



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

“Manejo del agua en plantines de *Eucalyptus grandis* y efecto frente a la sequía de la inoculación con bacterias beneficiosas embebidas en un polímero superabsorbente”

Tesis presentada para optar al Título de Doctor/a de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

Lic. José María Chaín

Directora de tesis: Dra. Irene Mabel Baroli
Co-directora de tesis: Dra. Gabriela Amodeo
Consejera de Estudios: Dra. Cecilia Cristina Carmarán

Lugar de trabajo: Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental e Instituto de Biodiversidad y Biología Experimental y Aplicada (IBBEA-CONICET-UBA)

Buenos Aires, 2021

Agradecimientos

Esta tesis fue realizada con el apoyo de muchas personas desde muchos lugares; tantas que podría escribir una segunda tesis solo con sus nombres y lo que han hecho por mí. Doy gracias a todos aquellos que con su invaluable compañía compartieron este camino conmigo y me dieron mucho más de lo que imaginan y de lo que podía esperar.

A Irene Baroli y Gabriela Amodeo, directoras de primer nivel y de una calidad humana ejemplar.

A Gustavo Gudesblat, quien me señaló los primeros pasos de este camino y continúa enseñándome en el trayecto.

A mis colegas de profesión, especialmente a los miembros del laboratorio de relaciones hídricas en plantas, con quienes he compartido mesada de trabajo, charlas de pasillo, congresos, clases, salidas de campo, historias de vida, trueques de suculentas, “no almuerzos” y mucho más; por mostrarme el verdadero rostro de la ciencia.

Agradezco también a las instituciones que avalaron, acogieron y financiaron el desarrollo de esta tesis y me permitieron crecer en mi formación. A la Universidad de Buenos Aires, especialmente al Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Al instituto de Biodiversidad y Biología Experimental y Aplicada del CONICET.

Al Instituto de Fisiología Vegetal del CONICET en la Universidad Nacional de La Plata, especialmente a Corina Graciano, por su buena disposición siempre atenta para llevar este trabajo a su máximo potencial.

Al Instituto Tecnológico de Chascomús del CONICET en asociación con la Universidad de San Martín, especialmente a Nazareno Castagno, Julia Estrella y Fernando Pieckenstain, por su colaboración desde el inicio del proyecto y por compartir generosamente su trabajo.

El más grande de los agradecimientos a mis padres, mis hermanos y mi gran familia. No hay forma en la que pueda devolver todo lo que he recibido de ellos. La abundancia, la gracia y la bendición han estado presentes desde el inicio.

Gracias a todos mis maestros y compañeros de tantas comunidades y de todas las escuelas (académicas y no tanto) que me enseñaron lo que me enseñaron, por los que sé lo que sé, y por quienes soy quien soy.

Gracias a tantos amigos que aunque no los merezca se mantienen a mi lado y deciden amarme del modo que soy. Desde los centrados a los extravagantes, de los cuerdos a los dementes (que somos la mayoría), incluyendo a los que se autodenominan “bonitos y gorditos”, “plantgroup”, “un panda, tres quesos y un jamón”, “tres caballos y un trago”, y otros tan normales como estos.

Esta tesis es un logro compartido del que todos ustedes merecen reconocimiento.

¡Muchas gracias!

Publicaciones realizadas

Los resultados de esta Tesis de doctorado dieron lugar a dos trabajos en revistas indexadas y numerosas participaciones en congresos nacionales e internacionales.

Publicaciones en revistas científicas:

Chaín, J. M., Tubert, E., Graciano, C., Castagno, N., Recchi, M., Pieckenstain, F., Estrella, M. J., Gudesblat, G., Amodeo, G., Baroli, I. 2020. “Growth promotion and protection from drought in *Eucalyptus grandis* seedlings inoculated with beneficial bacteria embedded in a superabsorbent polymer”, Scientific Reports 10 (1): 18221, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75212-4>

Di-Gaudio, A. V., Tubert, E., Laino, L. E., **Chaín, J. M.**, Pitta-Alvarez, S. I., Amodeo, G., Regalado, J. J. 2020. “A new and rapid micropropagation protocol for *Eucalyptus grandis* hill ex maiden”, Forest Systems 29 (1), eSC04, eISSN: 2171-9845 <https://doi.org/10.5424/fs/2020291-15965>

Presentaciones en congresos, reuniones y conferencias:

Chaín, J. M. et al. 2021. “*Arabidopsis thaliana* as a facilitating model for the study of the plant-PGPB-drought interaction in forest crops”, en la XXXIII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal (RAFV)

Chaín, J. M. et al. 2021. “Growth promotion and protection from drought in *Eucalyptus grandis* seedlings inoculated with beneficial bacterial embedded in a superabsorbent polymer”, en la reunion internacional *Plant Biology 2021 Worldwide Summit* (ASPB).

Chaín, J. M. et al. 2019. “Inoculación de bacterias beneficiosas embebidas en una matriz hidrofílica y su efecto frente al estrés hídrico en *Eucalyptus grandis*”, en las jornadas *Exactas y el Agro: aportes a la actividad agropecuaria y agroindustrial* - FCEN-UBA.

Albergoli, F., **Chaín, J. M.**, Baroli, I., Amodeo, G. 2019. “Propiedades hidráulicas de plantines de *Eucalyptus grandis* crecidos en hidroponía”, en las jornadas *Exactas y el Agro: aportes a la actividad agropecuaria y agroindustrial*, FCEN-UBA.

Chaín, J. M. et al. 2019. “Plant growth promoting bacteria and drought stress in *Eucalyptus grandis* seedlings”, en la conferencia internacional *Adapting forest ecosystems and wood products to biotic and abiotic stress*, proyecto Topwood (INRA Francia - INTA).

Chaín, J. M. et al. 2018. “Protection from drought stress in *Eucalyptus grandis* seedlings inoculated with beneficial bacterial strains embedded in a superabsorbent polymer”, en la XXXII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal (RAFV). ISBN 978-987-778-346-9.

Trabajo distinguido en la categoría “**Interacciones Bióticas**”.

Chaín, J. M. et al. 2017. “Plant growth promotion assays in *Eucalyptus grandis* mediated by beneficial bacteria” en la *Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias*. ISSN 1669-9106.



Índices

Índice general

Índice general	5
Índice de figuras	8
Índice de tablas	9
Resumen	10
Introducción	13
1 - Eucalyptus en forestación	14
1.1 - Las plantaciones forestales en el mundo y la forestación en Argentina	14
1.2 - El género <i>Eucalyptus</i>	17
1.3 - La especie <i>E. grandis</i>	20
2 - Principales problemas y soluciones prácticas	21
2.1 - Plantaciones forestales en contexto de cambio climático	21
2.2 - Disponibilidad de nutrientes	21
2.3 - Disponibilidad de agua	23
2.4 - Soluciones prácticas - Mejoramiento a nivel genotípico	25
2.4.1 Manejo de semillas y cepas clonales selectas en Argentina	27
2.5 - Soluciones prácticas - Uso de hidrogeles en forestación.....	28
3 - Bacterias benéficas	30
3.1 - Bacterias benéficas - Diversidad - Mecanismos.....	30
3.2 - Bacterias benéficas y nutrientes.....	31
3.3 - Bacterias benéficas y sequía.....	32
3.4 - El género <i>Pseudomonas</i>	34
4 - Formulaciones de bioinoculantes	35
4.1 - La aplicación de PGPB en formulaciones comerciales.....	35
4.2 - Bioinoculantes más usados - Regulaciones de calidad	38
5 - Antecedentes de intersección entre áreas temáticas	40
5.1 - Áreas temáticas: Forestales - Hidrogeles - PGPB - Estrés	40
Objetivos	42
Hipótesis	43
Materiales y Métodos	44
1 - Origen y mantenimiento de la colección de bacterias	45
2 - Pruebas de germinación	46
3 - Ensayos exploratorios en <i>Eucalyptus grandis</i>	47
3.1 - Diseño experimental general.....	47
3.2 - Ensayos de deficiencia de fósforo	48
3.3 - Ensayos de deficiencia nutricional generalizada	49
4 - Ensayos exploratorios en <i>Arabidopsis thaliana</i>	49
4.1 - Diseño experimental general.....	49

4.2 - Ensayo de tolerancia a la sequía.....	50
4.3 - Ensayo de comparación entre métodos de inoculación.....	50
5 - Ensayos de tolerancia a la sequía en <i>Eucalyptus grandis</i>.....	51
5.1 - Diseño experimental general.....	51
5.2 - Ensayo de inoculación individual y sequía gradual en invernadero	53
5.3 - Ensayo de inoculación individual y sequía rápida en cámara de cultivo	54
5.4 - Ensayo de coinoculación y sequía rápida en cámara de cultivo	54
6 - Medición de variables en <i>Eucalyptus grandis</i>	55
6.1 - Variables relacionadas al crecimiento y a la biomasa	55
6.2 - Variables relacionadas al manejo del agua y a la fotosíntesis	57
7 - Transformación de M25 y N33	59
8 - Análisis de la supervivencia de M25 y N33	60
8.1 - En la matriz del SAPH.....	60
8.2 - En diferentes sustratos con o sin SAPH	61
9 - Localización de las bacterias	61
9.1 - Luego de sequía en sustrato sin esterilizar	61
9.2 - Localización y efecto sobre raíces en microescala	62
10 - Análisis estadístico	63
10.1 - Pruebas de germinación	63
10.2 - Ensayos exploratorios y de tolerancia a la sequía	64
10.3 - Análisis multivariados	65
Resultados	67
Sección 1 - Selección de las cepas bacterianas.....	68
1.1 - Pruebas de germinación	69
1.2 - Ensayos exploratorios.....	72
1.2.1 - Ensayos de deficiencia de fósforo en <i>Eucalyptus grandis</i>	73
1.2.2 - Ensayos de deficiencia nutricional generalizada en <i>Eucalyptus grandis</i>	79
1.2.3 - Ensayo exploratorio de tolerancia a la sequía en <i>Arabidopsis thaliana</i>	86
1.2.4 - Comparación de métodos de inoculación utilizando <i>Arabidopsis thaliana</i>	87
1.3 - Selección de M25 y N33	88
Sección 2 - Supervivencia y localización de las cepas bacterianas seleccionadas.....	90
2.1 - Supervivencia de M25 y N33 en la matriz del SAPH aislado.....	91
2.2 - Supervivencia de M25 y N33 en diversos sustratos con o sin SAPH.....	92
2.3 - Localización de M25 y N33 en la planta y la rizosfera luego de sequía	95
2.4 - Localización y efecto sobre raíces en microescala	98
Sección 3 - Efecto de la inoculación de M25 y N33 en la tolerancia a la sequía en plantines de <i>E. grandis</i>.....	102
3.1 - Inoculación individual y sequía gradual en invernadero	103
3.2 - Inoculación individual y sequía rápida en cámara de cultivo	108
3.3 - Coinoculación y sequía rápida en cámara de cultivo	118
3.4 - Patrones en análisis multivariados	124
3.4.1 - Asociación entre variables - Correlaciones bivariadas	124
3.4.2 - Análisis de componentes principales	131

Discusión	135
1 - Pruebas de germinación y ensayos exploratorios	136
2 - Supervivencia y localización de bacterias	138
3 - Efecto de la inoculación sobre las raíces en microescala	141
4 - Ensayos de sequía en <i>E. grandis</i>	142
4.1 - Cierre estomático temprano y propiedades hidráulicas del vástago	142
4.2 - Intercambio gaseoso e índice de verdor	146
4.3 - Área foliar, crecimiento y biomasa en relación a otras variables	149
5 - Diferencias entre diseños experimentales y fuentes de variación	152
Conclusión	155
Bibliografía	156
Anexo 1	168
Anexo 2	170
Anexo 3	172
Anexo 4	173

Índice de figuras

Introducción	13
Figura I1: Distribución de plantaciones forestales en Argentina	19
Figura I2: Cadena de desarrollo tecnológico de las nuevas formulaciones de bioinoculan	37
Materiales y Métodos	44
Figura M1: Esquema comparativo del régimen de riego de los grupos estresados en cada ensayo 52	
Figura M2: Esquema y unidades experimentales representativas de los ensayos exploratorios y los experimentos de sequía en <i>E. grandis</i>	55
Figura M3: Esquema de siembra de muestras para el rastreo de bacterias fluorescentes	60
Resultados	67
Figura R1.1: Selección de cepas bacterianas por su efecto sobre la germinación de semillas de <i>E. grandis</i>	71
Figura R1.2: Efecto de la inoculación con M25 en plantines de <i>E. grandis</i> sometidos a estrés por deficiencia de fósforo en invernadero.....	74
Figura R1.4: Efecto de la inoculación con M25 o N32 en plantines de <i>E. grandis</i> sometidos a estrés por deficiencia de fosforo en cámara de cultivo	76
Figura R1.5: Determinación de la tasa fotosintética (P_n) en función de la intensidad de luz fotosintéticamente activa (PAR	77
Figura R1.6: Evaluación de parámetros del intercambio gaseoso en plantines de <i>E. grandis</i> inoculados con M25 o N32 y sometidos a estrés por deficiencia de fósforo en cámara de cultivo..	78
Figura R1.7: Efecto de la inoculación con N32 en plantines de <i>E. grandis</i> sometidos a estrés por deficiencia generalizada de nutrientes en cámara de cultivo	80
Figura R1.8: Evaluación de parámetros del intercambio gaseoso en plantines de <i>E. grandis</i> inoculados con N32 y sometidos a estrés por deficiencia generalizada de nutrientes en cámara de cultivo	81
Figura R1.9: Efecto de la inoculación con BT2 o N33 en plantines de <i>E. grandis</i> sometidos a estrés por deficiencia generalizada de nutrientes en cámara de cultivo	83
Figura R1.10: Evaluación de parámetros del intercambio gaseoso en plantines de <i>E. grandis</i> inoculados con BT2 o N33 y sometidos a estrés por deficiencia generalizada de nutrientes en cámara de cultivo	85
Figura R1.11: Efecto benéfico de M25 y N33 en <i>Arabidopsis thaliana</i> sometidas a estrés hídrico por suspensión del riego	86
Figura R1.12: Comparación entre el método de inoculación convencional por riego o a través del SAPH en <i>Arabidopsis thalia</i>	88
Figura R2.1: Supervivencia de las cepas M25 y N33 embebidas en la matriz de un polímero superabsorbente acrílico-celulósico (SAPH)	92
Figura R2.2: Supervivencia de las cepas M25 y N33 en distintos sustratos, inoculadas por riego o embebidas en el SAPH	94
Figura R2.3: Localización de bacterias marcadas con GFP luego de un experimento de estrés por sequía en plantines de <i>E. grandis</i> cultivados en suelo no estéril	97
Figura R2.4: Efecto de M25 y N33 sobre vástago de plántulas de <i>E. grandis</i> y <i>A. thaliana</i> cultivadas en placas con medio agarizado.....	101
Figura R3.1: Efecto de la inoculación con M25 o N33 en plantines de <i>E. grandis</i> sometidos a estrés por sequía gradual en invernadero.....	105
Figura R3.2: Conductancia estomática (g_s) de los plantines de <i>E. grandis</i> sometidos estrés por sequía gradual en invernadero	107

Figura R3.3: Variación en el tiempo del índice de área foliar de plantines de <i>E. grandis</i> en cámara de cultivo	110
Figura R3.4: Efecto de la inoculación con M25 o N33 en plantines de <i>E. grandis</i> sometidos a estrés por sequía rápida en cámara de cultivo	112
Figura R3.5: Índice de crecimiento comparado entre el ensayo en invernadero y en cámara de cultivo en un mismo tiempo desde el trasplante	113
Figura R3.6: Distribución de la biomasa registrada al momento de la cosecha de los eucaliptos en los ensayos de estrés por sequía	115
Figura R3.7: Evaluación de parámetros del intercambio gaseoso en plantines de <i>E. grandis</i> sometidos a estrés por sequía rápida	117
Figura R3.8: Efecto de la coinoculación con M25 y N33 en plantines de <i>E. grandis</i> sometidos a estrés por sequía rápida en cámara de cultivo	120
Figura R3.9: Conductancia estomática (g_s) de plantines de <i>E. grandis</i> coinoculados con M25 y N33, sometidos a estrés por sequía rápida en cámara de cultivo	121
Figura R3.10: Evaluación de parámetros del intercambio gaseoso en plantines de <i>E. grandis</i> coinoculados con M25 y N33 y sometidos a estrés por sequía rápida	123
Figura R3.11: Estudio de la relación entre variables mediante correlaciones bivariadas	128
Figura R3.12: Análisis de la relación entre el consumo de agua y el tamaño de los plantines de <i>E. grandis</i>	130
Figura R3.13: Gráfico <i>biplot</i> de los primeros dos componentes, CP1 y CP2, obtenidos en el análisis de componentes principales	134

Índice de tablas

Resultados	67
Tabla R1.1: Área foliar total de plantines de <i>E. grandis</i> sometidos a estrés por deficiencia generalizada de nutrientes en cámara de cultivo	82
Tabla R2.1: Efecto de M25 y N33 sobre la morfología del sistema radicular de plántulas de <i>E. grandis</i> y <i>A. thaliana</i> cultivadas en placas con medio agarizado	101
Tabla R3.1: Mediciones hidráulicas del vástago de plantines de <i>E. grandis</i> cultivados en invernadero	108



Resumen

Manejo del agua en plantines de *Eucalyptus grandis* y efecto frente a la sequía de la inoculación con bacterias beneficiosas embebidas en un polímero superabsorbente

El pasaje de plantines de *Eucalyptus* de invernaderos comerciales a campo representa una etapa crítica donde la tolerancia a condiciones ambientales adversas impacta sobre el futuro potencial de la plantación forestal. Inocular bacterias beneficiosas (PGPB) es una estrategia para favorecer la tolerancia al estrés abiótico, pero su uso en forestales es escaso debido a las dificultades que presenta su aplicación. Un recurso cada vez más empleado en forestación es utilizar polímeros hidrofílicos superabsorbentes (SAPs) para mitigar el déficit hídrico durante el despegue. Esta tesis desarrolla como herramienta biotecnológica la inoculación de bacterias en el entorno radicular de plantines de eucalipto utilizando como vehículo un SAP fabricado por nuestro laboratorio. Para ello se seleccionaron cepas bacterianas promisorias; se realizaron ensayos de tolerancia a estrés abiótico a diferentes escalas con las cepas seleccionadas y se realizó una caracterización hidráulica de los plantines. Los resultados mostraron que la inoculación con dos *Pseudomonas* promueve el crecimiento de los eucaliptos en condiciones óptimas y mejora la recuperación del área foliar, la regulación estomática y el contenido de agua luego de un período de sequía. Los efectos benéficos no solo fueron consistentes entre los distintos ensayos sino que se logró observar sinergismo al inocular simultáneamente ambas cepas seleccionadas. Los ensayos de reobtención del inóculo mostraron que las bacterias permanecen viables durante el período crítico de implantación y que la matriz del SAP es funcional para la potencial aplicación de PGPB a campo.

Palabras claves: *Eucalyptus grandis*, eucalipto, estrés hídrico, polímero superabsorbente, SAP, PGPB, *Pseudomonas*, propiedades hidráulicas.

Water management in *Eucalyptus grandis* seedlings and drought stress tolerance by inoculation with beneficial bacteria embedded in a superabsorbent polymer

The outplanting of greenhouse-grown *Eucalyptus* seedlings to the field represents a critical stage in which tolerance to adverse environmental conditions determines the outcome of the forest plantation. Inoculating beneficial bacteria (PGPB) is an environmentally friendly strategy to promote abiotic stress tolerance, but its use in forestry is scarce due to difficulties in its application. On the other hand, superabsorbent hydrophilic polymers (SAPs) are used to mitigate the effects of water deficit during initial growth. This thesis focused on the development of a biotechnological tool to protect eucalypt seedlings from stress by combining the inoculation of PGPB with the application, in the root proximity, of an SAP manufactured in our laboratory. With this aim, promising bacterial strains were selected and tested for their ability to confer abiotic stress tolerance at different scales of growth, and a hydraulic characterization of seedlings was carried out. The results showed that inoculation with two selected *Pseudomonas* strains promotes eucalypt growth under optimal conditions and improves the recovery of leaf area, normal stomatal conductance, and internal water content after a drought period. The beneficial effects were not only consistent among the different growth scales, but a synergistic effect was observed when both selected strains were inoculated together. Inoculum recovery tests showed that the bacteria remain viable during the critical implantation period and indicated that the SAP matrix could be a suitable vehicle for the application of PGPB in the field.

Key words: *Eucalyptus grandis*, eucalypt, water stress, superabsorbent polymer, SAP, PGPB, *Pseudomonas*, hydraulic properties.



Introducción

1 - *Eucalyptus* en forestación

1.1 - Las plantaciones forestales en el mundo y la forestación en Argentina

Las plantaciones forestales, tanto de especies nativas como de exóticas, cumplen un rol ecológico importante ya que su existencia ayuda a reducir la extracción de recursos desde los bosques naturales a nivel mundial y constituyen un importante sumidero de dióxido de carbono que contribuye al control de su concentración atmosférica.

Los bosques nativos a nivel mundial están sufriendo una tendencia a la reducción, tanto por cambios en el uso de la tierra hacia otras actividades productivas, como por la deforestación, que frecuentemente carece de una regulación que establezca límites a la extracción de recursos naturales. La pérdida de reservorios de carbono en biomasa de bosques ha superado las 11 gigatoneladas en los últimos 30 años. Esta situación se manifiesta con mayor severidad en África y Sudamérica, donde la Argentina se encuentra entre los diez países con la tasa anual más alta de pérdida de área forestal (FAO, 2016).

Aunque la tendencia global muestra una dirección negativa en cuanto al área total de tierras boscosas, el área global de plantaciones forestales con fines productivos ha aumentado en un promedio de 4.4 millones de hectáreas por año en el período de 1990 a 2015 (Payn *et al.*, 2015). En el caso particular de Argentina, se proyecta un incremento de alrededor del 48% del área dedicada a forestación para 2030, respecto a los valores de producción censados en 2015 (d'Annunzio *et al.*, 2015). Este incremento en tierras dedicadas a silvicultura es acompañado con un aumento en la capacidad de monitoreo, sensado remoto y registro de inventario de los recursos forestales a nivel mundial y en Argentina en particular, lo que demuestra un interés en el desarrollo de esta área productiva (Romijn *et al.*, 2015).

La tendencia a la reducción de los bosques naturales junto al incremento de bosques cultivados en la mayor parte del mundo, muestra la existencia de un proceso de "reemplazo" de tierras forestales nativas hacia otras implantadas, donde la necesidad de establecer programas de manejo que involucren estrategias productivas sustentables se vuelve cada vez más importante (FAO, 2016). El objetivo de estas estrategias debe

estar orientado a la optimización de las plantaciones existentes de tal forma de intensificarlas y aumentar su productividad, para evitar la necesidad de expandir las zonas de plantación hacia áreas nuevas y minimizar el uso de agua y fertilizantes (Payn *et al.*, 2015).

A nivel comercial, las plantaciones forestales son una fuente fundamental de madera y de materia prima para la industria papelera y la producción de biocombustibles, sumado a que constituyen un sector que ofrece gran cantidad de puestos de empleo a lo largo de la cadena productiva (Laharrague *et al.*, 2015; FAO, 2016). A la vez, la biomasa de origen forestal es una de las materias primas más baratas y que menor emisión de gases de efecto invernadero genera en su proceso productivo (Alcobé *et al.*, 2013), funcionando como un buen reemplazo de los combustibles fósiles en la generación de energía (Daystar *et al.*, 2014).

Por otro lado, la conservación de la biodiversidad se ha transformado en uno de los objetivos centrales en el manejo sostenible de bosques naturales o destinados a la producción (FAO, 2016). Desde hace décadas, los distintos gobiernos en Argentina reconocen a la industria forestal como un sector estratégico para el desarrollo social, ambiental y económico del país. Para proteger las funcionalidades sociales y ambientales, frecuentemente desplazadas por el aspecto económico, en el año 2007 se promulgó la ley 26.331, comúnmente llamada “ley de bosques”. Ésta define los presupuestos mínimos para el enriquecimiento, restauración, conservación, aprovechamiento y manejo sostenible de los bosques nativos y los servicios ambientales que estos proveen. Por otro lado, la ley permite a cada provincia elaborar un plan de reordenamiento territorial que determine las zonas de bosques nativos amparadas bajo la protección nacional y las distinga de aquellos sectores habilitados para cultivos con fines comerciales. A pesar de la existencia de esta normativa dirigida a la protección de los ecosistemas forestales autóctonos, el análisis de escenarios futuros muestra que la pérdida de biodiversidad y conectividad de bosques ocurre de igual forma si cada provincia estructura sus zonas protegidas de forma independiente (Piquer-Rodríguez *et al.*, 2015). Para que esto no ocurra, la iniciativa debe ser coordinada para que las zonas destinadas a conservación se estructuren de tal manera de priorizar la continuidad de los bosques, es decir, minimizar la fragmentación de estos ecosistemas para reducir la incidencia del “efecto borde” que los ambientes antropizados ejercen sobre un ecosistema nativo.

En este aspecto, las plantaciones forestales son un elemento fundamental a considerar para minimizar el efecto negativo de la fragmentación, ya que tienen la capacidad de establecer conexiones ecosistémicas entre los corredores boscosos naturales, aunque el impacto sobre la biodiversidad de las forestaciones implantadas es controversial. Mientras algunos autores se oponen a la perspectiva de utilizar plantaciones como conectores de ambientes naturales por los ciclos de corte y reforestación que experimentarán esas zonas (Stephens & Wagner, 2007), otros registran que las plantaciones forestales, incluso de especies exóticas (particularmente cultivos de eucaliptos), pueden favorecer la regeneración de especies del sotobosque en áreas degradadas y aumentar las poblaciones de especies animales, mientras comunican sectores forestales separados (Diaz *et al.*, 2006). Siempre será preferible la preservación del bosque nativo, pero las forestaciones en general permiten un mayor cuidado de la biodiversidad frente a otros usos de la tierra de carácter más intensivo, contribuyendo a dar continuidad a los parches de vegetación natural (Stephens & Wagner, 2007).

Con el objetivo de aumentar la superficie nacional forestada y promover la producción foresto-industrial de forma sostenible y competitiva, se acompañó el desarrollo de este sector con el acceso a beneficios financieros para las producciones y proyectos referentes a esta área. En los años 1997 y 1998 se sancionaron las leyes 24.857 y 25.080, respectivamente. La primera establece que toda actividad forestal, así como el aprovechamiento de bosques, gozará de estabilidad fiscal a partir de la evaluación positiva de factibilidad del proyecto respectivo y durante un plazo de hasta 33 años. La segunda instituye un régimen de inversiones dirigidas a nuevos emprendimientos forestales y a la ampliación de bosques existentes. La iniciativa propuesta por esta ley fue apoyada y ratificada por su prórroga mediante las leyes 26.432 (2008) y 27.487 (2019) que incorporan las modificaciones pertinentes para que esta normativa no resulte incompatible con lo designado por la ley 26.331 sobre protección de bosques nativos.

La legislación Argentina comprende dentro del objeto “bosque” a toda población arbórea tanto de origen natural (“bosque nativo”) o implantado (“bosque cultivado”) ya sea con especies autóctonas o exóticas). El artículo 3 de la ley 25.080 establece que las actividades comprendidas en el régimen de inversiones son: *“la implantación de bosques, su mantenimiento y su manejo sostenible incluyendo las actividades de investigación y desarrollo, así como las de industrialización de la madera, cuando el conjunto de todas ellas formen parte de un emprendimiento forestal o foresto-industrial*

integrado". Este régimen de inversión establecido por la ley 25.080 contempla un sistema de apoyo económico no reintegrable relacionado al rubro de la forestación. Con esto se estimula la realización de diversos emprendimientos, desde el manejo de bosques nativos y cultivados, hasta el desarrollo científico o la comercialización de los derivados de la industria forestal. El registro de apoyos económicos no reintegrables ([Anexo 1](#)) otorgados por esta ley muestra una inversión nacional de \$592.216.494 durante el 2019, ascendiendo a un total general de \$2.136.297.411 en el período comprendido entre los años 2000 y 2019, lo que manifiesta el énfasis de la política estatal en el desarrollo de la industria forestal. El mismo registro muestra también que un 85% del total de lo invertido fue destinado a apoyar los proyectos forestales de la región litoral (Entre Ríos, Corrientes y Misiones), que concentra la mayor parte de los bosques implantados de Argentina (Figura [1a](#)), entre los que se encuentran vastas extensiones de cultivos de coníferas y eucaliptos como los grupos de mayor representación a nivel nacional.

1.2 - El género *Eucalyptus*

Dentro de los árboles utilizados para forestación comercial en el mundo, se destaca la presencia internacional de diversas especies del género *Eucalyptus*. En los últimos 200 años, el género pasó de ser una novedad botánica a una de las mayores fuentes de materia prima para la industria papelera y la fabricación de tableros, biocombustibles y carbón vegetal (Booth, 2013). El género *Eucalyptus* pertenece a la familia Myrtaceae y abarca más de 700 especies, adaptadas principalmente a climas mediterráneos. Generalmente presentan un rápido crecimiento y alta producción de madera en poco tiempo (Daystar *et al.*, 2014), junto con una gran plasticidad, resistencia y resiliencia a la acción negativa de factores ambientales, aunque muestran sensibilidad a bajas temperaturas (Beale & Ortíz, 2013). La fuerte plasticidad de los eucaliptos permite plantarlos en un amplio espectro de ambientes y debido a esto, se registran más de 20 millones de hectáreas distribuidas en más de 90 países alrededor del mundo, con focos fuertes en Brasil, India y China (4,9; 3,9 y 2,6 millones de hectáreas respectivamente; Booth, 2013).

Argentina cuenta con alrededor de 27 millones de hectáreas de tierras forestales (Alcobé *et al.*, 2013), de las cuales 1,3 millones ha corresponden a plantaciones con fines productivos. Un 25% de estas últimas están ocupadas con eucaliptos (Figura [1a](#)). La diversidad interespecífica de este género es aprovechada para establecer

plantaciones en ambientes diversos, según las cualidades de cada especie en particular (Figura [11b](#)). *E. tereticornis* y *E. camaldulensis* son especies de climas cálidos que se caracterizan por presentar mayor tolerancia natural a sequía y salinidad dentro del género, y por eso son las especies elegidas para plantar en la región centro-norte del país. *E. viminalis* se destaca por su buen crecimiento en climas templado-fríos, convirtiéndola en una especie apta para plantar en la región pampeana. *E. dunii* y *E. urophylla* presentan buena aclimatación a rangos amplios de temperatura, tolerando satisfactoriamente el estrés por calor o por frío, sin embargo, son especies con una velocidad de crecimiento menor, por lo que usualmente se utilizan para la generación de híbridos con especies de mayor productividad. *E. grandis* es una de las especies de mayor velocidad de crecimiento dentro del género; exhibe una buena aclimatación al calor pero poca tolerancia a la sequía. Su plantación en Argentina se concentra en la región mesopotámica (Golfari, 1985). En esta región se localizan los focos de producción forestal nacional, en su mayoría coníferas y eucaliptos (fundamentalmente *E. grandis*; figura [11](#)). Allí se encuentra la mayor proporción de los aserraderos del país. El 90% de la materia prima que éstos reciben proviene de especies cultivadas, no nativas, de los cuales, un 35% corresponde a eucaliptos con aptitud maderera (Laharrague *et al.*, 2015).

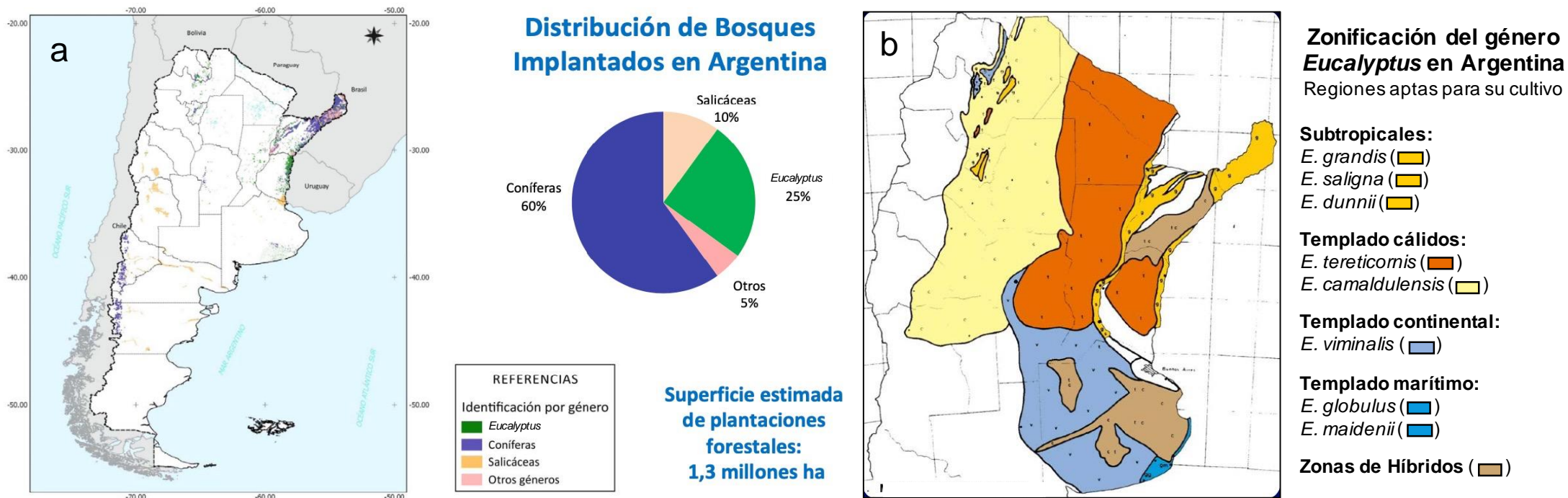


Figura 11: Distribución de plantaciones forestales en Argentina. (a) Distribución geográfica y proporción de los principales grupos de forestales exóticas implantadas en Argentina con fines productivos. Los datos corresponden a censos realizados durante el 2019 por la Dirección Nacional de Desarrollo Foresto-Industrial, perteneciente al Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (DNDFI-MAGyP; disponibles en: https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/ss_desarrollo_foresto_industrial). (b) Potenciales zonas de plantación de distintas especies de eucaliptos según sus características particulares. Figura modificada de Golfari, 1985.

1.3 - La especie *E. grandis*

Si bien el género es muy diverso y se utilizan más de 110 especies de eucalipto como plantaciones exóticas en el mundo, unas pocas especies concentran la mayor representatividad en las áreas implantadas. *Eucalyptus grandis* se encuentra entre los “9 grandes del género” (Booth, 2013). Es la especie forestal más ampliamente plantada en el mundo, fundamentalmente en regiones tropicales y subtropicales (Tariq *et al.*, 2019) y la principal especie forestal latifoliada cultivada comercialmente en Argentina (Harrand *et al.*, 2017). Se la puede encontrar establecida en la Mesopotamia, sobre todo en la provincia de Entre Ríos, en las proximidades del río Uruguay (Figura [1a](#)). Su gran difusión se debe a su buena adaptación y rápido crecimiento en condiciones edafoclimáticas variadas, aunque es sensible a las heladas y al drenaje deficiente del suelo (Bonnin *et al.*, 2015). La mayoría de las zonas donde se establecen las plantaciones de *E. grandis* presentan suelos arenosos de baja fertilidad (García, 2017). Dentro del rubro se la clasifica como especie de alta productividad y rápido crecimiento y su importancia aumenta al considerar el amplio rango de usos que se le da a los recursos que provee (Beadle & Sands, 2004). El ciclo de rotación y permanencia en cultivo normal de las plantaciones de *E. grandis* se encuentra entre los 8 y 15 años, con un rendimiento anual de 35 a 50 m³ ha⁻¹ (Alcobé *et al.*, 2013). Pese a que su madera es considerada de baja calidad para su aplicación en arquitectura, *E. grandis* es una especie apta para la producción de pastas celulósicas, tableros y aglomerados. En Argentina esos usos con frecuencia se ven restringidos debido a que los centros de cultivo y los de procesamiento se encuentran distanciados, por lo tanto, la mayor parte de la producción se envía a aserraderos para generar elementos de construcción y fabricación de cajones para frutas. Secundariamente, su madera se utiliza también para la confección de muebles rústicos y elementos del hogar (Beale & Ortíz, 2013).

2 - Principales problemas y soluciones prácticas

2.1 - Plantaciones forestales en contexto de cambio climático

Las proyecciones respecto a cambios ambientales, tales como el aumento de la temperatura y aridez mundial, no muestran un panorama favorable para la salud forestal (Bailey-Serres *et al.*, 2019; Payn *et al.*, 2015). A la vez, el aumento en la población mundial trae consigo un incremento en la demanda de alimentos y otros recursos para suplir las necesidades de la población (Lugtenberg, 2015; Payn *et al.*, 2015). Se estima que la extensión de las áreas forestales cultivadas y su productividad no podrá crecer al mismo ritmo que crecerá la demanda de recursos que proveen, poniendo en riesgo el abastecimiento de materia prima biomásica y maderera para las industrias involucradas (Bailey-Serres *et al.*, 2019; Payn *et al.*, 2015). Para responder a estas presiones se deben poner en práctica estrategias emergentes innovadoras que alivien el impacto del cambio climático (Payn *et al.*, 2015), aumenten la resiliencia de los cultivos y aseguren la producción sustentable en un esfuerzo cooperativo entre productores, criadores y científicos (Bailey-Serres *et al.*, 2019).

Globalmente, se observa una tendencia a la reducción de los reservorios de agua disponibles para cultivos (Allen *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2020) y a la escasez de nutrientes minerales por erosión de los suelos (Dell *et al.*, 2001). Estos dos factores de estrés son las causas principales de la limitación en el desarrollo de plantines forestales en estadios tempranos y conducen a la disminución de la supervivencia y el rendimiento de los cultivos silvícolas (Grossnickle, 2005). Para atender los objetivos de sustentabilidad en producciones forestales es necesario comprender cómo la falta de nutrientes y agua afectan a los individuos, para luego elaborar soluciones que aborden estos problemas.

2.2 - Disponibilidad de nutrientes

La disponibilidad y accesibilidad de nutrientes minerales es uno de los factores más importantes que controla el desarrollo de los árboles, sobre todo en plantines

forestales recientemente implantados en el campo (Grossnickle, 2005). Su presencia en la rizosfera determina la supervivencia de los individuos y afecta el rendimiento futuro del cultivo (Dell *et al.*, 2001). La calidad del suelo influye en el manejo forestal que se hace en las plantaciones comerciales y se ha registrado que en Argentina los suelos donde se cultiva la mayor proporción de *E. grandis* son de tipo arenoso y de baja fertilidad (Bonnin *et al.*, 2015). Debido a esto, es rutinario el agregado de grandes cantidades de fertilizantes con el fin de aumentar las tasas de crecimiento. En general, se utilizan suplementos granulados conteniendo nitrógeno, fósforo y potasio, que son aplicados superficialmente luego de la implantación de los eucaliptos en su lugar definitivo en el campo (Tubert *et al.*, 2018). El problema con este tipo de aplicaciones es que una fracción mayoritaria del fertilizante suele perderse sin ser captado por las plantas, que sólo logran aprovechar entre el 10 y el 40% de lo suministrado (Bhardwaj *et al.*, 2014). Las cantidades masivas de fertilizantes aplicadas compensan en parte la baja eficiencia de captación pero plantean un desafío ambiental, por la contaminación y eutrofización de cursos de agua que puede generar. Por esa razón, reducir el uso de fertilizantes es una práctica a mejorar en la búsqueda de una forestación sustentable (Daystar *et al.*, 2014; Jawjit *et al.*, 2007).

El problema se agrava cuando la deficiencia nutricional comienza a afectar otras funciones interconectadas. La eficiencia en el aprovechamiento de los fertilizantes depende fuertemente de la condición hídrica de los individuos (Graciano *et al.*, 2005; Tariq *et al.*, 2019). En sentido contrario, una mejor nutrición permite dar respuestas más eficientes al estrés hídrico; sin embargo, más fertilización también significa mayor consumo de agua, lo que lleva a posibles insuficiencias de riego (Battie-Laclau *et al.*, 2014). Una buena calidad nutricional al momento de la implantación también se relaciona con la capacidad de superar eventos críticos (como heladas o la competencia con malezas) por parte de los eucaliptos (Bonnin *et al.*, 2015).

Dentro de los requerimientos nutricionales en plantaciones comerciales, el fósforo se ha caracterizado como el nutriente que más limita el desarrollo de *E. grandis* en los suelos donde se cultiva. Suele presentarse en formatos insolubles y de difícil acceso (Tng *et al.*, 2014). La falta de fósforo genera limitaciones fotosintéticas y deficiencias de crecimiento (Tariq *et al.*, 2019). Además de los perjuicios sobre la productividad, los desórdenes nutricionales de diversos minerales pueden derivar en síntomas como defoliación, caída prematura de hojas en formación, generación de daño oxidativo, incapacidad de efectuar respuestas inmunes y deformidades en el desarrollo (Dell *et al.*, 2001). La estrategia más registrada en eucaliptos para subsanar la falta de

nutrientes en general es la alteración de la arquitectura radicular y la redistribución de recursos desde el vástago a las raíces para favorecer la exploración del suelo en busca de nuevas fuentes de nutrientes, pero no es una respuesta que ocurra siempre de la misma forma ya que la estrategia específica puede depender del nutriente en escasez (Graciano *et al.*, 2016). Al estar cada mineral involucrado en diversas funciones fisiológicas y estructurales dentro de los organismos, la respuesta para mitigar la carencia de algún tipo de nutriente puede variar significativamente de acuerdo a la disponibilidad de todos los recursos en conjunto. Se requiere de mayor investigación para conocer las bases de este fenómeno y desarrollar estrategias tecnológicas robustas aplicables a campo.

2.3 - Disponibilidad de agua

La sequía genera más pérdidas anuales de rendimiento de cultivos que todos los patógenos juntos (Gupta *et al.*, 2020). El estrés hídrico restringe fuertemente la productividad de los ecosistemas forestales (Allen *et al.*, 2010), generando fallas hidráulicas que constituyen un aspecto dominante en la mortalidad de bosques (Sapes *et al.*, 2019). Las especies del género *Eucalyptus* presentan un alto consumo de agua, lo que frecuentemente puede llevarlas a enfrentar problemas de desabastecimiento (Caldato & Schumacher, 2013; Diaz *et al.*, 2006). En las plantaciones de eucalipto, la disponibilidad de agua es el factor ambiental que limita en mayor medida el crecimiento y desarrollo de los individuos (Bonnin *et al.*, 2015).

Una plantación madura de *E. grandis* en la localidad de Concordia, Entre Ríos, consume para la producción de biomasa aproximadamente el 55% de la precipitación que recibe en un año promedio, mientras el resto se distribuye entre el retorno a la atmósfera por evaporación directa del suelo, el escurrimiento horizontal o la percolación a las capas más profundas del suelo, donde queda disponible solo para aquellos individuos que logren extender su sistema radical hasta alcanzarlas (Diaz *et al.*, 2006).

La baja disponibilidad de agua en el suelo y la disminución de las lluvias afecta sobre todo a los bosques inmaduros e individuos jóvenes, en los que se han registrado disminuciones de hasta un tercio del rendimiento potencial (Booth, 2013). La etapa de establecimiento es un período particularmente sensible a la falta de agua en las plantaciones madereras industriales (Crous, 2017; García, 2017), debido a la alta demanda evaporativa en áreas de gran exposición a la radiación solar. En esta etapa,

el riego debe ser mayor para favorecer la supervivencia de los plantines trasplantados ya que resulta un paso crítico en la producción, independientemente de la calidad y del genotipo de los plantines de partida, registrando la tasa de mortalidad más alta de todo el proceso (García, 2017). Este hecho se puede atribuir en parte a la exigente necesidad de aclimatación a la que se ven forzados los plantines luego de ser trasplantados desde un invernáculo de condiciones controladas a su posición definitiva en el campo, lo que se denomina “estrés por trasplante” (Crous, 2017). Sumado a esto, en la mayoría de los casos, los eucaliptos dependen de forma exclusiva de las precipitaciones y de las propiedades del suelo para la adquisición, retención y aprovechamiento del agua. Más aún, bajos potenciales hídricos en el sustrato impactan negativamente en la elongación radicular de los árboles jóvenes, lo que hace a la sequía un importante riesgo para su supervivencia, inmediatamente luego de la implantación en el campo. Es esencial un rápido crecimiento del sistema radicular para el éxito del trasplante, porque asegura el acceso al agua y los nutrientes requeridos para un vigoroso despegue inicial que determine una posición favorable de los plantines frente a la competencia por la luz que se establece con otras especies vegetales en un ambiente con bajo control de las malezas (Grossnickle, 2005).

La susceptibilidad de las plantas a la sequía y el desarrollo de estrategias de tolerancia dependen de múltiples factores como la especie, el estadio de crecimiento y la severidad, frecuencia y duración del estrés (Allen *et al.*, 2010). En general la tolerancia a la sequía se basa en minimizar la pérdida de agua y/o maximizar su obtención (Gupta *et al.*, 2020; Harfouche *et al.*, 2014). En el corto plazo, las plantas responden a la falta de agua disminuyendo la transpiración a través del control de la conductancia estomática. Esta estrategia no puede ser mantenida en el tiempo de forma indefinida, ya que trae como consecuencia la restricción en la incorporación del CO₂ necesario para la fotosíntesis y el aumento de la temperatura interna de la planta (Utkhao & Yingjajaval, 2015; Warren *et al.*, 2012). Cuando el estrés hídrico es severo o prolongado, la caída de hojas contribuye a reducir la tasa transpiratoria a nivel de planta entera. Este comportamiento es común en muchas especies del género *Eucalyptus* (Merchant *et al.*, 2007; Nouvellon *et al.*, 2010; Tariq *et al.*, 2019; Warren *et al.*, 2011) pero tiene la desventaja de causar retrasos en el crecimiento y reducciones substanciales en la productividad. Otra estrategia observada en plantines de eucalipto bajo estrés hídrico moderado es la de incrementar la distribución de recursos destinados a raíces de tal forma de maximizar la obtención de agua por expansión de la rizosfera (Whitehead & Beadle, 2004). Los ajustes osmóticos y elásticos permiten a las plantas continuar con la expansión celular y mantener el contenido de agua interno en medio de una sequía.

Como resultado, la fotosíntesis y el crecimiento son mayores en plantas que pueden efectuar dichos ajustes osmóticos y elásticos en respuesta a la escasez de agua. A nivel celular las especies de *Eucalyptus*, y en particular *E. grandis*, mantienen la turgencia de las células en condiciones de déficit hídrico mediante la acumulación activa de solutos orgánicos, como prolina, y a través del ajuste de la elasticidad de sus paredes celulares (Graciano *et al.*, 2005; Merchant *et al.*, 2007; Tariq *et al.*, 2019; Warren *et al.*, 2011, 2012).

2.4 - Soluciones prácticas - Mejoramiento a nivel genotípico

Las proyecciones climáticas postulan que las regiones utilizadas globalmente para la producción de eucaliptos sufrirán una severa deficiencia de agua en el futuro cercano (Dai, 2011). Es por eso que se vuelve cada vez más relevante el desarrollo de estrategias que maximicen el uso eficiente de este recurso y la tolerancia a la sequía en este género.

Los programas de mejoramiento y selección de eucaliptos con características genéticas superiores se han implementado desde el inicio de su uso como especie forestal comercial y continúan en la actualidad (Harrand *et al.*, 2017). Uno de los métodos más utilizados implica identificar eucaliptos de alto vigor en las zonas donde son nativos y aprovechar esos individuos para la obtención de semillas (Booth, 2013). También es posible utilizar los ejemplares destacados como progenitores en programas reproductivos dirigidos, denominados “programas de cría” o “*breeding*”. Estos métodos permiten la generación de híbridos interespecíficos dentro del género *Eucalyptus* para conformar nuevas variantes que acoplen características favorables seleccionadas de ambos progenitores (López *et al.*, 2012).

En las últimas décadas, junto con los sistemas de cría y recolección de semillas, se implementaron programas de generación de cepas clonales de eucalipto que reproduzcan las características observadas en los parentales pero sin atravesar el ciclo sexual, evitando así la segregación génica. Como resultado se obtiene un material de mayor homogeneidad (de árboles y sus productos derivados), lo que permite una mayor eficiencia en el manejo silvícola y en los siguientes eslabones de la cadena productiva (Harrand *et al.*, 2017). Para la generación de clones, la técnica más difundida es la macropropagación por estacas. Se trata de una multiplicación vegetativa mediante el enraizado de fragmentos semileñosos a herbáceos de ramas de eucaliptos con

características fenotípicas de interés. A pesar de ser una técnica rústica, es la que presenta mayor posibilidad de ser implementada por viveristas, con una relación costo/beneficio asequible (Harrand *et al.*, 2017). Sin embargo, la propagación vegetativa tiene el problema de favorecer enfermedades adquiridas en el proceso y exhibir índices de enraizamiento variables. Sumado a eso, algunas cepas clonales que muestran buenos rendimientos productivos frecuentemente presentan problemas en su propagación por un desarrollo radical deficiente, dificultando su multiplicación (Paz *et al.*, 2012).

