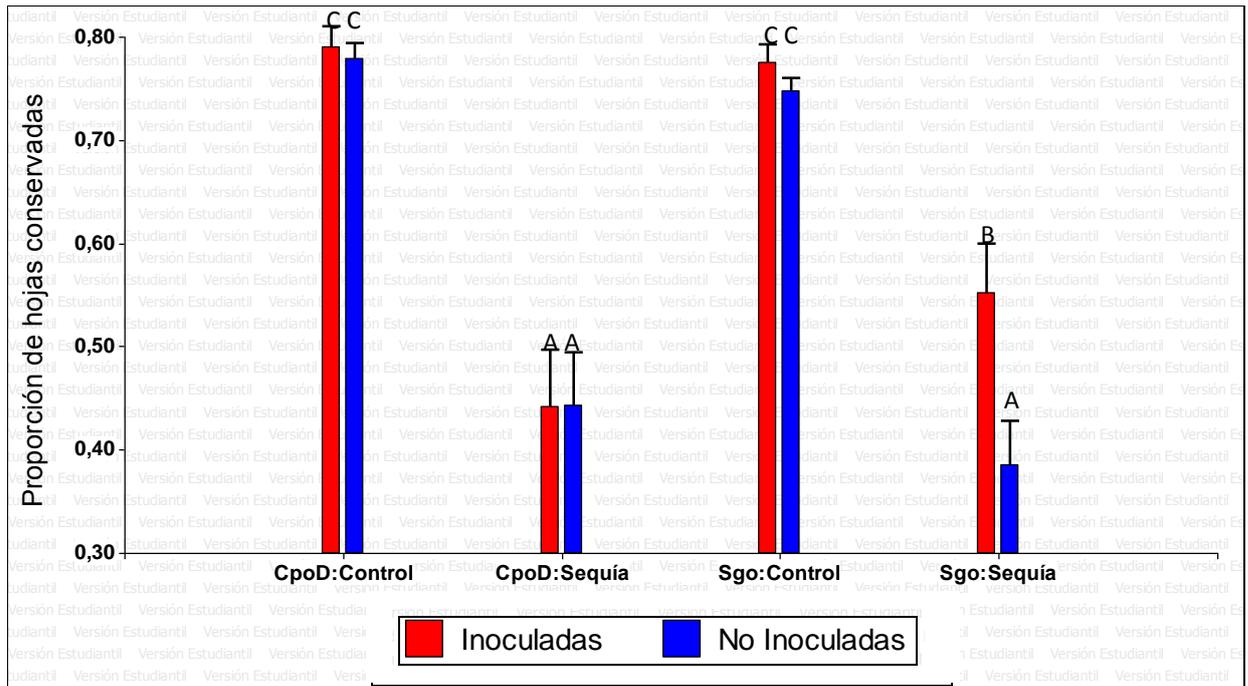


Figura 7: Proporción de hojas conservadas en plantas de *P. alba* de orígenes C. Durán y Santiago sometidas a estrés hídrico e inoculadas con rizobios. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Contenido relativo de agua (CRA)

El contenido relativo de agua se determinó en hojas completamente expandidas cosechadas el día 106 del experimento, (42 días desde el inicio del estrés). A diferencia de lo esperado, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. Esto se debe en parte a la enorme dispersión de los datos obtenidos. En promedio los valores de CRA estuvieron alrededor del 72%. Otro aspecto que podría haber contribuido a la falta de diferencias entre los tratamiento se relaciona con la pilosidad de las hojas de *P. alba* y si bien se incluyó un agente tensoactivo (0,01% tween 20) es posible que la imbibición de las hojas no haya sido completa al momento de la determinación del peso saturado. Tabla 3

Tratamiento	Medias	E.E.	
Cpo. Durán - Control - Inoculado	0,69	0,06	A
Cpo. Durán - Control - No inoculado	0,71	0,06	A
Cpo. Durán - Sequía - Inoculado	0,73	0,07	A
Cpo. Durán - Sequía - No inoculado	0,71	0,06	A
Santiago - Control - Inoculado	0,76	0,06	A
Santiago - Control - No inoculado	0,68	0,06	A
Santiago - Sequía - Inoculado	0,7	0,06	A
Santiago - Sequía - No inoculado	0,65	0,07	B

Tabla 3: Contenido relativo de agua en hojas de *P. alba* sometidas a estrés hídrico de orígenes Campo Durán y Santiago e inoculadas con rizobios. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,10$).

Contenido de clorofilas

El contenido de clorofilas se determinó en extractos alcohólicos de hojas. En condiciones control no se observaron diferencias significativas en los valores, independientemente de la inoculación en ambos orígenes. No obstante, marcadas diferencias fueron evidentes en plantas inoculadas sometidas a sequía, que mostraron hasta un 40% más de valores de clorofila en relación a las plantas no inoculadas de ambos orígenes. (Figura 8)