Por otro lado, los desarrollos tecnológicos de micropropagación y cultivo *in vitro* muestran un futuro prometedor en el mejoramiento de eucaliptos con técnicas más sofisticadas para la producción de nuevas cepas clonales (Di-Gaudio *et al.*, 2020). El uso de marcadores moleculares predictivos en *Eucalyptus* es cada vez más frecuente y se han encontrado buenas correlaciones entre dichos marcadores y el rendimiento en la producción de pulpa (Thavamanikumar *et al.*, 2014). Aún más, el genoma de *E. grandis* ya se encuentra disponible, siendo la primera referencia para eudicotiledóneas del orden Myrtales (Myburg *et al.*, 2014; código de acceso GenBank: [AUSX000000001](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AUSX000000001)). También existe una base de datos pública de genómica y transcriptómica de *E. grandis* que reúne la información disponible de diferentes autores (<https://eucgenie.org/>). Estos recursos en conjunto permitirán no solo establecer asociaciones entre regiones génicas y la mayor producción de biomasa, sino también encontrar las rutas de síntesis de metabolitos secundarios de interés comercial, como derivados de terpenos, aceites exclusivos para uso farmacéutico y compuestos aromáticos utilizados en perfumería o la industria culinaria (Myburg *et al.*, 2014).

Por lo general, los programas de mejoramiento buscan elevar la productividad de las plantaciones de eucalipto, fundamentalmente mediante la generación de mayor volumen de madera con mejor rectitud de fuste (López *et al.*, 2012), pero también tienen como objetivo encontrar otras características deseables que ayuden a optimizar el rendimiento por otras vías. Entre ellas se destacan aquellas que otorgan mayor capacidad de tolerancia a un estrés ambiental determinado (como la sequía, el frío o fuertes vientos) o las que ayudan a aumentar la tasa de germinación de un lote semillero, a la vez que se obtienen plántulas más uniformes que resultan más fáciles de manejar (Harrand *et al.*, 2017). Sin dudas, el mejoramiento genético de eucaliptos ha generado enormes ganancias a nivel productivo, sin embargo, la selección de progenies con características genéticas que favorecen el crecimiento en biomasa de los eucaliptos frecuentemente tiene un impacto negativo en la capacidad de adaptación a cambios en

el entorno y el clima (Booth, 2013). A la vez, se ha observado que la domesticación de un cultivo frecuentemente lleva a la pérdida en la capacidad de interacción con microorganismos que naturalmente favorecerían a las plantas (Compant *et al.*, 2019). Esto pone en riesgo potencial el abastecimiento de recursos provenientes de la biomasa forestal, por lo que es recomendable buscar nuevas alternativas que acompañen a los programas de mejoramiento convencionales para garantizar que la demanda actual y futura sea satisfecha. Los nuevos protocolos de manejo silvícola deben implementar una estrategia combinada entre el *breeding* selectivo y el uso de microorganismos (modificando en conjunto el genoma de la planta y la microbiota asociada a un cultivo) para aprovechar los beneficios de ambas estrategias, que individualmente podrían no conseguir aumentar la productividad de las plantaciones forestales al mismo ritmo que aumenta la demanda sobre las mismas (Wei & Jousset, 2017).

2.4.1 Manejo de semillas y cepas clonales selectas en Argentina

En Argentina, a inicios del año 2020 se registraron 172 viveros inscriptos y habilitados oficialmente por el Instituto Nacional de Semillas (INASE) para la producción, comercialización y distribución de materiales de propagación de especies forestales, lo que incluye semillas, material de propagación agámico y plantines de progenie o de origen clonal. En la producción de semillas de *E. grandis* sobresalen como líderes las empresas Pomera (Garruchos S.A. - Grupo INSUD) y Paul Forestal S.R.L., junto con la Asociación Cooperadora de la Estación Experimental Agropecuaria Concordia (INTA-Concordia). En cuanto a la generación de materiales agámicos, las sociedades mencionadas se encuentran fuertemente representadas, pero existe mayor representación de productores menores que también ofrecen material agámico, ya que gracias a la enorme variedad de cepas clonales que existen actualmente en el mercado, cada empresa puede explotar comercialmente un conjunto diferente de materiales de propagación, según la demanda zonal de la región donde radiquen. En Argentina se comercializan 34 cepas clonales relacionadas a *E. grandis*, de las cuales 21 corresponden a variedades puras de la especie con características de interés, mientras las otras 13 responden a cruza híbridas entre *E. grandis* y alguna otra especie del mismo género con el objetivo de lograr nuevas características enfocadas en aumentar los rendimientos de la producción. (Datos en: <https://www.argentina.gob.ar/inase/certificacionsemillas/semillas-y-viveros-forestales>).

2.5 - Soluciones prácticas - Uso de hidrogeles en forestación

Los hidrogeles son redes de cadenas poliméricas que pueden formar una solución coloidal en agua. Comenzaron a desarrollarse alrededor de 1940 pero resultaban costosos e inestables (Zohuriaan-Mehr & Kabiri, 2008). El avance de la tecnología permitió desarrollar polímeros super-absorbentes (SAPs por sus siglas en inglés) estables, asequibles y con enorme capacidad de absorción y retención de líquidos (Lejcuś *et al.*, 2018). Estas matrices poliméricas hidrofílicas superabsorbentes pueden incorporar entre 400 y 1500% su peso en agua y presentan la capacidad de retenerla y liberarla gradualmente según la demanda del entorno (Landis & Haase, 2012; Montesano *et al.*, 2015). El uso de hidrogeles de tipo SAP se ha incrementado significativamente desde la década de 1970 hasta la actualidad (Montesano *et al.*, 2015) y se han convertido en un fuerte soporte a la agricultura y la mejora de suelos para diversos usos (Lejcuś *et al.*, 2018). Los productores forestales recurren habitualmente al agregado de estos hidrogeles en el pocillo del suelo donde se colocan los nuevos plantines para mantener un apropiado contenido de agua en la rizosfera durante el establecimiento (Crous, 2017).

Diferentes tipos de hidrogeles pueden ser elaborados a partir de la combinación de diversas unidades monoméricas y alterando el estado de entrecruzamiento entre ellas. Como consecuencia se puede obtener una variedad de SAPs que se distinguen entre sí por sus propiedades intrínsecas de viscosidad, elasticidad, capacidad de retención de agua y degradabilidad. En general, las distintas variantes de SAPs resultan sensibles a degradación y alteraciones de las propiedades de su matriz en presencia de los iones del suelo o por efecto de otros factores ambientales como el pH, las temperaturas y la exposición a radiación UV (Lejcuś *et al.*, 2018; Shen *et al.*, 2015; Ullah *et al.*, 2015).

Existen varias formas de clasificar a los hidrogeles, por ejemplo según sus propiedades eléctricas o por las características de la unidad monomérica utilizada como base. Pero existe un consenso para clasificarlos de forma simplificada en dos categorías: sintéticos o biobasados (polímeros naturales, como almidón o derivados celulósicos), considerando también la formación de híbridos entre ellos. Cuando el término “superabsorbente” es usado sin especificación adicional, generalmente hace referencia al tipo de SAP sintético más convencional; es decir, de base aniónica formado por monómeros acrílicos, en su mayoría derivados de ácido acrílico neutralizados con compuestos básicos de sodio o potasio. También se incluye bajo la misma

denominación “SAP” a sus copolímeros posibles, tales como los híbridos en distintas proporciones con polímeros biobasados (Shen *et al.*, 2015; Zohuriaan-Mehr & Kabiri, 2008).

Particularmente, los SAPs a base de monómeros acrílicos altamente entrecruzados han sido reportados como hidrogeles accesibles económicamente y muy efectivos en reducir la deficiencia de agua post-trasplante en plantaciones forestales (Viero & Little, 2006). De hecho, se han desarrollado y se utilizan actualmente metodologías para su fácil aplicación en el campo, sin alterar en gran medida las prácticas usuales de producción (Shi *et al.*, 2010; Zohuriaan-Mehr *et al.*, 2010). Una vez aplicados, la colonización de los SAPs por las comunidades del suelo y la degradación mediada por microorganismos ocurren naturalmente y no dejan residuos tóxicos o señales de daño ecológico, aunque los tiempos resultan variables según la composición del hidrogel (Oksińska *et al.*, 2016). Los copolímeros, especialmente los que integran derivados celulósicos (como hidroximetil o carboximetil celulosas), son menos costosos y presentan mejor compatibilidad con el ambiente ya que son más fácilmente degradados por la microbiota (Montesano *et al.*, 2015; Nie *et al.*, 2004).

Este tipo de estrategias resulta tan redituable a nivel comercial y versátil como nueva tecnología, que podemos encontrar más de un uso aplicable para las plantaciones forestales, como la remediación de suelos aridificados por su uso intensivo o la liberación controlada de agroquímicos (Zohuriaan-Mehr *et al.*, 2010; Zohuriaan-Mehr & Kabiri, 2008). Tubert y colaboradores (2018) presentaron una propuesta superadora que maximiza la ventaja de aplicar hidrogeles a nivel productivo combinando un gel superabsorbente de composición acrílico-celulósica con una mezcla de nutrientes específica para el desarrollo de plantines de *E. grandis*. Esta formulación resultó efectiva no solo para la retención de agua sino también para la liberación controlada de nutrientes, tanto en ensayos en invernadero como en pruebas a campo

3 - Bacterias benéficas

3.1 - Bacterias benéficas - Diversidad - Mecanismos

Las plantas albergan comunidades de microorganismos, especialmente bacterias, en el interior o en la superficie de todos sus órganos (Lugtenberg, 2015). Los organismos bacterianos asociados a plantas pertenecen a diversos filos, siendo Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes y Bacteroidetes los más representados, tanto en especies herbáceas como arbóreas (Finkel *et al.*, 2017; Fitzpatrick *et al.*, 2020). Algunas de estas bacterias pueden establecer una interacción positiva con la planta y son reconocidas como “bacterias promotoras del crecimiento” (PGPB por sus siglas en inglés; Backer *et al.*, 2018). Las bacterias benéficas pueden promover el crecimiento vegetal de forma directa o indirecta a través de diversos mecanismos y actividades fisiológicas, y pueden ser subdivididas en tres grandes grupos (Meena *et al.*, 2017).

Las bacterias biofertilizadoras favorecen el desarrollo de las plantas mediante estrategias que se relacionan con el aporte y el aumento de la disponibilidad de nutrientes necesarios para el organismo fotosintético. Ejemplos ampliamente conocidos de este grupo son las bacterias fijadoras de nitrógeno, las solubilizadoras de fosfatos y las quelantes de hierro por medio de la producción de sideróforos (Choudhary *et al.*, 2016; Lugtenberg & Kamilova, 2009). El uso de PGPB de este grupo disminuye la necesidad de aplicación de fertilizantes en cantidades masivas, lo que trae asociado una reducción en el costo de producción de cultivos, utilizando una estrategia sustentable y de bajo impacto ambiental (Premachandra *et al.*, 2016).

El segundo grupo de bacterias benéficas se categoriza como fitoestimuladoras, cuando la interacción con la planta se basa en la regulación o producción directa de fitohormonas o análogos estructurales de los reguladores del desarrollo vegetal (Meena *et al.*, 2017). Dentro de este grupo se engloban los numerosos reportes de bacterias productoras de auxinas que favorecen el desarrollo de la raíz o alteran su arquitectura aumentando la superficie de absorción, así como también la producción de la enzima ACC deaminasa que degrada al precursor del etileno, retrasando la senescencia de los órganos en condiciones de estrés. Otra estrategia muy representada dentro de este grupo se relaciona a la producción de ácido abscísico, que acelera el cierre estomático en condiciones de estrés por sequía, minimizando la pérdida de agua a través de los

estomas (Lugtenberg & Kamilova, 2009; Naylor & Coleman-Derr, 2018; Ngumbi & Kloepper, 2016; Premachandra *et al.*, 2016).

Por último, un tercer grupo incluye a las bacterias biocontroladoras, que ejercen algún tipo de actividad supresiva del desarrollo de una enfermedad. En este caso, el antagonismo con otros microorganismos es la estrategia más frecuente y favorece el crecimiento de las plantas de forma indirecta al limitar la incidencia y posibilidad de acción de los organismos patogénicos. Menos frecuentemente, pueden actuar induciendo la activación de mecanismos de resistencia a patógenos por parte de la planta (Bhardwaj *et al.*, 2014; Fitzpatrick *et al.*, 2020; Lugtenberg, 2015).

La manifestación de la acción benéfica de las PGPB puede variar sustancialmente de acuerdo a la articulación de los múltiples factores que involucra esta interacción, principalmente el tipo de cepa bacteriana y la especie vegetal, en conjunto con los factores bióticos y abióticos que las envuelven. Así, una cepa que muestra una capacidad prometedora de favorecer el desarrollo vegetal en buenas condiciones de cultivo, podría no exhibir el mismo efecto en la presencia de estrés o en interacción con otra especie de planta. De la misma forma, con frecuencia la promoción del crecimiento no ocurre en condiciones óptimas para la interacción pero sí cuando el entorno es desfavorable y por eso es fundamental estudiar los efectos de las PGPB también bajo la presión de condiciones adversas (Backer *et al.*, 2018). Esto permite una prospección más adecuada de cepas benéficas prometedoras y mayor previsibilidad y consistencia de su acción en el campo. La aplicación de diversos microorganismos benéficos a los cultivos es una de las estrategias emergentes que permiten reducir el uso de fertilizantes y aumentar la resiliencia a estreses bióticos y abióticos si se manipula correctamente la asociación planta-microorganismo (Bailey-Serres *et al.*, 2019; Hasanuzzaman, 2020; Lugtenberg, 2015). Modular el microbioma de la rizosfera es un elemento esencial para la planificación de cultivos sustentables y para restaurar ambientes degradados por el uso productivo excesivo (Ahkami *et al.*, 2017).

3.2 - Bacterias benéficas y nutrientes

Tradicionalmente se ha denominado como biofertilizantes a las sustancias que contienen microorganismos vivos que promueven el crecimiento de las plantas aumentando el abastecimiento o disponibilidad de nutrientes (Herrmann & Lesueur, 2013). Se ha demostrado que al aplicar biofertilizantes sobre semillas, plantas o

directamente en el suelo, las células del inóculo pueden multiplicarse y participar en los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes, beneficiando la productividad de los cultivos (Bhardwaj *et al.*, 2014).

La inoculación con fines productivos de plantaciones agrícolas con PGPB biofertilizantes data desde inicios del siglo 20, con la formalización de la patente de un producto conteniendo *Rhizobium* sp. (Malusá *et al.*, 2012). Desde entonces, la mayor parte de biofertilizantes se han basado en la aplicación de bacterias fijadoras de nitrógeno (Malusá & Vassilev, 2014; Puente *et al.*, 2010; Qados, 2015) y en menor medida solubilizadoras de fósforo (Bashan *et al.*, 2016; Castagno *et al.*, 2011). Sin embargo, se conoce que los diversos biofertilizantes mantienen la fertilidad de los suelos, integrando el manejo de micro y macronutrientes con la acción descomponedora de materia orgánica (Bhardwaj *et al.*, 2014). De esta forma, la manipulación del microbioma asociado a plantas se transforma en una herramienta de gran potencial en la búsqueda de cultivos intensificados pero sustentables y sostenibles, que requieran menor aporte de fertilización externa (Lugtenberg, 2015). A pesar de esto, la falta de protocolos para la eficiente aplicación de biofertilizantes en el campo hace que muchas PGPB de las que se conoce su utilidad en pruebas de laboratorio permanezcan inaccesibles para los agricultores (Bhardwaj *et al.*, 2014).

3.3 - Bacterias benéficas y sequía

Se registra un número cada vez mayor de reportes mostrando que la inoculación con cepas seleccionadas de PGPB puede contribuir a la superación exitosa de un estrés ambiental (como sequías, salinidad o cambios abruptos de temperatura, entre otros) en cultivos comerciales. Múltiples revisiones completas han sido publicadas al respecto (Ahkami *et al.*, 2017; Backer *et al.*, 2018; Berg, 2009; Hasanuzzaman, 2020; Meena *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2009). Específicamente en el caso de estrés por déficit hídrico, se ha observado que muchas de las PGPB inducen una respuesta de tolerancia sistémica a través de regulaciones hormonales como las mencionadas previamente para el caso de las auxinas, el etileno y el ácido abscísico (Vurukonda *et al.*, 2016). En otro tipo de interacciones, la inoculación con ciertas PGPB aumentó el contenido relativo de agua en las hojas de distintas especies de plantas y afectó otros parámetros fisiológicos como el contenido de clorofila, la adquisición de nutrientes, la tasa fotosintética y la eficiencia en el uso del agua (Choudhary *et al.*, 2016; Naylor & Coleman-Derr, 2018). En ocasiones, el efecto positivo de las PGPB solo resulta evidente durante el período de

sequía o incluso recién en la recuperación luego del estrés, pero no en condiciones de riego abundante, cuando la planta se encuentra en óptimas condiciones para su desarrollo (Mayak *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2014). Sumado a lo anterior, se ha observado que luego de superado un período seco, la comunidad de microorganismos remanentes que lograron sobrevivir a la condición de estrés tienen mayor capacidad de superar futuras situaciones similares, influyendo positivamente en las plantas del entorno para facilitarles la superación del próximo estrés también (de Vries *et al.*, 2020; Naylor & Coleman-Derr, 2018). Por otro lado, las PGPB que confieren tolerancia a estrés hídrico frecuentemente pueden beneficiar el crecimiento de las plantas bajo otros estreses abióticos (Ngumbi & Kloepper, 2016). Más aún, las PGPB usualmente no presentan especificidad en cuanto a la planta con la que interactúan y pueden colonizar y ejercer sus efectos benéficos en múltiples especies vegetales (Naylor & Coleman-Derr, 2018).

Otro aspecto favorable de las PGPB se relaciona con la capacidad de interacción entre ellas que puede resultar en un incremento sinérgico de sus efectos benéficos cuando son inoculadas en forma de consorcio, independientemente del número de cepas que componen dicho consorcio (Compant *et al.*, 2019; Khan *et al.*, 2019; Naylor & Coleman-Derr, 2018). Este tipo de interacciones no se limita solo a bacterias entre sí. La inoculación simultánea con diferentes PGPB y hongos formadores de micorrizas a menudo resulta en un aumento del crecimiento y el rendimiento de las plantas comparado con la inoculación individual. La interacción sinérgica entre hongos y diversos géneros de bacterias, incluyendo *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus* y *Pseudomonas*, ha sido reportada como benéfica para el desarrollo de cultivos (Malusá *et al.*, 2012). A la vez, estudios recientes han demostrado que ciertas bacterias poseen una capacidad activa de reclutamiento de otras cepas con funciones potencialmente benéficas para el desarrollo vegetal, logrando la integración de un núcleo microbiano que exhibe múltiples características favorables, a partir de la inoculación de un microorganismo específico (Toju *et al.*, 2018). Investigaciones recientes muestran que las plantas, en interacción con microorganismos reclutadores y en respuesta a estímulos ambientales (algunos de los cuales pueden ser factores críticos como la disponibilidad de agua), pueden modular el tipo de microbioma que se constituye en su entorno, favoreciendo la comunidad microbiana que mejor potencie su desarrollo (Fitzpatrick *et al.*, 2020; Toju *et al.*, 2018).

Debido a los numerosos beneficios que ofrece la interacción entre plantas y bacterias benéficas se observa un rápido incremento en el uso de PGPB a nivel productivo. Esta estrategia está ganando cada vez más importancia como una

alternativa natural redituable económicamente y amigable con el ambiente para lograr el aumento en el rendimiento y un mejor manejo de factores de estrés en los cultivos, con el objetivo de transformar la agricultura actual en un sistema resiliente al cambio climático global, que minimice el uso de fertilizantes y agroquímicos sintéticos (Compant *et al.*, 2019).

3.4 - El género *Pseudomonas*

Varios géneros de proteobacterias presentes en la microbiota del suelo han sido descritos en relación a su capacidad como promotores del crecimiento en plantas para su uso sostenible en agricultura (Singh *et al.*, 2011). Dentro de ellos se encuentra el género *Pseudomonas* como uno de los más representativos, de mayor importancia y más ampliamente difundido en todo el mundo (Babalola, 2010). *Pseudomonas* es un género de bacterias no esporulantes Gram (-) comúnmente hallado en todo tipo de suelos, libres de vegetación o en la rizosfera de diferentes especies vegetales. Las especies de este género son notoriamente versátiles, pudiendo utilizar eficientemente los nutrientes de sustratos diversos y sobreviviendo bajo condiciones del entorno que serían demasiado estresantes para otras bacterias (Santoyo *et al.*, 2012). Muchas de sus especies presentan actividad *quorum sensing* y tienen la capacidad de desarrollar biofilms (Babalola, 2010; Meena *et al.*, 2017).

Existe un amplio registro de reportes que caracterizan a diferentes cepas de *Pseudomonas* como PGPB, gracias al amplio espectro de funciones ecológicas y fisiológicas que son capaces de efectuar. En interacción con organismos vegetales mejoran la adquisición de nutrientes, potencian procesos de fitoremediación y contribuyen a la superación de estrés bióticos y abióticos (Babalola, 2010; Meena *et al.*, 2017), con un fuerte efecto positivo en la promoción de la tolerancia a la sequía y a variaciones en la humedad del ambiente (Berendsen *et al.*, 2012; Berg *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014). Son activas productoras de metabolitos secundarios, sustancias volátiles y compuestos bioactivos, frecuentemente asociados a mecanismos supresivos y biocontroladores de patógenos o la activación de una respuesta sistémica inducida (Berg *et al.*, 2014; Santoyo *et al.*, 2012). Ciertas cepas del género pueden establecer una comunicación dinámica con otros microorganismos, aumentando la actividad microbiana en el suelo y frecuentemente se las puede encontrar como endofitos (Babalola, 2010; Berg, 2009). Estos motivos han hecho que el género *Pseudomonas* se utilice como modelo de la interacción entre plantas y bacterias (Berg *et al.*, 2014).

4 - Formulaciones de bioinoculantes

4.1 - La aplicación de PGPB en formulaciones comerciales

A pesar de la abundante cantidad de publicaciones que identifican y caracterizan PGPB en el laboratorio, muchas de estas cepas muestran un éxito limitado cuando son trasladadas a ensayos a campo (Compant *et al.*, 2019). Una de las principales causas de este hecho se atribuye al rápido descenso de la población bacteriana cuando es inoculada directamente en el suelo, probablemente por la exigencia de sobrevivir en un ambiente con variaciones ambientales no controladas, la competencia por el nicho con la microbiota nativa ya adaptada al ambiente y la presencia de organismos predadores (Malusá *et al.*, 2012). Por este motivo es conveniente formular bioinoculantes bacterianos que involucren un soporte sólido o semisólido que provea protección física y un microambiente adecuado para el crecimiento o viabilidad de la cepa a inocular. A estos soportes que favorecen la supervivencia del inóculo y su liberación controlada se los denomina comúnmente “*carriers*”.

El *carrier* es la mayor porción (por volumen o por peso) de la formulación, que ayuda a entregar una cantidad deseable de PGPB en buenas condiciones fisiológicas. Los materiales constituyentes del *carrier* pueden ser de orígenes diversos: orgánicos, inorgánicos o sintetizados a partir de moléculas específicas. La disponibilidad del material y el costo son los factores que más afectan la elección del *carrier* (Herrmann & Lesueur, 2013). La calidad de los mismos se determina en base a múltiples factores relacionados a su aplicación en producciones de cultivos comerciales. Un *carrier* es considerado de alta calidad cuando es capaz de sostener consistentemente la viabilidad del inóculo deseado durante el proceso de formulación, transporte, almacenamiento e implantación a campo (Bashan *et al.*, 2016). También se busca que posea una buena capacidad de absorción de humedad y regulación del pH para generar un ambiente apropiado para los microorganismos una vez inoculados. Más aún, se espera que los *carriers* puedan ser autoclavables o sometibles a algún otro tipo de esterilización para que el único inóculo distribuido sea el seleccionado (Malusá *et al.*, 2012).

Por otro lado, la generación de estos *carriers* en combinación con las cepas seleccionadas debe ser de bajo costo y fácil utilización (preferentemente adecuándose a los sistemas ya implementados por los productores u ofreciendo otras alternativas

prácticas) para que sea una opción elegida por el mercado (Herrmann & Lesueur, 2013). Desde un punto de vista ecológico, las formulaciones de bioinoculantes deben estar diseñadas pensando en minimizar los riesgos de contaminación, tanto en la fabricación como en la degradación del producto en el campo, considerando utilizar microorganismos naturales (y preferentemente locales), evitando la liberación de cepas modificadas. Más aún, se espera que la formulación resultante tenga una durabilidad determinada que le permita resistir el efecto de los agentes bióticos y abióticos al menos el tiempo suficiente para el desarrollo de la interacción entre el inóculo y el cultivo de interés pero alcanzando su degradación natural en un tiempo acotado (Bashan *et al.*, 2016). El aspecto clave en las tecnologías de inoculación de PGPB es usar la formulación apropiada, lo que implica la elección del inóculo idóneo, la selección de un *carrier* adecuado y el diseño correcto del método de almacenamiento, distribución y aplicación (Malusá *et al.*, 2012). Las formulaciones de bioinoculantes exitosas permiten alargar el tiempo de viabilidad del inóculo cuando el producto se encuentra almacenado y garantizan la provisión de células cuando es aplicado. Esta tecnología es sobre todo necesaria para bacterias Gram (-) que, al no ser esporulantes, son susceptibles al bajo contenido de humedad y no son de fácil traslado desde los laboratorios de producción al campo (Compant *et al.*, 2019).

La figura [12](#) muestra cómo es el ciclo de investigación y desarrollo de una nueva formulación, desde que es ideada hasta que puede ser comercializada y utilizada en plantaciones agrícolas. El proceso requiere de una íntima relación entre ciencia básica y aplicada, junto a un marco legal que regule su implementación y un sistema de evaluación y seguimiento que monitoree los avances y la efectividad del nuevo producto (Bashan *et al.*, 2014).

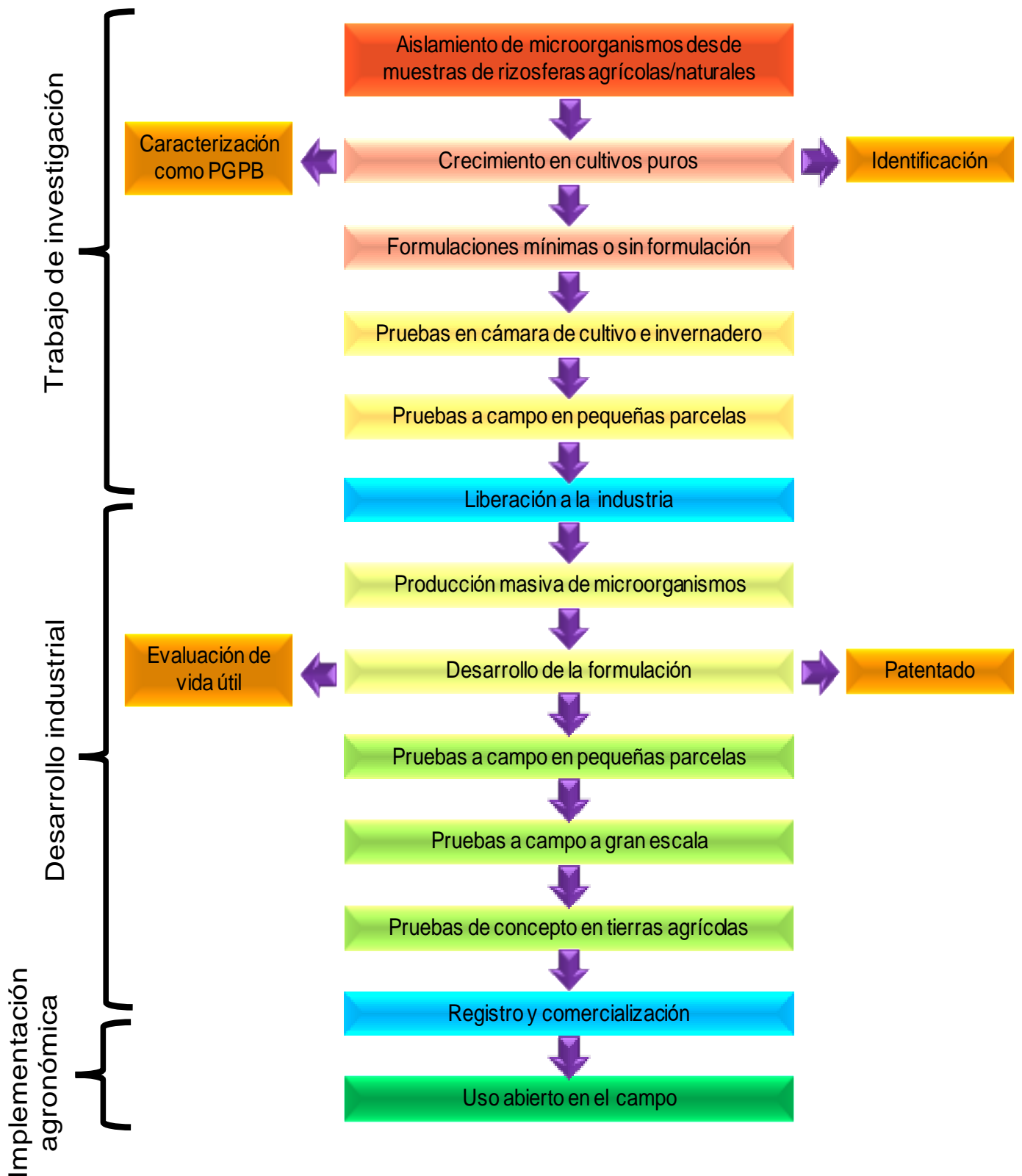


Figura I2: Cadena de desarrollo tecnológico de las nuevas formulaciones de bioinoculantes, desde la obtención del microorganismo de interés hasta su liberación comercial a campo. Figura modificada de Bashan *et al.*, 2014.

4.2 - Bioinoculantes más usados - Regulaciones de calidad

En la actualidad, distintos tipos de *carriers* se utilizan comercialmente para la preparación de bioinoculantes. Los más distribuidos e importantes en cuanto a volumen de uso son los derivados de materiales inertes, biofilms y formulaciones líquidas utilizados principalmente como cobertura de semillas para facilitar el contacto planta-bacteria durante la germinación (Bashan *et al.*, 2014). Sin embargo, este tipo de estrategias no son apropiadas para la industria forestal, donde el material de partida para las plantaciones suele ser un plantín que ya cuenta con un sistema radicular en desarrollo, frecuentemente obtenido mediante macropropagación clonal por medio de estacas (Harrand *et al.*, 2017).

Otro tipo de formulaciones de amplio uso en agricultura y manejo ambiental son las que involucran la utilización de un polímero, generalmente orgánico o biobasado, partiendo de alginato, agar, carragenanos, pectinas y quitosano, entre otros, como materia prima. Este tipo de polímeros puede resultar relativamente oneroso por los materiales que se utilizan y por los costos adicionales de aplicación industrial, por lo que no se registra ninguna formulación comercial disponible en el mercado (Bashan *et al.*, 2016). Sin embargo, su estudio en laboratorios es activo y representa la tecnología del futuro en el área de los bioinoculantes (Bashan *et al.*, 2016; Malusá *et al.*, 2012; Perez *et al.*, 2018). Hasta ahora, poco se ha estudiado del uso de polímeros sintéticos de base acrílica como potenciales vehículos para la inoculación de PGPB, pero los resultados preliminares son prometedores aunque nunca se han testeado en plantas. Se estima que consiguen mantener una alta viabilidad del inóculo gracias a la capacidad de encapsulación e inmovilización de las células, brindándoles protección en un medio con humedad apropiada durante el período de almacenamiento (Bashan *et al.*, 2016).

En plantaciones forestales, especialmente las de eucaliptos, la aplicación de hidrogeles superabsorbentes de bajo costo en el pocillo de plantación como matriz intermedia entre el plantín y el suelo se está integrando cada vez más como una rutina dentro de los protocolos de implantación. Como resultado se logra el acondicionamiento necesario del suelo para la expansión radical inicial y la retención de agua necesaria para aliviar el estrés del pasaje de los plantines desde el invernadero al campo (Crous, 2017). Utilizar este tipo de polímeros simultáneamente como vehículos para la inoculación de PGPB no resultaría en un gran gasto adicional en el manejo silvicultural y podría traer los beneficios que aporta la interacción con microorganismos benéficos.

En muchos países la definición de calidad de un bioinoculante está regida por regulaciones gubernamentales, mientras en otros es el propio mercado el que decide la adopción y la permanencia de una formulación (Bashan *et al.*, 2016). No existe un acuerdo internacional acerca de valores estándares de unidades formadoras de colonia (UFC) que un bioinoculante debería ser capaz de entregar y en los países donde sí existe una regulación, concierne generalmente a rizobios y el criterio es en cierto punto arbitrario. Cuando se indica un valor, en la mayoría de los casos se hace referencia al número mínimo de células viables por unidad de peso o volumen del inoculante (Herrmann & Lesueur, 2013). Los hidrogeles una vez hidratados conforman una matriz semisólida que puede ser caracterizada tanto por peso como por volumen. Por lo tanto, para definir estándares de calidad se deben encontrar valores de referencia que tengan en cuenta la conformación acuosa y sólida de este tipo de soportes. En la legislación de países donde el desarrollo de biofertilizantes ha sufrido un fuerte avance y se han elaborado regulaciones de calidad al respecto, encontramos algunos números de referencia. En el caso de India, se espera que las formulaciones en soportes sólidos puedan contener alrededor de $0,5 \times 10^7$ UFC g^{-1} y las formulaciones en soportes líquidos 1×10^8 UFC mL^{-1} . En China el estándar es más exigente, pautando concentraciones mínimas de 1×10^8 CFU g^{-1} y 5×10^8 CFU mL^{-1} en soportes sólidos y líquidos respectivamente (Malusá & Vassilev, 2014).

5 - Antecedentes de intersección entre áreas temáticas

5.1 - Áreas temáticas: Forestales - Hidrogeles - PGPB - Estrés

El uso de hidrogeles en la implantación de especies forestales es muy difundido a nivel comercial, fundamentalmente con el objetivo de aliviar el estrés hídrico en esa etapa. Se han publicado múltiples trabajos en los que los hidrogeles aumentan la probabilidad de supervivencia de distintos árboles en estadios iniciales del desarrollo. Su utilización abarca tanto gimnospermas como angiospermas, en géneros de interés comercial como *Pinus*, *Cupressus*, *Quercus*, *Populus*, diversas leguminosas y diferentes especies e híbridos de *Eucalyptus* (Agaba *et al.*, 2010; Crous, 2017; Kargar *et al.*, 2017; Oriquiriza *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2010; Zohuriaan-Mehr & Kabiri, 2008). En todos ellos, la aplicación de polímeros superabsorbentes generó una mejora en el establecimiento de los plantines. Sin embargo, la mayoría de estas publicaciones se limitan a medir la supervivencia y crecimiento de los individuos, sin relacionar estas variables con parámetros fisiológicos. Incluso en algunos de ellos no se impone ningún tipo de estrés o simplemente se deja evolucionar la plantación sin un manejo elaborado para medir mortandad de individuos en el tiempo. En aquellos trabajos donde se desarrolló algún tipo de estrés por deficiencia de agua, los hidrogeles demostraron ser esenciales para elevar el rendimiento potencial de la plantación.

A diferencia de lo que sucede con los polímeros superabsorbentes, las publicaciones que involucran la inoculación con microorganismos benéficos en plantines de *Eucalyptus* son menos numerosas y evalúan principalmente inóculos del género *Bacillus* y distintas micorrizas (Lorensi De Souza *et al.*, 2014; Moreira & Araújo, 2013; Paz *et al.*, 2012). En estos trabajos se suelen caracterizar funciones específicas de los microorganismos, tales como la actividad solubilizadora de fosfatos, la producción de fitohormonas o el antagonismo con patógenos, pero mediante ensayos *in vitro*, sin contacto con las plantas. Al inocular estos organismos benéficos en el sustrato, se observa un aumento en la supervivencia de los plantines o en la capacidad productiva y la generación de biomasa, pero nuevamente solo se miden este tipo de variables y no se busca una relación con parámetros fisiológicos. Tampoco se evalúa la persistencia del inóculo en el tiempo o la posible colonización de los tejidos luego de aplicarlo en el

entorno radical de los eucaliptos. También se propuso un método para la prospección de potenciales PGPB basado en la interacción de las cepas con *Eucalyptus* en etapas germinativas (Mafia *et al.*, 2009).

Se han registrado avances en la formulación de bioinoculantes que integren PGPB y polímeros superabsorbentes, pero estas formulaciones frecuentemente no llegan a ser probadas en un cultivo comercial y se limitan a las pruebas de laboratorio de supervivencia del inóculo y características físico-químicas del soporte (Bashan *et al.*, 2016; Perez *et al.*, 2018). Existen unas pocas publicaciones de la aplicación conjunta de SAPs y PGPB en la literatura y ninguna de ellas está relacionada a plantines de especies forestales. El trabajo de (Hong *et al.*, 2016) mostró que no hay una interacción negativa entre la inoculación de una cepa bacteriana de la familia Micrococcaceae y suelo mezclado con SAP en un cultivo de *Arundo donax* bajo ciclos alternantes de sequía y riego. Un efecto similar fue reportado en maíz inoculado con una combinación de *Azospirillum lipoferum* y *Pseudomonas putida* sembrado en un sustrato previamente acondicionado con SAP, tanto en condiciones de riego normal como en plantas sometidas a estrés hídrico (Moslemi *et al.*, 2011). La inoculación con *Azotobacter* en plantines de *Ficus benjamina* (una especie con porte arbóreo, pero que no es utilizada en forestación) plantados en sustratos con SAP también condujo a una considerable mejora en la disponibilidad de agua en el suelo, la supervivencia frente al estrés hídrico y el crecimiento de los individuos (Qados, 2015). Cabe destacar que en los últimos tres trabajos mencionados, la aplicación de SAP y de los inóculos bacterianos se realizó de forma separada, mezclando el sustrato de plantación con los hidrogeles previamente a la inoculación. Esto significa que no se aprovechó la matriz de los polímeros como vehículo para la inoculación de las cepas beneficiosas. La inoculación de PGPB a través de polímeros ha sido implementada en algunas especies herbáceas, como caña de azúcar o frijoles silvestres, pero en estos casos solo se registró la promoción del crecimiento general de las plantas, en ausencia de estrés (Bashan *et al.*, 2016).

El estudio conectado de las áreas temáticas presentadas en este apartado será determinante en el desarrollo de nuevas tecnologías que busquen innovar en el campo de la silvicultura. La implementación conjunta de estrategias preexistentes que nunca se habían probado unidas puede ser el enfoque que permita garantizar la sustentabilidad de la producción forestal. Teniendo en cuenta estos antecedentes, el desafío futuro será el de estudiar mediante un abordaje integral la selección de PGPB para uso agrícola, su inoculación eficiente, el rol de tecnologías complementarias (como los hidrogeles) y la optimización del uso de los recursos en condiciones ambientales diversas para promover un desarrollo forestal sostenible.

Objetivos

Esta tesis tuvo por objetivo general analizar la factibilidad y los beneficios de aplicar una estrategia biotecnológica sobre el desarrollo de plantines de *Eucalyptus grandis*, fundamentalmente en etapas tempranas, relacionadas con períodos críticos en plantaciones comerciales. La estrategia se basó en la utilización de un polímero superabsorbente acrílico-celulósico como vehículo para la inoculación de bacterias promotoras del crecimiento en el entorno radical de los plantines de *E. grandis* sometidos a diferentes factores de estrés.

Del objetivo principal se derivan los siguientes objetivos particulares, relacionados con los diferentes ensayos, que en su conjunto permitieron alcanzar el objetivo general:

O1) Seleccionar cepas de interés a partir de una colección amplia de bacterias, mediante pruebas exploratorias.

O2) Estudiar la respuesta fisiológica de *E. grandis* en presencia de bacterias beneficiosas para evaluar su impacto sobre el manejo del agua y nutrientes en la etapa de implantación.

O3) Comparar las respuestas observadas en *E. grandis* con las de *Arabidopsis thaliana*, para evaluar la especificidad de las interacciones y en el futuro explorar sus mecanismos en una planta modelo de generación rápida.

O4) Optimizar la inoculación de plantines con cepas seleccionadas de bacterias a través de un polímero hidrofílico superabsorbente.

O5) Evaluar la supervivencia del inóculo en el tiempo en diferentes sustratos y la localización del mismo cuando es aplicado en la proximidad del sistema radical de plantines de *E. grandis*.

O6) Analizar las diferencias en la respuesta de *E. grandis* frente al estrés hídrico impuesto de dos formas distintas en dos ambientes contrastantes (cámara de cultivo e invernadero).

O7) Estudiar cuáles son las variables que mejor describen este sistema en estudio mediante el uso de herramientas estadísticas multivariadas.

Hipótesis

Del objetivo general formulado se desprende la siguiente hipótesis:

Hipótesis general: La utilización del polímero superabsorbente acrílico-celulósico como vehículo para la inoculación de cepas promotoras del crecimiento es factible y aporta beneficios al desarrollo de *Eucalyptus grandis* en estadios tempranos y a la superación de estreses.

En respuesta a los objetivos particulares se formulan las siguientes hipótesis:

Hipótesis O1) Las pruebas exploratorias permiten seleccionar cepas de interés para su posterior aplicación en ensayos a mayor escala.

Hipótesis O2) Las bacterias aplicadas alteran la fisiología de *E. grandis* y contribuyen a una mejora en el manejo del agua y los nutrientes en la etapa de implantación.

Hipótesis O3) Las respuestas observadas en *E. grandis* son comparables a las observadas en *A. thaliana*.

Hipótesis O4) Las pruebas de diferentes métodos de inoculación de las cepas seleccionadas muestran que la aplicación a través de un polímero hidrofílico superabsorbente es superior a su aplicación en ausencia de *carrier*.

Hipótesis O5) El inóculo es capaz de sobrevivir en diferentes sustratos por al menos tres meses y se localiza en la proximidad del sistema radical de *E. grandis* o colonizando el interior de sus tejidos.

Hipótesis O6) Las diferentes velocidades de imposición del estrés hídrico y los ambientes contrastantes generan diferentes respuestas por parte de los eucaliptos.

Hipótesis O7) Los análisis multivariados permiten reconocer patrones de asociación entre variables, priorizarlas y resumir la información redundante, destacando a las variables de crecimiento y uso del agua en los ensayos de estrés hídrico.



Materiales y Métodos

1 - Origen y mantenimiento de la colección de bacterias

La colección de bacterias utilizada para el desarrollo de esta tesis fue provista por los laboratorios de 'Microbiología del Suelo' y de 'Interacciones Planta-Microorganismos', pertenecientes al Instituto Tecnológico Chascomús (INTECH-CONICET-UNSAM), en colaboración con los doctores Luis Nazareno Castagno, María Elisa González, Fernando Pieckenstain y María Julia Estrella. La colección está compuesta por 63 cepas con diferentes orígenes. La cepa CHA0 (*Pseudomonas fluorescens*) ha sido ampliamente reportada como biocontroladora de enfermedades de gran relevancia económica e importancia agrícola e inductora de la respuesta sistémica adquirida en múltiples especies vegetales (Berendsen *et al.*, 2012; Ramette *et al.*, 2011) y se encuentra disponible como CFBP 6595 en la Colección Francesa de Bacterias Asociadas a plantas (<https://www6.inrae.fr/cirm/CFBP-Bacteries-associees-aux-Plantes>) y como DSM 19095 en la Colección Alemana de Microorganismos (<https://www.dsmz.de>). Las cepas con código BT2, BT4, BT5, GT4, MT3, MT8, NT2, NT3, NT6 y las numeradas de N1 a N47 provienen de aislamientos de la filosfera de diversos cultivos hortícolas de la ciudad de La Plata y alrededores (Romero *et al.*, 2016). La identidad taxonómica de la cepa N33 fue determinada mediante el análisis de la secuencia del ARN ribosomal 16S ([Anexo 2](#)). La secuencia nucleotídica obtenida fue depositada en la base de datos GenBank bajo el código de acceso MT792080. Los códigos M22, M25 (ambas del género *Pseudomonas*) y M91 (*Pantoea* sp.) refieren a tres aislamientos obtenidos desde sustrato de la rizosfera de la planta forrajera *Lotus tenuis*, en la cuenca del río Salado, Chascomús. Estas últimas tres cepas fueron descritas como solubilizadoras de fósforo y potenciales promotoras del crecimiento (Castagno *et al.*, 2011). Los aislamientos ARP₂₃ y MEP₂₁₈, correspondiente a las especies *Bacillus amyloliquefaciens*, la cepa A6 de *Bacillus velezensis* y la cepa A7 de *Bacillus subtilis* fueron provistos por el Departamento de Ciencias Naturales de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto. Estas cepas fueron obtenidas a partir de muestras de suelo agrícola de la provincia de Córdoba y caracterizadas en trabajos ya publicados (Alvarez *et al.*, 2012; Vignatti *et al.*, 2020). Para conservar el cepario completo se realizaron cultivos axénicos de todas las cepas en medio líquido LB, manteniéndolos durante 24 horas en un agitador a 28°C y 180 rpm. Usando tubos Eppendorf®, 0,5 mL de cada cultivo fueron mezclados con 0,5 mL de glicerol al 30% en agua y la suspensión resultante se mantuvo indefinidamente a -80°C.

2 - Pruebas de germinación

Las semillas utilizadas provienen de la cosecha 2015 del Huerto Semillero Clonal 1.5 a cargo del Centro de Investigaciones y Experiencias Forestales (CIEF-INTA) y de la empresa Paul Forestal S.R.L., ubicado en la localidad de Colonia Berduc, provincia de Entre Ríos. Por el modo de cosecha de los frutos y la obtención de las semillas, el producto que se comercializa es una mezcla que incluye las semillas viables junto con fragmentos de material estéril derivado de partes florales remanentes en los frutos de tipo cápsula de esta especie. Debido a esto se estandarizó una cantidad de mezcla semillera (luego de determinar una viabilidad de aproximadamente 600 semillas viables por gramo) para utilizar en los siguientes ensayos.

Inicialmente se determinó el tiempo necesario para lograr el máximo número de plántulas emergentes de *E. grandis* permitiendo la germinación de las semillas en condiciones óptimas y sin el agregado de bacterias. Tres muestras de 50 mg de mezcla semillera se sembraron en placas de Petri preparadas con papel absorbente humedecido con 10 ml de solución nutritiva (Javot *et al.*, 2003). Las placas se resguardaron en oscuridad en una cámara de temperatura controlada ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) durante tres días para evitar problemas de fotosensibilidad de las semillas. Superado ese tiempo, las placas fueron expuestas a la luz en la misma cámara de cultivo ($250\ \mu\text{mol}$ fotones $\text{m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$, fotoperíodo 16/8 h L/O, $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 65-70% HR) y se registró diariamente el número de semillas germinadas. Se consideró una semilla como germinada cuando se logró observar la protrusión de una radícula de al menos 2 mm de longitud.

Posteriormente, las 63 cepas de la colección de bacterias fueron evaluadas en su capacidad para promover la germinación de semillas de *E. grandis*. Para ello, se adaptó un protocolo previamente publicado para la inoculación de *E. globulus* con *Azospirillum brasiliense* (Puente *et al.*, 2010). Para preparar el inóculo bacteriano de cada cepa de la colección, las bacterias fueron cultivadas por 24 horas en 5 ml de medio líquido LB a 28°C y en agitación constante a 180 rpm. Los cultivos fueron centrifugados durante 10 minutos a 2000 rcf y resuspendidos con una solución de MgCl_2 10 mM. Mediante un lector de microplacas (Sensident Scan, Merck, Darmstadt, Alemania) se ajustaron las suspensiones con MgCl_2 10 mM hasta alcanzar una densidad óptica (DO) a 578 nm de 0,1; correspondiente a una concentración estimada de 10^8 unidades formadoras de colonia (UFC) por mililitro. Se descargó 1 mL de cada suspensión bacteriana en distintos tubos eppendorf conteniendo 50 mg de mezcla semillera. Para favorecer la inmersión de las semillas en la suspensión de bacterias, se agitó

manualmente cada tubo de forma regular. Las semillas control fueron sumergidas en 1 mL de MgCl₂ 10 mM. Luego de 30 minutos, la suspensión excedente fue retirada del tubo y las semillas decantadas se esparcieron sobre placas de Petri preparadas con papel absorbente humedecido con 10 mL de solución nutritiva (Javot *et al.*, 2003). Para maximizar la emergencia de plántulas (con la perspectiva de continuar su observación durante el desarrollo temprano) minimizando el posible efecto fotoinhibitorio inicial, las placas permanecieron en oscuridad durante una semana en la cámara de cultivo descrita anteriormente. Después de siete días en esta condición, las placas fueron expuestas a la luz por tres días más para contar el número de plántulas emergidas al cabo de 10 días desde la imbibición inicial. Este procedimiento se repitió un mínimo de 3 veces para cada cepa de la colección.

3 - Ensayos exploratorios en *Eucalyptus grandis*

3.1 - Diseño experimental general

Para los ensayos exploratorios se utilizaron plantines de *E. grandis* de dos meses de edad, producidos desde semillas sin inocular, siguiendo el protocolo de germinación descrito en [MM2](#). Para que las plantas alcanzaran el estadio de desarrollo deseado, las plántulas fueron transferidas desde las placas de germinación a vasos plásticos conteniendo 80 mL de arena autoclavada y se mantuvieron regadas a capacidad de campo utilizando solución nutritiva (Javot *et al.*, 2003). Con los plantines generados se diseñaron dos tipos de ensayos basados en estrés nutricional para evaluar el efecto benéfico de cepas seleccionadas de bacterias inoculadas en el entorno radical mediante un polímero superabsorbente hidrofílico de composición acrílico-celulósica (SAPH). El gel utilizado es de elaboración propia de este laboratorio en colaboración con la empresa Tetraquímica S.A. y ha mostrado ser un recurso eficaz para favorecer el desarrollo de *Eucalyptus*, solo o formulado con nutrientes minerales (Tubert *et al.*, 2018). En los experimentos de esta tesis se utilizó el SAPH estándar, sin agregado de fertilizantes en su formulación. Los ensayos exploratorios se realizaron en macetas conteniendo 500 mL de una mezcla de arena y vermiculita en proporciones iguales y 150 mL de SAPH, hidratado con agua destilada en el caso del tratamiento control, o con suspensiones bacterianas en las plantas inoculadas (Figura [M2](#)). En todos los casos, el SAPH se hidrató de tal forma de inocular 10¹⁰ UFC, estimadas a partir de la medición de la densidad óptica de los cultivos.

Cada experimento comenzó con el trasplante de los plantines de *E. grandis* a las macetas con sustrato y SAPH y se prolongó entre 75 y 115 días, para abarcar el período crítico de implantación a campo. En todos los ensayos se llevó a cabo una rotación de los recipientes conteniendo a los individuos de tal forma de minimizar el efecto posicional, independientemente de haber sido cultivados en invernadero o en cámara de cultivo. Las particularidades de cada tipo de ensayo exploratorio se describen a continuación.

3.2 - Ensayos de deficiencia de fósforo

El ensayo de deficiencia de fósforo en invernadero se realizó durante los meses de octubre de 2016 a enero de 2017. El fósforo presente en la solución nutritiva de riego se sustituyó por fósforo insoluble (CaHPO_4) mezclado con el sustrato. La cantidad de CaHPO_4 a agregar en el sustrato se calculó considerando un hipotético riego semanal de 500 mL de solución nutritiva (Javot *et al.*, 2003) por planta durante 12 semanas, resultando en 3 mmoles de fósforo total, equivalente a 0,41 g de fosfato dicálcico por planta. Antes del trasplante, en cada maceta se dispusieron 150 mL de SAPH hidratado. Dos grupos de plantines de *E. grandis* (SAPH-Control y SAPH+M25) fueron trasplantados a macetas conteniendo el fosfato insoluble en el sustrato mientras un tercer grupo se mantuvo como control positivo del crecimiento, siendo regado con la solución nutritiva completa (grupo SAPH SNC). Uno de los grupos de plantas cultivados en sustrato con fósforo insoluble recibió la inoculación con M25 embebida en la matriz del SAPH (SAPH+M25), mientras el otro grupo fue cultivado con SAPH hidratado con agua destilada (SAPH Control). Cada grupo contó con 4 réplicas y se monitoreó su aspecto general, la pérdida de hojas y la altura durante 95 días desde el trasplante. A tiempo final se registró el diámetro de la base del tallo y los parámetros de intercambio gaseoso de todos los plantines ([MM6](#)).

El segundo ensayo de deficiencia de fósforo, replicó el experimento del invernadero pero con una duración de 91 días y se realizó en una cámara de cultivo de condiciones controladas ($250 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo 16/8 hs L/O, $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 65-70% HR). Además de los tres grupos mencionados para el ensayo en invernadero, se incorporó un cuarto grupo de plantines a los que se les inoculó otra cepa candidata del cepario (SAPH+N32). Cada grupo contó con 7 réplicas.

3.3 - Ensayos de deficiencia nutricional generalizada

Los ensayos de deficiencia nutricional generalizada se realizaron en la misma cámara de cultivo que el ensayo de deficiencia de fósforo, bajo condiciones ambientales idénticas ($250 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo 16/8 hs L/O, $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 65-70% HR). Se utilizaron macetas de 500 mL, conteniendo como sustrato la mezcla arena:vermiculita 1:1 V V⁻¹ y 150 mL de SAPH hidratado. En todos los casos, los nutrientes fueron adicionados únicamente a través del riego con 250 mL semanales de líquido. Se definieron cuatro grupos de plantines según la concentración de nutrientes que recibieron a partir de diluciones de la solución nutritiva madre (Javot *et al.*, 2003). El tratamiento "1x" corresponde a la aplicación de la solución nutritiva original. Esta solución fue diluida 5 y 50 veces para utilizar como riego de los tratamientos "1/5x" y "1/50x", respectivamente. El tratamiento "0x" corresponde al riego con agua destilada sin agregado de nutrientes.

En un primer ensayo de 115 días de duración, se evaluó el efecto de la inoculación de N32 (SAPH+N32) en comparación con un grupo SAPH Control donde el SAPH se hidrató con agua destilada. El mismo diseño experimental se repitió pero en un período de tiempo más corto (72 días) e inoculando las cepas BT2 y N33 (grupos SAPH+BT2 y SAPH+N33). Ambos ensayos contaron con un número de 3-4 individuos por tipo de inoculación en cada dilución nutricional aplicada. Al igual que en los experimentos previos, se estimaron los parámetros morfométricos y de intercambio gaseoso a luz saturante ([MM6](#)).

4 - Ensayos exploratorios en *Arabidopsis thaliana*

4.1 - Diseño experimental general

Las pruebas con *Arabidopsis thaliana* se llevaron a cabo en cámara de cultivo con una intensidad de luz de $150 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, un fotoperíodo de 12/12 hs L/O, temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ y humedad relativa de 65-70%. Las semillas del ecotipo Columbia fueron superficialmente esterilizadas y germinadas en medio MS agarizado (Murashige & Skoog, 1962). Para la esterilización superficial, las semillas fueron sumergidas con agitación en una solución de 4 partes de etanol 96% con una parte de lavandina ($12,5 \text{ g Cl L}^{-1}$) durante 10 minutos, luego se retiró el sobrenadante y se realizaron dos lavados con etanol 96%, dejando secar las semillas en flujo laminar. Las

placas con las semillas sembradas se mantuvieron en oscuridad a 4°C durante 4 días y posteriormente fueron expuestas a la luz en la cámara de cultivo para iniciar la germinación. Plántulas de 7 días de crecimiento fueron transferidas desde las placas de germinación a vasos plásticos de 80 mL conteniendo sustrato nutritivo GrowMix Multipro (Terraferil S.A. Moreno, Buenos Aires, Argentina) mezclado con perlita en proporciones 3:1 (V V⁻¹).

4.2 - Ensayo de tolerancia a la sequía

Para el ensayo de tolerancia a la sequía en *Arabidopsis thaliana*, la inoculación se realizó a través del riego y no se utilizó SAPH. Al finalizar la segunda semana desde la implantación en los vasos plásticos, se inocularon dos grupos de plantas aplicando 1 mL de suspensión bacteriana 10⁸ UFC mL⁻¹, manteniendo un grupo de *Arabidopsis* sin inocular como grupo control. Todos los grupos contaron con un total de nueve réplicas. Las plántulas se mantuvieron regadas a capacidad de campo con solución nutritiva (Javot *et al.*, 2003) durante tres semanas desde el inicio del ensayo, es decir que desde la inoculación hasta la suspensión del riego al final de la tercera semana, transcurrió una semana de interacción entre el inóculo y las plantas. Luego del período de riego abundante, se suspendió el suministro de agua y se permitió la deshidratación libre del sustrato por otras tres semanas. En ese momento (6 semanas desde el trasplante a los vasos plásticos) se determinó el número de plántulas que habían alcanzado el punto de marchitez permanente y el peso seco de las rosetas.

4.3 - Ensayo de comparación entre métodos de inoculación

Para determinar el efecto de la inoculación bacteriana en la acumulación de biomasa en *A. thaliana*, plántulas germinadas en placas fueron inoculadas por riego o a través del SAPH al momento de trasplantarlas a los vasos con sustrato GrowMix:perlita. Para la inoculación por riego se aplicó 1 mL de suspensión bacteriana 10⁸ UFC mL⁻¹, directamente sobre el sustrato cercano a la plántula de *Arabidopsis* recientemente trasplantada. Para inocular mediante el SAPH, se colocó 1 mL de gel hidratado con la suspensión bacteriana en el pocillo de plantación, de tal forma de aplicar la misma cantidad de bacterias que en la inoculación por riego. Para los grupos control, se agregó 1 mL de agua destilada o 1 mL de SAPH sin inóculo. Cada grupo contó con 8 o 9 réplicas. Este ensayo tuvo una duración de 3 semanas, durante las cuales se

mantuvieron todos los vasos bien regados con solución nutritiva, sin imponer ningún tipo de estrés abiótico, por lo que todas las plantas se encontraban vivas y turgentes a tiempo final. Para determinar el área foliar de cada roseta se tomaron fotografías (180 ppp) de cada planta perpendicularmente al área circular de los vasos y se calculó el área foliar de cada roseta mediante el procesamiento de imágenes en Photoshop CS3, separando el área ocupada por tejido verde de los demás colores (ver video demostrativo en www.youtube.com/LeafArea). Posteriormente, se determinó el peso seco de la roseta de cada planta luego de 48 horas en estufa a 80°C.

5 - Ensayos de tolerancia a la sequía en *Eucalyptus grandis*

5.1 - Diseño experimental general

En estos ensayos se implementó un diseño modificado del utilizado por Shi y colaboradores (2010) para la evaluación del efecto de la sequía en *Populus popularis* crecidos en sustrato con hidrogeles. Para esta tesis se utilizaron plantines de *E. grandis* generados a partir de semillas y crecidos en una cámara de cultivo de condiciones controladas (250 μmol fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo 16/8 h L/O, 22 \pm 2°C, 65-70% HR) hasta alcanzar los dos meses de edad. La germinación se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en [MM2](#). Al cabo de siete días las placas fueron descubiertas y expuestas a la luz para permitir a las plántulas aclimatarse al fotoperíodo durante tres días antes de ser separadas individualmente en recipientes plásticos, conteniendo 80 ml de arena autoclavada. Se realizaron fertilizaciones regulares mediante el riego con la misma solución nutritiva utilizada para la germinación. Alcanzados los dos meses de edad, los plantines fueron extraídos de estos envases pequeños y lavados para remover toda la arena o nutrientes residuales del entorno radical y fueron trasplantados en macetas de 500 mL para iniciar los experimentos en la cámara de cultivo o como paso intermedio para permitir una aclimatación corta en el ensayo en invernadero.

Se ensayaron dos tipos de sequía diferentes mediante variaciones en el diseño experimental. En el ensayo en invernadero se llevó a cabo un estrés hídrico severo pero gradual y prolongado en el tiempo, con ambas cepas inoculadas individualmente en distintos eucaliptos. En los dos ensayos en cámara de cultivo también se realizó un estrés hídrico severo pero rápido y de corta duración. En uno de ellos, M25 y N33 fueron inoculadas individualmente y en el otro se aplicaron simultáneamente, en proporciones iguales. En los tres ensayos el método de inoculación fue a través del SAPH hidratado

con suspensiones bacterianas ajustadas para que cada plantín recibiera una carga inicial de 10^{10} UFC en la matriz del polímero colocado en el pocillo de plantación (Figura M2).

En los tres experimentos se planteó un diseño bifactorial, con “inoculación” y “régimen hídrico” como factores principales. Dentro del factor inoculación, los niveles fueron cada una de las cepas a inocular y Control sin inocular. El factor “régimen hídrico” hace referencia al tipo de riego recibido. Todos los eucaliptos recibieron inicialmente un riego abundante pero la mitad de los plantines de cada ensayo fueron mantenidos bien regados a lo largo de toda la duración del ensayo, mientras a la otra mitad se le suspendió el suministro de agua por un tiempo determinado para posteriormente reanudar el riego e iniciar un período de recuperación desde el estrés hídrico (Figura M1). Para minimizar la pérdida de agua por evaporación directa desde el sustrato, las macetas de todos los individuos a los que se les suspendió el riego fueron cubiertas con envolturas plásticas cerradas alrededor de la base de los eucaliptos, durante el período de sequía. Las envolturas fueron retiradas al reanudar el riego normal en el período de recuperación. En todos los casos, las plantas fueron reordenadas y reubicadas regularmente en el espacio de trabajo para evitar efectos posicionales.

Tanto en el invernadero como en la cámara de cultivo, se determinaron la altura, diámetro en la base del tallo central, índice de verdor, contenido relativo de agua (CRA), conductancia estomática (g_s), tasa fotosintética neta (P_n) y tasa transpiratoria (E) a lo largo del tiempo de duración de cada ensayo. Al finalizar el período de recuperación de la sequía, se calculó el área foliar total y se registró el peso de raíces, tallos y hojas por separado, junto con parámetros relacionados al manejo del agua y la hidráulica de los plantines (MM6). Las particularidades de cada ensayo de tolerancia a la sequía en *E. grandis* se describen a continuación.

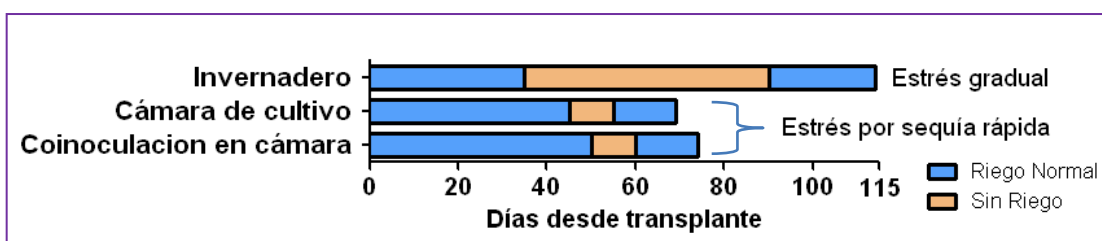


Figura M1: Esquema comparativo del régimen de riego de los grupos estresados en cada ensayo. En celeste se marcan los períodos de riego normal donde los plantines recibieron agua a capacidad de campo, mientras los segmentos naranjas señalan los lapsos de suspensión del riego en cada caso.

5.2 - Ensayo de inoculación individual y sequía gradual en invernadero

Este experimento se llevó a cabo entre febrero y junio de 2018. Los plantines fueron trasladados a un invernadero localizado en la ciudad de La Plata (-34.912375, -57.930637) dependiente del Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE - CONICET - UNLP). La temperatura ambiente media varió entre los 10 y 25°C ([Anexo 3](#): Climograma). La humedad relativa interna del invernadero se registró entre los 50 y 70% al momento de realizar mediciones. Con el paso de las semanas, los cambios estacionales llevaron a una fuerte disminución de la temperatura durante la mañana con un aumento de la HR ambiente favorecida por lluvias frecuentes y abundantes, incluso por encima del volumen esperado para los meses en que se llevó a cabo el ensayo ([Anexo 3](#): Pluviograma). El fotoperíodo cambió consecuentemente desde días con una proporción 14/10 L/O en febrero a 12/12 L/O en junio. La densidad del flujo de fotones en días soleados alcanzó un máximo de 1500 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ al mediodía pero en la mayoría de los días se registraron máximos alrededor de los 1000 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Luego de dos semanas de aclimatación, los plantines que se encontraban en macetas de 500 mL fueron inoculados al ser trasplantados a macetas de 10 L conteniendo sustrato (arena:vermiculita 1:1 V V⁻¹) junto con 500 mL de SAPH previamente hidratado con suspensión bacteriana conteniendo una carga inicial de 10¹⁰ UFC. Para el grupo control, el SAPH fue hidratado con agua destilada. La mitad de las plantas de cada tipo de inoculación fueron regadas con agua corriente para mantenerlas a capacidad de campo continuamente mientras la otra mitad fue sometida a estrés hídrico por suspensión del riego. Cada uno de los seis grupos resultantes de combinar los factores inoculación con dos cepas diferentes y régimen hídrico, contó con un total de 12 plantas seleccionadas aleatoriamente. Los eucaliptos a ser mantenidos en un régimen de riego normal fueron regados a capacidad de campo con agua corriente, suplementando semanalmente con 250 mL de solución nutritiva (Javot *et al.*, 2003). En los grupos preparados para estresar, este régimen de riego normal fue mantenido por un lapso de 35 días después del trasplante, luego del cual se suspendió el suministro de agua por 55 días, implicando un período de sequía prolongado. Al finalizar el tiempo del estrés, el riego con agua corriente y solución nutritiva fue reiniciado y mantenido durante 24 días, determinando un período de recuperación ([Figura M1](#)).

5.3 - Ensayo de inoculación individual y sequía rápida en cámara de cultivo

Plantines de dos meses de edad fueron inoculados directamente al ser trasplantados desde los vasos de 80 mL a macetas de 500 mL, sin un período intermedio de aclimatación, ya que el experimento se desarrolló en el mismo ambiente donde los eucaliptos fueron producidos desde el inicio. En este caso, las macetas contenían el mismo sustrato arena:vermiculita 1:1 $V V^{-1}$ pero con menor cantidad de SAPH. Cada individuo recibió 150 mL del polímero previamente hidratado con suspensiones bacterianas conteniendo una carga inicial de 10^{10} UFC iniciales o hidratado con agua destilada en el caso del grupo control. Se adaptó el mismo sistema bifactorial descrito para el ensayo en invernadero, disponiendo de 8 réplicas por tratamiento, seleccionadas aleatoriamente. En condiciones de riego normal, los eucaliptos fueron regados a capacidad de campo con agua corriente, suplementando semanalmente con 150 mL de solución nutritiva (Javot *et al.*, 2003). Los grupos sin estresar se mantuvieron bien regados a lo largo de la duración del experimento, mientras que las plantas del tratamiento de sequía fueron regadas normalmente durante 45 días luego del trasplante a las macetas de 500 mL y luego de esa fase inicial, se les suspendió el suministro de agua por 10 días, para después reanudarlo durante 14 días más, completando un total de 69 días (Figura [M2](#)).

5.4 - Ensayo de coinoculación y sequía rápida en cámara de cultivo

El ensayo de coinoculación conservó el diseño del experimento de sequía rápida e inoculaciones individuales ([MM5.3](#)), utilizando macetas de 500 mL y condiciones ambientales idénticas, pero en este caso el factor “inoculación” contó solo con dos niveles correspondientes al agregado simultáneo de M25+N33 o los controles sin inocular. Para la coinoculación de las dos cepas seleccionadas, el SAPH fue hidratado con suspensiones bacterianas ajustadas para que ambas cepas se encontraran en igual proporción, inoculando $0,5 \times 10^{10}$ UFC de cada cepa en 150 mL de SAPH hidratado y colocado en el pocillo de plantación. El régimen de riego de los plantines estresados fue semejante al ensayo descrito en [MM5.3](#), excepto que se implementó un período inicial de 50 días bajo riego normal, 10 días sin riego y 14 días de recuperación, completando un total de 74 días para este ensayo (Figura [M1](#)). Los eucaliptos no estresados se mantuvieron bien regados con agua corriente y suplementados semanalmente con 150 mL de solución nutritiva (Javot *et al.*, 2003).

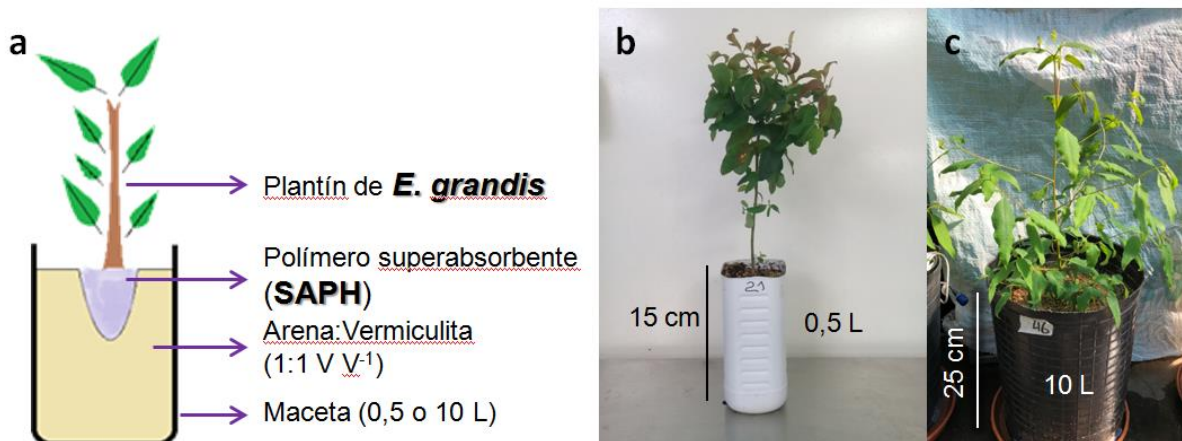


Figura M2: Esquema y unidades experimentales representativas de los ensayos exploratorios y los experimentos de sequía en *E. grandis*. (a) Esquema de plantación de un plantín en macetas conteniendo una mezcla de arena y vermiculita (1:1 V V⁻¹) como sustrato y SAPH hidratado con agua o con suspensión bacteriana según corresponda. (b) Ejemplar de eucalipto plantado en maceta de 0,5 L conteniendo sustrato y 150 mL de SAPH, representativo de los ensayos exploratorios y de los experimentos de sequía en cámara de cultivo. (c) Ejemplar de eucalipto plantado en maceta de 10 L conteniendo sustrato y 500 mL de SAPH, representativo del experimento de sequía en invernadero.

6 - Medición de variables en *Eucalyptus grandis*

6.1 - Variables relacionadas al crecimiento y a la biomasa

La **altura** de cada eucalipto fue considerada desde el nivel del sustrato hasta el ápice principal, midiendo en intervalos de 0,5 cm. El **diámetro del tallo principal** fue medido en la base de los eucaliptos, inmediatamente por encima de la primera raíz secundaria. Ambos parámetros fueron medidos semanalmente usando una cinta métrica y un calibre Vernier, respectivamente. Con los pares de datos de altura y diámetro se calculó del **índice de crecimiento** (IC), el cual resulta de multiplicar la altura por el diámetro al cuadrado ($IC = altura \times diámetro^2$) para un tiempo determinado. El incremento en tamaño general de los plantines se calculó como la diferencia en el IC entre el momento inicial y el momento final. Este índice de crecimiento aproxima de forma simplificada el volumen total del tallo central, considerándolo un cilindro.

Para determinar la partición de **biomasa** entre los distintos órganos, los tallos, raíces y hojas de cada planta fueron separados, secados por 48 horas a 80°C y pesados en una balanza analítica para obtener el peso a tiempo final de cada órgano. El **coeficiente Raíz:Vástago** se calculó como el cociente entre el peso seco de las raíces y el de la suma de tallos y hojas de cada individuo.

Para estimar el **área foliar total** se tomó una muestra de hojas de cada planta, las que fueron escaneadas (con resolución de 300 ppi) sobre fondo blanco inmediatamente luego de ser cortadas y el área verde ocupada por las hojas fue calculada mediante procesamiento de imágenes en Photoshop CS3, siguiendo el mismo protocolo utilizado para medir el área foliar de las rosetas de arábidopsis ([MM4.3](#)). Esta muestra de hojas fue secada en sobres de papel madera por 48 horas a 80°C y pesada para relacionar el área verde de las imágenes con su peso seco correspondiente. El área foliar total se calculó multiplicando el peso de la biomasa foliar total por el área escaneada y dividiendo por el peso de la muestra de hojas. Las muestras para la medición del área foliar se tomaron a tiempo final, instantes previos a la cosecha de los individuos.

El **índice de área foliar** se estimó mediante la medición de la luz interceptada por el canopy de plantines, en el ensayo de tolerancia a sequía rápida e inoculaciones individuales en cámara de cultivo ([MM5.3](#)). Para esta estimación se adaptó el protocolo comúnmente utilizado para cultivos a campo (Pask *et al.*, 2013). Los ocho eucaliptos de un mismo grupo se alinearon en dos hileras a 15 cm de distancia, cada hilera formada por cuatro plantines separados 7 cm entre sí, emulando una distribución de plantación a baja escala. Con un sensor de luz fotosintéticamente activa (LI-190R, LI-COR, Lincoln, NE) se registró la cantidad de luz residual que logró atravesar el canopy formado por las ramas y hojas de los plantines (luz transmitida = LT). Se realizaron cuatro mediciones a la altura de la base de los eucaliptos en el medio de ambas hileras. Para registrar ambos lados del canopy de los plantines las hileras fueron intercambiadas de lugar, manteniendo las distancias establecidas, registrando nuevamente los cuatro puntos en el espacio medio entre las hileras. Esta medida es importante para poder compensar posibles asimetrías del vástago que produjeran variaciones en la luz que alcanza la base de los plantines. Junto con la luz transmitida se midió la luz reflejada (LR) colocando el sensor invertido sobre los eucaliptos para captar la cantidad de luz devuelta por el follaje. La intensidad lumínica a la altura del canopy (luz incidente = LI) se midió colocando el sensor en la proximidad de los ápices del vástago, orientado de forma perpendicular hacia al sistema de iluminación de ese estante en la cámara de cultivo. Con esos tres tipos de medida se calculó un índice de área foliar según la fórmula $(LI-LR-LT) / (LI-LR) \times 100$. De esta manera, las variaciones en este índice reflejan los cambios en el área que interfiere con el paso de la luz hasta la base de los plantines, relacionándose con la cantidad de follaje de cada grupo de individuos.

6.2 - Variables relacionadas al manejo del agua y a la fotosíntesis

Para medir el **contenido relativo de agua** (CRA) se tomó una hoja madura totalmente expandida de cada individuo, antes de iniciar el estrés hídrico, en el momento de máxima sequía y luego del período de recuperación. Cada hoja fue inmediatamente pesada para registrar su peso fresco (PF). Posteriormente, las hojas fueron sumergidas en agua destilada y mantenidas a 4°C por 24 horas para luego ser pesadas nuevamente y registrar el peso turgente (PT), que representa el peso de la hoja cuando se encuentra internamente saturada de agua. Luego de obtener el PT, las hojas fueron secadas durante 48 horas en estufa a 80°C y pesadas para registrar el peso seco (PS). El CRA fue calculado como el cociente entre el contenido de agua interna en condiciones de cultivo y el contenido máximo de agua a saturación, según la fórmula $CRA = (PF-PS) / (PT-PS) \times 100$.

La **conductancia estomática** (g_s) fue medida con un porómetro de estado estacionario (modelo SC-1, Decagon Devices, Pullman, Washington) en la cara abaxial de la hoja más joven totalmente expandida del tallo principal. Para minimizar el efecto del fotoperíodo en los ensayos en invernadero, las mediciones se realizaron siempre entre las 10 y las 16 horas, cuando la iluminación del ambiente es relativamente más homogénea, comparado con las horas previas y posteriores a ese rango. El índice de verdor (IV) se registró con un medidor de clorofila instantáneo no destructivo (Minolta SPAD 502) sobre la misma hoja en la que se midió la g_s con porómetro (Pask *et al.*, 2013).

El mismo criterio se usó para seleccionar las hojas a las cuales se les midió la **tasa fotosintética neta** (P_n) y la **tasa transpiratoria** (E). Las mediciones se realizaron con un analizador de gases en el infrarrojo (LI6400, LI-COR, Lincoln, NE), provisto con una cámara de medición iluminada por una lámpara LED con mezcla de color rojo y azul. Se realizaron curvas de luz en tres plantas control (sin estresar ni inocular) del ensayo de deficiencia de fósforo en cámara de cultivo, para determinar el punto de saturación de luz en que la tasa de intercambio gaseoso fue máxima. Para esto, las hojas fueron equilibradas en la cámara del instrumento a 400 ppm de CO₂ e iluminadas con luz fotosintéticamente activa en un rango de intensidad lumínica variable, de 0 (oscuridad) a 1200 $\mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, siguiendo la secuencia 250, 400, 100, 50, 10, 0, 800, 1200 $\mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Las condiciones de temperatura, humedad relativa y flujo de aire dentro de la cámara de medición se mantuvieron constantes en 22°C, 65%

y 500 mmol s^{-1} , respectivamente. El valor de PAR observado como saturante ($1200 \text{ } \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) se utilizó como condición lumínica en las mediciones de P_n y E en todos los individuos de ese ensayo, los ensayos de deficiencia nutricional y los de tolerancia a la sequía, conservando las condiciones de temperatura, humedad relativa, flujo y concentración de CO_2 de la cámara de medición sin cambios. La **eficiencia instantánea en el uso del agua** (EUA) de cada hoja fue calculada como el cociente entre P_n y E a capacidad máxima por saturación lumínica.

Las variables de intercambio gaseoso en el ensayo de deficiencia de fósforo en invernadero se midieron ajustando la intensidad de luz dentro de la cámara de medición del LI6400 a la recibida por los eucaliptos en tiempo real en el lugar de cultivo. Las mediciones se realizaron entre las 11 y 13 horas y la intensidad de luz varió entre los 900 y $1200 \text{ } \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. La temperatura de la cámara de medición se mantuvo constante a 30°C para que se aproximara a la registrada mediante termómetro dentro del invernadero. El flujo de aire y la humedad relativa se mantuvieron a 300 mmol s^{-1} y 65% , respectivamente.

Usar la hoja más joven totalmente expandida del tallo principal para la medición de g_s , IV, P_n y E en lugar de medir siempre la misma hoja, implicó que los resultados no incluyeran información sobre la velocidad relativa del desarrollo y senescencia de las hojas en los distintos tratamientos, pero permitió efectuar mediciones en todas las plantas, incluso cuando ciertas hojas se hubieran desprendido debido al estrés hídrico u otros factores.

La **velocidad de evapotranspiración** de agua se registró a través del pesaje regular de cada maceta (Shi *et al.*, 2010). Se consideró como el punto máximo de sequía el momento en que se estabilizó la caída del peso en las macetas con riego suspendido. Para determinar el pH y la conductividad eléctrica del sustrato, se tomaron 10 mL de sustrato de cada maceta en tubos falcon de 50 mL . A cada muestra se le agregaron 20 mL de agua destilada, resultando en una proporción de una parte de suelo por cada dos partes de agua. Cada tubo se agitó manualmente durante dos minutos para favorecer la interacción entre el medio líquido y la fase sólida y luego se dejó reposar hasta decantar todo el sustrato. El pH y la conductividad eléctrica del sobrenadante se determinaron con un pH-metro (modelo Adwa AD8000) y con un conductímetro (modelo Adwa AD204), respectivamente, los que fueron previamente calibrados con soluciones estándares.

Las **curvas presión-volumen** se construyeron con datos provenientes de una rama de cada una de seis plantas por tratamiento, tomados al finalizar el período de recuperación. Las ramas fueron hidratadas por 24 horas en agua destilada a 4°C hasta la máxima turgencia y pesadas en una balanza analítica. El potencial hídrico a máxima turgencia de cada rama fue medido con una cámara de presión de Scholander (Biocontrol, Argentina). A partir de ese momento, se dejó secar las ramas a temperatura ambiente y se registró su peso y potencial hídrico regularmente hasta alcanzar la deshidratación completa. Con los pares de datos resultantes (peso y potencial hídrico asociados a un mismo momento de medición) se analizó la curva de decaimiento del potencial hídrico en función del contenido relativo de agua calculado con los pesos en cada tiempo, el peso de máxima turgencia de cada rama y su peso seco en su máxima deshidratación. Los valores medios de las curvas por grupo fueron analizadas utilizando el macro de libre acceso "PV Curve Fitting 5.6.xls" (disponible en <http://landflux.org/Tools.php>), basado en la metodología descrita por Schulte y Hinckley (1985). El macro ajusta las curvas presión-volumen a un modelo lineal bifásico, donde la pendiente de la primera recta permite evaluar el coeficiente de máxima elasticidad (E_{max}), la intersección entre las dos rectas corresponde al potencial osmótico en el punto de pérdida de turgencia (Ψ_0 PPT), la proyección de la segunda recta sobre el eje del potencial hídrico estima el potencial osmótico a máxima saturación interna de agua (Ψ_0 SAT) y la raíz de esa misma recta estima el contenido relativo de agua apoplástica (CRA apoplástico).

7 - Transformación de M25 y N33

Las cepas seleccionadas fueron transformadas para producir la proteína fluorescente verde de medusa (GFP). Simultáneamente, se les incorporó la información del gen *nptII*, que produce la enzima neomicina fosfotransferasa II de resistencia a neomicina y kanamicina. Las variantes fluorescentes fueron generadas por conjugación de cuatro líneas parentales compatibles, utilizando el sistema de transposones mini-Tn7 (Lambertsen *et al.*, 2004). Mediante esta técnica se logra la inserción estable de la secuencia de interés en un sitio único y neutral del cromosoma bacteriano. El trabajo fue realizado en los laboratorios de 'Microbiología del Suelo' y de 'Interacciones Planta-Microorganismos' (INTECH-CONICET-USAM), en colaboración con los doctores Luis Nazareno Castagno, María Elisa González, Fernando Pieckenstain y María Julia Estrella.

8 - Análisis de la supervivencia de M25 y N33

8.1 - En la matriz del SAPH

La supervivencia de las cepas se evaluó en la matriz del SAPH aislado, es decir, libre de suelo y en ausencia de plantas. Para esto, el SAPH fue autoclavado y posteriormente hidratado con suspensiones axénicas de las bacterias transformadas conteniendo 10^8 UFC mL^{-1} en agua destilada. Como control, se hidrató la misma cantidad de SAPH con agua destilada estéril. Sesenta mL de cada preparación de SAPH (inoculado con M25, con N33 o sin inocular) fueron transferidos a frascos de vidrio tapados con aluminio de forma de permitir el intercambio gaseoso. Los frascos se mantuvieron en oscuridad en una cámara de cultivo ($22 \pm 2^\circ\text{C}$, 65-70% HR) durante tres meses. Periódicamente, se tomaron muestras de entre 0,8 y 1,4 gramos de gel desde cada frasco bajo esterilidad en flujo laminar. Se realizaron diluciones seriadas de cada muestra, según su propio peso, con solución estéril de MgCl_2 10 mM en factores de 10. Cincuenta μL de cada dilución se sembraron por triplicado en una misma placa conteniendo medio LB agarizado 0,8% (m V^{-1}) suplementado con $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de kanamicina. (Figura M3). Cada placa se realizó por duplicado y todas las placas se incubaron durante 24 horas a 28°C para su conteo al día siguiente de la siembra. El número de colonias fluorescentes en cada muestra se evaluó mediante el método de conteo por gota (Naghili *et al.*, 2013). En cada placa se determinó la dilución donde se pudieran distinguir colonias aisladas y se realizó un promedio del número de colonias fluorescentes observadas entre los duplicados de una misma muestra, para luego retroceder en los cálculos de dilución y determinar una cantidad de bacterias por mL de SAPH colectado originalmente. Para realizar el conteo se analizaron fotografías de cada placa mediante la herramienta “multipoint” del software de acceso libre ImageJ (Rasband, 2018).

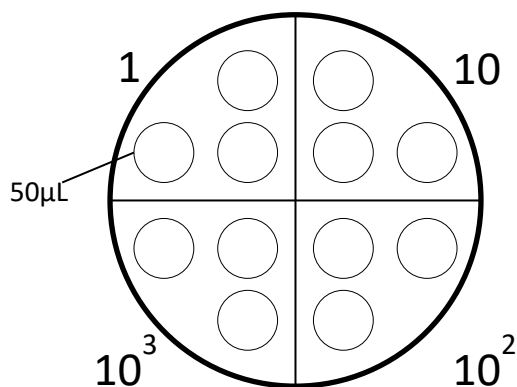


Figura M3: Esquema de siembra de muestras para el rastreo de bacterias fluorescentes. Cada muestra fue resuspendida y diluida en MgCl_2 y se sembraron 3 gotas de $50 \mu\text{L}$ de cada dilución, en placas de Petri de 90 mm de diámetro con medio LB semisólido suplementado con $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de kanamicina. Los números en las esquinas de cada cuadrante indican el factor de dilución: 1, 10, 10^2 , 10^3 correspondiente a 10, 100, 1000, 10000 mL de MgCl_2 por cada gramo de muestra original, respectivamente. Todas las placas se realizaron por duplicado.

8.2 - En diferentes sustratos con o sin SAPH

Para evaluar la supervivencia de N33 y M25 en diferentes sustratos, se aplicaron las bacterias transformadas con GFP embebidas en el SAPH o mediante inoculación por riego y se determinó la cantidad de inóculo viable remanente en el tiempo a través de muestreos periódicos. Se utilizó el sistema de frascos descrito en [MM8.1](#), donde se colocaron 100 mL de arena, arena:vermiculita 1:1 (V V⁻¹) o tierra fértil (sustrato comercial GrowMix Multipro, Terrafertil) en cada recipiente. Los tres tipos de sustratos fueron previamente autoclavados para evitar el crecimiento de otros microorganismos.

Para ambos métodos de inoculación, se prepararon suspensiones bacterianas de 10⁸ UFC mL⁻¹ en MgCl₂ 10 mM y se colocaron 30 mL en cada frasco, de forma directa en el caso de las inoculaciones por riego o utilizando las suspensiones de bacterias para hidratar el SAPH, aplicando 30 mL del gel mezclado con el sustrato. Considerando el volumen de sustrato en cada frasco y el agregado de un número equivalente de UFC por ambos métodos, la concentración inicial en cada frasco fue de 3x10⁷ CFU por mL de sustrato. A partir de ese momento, en intervalos semanales se tomaron muestras de entre 0,8 y 1,4 gramos desde cada frasco, se diluyeron en MgCl₂ y se sembraron en placas de Petri con medio LB suplementado con 50 µg ml⁻¹ de kanamicina, siguiendo el patrón de la figura [M3](#). Tanto las inoculaciones como la toma de muestras y la preparación de las placas de Petri se realizaron bajo flujo laminar. Entre muestreo y muestreo los frascos permanecieron en oscuridad en una cámara de cultivo (22±2°C, 65-70% HR) durante tres meses.

9 - Localización de las bacterias

9.1 - Luego de sequía en sustrato sin esterilizar

Se inocularon las bacterias transformadas con GFP en macetas de 500 mL, conteniendo plantines de *E. grandis* de dos meses de edad y sustrato comercial (GrowMix Multipro, Terrafertil) sin esterilizar. Los plantines utilizados no fueron producidos desde semilla sino que fueron adquiridos a la empresa Paul Forestal S.R.L, que los genera por macropropagación clonal de la variedad registrada como INTA36. Ésta corresponde a un genotipo de *E. grandis* ampliamente comercializado en Argentina y de uso establecido en plantaciones forestales.

Los cultivos de M25 y N33 fueron crecidos como se describe en las pruebas de germinación ([MM2](#)), pero resuspendiendo en agua destilada para su aplicación por riego en el entorno radical de los clones en maceta. Se aplicaron 100 mL de suspensión bacteriana de concentración 10^8 UFC mL⁻¹ mientras el grupo control recibió 100 mL de agua destilada.

Inicialmente, las plantas fueron regadas a capacidad de campo por 16 días para permitir la interacción entre las plantas, las bacterias inoculadas y otros microorganismos presentes en el sustrato sin esterilizar. Posteriormente, se suspendió el riego por 14 días, lo que fue seguido de 21 días de riego normal. Periódicamente se colectaron muestras de suelo de cada maceta para verificar la presencia de las bacterias fluorescentes en las macetas inoculadas y para descartar la presencia de microorganismos resistentes a kanamicina que pudieran introducir falsos positivos, mediante la observación de las placas sembradas con muestras provenientes del control no inoculado. A los 51 días de iniciado el ensayo, junto con las muestras de suelo se tomaron también muestras de hojas, raíces y rizoplano. Para las muestras provenientes de hoja y raíz, el material vegetal fue superficialmente esterilizado por 30 segundos en alcohol 96%, lavado con agua destilada y homogeneizado con mortero usando 1 mL de MgCl₂ 10mM por cada gramo de biomasa. Para las muestras de rizoplano, las raíces fueron lavadas minuciosamente con agua destilada estéril realizando 4 enjuagues para eliminar los restos de sustrato. Posteriormente, fueron trituradas sin esterilización superficial previa, permitiendo la supervivencia de los microorganismos externos a las raíces colectadas pero que no se hubieran eliminado en los lavados. El homogenato obtenido de cada muestra fue filtrado para remover residuos vegetales de gran tamaño y se utilizó el sobrenadante para realizar diluciones seriadas y sembrar gotas de 50 µL en placas de Petri. En todos los casos, el medio LB agarizado fue suplementado con 50 µg mL⁻¹ de kanamicina, con el agregado de 50 µg mL⁻¹ de nistatina para evitar el desarrollo de hongos propios del sustrato. Las placas fueron incubadas a 28°C por 24 horas y analizadas con un transiluminador UV para realizar el conteo de colonias bacterianas fluorescentes.

9.2 - Localización y efecto sobre raíces en microescala

A partir de semillas de *E. grandis* y *A. thaliana* superficialmente esterilizadas se prepararon placas de germinación con medio MS. Las semillas de *E. grandis* fueron esterilizadas por inmersión en lavandina comercial 25 g Cl L⁻¹ durante 10 minutos y

lavadas un mínimo de tres veces con agua destilada estéril. Las placas con las semillas de eucalipto fueron envueltas con aluminio por 2 días y mantenidas en oscuridad para evitar cualquier tipo de efecto fotoinhibitorio de la germinación. Las semillas de *A. thaliana* fueron esterilizadas como se describe en la sección [MM4.1](#) y sus placas de germinación fueron incubadas en oscuridad a 4°C durante 4 días para asegurar una germinación homogénea al ser expuestas a la luz. Las placas de ambas especies fueron colocadas de forma vertical para favorecer el desarrollo de la raíz en una dirección y por encima del medio agarizado, en una cámara de cultivo (150 μmol fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo 12/12 h L/O, $22\pm 2^\circ\text{C}$, 65-70% HR). Luego de una semana de crecimiento en luz, las plántulas fueron transferidas a placas cuadradas con medio MS y también en posición vertical, de a cinco individuos por placa, alineados en el extremo superior con las raíces orientadas hacia abajo. Para la aplicación de las bacterias y la observación de sus efectos sobre las raíces se siguió un protocolo adaptado de Asari y colaboradores (2017). Aproximadamente 0,5 cm por debajo de cada ápice radicular se sembró una gota de 20 μL de suspensión bacteriana por plántula. Las suspensiones originales de bacterias fluorescentes se ajustaron a una DO de 1, equivalente a 10^9 UFC mL^{-1} , por lo tanto en cada gota de 20 μL se aplicó un total de 2×10^7 UFC. En el caso de las placas control se sembró el volumen equivalente con solución autoclavada de MgCl_2 10 mM. Luego de una semana de crecimiento en las placas cuadradas verticales, se utilizó un scanner de alta resolución (600 ppp) para fotografiar cada placa y evaluar los cambios en la arquitectura radicular. Posteriormente, los vástagos fueron cortados y pesados inmediatamente. Debido a la sensibilidad de la balanza utilizada y el pequeño tamaño de las plantas, se registró el peso fresco promedio del conjunto de plantas cultivadas en cada placa. Las raíces fueron colocadas en portaobjetos y observadas bajo microscopio de fluorescencia para evidenciar la presencia de inóculo. Cada grupo resultado de la combinación entre los factores “inoculación” (M25, N33 o Control) y “especie” (*E. grandis* o *A. thaliana*) contó con un total de 4 réplicas, considerando una única unidad experimental a la placa cuadrada con 5 plántulas en ella.

10 - Análisis estadístico

10.1 - Pruebas de germinación

Se evaluó la diferencia entre el promedio de plántulas germinadas en las placas inoculadas con las distintas cepas de la colección respecto al control sin inocular mediante intervalos de confianza (IC 95%). Debido a la gran cantidad de cepas

ensayadas, con distinto número de réplicas y con heterocedasticidad marcada entre las cepas, las diferencias se analizaron de forma bidireccional, es decir, constatando que la media de cada cepa quedara excluida del intervalo de las placas control y viceversa.

10.2 - Ensayos exploratorios y de tolerancia a la sequía

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA de uno o dos factores, según correspondiera (señalado en la leyenda de cada figura). En los ensayos exploratorios de deficiencia de fósforo en *E. grandis*, las variables P_n , E, EUA e IC se analizaron mediante un ANOVA de un factor. De la misma forma, se analizó con un ANOVA de un factor el peso de la roseta en el ensayo exploratorio de tolerancia a la sequía en *A. thaliana*, g_s en el experimento de sequía gradual en *E. grandis* y el peso del vástago de ambas especies en los experimentos en placas verticales. Se realizó un ANOVA de dos factores para las variables de intercambio gaseoso (P_n , E y EUA), biomasa, IC, área foliar y CRA, en los ensayos exploratorios de deficiencia nutricional, en los experimentos de sequía en *E. grandis* y en el ensayo de comparación entre métodos de inoculación en *A. thaliana*. En todos los casos se utilizó $\alpha = 0,05$, excepto en el análisis de la EUA de plantines de eucalipto en el ensayo exploratorio de deficiencia de fósforo en el invernadero, donde se utilizó $\alpha = 0,1$ para señalar una tendencia relevante.

El índice de verdor de los ensayos de tolerancia a la sequía en *E. grandis* fue analizado mediante una prueba T (dos colas, $\alpha = 0,05$), comparando la media de los datos de invernadero contra la media de ambos ensayos en cámara de cultivo en conjunto.

Los supuestos de homocedasticidad y normalidad fueron verificados previamente mediante las pruebas de Levene y Shapiro-Wilk, respectivamente. En caso de detectar heterocedasticidad, se utilizaron modelos lineales generalizados (MLG) para modelar la varianza. Cuando la interacción entre factores resultó significativa (P-valor < 0,05) en los ANOVA de dos factores y los MLG, se compararon todas las combinaciones de tratamientos posibles mediante contrastes *post-hoc* con el método de Tukey (indicando las diferencias con letras minúsculas en tablas y figuras). En los casos donde los factores principales resultaron significativos pero no así la interacción, las medias de los niveles de esos factores fueron comparadas en un ANOVA de efectos principales

(utilizando letras minúsculas para marcar diferencias en el factor “inoculación” y letras mayúsculas para el factor “régimen de riego”).

Todos los análisis estadísticos de los ensayos fueron realizados con el software Infostat (di Rienzo *et al.*, 2018) y los gráficos realizados con la plataforma GraphPad Prism 6.01 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com).

10.3 - Análisis multivariados

Con los datos combinados de los tres ensayos de sequía se evaluó la existencia de patrones de correlación entre variables y el ordenamiento de grupos considerando la influencia global de los parámetros medidos y su interacción conjunta como parte de un sistema más amplio que explique la variabilidad observada entre los individuos.

Previo a los estudios de correlación y el análisis de componentes principales (ACP), se confeccionó la planilla de datos conteniendo el máximo número de variables posibles, registradas sobre los mismos individuos identificados de tal forma de asociar los valores de cada variable a un eucalipto en particular. Como criterio para que los datos entre ensayos resultaran comparables, se usaron los valores registrados a tiempo final, considerando que la mitad de los individuos corresponden a eucaliptos que sufrieron el estrés hídrico mientras la otra mitad corresponden a plantines continuamente regados. Todos los análisis derivados de esa planilla se realizaron utilizando la plataforma de programación R combinada con la interfase visual RStudio (RStudio Team, 2020), en conjunto con Infostat (di Rienzo *et al.*, 2018).