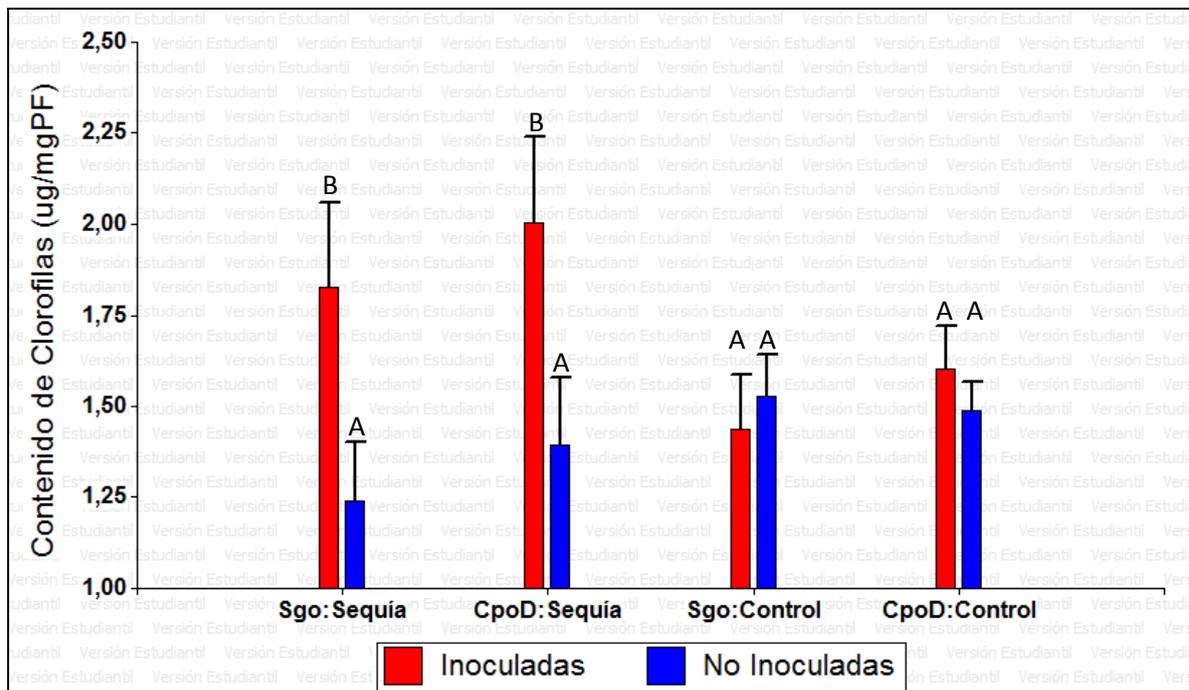


Figura 8: Contenido de clorofilas en plantas de *P. alba* de orígenes C. Durán y Santiago sometidas a estrés hídrico e inoculadas con rizobios. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Eficiencia del fotosistema II

La eficiencia del fotosistema II, como una estimación del mantenimiento de la actividad fotosintética, se determinó semanalmente a lo largo del desarrollo del experimento. En plantas de origen Santiago no se observó efecto del estrés hídrico ni de la inoculación para este parámetro, resultando en valores similares a los medidos en plantas control, tanto en inoculadas como en no inoculadas

Para las plantas de la población Campo Durán no se observaron diferencias en los valores de eficiencia del fotosistema II en control respecto de la inoculación, mientras que con restricciones hídricas los valores se redujeron de modo significativo en las plantas no inoculadas respecto de las inoculadas. Estos resultados muestran que el efecto del estrés hídrico sobre el fotosistema II en plantas de Campo Durán es mitigado por la simbiosis con rizobios específicos (Figura 9).