En primer lugar, se completaron algunos datos faltantes de la planilla, que pudieran estar ausentes debido a problemas técnicos durante las mediciones o por ser valores notoriamente atípicos (outliers) según lo observado en los MLG. Para esto, se utilizaron los paquetes FactoMineR (Lê *et al.*, 2008) y missMDA (Josse & Husson, 2016) con una serie de comandos para realizar un ACP de imputación de datos. De esta forma, los valores completados corresponden a valores ajustados a lo esperable para ese individuo, considerando el resto de sus valores para las demás variables y la relación entre variables observada comparativamente entre individuos. Con éste método se evita la pérdida de unidades de estudio que de otra forma deberían ser excluidas de la planilla por la ausencia de dato en una variable, a la vez que se evita completar el valor ausente

con la media estadística del grupo, lo cual modificaría la correlación entre variables ya que la media no es un valor propio del individuo en particular sino del tratamiento al que pertenece.

Con la planilla de datos completa se procedió a evaluar la relación entre variables mediante el índice de correlación de Pearson, cuya significancia se determinó a través de la regresión lineal de cada distribución de datos y su nivel de ajuste a una recta. Para la elaboración de la matriz de correlación bivariada (entre pares de variables) y el diagrama de dispersión de datos se utilizaron las funciones ``cor`` y ``plot`` integradas en los códigos básicos de R, junto con el paquete GGally que ofrece la combinación entre los cálculos de correlación y el soporte gráfico. El mismo procedimiento se aplicó para el cálculo y gráfico de la correlación entre el índice de crecimiento y la evapotranspiración total de las macetas al finalizar la sequía.

Para el ACP, se retiraron de la planilla las variables redundantes calculadas a partir de combinaciones de otras variables de la misma tabla y se calcularon los centroides (medias multivariadas) de cada grupo resultante de la combinación de tres factores: el tipo de ensayo, el tipo de inóculo recibido y el régimen hídrico aplicado. Este agrupamiento de individuos según los tres factores mencionados fue tomado como criterio de clasificación para el ordenamiento de las variables más influyentes en su separación. Se utilizaron los paquetes FactoMineR (Lê *et al.*, 2008) y Ade4 (Dray & Dufour, 2007) para obtener los datos sobre la distribución de la variabilidad del sistema entre los componentes principales, el valor relativo de los autovalores de cada componente y las coordenadas de los vectores que representan a las variables. Esta información se plasmó en un biplot de los primeros dos componentes, que permitió la evaluación de patrones en la distribución de los centroides de los grupos, vistos como unidades de estudio globales del sistema.

Resultados

Selección de las cepas bacterianas

El trabajo experimental con especies forestales presenta dificultades intrínsecas del material vegetal utilizado, como el mayor requerimiento de espacio comparado con especies herbáceas o la necesidad de tiempos de cultivo superiores para permitir el crecimiento de las plantas hasta un estadio de desarrollo de interés. Como consecuencia, la prospección de microorganismos con potencialidad benéfica en especies arbóreas carece de protocolos propios convencionalmente estandarizados y exige la puesta a punto de sistemas de exploración que puedan aprovechar al máximo la información obtenida desde un grupo reducido de individuos cultivados en períodos relativamente cortos. Esta sección presenta los resultados de la prospección de bacterias promotoras del desarrollo mediante la exploración en diferentes sistemas de cultivo, incluyendo la germinación de semillas y etapas tempranas de crecimiento de plantines de *Eucalyptus grandis* inoculados con diversas cepas, en condiciones de cultivo favorables o con la imposición de estrés nutricional. Además se plantea el uso análogo de *Arabidopsis thaliana*, planta modelo de rápido crecimiento y fácil cultivo en laboratorio, como una herramienta adicional que brinda información complementaria para la selección de cepas bacterianas de interés, en condiciones de desarrollo normal o bajo estrés hídrico. Junto con la selección de cepas benéficas, se introduce un sistema de inoculación basado en la imbibición de las bacterias en un polímero hidrofílico superabsorbente (SAPH) cuya matriz puede funcionar como vehículo para la aplicación de microorganismos en el entorno radical de los plantines de eucalipto. Observando los resultados de todos los ensayos en forma integral, se seleccionaron específicamente dos cepas del género *Pseudomonas* (M25 y N33) para estudios de mayor complejidad.

1.1 - Pruebas de germinación

Como primer paso en la selección de bacterias benéficas para *E. grandis*, se analizó el efecto sobre la germinación de semillas cuando éstas fueron inoculadas con cada cepa de forma individual, a partir de la colección de 63 bacterias de suelo y filosfera, descrita en la sección de materiales y métodos ([MM1](#)). Si bien el objetivo era encontrar bacterias que promuevan el crecimiento en eucaliptos de etapas posteriores a la germinación o provenientes de propagación por estaca enraizada, evaluar los efectos de la inoculación sobre la germinación o el desarrollo temprano de las plántulas resulta un abordaje práctico para comenzar, considerando que la exploración de cepas candidatas en cultivos forestales es dificultosa debido a los tiempos que conlleva el desarrollo de estas plantas comparado a un cultivo anual (Backer *et al.*, 2018). Los eucaliptos en particular, permiten aprovechar los estadios tempranos para pruebas experimentales sin mayores dificultades ya que la germinación y el crecimiento inicial de las plántulas pueden ser iniciados con la simple imbibición de las semillas.

En condiciones estándares sin agregado de bacteria, la imbibición con agua destilada produjo la germinación de entre 33 y 40 semillas provenientes de 50 mg de mezcla semillera, alcanzando este máximo en un lapso de diez días desde iniciado el ensayo (Figura [R1.1](#) a y b). Conociendo este parámetro, se evaluó la cantidad de plántulas emergidas a los 10 días, a partir de 50 mg de mezcla semillera embebida con la suspensión bacteriana de cada cepa ensayada de forma individual o con agua destilada en el caso del control. Se observó que la mayoría de las cepas (69,8%) no tuvo en efecto significativamente diferente en la frecuencia de germinación respecto al control sin inocular, mientras que el 19,1% tuvo un efecto inhibitorio y un 11,1% mostró capacidad promotora sobre este proceso (diferencias analizadas entre medias con un intervalo de confianza del 95%, figura [R1.1](#) c y d). La inoculación con la cepa N33 fue la que promovió la germinación en mayor medida, con un promedio de 46 plántulas por placa, alrededor de 12 plántulas más con respecto a las 34 plántulas promedio registradas para las placas sembradas con semillas sin inocular (Figura [R1.1](#) d).

Junto con la cuantificación de las plántulas emergidas, cada placa de germinación fue calificada visualmente según la calidad general de los eucaliptos obtenidos, de forma de contar con un registro que considerara, además del número, el aspecto morfológico de esas plántulas. Se señaló con un signo positivo a las cepas cuyas placas de germinación mostraron plántulas visualmente más robustas o vigorosas que las observadas en las placas control. Las cepas marcadas positivamente fueron las

siguientes: MT8, BT2, BT4, NT2, NT6, N1, N3, N7, N11, N13, N32 y N33. De esta forma dichas cepas fueron consideradas prometedoras para estudiar en pruebas exploratorias posteriores. Otras cepas fueron calificadas negativamente si con frecuencia sus placas de germinación mostraron plántulas germinadas, pero deficientes o con apariencia deforme en comparación con las controles. Este es el caso de las cepas MT3, CHAO, BT5 y N5. No se otorgó un signo de calificación a la cepa cuando las plántulas de sus placas de germinación no resultaban apreciablemente diferentes de las plántulas control sin inocular.

Se usó tanto la cuantificación de la germinación como los registros de calidad para descartar de futuros ensayos aquellas cepas consideradas perjudiciales en la germinación, manteniendo la posibilidad de evaluar el efecto de las cepas no inhibitorias (neutrales o promotoras) en experimentos de mayor escala con eucaliptos en condiciones de cultivo óptimas o sometidos a estrés hídrico o nutricional.

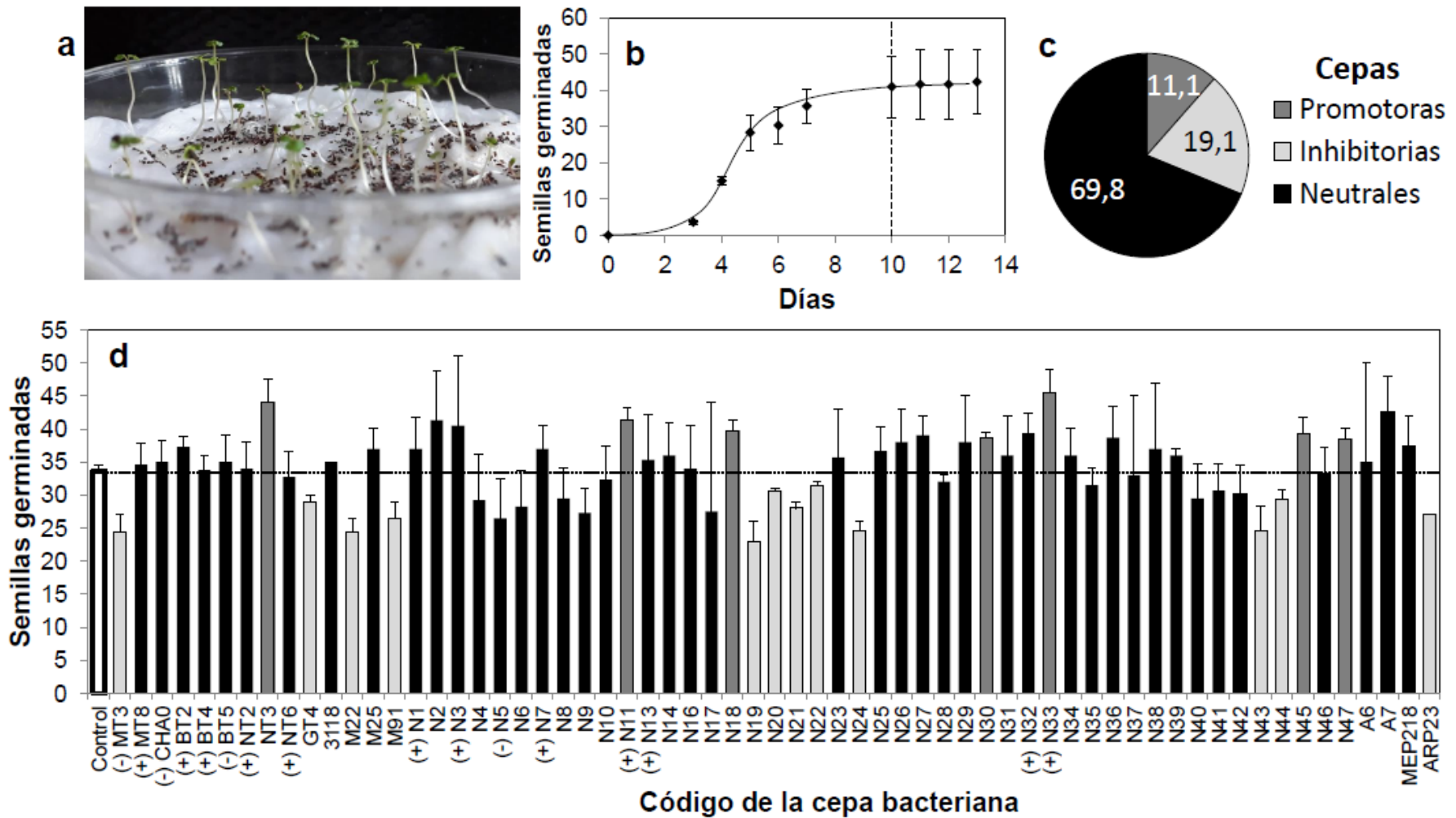


Figura R1.1: Selección de cepas bacterianas por su efecto sobre la germinación de semillas de *E. grandis*. En todos los casos se contó el número de plántulas emergentes desde 50 mg de mezcla semillera comercial. (a) Placa de germinación a los diez días desde la imbibición. (b) Tasa de germinación de semillas de *E. grandis* sin inocular. La línea punteada indica el tiempo cuando se alcanza la máxima germinación. Los puntos representan la media, $n = 3$, con su error estándar. (c) Proporción de cepas promotoras, inhibitorias y sin efecto (neutrales) sobre la germinación de semillas de *E. grandis*, del total de 63 cepas ensayadas. (d) Número de semillas germinadas a los 10 días desde la imbibición inicial con suspensiones axénicas de diferentes cepas bacterianas (10^8 UFC mL^{-1}) o con agua destilada en el caso del control (barra blanca). Se muestran las medias de cada tratamiento con su error estándar, $n = 3$. La línea punteada horizontal representa la media del tratamiento control. Las barras gris claro, gris oscuro y negras muestran cepas con efecto negativo, positivo o sin efecto en la germinación, respectivamente (IC = 95%). Los signos (+) y (-) delante del código de las cepas indica la valoración positiva o negativa en la prueba visual de vigor.

1.2 - Ensayos exploratorios

Para continuar la evaluación de propiedades benéficas de las bacterias sobre los eucaliptos, las plántulas inoculadas desde semilla fueron transferidas directamente desde sus placas de germinación a vasos plásticos conteniendo solo arena como sustrato. Estas plántulas mostraron una alta variabilidad en mediciones del desarrollo temprano, como la longitud o el peso del vástago, cuando fueron evaluadas en ensayos de corta duración. Esta fuerte variabilidad podría encontrar su explicación en el hecho de que los individuos fueron inoculados en la semilla, lo cual no garantiza la presencia de las bacterias en la nueva condición de cultivo. Sin embargo, estos ensayos exploratorios permitieron estandarizar un sistema de crecimiento preparatorio para permitir crecer a las plántulas de *E. grandis* durante dos meses en cámara de cultivo hasta poder ser usadas en ensayos a mayor escala, emulando la edad que tienen los plantines utilizados en las implantaciones reales a campo de las producciones forestales.

Aumentando la escala de trabajo, se diseñaron nuevos ensayos exploratorios usando plantas y macetas de mayor tamaño, donde las bacterias fueron inoculadas directamente en el entorno radical de plantines de *E. grandis*, utilizando la matriz polimérica de un gel hidrofílico superabsorbente desarrollado previamente por este laboratorio (SAPH, Tubert *et al.*, 2018) como vehículo para la inoculación (Figura [M2](#)). Gracias a la implementación del SAPH se logró garantizar el contacto estrecho entre las bacterias y las raíces de los eucaliptos, controlando de forma más eficiente la cantidad de inóculo inicial que cada individuo recibió a tiempo inicial. A diferencia de las pruebas de desarrollo temprano, en estos ensayos exploratorios se usaron plantines de *E. grandis* de dos meses de edad obtenidos desde semillas sin inocular, como material vegetal de partida. Al ser plantas de mayor tamaño y edad, los requerimientos de espacio y tiempo para la realización de estos ensayos exploratorios fueron superiores al de las pruebas a menor escala en vasos plásticos. Como consecuencia, cada ensayo contó con un número de réplicas limitado para poder mantener un equilibrio entre representatividad de la muestra y testeo de un número adecuado de cepas en distintas condiciones de cultivo. Estos ensayos exploratorios incluyeron la imposición de un tipo de estrés abiótico que pudiera evidenciar posibles beneficios de las cepas utilizadas en condiciones adversas para los plantines de eucalipto. En este segmento se presenta la identificación de patrones de crecimiento o fisiológicos de interés, que serán estudiados posteriormente en experimentos de mayor complejidad. Por tal motivo, los análisis estadísticos realizados en esta parte de la tesis no tienen un objetivo estrictamente

analítico sino destacar el nivel de confianza con que ciertos parámetros marcaron tendencias reconocibles, aún frente a la caída de la potencia estadística, debido al bajo número de réplicas y la heterogeneidad intrínseca del material vegetal y las condiciones de cultivo.

1.2.1 - Ensayos de deficiencia de fósforo en *Eucalyptus grandis*

La cepa M25, que ha sido caracterizada como una cepa del género *Pseudomonas* con capacidad solubilizadora de fósforo (Castagno *et al.*, 2011) resultó neutral en los ensayos de germinación (Figura [R1.1](#)). Para explorar su posible efecto benéfico en la adquisición de P en eucaliptos, se diseñó un experimento en invernadero donde se inocularon plantines de eucalipto con M25 utilizando SAPH como vehículo, en arena lavada y esterilizada (sustrato pobre en nutrientes), con fosfato dicálcico como ~~una~~ fuente de fósforo insoluble y suministrando el resto de los nutrientes a través del riego. Como control positivo del crecimiento, un grupo de plantas (SAPH-SNC) fue regado con una solución nutritiva completa (Javot *et al.*, 2003) sin agregado de fósforo insoluble en el sustrato.

En este ensayo se observó que con el paso del tiempo los plantines regados con la solución nutritiva completa tuvieron un mejor desarrollo y conservaron sus hojas a lo largo del experimento, mientras los plantines sometidos a deficiencia de fósforo manifestaron síntomas de estrés, como manchas foliares y defoliación. A pesar de esto, se registró una tendencia positiva a favor de las plantas inoculadas, las cuales presentaron una altura promedio intermedia entre el control sin inocular y las plantas no estresadas, distinguiéndose más notoriamente con el avance del tiempo (Figura [R1.2 a](#)). Al momento de la cosecha, se midió el diámetro del tallo en la base de cada individuo y se calculó el índice de crecimiento volumétrico. En este ensayo el índice de crecimiento de los plantines inoculados con M25 fue en promedio un 32% mayor al índice de crecimiento de los controles sin inocular (Figura [R1.2 b](#))

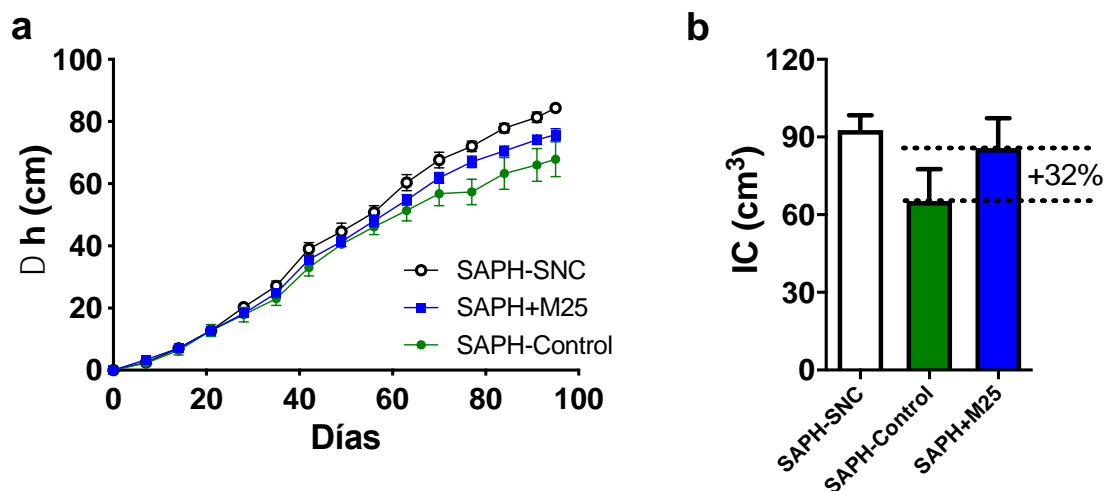


Figura R1.2: Efecto de la inoculación con M25 en plantines de *E. grandis* sometidos a estrés por deficiencia de fósforo en invernadero. (a) Incremento de altura del tallo en el tiempo. (b) Índice de crecimiento (IC). Los datos muestran el valor de la media para cada tratamiento junto con su error estándar, $n = 4$. Las líneas punteadas indican la diferencia en el índice de crecimiento entre los eucaliptos estresados sin inocular (SAPH-Control) y los inoculados con M25 (SAPH+M25).

Para monitorear el estado fisiológico de los plantines una vez que hubieron superado la ventana crítica de los primeros 90 días desde el inicio del experimento, se registró la fotosíntesis neta (P_n) y la transpiración (E) de los plantines, utilizando un analizador de gases en el infrarrojo. Ambos parámetros se estimaron ajustando la intensidad de luz del analizador a la del invernadero en tiempo real. Con esos dos parámetros se calculó la eficiencia instantánea en el uso del agua (EUA) como el cociente entre los dos valores para cada individuo. Se observó que los plantines inoculados con M25 tendieron a fotosintetizar más que los plantines estresados sin inocular, con una tasa transpiratoria ligeramente menor. Estas pequeñas diferencias resultaron en una eficiencia del uso del agua más elevada en los plantines inoculados (Figura [R1.3](#)). En los eucaliptos regados con la solución nutritiva completa (SAPH-SNC) se registró una tasa fotosintética menor que en los plantines cultivados con fósforo insoluble en el sustrato (SAPH-Control y SAPH+M25), pero a diferencia de esos dos grupos de plantas, estos eucaliptos no sufrieron una defoliación severa, conservando mucha mayor cantidad de área foliar productiva. Es pertinente mencionar que en este ensayo, los eucaliptos fueron cultivados durante los meses de octubre a enero en un invernadero con escasa regulación de la temperatura, lo que pudo haber causado estrés por alta temperatura, adicionalmente al estrés generado por la falta de fósforo soluble.

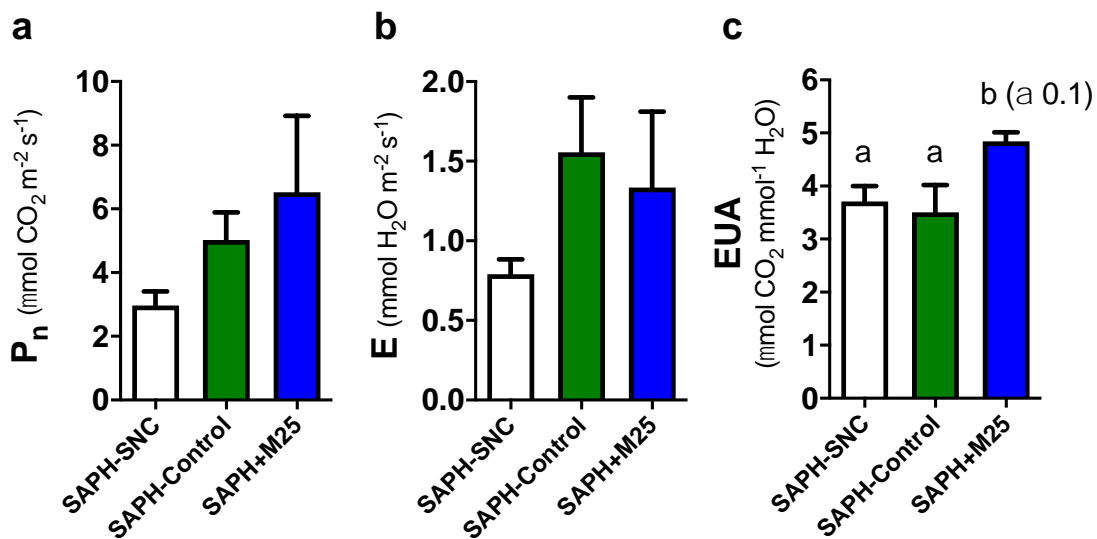


Figura R1.3: Evaluación de parámetros del intercambio gaseoso en plantines de *E. grandis* inoculados con M25 y sometidos a estrés por deficiencia de fósforo en invernadero. (a) Tasa fotosintética neta (P_n). (b) Tasa transpiratoria (E). (c) Eficiencia instantánea en el uso del agua (EUA). Todos los parámetros fueron medidos con LI6400, en la hoja más joven totalmente expandida del tallo principal de cada individuo, calibrando la luz del instrumento a la luz del invernadero en tiempo real. Todas las barras representan la media junto con su error estándar, $n = 4$. Las letras en el gráfico de EUA indican diferencias significativas en un ANOVA de un factor (P -valor $< 0,1$).

El mismo diseño experimental utilizado en el invernadero fue replicado en una cámara de cultivo de condiciones controladas, para minimizar el efecto de factores ambientales (especialmente grandes fluctuaciones de temperatura) incidentes sobre los plantines y poder evaluar de forma más definida los efectos de la inoculación con bacterias. En esta oportunidad, además de inocular con la cepa M25, otro grupo de plantines fue inoculado de la misma forma con la cepa N32, una de las cepas neutrales para el número de semillas germinadas pero calificada positivamente en la visualización de plantas vigorosas en las placas de germinación.

Nuevamente, los eucaliptos regados con solución nutritiva completa presentaron un mejor desarrollo, con baja incidencia de síntomas foliares. Consistentemente con lo observado en el invernadero, los plantines inoculados mostraron una curva de crecimiento (medida como aumento de altura en el tiempo) intermedia entre los plantines no inoculados (SAPH-Control) y los no estresados (SAPH-SNC), con un comportamiento similar entre los inoculados con M25 y N32 (Figura [R1.4](#) a). El índice volumétrico de crecimiento del tallo principal, considerando el incremento de altura y el diámetro de la base a tiempo final, mostró una ventaja de los eucaliptos inoculados con

cualquiera de las dos cepas en un porcentaje considerablemente mayor (31%) frente a los controles sin inocular, permaneciendo un poco por debajo de los plantines no estresados (Figura [R1.4 b](#)).

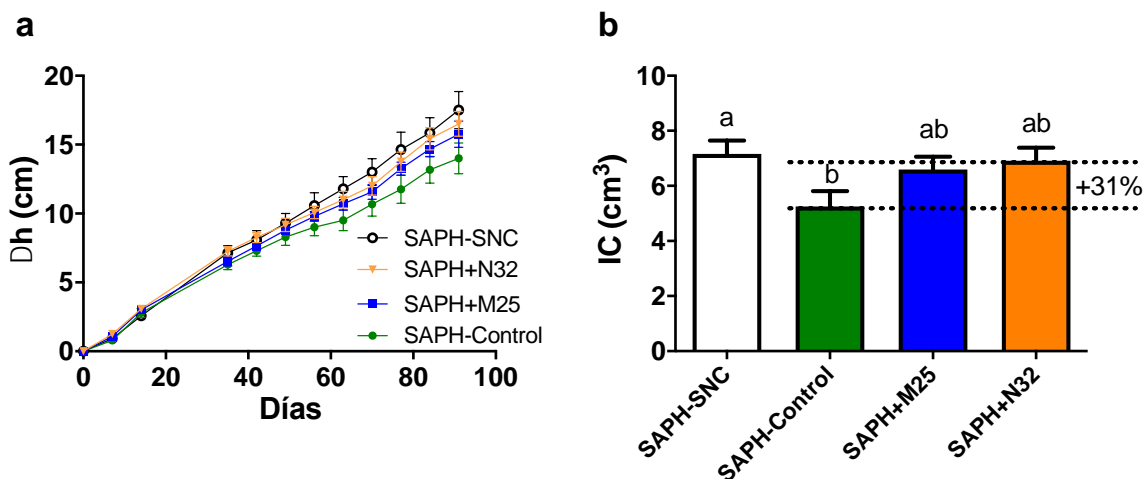


Figura R1.4: Efecto de la inoculación con M25 o N32 en plantines de *E. grandis* sometidos a estrés por deficiencia de fósforo en cámara de cultivo. (a) Incremento de altura en el tiempo. (b) Índice de crecimiento (IC). Las líneas punteadas indican la diferencia en el índice de crecimiento entre los eucaliptos estresados sin inocular (SAPH-Control) y los inoculados con M25 (SAPH+M25) o con N32 (SAPH+N32). Los datos muestran el valor de la media para cada tratamiento junto con su error estándar, n = 7. Letras diferentes en el gráfico de IC indican diferencias significativas en un ANOVA de un factor (P-valor < 0,05).

En cuanto a las mediciones de intercambio gaseoso, se realizó inicialmente una curva de tasa fotosintética en función de la intensidad de luz con plantas en buen estado del grupo de eucaliptos sin estrés nutricional, y así conocer el nivel fotosintético esperable a la intensidad de luz de cultivo en la cámara y determinar un valor saturante de iluminación, para usarlo como referencia en futuras mediciones de P_n y E máxima. A la altura del canopy de los eucaliptos en cámara de cultivo se registró una luz incidente de aproximadamente $250 \mu\text{mol}$ de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A esa intensidad de luz, la tasa fotosintética se estabilizó alrededor del 50% de la capacidad máxima alcanzada a luz saturante, alcanzada a $1200 \mu\text{mol}$ de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para esta condición de cultivo en particular (Figura [R1.5](#)).

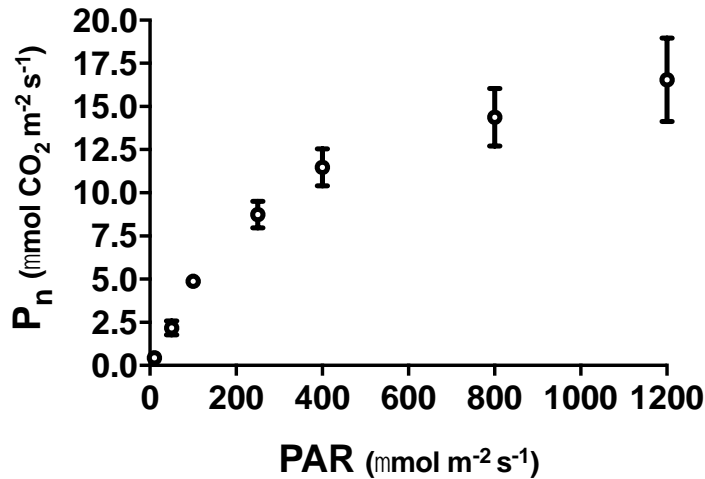


Figura R1.5: Determinación de la tasa fotosintética (P_n) en función de la intensidad de luz fotosintéticamente activa (PAR). Las mediciones se realizaron con el equipo LI6400 en la hoja más joven totalmente expandida del tallo principal de plantines de *E. grandis* cultivados en cámara bajo condiciones controladas. Cada punto representa la media, junto con su desvío estándar, de una muestra de tres plantines no estresados, medidos en cada intensidad lumínica. Durante las mediciones, la temperatura y la concentración de CO_2 en la cámara del LI6400 se mantuvieron idénticas a las de cultivo.

En la cámara de cultivo, las condiciones de temperatura y humedad ambiente se mantuvieron constantes ($22 \pm 2^\circ\text{C}$, 65-70% HR) a lo largo de la duración del ensayo lo que favoreció la observación del efecto de la deficiencia de fósforo, aislada de otros posibles estreses. Los eucaliptos crecidos en la cámara de cultivo conservaron la mayor parte de su follaje, que comenzó a manifestar, en los tratamientos donde el fósforo solo estaba presente de forma insoluble en el sustrato, manchas de una coloración rojiza-violácea en las hojas maduras. Este síntoma está descrito como el primero en aparecer frente a una situación de deficiencia de fósforo (Dell *et al.*, 2001). Por otro lado, la menor intensidad lumínica y la reducción del volumen de la maceta (de 1 L en invernadero a 0,5 L en la cámara de cultivo) se tradujeron en una producción de biomasa menor, dando como resultado plantas con menor altura, diámetro e índice de crecimiento para un mismo tiempo desde el inicio de cada ensayo (comparar figuras [R1.2](#) y [R1.4](#)).

A pesar de las diferencias entre ambas condiciones de crecimiento, este ensayo exploratorio de deficiencia de fósforo en cámara de cultivo mostró consistentemente un fuerte efecto benéfico de la inoculación con la cepa M25 sobre el manejo del agua a nivel del intercambio gaseoso y la regulación de la transpiración. La capacidad fotosintética máxima (a intensidad de luz saturante) no varió apreciablemente entre los distintos tratamientos, mientras que la transpiración fue considerablemente menor en los plantines inoculados con M25, con un promedio alrededor de 42% más bajo que el

registrado para los controles sin inocular. Como consecuencia, la eficiencia instantánea en el uso del agua resultó significativamente más elevada en las plantas inoculadas con M25 que en los eucaliptos del resto de los tratamientos (Figura R1.6).

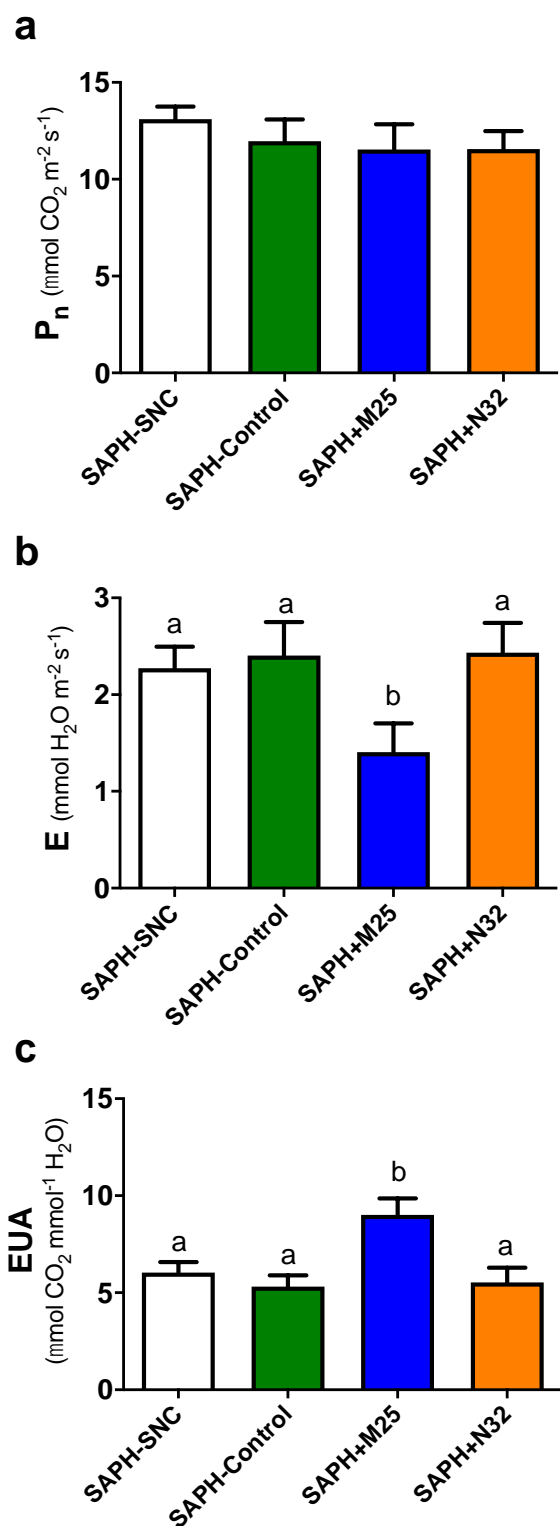


Figura R1.6: Evaluación de parámetros del intercambio gaseoso en plántulas de *E. grandis* inoculadas con M25 o N32 y sometidas a estrés por deficiencia de fósforo en cámara de cultivo. (a) Tasa fotosintética a luz saturante neta (P_n). (b) Tasa transpiratoria (E). (c) Eficiencia instantánea en el uso del agua (EUA). Todos los parámetros fueron medidos con LI6400, en la hoja más joven totalmente expandida del tallo principal de cada individuo, a intensidad de luz saturante, 1200 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Todas las barras representan la media junto con su error estándar, $n = 7$. Las letras en los gráficos de E y EUA indican diferencias significativas en un ANOVA de un factor (P -valor < 0,05).

1.2.2 - Ensayos de deficiencia nutricional generalizada en *Eucalyptus grandis*

Las cepas N32 (utilizada en el ensayo con fósforo insoluble en cámara de cultivo), BT2 y N33 fueron seleccionadas para estos ensayos exploratorios por la calificación positiva obtenida en la prueba visual de vigor de plántulas en placas de germinación, pero no se disponía de información adicional que demostrase alguna relación entre estas cepas y la solubilización de fósforo específicamente. Por eso, se diseñó otro ensayo que permitiera evaluar el vigor de los eucaliptos bajo una deficiencia generalizada de nutrientes. Para lograrlo, los plantines se cultivaron en la cámara de cultivo usando el mismo sustrato pobre hecho de arena lavada y vermiculita inerte en partes iguales y se suministraron diferentes dosis de nutrientes balanceados a través del riego.

En un primer experimento se evaluó el efecto promotor de N32 en el desarrollo de plantines de *E. grandis* regados con diluciones (1x, 1/5x, 1/50x) de una solución nutritiva completa (Javot *et al.*, 2003) o con agua destilada (0x). El aspecto general de los eucaliptos fue notoriamente afectado por las dosis de nutrientes. Cuanto mayor fue la dilución, más fuerte y tempranamente se manifestó la coloración rojiza del follaje, acompañada de defoliación, manchas necróticas y fragilidad de tejidos en las diluciones extremas. A la vez, los plantines que recibieron menos nutrientes, ralentizaron su crecimiento de forma significativa y desarrollaron menos área foliar en comparación con los que fueron regados con la solución nutritiva sin diluir. A pesar de estas diferencias en el desarrollo general de las plantas, no se registraron diferencias en el área foliar final entre eucaliptos inoculados y controles sin inocular para ninguna de las diluciones nutricionales (Figura [R1.7 a](#)). Por otro lado, se observó una tendencia general hacia mayor crecimiento en altura de los plantines inoculados frente a los controles sin inocular, independientemente de la cantidad de nutrientes aplicados (Figura [R1.7 b](#)). La ligera ventaja en altura fue acompañada con mayores valores de diámetro en la base del tallo de los eucaliptos inoculados, resultando en un índice de crecimiento a tiempo final más elevado que el de las plantas sin bacterias (Figura [R1.7 c](#)).

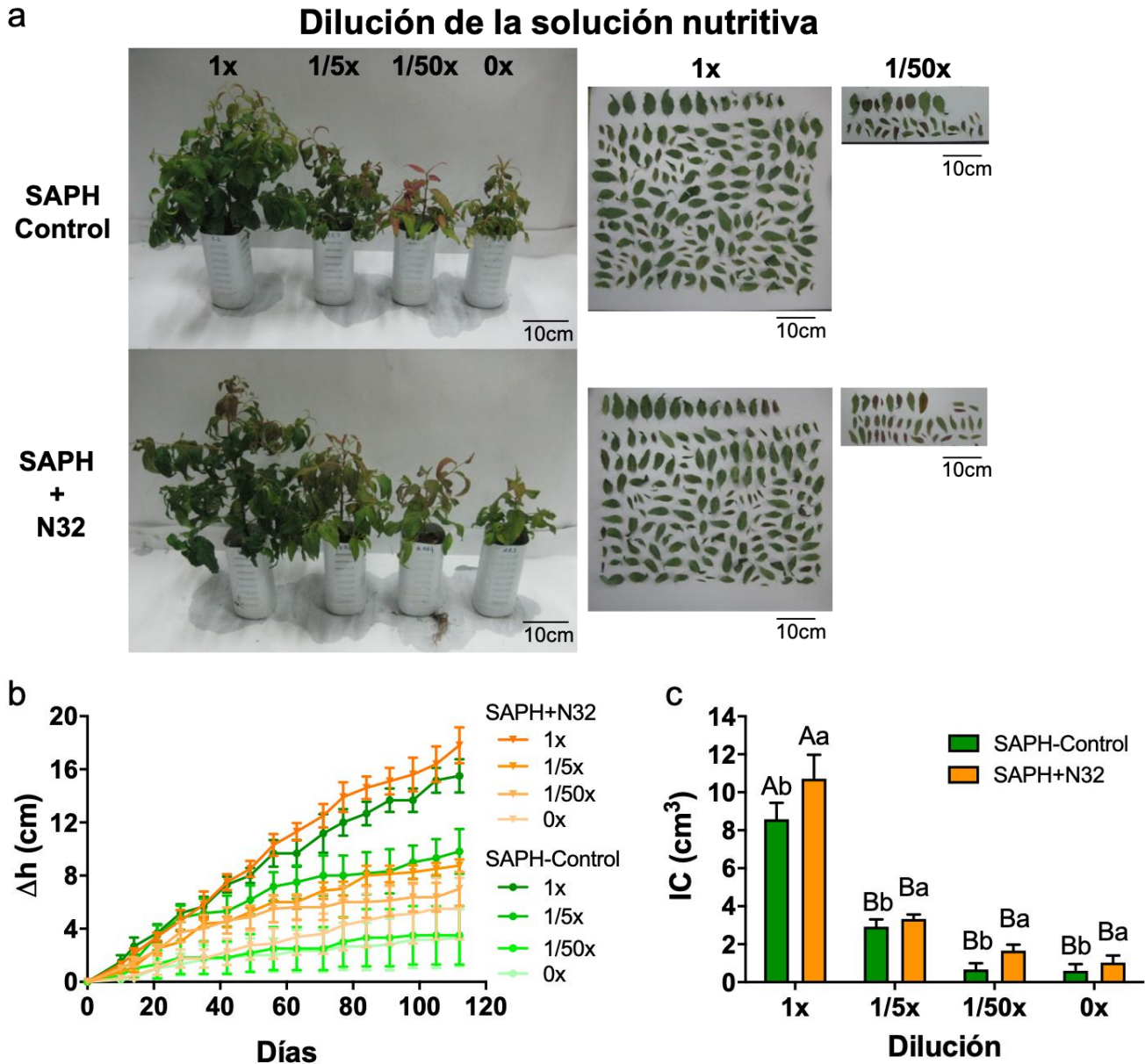


Figura R1.7: Efecto de la inoculación con N32 en plantines de *E. grandis* sometidos a estrés por deficiencia generalizada de nutrientes en cámara de cultivo. (a) Aspecto general y área foliar final de los plantines regados con distintas diluciones de la solución nutritiva. (b) Incremento de altura en el tiempo. (c) Índice de crecimiento (IC). Los datos muestran el valor de la media para cada tratamiento junto con su error estándar, n = 3-4. Las diferentes letras en el gráfico de IC indican diferencias significativas en un ANOVA de dos factores (P-valor < 0,05). Las letras mayúsculas refieren al factor "dilución" (1x, 1/5x, 1/50x o 0x), las letras minúsculas refieren al factor "inoculación" (SAPH-Control o SAPH+N32).

Los parámetros de intercambio gaseoso medidos en los plantines inoculados con N32 resultaron equivalentes a los registrados en los controles sin inocular, cuando fueron regados con la solución nutritiva sin diluir (Figura R1.8). Este comportamiento es similar a lo observado en el ensayo de deficiencia de fósforo para los eucaliptos

inoculados con esta misma cepa (Figura R1.6). En las menores concentraciones de nutrientes se observó un patrón diferente. Los eucaliptos cultivados con bacterias presentaron valores ligeramente más altos de P_n que los no inoculados, con una tasa transpiratoria E más elevada también. Como consecuencia, la EUA no mostró diferencias notorias entre tratamientos, aunque se debe considerar que en este ensayo, la tasa transpiratoria presentó una heterogeneidad más alta que la tasa fotosintética, lo cual dificulta la determinación de patrones precisos en la eficiencia instantánea del uso del agua (Figura R1.8).

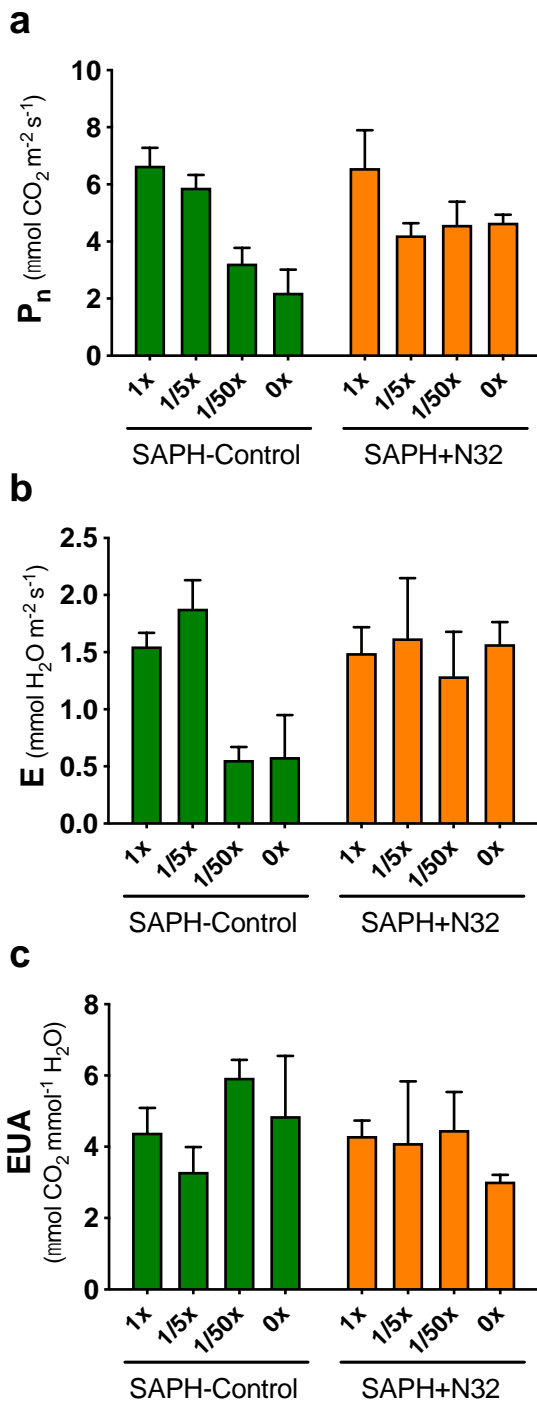


Figura R1.8: Evaluación de parámetros del intercambio gaseoso en plantines de *E. grandis* inoculados con N32 y sometidos a estrés por deficiencia generalizada de nutrientes en cámara de cultivo. (a) Tasa fotosintética neta a luz saturante (P_n). (b) Tasa transpiratoria (E). (c) Eficiencia instantánea en el uso del agua (EUA). Todos los parámetros fueron medidos con LI6400, en la hoja más joven totalmente expandida del tallo principal de cada individuo, a intensidad de luz saturante, 1200 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Todas las barras representan la media junto con su error estándar, $n = 3-4$. No se encontraron diferencias significativas en un ANOVA de dos factores (P -valor $> 0,05$).

Reproduciendo el mismo diseño experimental de deficiencia nutricional generalizada, se evaluó en un segundo ensayo la capacidad promotora de las cepas BT2 y N33 frente a este tipo de estrés abiótico. Como ocurrió en el ensayo anterior, los eucaliptos regados con bajas concentraciones de nutrientes manifestaron síntomas más agudos que aquellos a los que se les suministró mayor cantidad de nutrientes en el riego. El follaje adquirió coloraciones rojizas y amarillas en los plantines estresados, con posterior aparición de necrosis y defoliación. El crecimiento en altura y la aparición de ramas y hojas nuevas se ralentizó ante la falta de nutrientes, sin embargo, el aspecto general de los eucaliptos inoculados con bacterias, especialmente los inoculados con N33, fue visualmente menos crítico que el de las plantas sin inocular (Figura [R1.9](#) a). Se observó una notoria diferencia en el área foliar con ambas inoculaciones cuando los eucaliptos fueron regados con la solución nutritiva completa. El aumento en el área foliar se registró en 45 y 54% para N33 y BT2, respectivamente, respecto del grupo control sin inocular. A menores concentraciones de nutrientes el efecto positivo se redujo en el grupo inoculado con BT2 y se magnificó para el grupo inoculado con la cepa N33, que mostró un menor nivel de defoliación ([Tabla R1.1](#) y figura [R1.9](#) a).

Dilución	Área foliar total a tiempo final (cm ²)					
	SAPH Control		SAPH + BT2		SAPH + N33	
1x	888,9 ± 68,3	b	1374,4 ± 48,5	a	1288,1 ± 135,1	a
1/50x	110,7 ± 12,9	d	122,7 ± 15,6	d	212,6 ± 9,6	c

Tabla R1.1: Área foliar total de plantines de *E. grandis* sometidos a estrés por deficiencia generalizada de nutrientes en cámara de cultivo. Los resultados mostrados corresponden a la media ± el error estándar, n = 3-4. Las distintas letras indican diferencias en un ANOVA de dos factores donde la interacción entre los factores "inoculación" (SAPH-Control, SAPH+BT2 o SAPH+N33) y "dilución" (1x o 1/50x) resultó significativa (P-valor < 0,05).

El efecto promotor de las bacterias se manifestó también en los parámetros de crecimiento, donde, hacia el final del experimento, los eucaliptos inoculados con N33 alcanzaron los mayores valores de altura e índice de crecimiento. Comparando los plantines no estresados nutricionalmente, los inoculados con N33 presentaron un aumento promedio del 65% en el índice de crecimiento frente a los plantines sin inocular. En las diluciones siguientes, el efecto de la inoculación con N33 no fue de la misma magnitud pero se mantuvo una tendencia positiva, con incrementos en IC del 22, 21 y 26% en las diluciones 1/5x, 1/50x y 0x, respectivamente. La inoculación con la cepa BT2 mostró también una tendencia positiva en el crecimiento, aunque con un comportamiento menos definido y magnitudes variables. El efecto más notorio se

observó en el grupo de plantines regados con la solución nutritiva completa, que presentaron un índice de crecimiento un 40% por encima de los controles sin inocular, lo que equivale a un 15% por debajo de los inoculados con N33 (Figura R1.9 c).