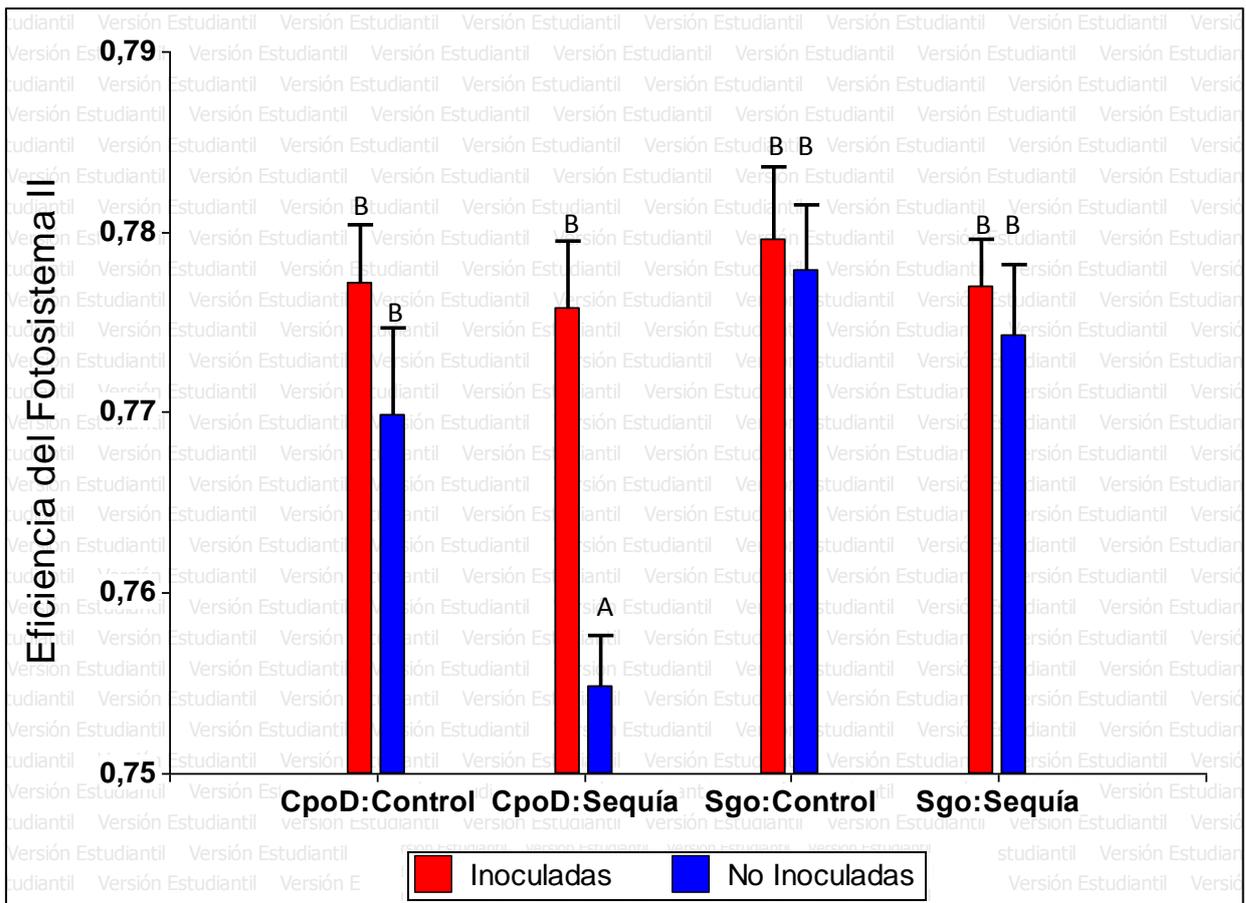


Figura 9: Eficiencia del fotosistema II en plantas de *P. alba* de orígenes C. Durán y Santiago sometidas a estrés hídrico en inoculadas con rizobios. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

FRAP

El contenido de antioxidantes exhibió diferencias significativas entre tratamientos de inoculación y marginalmente significativas entre condiciones de riego, con un valor promedio en el tratamiento de sequía inoculadas que supera en más del 37% a lo medido en plantas sin inocular bajo la misma condición de riego (21,08 y 15,36nmol Trolox/mgPF respectivamente), en tanto que en plantas control se midieron concentraciones con diferencias porcentuales similares entre inoculadas y no inoculadas, aunque con valores absolutos menores, cuya diferencia no resultó significativa (Figura 10). Estas observaciones permiten inferir que la relación simbiótica establecida favorecería la activación de los mecanismos de respuesta en la planta frente a una situación de estrés oxidativo.

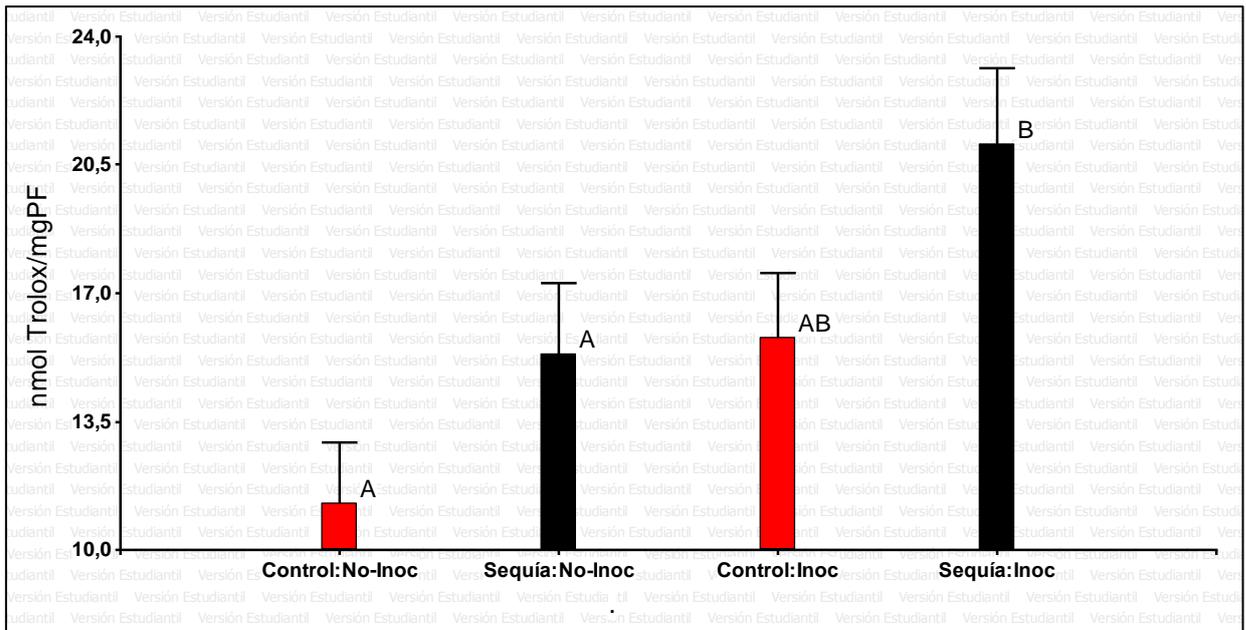


Figura 10: Contenido de antioxidantes en plantas de *P. alba* de orígenes Campo Durán y Santiago sometidas a estrés hídrico e inoculadas con rizobios. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Contenido de prolina

El contenido de prolina en hojas resultó mayor en plantas inoculadas respecto de las no inoculadas, dada su relación con el metabolismo del nitrógeno en nódulos. En condiciones de sequía esta diferencia se vio incrementada en plantas de origen Santiago, respecto de las de Campo Durán. En este sentido los valores del contenido de prolina en arboles de origen Santiago inoculados en sequía fueron 2 veces mayores que los de los no inoculados ($1,66 \pm 0,16$ vs $0,83 \pm 0,16$ $\mu\text{mol/mg}$ PF de hoja), mientras que en control las plantas de Santiago inoculadas mostraron 1,75 veces más prolina que las no inoculadas ($1,44 \pm 0,15$ vs $0,82 \pm 0,14$ $\mu\text{mol/mg}$ PF).