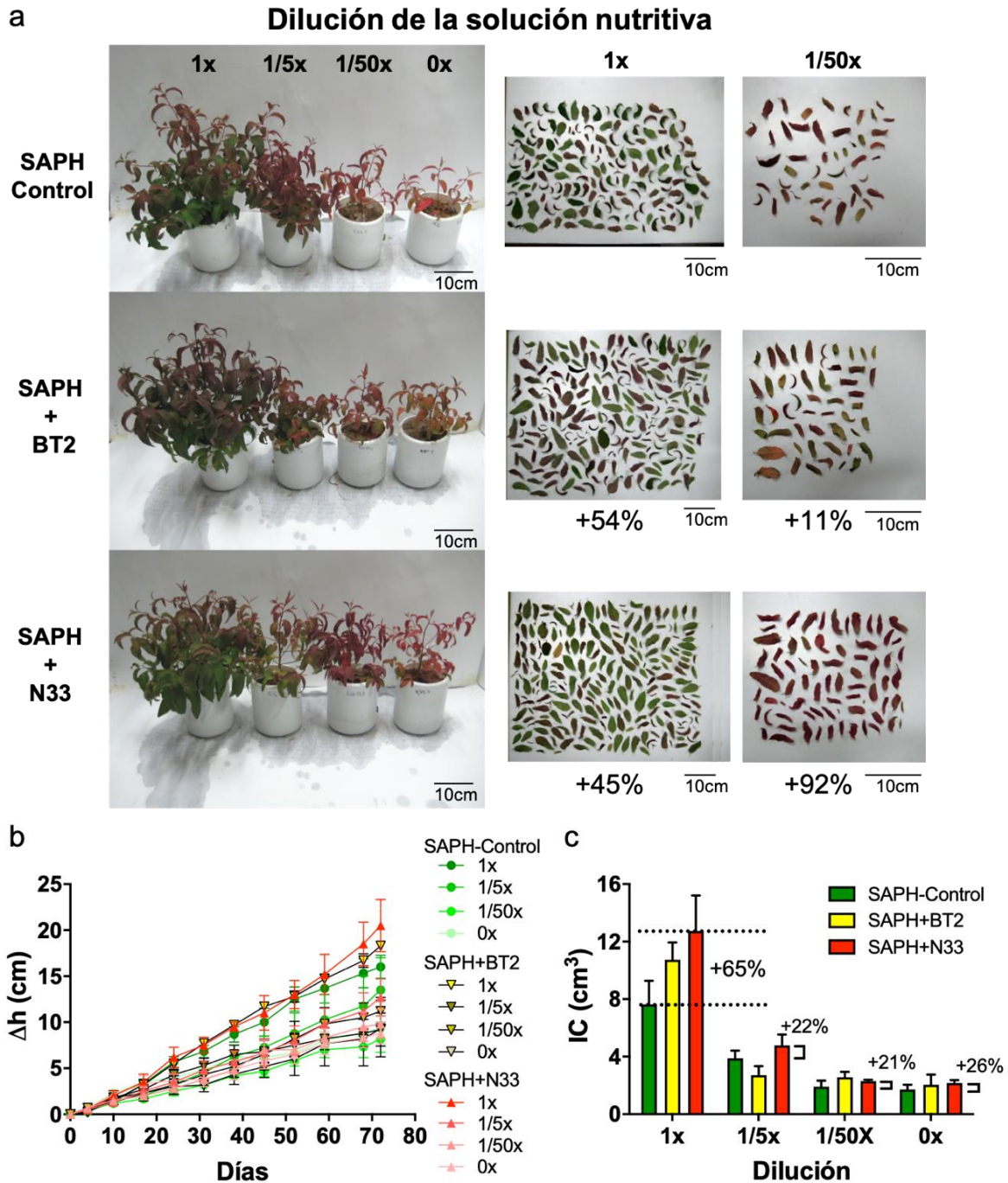


Figura R1.9: Efecto de la inoculación con BT2 o N33 en plantines de *E. grandis* sometidos a estrés por deficiencia generalizada de nutrientes en cámara de cultivo. (a) Aspecto general y área foliar final de los plantines regados con distintas diluciones de la solución nutritiva. Los porcentajes indicados debajo de las imágenes de área foliar corresponden al incremento de esa variable en los tratamientos con bacterias respecto al grupo control sin inocular. (b) Incremento de altura en el tiempo. (c) Índice de crecimiento (IC). Los porcentajes en el gráfico de IC indican la diferencia en el índice de crecimiento entre los eucaliptos sin inocular (SAPH-Control) y los inoculados con N33 (SAPH+N33). Los datos muestran el valor de la media para cada tratamiento junto con su error estándar, n = 3-4.

Los parámetros de intercambio gaseoso reflejaron en gran medida lo observado en las variables de crecimiento para los grupos de eucaliptos regados con la solución nutritiva completa. En condiciones sin estrés, los plantines inoculados con N33 presentaron una tasa fotosintética 66% más elevada que los controles sin inocular y una tasa transpiratoria también aumentada en un 55%. Como consecuencia, la EUA no se diferenció entre ambos grupos para esa condición nutricional. Los eucaliptos no estresados e inoculados con BT2 presentaron una P_n promedio 41% por encima de los no inoculados, aunque la heterogeneidad entre los individuos fue mucho mayor, tanto para las mediciones de P_n como de E (Figura [R1.10](#)). Estas diferencias de P_n mencionadas son comparables a los incrementos registrados en el índice de crecimiento entre los plantines sin inocular y los tratados con una u otra cepa en esa misma condición nutricional. Esto refleja la relación entre la fotosíntesis y la producción de biomasa y resulta consistente con la hipótesis de un efecto promotor del desarrollo involucrando mecanismos de modulación del metabolismo fotosintético mediado por la inoculación con bacterias benéficas.

En las menores concentraciones de nutrientes, tanto P_n como E se mantuvieron estables en los plantines inoculados con N33, mientras en las plantas sin inocular se observó un comportamiento escalonado, donde a menores concentraciones de nutrientes, menores fueron los valores de P_n y E registrados. En ambos casos, la eficiencia en el uso del agua resultó pareja entre todas las diluciones aplicadas y fue comparable entre ambos tratamientos. Los valores de E para el tratamiento con BT2 en las menores concentraciones de nutrientes fueron muy similares a los registrados para N33, pero en este ensayo exploratorio, la tasa fotosintética no siguió un comportamiento definido, lo que derivó consecuentemente en una mayor heterogeneidad en el cálculo de la eficiencia en el uso del agua para los plantines inoculados con BT2 en las distintas diluciones de nutrientes (Figura [R1.10](#)).

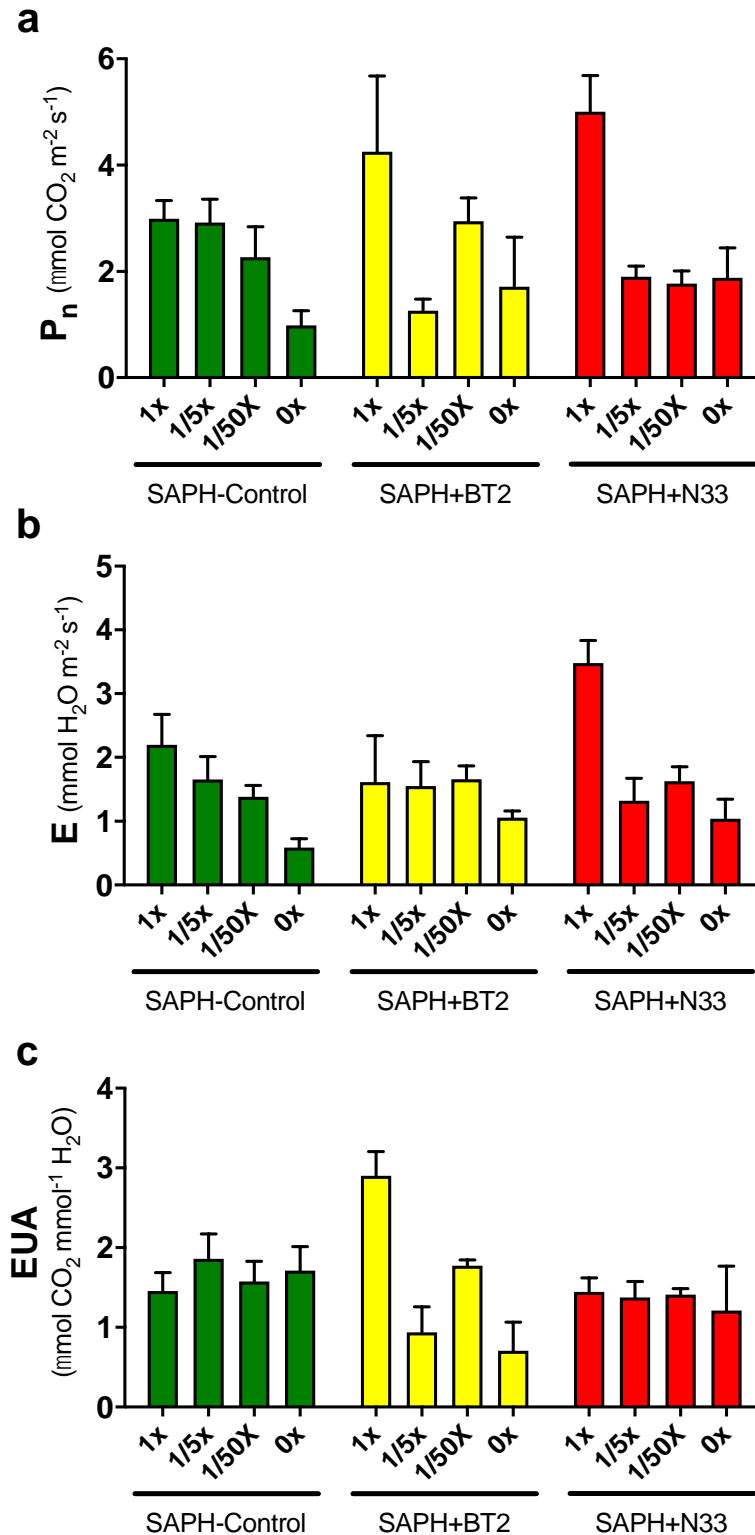


Figura R1.10: Evaluación de parámetros del intercambio gaseoso en plantines de *E. grandis* inoculados con BT2 o N33 y sometidos a estrés por deficiencia generalizada de nutrientes en cámara de cultivo. (a) Tasa fotosintética neta (P_n). (b) Tasa transpiratoria (E). (c) Eficiencia instantánea en el uso del agua (EUA). Todos los parámetros fueron medidos con LI6400, en la hoja más joven totalmente expandida del tallo principal de cada individuo, a intensidad de luz saturante, $1200 \mu\text{mol}$ de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Todas las barras representan la media junto con su error estándar, $n = 3-4$.

1.2.3 - Ensayo exploratorio de tolerancia a la sequía en *Arabidopsis thaliana*

Simultáneamente a las pruebas realizadas en *E. grandis*, se ensayaron las cepas N33 y M25 en experimentos de promoción del crecimiento en *Arabidopsis thaliana*. El objetivo inicial fue encontrar condiciones que permitieran utilizar esta planta modelo como especie apta para la prospección de cepas bacterianas en ensayos de menor duración y requerimientos de espacio, comparados a los realizados con plantines de eucalipto. Para ello se evaluó en primer término el efecto promotor de ambas cepas en un ensayo rápido de estrés por déficit hídrico producido por suspensión total del riego, un tipo de estrés abiótico de frecuente implementación en la experimentación con *Arabidopsis*, como ya se ha reportado en la literatura (Yao *et al.*, 2018). En este ensayo, las bacterias fueron inoculadas por riego dos semanas luego del trasplante de las plántulas de *Arabidopsis* desde las placas de germinación a vasos de 80 mL conteniendo una mezcla de sustrato comercial con perlita. Luego de tres semanas de crecimiento desde el trasplante, se suspendió el riego y se permitió la desecación libre y gradual del sustrato por otras tres semanas. En el aspecto exterior, se observó una tendencia favorable de las plantas inoculadas a la tolerancia a la sequía, permaneciendo más verdes y turgentes a medida que la falta de agua se volvía más severa. Asociado a lo observado, el número de plantas que alcanzaron el punto de marchitez permanente al cabo de tres semanas sin riego fue superior en el grupo de *Arabidopsis* sin inocular, resultando en un 78, 64 y 45% para los tratamientos control, M25 y N33, respectivamente (Figura R1.11 a). Luego de esas tres semanas de estrés, cada planta fue cortada a la altura del hipocótilo y se registró el peso seco de las rosetas. Independientemente de la cepa, los individuos inoculados mostraron un peso seco de roseta un 10% superior al de las plantas sin inocular (Figura R1.11 b).

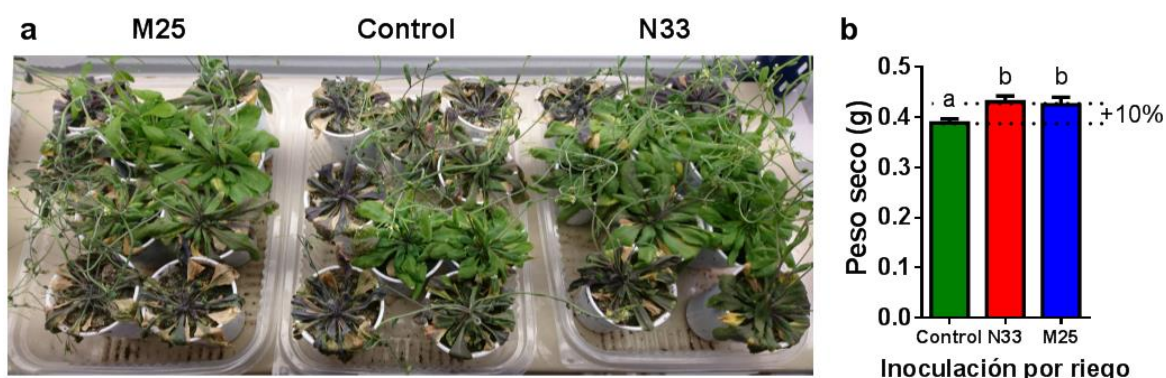


Figura R1.11: Efecto benéfico de M25 y N33 en *Arabidopsis thaliana* sometidas a estrés hídrico por suspensión del riego. Las cepas seleccionadas fueron inoculadas a través del riego. (a) Aspecto general de las *Arabidopsis* al final del período de sequía. (b) Peso seco de las rosetas. El gráfico muestra la media de cada tratamiento junto con su error estándar, n = 9. Las letras indican diferencias significativas en un ANOVA de un factor (P-valor < 0,05).

1.2.4 - Comparación de métodos de inoculación utilizando *Arabidopsis thaliana*

Dada la ventaja operativa de trabajar con *Arabidopsis* y los resultados positivos de las inoculaciones con M25 y N33, se utilizó esta planta para investigar si el método de inoculación tradicional por riego resultaba equivalente al método de inoculación en gel propuesto en esta tesis. Con ese fin se evaluó el efecto de inocular las cepas a través de su agregado directo por medio de un riego inicial o utilizando el mismo polímero superabsorbente (SAPH) usado en los ensayos con *E. grandis* como medio para su aplicación. El efecto promotor de ambas cepas volvió a manifestarse, mostrando un incremento en biomasa seca de las plantas inoculadas, el cual fue acompañado por un aumento significativo del área foliar final. En cuanto a la comparación entre los métodos de inoculación, no se encontraron diferencias significativas entre la aplicación de bacterias por riego o a través del SAPH (Figura [R1.12](#)).

En este punto se debe considerar que la ventaja potencial del polímero utilizado no se manifiesta apropiadamente en condiciones donde el agua no es limitante. Los geles superabsorbentes se utilizan como estrategia para aliviar el estrés por falta de agua pero este ensayo se realizó con riego frecuente, sin la imposición de ningún tipo de estrés hídrico. Para evaluar si efectivamente ambos métodos de inoculación son diferentes, se debería someter a las plantas a una condición hídrica desfavorable que revele el efecto protector del SAPH para posteriormente evaluar si el efecto promotor de las bacterias perdura. A pesar de estas consideraciones y como se ha mostrado en los anteriores ensayos, se puede afirmar que la inoculación a través del SAPH reproduce los efectos benéficos de las cepas estudiadas y constituye un método con mayor potencialidad de favorecer el desarrollo de distintas plantas al combinar la protección hídrica de un gel superabsorbente con el efecto promotor de bacterias benéficas.

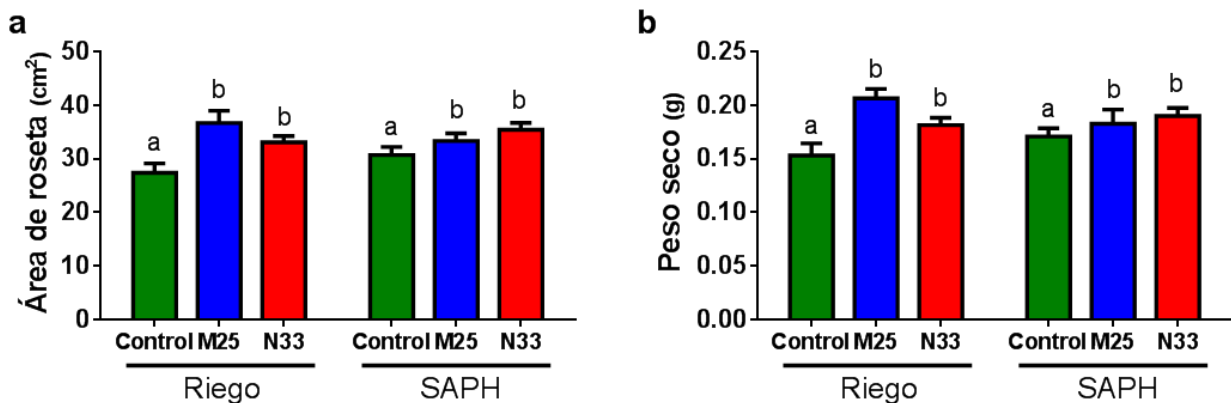


Figura R1.12: Comparación entre el método de inoculación convencional por riego o a través del SAPH en *Arabidopsis thaliana*. (a) Área foliar final calculada a partir del análisis de imágenes de las rosetas de cada individuo. (b) Peso seco de esas mismas rosetas. Los gráficos muestran la media de cada tratamiento junto con su error estándar, n = 8-9. Las letras en cada gráfico indican diferencias significativas en un ANOVA de dos factores (P-valor < 0,05). El factor “método de inoculación” y la interacción entre factores resultaron no significativos, por lo tanto las letras solo señalan diferencias en el factor principal “inóculo” (Control, M25 o N33).

1.3 - Selección de M25 y N33

Considerando toda la información reunida y presentada hasta el momento, se decidió profundizar en la capacidad promotora de dos cepas en particular: M25 y N33, ambas identificadas como pertenecientes al género *Pseudomonas* ([Anexo 2](#)).

A partir de los resultados en *E. grandis*, N33 fue seleccionada por ser una cepa claramente promotora de crecimiento. Fue la cepa que mostró mayor estimulación de la germinación, con una calificación positiva relacionada al vigor de las plántulas en sus placas de germinación (Figura [R1.1](#)). También se destacó en los ensayos de deficiencia generalizada de nutrientes por promover el aumento de la tasa fotosintética neta máxima, manteniendo la eficiencia del uso del agua en valores comparables a los eucaliptos sin inocular (Figura [R1.10](#)) y produjo un incremento considerable en el área foliar y el índice de crecimiento en condiciones de cámara de cultivo ([Tabla R1.1](#) y figura [R1.9](#)).

Sobre la cepa M25 ya se contaba con información previa que la caracterizaba como solubilizadora de fosfato y promotora del crecimiento en *Lotus tenuis* (Castagno *et al.*, 2011). Para el caso de *E. grandis*, M25 mostró efectos positivos en la regulación del uso eficiente del agua en los ensayos de deficiencia de fósforo, tanto en invernadero

como en cámara de cultivo (Figuras [R1.3](#) y [R1.6](#)), acompañados de un incremento en el índice de crecimiento consistente entre ambas condiciones experimentales (Figuras [R1.2](#) y [R1.4](#)).

Ambas cepas promovieron significativamente el aumento de biomasa en plántulas de *A. thaliana* en condiciones de cultivo sin estrés o sometidas a falta de agua por suspensión del riego (Figuras [R1.11](#) y [R1.12](#)).

Por estos motivos, N33 y M25 fueron seleccionadas para estudiar en experimentos más exhaustivos, relacionados a su supervivencia en distintos sustratos de plantación o en la matriz del gel utilizado como vehículo. Por otro lado, debido a que ambas cepas demostraron haber influido positivamente sobre el intercambio gaseoso y el manejo del agua en plantines de *E. grandis* y promovido el crecimiento de *A. thaliana* sometidas a estrés hídrico, se procedió a caracterizar su efecto protector en ensayos de sequía por suspensión del riego bajo diferentes condiciones de cultivo.

Supervivencia y localización de las cepas bacterianas seleccionadas

Para que una formulación de bioinoculante sea efectiva, se debe garantizar que los microorganismos seleccionados sean compatibles con el material por el cual se pretende aplicarlos en la plantación de destino. Conocer el grado de supervivencia del inóculo deseado en la formulación a aplicar resulta de gran relevancia a nivel productivo ya que permite predecir comportamientos esperables, sobre todo en ambientes donde existen muchas otras variables sin controlar. En ese aspecto, la interacción de la formulación con el medio y con la especie blanco de aplicación se vuelve un punto central en la evaluación de calidad de cada formulación en particular. En esta sección se muestran los estudios de supervivencia de las cepas seleccionadas, M25 y N33, en la matriz polimérica del SAPH aislado o aplicado en sustratos que representan suelos con distintas propiedades de porosidad, densidad y contenido de minerales. A la vez se establece una comparación entre el método convencional de aplicación de microorganismos por riego y su inclusión en la matriz del SAPH. Posteriormente se evalúa la supervivencia de las cepas seleccionadas aplicadas por riego en la rizosfera de plantines de *E. grandis* cultivados en suelo sin esterilizar y sometidos a estrés hídrico. En este ensayo se realizó un estudio de localización del inóculo al finalizar el experimento. La sección concluye con un ensayo en medio agarizado para evaluar el efecto directo de M25 y N33 sobre la arquitectura y morfología radicular y el peso del vástago de plántulas de *E. grandis* y *A. thaliana*.

2.1 - Supervivencia de M25 y N33 en la matriz del SAPH aislado

Una formulación con bacterias promotoras del desarrollo destinada a cultivos comerciales debe ser de fácil aplicación por el productor, considerando, de ser posible, utilizar los mismos métodos y materiales usados habitualmente, de tal forma de minimizar la necesidad de inversión en nuevas tecnologías y en capacitación para su correcto manejo. En ese sentido, sabiendo que el uso de geles hidrofílicos superabsorbentes al momento del trasplante a campo es una práctica habitual en la producción de eucaliptos, se propone utilizar estos polímeros como matriz para la inoculación de bacterias benéficas en el paso de implantación.

Para probar la posibilidad de usar el SAPH como vehículo para la inoculación de las cepas M25 y N33, se evaluó la supervivencia de las bacterias a lo largo del tiempo, embebidas en el SAPH. Para hidratar el polímero se utilizaron suspensiones de cada cepa conteniendo 10^8 unidades formadoras de colonia (UFC) por mililitro en agua destilada o agua destilada estéril para el caso del control y los recipientes se mantuvieron en oscuridad bajo condiciones controladas ($22\pm 2^\circ\text{C}$, 65-70% HR), durante 12 semanas.

Ambas cepas mostraron una caída en la concentración de UFC de un orden de magnitud dentro de los primeros 20 días desde la hidratación del polímero. Transcurrido ese tiempo se observó una estabilización del valor alrededor de 10^7 UFC ml^{-1} , que se mantuvo constante hasta la última medición a las doce semanas desde iniciado el ensayo (Figura [R2.1](#)). El gel control no mostró crecimiento bacteriano a partir de las muestras extraídas. Esto permite afirmar que en principio, las bacterias seleccionadas pueden sobrevivir en el gel aislado manteniéndose en alta concentración durante un tiempo equivalente a lo que dura la etapa crítica de implantación a campo, lo que hace al SAPH acrílico-celulósico desarrollado por este laboratorio un carrier apropiado para las pruebas de aplicación de las bacterias en la cercanía del sistema radical de plantines de *E. grandis*.

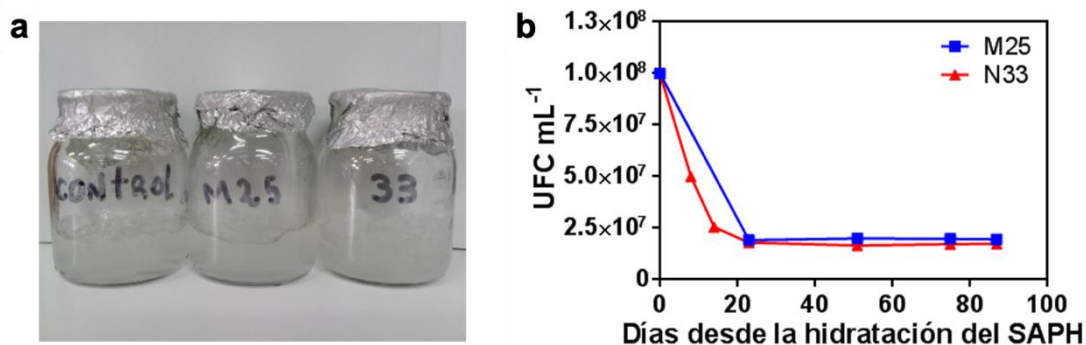


Figura R2.1: Supervivencia de las cepas M25 y N33 embebidas en la matriz de un polímero superabsorbente acrílico-celulósico (SAPH). (a) Recipientes desde donde se extrajeron las muestras de gel inoculado y sin inocular. (b) Cuantificación del número de unidades formadoras de colonia (UFC) recuperadas por mililitro de SAPH hidratado con suspensión bacteriana en función del tiempo desde la inoculación.

2.2 - Supervivencia de M25 y N33 en diversos sustratos con o sin SAPH

Habiendo comprobado la supervivencia de N33 y M25 en la matriz del SAPH aislado, se evaluó su supervivencia en diferentes sustratos, luego de inocularlas mediante imbibición en el SAPH o mediante la técnica convencional de inoculación por riego. Para hidratar el polímero o para inocular por riego, se prepararon suspensiones bacterianas de igual concentración inicial que las utilizadas en el ensayo de supervivencia en SAPH aislado y se aplicaron cantidades equivalentes por ambos métodos en un mismo volumen de arena, arena:vermiculita (1:1 V/V) o tierra fértil comercial. La concentración inicial de UFC por mililitro de sustrato fue de 3×10^7 en todos los casos. A fines comparativos, se muestran los resultados por unidad de volumen ya que los distintos sustratos ensayados presentan densidades diferentes.

El número de UFC por mL de sustrato disminuyó con el tiempo, para todas las combinaciones de cepa inoculada, método y sustrato, alcanzando valores entre 1 y 2 órdenes de magnitud menores a la concentración inicial luego de 90 días. La cepa M25 mostró una caída más paulatina y regular, sin una distinción clara entre los distintos sustratos, mientras en los frascos inoculados con N33 se hizo más evidente el efecto de cada tipo de sustrato en la supervivencia de las bacterias, que tuvieron un mejor desempeño en la tierra fértil que en la arena, con un comportamiento intermedio en la mezcla arena:vermiculita (Figura [R2.2](#) b y c). Comparativamente, las curvas de reobtención de bacterias en el tiempo de la cepa M25 se mantienen siempre por encima de las registradas para N33, con menor distancia entre ellas para la inoculación en tierra fértil, pero con una separación más notoria en los otros dos tipos de sustratos y con un

mayor número de colonias recuperables al final del tiempo del experimento para las inoculaciones en arena (Figura [R2.2](#) d, e y f). No se observa un patrón definido que diferencie a los métodos de inoculación, pero se debe considerar que en este experimento, la pérdida de humedad por evaporación desde los frascos fue mínima debido a que se encontraban tapados y conservados en oscuridad en una cámara de temperatura controlada a 22°C. Si el suelo mantiene su contenido de agua sin deshidratarse entonces el potencial efecto positivo del polímero superabsorbente se enmascara debido a que no se impone una condición limitante donde el SAPH pueda marcar una diferencia frente a la inoculación tradicional por riego. Este ensayo permite concluir que en condiciones óptimas de humedad del suelo, ambos métodos de inoculación son equivalentes, indicando que no existe una penalidad por inocular en la matriz del SAPH y se puede aprovechar dicha matriz como vehículo para la incorporación de bacterias beneficiosas en diferentes sustratos sin necesidad de introducir nuevas prácticas o protocolos adicionales en plantaciones comerciales.

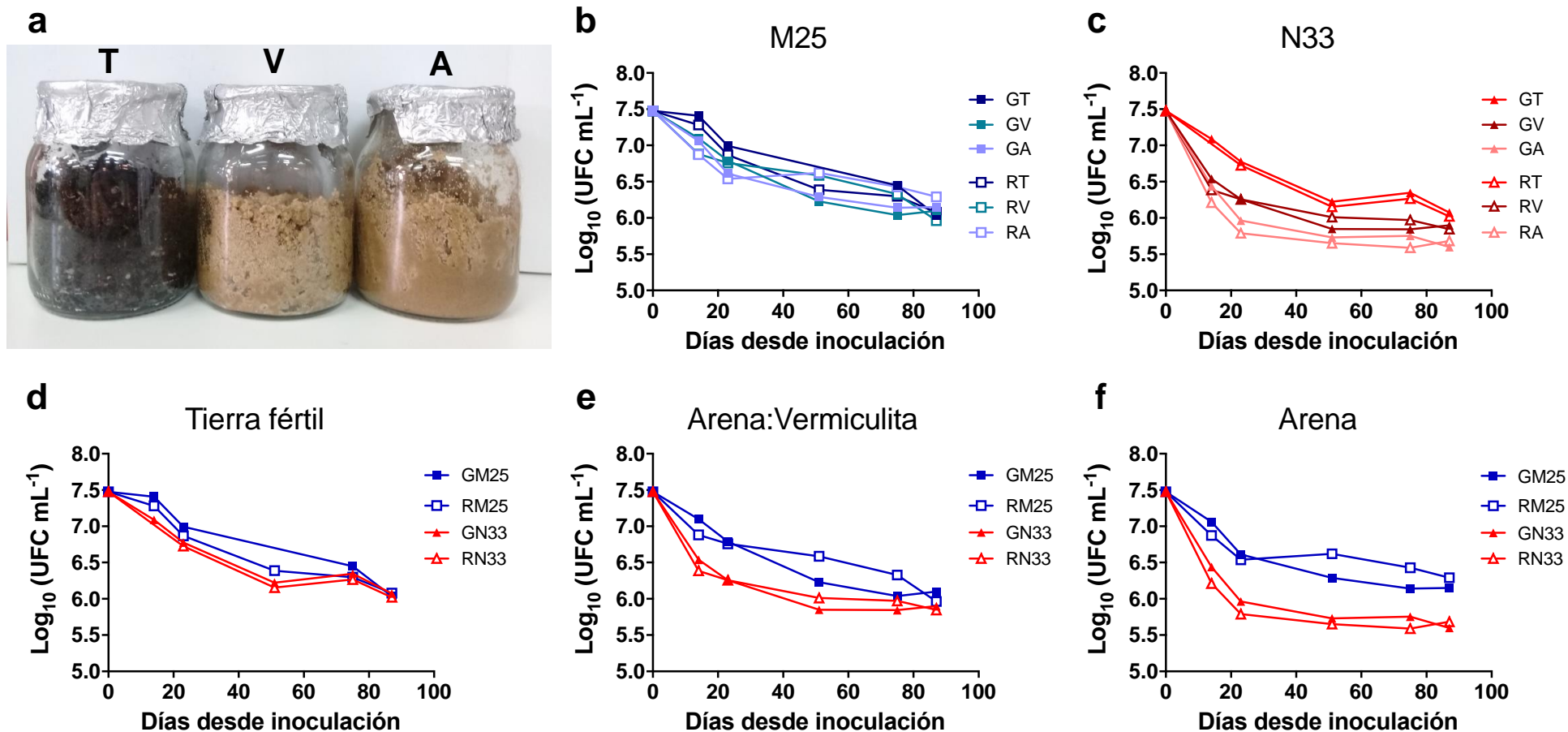


Figura R2.2: Supervivencia de las cepas M25 y N33 en distintos sustratos, inoculadas por riego o embebidas en el SAPH. (a) Fotografía de los recipientes conteniendo tierra fértil (“T”), mezcla arena:vermiculita (“V”) o arena (“A”), que se usaron para el análisis de supervivencia. (b) y (c) Supervivencia en el tiempo de M25 y N33, respectivamente, medida como unidades formadoras de colonia (UFC), recuperadas por mililitro de sustrato muestreado. (d), (e) y (f) Comparación entre los métodos de inoculación para las dos bacterias en cada sustrato ensayado. Los símbolos llenos muestran las inoculaciones a través del gel SAPH y los vacíos mediante riego (“G” y “R”, respectivamente, en los rótulos de cada símbolo). Se muestra un experimento representativo.

2.3 - Localización de M25 y N33 en la planta y la rizosfera luego de sequía

Habiendo evaluado la supervivencia del inóculo en el polímero aislado o en distintos sustratos esterilizados, el siguiente ensayo buscó estudiar la persistencia de las cepas seleccionadas inoculadas en el entorno radical de eucaliptos plantados en suelo no estéril y posteriormente sometidos a estrés hídrico por suspensión del riego. A la vez, se buscó evaluar la posibilidad de ingreso de las bacterias desde el sustrato donde fueron inoculadas hacia el interior de los eucaliptos mediante el rastreo de bacterias fluorescentes en muestras de tejidos de los plantines.

Este ensayo se realizó utilizando sustrato comercial sin previa esterilización, en ausencia de SAPH e imponiendo un período de sequía, de tal forma de evaluar la durabilidad del inóculo en condiciones desfavorables, debiendo competir con los microorganismos ya existentes en dicho sustrato y sin la protección que le provee la matriz polimérica y acuosa del gel superabsorbente ante el estrés hídrico. Se utilizaron plantines de *E. grandis* de dos meses de edad de la variedad clonal INTA36, de uso frecuente en cultivos comerciales de la Argentina. Las bacterias transformadas con GFP se inocularon por riego en macetas de 0,5 litros conteniendo sustrato comercial GROWMIX no esterilizado y los plantines de *E. grandis*. Inicialmente las macetas fueron regadas a capacidad de campo por 16 días para permitir la estabilización e interacción del sistema microorganismos-planta-suelo en condiciones de crecimiento que no fueran restrictivas. Posteriormente, se suspendió el riego por 14 días, promoviendo la desecación parcial del sustrato para luego iniciar una fase de riego normal que se mantuvo por 3 semanas. Para constatar la supervivencia de las cepas se tomaron regularmente muestras de suelo inoculado. Se verificó positivamente la presencia del inóculo antes de suspender el riego. A tiempo final, junto con las correspondientes muestras de suelo, se separaron muestras de raíces y hojas para intentar rastrear bacterias en el interior de dichos órganos realizando un homogenato de los tejidos luego de una esterilización superficial. También se colectaron muestras de rizoplasma a partir de raíces minuciosamente limpias y libres de sustrato pero sin esterilización superficial.

Los resultados obtenidos (Figura [R2.3](#)) muestran que luego de 50 días en la cámara de cultivo, el inóculo pudo ser recuperado desde el sustrato, incluso luego de haber transitado un período de 14 días sin riego. La cepa M25 presentó un título de supervivencia un orden de magnitud mayor que N33 (10^4 y 10^3 UFC por gramo de suelo fresco, respectivamente). En cuanto a las muestras de tejidos, se logró reobtener bacterias fluorescentes desde raíces limpias pero sin esterilizar de plantines inoculados

con una u otra cepa, pero no se registró la presencia de bacterias transformadas con GFP cuando las muestras se esterilizaron superficialmente antes de proceder con la disgregación del tejido. Esto indicaría que las bacterias se localizaron efectivamente en el entorno próximo de las raíces luego de ser regadas en el suelo pero sin evidencias de su ingreso en la planta. Asimismo, tampoco se registró la aparición de colonias de ningún tipo desde los homogenatos de tejido foliar recolectado (Figura [R2.3](#)).

Este ensayo es consistente con las pruebas previas de recuperación de bacterias desde el gel aislado y en diferentes sustratos, mostrando que ambas cepas son capaces de sobrevivir durante el período de implantación. Más aún, el ensayo demuestra que estas bacterias son capaces de convivir con plantines de *E. grandis* y ocupar los espacios más próximos a la raíz, superando dificultades como la competencia interespecífica y factores de estrés abiótico severos y frecuentes en la naturaleza.

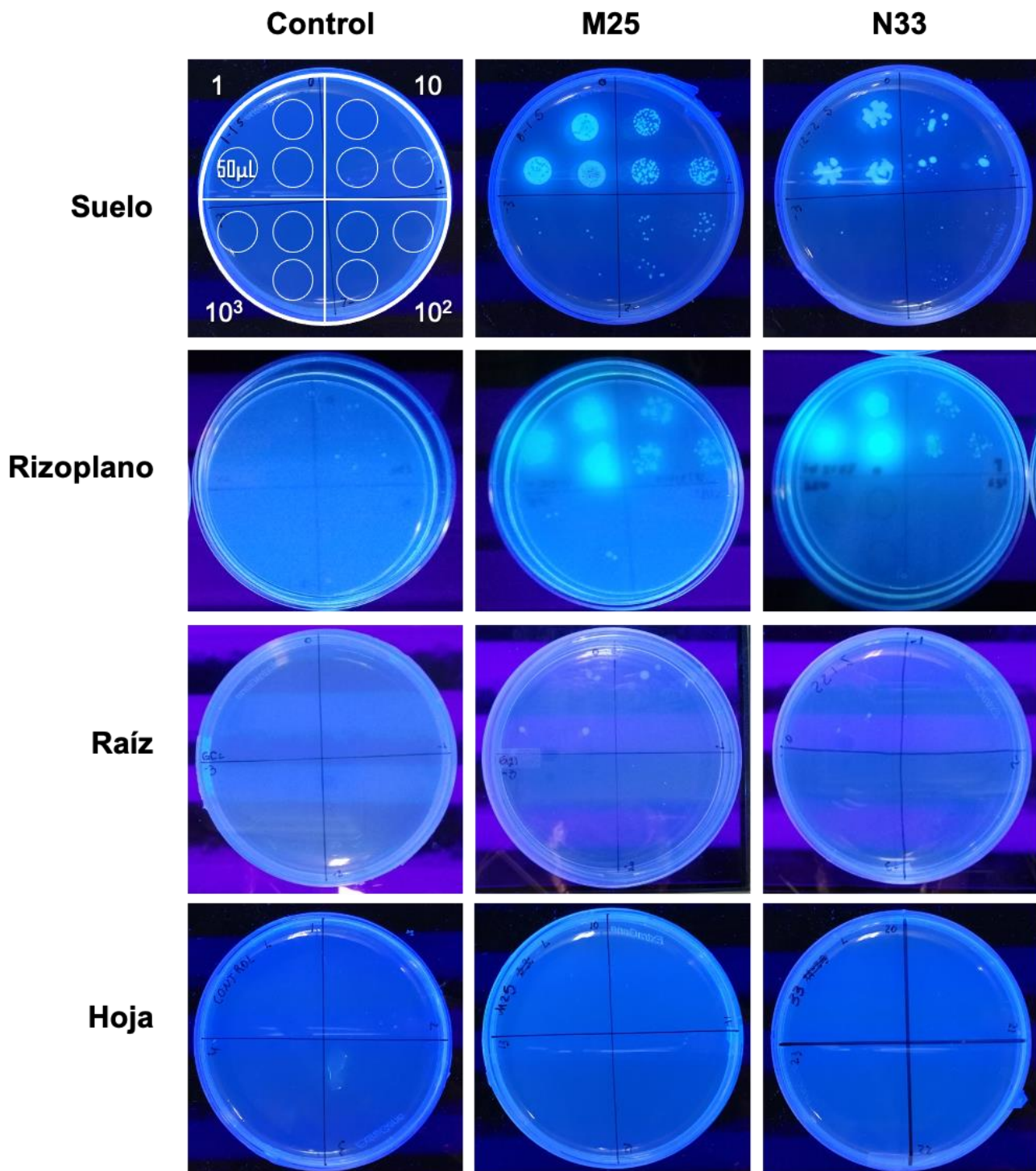


Figura R2.3: Localización de bacterias marcadas con GFP luego de un experimento de estrés por sequía en plantines de *E. grandis* cultivados en suelo no estéril. Muestras de suelo, rizoplano, raíz y hojas fueron procesadas para la recuperación del inóculo. La suspensión resultante fue diluida en serie y 50 µL de cada dilución se sembraron como se muestra en la imagen superior izquierda, en placas con medio rico agarizado suplementado con kanamicina. Control: muestras provenientes de suelo y plantas no inoculados.

2.4 - Localización y efecto sobre raíces en microescala

Los resultados de los análisis de reobtención del inóculo desde muestras de suelo no estéril y tejidos de *E. grandis*, mostraron una fuerte presencia de las bacterias en el entorno radical de los plantines, sin evidencia de ingreso a los tejidos internos. Debido a esto, se decidió estudiar los posibles efectos de la inoculación sobre la arquitectura y morfología radicular de plántulas en escala reducida. Para ello se preparó un sistema de cultivo en placas con medio agarizado que permitiera visualizar la raíz libre de sustrato y habiendo aplicado las bacterias transformadas con GFP en la proximidad de la zona de crecimiento de las raíces de plántulas jóvenes, provenientes de semillas recientemente germinadas. El mismo sistema de cultivo se utilizó para evaluar el efecto sobre plántulas de *E. grandis* y de *A. thaliana* luego de una semana de crecimiento en presencia de M25, N33, o solución de magnesio estéril en el caso de las plantas control.

Las plántulas sin inocular, tanto de eucalipto como de arabidopsis, presentaron una morfología con poco desarrollo de pelos radicales mientras las plántulas inoculadas aumentaron notoriamente la cantidad y la longitud de los mismos, con diferencias significativas en el caso de *A. thaliana*. La cepa N33 fue la que mayor impacto produjo en el aumento de este carácter ([Tabla R2.1](#), figura [R2.4](#) a y b). Un mayor desarrollo en número y tamaño de los pelos absorbentes implica un incremento considerable de la superficie total de la zona de absorción de las raíces de estos individuos. Por otro lado, no se observó un cambio notorio entre los tratamientos en la arquitectura radicular general, la longitud de la raíz principal o la cantidad de raíces laterales. La morfología del sistema radicular fue más homogénea en *A. thaliana* que en *E. grandis*, a pesar de provenir todas las plántulas desde semilla, lo que se reflejó en la varianza de los datos registrados ([Tabla R2.1](#), figura [R2.4](#) a y b). Estos resultados reafirman la importancia de realizar exploraciones experimentales en modelos de laboratorio más sencillos de manipular, para evidenciar efectos que la variabilidad natural de una especie menos domesticada podría estar enmascarando estadísticamente.

Sumado al estudio en raíces, de cada placa se calculó un promedio de peso fresco del vástago por plántula, para tener una medida del impacto de la inoculación en el crecimiento de la parte aérea en esta microescala. De cada tratamiento se cultivaron cuatro placas independientes, pero a pesar del bajo número de réplicas se observó una tendencia favorable hacia mayores valores de peso fresco del vástago en los eucaliptos

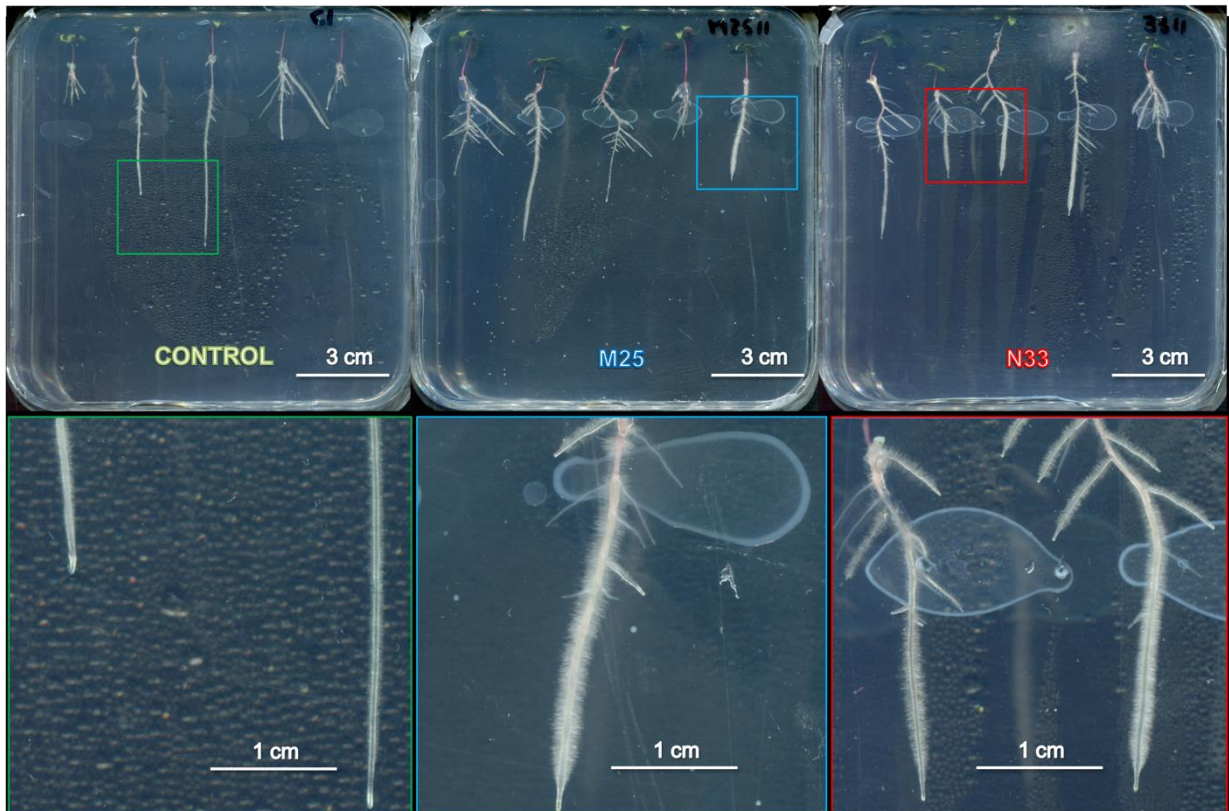
inoculados, con promedios de 24 y 48% superiores para las plántulas inoculadas con N33 y M25, respectivamente. En el caso de *arabidopsis*, las diferencias resultaron de una magnitud mayor y significativas, separando ambos grupos de plántulas inoculadas de las plantas control con un incremento de alrededor de 80% en el peso fresco promedio de los vástagos (Figura [R2.4](#) c y d).

Al momento de la cosecha, se verificó la persistencia del inóculo luego de la semana de cultivo mediante la observación microscópica de bacterias fluorescentes en las raíces de las plántulas. Nuevamente se observó la presencia de inóculo en la proximidad de las raíces, incluso a cierta distancia de la zona de inoculación, sin evidencia de una posible colonización interna de los tejidos por parte de las bacterias (resultados no mostrados). Se requiere repetir esta metodología para profundizar en el estudio detallado de la localización mediante cortes histológicos de mayor precisión.

Este tipo de ensayos de corta duración permiten evaluar de forma rápida y directa el efecto de diferentes cepas sobre el sistema radicular y su influencia en el vástago, además de facilitar estudios más detallados de localización de las bacterias aprovechando un medio de cultivo simplificado y libre de otros microorganismos que pudieran interferir con la observación. Estos ensayos también son eficientes para comparar los resultados obtenidos con la especie vegetal de interés y la planta modelo *A. thaliana*, constituyendo una herramienta apropiada para futuras exploraciones iniciales y prospección de posibles cepas promotoras del desarrollo.

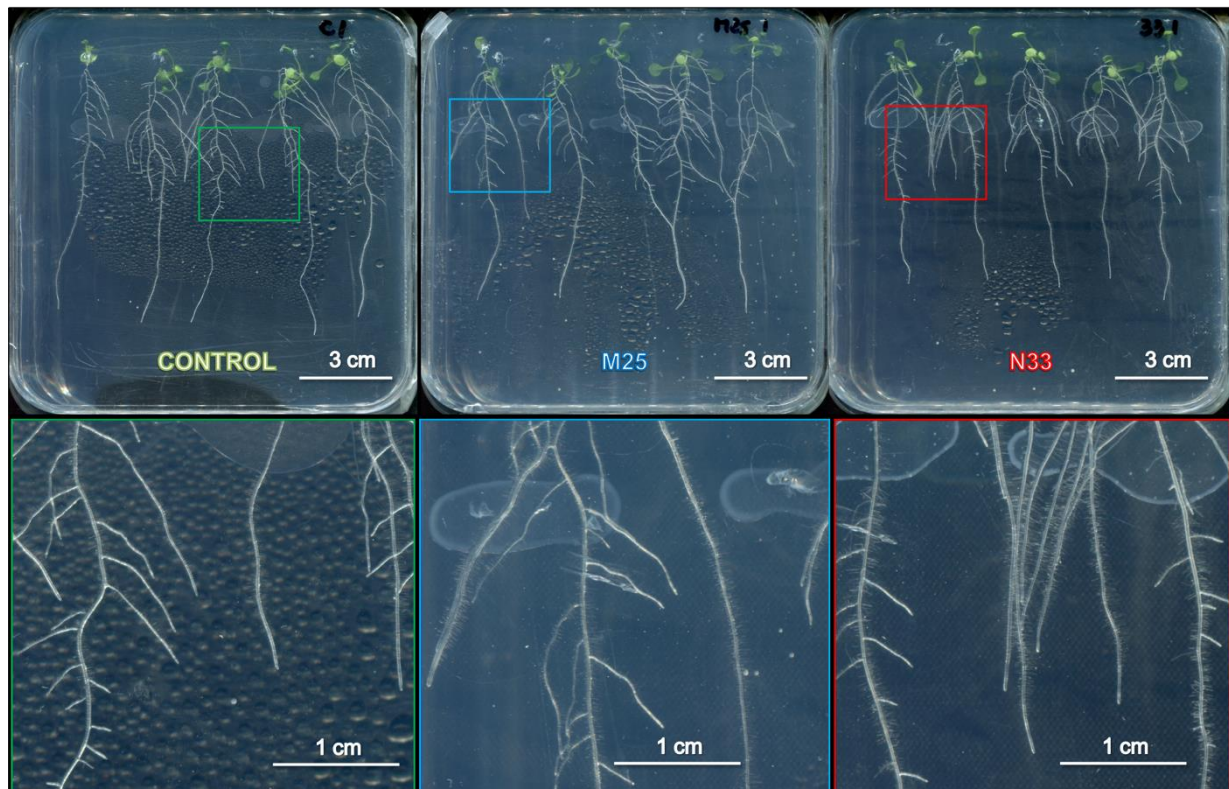
a

Eucalyptus grandis



b

Arabidopsis thaliana



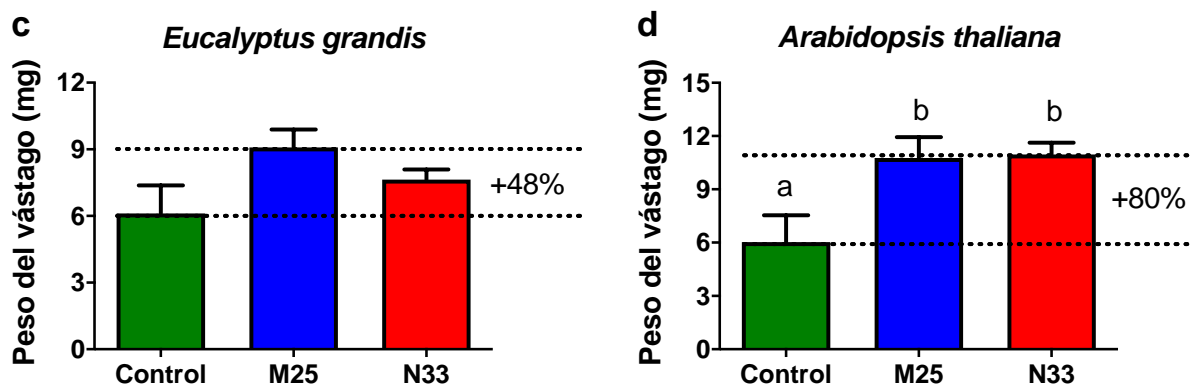


Figura R2.4: Efecto de M25 y N33 sobre vástago de plántulas de *E. grandis* y *A. thaliana* cultivadas en placas con medio agarizado. Página 99: (a) y (b) Aspecto general y detalle de la morfología del sistema radicular de plántulas de *E. grandis* y *A. thaliana*, respectivamente. Las fotografías fueron tomadas a los siete días del pasaje de los individuos desde sus placas de germinación a esta condición de cultivo en medio MS agarizado. Página 100: (c) y (d) Peso fresco del vástago de las plántulas de *E. grandis* y *A. thaliana*, respectivamente. Los valores de las plántulas fueron promediados por placa, considerando una placa como unidad experimental. La barras representan la media entre placas de un mismo tratamiento con su error estándar, n = 4. Diferentes letras indican diferencias significativas en un ANOVA de un factor (P-valor < 0,05).

		Longitud de raíz principal (cm)	Número de raíces laterales	Pelos absorbentes	
				Cantidad	Longitud (mm)
<i>E. grandis</i>	Control	4,6 ± 2,3	10 ± 3	+	0,48 ± 0,19
	M25	4,3 ± 1,2	12 ± 4	+++	0,60 ± 0,13
	N33	4,6 ± 1,4	11 ± 3	++++	0,74 ± 0,11
<i>A. thaliana</i>	Control	9,6 ± 0,5	22 ± 6	+	0,72 ± 0,08 a
	M25	9,2 ± 1,0	24 ± 8	++	0,87 ± 0,08 b
	N33	8,8 ± 1,2	21 ± 5	+++	0,98 ± 0,09 c

Tabla R2.1: Efecto de M25 y N33 sobre la morfología del sistema radicular de plántulas de *E. grandis* y *A. thaliana* cultivadas en placas con medio agarizado. Los datos fueron obtenidos mediante el análisis de imágenes escaneadas del sistema radicular. Los valores de las plántulas para cada variable fueron promediados por placa, considerando una placa como unidad experimental. Los valores mostrados en la tabla representan la media entre placas de un mismo tratamiento con su desvío estándar, n = 4. Diferentes letras indican diferencias significativas en un ANOVA de un factor (P-valor < 0,05).

Sección 3

Efecto de la inoculación de M25 y N33 en la tolerancia a la sequía en plantines de *E. grandis*

Uno de los principales agentes que afecta la producción forestal de eucaliptos en etapas tempranas es la falta de agua para el despegue inicial de los plantines recientemente implantados en el campo. Es por este motivo que se recurre a los polímeros hidrofílicos superabsorbentes como estrategia para sobrellevar la deshidratación. Aún así, las condiciones climáticas y el entorno pueden contribuir a que este tipo de estrés sea leve o agudo o que ocurra de una forma gradual y progresiva o rápida y abrupta. Para evaluar el efecto protector frente a la falta de agua de la inoculación con las cepas bacterianas seleccionadas, se ensayaron dos tipos de velocidad de imposición de una sequía severa por deshidratación del suelo: gradual y prolongada en el tiempo o abrupta y de corta duración. Estos sistemas diferentes se lograron manipulando las condiciones de crecimiento y cultivo de los eucaliptos de cada experimento. Para cada condición se evaluó paralelamente la capacidad de crecimiento bajo riego normal, manteniendo el suelo a capacidad de campo, para observar el posible efecto promotor de las bacterias en ausencia de estrés hídrico. Posteriormente, se ensayó el efecto de la inoculación simultánea con ambas cepas bacterianas, a capacidad de campo y en condiciones de estrés hídrico por sequía rápida. Debido a que estos ensayos involucraron la medición de una gran cantidad de parámetros y fueron realizados de una forma comparable entre los diferentes sistemas de cultivo, esta sección concluye con un apartado de análisis multivariados que buscan encontrar asociaciones entre variables y distinguir patrones de comportamiento de los eucaliptos, relacionados a los factores de inoculación y disponibilidad de agua.

3.1 - Inoculación individual y sequía gradual en invernadero

Plantines de *E. grandis* de dos meses de edad fueron aclimatados dos semanas en un invernadero perteneciente al Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE-CONICET-UNLP; -34.912375, -57.930637; La Plata, Buenos Aires, Argentina). Transcurrido ese tiempo fueron trasplantados a macetas de 10 litros para iniciar el experimento que duró desde Marzo hasta Junio de 2018 (un total de 114 días). La inoculación se realizó colocando en el pocillo de trasplante 500 ml de SAPH, hidratado con suspensión bacteriana o con agua corriente en el caso del control. Las plantas fueron regadas a capacidad de campo día por medio durante 35 días, momento en que se detuvo el riego en la mitad de las plantas (“sequía” en el esquema de riegos de la figura [R3.1 a](#)), mientras la otra mitad mantuvo el régimen de riego normalmente. La evapotranspiración de agua se registró regularmente por pesaje de las macetas, cubiertas con bolsas impermeables cerradas al cuello de los plantines para minimizar la evaporación directa desde el sustrato. Cuando la caída del peso se estabilizó en un valor mínimo, a los 55 días luego de retirado el suministro de agua ([Anexo 4](#)), se estimó que se había llegado a la pérdida máxima del contenido de agua de la maceta y se procedió a reiniciar el riego durante 24 días más para evaluar los efectos del estrés y de las bacterias en una fase de recuperación post-sequía. El volumen de maceta utilizado y el descenso estacional de la temperatura ambiente con alta humedad relativa (ver condiciones ambientales locales durante el período del ensayo en el [Anexo 3](#)) produjo una caída de la cantidad de agua en el sustrato prolongada en el tiempo pero de alta intensidad al alcanzar un contenido mínimo, obteniéndose como resultado un estrés hídrico severo pero gradual.

Bajo estas condiciones, se observó que el contenido relativo de agua (CRA) foliar de las plantas sin estrés hídrico, se encontraba alrededor del 96%, mientras que luego de 55 días sin riego, todas las plantas estresadas mostraron una caída cercana al 4% en su CRA foliar, independientemente de la presencia de bacteria en la matriz del SAPH. Superado el período de sequía y los subsecuentes 24 días de recuperación con el riego restaurado, los plantines inoculados con M25 presentaron un CRA 2% superior al de los controles e incluso a su propio valor inicial previo a la imposición de la sequía, mientras los inoculados con la cepa N33 mostraron un comportamiento intermedio entre los controles y las inoculadas con M25, en el período de recuperación (Figura [R3.1 b](#)).

Sumado a lo anterior, el tratamiento de sequía gradual causó una defoliación ligera, detuvo la formación de nuevas hojas y ralentizó el desarrollo del vástago en general. El área foliar total y el índice de crecimiento reflejaron este efecto negativo de

la falta de agua en el desarrollo, independientemente del inóculo aplicado, mostrando una diferencia con el grupo no estresado de 20% y 30% respectivamente (Figura [R3.1](#) c y d). Bajo ambos regímenes de riego contrastantes, las dos inoculaciones bacterianas mostraron una fuerte tendencia positiva hacia mayores índices de crecimiento, entre 33 y 35% superiores a los correspondientes a las plantas sin inocular, aunque las diferencias resultaron estadísticamente no significativas.

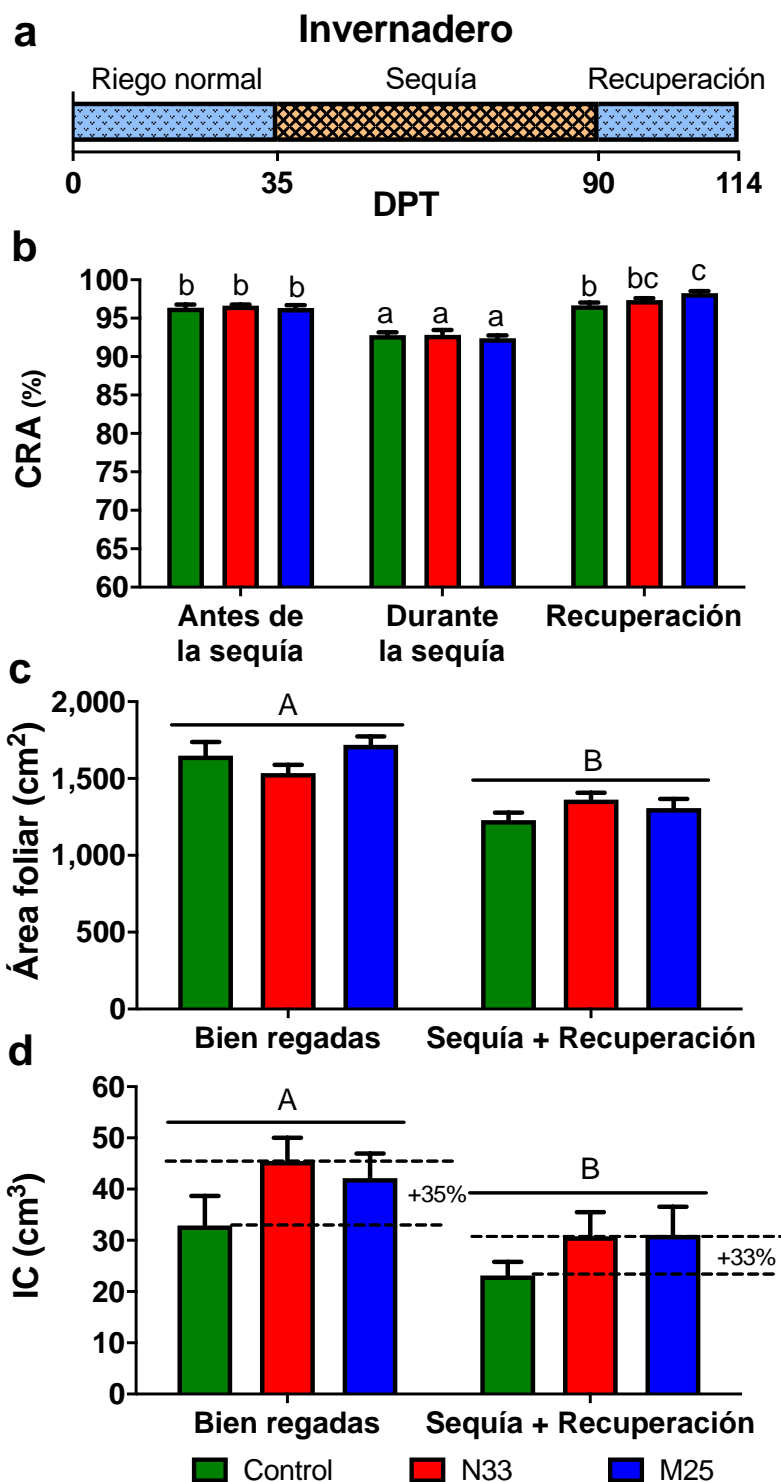


Figura R3.1: Efecto de la inoculación con M25 o N33 en plantines de *E. grandis* sometidos a estrés por sequía gradual en invernadero. (a) Régimen de riego para el experimento de déficit hídrico. En las etapas de riego normal y recuperación las plantas fueron regadas a capacidad de campo; durante el período de sequía, se suspendió el suministro de agua por 55 días (DPT, días post-trasplante). (b) Contenido relativo de agua (CRA) de hojas individuales antes y durante el período de sequía y 24 días luego de reiniciado el riego en la etapa de recuperación (35, 90 y 114 DPT, respectivamente). (c) y (d) Parámetros de crecimiento registrados a tiempo final, para las plantas bien regadas y las que atravesaron un período de sequía con posterior recuperación. (c) Área foliar total. (d) Índice de crecimiento (IC) calculado como la diferencia entre el volumen final (producto entre el diámetro de la base al cuadrado y la altura máxima del tallo principal) y el inicial para cada eucalipto. Las líneas punteadas indican el incremento en la media del IC entre las plantas inoculadas y los controles sin inocular para cada régimen de riego. Los gráficos muestran la media de cada tratamiento junto con su error estándar, $n = 12$. Las distintas letras indican diferencias significativas en un ANOVA de dos factores (P -valor $< 0,05$). Las letras mayúsculas refieren al factor "régimen de riego" (bien regadas o sequía + recuperación). Las letras minúsculas refieren a la interacción entre los factores "régimen de riego" e "inoculación" (sin inocular, N33 o M25). El factor "inoculación" fue no significativo en todos los casos.

Para analizar específicamente la respuesta de los estomas a medida que el tiempo avanzaba la suspensión del riego, se utilizó un porómetro de estado estacionario. Debido a que las mediciones con este sistema dependen de las condiciones ambientales del entorno en cada fecha de medición, los valores de conductancia estomática (g_s) de los eucaliptos bajo régimen de sequía de cada tipo de inoculación se relativizaron al promedio de sus propias contrapartes bajo riego normal de esa misma fecha. De esta manera se logró separar los efectos sobre los estomas producidos por el tratamiento de sequía de aquellos generados por factores ambientales y así construir una curva en el tiempo estandarizada para esta variable.

Se observó un comportamiento bifásico causado por la sequía en la conductancia estomática de los plantines estresados. En las plantas no inoculadas, g_s inicialmente disminuyó de forma gradual por 30 días desde la suspensión del riego (entre los 35 y 70 días post-trasplante, DPT) hasta una diferencia del 20% respecto a los valores de las plantas bien regadas, reflejando la naturaleza progresiva del estrés hídrico impuesto. Luego de eso, la falta de agua produjo una caída pronunciada en g_s , desde 80% a 10% de los valores de plantas regadas, en alrededor de 7 días. Las plantas inoculadas mostraron el mismo patrón bifásico con un descenso inicialmente gradual de g_s seguido de una caída abrupta, pero con una respuesta al estrés hídrico más temprana respecto a los eucaliptos sin inocular, alcanzando valores mínimos de g_s con una semana de anticipación. Al reanudar el riego normal las plantas sin inocular y aquellas inoculadas con N33 mostraron una recuperación en los valores de g_s más rápida que las inoculadas con M25 (Figura [R3.2](#)).

Si consideramos a la modulación estomática como una estrategia para la superación del déficit hídrico, estos resultados sugieren un mecanismo en que las plantas inoculadas con M25 conservan mejor el agua, alcanzando mayores valores de CRA que las no inoculadas, resultando consistente también con la respuesta intermedia de los eucaliptos inoculados con N33 presentada en la figura [R3.1 b](#).

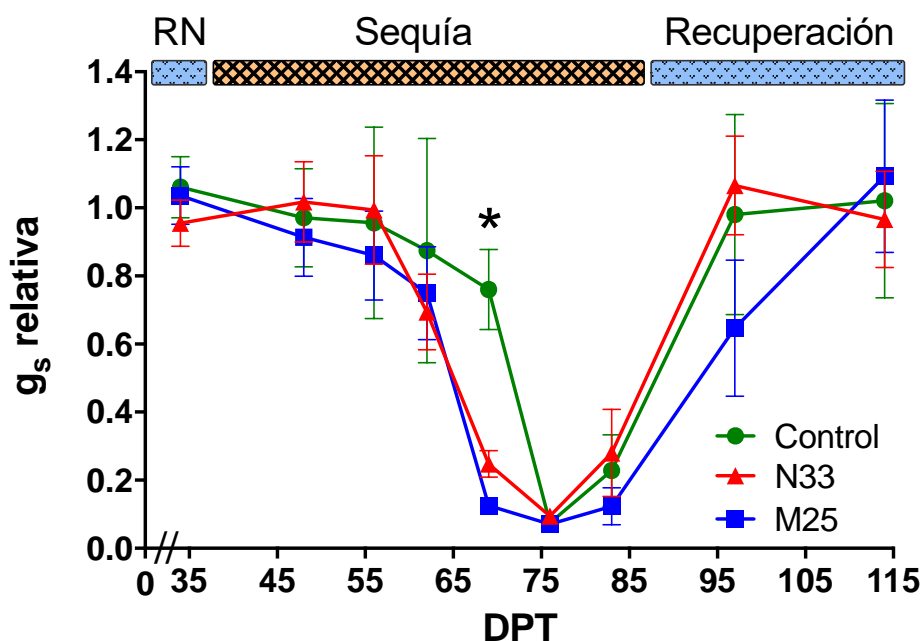


Figura R3.2: Conductancia estomática (g_s) de los plantines de *E. grandis* sometidos estrés por sequía gradual en invernadero. Las mediciones fueron realizadas utilizando un porómetro de estado estacionario sobre hojas individuales. El gráfico muestra el tiempo entre la última medición antes del inicio del estrés hídrico y el final del experimento. El esquema de riego se muestra en la parte superior del gráfico (RN = Riego normal). El eje x señala los días-post trasplante (DPT), mientras el eje y muestra los valores de g_s promedio para las plantas estresadas y recuperadas, relativos a su respectivo control bien regado. Las barras de error representan el error estándar propagado; cuando no son visibles, su tamaño es menor al de los símbolos. El asterisco indica diferencias significativas entre las plantas control e inoculadas, para ese DPT, en un ANOVA de un factor (P -valor < 0,05).

Para continuar con el estudio de las propiedades hidráulicas y la distribución del agua en el interior de las plantas, se evaluaron diversos parámetros por ajuste a curvas presión-volumen en una rama de cada planta a tiempo final. El CRA apoplástico de las ramas fue entre 32 y 100% mayor en plantas inoculadas con M25, independientemente del régimen de riego aplicado. Los eucaliptos inoculados con N33 presentaron nuevamente una respuesta intermedia entre el control y las inoculadas con M25. Resultados similares se observaron al evaluar el coeficiente de elasticidad (E_{max}). No se registraron cambios significativos en el potencial osmótico, ni el punto de máxima saturación de agua interna, ni en el de pérdida de turgencia (Ψ_o SAT y Ψ_o PPT, respectivamente) independientemente del tipo de inoculación o régimen de riego aplicado (Tabla R3.1). Estos resultados sugieren que las plantas inoculadas pueden modificar las estrategias de manejo del agua disponible mediante la alteración de las propiedades estructurales de la pared celular y los reservorios de agua intercelulares.

Tratamiento		Ψ_o SAT (MPa)		Ψ_o PPT (MPa)		CRA apo		E_{max} (Mpa)	
Control	Bien regadas	-1,32 ± 0,10	NS	-1,49 ± 0,08	NS	0,40 ± 0,08	A	8,40 ± 1,13	A
	Sequía + Recuperación	-1,39 ± 0,04		-1,53 ± 0,05		0,29 ± 0,04		9,96 ± 0,51	
N33	Bien regadas	-1,14 ± 0,08		-1,33 ± 0,06		0,52 ± 0,09	AB	6,78 ± 1,20	AB
	Sequía + Recuperación	-1,29 ± 0,11		-1,47 ± 0,09		0,45 ± 0,09		7,77 ± 1,30	
M25	Bien regadas	-1,15 ± 0,09		-1,35 ± 0,08		0,53 ± 0,08	B	6,56 ± 1,09	B
	Sequía + Recuperación	-1,13 ± 0,05		-1,38 ± 0,03		0,61 ± 0,07		5,42 ± 0,99	

Tabla R3.1: Mediciones hidráulicas del vástago de plantines de *E. grandis* cultivados en invernadero. Las plantas fueron cultivadas bajo dos regímenes hídricos alternativos: “Bien regadas” como una condición de riego normal o “Sequía + Recuperación”, consistiendo en 35 días de riego normal y una suspensión del riego por 55 días seguidos de 24 días nuevamente con riego normal a capacidad de campo. La tabla muestra el potencial osmótico a saturación interna de agua (Ψ_o SAT), el potencial osmótico en el punto de pérdida de turgencia (Ψ_o PPT), el contenido relativo de agua en el apoplasto (CRA apo) y el coeficiente de elasticidad máxima (E_{max}). Las mediciones se realizaron en ramas escindidas de 6 plantas por tratamiento. Los resultados mostrados corresponden a la media ± el error estándar. Las distintas letras indican diferencias significativas en un ANOVA de dos factores (P-valor < 0,05). NS = diferencias no significativas.

3.2 - Inoculación individual y sequía rápida en cámara de cultivo

En la naturaleza la cantidad de agua disponible para el desarrollo vegetal puede variar de acuerdo a las condiciones ambientales que impacten sobre la modulación de su entrada o salida del sistema. Con el objetivo de evaluar el efecto protector de las bacterias seleccionadas sobre plantines de *E. grandis* bajo condiciones de sequía severa, se complementó el experimento en invernadero descrito anteriormente con ensayos en cámara de cultivo bajo condiciones ambientales controladas. Mientras en el invernadero, macetas de 10 litros, 500 ml de SAPH por maceta y el descenso estacional de temperatura permitieron manejar una sequía progresiva, en este ensayo plantines de *E. grandis* de la misma edad (dos meses) fueron trasplantados a macetas 20 veces menores (0,5 litros), con 150 ml de SAPH por maceta, en una cámara de cultivo a 22±2°C de temperatura constante. De esta forma se forzó la deshidratación del sustrato de manera más rápida y pronunciada, alcanzando el mínimo de contenido de agua en suelo en solo 10 días sin riego frente a los 55 días necesarios en el ensayo en invernadero ([Anexo 4](#): comparación de agua evapotranspirada total entre ensayos). Luego de 45 días desde el trasplante, cuando todas las plantas se mantuvieron bajo un régimen de riego normal a capacidad de campo, se llevó a cabo la suspensión del riego, nuevamente en la mitad de las plantas. El período de recuperación comenzó con la

reanudación del riego normal luego de 10 días de sequía y se sostuvo 14 días hasta la cosecha de la totalidad de las plantas (Figura [R3.4 a](#)).

En vistas generales, el estrés hídrico rápido causó un efecto más marcado sobre los parámetros de crecimiento que la deshidratación progresiva y gradual, conduciendo a una defoliación severa y un considerable retraso en el desarrollo, tanto de los plantines inoculados como no inoculados (comparar figuras [R3.1](#) y [R3.4](#)). El CRA foliar se encontró alrededor de 92,5% en todas las plantas regadas a capacidad de campo, independientemente de la presencia de inóculo bacteriano. Diez días después de suspendido el riego, el CRA sufrió una caída significativa de entre 12 y 15% en las plantas control y las inoculadas con M25. En estos dos grupos, el CRA se recuperó con la reanudación del riego pero alcanzando sólo un valor de 85% en las plantas no inoculadas (7 puntos por debajo de los valores iniciales antes de comenzar el período de sequía), mientras los eucaliptos tratados con la cepa M25 recuperaron la totalidad del CRA medido antes de la suspensión del riego. Estos resultados se condicen con los obtenidos en el ensayo en invernadero. Por otro lado, aunque se observa una tendencia a menores valores de CRA durante la sequía, estadísticamente las plantas inoculadas con N33 no mostraron un cambio significativo en el CRA en ninguno de los tres períodos evaluados (Figura [R3.4 b](#)).

La medición de área foliar final mostró que ninguno de los grupos de plantas que se mantuvieron bajo condiciones de riego normal a lo largo de todo el experimento presentó una diferencia significativa con respecto a esta variable entre sí, pero si fueron notoriamente diferentes con sus contrapartes que atravesaron el período de sequía. La falta de agua detuvo la formación de nuevas hojas y causó una fuerte defoliación en los tres grupos; sin embargo, las plantas inoculadas mostraron una mayor capacidad para mantener su follaje durante la sequía y cuando el riego normal se reanudó fueron capaces de producir nuevas hojas más velozmente que las plantas control. Esto resultó en que una vez finalizado el período de recuperación después del estrés hídrico, al momento de la cosecha, las plantas inoculadas tanto con M25 como con N33 presentaran un área foliar total final significativamente mayor que la registrada para las plantas sin inocular (Figura [R3.4 c](#)).

La distribución homogénea de luz en los estantes de la cámara de cultivo permitió hacer un seguimiento de un índice de área foliar en el tiempo, estimado como la intercepción de la luz incidente debido a la densidad del canopeo de los eucaliptos. El monitoreo periódico del índice de área foliar apoya los resultados obtenidos con la

medición de área foliar total a tiempo final. Analizando la figura R3.3 se observa la caída del índice en correlato directo con el inicio del período de sequía en las plantas con riego suspendido, seguido de un nuevo aumento del índice una vez reiniciado el riego normal en el período de recuperación. Por otro lado, la figura también muestra cómo se alcanza la máxima interceptación posible de la luz incidente por el follaje de las plantas bien regadas de cada grupo. Lo primero se debe a que la pérdida de hojas permite mayor paso de luz hacia la base de los plantines, es decir, disminuye la cantidad de luz interceptada por los eucaliptos, lo cual se asocia a la disminución de área foliar activa, revirtiéndose posteriormente (en menor medida en plantas sin inocular) con la generación de nuevas hojas cuando el agua vuelve a estar disponible. Lo segundo se relaciona con la resolución de la técnica y la capacidad limitada de medir la interceptación de la luz incidente: Cuanto mayor sea el canopeo, menor será la cantidad de luz que llegue a la base de los plantines pero a partir de cierto punto, por más que se creen nuevas hojas el solapamiento de áreas y distanciamiento entre ellas no permitirá que la técnica detecte el aumento del área foliar (Figura R3.3).

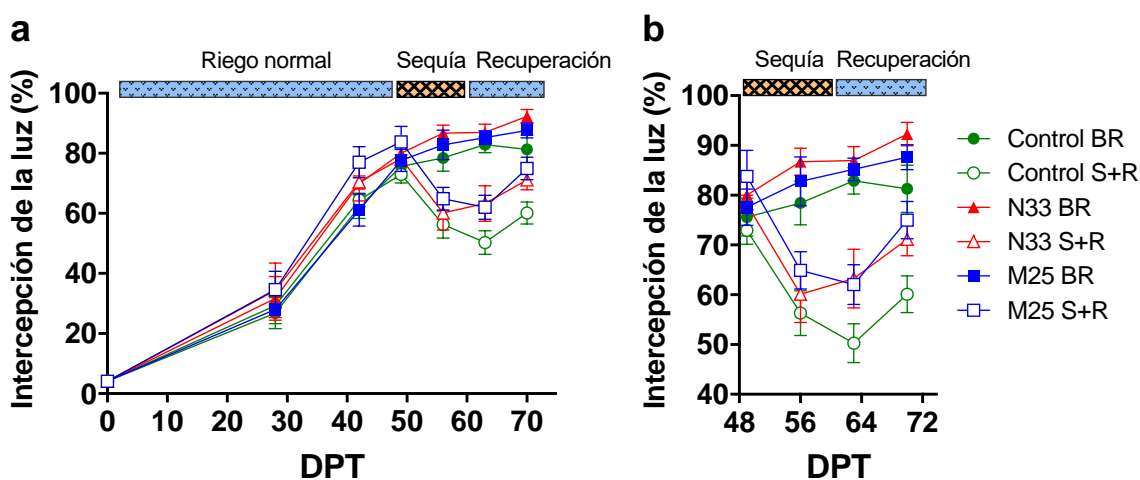


Figura R3.3: Variación en el tiempo del índice de área foliar de plantines de *E. grandis* en cámara de cultivo. El índice de área foliar se estimó como la interceptación de la luz incidente por el canopeo de los eucaliptos del ensayo de tolerancia a la sequía rápida. El régimen de riego para los eucaliptos estresados (grupos nombrados con las siglas S+R = Sequía + Recuperación) se muestra en la parte superior de cada gráfico. A las plantas bien regadas (BR) se les suministró agua de forma regular, manteniéndolas a capacidad de campo. (a) Intercepción de la luz a lo largo de toda la duración del experimento. (b) Detalle ampliado del gráfico (a), mostrando únicamente los períodos de sequía y recuperación. DPT = días post-trasplante. Los puntos muestran la media de cada tratamiento junto con su error estándar, n = 4.

Las mediciones de altura y diámetro del cuello de tallo principal no mostraron diferencias significativas entre los distintos niveles del factor “inoculación” pero sí reflejaron el efecto del tratamiento hídrico. El conjunto de plantas que sufrieron la falta de agua presentó un índice de crecimiento promedio 35% menor al grupo que se mantuvo regado a capacidad de campo; y aunque la heterogeneidad de los eucaliptos pudo haber enmascarado algunas diferencias a nivel estadístico se observa nuevamente una tendencia de crecimiento positiva a favor de las plantas inoculadas, consistente con el experimento en invernadero. En condiciones de riego abundante, el índice de crecimiento de los plantines inoculados con N33 mostró valores aproximadamente un 10% mayores que las plantas controles o inoculadas con M25. Dentro del grupo de plantas estresadas, las inoculaciones con ambas bacterias resultaron en índices de crecimiento 16% por encima de los eucaliptos sin inocular (Figura [R3.4](#) d).

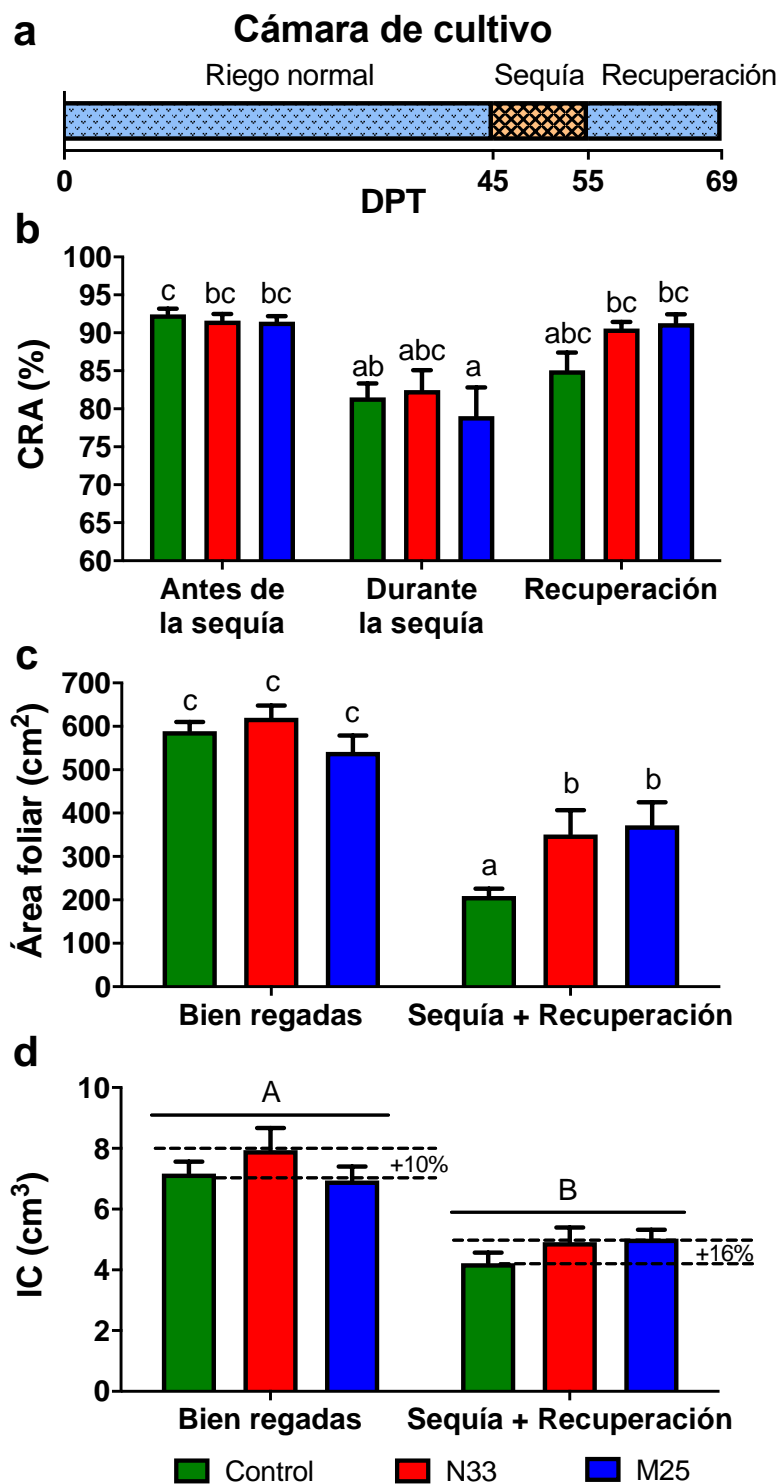


Figura R3.4: Efecto de la inoculación con M25 o N33 en plántulas de *E. grandis* sometidas a estrés por sequía rápida en cámara de cultivo. (a) Régimen de riego para el experimento de déficit hídrico. En las etapas de riego normal y recuperación las plantas fueron regadas a capacidad de campo; durante el período de sequía, se suspendió el suministro de agua por 10 días (DPT, días post-trasplante). (b) Contenido relativo de agua (CRA) de hojas individuales antes y durante el período de sequía y 14 días luego de reiniciado el riego en la etapa de recuperación (45, 55 y 69 DPT, respectivamente). (c) y (d) Parámetros de crecimiento registrados a tiempo final, para las plantas bien regadas y las que atravesaron un período de sequía con posterior recuperación. (c) Área foliar total. (d) Índice de crecimiento (IC) calculado como la diferencia entre el volumen final (producto entre el diámetro de la base al cuadrado y la altura máxima del tallo principal) y el inicial para cada eucalipto. Las líneas punteadas indican el incremento en la media del IC entre las plantas inoculadas y los controles sin inocular para cada régimen de riego. Los gráficos muestran la media de cada tratamiento junto con su error estándar, $n = 8$. Las distintas letras indican diferencias significativas en un ANOVA de dos factores (P -valor $< 0,05$). Las letras mayúsculas refieren al factor "régimen de riego" (bien regadas o sequía + recuperación). Las letras minúsculas refieren a la interacción entre los factores "régimen de riego" e "inoculación" (sin inocular, N33 o M25). El factor "inoculación" fue no significativo en todos los casos.

Analizando comparativamente los experimentos en invernadero y en cámara de cultivo, se observa que los índices de crecimiento son mayores en el primero que en el segundo, para un mismo tiempo de cultivo desde el trasplante (Figura R3.5); lo que puede ser atribuido a las condiciones de crecimiento que difieren entre ambos ensayos. Los eucaliptos en el invernadero fueron crecidos en macetas con 20 veces mayor capacidad que las usadas en la cámara de cultivo y recibieron una intensidad lumínica más favorable a lo largo del día, con la exposición frecuente a irradiancias cercanas a $1500 \mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ según el estado del tiempo, superiores a la cantidad constante y limitada de $250 \mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ que provee la cámara. La fuerte restricción espacial y lumínica determinó que incluso los eucaliptos regados constantemente a capacidad de campo en la cámara de cultivo presentaran valores de desarrollo inferiores a los registrados para los plantines en invernadero bajo tratamiento de sequía (Figura R3.5).

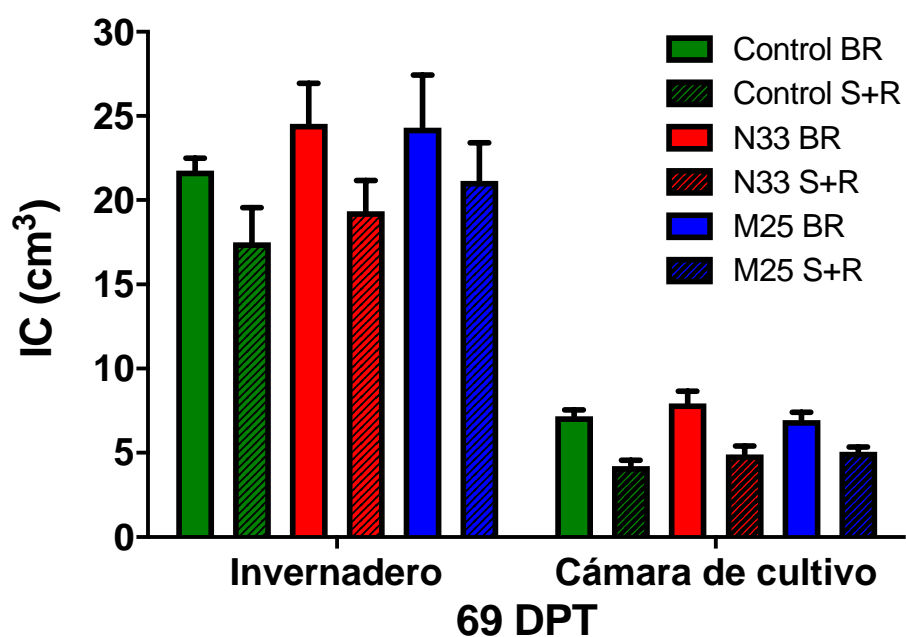


Figura R3.5: Índice de crecimiento comparado entre el ensayo en invernadero y en cámara de cultivo en un mismo tiempo desde el trasplante. El tiempo 69 DPT corresponde a la máxima duración del ensayo en cámara de cultivo previo a la cosecha. Todas las barras representan la media de cada tratamiento junto con su error estándar, $n = 8-12$. Las barras lisas representan los grupos de eucaliptos mantenidos en buenas condiciones hídricas, regados regularmente a capacidad de campo (BR). Las barras rayadas representan los grupos de eucaliptos que fueron estresados por suspensión del riego y recuperados al reiniciar el riego normal (S+R = Sequía + Recuperación).

La duración del ensayo en invernadero, con el tratamiento de sequía gradual, se prolongó hasta alcanzar un contenido mínimo de agua en el sustrato, durando 45 días más que el ensayo de sequía rápida en la cámara de cultivo. Esto junto con lo descrito anteriormente, contribuye a explicar la diferencia en los valores absolutos de crecimiento (altura y diámetro del cuello del tallo) y de biomasa a tiempo final. En cuanto a las velocidades de imposición de la sequía severa, el estrés rápido provocó un efecto más marcado en la biomasa seca final de raíces y hojas que el estrés progresivo (Figura [R3.6](#)). Este efecto se ve reflejado también en la abrupta defoliación de los eucaliptos en la cámara de cultivo, frente a la ligera caída de hojas en el invernadero. Comparando los promedios generales de los eucaliptos sin distinguir por inoculación, sino por condición hídrica, los plantines que atravesaron un período de sequía muestran una caída del 20% y 30% en invernadero y 47% y 35% en cámara de cultivo, para el área foliar y el índice de crecimiento respectivamente. Estos resultados indican que ambos parámetros, en especial la biomasa foliar, se vieron afectados en mayor medida cuanto menor fue el tiempo para la aclimatación de las plantas frente al estrés (comparación entre figuras [R3.1](#) y [R3.4](#)). En ambos experimentos el factor “sequía” fue significativo para la biomasa seca final de tallo, pero no se observaron diferencias entre los niveles del factor “inoculación”. El coeficiente raíz-vástago no varió sustancialmente en respuesta al régimen de riego o a la presencia de bacterias en ninguno de los dos ensayos (Figura [R3.6](#)).

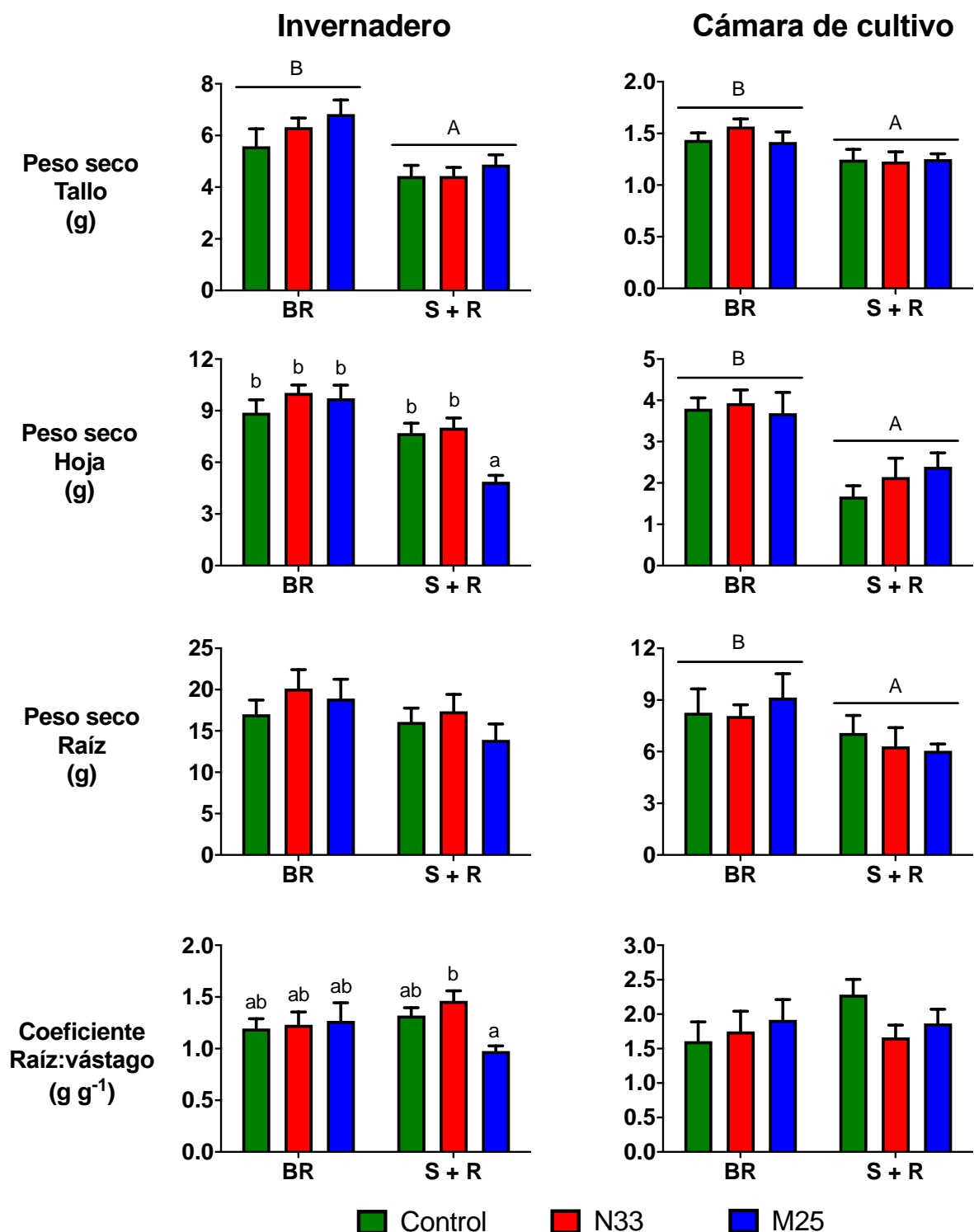


Figura R3.6: Distribución de la biomasa registrada al momento de la cosecha de los eucaliptos en los ensayos de estrés por sequía. A las plantas bien regadas (BR) se les suministró agua de forma regular, manteniéndolas a capacidad de campo. Los grupos de eucaliptos que fueron estresados por suspensión del riego y recuperados con el reinicio de un período de riego normal se indican con las siglas "S+R" (Sequía + Recuperación). Todas las barras representan la media de cada tratamiento junto con su error estándar, n = 8-12. Las distintas letras sobre las barras indican diferencias significativas en un ANOVA de dos factores (P-valor < 0,05). Las letras mayúsculas refieren al factor "régimen de riego" (Bien regadas o Sequía + Recuperación). Las letras minúsculas refieren a la interacción entre los factores "régimen de riego" e "inoculación" (sin inocular, N33 o M25). La ausencia de letras indica que no se registraron diferencias significativas en los factores principales ni en la interacción entre factores (P-valor > 0,05).

En diferentes estadios del ensayo de sequía rápida en cámara de cultivo se evaluó el intercambio gaseoso en la hoja más joven completamente desarrollada en el tallo principal de todas las plantas, para estimar su capacidad fotosintética neta (P_n) y tasa transpiratoria (E) a intensidad de luz saturante. Las mediciones se realizaron con un analizador de gases en el infrarrojo; a los 45, 52 y 69 DPT que corresponden al momento previo de iniciar la sequía, a los 7 días sin riego y a 7 días dentro del período de recuperación, respectivamente (esquema de riego en figura [R3.4](#)). La figura [R3.7](#) muestra la estimulación de P_n en condiciones de riego normal causada por la inoculación con N33, similar a lo observado previamente para la misma cepa en ensayos exploratorios (Figura [R1.10](#)). Este efecto no se evidencia en las plantas inoculadas con M25 en etapas previas a la suspensión del riego. En todas las plantas, la falta de agua durante 7 días condujo a una caída de entre 30 y 40% en P_n , independientemente de haber sido o no inoculada. Luego de 14 días de reanudado el riego, los valores de P_n se elevaron por encima de los iniciales. Más aún, las plantas inoculadas con una u otra cepa mostraron mayor P_n en la recuperación comparado con los controles sin inocular, siendo las plantas con M25 las que alcanzaron el mayor valor promedio, un 40% más alto que los plantines sin inocular.