En las plantas de origen Campo Durán inoculadas, el contenido de prolina fue significativamente más alto que en las no inoculadas en condición control ($1,23 \pm 0,13$ vs $0,73 \pm 0,13$ $\mu\text{mol/mg}$ PF); mientras que en sequía, las plantas inoculadas de Campo Durán mostraron los valores absolutos más bajos, que no difirieron de los de las plantas no inoculadas en esa condición. La acumulación de prolina como aminoácido osmóticamente activo podría estar contribuyendo al aumento de tolerancia al estrés hídrico mediante la disminución del potencial osmótico del citoplasma, a la vez que constituye una fuente de energía rápida para la recuperación de la planta una vez que cesa la condición de sequía (Hayat, 2012) (Figura 11).

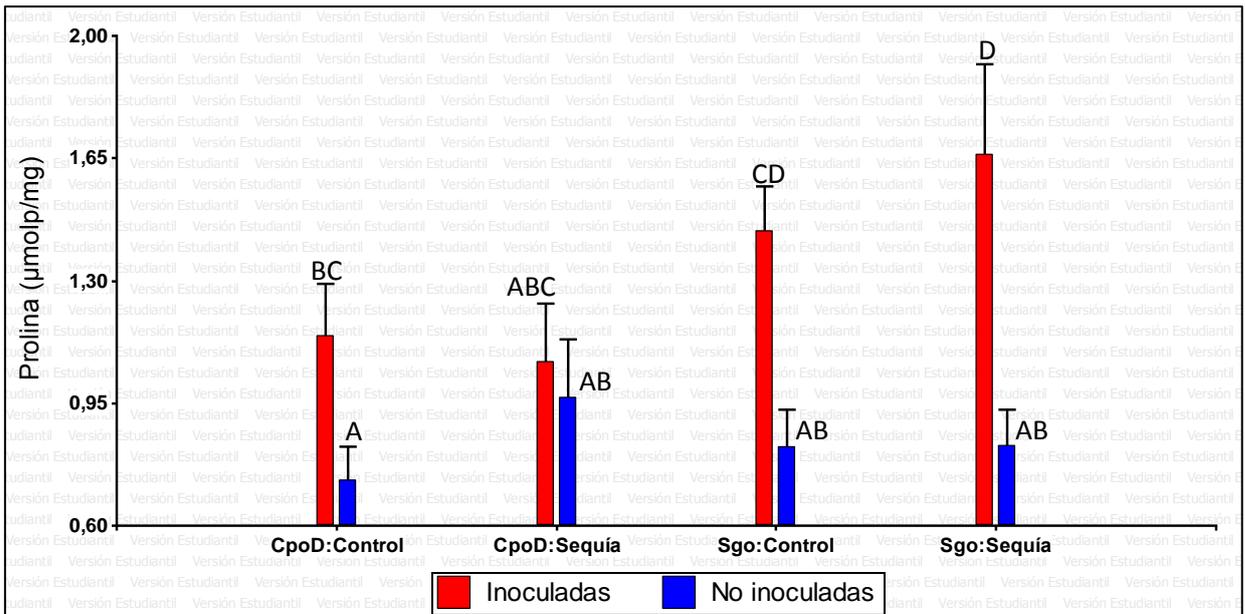


Figura 11: Contenido de prolina en hojas de *P. alba* de orígenes Campo Durán y Santiago sometidas a estrés hídrico e inoculadas con rizobios. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Conductividad relativa

La conductividad relativa se determinó al final del período de estrés en hojas frescas extraídas de los nudos superiores. Llamativamente la conductividad eléctrica es mayor en condición de inoculación en ambos orígenes y tratamientos. A su vez, en campo duran no se observan efectos de la sequía respecto de los controles, mientras que en Santiago el estrés hídrico produjo, tanto en plantas inoculadas como no inoculadas (Figura 12).

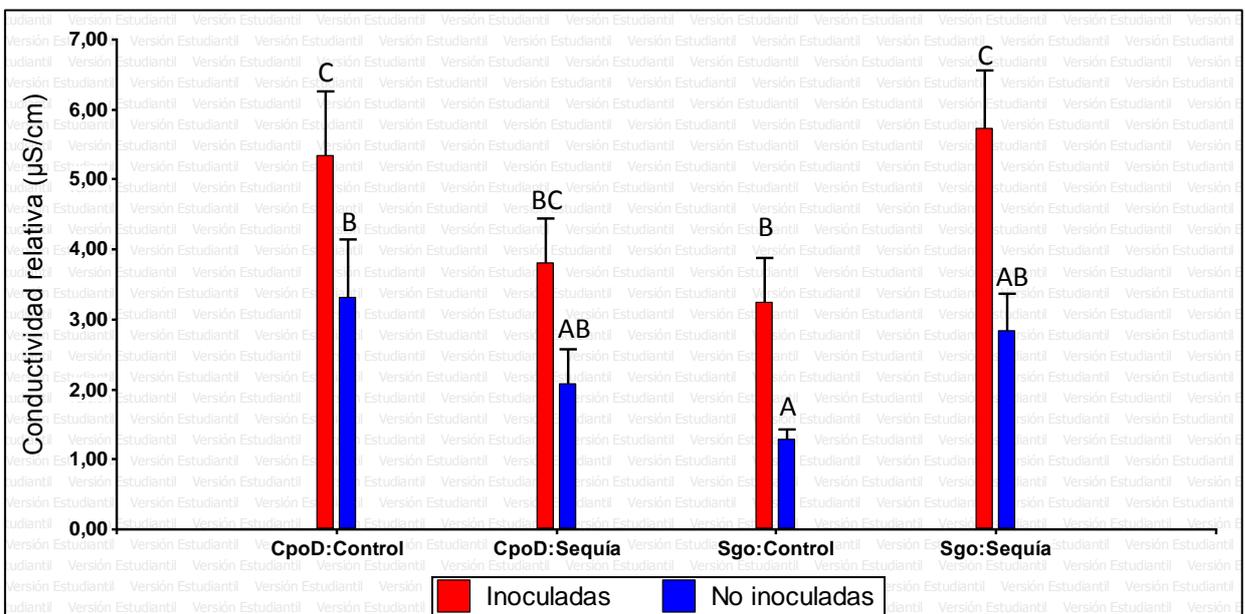


Figura 12: Conductividad relativa de hojas de *P. alba* de orígenes C. Durán y Santiago sometidas a estrés hídrico e inoculadas con rizobios. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

MDA

El contenido de MDA fue evaluado en extracto de hojas y representa el nivel de lípidos peroxidados en relación a la condición a la que fueron sometidas las plantas. Contrariamente a lo esperable, los niveles de MDA en *P. alba* en control fueron más altos que en estrés, sin efecto de la inoculación o del origen de las plantas. (Figura 13).

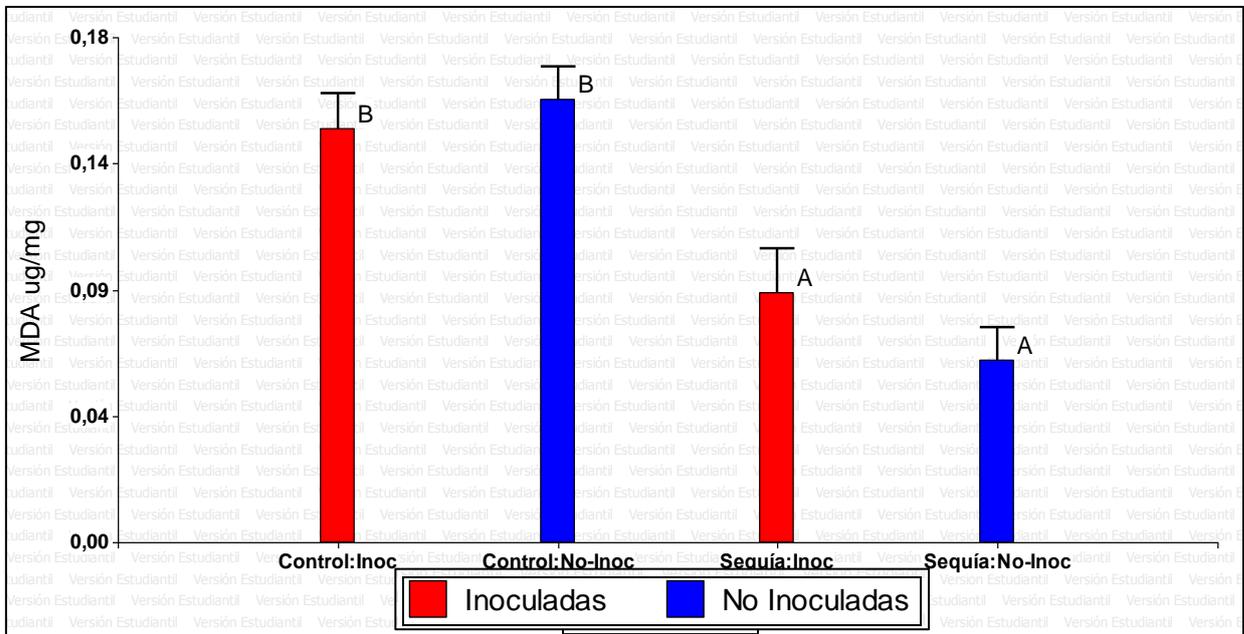


Figura 13: Contenido de MDA en hojas de *P. alba* de orígenes Campo Durán y Santiago sometidas a estrés hídrico e inoculadas con rizobios. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Discusión y conclusiones

El presente trabajo resulta un primer abordaje al estudio de los efectos de la inoculación con rizobios en *Prosopis alba* con el objetivo de mejorar su tolerancia a condiciones de estrés hídrico en la etapa de establecimiento de los plantines. En ese marco, se evaluaron algunas de las variables más comúnmente utilizadas para valorar el estado y la capacidad de respuesta de los plantines frente a déficit hídrico provocado en etapas tempranas, que es el momento en el que usualmente los plantines de Algarrobo, producidos en condiciones de vivero, son transferidos a campo como material de inicio de plantaciones forestales. Estos ensayos nos han permitido estimar el efecto de la inoculación y establecimiento de la simbiosis a través del empleo como inóculo de una mezcla de tres aislamientos rizobianos específicos, provenientes de suelos de poblaciones de Algarrobo blanco y aislado de nódulos empleando plantas trampa. A su vez, durante el desarrollo del trabajo se definieron algunas de las condiciones necesarias para la producción e inoculación en vivero, como es el uso de sustratos pobres en nitrógeno para facilitar la nodulación.

Hemos podido en primer lugar seleccionar un conjunto de indicadores como peso seco de parte aérea, proporción de hojas conservadas y diámetro del tallo que nos permitieron explicar la variabilidad de los datos y discriminar, mediante un análisis de componentes principales, la respuesta de los plantines en condiciones de estrés. Estas variables se modificaron por la situación de estrés cuando la disponibilidad de agua fue del 30% de la capacidad de campo del envase

contenedor. Este comportamiento fue evidente en ambos orígenes ensayados, lo cual nos permite afirmar que la intensidad y duración del estrés aplicado fueron apropiadas para afectar de manera fehaciente las condiciones de crecimiento de *P. alba*. No obstante esto, para el CRA analizado de manera individual no se observaron diferencias significativas entre control y sequía, que podrían atribuirse a deficiencias de ajuste metodológico en la determinación del parámetro.