El incremento en P_n observado en las plantas bien regadas inoculadas con N33 fue acompañado con un aumento en E . Como consecuencia, su eficiencia instantánea en el uso del agua (EUA, calculada como el cociente entre P_n y E) resultó no ser significativamente diferente de la calculada para las plantas no inoculadas. Luego de 7 días sin ser regadas, las plantas controles aún mantenían una E relativamente elevada, mientras que en las plantas inoculadas con las bacterias la tasa transpiratoria se redujo marcadamente hasta valores entre 70 y 77% menores respecto a sus iniciales. Este comportamiento en condiciones de sequía es consistente con la mayor reducción de g_s en las plantas inoculadas frente a los controles sin inocular observada en el experimento en invernadero (Figura [R3.2](#)). La disminución de E fue más pronunciada en los eucaliptos inoculados con M25, que comparativamente mostraron la mayor EUA durante el período de sequía entre los tres grupos evaluados. En ninguna de las plantas, los valores elevados de P_n en el período de recuperación respecto a sus valores iniciales fueron acompañados con incrementos proporcionales en E . Como resultado, todos los grupos alcanzaron valores más altos de EUA que los calculados antes de iniciada la sequía, sin diferencias estadísticas entre las plantas inoculadas o sin inocular.

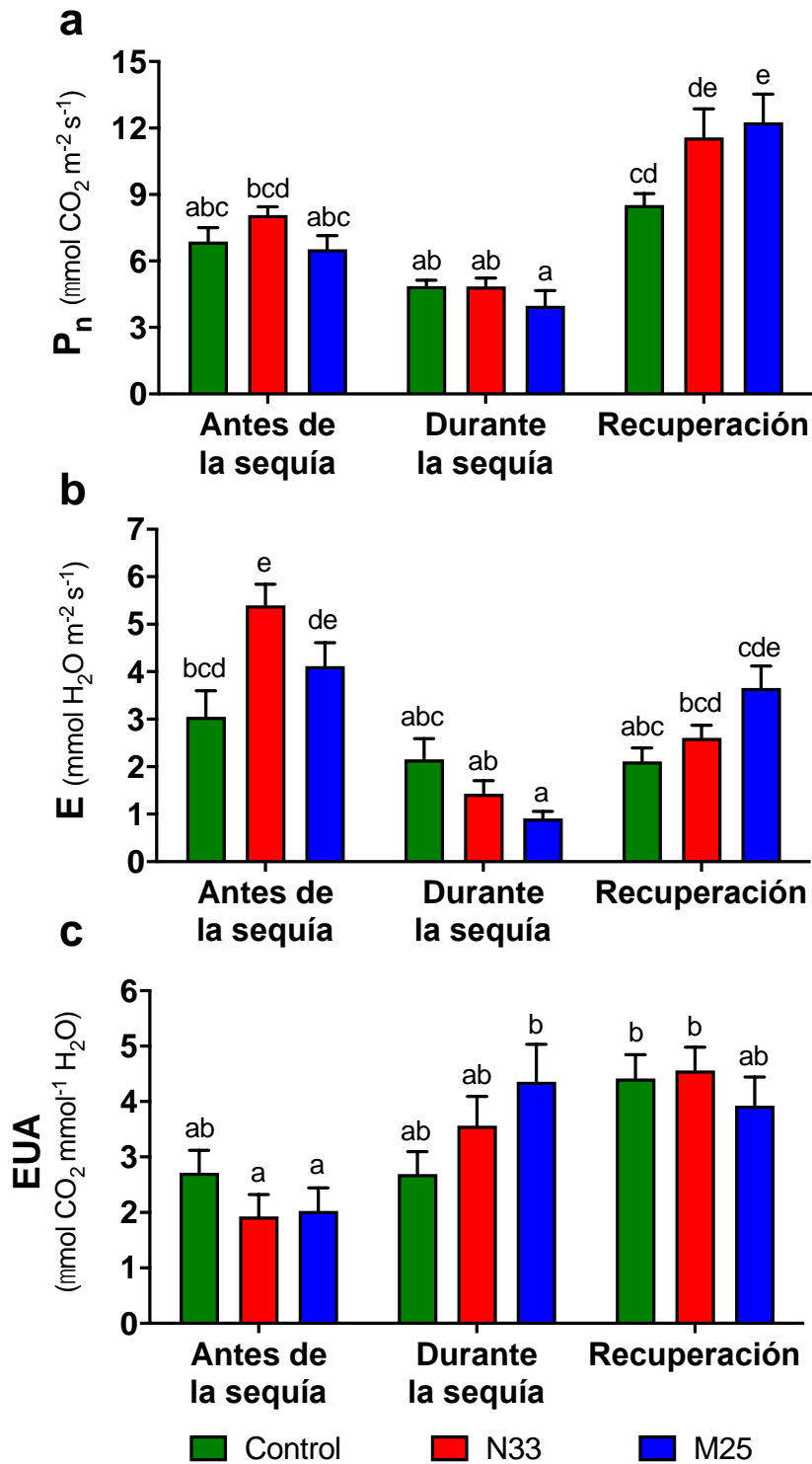


Figura R3.7: Evaluación de parámetros del intercambio gaseoso en plantines de *E. grandis* sometidos a estrés por sequía rápida. (a) Tasa fotosintética neta (P_n). (b) Tasa transpiratoria (E). (c) Eficiencia instantánea en el uso del agua (EUA), calculada como el cociente entre P_n y E . Todos los parámetros fueron medidos con LI6400, en la hoja más joven totalmente expandida del tallo principal de cada individuo, a intensidad de luz saturante, 1200 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las mediciones se realizaron en tres tiempos a lo largo del experimento: 45 DPT (antes de la suspensión del riego), 52 DPT (luego de 7 días sin riego) y 69 DPT (en el periodo de recuperación, 14 días luego de reiniciado el riego normal). Todas las barras representan la media junto con su error estándar, $n = 8$. Las letras minúsculas indican la interacción entre los factores "régimen de riego" (antes de la sequía, durante la sequía o recuperación) e "inoculación" (sin inocular, N33 o M25). Las distintas letras representan diferencias estadísticamente significativas en un ANOVA de dos factores (P -valor $< 0,05$).

3.3 - Coinoculación y sequía rápida en cámara de cultivo

Ante los diferentes comportamientos causados por las inoculaciones individuales de las dos cepas seleccionadas, se evaluó la posibilidad de interacciones entre M25 y N33 en un experimento de coinoculación de ambas cepas simultáneamente en la matriz del SAPH. Al ser inoculadas en conjunto, el resultado sobre el desarrollo vegetal puede verse afectado de diversas maneras, entre ellas, existe la posibilidad de un efecto sinérgico, antagónico o compensatorio en la acción benéfica de las bacterias sobre los eucaliptos.

Este experimento se realizó como una variación del ensayo descrito anteriormente de sequía rápida en cámara de cultivo. Nuevamente, plantines de *E. grandis* de dos meses de edad fueron inoculados al momento del trasplante a macetas de 0,5 litros, a través de 150 ml de SAPH hidratado con suspensión bacteriana conteniendo UFCs en partes iguales de M25 y N33, alcanzando la misma concentración celular total que la utilizada para los ensayos de inoculación individual. Esto significa que la concentración de cada cepa corresponde a la mitad de la ensayada en los experimentos anteriores pero se mantuvo la carga total bacteriana inoculada en el entorno radical de los eucaliptos. La suspensión del riego se impuso a la mitad de las plantas a los 50 DPT, cuando los individuos presentaban un tamaño similar a los del anterior ensayo en cámara de cultivo al momento de iniciar la sequía. El sustrato alcanzó su contenido mínimo de agua a los diez días sin recibir riego ([Anexo 4](#)), momento en el cual se reanudó el suministro de agua para dar lugar a un período de recuperación de 14 días (Figura [R3.8](#) a). La duración total del ensayo fue de 74 días.

En este experimento el CRA foliar fue 3% más alto en los plantines coinoculados que en los controles sin inocular, incluso antes de iniciar el estrés hídrico. Luego de 10 días de que se detuviera el riego, los valores de CRA habían caído significativamente respecto a los valores iniciales pero la diferencia resultó más marcada en las plantas control, las cuales sufrieron una disminución del 22% frente al 12% que mostraron los plantines coinoculados. El CRA foliar se recuperó con la reanudación del riego alcanzando valores similares a los observados previo al período de sequía y manteniendo las diferencias entre eucaliptos coinoculados y sin inocular (Figura [R3.8](#) b).

El estrés hídrico afectó sustancialmente la formación de nuevas hojas y produjo una notoria defoliación de todos los individuos estresados. A pesar de esto, no se

registraron diferencias en el área foliar final entre las plantas que recibieron las bacterias y las no inoculadas, ni en aquellas que se mantuvieron en condiciones de riego normal ni en las recuperadas del estrés (Figura [R3.8](#) c). Si bien se trata de un ensayo metodológicamente más parecido al de inoculaciones individuales en cámara de cultivo, este comportamiento en cuanto al área foliar se asemeja al observado en el experimento en invernadero. Comparativamente, la reducción del área foliar en los plantines estresados fue de un 20% y un 27% en los ensayos de invernadero y coinoculación, mientras que en el ensayo de inoculaciones individuales en cámara de cultivo se observó una disminución promedio del 47% para este parámetro.

El efecto de la sequía también se hizo evidente en el desarrollo general de las plantas disminuyendo fuertemente el índice de crecimiento de los plantines estresados en un 50% respecto a los que no sufrieron la falta de agua. Sin embargo, la coinoculación con M25 y N33 promovió considerablemente el crecimiento, independientemente del régimen de riego. Comparado con las plantas sin inocular, los eucaliptos coinoculados mostraron valores 27 y 37% más altos en el índice de crecimiento en condiciones de riego normal y luego de la recuperación del estrés hídrico, respectivamente (Figura [R3.8](#) d).

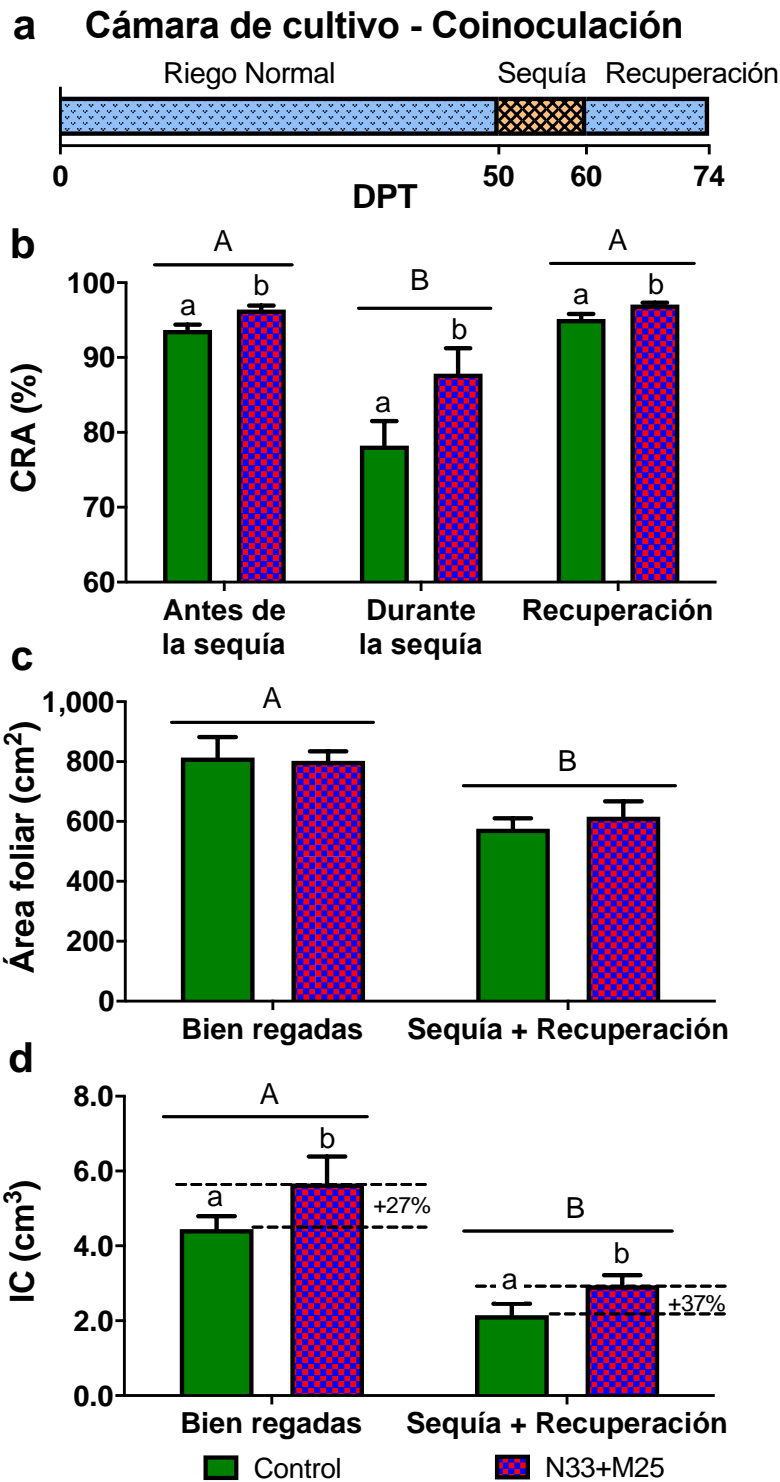


Figura R3.8: Efecto de la coinoculación con M25 y N33 en plantines de *E. grandis* sometidos a estrés por sequía rápida en cámara de cultivo. (a) Régimen de riego para el experimento de déficit hídrico. En las etapas de riego normal y recuperación las plantas fueron regadas a capacidad de campo; durante el período de sequía, se suspendió el suministro de agua por 10 días (DPT, días post-trasplante). (b) Contenido relativo de agua (CRA) de hojas individuales antes y durante el período de sequía y 14 días luego de reiniciado el riego en la etapa de recuperación (50, 60 y 74 DPT, respectivamente). (c) y (d) Parámetros de crecimiento registrados a tiempo final, para las plantas bien regadas y las que atravesaron un período de sequía con posterior recuperación. (c) Área foliar total. (d) Índice de crecimiento (IC) calculado como la diferencia entre el volumen final (producto entre el diámetro de la base al cuadrado y la altura máxima del tallo principal) y el inicial para cada eucalipto. Las líneas punteadas indican el incremento en la media del IC entre las plantas inoculadas y los controles sin inocular para cada régimen de riego. Los gráficos muestran la media de cada tratamiento junto con su error estándar, n = 10. Las distintas letras indican diferencias significativas en un ANOVA de dos factores (P-valor < 0,05). Las letras mayúsculas refieren al factor "régimen de riego" (bien regadas o sequía + recuperación). Las letras minúsculas refieren al factor "inoculación" (sin inocular o N33 + M25). La interacción entre los factores "régimen de riego" e "inoculación" fue no significativa en todos los casos.

Como en los experimentos previos, los eucaliptos fueron monitoreados regularmente a nivel estomático para evaluar su capacidad de manejo del agua e intercambio gaseoso, antes, durante y después de la suspensión del riego. Las mediciones de estado estacionario mostraron un rápido descenso de la conductancia estomática en las plantas estresadas. Antes de completados los 10 días de duración de la sequía (entre los 50 y 60 DPT), todos los individuos presentaron una caída desde 100 a 10% en sus valores de g_s relativos a sus propios controles bien regados. La velocidad de este suceso refleja la naturaleza rápida del estrés hídrico impuesto. A pesar del corto período de sequía ensayado se observa que la caída de g_s de las plantas coinoculadas presenta una pendiente inicial descendente más pronunciada que las plantas control, alcanzando valores menores de la variable en los primeros días desde la suspensión del riego. Similar a lo registrado en los ensayos previos, los plantines que recibieron las bacterias mostraron una capacidad de reacción más temprana frente al estímulo de sequía, cerrando sus estomas con anticipación, lo cual resulta una estrategia apropiada para la conservación del agua interna, permitiendo mantener un mayor contenido de agua en los tejidos. Con la reanudación del riego en la fase de recuperación, todas las plantas regresaron a valores normales de g_s , equivalentes a sus contrapartes mantenidas con riego constante, y similares a los registrados antes del inicio de la sequía (Figura R3.9).

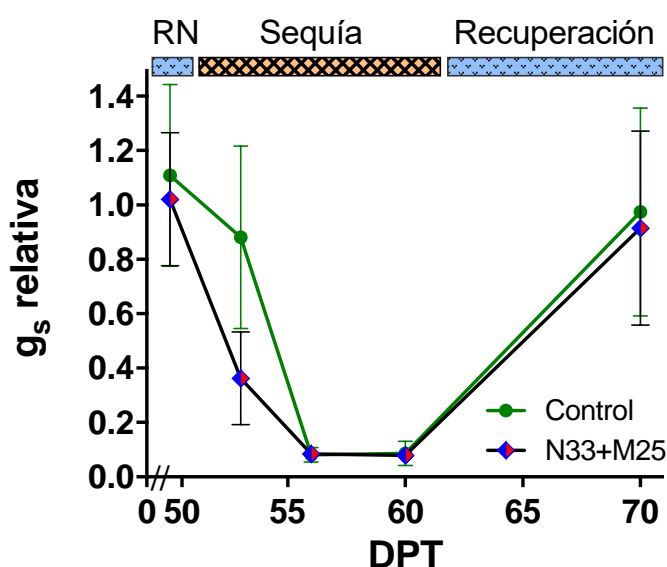


Figura R3.9: Conductancia estomática (g_s) de plantines de *E. grandis* coinoculados con M25 y N33, sometidos a estrés por sequía rápida en cámara de cultivo. Las mediciones fueron realizadas utilizando un porómetro de estado estacionario sobre hojas individuales. El gráfico muestra el tiempo entre la última medición antes del inicio del estrés hídrico y el final del experimento. El esquema de riego se muestra en la parte superior del gráfico (RN = Riego normal). El eje x señala los días-post trasplante (DPT), mientras el eje y muestra los valores de g_s promedio para las plantas estresadas y recuperadas, relativos a su control bien regado respectivo. Las barras de error representan el error estándar propagado; cuando no son visibles, su tamaño es menor al de los símbolos. El asterisco indica diferencias significativas entre las plantas control e inoculadas, para ese DPT, en un ANOVA de un factor (P -valor < 0,05).

Las mediciones de los parámetros de intercambio gaseoso (fotosíntesis neta, tasa transpiratoria y eficiencia instantánea en el uso del agua) se realizaron a los 50, 57 y 74 DPT, correspondientes al momento previo a iniciar la sequía, a los 7 días desde la suspensión del riego y luego de 14 días de recuperación, respectivamente (Esquema de riego en figura [R3.8](#)). Siguiendo los protocolos utilizados en los anteriores ensayos, las mediciones se realizaron en la hoja más joven totalmente expandida del tallo principal y a intensidad de luz saturante. Los resultados mostraron una estimulación positiva de P_n en los plantines de *E. grandis* coinoculados, los cuales alcanzaron valores más altos que los plantines sin inocular, independientemente del estrés hídrico y del momento de medición. Por otro lado, no se observó un cambio significativo en E o en EUA por efecto del agregado de las bacterias, pero sí a causa del régimen de riego. La falta de agua provocó una disminución tanto en P_n como en E, mientras que EUA aumentó durante el período de sequía, indicando que la tasa transpiratoria resultó afectada en mayor medida que la capacidad fotosintética. Luego de 14 días de recuperación bajo riego normal, las plantas que habían sido estresadas volvieron a presentar valores de E en el rango de los registrados antes de iniciar la sequía, pero con una actividad fotosintética superior. Como consecuencia, tanto las plantas inoculadas como sin inocular mantuvieron elevada su EUA en la fase de recuperación, con valores por encima de los registrados antes de iniciar la sequía (Figura [R3.10](#)).

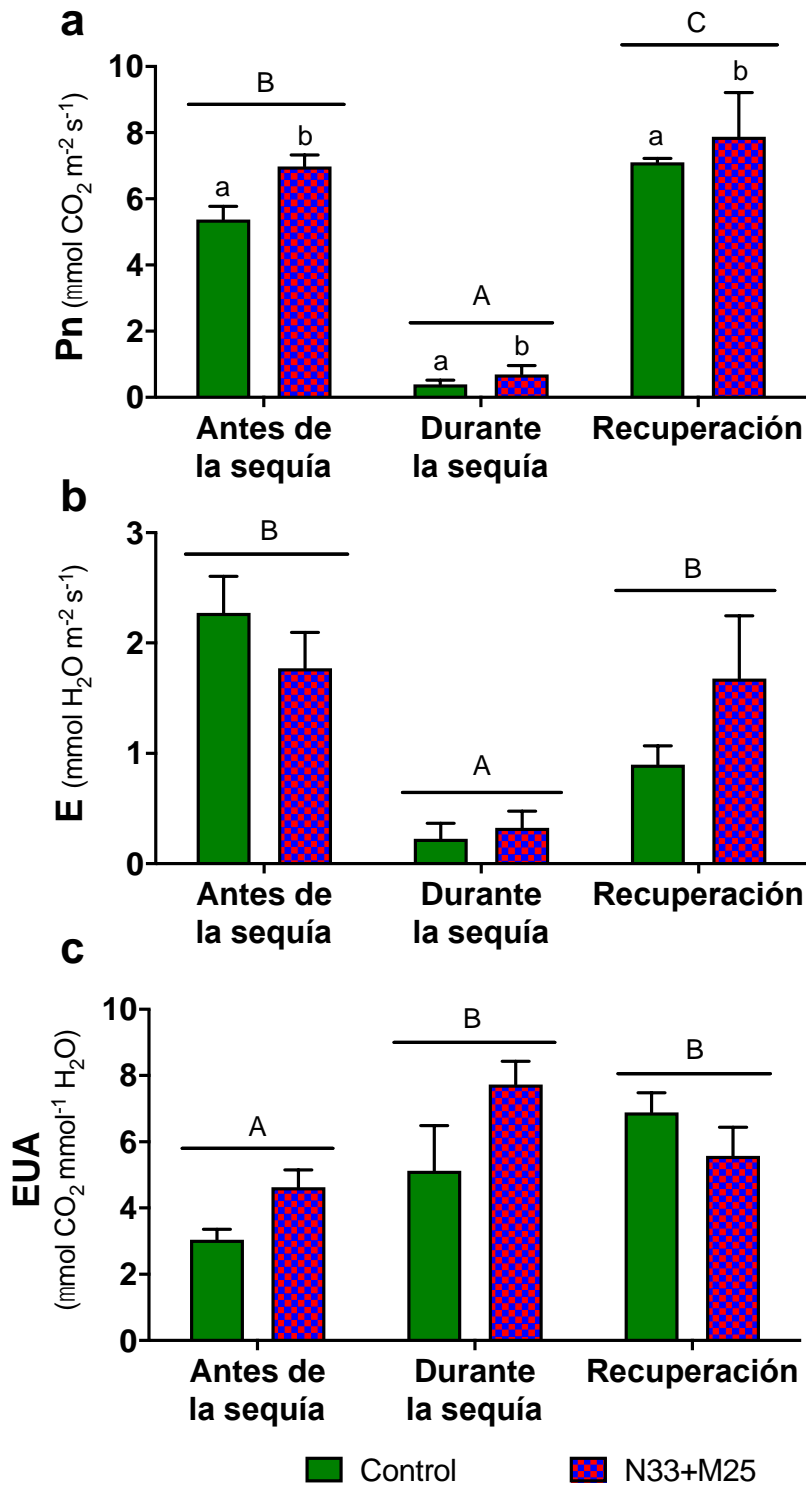


Figura R3.10: Evaluación de parámetros del intercambio gaseoso en plantines de *E. grandis* coinoculados con M25 y N33 y sometidos a estrés por sequía rápida. (a) Tasa fotosintética neta (P_n). (b) Tasa transpiratoria (E). (c) Eficiencia instantánea en el uso del agua (EUA), calculada como el cociente entre P_n y E . Todos los parámetros fueron medidos con LI6400, en la hoja más joven totalmente expandida del tallo principal de cada individuo, a intensidad de luz saturante, $1200 \mu\text{mol de fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las mediciones se realizaron en tres tiempos a lo largo del experimento: 50 DPT (antes de la suspensión del riego), 57 DPT (luego de 7 días sin riego) y 74 DPT (en el período de recuperación, 14 días luego de reiniciado el riego normal). Todas las barras representan la media junto con su error estándar, $n = 10$. Las distintas letras indican diferencias significativas en un ANOVA de dos factores (P -valor $< 0,05$). Las letras mayúsculas refieren al factor “régimen de riego” (bien regadas o sequía + recuperación). Las letras minúsculas refieren al factor “inoculación” (sin inocular o N33 + M25). La interacción entre los factores “régimen de riego” e “inoculación” fue no significativa en todos los casos.

3.4 - Patrones en análisis multivariados

Los estudios que involucran el seguimiento de individuos de una especie vegetal en un cultivo o en su entorno natural, frecuentemente incluyen la medición de múltiples “variables respuesta” que caracterizan aspectos relacionados a su desarrollo y fisiología. Cuando esas variables son registradas para una misma unidad de estudio entonces se pueden establecer vínculos entre los parámetros según como se manifieste el conjunto de dichas variables. En estudios de tipo ecológico, además de las variables respuesta, se añade una enorme diversidad de variables ambientales no controladas por el observador, que afectan la capacidad explicativa del sistema. Los análisis multivariados constituyen una estrategia para el tratamiento de todos esos datos de forma integral, permitiendo identificar patrones de relación entre variables medidas en unidades de estudio equivalentes. A continuación se describen los resultados de la aplicación de métodos de correlación bivariada y análisis de componentes principales sobre los datos registrados para los eucaliptos a partir de los ensayos de sequía gradual y rápida, en cámara de cultivo e invernadero.

3.4.1 - Asociación entre variables - Correlaciones bivariadas

Como primera aproximación al estudio multivariado, se analizó la relación entre pares de variables respuesta, para establecer su nivel de asociación y ajuste a un comportamiento linealmente proporcional. La figura [R3.11](#) muestra la matriz de correlación de Pearson y los diagramas de dispersión de datos para cada combinación de variables, las cuales se clasifican en dos categorías según el tipo de medición realizada. Las variables relacionadas a la biomasa de los eucaliptos incluyen el índice de crecimiento, el área foliar total y específica, el peso seco particionado entre raíz, tallo y hojas y el coeficiente Raíz/Vástago. Las variables de tipo fisiológicas, CRA e índice de verdor, se relacionan a aspectos de manejo del agua y capacidad fotosintética de los individuos. Todas estas variables fueron registradas en todos los eucaliptos a tiempo final en cada ensayo, luego de haber transcurrido el período de recuperación para las plantas estresadas. Debido a que son ensayos de larga duración, donde múltiples factores imponderables pudieron afectar el resultado final observado, se considera un buen nivel de ajuste cuando el índice de correlación de Pearson es significativo (indicado mediante asteriscos) y con módulo superior a 0,7 (subrayado en rojo). La diagonal de la figura muestra el patrón de distribución de datos para una variable determinada.

En las variables relacionadas a la biomasa, la distribución de frecuencia de valores muestra una forma de doble pico, con el máximo más alto desplazado hacia valores más pequeños de la variable, debido a que la mayor parte de los puntos corresponde al conjunto de individuos entre los ensayos de inoculación individual y coinoculación en cámara de cultivo, que produjo plantas más pequeñas. Debajo del área del segundo pico se distribuyen los datos correspondientes al ensayo en invernadero, que no solo son menos en cantidad sino que a la vez ocupan un mayor rango de distribución en valores más altos, reflejando que las distintas condiciones de cultivo afectaron fuertemente sobre la producción de biomasa y la heterogeneidad de los plantines de eucalipto, como se mostró previamente en las figuras [R3.5](#) y [R3.6](#).

El área foliar específica, que resulta de la división entre área foliar total y peso seco de las hojas, no respeta ese mismo patrón. Su distribución de datos muestra una única campana más centralizada, debajo de la cual se distribuyen los valores de los individuos de la cámara de cultivo y del invernadero sin una distinción evidente. Observando los índices de correlación de esa variable con las demás, no se registran buenos ajustes lineales, que presentan índices de Pearson con módulo inferior a 0,26 en todos los casos, lo cual indica que se mantuvo constante entre ambas condiciones de cultivo, a pesar de que el volumen del tallo, peso seco de raíz, tallo y hojas y área foliar total de las individuos fuera muy diferente (Figuras [R3.1](#), [R3.4](#), [R3.5](#), [R3.6](#) y [R3.8](#)).

Dentro de las variables fisiológicas, la distribución de datos del CRA muestra un máximo desplazado hacia la derecha, es decir hacia valores mayores de CRA. Los datos utilizados para realizar estas correlaciones son los de CRA a tiempo final, correspondientes al mismo momento en que se registraron los valores de las demás variables. Esto incluye valores de eucaliptos que fueron mantenidos bajo un régimen de riego normal durante todo el tiempo de los ensayos, junto con valores de individuos que fueron sometidos a sequía con posterior recuperación. La distribución observada puede deberse a que, al computar el CRA, los plantines bien regados poseían un contenido de agua elevado por no haber sufrido estrés hídrico sumado a que gran parte de los eucaliptos que atravesaron el período de sequía ya se encontraban recuperados, haciendo que la mayor parte de los datos se encontraran en valores superiores al 92% de CRA. Por otro lado, otra parte de los individuos estresados no recuperó el CRA que poseían inicialmente previo al estrés. Esto se manifiesta en los datos con valores inferiores a 92%, hacia la izquierda del pico máximo, principalmente representados por el grupo de eucaliptos sin inocular, sometidos a sequía y recuperación, del ensayo en cámara de cultivo cuyo CRA fue cercano al 85% en promedio (Figura [R3.4](#)). Esta

información es compatible con los análisis de CRA presentados para cada ensayo por separado, donde el grupo de eucaliptos sin inocular mostró los menores valores de esta variable en el período de recuperación mientras los inoculados concentraron los valores más altos (Figuras [R3.1](#), [R3.4](#) y [R3.8](#)), similares a los de los individuos bien regados.

El índice de verdor presentó una distribución de datos formada por dos máximos muy cercanos entre sí, mostrando una ligera diferencia entre los valores obtenidos en cámara de cultivo y los registrados en el invernadero. La media con su desvío estándar fue de $38,7 \pm 4,1$ unidades SPAD para los datos de la cámara de cultivo y de $34,9 \pm 3,6$ unidades SPAD para el invernadero, mostrando diferencias significativas en una prueba t de Student (P-valor < 0,05). Estas diferencias probablemente reflejen la aclimatación de las plantas a la diferente intensidad lumínica de cada ambiente, relacionado con un mayor contenido de clorofila en los eucaliptos cultivados en la cámara. Se debe considerar que incluso los eucaliptos que fueron estresados tuvieron valores de verdor normales, posiblemente debido al método de registro de esta variable, donde se seleccionaron hojas equivalentes entre los individuos pero siempre vivas y maduras. De esta forma, la variable no incluye el proceso dinámico de senescencia como podría haberse visto si la medición se hubiese realizado siguiendo desde el inicio una misma hoja para cada planta. A la vez, ignora las hojas jóvenes, marchitas o caídas que no fueron elegidas para medir.

Si bien las dos variables fisiológicas mostraron una correlación significativa con algunas de las variables de biomasa (IC, AFT, PS Raíz, PS Tallo y PS Hojas), ninguna combinación presentó un índice de Pearson de módulo mayor a 0,7, dando a entender que la correlación entre estas variables podría existir pero con un alto nivel de dispersión. Por el contrario, las variables asociadas a la biomasa mostraron una fuerte asociación entre sí y con un buen ajuste a un comportamiento lineal. El índice de crecimiento se asoció positivamente con el área foliar total y con el peso seco de raíz, tallo y hojas. El mejor ajuste se observó para la relación entre el índice de crecimiento y el peso seco del tallo, con un índice de correlación de Pearson de 0,967. Esto es importante porque indica que la aproximación utilizada para el seguimiento de los plantines en el tiempo, tiene su correlato en una variable de interés comercial. En efecto, la medición de altura y diámetro del tallo principal de los plantines, refleja de manera ajustada un peso seco de tallo linealmente proporcional, constituyendo una herramienta potente para la predicción de productividad futura mediante una técnica no destructiva. De la misma forma, el área foliar final se relacionó fuertemente y de forma positiva con los pesos secos de los distintos órganos de la planta, lo cual muestra el impacto directo

que tiene la disponibilidad de mayor cantidad de tejido fotosintético sobre la producción de biomasa general en el desarrollo de las plantas.

Los pesos secos de cada sección de la planta también se relacionaron positivamente entre sí y con buenos niveles de ajuste lineal, indicando que a mayor cantidad de uno, se espera proporcionalmente mayor cantidad del otro, para las combinaciones de raíz tallo y hojas. Debido a esto, el coeficiente Raíz/Vástago que resulta de la división entre el peso seco de las raíces y la suma de tallo más hojas, se mantuvo relativamente constante. Las variaciones en el coeficiente Raíz/Vástago pueden ser interpretadas como cambios en la asignación de recursos para el desarrollo diferencial del sistema radical (si el coeficiente aumenta) o de la parte aérea (si el coeficiente disminuye). En este estudio en particular, se deduce que no hubo un cambio substancial en la reasignación de recursos a pesar de las diferentes condiciones de cultivo, la inoculación con bacterias o el estrés hídrico impuesto a la mitad de los plantines.

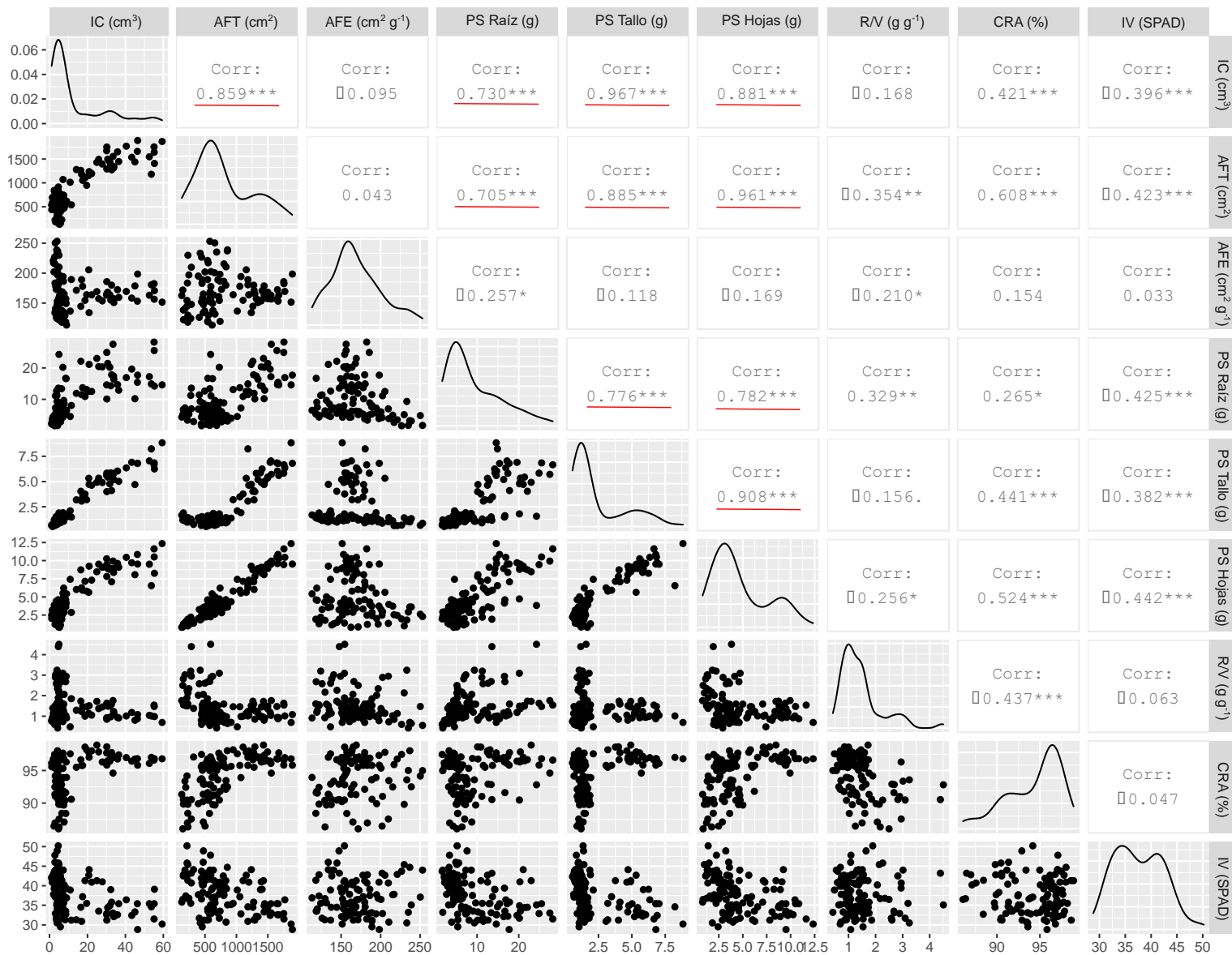


Figura R3.11: Estudio de la relación entre variables mediante correlaciones bivariadas. La figura muestra la matriz de correlación de Pearson y diagramas de dispersión de datos para pares de variables medidas a tiempo final en plantines de *E. grandis*. Los puntos corresponden a los datos en conjunto de los ensayos de estrés hídrico realizados en cámara de cultivo y en invernadero. En la diagonal se grafica la frecuencia de los valores de cada variable. Se subrayan en rojo los índices de correlación de Pearson con módulo superior a 0,7. Los asteriscos señalan el nivel de significancia del índice de correlación. Las variables incluidas en el análisis fueron el índice de crecimiento (IC), el área foliar total (AFT), el área foliar específica (AFE), los pesos secos de raíz (PS Raíz), tallo (PS Tallo) y hojas (PS Hojas), el coeficiente raíz/vástago (R/V), el contenido relativo de agua (CRA) y el índice de verdor (IV).

Por otro lado, se utilizó el mismo método de correlación bivariada para analizar la relación entre la cantidad total de agua evapotranspirada en las macetas en las que se suspendió el riego y el tamaño del eucalipto que alojaban. En este caso, las mediciones no corresponden al tiempo final de cada ensayo sino al momento de finalización de la sequía, donde la deshidratación del sustrato (estimada como caída del peso) fue máxima. El parámetro más apropiado para relacionar el consumo de agua con la transpiración de la planta hubiese sido el área foliar, pero debido a que las estimaciones precisas de esa variable involucran la destrucción de la planta, se decidió utilizar el índice de crecimiento, cuya medición se realizó con regularidad a lo largo de los ensayos. Esta decisión se apoya en la información presentada en la figura [R3.11](#), que muestra una correlación positiva y estrecha entre ambas variables (índice de Pearson = 0,859).

Cuando se analizan los datos de los ensayos en cámara de cultivo y en invernadero en conjunto, se obtiene una fuerte correlación positiva entre la evapotranspiración y el tamaño de la planta, lo que parecería indicar que a mayor tamaño de planta, mayor fue la deshidratación del sustrato (Figura [R3.12 a](#)). Sin embargo, atendiendo a la distribución de los datos, se observa una notoria distribución bimodal de la caída del peso de las unidades experimentales de acuerdo a la capacidad volumétrica de las macetas. El volumen total de agua evapotranspirada en el ensayo en invernadero fue 10 veces mayor (alrededor de 2,5 L) que el registrado para las macetas en la cámara de cultivo (cercano a 0,25 L), lo cual agrupa los valores en dos polos según la condición de cultivo (Figura [R3.12 a](#)). Como consecuencia, la correlación de Pearson resulta elevada debido a que ambos polos de datos actúan como dos únicos puntos a partir de los cuales se ajusta una recta con mucha precisión, generando una falsa proporcionalidad lineal. Para evitar este efecto, se realizaron las correlaciones con los datos separados por condición de cultivo. De esta forma se observó una mayor correlación de Pearson en los ensayos realizados en cámara comparados con el de invernadero, a pesar de que los primeros cuentan con plantas de menor tamaño (Figura [R3.12 b y c](#)). Esto puede ser atribuido a que el ensayo en invernadero se realizó usando macetas de 10 L (20 veces mayor capacidad que las utilizadas en la cámara de cultivo), por lo tanto, la proporción de biomasa vegetal en relación al volumen de sustrato es mucho menor en el ensayo en invernadero que en los de cámara. Las diferencias en el volumen de la maceta, sumado a las condiciones ambientales más controladas, resultan en una mayor influencia de los eucaliptos en el consumo de agua de la maceta, cuando estos ocupan proporcionalmente mayor cantidad del espacio disponible. Esto muestra

que efectivamente el tipo de sequía aplicado en cada ensayo impactó de forma diferente en los plantines de eucalipto, generando condiciones de estrés hídrico distintas.

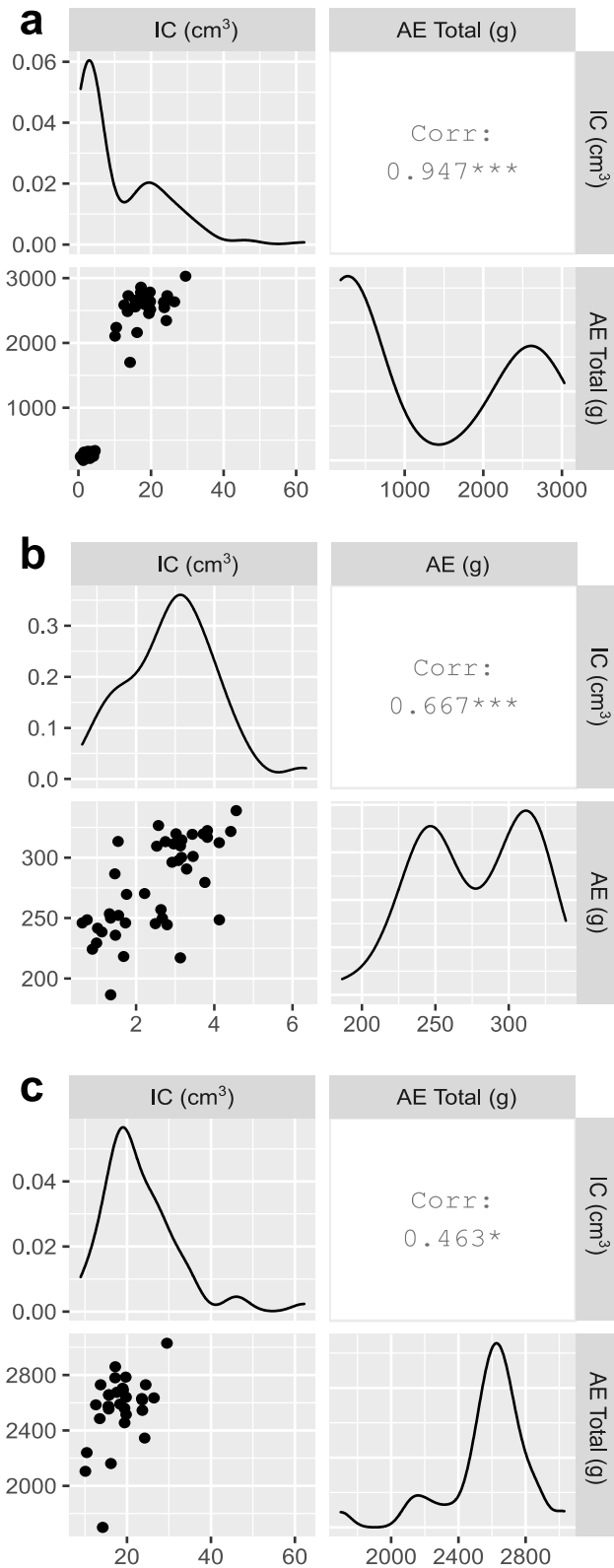


Figura R3.12: Análisis de la relación entre el consumo de agua y el tamaño de los plantines de *E. grandis*. Los gráficos muestran la distribución de datos y correlación de Pearson entre el índice de crecimiento (IC) y la cantidad total de agua evapotranspirada (AE total), registrada como caída del peso de las macetas durante el período sin riego en los ensayos de estrés hídrico. (a) Correlación utilizando los datos de los tres ensayos de estrés hídrico en *E. grandis* en conjunto. (b) Correlación de los datos de *E. grandis* en los ensayos de cámara de cultivo de inoculación individual y coinoculación. (c) Correlación utilizando los datos de los plantines de *E. grandis* en el ensayo en invernadero.

3.4.2 - Análisis de componentes principales

Habiendo encontrado correlaciones significativas entre las variables medidas, un análisis de componentes principales (ACP) permite ordenarlas según la proporción de variación que explican en conjunto, a la vez que resume información construyendo nuevas variables, llamadas “componentes principales”, obtenidas mediante combinaciones lineales independientes de este grupo de variables respuesta. Se construyen tantos componentes como variables originales del análisis, haciendo uso de las correlaciones de Pearson para establecer vínculos ordenados entre los términos de esas combinaciones lineales. Si no existiera correlación entre las variables, entonces cada componente sería equivalente a una variable individual y su nivel explicativo no sería mejor que el que resulta de un análisis univariado, como los ANOVA tradicionales. Este método también es sensible a la colinealidad y la redundancia de información, debido a que hace uso de las relaciones entre variables para la ponderación del peso de cada una. Si dos variables están estrechamente ligadas, entonces podría sobrevalorarse su peso por considerarse doblemente importante cuando en realidad se trata de información repetida (Palacios *et al.*, 2020). Siguiendo estos criterios, el ACP se realizó sin incluir el área foliar específica, que resulta de la división entre área foliar total y peso seco de las hojas, ni tampoco el coeficiente Raíz/Vástago, que se calcula a partir de los datos de peso seco de raíz y la suma de tallo más hojas.

Cuando un componente principal logra integrar gran parte de la variación entre las unidades de estudio, ese componente es considerado relevante y su valor explicativo aumenta. Dicho valor explicativo se caracteriza mediante el cálculo de un “autovalor” para cada componente. Si el autovalor de un componente principal es mayor a 1, se considera que dicho componente tiene mayor poder explicativo de la variación entre individuos que una única variable observada de manera aislada. De esta forma, se utiliza ese valor mínimo de “1” para la selección de componentes que resuman información, agrupando variables en las combinaciones lineales que mejor expliquen la variabilidad del sistema. Este es el criterio de Kaiser-Guttman (Palacios *et al.*, 2020).

Según este criterio, para describir los ensayos de *E. grandis*, agrupando las unidades de estudio según la combinación de tratamientos (condición de cultivo, inoculación y régimen hídrico) es suficiente con tomar los dos primeros componentes (inserto en figura [R3.13](#)) que en conjunto explican el 93,7% de la variabilidad total del sistema. El primer componente principal (CP1) es la combinación lineal de las variables seleccionadas que mejor explica la variación registrada entre las unidades de estudio, y

en este caso resume un 80,8% de la variabilidad total del sistema. El segundo componente principal (CP2) logra explicar 12,9% de la variabilidad total. El resto de la variabilidad del sistema (6,3% de variabilidad residual) se distribuye entre los demás componentes, que poseen un autovalor inferior a 1, indicando su bajo poder explicativo. La figura [R3.13](#), donde el eje de las abscisas corresponde al CP1 y el eje de las ordenadas al CP2, muestra la asociación de las variables originales a cada uno de los componentes, esquematizada en forma de vectores. La longitud de cada vector indica el peso de esa variable en cada componente, según el ángulo en el que se disponga. El peso o importancia de cada variable está dado por el nivel de variación que presenta dicha variable en las unidades de estudio. Cuanto más difieran los valores entre individuos para una variable, mayor longitud tendrá su vector debido a que gran parte de las diferencias entre unidades de estudio estará explicada por ella. Cuando un vector está direccionado de forma paralela a uno de los ejes, indica que tiene una fuerte importancia en el componente principal que representa ese eje. Por otro lado, cuando dos vectores se disponen en la misma dirección, la longitud comparativa entre ambos indica cuál tiene mayor peso, indicando qué variable es preponderante en ese componente.

La figura [R3.13](#) muestra que las variables relacionadas a la biomasa se encuentran estrechamente ligadas al CP1, sobre todo el índice de crecimiento y el peso seco de tallo y hojas, ya que sus vectores se orientan siguiendo el eje x, pero todas ellas con una magnitud similar, ya que presentan longitudes similares. Por otro lado, las variables fisiológicas son las que están ligadas con mayor afinidad al CP2. En base a esto, se puede simplificar el sistema considerando que cuando las variaciones entre las unidades de estudio se observan como distanciamientos en el eje x, entonces las diferencias entre grupos están basadas en cambios en la producción de biomasa y el crecimiento de los plantines, mientras que los distanciamientos en el eje y representan cambios relacionados al manejo del agua y la capacidad fotosintética, evaluados como CRA e índice de verdor.