Asimismo, el ACP permitió a priori identificar algunas de las variables que mejor explicarían la respuesta de los plantines a la inoculación, destacándose en este aspecto el contenido de prolina, antioxidantes y clorofilas, y en menor medida la eficiencia del PSII.

Si bien los valores obtenidos en peso seco de parte aérea y diámetro del tallo no contribuyeron de modo directo a validar la hipótesis que las plantas inoculadas y noduladas presentaron un mejor comportamiento frente a condiciones de estrés, la correlación lineal positiva entre peso seco de parte aérea y peso seco de nódulos es importante como indicador que la presencia de nódulos contribuyen al crecimiento de la biomasa aérea de las plantas de *P. alba*.

Contrariamente, otra de las variables que comúnmente se emplean para evaluar crecimiento bajo diferentes situaciones de estrés, como es la altura, no correlacionó con las restricciones hídricas ni con la presencia de nódulos. En este sentido, los resultados del presente trabajo difieren de lo observado en otras especies del mismo género (Villagra, 2006; López, 2012), donde condiciones de estrés hídrico afectaron en gran medida el crecimiento en altura de las plantas. Una explicación posible a esto tiene que ver con la duración del tratamiento de estrés, que en los trabajos previos fue de noventa a cien días, por lo que se considera que prolongando el tiempo del experimento podrían acumularse los efectos de cada tratamiento y evidenciar diferencias más marcadas en variables de crecimiento. Al respecto, en nuestro trabajo, donde la duración del estrés fue de 42 días la pérdida de hojas resultó limitante para extender el tiempo de exposición a condiciones de sequía, debido a la necesidad de contar con material para las determinaciones bioquímicas, así como de CRA y de conductividad relativa.

La capacidad de las plantas para aclimatarse a diferentes condiciones ambientales está asociada entre otros con sus posibilidades de mantener la fotosíntesis, cuya disminución impacta en el crecimiento. En este sentido resultan de gran importancia para evaluar los efectos del estrés hídrico el rendimiento cuántico del fotosistema II, la proporción de hojas conservadas y el contenido de clorofilas, que en conjunto dan una idea de la capacidad fotosintética (Anjum et al, 2011).

La eficiencia del fotosistema II en plantas del origen Santiago inoculadas no se diferenció en sequía de las no inoculadas, como sí ocurrió en las plantas provenientes de Campo Durán.

Las plantas de origen Santiago inoculadas conservaron en sequía una mayor proporción de hojas que las no inoculadas, permitiendo además mantener la funcionalidad del PSII. Ha sido citado que la presencia de bacterias benéficas, como las rizobacterias, debido a su capacidad de producir la enzima 1-amino ciclopropilpropane-1-carboxylate deaminasa (ACC-deaminasa), que disminuye la formación de etileno en las plantas por secuestro de su precursor, contribuyen a reducir el impacto de diferentes situaciones de estrés como sequía, salinidad o patógenos (Ahemad y Kibret, 2014). En

este sentido en este trabajo no hemos evaluado la actividad de la enzima en los inóculos ensayados pero ha sido evidente el efecto que la presencia de las rizobacterias tuvo en la conservación del número de hojas.

Paradójicamente las plantas no inoculadas que perdieron una considerable cantidad de hojas en sequía mantuvieron estable la eficiencia cuántica del PSII. Desde el punto de vista de la tolerancia a la condición de estrés las plantas del origen Santiago inoculadas aparecen como capaces de conservar hojas y mantener la actividad fotosintética que puede ser estimada mediante la fluorescencia de clorofila del PSII.

En las plantas de Campo Durán sometidas a estrés, se observó que si bien conservaron menor proporción de hojas que las de Santiago, la eficiencia cuántica del PSII se mantuvo alta solamente cuando estas estuvieron inoculadas. Por el contrario, una drástica y significativa disminución de los valores de fluorescencia del PSII se observó para similar proporción de hojas conservadas en ausencia de inóculos. En este sentido, las plantas del origen Campo Durán no inoculadas mostraron menor eficiencia del PSII con una capacidad de conservar hojas equivalente a la de Santiago sin inocular.

Los niveles de clorofilas fueron significativamente más elevados en plantas inoculadas en situación de sequía, asociado a que en las plantas de Santiago no se redujo la eficiencia cuántica del PSII respecto de los controles y además conservaron una mayor proporción de hojas. En tanto que en las plantas inoculadas de origen Campo Durán la pérdida de hojas fue similar a las no inoculadas, pero la eficiencia del PSII se mantuvo al mismo nivel que en los controles.

Validando nuevamente que la simbiosis contribuye de manera positiva para tolerar condiciones de restricciones hídricas los niveles de antioxidantes no enzimáticos fueron superiores en las plantas inoculadas respecto de las no inoculadas aunque sin comportamiento diferencial entre los orígenes ensayados. Teniendo en cuenta que la disminución en el contenido de clorofilas en condiciones de estrés hídrico es considerada un síntoma típico de estrés oxidativo, resultado de la fotooxidación y degradación de la clorofila, el mayor contenido de este pigmento en plantas inoculadas sometidas a estrés hídrico podría deberse al incremento en el contenido de antioxidantes no enzimáticos observado en este grupo (Anjum et al. 2011). Por otra parte, Chávez Díaz et al. (2013) encontraron que los rizobios utilizados en este trabajo fueron capaces de producir ácido indol acético (AIA) en vida libre, correlacionando los niveles de AIA con su capacidad para sobrevivir bajo condiciones de estrés osmótico severo. Si bien en este trabajo no se evaluó la producción de hormonas por parte de los bacteroides, se ha propuesto que la promoción del crecimiento vegetal ejercida por rizobacterias podría darse a través de las hormonas producidas por los microorganismos y por la estimulación que ellos ejercen en la producción de reguladores de crecimiento propios de la planta, que es modulada por factores de estrés ambiental como pH, estrés osmótico y mátrico y déficit de carbono (Idris et al. 2007; Ahemad y Kibret, 2014). En este aspecto, Cohen et al. (2009) demostraron que la inoculación con bacterias del género *Azospirillum* incrementa el contenido de ácido abscísico en plantas de maíz, hormona implicada en las respuestas a estrés hídrico y salino (Cassán y Vanderleyden, 2014) y que induce la síntesis y acumulación de prolina (Hayat et al. 2012).

La acumulación de prolina tiene un valor muy importante en la tolerancia al estrés hídrico, permite disminuir la pérdida de agua actuando como osmolito compatible a la vez que contribuye a la eliminación de radicales libres, amortiguar el potencial redox celular en condiciones de estrés y, mediante el incremento de la actividad de varios antioxidantes, a la protección de las membranas celulares (Molinari, 2007). Analizando dos morfotipos de *P. alba* en condiciones de sequía López et al.,(2010) observaron importantes incrementos en los niveles de prolina. En nuestro trabajo esos incrementos sólo fueron evidentes en plantas inoculadas, especialmente de origen Santiago, tanto en condición control como en sequía, mientras que las no noduladas bajo estrés, no difirieron de los controles. Similarmente, empleando estrés salino, Meloni (2004) no encontró diferencias en los niveles de prolina en plantines de *P. alba* no inoculados. Paralelamente, el contenido de antioxidantes no enzimáticos fue mayor en plantas inoculadas que no inoculadas, particularmente en el tratamiento de estrés hídrico. Los resultados del presente trabajo sugieren que tendría un rol clave en la mayor tolerancia a sequía observada en plantas inoculadas de origen Santiago, aunque no se pudo verificar efecto como protector de membranas ni como osmolito compatible. Por lo tanto un entendimiento más acabado de los mecanismos de acción en *Prosopis*, así como la forma en que la inoculación afecta la síntesis de prolina, resultaría importante en trabajos futuros.

Los análisis de hojas llevados a cabo para evaluar la integridad de membranas no resultaron concluyentes. El análisis del contenido de MDA indicaría una mayor peroxidación de lípidos en plantas sin restricciones hídricas. Al respecto, Sachdev (2008) indica que el método utilizado está sujeto a múltiples fuentes de error cuando se aplica a muestras biológicas complejas como homogeneizados de tejidos. Además, Janero (1990) postula que el MDA es una sustancia reactiva que puede ser oxidativa y metabólicamente degradada, por lo tanto es posible que las condiciones oxidativas del tratamiento de estrés degradaran parte del MDA. Por otra parte, las mediciones de conductividad relativa llevadas a cabo en hojas para determinar la fuga de electrolitos parecen indicar un mayor daño de las membranas celulares en plantas inoculadas que en no inoculadas. En este sentido, Bajji (2002) advierte que este tipo de mediciones puede ser influenciado por el estado nutricional de las hojas, a la vez que requieren una cuidadosa adecuación de la técnica para cada especie. Así, las diferencias fisiológicas observadas entre plantas inoculadas y no inoculadas, sumado a que, como proponen Yildirim et al. (2008) las bacterias promotoras del crecimiento vegetal mejoran la absorción de minerales, pudieron afectar las mediciones de conductividad eléctrica realizadas.

A modo de síntesis se puede concluir:

Si bien las variables de crecimiento general no exhibieron efectos marcados de la inoculación, se estableció una correlación positiva entre el peso seco aéreo y el peso seco de nódulos.

Se demostró que la inoculación con rizobios altera las respuestas de tolerancia y escape a la sequía, mejorando el rendimiento del PSII en Campo Durán y disminuyendo la pérdida de hojas en Santiago.

Se encontró que la inoculación con rizobios mejora la condición fisiológica de las plantas en relación a la tolerancia al estrés hídrico, incrementando los niveles de antioxidantes no enzimáticos, prolina y clorofilas.

Existen diferencias en las respuestas de los dos orígenes ensayados, donde en general Santiago presenta mayor tolerancia al estrés hídrico y respuestas a la inoculación y nodulación más marcadas.

Literatura citada

Acosta, M., Oliva, L., & Abril, A. (1994). Colección de rizobios de Prosopis arbóreos en la zona semiárida de la provincia de Córdoba (Argentina). *Ciencia del Suelo*, 12(1), 38-40.

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.

Anjum, S. A., Xie, X. Y., Wang, L. C., Saleem, M. F., Man, C., & Lei, W. (2011). Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African Journal of Agricultural Research*, 6(9), 2026-2032.

Ashraf, M. P. J. C., & Harris, P. J. C. (2004). Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant science*, 166(1), 3-16.

Bajji, M., Kinet, J. M., & Lutts, S. (2002). The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. *Plant Growth Regulation*, 36(1), 61-70.

Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.

Bertram, N., & Chiacchiera, S. (2014). Ascenso de napas en la Región Pampeana:¿ Consecuencia de los cambios en el uso de la tierra. *INTA EEA Marcos Juárez*.

Bilger, W., & Björkman, O. (1990). Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynthesis research*, 25(3), 173-185.

Broughton, W. J., & Dilworth, M. J. (1971). Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. *Biochemical journal*, 125(4), 1075-1080.

Burkart, R., Barbaro, N., Sánchez, R. O., & Gómez, D. A. (1999). Eco-regiones de la Argentina. Programa de desarrollo institucional, componente de política ambiental. *Administración de Parques Nacionales*.

Cassán, F., Vanderleyden, J., & Spaepen, S. (2014). Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 33(2), 440-459.

Cohen, A. C., Travaglia, C. N., Bottini, R., & Piccoli, P. N. (2009). Participation of abscisic acid and gibberellins produced by endophytic *Azospirillum* in the alleviation of drought effects in maize. *Botany*, 87(5), 455-462.

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

Díaz, L. C., González, P., Rubio, E., & Melchiorre, M. (2013). Diversity and stress tolerance in rhizobia from Parque Chaqueño region of Argentina nodulating *Prosopis alba*. *Biology and fertility of soils*, 49(8), 1153-1165.

Dobson, A. P., Bradshaw, A. D., & Baker, A. Á. (1997). Hopes for the future: restoration ecology and conservation biology. *Science*, 277(5325), 515-522.

GUPTA, G. 1995. Rain-water management for tree planting in the Indian Desert. *J Arid. Environ.* 31:219-235.

Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M. N., Wani, A. S., Pichtel, J., & Ahmad, A. (2012). Role of proline under changing environments: a review. *Plant Signaling & Behavior*, 7(11), 1456-1466.

Heath, R. L., & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 125(1), 189-198.

Idris, E. E., Iglesias, D. J., Talon, M., & Borriss, R. (2007). Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Molecular plant-microbe interactions*, 20(6), 619-626.

Iglesias, O., Rivas, R., García-Fraile, P., Abril, A., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E., & Velázquez, E. (2007). Genetic characterization of fast-growing rhizobia able to nodulate *Prosopis alba* in North Spain. *FEMS microbiology letters*, 277(2), 210-216.

Janero, D. R. (1990). Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 9(6), 515-540.

López Lauenstein D., Luna C. y Verga A. (2010). Respuesta al estrés hídrico en dos grupos morfológicos de *Prosopis alba*. XXVIII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. Septiembre de 2010.

López Lauenstein, D., Fernández, M. E., & Verga, A. (2012). Respuesta diferenciada a la sequía de plantas jóvenes de *Prosopis chilensis*, *P. flexuosa* y sus híbridos interespecíficos: implicancias para la reforestación en zonas áridas. *Ecología austral*, 22(1), 43-52.

López Lauenstein, D; Vega, C; Venier, P; & Verga, A. Ensayos de orígenes de Algarrobo blanco. "4to Congreso Forestal Argentino y Latinoamericano Iguazú". 23 al 27 de Septiembre de 2013. Iguazú, Misiones. ISSN 1669-6786.

Marulanda, A., Barea, J. M., & Azcón, R. (2009). Stimulation of plant growth and drought tolerance by native microorganisms (AM fungi and bacteria) from dry environments: mechanisms related to bacterial effectiveness. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28(2), 115-124.

Meloni, D. A., Gulotta, M. R., Martínez, C. A., & Oliva, M. A. (2004). The effects of salt stress on growth, nitrate reduction and proline and glycinebetaine accumulation in *Prosopis alba*. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 16(1), 39-46.

Millennium Ecosystem Assessment, 2005. Ecosystems and Human Well-being: Biodiversity Synthesis. World Resources Institute, Washington, DC.

Molinari, H. B. C., Marur, C. J., Daros, E., De Campos, M. K. F., De Carvalho, J. F. R. P., Pereira, L. F. P., & Vieira, L. G. E. (2007). Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. *Physiologia Plantarum*, 130(2), 218-229.

Navall, M., & Senillani, M. G. (2004). Crecimiento y calidad maderera de plantaciones de *Prosopis alba* Gris.(algarrobo blanco) en el Área de Riego del Río Dulce, provincia de Santiago del Estero. *XIX Jornadas Forestales de Entre Ríos*.

Sachdev, S., & Davies, K. J. (2008). Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(2), 215-223.

Soto, M. J., Sanjuan, J., & Olivares, J. (2006). Rhizobia and plant-pathogenic bacteria: common infection weapons. *Microbiology*, 152(11), 3167-3174.

Troll, W. and Lindsey, J. (1954). A photometric method for the determination of proline. *Journal of Biology and Biochemistry*, 215, 655±60.

Van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M., & Pieterse, C. M. J. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual review of phytopathology*, 36(1), 453-483.

Velázquez, E., Igual, J. M., Willems, A., Fernández, M. P., Muñoz, E., Mateos, P. F., ... & Gillis, M. (2001). *Mesorhizobium chacoense* sp. nov., a novel species that nodulates *Prosopis alba* in the Chaco Arido region (Argentina). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(3), 1011-1021.

Verga, A., Lauenstein, D. L., López, C., Navall, M., Joseau, J., Gómez, C., ... & Marcó, M. (2009). Caracterización morfológica de los algarrobos (*Prosopis* sp.) en las regiones fitogeográficas Chaqueña y Espinal norte de Argentina. *Revista de Ciencias Forestales*, 17, 1-2.

Villagra, P. E., & Cavagnaro, J. B. (2006). Water stress effects on the seedling growth of *Prosopis argentina* and *Prosopis alpataco*. *Journal of Arid Environments*, 64(3), 390-400.

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*.

Wintermans, J. F. G. M., & De Mots, A. (1965). Spectrophotometric characteristics of chlorophylls a and b and their phenophytins in ethanol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biophysics including Photosynthesis*, 109(2), 448-453.

Yildirim, E., Donmez, M. F., & Turan, M. (2008). Use of bioinoculants in ameliorative effects on radish plants under salinity stress. *Journal of Plant Nutrition*, 31(12), 2059-2074.

Zamioudis, C., & Pieterse, C. M. (2012). Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(2), 139-150.

Zak, M. R., Cabido, M., & Hodgson, J. G. (2004). Do subtropical seasonal forests in the Gran Chaco, Argentina, have a future?. *Biological conservation*, 120(4), 589-598.