Los puntos de la figura [R3.13](#) representan los centroides multivariados de cada grupo, que son medias estandarizadas considerando los valores de cada individuo del grupo para todas las variables medidas. Los grupos se dividen por la combinación entre los factores “inoculación” (con M25, N33, N25+N33 o controles sin inocular), “régimen hídrico” (riego constante o sequía+recuperación) y “experimento” (invernadero, cámara de cultivo o ensayo de coinoculación, señalados con colores verde, naranja y azul, respectivamente). Se observa una notoria separación en el eje x entre los grupos de

eucaliptos cultivados en cámara de cultivo y los del invernadero, estos últimos desplazados hacia valores más altos del CP1, lo cual se relaciona a la mayor producción de biomasa observada en el invernadero, donde las condiciones de crecimiento resultaron menos limitantes que en la cámara de cultivo. Incluso internamente, los grupos inoculados en el ensayo en invernadero se posicionan hacia la derecha de los controles sin inocular, tanto en los grupos constantemente regados como en los que atravesaron un período de sequía con posterior recuperación. En los dos ensayos en cámara de cultivo se observa la separación en el eje x de los eucaliptos bien regados de los que fueron estresados, sin embargo, la distancia en el CP1 dentro de cada régimen de riego es mucho menor, comparado con lo observado para el invernadero. El aporte explicativo del CP2 se hace más evidente en los grupos a los cuales se les suspendió el riego, especialmente en los ensayos en cámara, donde las restricciones al crecimiento fueron más estrictas y la correlación entre el tamaño de las plantas y la evapotranspiración resultó más estrecha. Bajo esas circunstancias, se observa una ventaja substancial de los eucaliptos inoculados frente a los controles sin inocular, mostrando valores más elevados en el CP2, relacionado a un mejor manejo del estado hídrico interno de los plantines y su capacidad fotosintética. Este patrón de distribución de grupos resume de forma global lo descrito de forma individual para cada variable en cada ensayo y es compatible con la información presentada en las figuras [R3.4](#), [R3.7](#), [R3.8](#) y [R3.10](#) que muestran el efecto benéfico de las bacterias en el CRA y la tasa fotosintética de los eucaliptos luego de un período de recuperación.

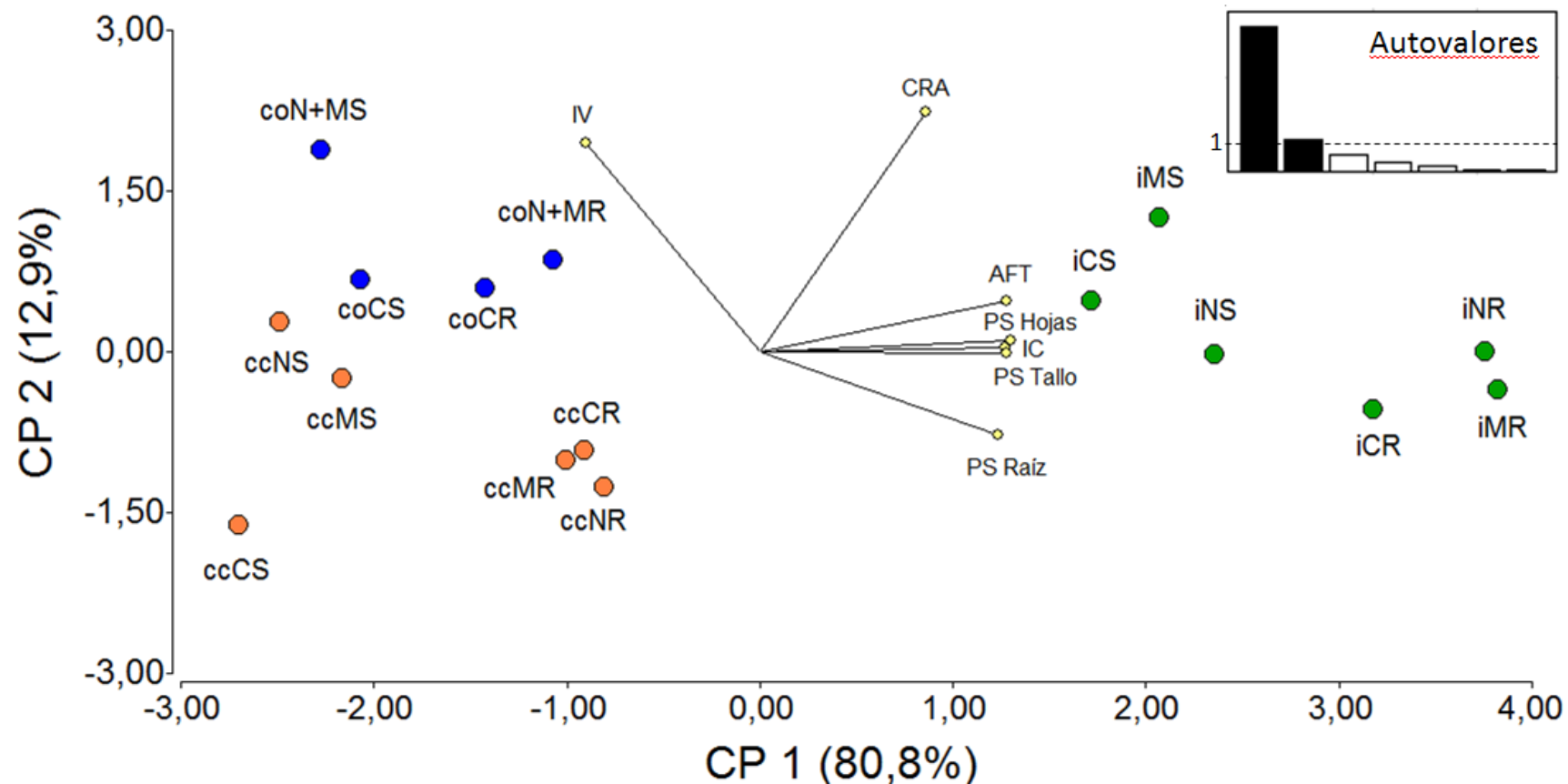


Figura R3.13: Gráfico *biplot* de los primeros dos componentes, CP1 y CP2, obtenidos en el análisis de componentes principales. Los números entre paréntesis indican el porcentaje de variabilidad explicada por cada componente. Las líneas que surgen desde el origen de coordenadas representan los vectores de asociación de las variables originales a los componentes. Las variables incluidas en el análisis fueron el índice de verdor (IV), el contenido relativo de agua (CRA), el área foliar total (AFT), el índice de crecimiento (IC) y el peso seco de raíz (PS Raíz), tallo (PS Tallo) y hojas (PS Hojas). Los puntos representan los centroides de los grupos formados con la combinación de los niveles de tres factores: “experimento”, “inoculación” y “régimen hídrico”. Las letras en minúscula representan los niveles del factor “experimento”, invernadero (i), cámara de cultivo de inoculación individual (cc) o ensayo de coinoculación (co), señalados con colores verde, naranja y azul, respectivamente. La primera letra mayúscula representa el tipo de inoculación, N para N33, M para M25, N+M para la coinoculación y C para los controles sin inocular. La última letra mayúscula representa el régimen hídrico aplicado, R para los plantines bien regados, S para los que fueron estresados y posteriormente recuperados. El gráfico inserto en la esquina superior derecha muestra los autovalores de los siete componentes, señalando en negro los que superaron el valor de 1, marcado con la línea de puntos.



Discusión

1 - Pruebas de germinación y ensayos exploratorios

En los programas de mejoramiento de especies forestales o en la búsqueda de mejores prácticas silvícolas que lleven a mayores valores de rendimiento, generalmente se realizan seguimientos para determinar si la decisión de mejora adoptada es productivamente deseable. Estos monitoreos suelen realizarse una vez implantados los árboles en el campo y usualmente solo se registran parámetros de crecimiento como altura y diámetro. A pesar de ser información directa sobre el valor de mejora de una práctica en particular, este sistema tiene como desventaja que los datos se recopilan en un tiempo muy largo y la información obtenida no resulta útil sino hasta la plantación del próximo rodal. Es por eso que con frecuencia se acude a la selección de características de interés en los plantines, en etapas tempranas previas a la implantación, que permitan optimizar la toma de decisiones en un tiempo razonablemente adecuado. Las pruebas en etapas germinativas o en plantines de menos de 3 meses permitirían preseleccionar eficientemente mediante experimentos sencillos, de corta duración y con un alto número de réplicas, mejorando la capacidad de tomar decisiones rápidas y preventivas, antes de que el individuo ya haya sido implantado en el campo y no sea posible cambiar la estrategia de manejo del rodal.

En particular, realizar pruebas de germinación en el género *Eucalyptus* no es metodológicamente difícil, considerando la numerosa cantidad de semillas que cada árbol competente es capaz de producir y que dichas semillas no tienen más restricción para la germinación que la imbibición con agua (Puente *et al.*, 2010). Por otro lado, múltiples publicaciones muestran cómo la aplicación de PGPB que promueven la germinación también genera efectos positivos en el desarrollo y la promoción del crecimiento cuando son inoculadas en plantas jóvenes (Bakhshandeh *et al.*, 2020), incluidas las especies del género *Eucalyptus* (Puente *et al.*, 2010), entre ellas *E. grandis* (Mafia *et al.*, 2009). Sumado a lo anterior, los ensayos de germinación permiten identificar y descartar cepas que tengan efectos perjudiciales antes de ser aplicadas en experimentos a mayor escala (Mafia *et al.*, 2009). De esta forma, la prospección de bacterias beneficiosas mediante experimentos rápidos de germinación permite acelerar los tiempos requeridos y aumentar el número total de cepas ensayadas, favoreciendo el desarrollo de nuevos inoculantes de interés comercial (Backer *et al.*, 2018). Luego de seleccionarlas por la promoción de la germinación, las cepas más promisorias de PGPB son aquellas que superan exitosamente las pruebas en plantas jóvenes bajo condiciones estresantes porque son las que pueden actuar en condiciones más similares a las que se exponen las plantaciones en el campo. Por eso se recomienda

evaluar los efectos de la inoculación no solo en condiciones óptimas de crecimiento del cultivo sino también bajo la influencia de factores de estrés (Backer *et al.*, 2018; Bakhshandeh *et al.*, 2020). Este tipo de protocolos exploratorios usando plantas jóvenes puede ser aplicado en eucaliptos, donde la necesidad de optimizar el uso del tiempo y el espacio se vuelven preponderantes para la investigación con especies forestales. Cuando el número de bacterias a probar es grande, hacer múltiples pruebas preliminares con bajo número de réplicas puede resultar útil como primera aproximación (Moreira & Araújo, 2013).

Las pruebas de germinación y la evaluación del vigor en plántulas de *E. grandis* inoculadas con PGPB presentadas en esta tesis permitieron reducir el número de cepas a probar en ensayos posteriores. Cerca del 20% de un total de 63 cepas ensayadas fueron catalogadas como perjudiciales en la interacción con *E. grandis* durante el proceso de germinación (Figura [R1.1](#)) y descartadas para futuros experimentos. El método utilizado es fácilmente reproducible y puede ser extendido a colecciones con mayor número de cepas iniciales. Esto se vuelve relevante en el contexto actual donde gracias a los avances en métodos de cultivo y secuenciación, la cantidad de colecciones y aislamientos (incluso de aquellas cepas que no son cultivables en medios estandarizados) ha crecido exponencialmente en las últimas décadas, haciendo más laboriosa y extensa la evaluación de cepas candidatas (Finkel *et al.*, 2017).

Con tres de las cepas señaladas como positivas (BT2, N32 y N33) y una señalada como neutral (M25), se realizaron pruebas de estrés hídrico y nutricional, siendo los factores que afectan en mayor medida a las plantaciones de *E. grandis* (Bonnin *et al.*, 2015; Graciano *et al.*, 2016; Tng *et al.*, 2014). En las pruebas de desarrollo temprano, la inoculación con cada una de las cuatro cepas mostró concordantemente la capacidad de favorecer el crecimiento y la tolerancia a los estreses aplicados, tanto en *E. grandis* como en *A. thaliana*, e incluso de mejorar la productividad de las plantas en ausencia de estrés (Figuras [R1.2](#), [R1.4](#), [R1.7](#), [R1.9](#), [R1.11](#) y [R1.12](#)). Fisiológicamente, la cepas M25 y N33 destacaron por modular el manejo del agua y la actividad fotosintética en pruebas nutricionales (Figuras [R1.3](#), [R1.6](#) y [R1.10](#)) y disminuir la mortalidad de arabisopsis en condiciones de sequía (Figura [R1.11](#)). A pesar de ser ensayos rápidos y con bajo número de réplicas, resultaron efectivos en la selección de dos cepas candidatas con potencial efecto frente a la falta de agua.

2 - Supervivencia y localización de bacterias

En los inicios del uso de PGPB, la recuperación del inóculo aplicado se limitaba a los 30 - 40 días desde su inoculación en el suelo o en la rizosfera, lo que llevaba a la necesidad de reinocular secuencialmente a lo largo de la temporada de cultivo para aumentar la efectividad de la aplicación de bacterias promotoras del crecimiento (Malusá & Vassilev, 2014). Actualmente, las formulaciones de bioinoculantes asocian a las PGPB con soportes (*carriers*) que favorecen su supervivencia. Un bioinoculante de buena calidad debe ser capaz de generar un contacto efectivo entre el microorganismo de interés y la planta hospedante, mientras ofrece protección al inóculo frente al ambiente y la competencia con la comunidad microbiana nativa. A la vez, la aplicación debe resultar simple para que pueda ser incorporada por los productores sin la necesidad de una capacitación especial y rentable económicamente para favorecer su establecimiento en el mercado (Herrmann & Lesueur, 2013).

Cuando la formulación final a aplicar es seca, el contenido de humedad aceptable debe ser menor al 55%, lo que impone un límite al desarrollo de microorganismos indeseados que puedan alterar la estructura del *carrier* o contaminar la formulación, pero asimismo restringen los tipos de inóculo y concentración que pueden soportar esa condición. Las formulaciones líquidas, por otro lado, pueden contener mucho mayor número de células del inóculo pero como desventaja suelen tener requisitos de almacenamiento especiales y tienden a perder viabilidad con mayor velocidad, debido a que el soporte utilizado ofrece menor protección (Herrmann & Lesueur, 2013). Entre los *carriers* en activo desarrollo, los polímeros orgánicos superabsorbentes que integran una fase sólida y otra líquida, comienzan a ser evaluados con mayor interés por lograr compensar satisfactoriamente esas debilidades. Ofrecen protección y una vida útil de las PGPB larga incluso a temperatura ambiente, sin grandes requerimientos de almacenamiento, a la vez que encapsulan o inmovilizan los microorganismos de interés en su matriz y los liberan gradualmente a través de un proceso de degradación (Malusá *et al.*, 2012). En condiciones óptimas de almacenamiento pueden mantener la viabilidad del inóculo por más de un año (Bashan *et al.*, 2016; Perez *et al.*, 2018).

Los hidrogeles son polímeros superabsorbentes que ya se utilizan actualmente en plantaciones forestales de eucaliptos, aunque únicamente con el objetivo de aliviar el estrés hídrico postrasplante (Crous, 2017; Viero & Little, 2006). Su implementación es económicamente favorable y no requiere grandes cambios en las prácticas de

manejo silvícola de los productores (Shi *et al.*, 2010; Zohuriaan-Mehr *et al.*, 2010). A la vez, la literatura muestra que para optimizar su efecto contra el estrés hídrico es más eficiente colocarlos prehidratados en el pocillo de plantación previo al trasplante, preferentemente sin mezclar con el sustrato para minimizar el contacto entre el hidrogel y el medio, evitando que los iones del suelo puedan afectar la matriz polimérica del hidrogel. Resulta poco recomendable la aplicación de gránulos secos mezclados con el sustrato para su posterior hidratación (Crous, 2017; Moslemi *et al.*, 2011). Esto ofrece la oportunidad de diseñar una formulación que integre los hidrogeles que ya se utilizan en cultivos con PGPB para su aplicación agronómica, como un bioinoculante semisólido que maximice el aprovechamiento del polímero (haciendo aún más rentable la inversión en ellos) y favorezca la supervivencia del inóculo de interés en un medio húmedo protegido.

Bajo estas perspectivas, el polímero superabsorbente acrílico-celulósico utilizado para el desarrollo de esta tesis (SAPH; Tubert *et al.*, 2018) ha demostrado ser un material que reúne las características deseadas para ser usado como vehículo en la inoculación de bacterias benéficas en la rizosfera de plantines de *E. grandis* en el período de trasplante. En condiciones de laboratorio, el SAPH mantuvo la viabilidad del inóculo en sustratos de diferente composición por al menos tres meses, un tiempo comparable al período crítico de implantación a campo de los plantines generados en invernadero. Luego de 12 semanas de preparada la formulación, se logró reaislar un número alto de unidades formadoras de colonia (10^7 CFU mL⁻¹) desde el SAPH que había sido hidratado con suspensiones bacterianas de ambas cepas seleccionadas como promotoras del crecimiento (M25 y N33) y almacenado (Figura [R2.1](#)). Esta concentración se encuentra en el orden de magnitud que exigen los estándares de calidad de países con gran desarrollo en bioinoculantes, como India, aunque se encuentra ligeramente por debajo de los estándares rubricados en países más exigentes, como China (Malusá & Vassilev, 2014). Sin embargo, la concentración final aislada del SAPH es solo un orden de magnitud menor a la concentración inicial inoculada, demostrando una gran capacidad del polímero de mantener la viabilidad en alto número. Con el objetivo de obtener una viabilidad aún mayor durante el almacenamiento de la formulación y posterior uso se podría considerar a futuro evaluar la supervivencia hidratando el hidrogel con cultivos bacterianos iniciales más concentrados.

La persistencia inicial del inóculo es un factor crucial para garantizar que exista tiempo suficiente para lograr la interacción entre las bacterias y los plantines, mientras

que la supervivencia incluso luego de un período de estrés hídrico favorece la selección de las bacterias capaces de sobrevivir en esas condiciones y de ejercer su efecto benéfico en próximos eventos de estrés (de Vries *et al.*, 2020; Naylor & Coleman-Derr, 2018). Las cepas seleccionadas se mantuvieron viables en distintos tipos de sustratos, esterilizados o no, e incluso en contacto con plantines de *E. grandis* y luego de un periodo de sequía. Se demostró la recuperación de células vivas transformadas con GFP, luego de casi dos meses en condiciones fuertemente adversas para las bacterias y por alrededor de 3 meses en sustratos estériles y con buen contenido de humedad (Figuras [R2.2](#) y [R2.3](#)). Estos resultados son alentadores ya que indican que las PGPB utilizadas podrían establecerse satisfactoriamente y permanecer viables el tiempo suficiente para ejercer su efecto benéfico y contribuir a aliviar el estrés postrasplante de los eucaliptos.

Una vez inoculadas, evaluar la supervivencia y localización de las bacterias constituye un elemento fundamental para comprender el modo de acción y la durabilidad de las PGPB. Permite determinar el tiempo de permanencia del inóculo y establecer si las cepas bacterianas aplicadas tienen la capacidad de colonizar las plantas objetivo y migrar por su interior (Romano *et al.*, 2020). A pesar de sus ventajas, menos del 25% de trabajos que involucran PGPB se encargan de rastrearlas al final del ensayo (Rilling *et al.*, 2019). Generar nuevas herramientas de trazabilidad de las PGPB es un desafío a atender en el futuro cercano (Romano *et al.*, 2020). Añadirá un valor agregado importante a los bioinoculantes y permitirá hacer mejores análisis de calidad basados en pruebas de aplicaciones *in situ*, que llevarán a tomar mejores decisiones respecto al manejo de estas tecnologías. En el caso particular de esta tesis, la transformación de M25 y N33 con GFP permitió estudiar además de su viabilidad en el tiempo, la localización de las bacterias luego de inoculadas en *E. grandis* a través del SAPH. Notoriamente, a pesar de haberse registrado efectos benéficos de las bacterias en el vástago en los ensayos exploratorios y de estrés hídrico, en el experimento de rastreo solo se evidenció una fuerte colonización del entorno radical de los eucaliptos. No se observó la presencia de las cepas seleccionadas en tejidos foliares o su posible ingreso por raíces (Figura [R2.3](#)). Estos resultados podrían indicar que las PGPB seleccionadas ejercen su acción benéfica influyendo en la señalización interna de los eucaliptos. Se ha reportado que las fitohormonas, ciertos iones, las especies reactivas de oxígeno o pequeños péptidos pueden actuar como mensajeros entre los distintos órganos de las plantas (Takahashi & Shinozaki, 2019) y que la concentración de estos compuestos puede alterarse frente a los distintos estreses abióticos (Meena *et al.*, 2017). Sumado a lo anterior, es ampliamente sabido que algunas PGPB son capaces de producir

fitohormonas o análogos de las mismas o de afectar la producción intrínseca de la planta inoculada (Naylor & Coleman-Derr, 2018; Ngumbi & Kloepper, 2016). Así mismo, otras publicaciones muestran que algunas PGPB manifiestan una actividad antioxidante benéfica que logra mitigar el estrés abiótico (Naveed *et al.*, 2014b; Meena *et al.*, 2017; Khan *et al.*, 2019). Medir la producción y movilidad de fitohormonas o especies reactivas de oxígeno en eucaliptos inoculados y estresados puede ser clave para comprender el mecanismo de acción de M25 y N33 a futuro.

3 - Efecto de la inoculación sobre las raíces en microescala

Cambiar la arquitectura del sistema radical y modular la longitud de los pelos absorbentes es un mecanismo versátil y dinámico de aclimatación de las plantas frente a deficiencias hídricas o nutricionales (Graciano *et al.*, 2005; Gupta *et al.*, 2020). La interacción con microorganismos benéficos produce frecuentemente el aumento del número y la elongación de raíces laterales o pelos absorbentes, incrementando el volumen de suelo explorado por las plantas (Choudhary *et al.*, 2016; Ngumbi & Kloepper, 2016). En diferentes plantas, como *Arabidopsis* o trigo, se ha reportado que distintas cepas de bacterias pueden ejercer esta acción estimulante a través de la modulación hormonal (Backer *et al.*, 2018; López-Bucio *et al.*, 2007; Naylor & Coleman-Derr, 2018). En promedio, los pelos radicales pueden ser hasta el 70% de la superficie radical según la especie vegetal, pero las PGPB pueden aumentar notoriamente ese número, facilitando la exploración del sustrato en busca de recursos (Richardson *et al.*, 2009). Plantas de trigo inoculadas con *Bacillus thuringiensis* AZP2 lograron desarrollar una mayor densidad de pelos absorbentes entre dos y tres veces más largos que las plantas sin inocular y los efectos fueron más pronunciados cuando las plantas experimentaron déficit hídrico (Ngumbi & Kloepper, 2016). El mismo resultado se obtuvo cuando los sistemas radicales de plántulas de *E. grandis* y *A. thaliana* entraron en contacto con células de las cepas M25 y N33 (Figura [R2.4](#) a y b). Las plántulas de dos semanas de edad desplegaron mayor cobertura sobre el medio nutritivo agarizado, con un visible incremento en la densidad y longitud de los pelos absorbentes, lo cual derivó consecuentemente en vástagos que acumularon mayor biomasa al finalizar el experimento (Figura [R2.4](#) c). A pesar de que en estos ensayos no se impuso ningún tipo de estrés, son resultados prometedores ya que, por lo general, el aumento de la capacidad absorbente de la raíz está asociado con una mejor respuesta frente a ambientes desafiantes (López-Bucio *et al.*, 2007), como los suelos arenosos de alto

drenaje y baja fertilidad que predominan en las zonas de plantación de *E. grandis* (Bonnin *et al.*, 2015).

4 - Ensayos de sequía en *E. grandis*

Las cepas M25 y N33 promovieron el crecimiento de *E. grandis* y modularon parámetros de intercambio gaseoso como P_n y E (Figuras [R1.2](#), [R1.3](#), [R1.4](#), [R1.6](#), [R1.9](#) y [R1.10](#)), optimizando el uso de recursos como el agua. Además estimularon el desarrollo de pelos absorbentes en *E. grandis* y *A. thaliana* ([Tabla R2.1](#) y figura [R2.4](#)), a la vez que disminuyeron la mortandad de arábidopsis sometidas a sequía (Figura [R1.11](#)) y sobrevivieron al déficit hídrico en el entorno radical de eucaliptos (Figura [R2.3](#)). Conociendo estos resultados se llevaron a cabo experimentos que permitieron estudiar el efecto de la inoculación de estas PGPB en *E. grandis* sometidos a estrés hídrico. Se plantearon dos diseños experimentales con el objetivo de evaluar los efectos benéficos de estas PGPB en la mitigación de dos tipos de sequía severa. En el ensayo en invernadero la sequía se presentó de forma gradual permitiendo a los plántines adoptar estrategias de aclimatación en interacción con las bacterias seleccionadas. En los ensayos en cámara de cultivo la sequía se impuso rápidamente, obligando a los eucaliptos a desplegar estrategias de supervivencia inmediata.

4.1 - Cierre estomático temprano y propiedades hidráulicas del vástago

Las cepas M25 y N33 mostraron ejercer una influencia positiva en el manejo del agua de *E. grandis* sujetos a estrés abiótico. Las inoculaciones individuales o la coinoculación modificaron la estrategia de uso del agua, estimulando a los eucaliptos a desplegar una respuesta más temprana a la falta de este recurso, cerrando los estomas (Figuras [R3.2](#) y [R3.9](#)). Disminuir la conductancia estomática es una estrategia común para evitar la pérdida excesiva de agua por transpiración y se ha registrado ampliamente en diversas especies del género *Eucalyptus* (Harfouche *et al.*, 2014; Hernandez *et al.*, 2016; Utkhao & Yingjajaval, 2015), incluyendo *E. grandis* (Graciano *et al.*, 2005; Tariq *et al.*, 2019). El cierre estomático en condiciones de estrés hídrico es fundamental para mantener la integridad del sistema interno de transporte de agua, evitando en embolismo, y para conservar un apropiado potencial hídrico en los tejidos (Oliveira *et al.*, 2011). En el caso de los eucaliptos inoculados y estresados de los ensayos de sequía, el cierre temprano de los estomas no generó una desventaja productiva comparado con los controles sin inocular; por el contrario, se obtuvieron mayores

valores promedio en el índice de crecimiento y se mantuvo una tasa fotosintética equiparable o incluso superior durante la sequía en los distintos ensayos (Figuras [R3.1](#), [R3.4](#), [R3.7](#), [R3.8](#) y [R3.10](#)).

La disminución de la conductancia estomática puede estar relacionado con el aumento en el contenido relativo de agua observado en las hojas de los individuos inoculados, luego de un período de recuperación desde la sequía. Los plantines inoculados individualmente con M25 mostraron mayor CRA que los no inoculados, solo luego del período de recuperación en ambos tipos de estrés hídrico ensayados por imposición gradual o rápida de la sequía. Este comportamiento es similar al registrado para otras PGPB, incluso sin que se observe un efecto aparente de protección o beneficio en etapas previas al estrés o durante la sequía. Por ejemplo, la inoculación con *Achromobacter* en plantas de tomate y pimiento produjo un aumento considerable del CRA (+5%), pero este beneficio solo se manifestó al reanudar el riego en el período de recuperación luego de la sequía (Mayak *et al.*, 2004), siendo valores comparables con los obtenidos en esta tesis para eucalipto (2 y 7% de aumento luego de sequía gradual y rápida, respectivamente, figuras [R3.1](#) y [R3.4](#)). Las plantas inoculadas con la cepa N33 mostraron valores intermedios entre los del control y los de las plantas tratadas con M25. En condiciones de riego normal, los eucaliptos coinoculados presentaron un CRA 3% superior que las plantas sin inocular, un tipo de beneficio también reportado para la inoculación con otras PGPB (Naveed *et al.*, 2014b; Naveed *et al.*, 2014a; Khan *et al.*, 2019). En resumen, el CRA es un parámetro importante para la definición de una estrategia de tolerancia al estrés y puede ser utilizado como variable sencilla de medir para detectar PGPB promisorias (Ngumbi & Kloepper, 2016).

A pesar de haber sido inoculadas en el entorno radical de los plantines y no haberse observado colonización interna de los tejidos, los efectos benéficos de M25 y N33 se manifestaron significativamente en el vástago de los eucaliptos. Si bien el aumento del CRA mediado por PGPB no está del todo dilucidado, diversos autores sugieren que se genera por cambios en la regulación estomática frente al estrés, mediada por la inducción por parte de las bacterias de la producción de ácido abscísico (ABA), aún en las inoculaciones directas en el sustrato (Ngumbi & Kloepper, 2016). Pero aunque el ABA se acumule en las raíces de las plantas bajo estrés hídrico, es la producción de ABA en vástago la que gatilla el cierre estomático, lo que puede estar inducido por otros metabolitos móviles provenientes desde la raíz (Takahashi & Shinozaki, 2019). Algunos candidatos son el ión Ca^{2+} , las especies reactivas de oxígeno o péptidos de pequeño tamaño como los pertenecientes a la familia CLE

(CLAVATA/EMBRYO SURROUNDING REGION-RELATED). El movimiento estomático es un ejemplo de cómo las señales derivadas de la raíz pueden tener su respuesta en el vástago (Li *et al.*, 2021).

Comparativamente, al finalizar el período de sequía rápida el CRA foliar sufrió una caída de entre 12 y 22%, mientras en el ensayo donde la sequía se impuso gradualmente el CRA sólo disminuyó en un 4%, incluso cuando el sustrato se había deshidratado hasta su mínimo contenido de agua (Figuras [R3.1](#), [R3.4](#) y [R3.8](#)). Cuando el estrés hídrico se presenta de forma gradual, es decir, progresando en pequeñas fracciones en el tiempo, aunque alcance una severidad equiparable a un estrés severo pero impuesto repentinamente, la red regulatoria de genes que operan para superar o afrontar dicho estrés es diferente, debido al mayor tiempo disponible para efectuar una respuesta (Chaves *et al.*, 2003). Esto apoya la idea de que las cepas bacterianas pueden aumentar la tolerancia al estrés hídrico impuesto gradualmente mediante un mecanismo de aclimatación.

Los eucaliptos inoculados con M25 en el invernadero acumularon más agua en la fracción apoplástica que los individuos sin inocular, independientemente del régimen de riego aplicado ([Tabla R3.1](#)). En condiciones normales, una parte considerable del agua de las hojas de todas las plantas está presente en el apoplasto y no puede ser despreciada como reservorio. Se ha observado que las paredes celulares de *Eucalyptus globulus* tienen la capacidad de retener entre 30 y 40% del agua foliar total cuando la hoja se encuentra en máxima turgencia (Wardlaw, 2005). En condiciones de sequía el agua apoplástica puede actuar como una fuente suplementaria de este recurso (Wardlaw, 2005). La cantidad de agua en los reservorios es pequeña en comparación al volumen que se transpira en condiciones normales, pero es importante en periodos de escasez porque puede movilizarse, mantener el turgor celular y sostener un balance hídrico positivo (Bréda *et al.*, 2006; Sapes *et al.*, 2019). Existen antecedentes que muestran cómo la presencia de microorganismos promueve el aumento del flujo de agua por el apoplasto, tanto en plantas bien regadas como sometidas a estrés hídrico, diferenciándolas de los controles sin inocular. Por ejemplo, en maíz y tomate se obtuvo un aumento del 81 y 195 % en plantas bien regadas o sometidas a estrés hídrico, respectivamente (Bárzana *et al.*, 2012). Esos porcentajes son mayores a los obtenidos para el ensayo en invernadero presentado en esta tesis (aumentos de 32 y 100%, [Tabla R3.1](#)) pero mantienen la tendencia a mostrar mayor diferencia en condiciones de sequía, realizando el efecto protector frente al estrés de las inoculaciones con PGPB.

Sumado a lo anterior, las mismas plantas inoculadas con M25 presentaron un menor módulo del coeficiente E_{max} ([Tabla R3.1](#)), que cuantifica la elasticidad de las paredes celulares. Este coeficiente es una medida de la magnitud de la pérdida de turgencia cuando el tejido pierde un determinado volumen de agua. Una pared elástica (con bajo módulo de E_{max}) hace que disminuya poco la presión de turgencia por cada unidad de pérdida de CRA. Contrariamente, un tejido poco elástico, pierde mucha turgencia frente a una pequeña disminución del CRA. Por lo tanto, células con paredes más elásticas permiten a los plantines afrontar mejor el estrés hídrico al mantener la turgencia de los tejidos frente a la deshidratación celular (Álvarez *et al.*, 2018; Merchant *et al.*, 2007). En nuestro caso, la inoculación con M25 claramente influyó en la modulación del uso del agua a nivel del vástago, volviendo a las plantas más conservadoras de las reservas, combinando las estrategias de mayor elasticidad de paredes celulares junto a la acumulación de agua en el apoplasto y el cierre parcial de los estomas con una respuesta más temprana luego de percibido el estímulo de estrés debido a la suspensión del riego.

Se ha observado que distintas especies del género *Eucalyptus* pueden efectuar respuestas de ajuste osmótico en condiciones de sequía, aumentando la concentración de osmolitos en tejidos específicos, pero esta estrategia no es adoptada por todas las especies del género (Warren *et al.*, 2011). En este caso, no se evidenció una estrategia de ajuste osmótico en *E. grandis* debido a la inoculación con bacterias o al estrés hídrico ([Tabla R3.1](#)); sin embargo, las ramas utilizadas para confeccionar las curvas Presión - Volumen pertenecían a plantas que ya habían atravesado el periodo de recuperación exitosamente. Disponer de agua nuevamente mejora la condición hídrica de los individuos y puede revertir la acumulación de osmolitos, haciendo que no se evidencie un posible ajuste adoptado en el periodo de sequía. Mientras que la falta de agua puede generar cambios en la concentración de osmolitos a corto plazo, éstos resultan reversibles, mientras que los cambios estructurales, como la alteración de la composición de las paredes celulares, son de carácter duradero (Warren *et al.*, 2012). En modelos de ajuste hidráulico que tienen en cuenta la duración y la intensidad del estrés hídrico, se ha observado que frente a estreses moderados de corto plazo, las plantas implementan una estrategia hacia la conservación del agua aumentando la resistencia al flujo, mientras a largo plazo y bajo estreses severos la estrategia adoptada por las plantas es disminuir la resistencia y aumentar la elasticidad para favorecer los movimientos de agua internos y la turgencia celular (Maseda & Fernández, 2006).

4.2 - Intercambio gaseoso e índice de verdor

Una duración prolongada del estrés hídrico conduce al cierre estomático, con la concomitante falta de CO₂ como aceptor final de electrones, lo que puede dañar la maquinaria fotosintética, desde el contenido de clorofila hasta el funcionamiento de los fotosistemas, causando una disminución en la capacidad fotosintética de los individuos (Medrano Gil *et al.*, 2007). Por eso es esencial para las plantas optimizar el proceso de fotosíntesis en el uso de recursos que son escasos en períodos críticos. Además, la modulación del intercambio gaseoso para potenciar la fotosíntesis es deseable en el manejo de especies cultivadas porque deriva en un incremento de la biomasa utilizando los mismos o menor cantidad de recursos (Bailey-Serres *et al.*, 2019). Intervenir en este proceso es otro de los efectos ampliamente registrados de la aplicación de PGPB (Naveed, Hussain, *et al.*, 2014; Naveed, Mitter, *et al.*, 2014; Naylor & Coleman-Derr, 2018), que contribuye a mantener la productividad de las plantas en condiciones de deficiencia de recursos, principalmente de agua (Khan *et al.*, 2019; Ngumbi & Kloepper, 2016).

Tanto N33 como M25 mostraron un efecto positivo en la modulación de los parámetros de intercambio gaseoso. Cuando fueron inoculadas individualmente, P_n cayó durante el período de sequía, sin diferencias significativas con los eucaliptos no inoculados, pero alcanzando mayores valores en las plantas inoculadas durante la fase de recuperación (Figura [R3.7](#)). En el ensayo de coinoculación, la P_n de las plantas inoculadas fue mayor que en las plantas control en todos los tiempos de medición: durante la sequía, en la recuperación e incluso antes de la imposición del estrés (Figura [R3.10](#)). Comportamientos similares fueron registrados para la inoculación con otra cepa PGPB, *Burkholderia phytofirmans* PsJN, pero con diferencias entre cultivos de maíz y trigo. Mientras en maíz la inoculación condujo a un aumento de P_n y E tanto en condiciones normales como bajo estrés hídrico, en trigo el efecto benéfico sólo se manifestó en el período de sequía (Naveed, Hussain, *et al.*, 2014; Naveed, Mitter, *et al.*, 2014), demostrando que la alteración fisiológica del intercambio gaseoso es altamente dependiente de la relación entre los distintos microorganismos y las especies vegetales.

Los tiempos requeridos para la restauración de los parámetros de intercambio gaseoso, especialmente la conductancia estomática, a valores normales luego del estrés son variables entre especies forestales. Las especies más rápidas, como *Tabebuia aurea*, pueden conseguirlo dentro de las 96 horas, pero en otras especies arbóreas existen registros de demoras de hasta 14 días en condiciones experimentales

(Oliveira *et al.*, 2011). En distintas especies de eucalipto, la recuperación total del intercambio gaseoso se registró entre los 5 y 11 días luego de reanudado el riego (Warren *et al.*, 2011). La figura [R3.2](#) muestra cómo g_s de eucaliptos crecidos en invernadero tuvo un comportamiento menos acelerado que en *T. aurea*, donde el control y las plantas inoculadas con N33 se recuperaron dentro de los primeros 10 días de reanudado el riego, mientras que el grupo de plantas inoculado con M25 requirió de un tiempo aún mayor para alcanzar una g_s similar a los valores de los controles no estresados. Para el caso de P_n solo se registró la actividad fotosintética luego de 14 días desde la reanudación del riego y no se realizó un seguimiento de la recuperación, pero, como fue mencionado previamente, al finalizar los experimentos los valores de esta variable fueron mayores a los iniciales antes de la imposición del estrés (Figuras [R3.7](#) y [R3.10](#)), mostrando una recuperación completa.

En otras especies de eucaliptos, P_n y E cambian de forma acoplada frente al estrés hídrico, manteniendo una EUA constante (Merchant *et al.*, 2007). En el caso de *E. grandis* se observó un ligero incremento de la EUA luego de retirado el riego, que se magnificó en el período de recuperación (Figuras [R3.7](#) y [R3.10](#)). Pero, a pesar de haberse registrado un aumento en la EUA debido a la inoculación con M25 en los ensayos exploratorios de deficiencia de fósforo, en los ensayos de sequía los cambios en P_n fueron acompañados con modificaciones similares en E, resultando en eficiencias no significativamente diferentes entre las plantas inoculadas y los controles sin inocular (Figuras [R1.3](#), [R1.6](#), [R3.7](#) y [R3.10](#)), aunque se observaron tendencias positivas a favor de los eucaliptos inoculados. Se debe considerar que las mediciones fueron realizadas a saturación lumínica con fines de estandarización, lo cual muestra la capacidad máxima de intercambio gaseoso y no el intercambio a tiempo real de los individuos. En mediciones como estas, los efectos benéficos de las bacterias pueden quedar enmascarados, pudiendo variar la respuesta en condiciones naturales de flujo de fotones fluctuante, actuando sobre el micromanejo de los recursos (Naveed, Hussain, *et al.*, 2014).

El índice de verdor es otra variable relacionada a la actividad fotosintética. Es una estimación indirecta del contenido de clorofila de las hojas y una aproximación al complejo fotosintético entero. A nivel productivo, se utiliza como indicador de potencial fotosintético o para evaluar el estado fisiológico de un cultivo (Reynolds *et al.*, 2013). Los disturbios ambientales, como la sequía, las temperaturas estresantes y la acumulación de sales o metales, pueden generar alteraciones de los valores de verdor, que tienden a disminuir, señalando el daño a la maquinaria fotosintética

(Hasanuzzaman, 2020). La deficiencia nutricional y la senescencia foliar son otros factores que afectan al verdor de las hojas (Pask *et al.*, 2013). Además, el contenido de clorofila y otros pigmentos responde a la calidad lumínica del ambiente (Reynolds *et al.*, 2013). Existen que muestran que ciertos microorganismos presentes en el ambiente o inoculados (generalmente de forma directa en las hojas) pueden tener influencia en la acumulación de pigmentos y por lo tanto en el índice de verdor, un efecto muchas veces relacionado a aumentos en la capacidad fotosintética y mayor desarrollo de biomasa (Hasanuzzaman, 2020).

En los experimentos realizados en *E. grandis* presentados en esta tesis no se registró un cambio sustancial en el índice de verdor, que mantuvo valores promedio similares entre los distintos tratamientos, incluso comparando hojas de plantines en condiciones hídricas diferentes (Figura [R3.11](#)). Esto resulta relevante ya que, aun habiendo sufrido distintos grados de defoliación, las hojas retenidas en los eucaliptos en sequía mantuvieron una calidad de verdor fisiológicamente saludable. Este tipo de comportamiento frente al estrés puede ser considerado como una resiliencia fisiológica que logra sostener la actividad fotosintética en condiciones desfavorables (Kargar *et al.*, 2017). A pesar de haberse observado aumentos en el área foliar y la actividad fotosintética debido a la inoculación con M25 y N33, tampoco hubo diferencias significativas en el índice de verdor al considerar el factor “inoculación”, lo que significa que la influencia de estas cepas bacterianas sobre el proceso de fotosíntesis y en el desarrollo de biomasa no tiene su causa en la acumulación de clorofila. Solo se observó una ligera diferencia entre los datos de experimentos hechos en cámara o en invernadero, sin llegar a ser diferencias estadísticamente significativas (Figura [R3.11](#)) y que pueden atribuirse a la diferencia de irradiancia entre los dos ambientes, ya que la luz (en intensidad y calidad) es un factor clave en la modulación del contenido de clorofila del mesófilo (Reynolds *et al.*, 2013).

El criterio de selección de la hoja para la determinación del índice de verdor favoreció la uniformidad en los datos, ya que las hojas medidas se encontraban a alturas similares de los plantines, correspondían únicamente al tallo principal y solo se utilizaron hojas en el mismo estadio (la hoja más joven completamente expandida). Como consecuencia, no se integró el verdor del resto del follaje ni se evaluó una posible aceleración o retraso del proceso de senescencia causado por el tratamiento. Sin embargo, este criterio de selección de las hojas a medir permite afirmar que el tratamiento no está influenciando la cantidad de clorofila producida en las nuevas hojas, al menos hasta alcanzar su máxima expansión. Las mediciones de verdor puntuales

sobre hojas específicas son útiles, fáciles y rápidas de realizar, lo cual es deseable en producciones agronómicas, aunque a menudo es recomendable integrar el contenido total de clorofila del dosel para una evaluación más fina de la fisiología de las plantas de interés (Pask *et al.*, 2013).

4.3 - Área foliar, crecimiento y biomasa en relación a otras variables

Otra estrategia frecuente de las especies arbóreas frente a la repentina y extrema falta de agua suele ser la pérdida de todas sus hojas (Nouvellon *et al.*, 2010; Tariq *et al.*, 2019; Utkhao & Yingjajaval, 2015), manteniendo los ápices intactos para conservar la capacidad de rebrotar y generar nuevas hojas cuando haya agua disponible nuevamente. En *Eucalyptus*, se observó que este tipo de respuestas plásticas está íntimamente conectado con las propiedades hidráulicas de los individuos (Hernandez *et al.*, 2016; Whitehead & Beadle, 2004).

Cuando el estrés hídrico fue impuesto de forma rápida en el ensayo en cámara de cultivo, se observó una severa defoliación seguida de una recuperación rápida del área foliar luego de reanudado el riego. La inoculación con cualquiera de las dos cepas, M25 o N33, favoreció la retención de área foliar durante la suspensión del riego y la generación de nuevas hojas en el período de recuperación. Como consecuencia, los plantines inoculados mostraron una mayor área foliar al finalizar el experimento evidenciando el efecto protector de estas PGPB, vinculado a la conservación de tejido fotosintético (Figuras [R3.3](#) y [R3.4](#)). A pesar de la pérdida general de biomasa foliar, no se registraron cambios en el área foliar específica en ninguno de los ensayos de estrés hídrico (Figura [R3.11](#)). Esta variable indica la distribución de biomasa foliar por unidad de área que ocupa y da una idea del grosor de las hojas. Se ha reportado que en diversos modelos vegetales, incluyendo distintas especies arbóreas, los cambios en el área foliar específica ayudan a un uso más eficiente de los recursos y de la maquinaria fotosintética en condiciones de estrés (Nouvellon *et al.*, 2010). Sin embargo, no todas las plantas despliegan este tipo de respuesta y en cambio optan por una estrategia diferente que mantiene el área foliar específica inalterada a costa de modificar otra característica. Los resultados presentados en esta tesis son coherentes con lo reportado en la bibliografía para distintas especies de eucaliptos, en las que se observa que la mayoría de ellas no altera el área foliar específica frente a la falta de agua pero sí reducen el área total transpirante eliminando hojas enteras cuando el estrés es severo (Maseda & Fernández, 2015; Merchant *et al.*, 2007). El seguimiento de eucaliptos en

bosques hasta la etapa madura muestra que el área foliar específica cambia fundamentalmente con el tamaño y la edad del árbol, siendo menor en árboles de mayor madurez. En la naturaleza pueden existir cambios de esta variable en respuesta a la disponibilidad de agua, pero son altamente dependientes de la influencia de estímulos estacionales, como los cambios lumínicos y de temperatura. Frente a un disturbio puntual, severo y de corta duración, los eucaliptos pierden y luego reponen biomasa foliar, construyendo nuevas hojas con mayor o menor área foliar específica según la necesidad (Nouvellon *et al.*, 2010).

Por el contrario, bajo sequía gradual y progresiva, los árboles del género *Eucalyptus* pueden desplegar mecanismos de aclimatación a la falta de agua, reorganizando el área foliar sin la necesidad de sacrificar hojas, a través de cambios en el balance hídrico y la economía del agua (Whitehead & Beadle, 2004). En el ensayo de tolerancia a la sequía en invernadero, donde el estrés fue impuesto gradualmente, las plantas solo sufrieron una ligera defoliación pero cambiaron sus parámetros hidráulicos para ajustarse a la situación ([Tabla R3.1](#) y figura [R3.1](#)).

Típicamente frente al estrés hídrico las estrategias de reducción del área foliar y cierre de estomas llevan a una reducción de la tasa de crecimiento de la parte aérea y del rendimiento de cultivo. En el mejoramiento de especies vegetales de interés comercial se puede recurrir a la transformación genética con el fin de añadirles la información de tolerancia a diversos factores ambientales (Bailey-Serres *et al.*, 2019). Sin embargo, en la mayoría de los casos, las plantas transformadas con genes de tolerancia a sequía tienen penalidades considerables en la producción de biomasa cuando no atraviesan un periodo de estrés o incluso cuando el estrés es moderado, y sólo en condiciones de sequía extrema y duradera las plantas transformadas manifiestan la ventaja esperada (Skirycz *et al.*, 2011). Es aquí donde cobran valor las PGPB como estrategia sustentable y ecológicamente apta para potenciar el rendimiento de los cultivos. Las PGPB mantienen la productividad en condiciones de estrés, por lo general sin afectarla negativamente cuando las plantas se encuentran en buenas condiciones de crecimiento (Ngumbi & Kloepper, 2016).

La inoculación con N33 mostró una tendencia positiva hacia la estimulación del crecimiento en condiciones de riego abundante, sin estrés, tanto en invernadero como en cámara de cultivo (Figuras [R3.1](#) y [R3.4](#)). Lo mismo se observó en condiciones de estrés por deficiencia nutricional generalizada en cámara de cultivo (Figura [R1.9](#)). La inoculación con M25 también estimuló el crecimiento en tratamientos de restricción de

fósforo, tanto en invernadero como en cámara de cultivo (Figuras [R1.2](#) y [R1.4](#)). Ambas cepas causaron un incremento en la altura y el diámetro en la base de plantines de *E. grandis* luego de un período de sequía, que fue estadísticamente significativo únicamente cuando estas dos *Pseudomonas* fueron aplicadas simultáneamente (Figuras [R3.1](#), [R3.4](#) y [R3.8](#)). Esto puede deberse a un sinergismo entre las bacterias cuando son coinoculadas (Khan *et al.*, 2019), lo que es positivo, ya que se ha observado que la mezcla de microorganismos que ejercen efectos benéficos al ser inoculados por separado no siempre conduce a resultados superadores o incluso disminuye el efecto benéfico cuando son aplicadas en combinaciones inapropiadas (Compant *et al.*, 2019).

El crecimiento de los individuos fue notoriamente mayor y más rápido en el invernadero, probablemente gracias a la mayor intensidad de luz que recibieron las plantas. En este caso, el estrés hídrico gradual causó una ligera defoliación pero, debido a la mayor elasticidad de las paredes celulares y los reservorios de agua apoplástica en el vástago de los eucaliptos inoculados, éstos fueron capaces de afrontar el estrés con mejor manejo del agua, resultando en índices de crecimiento superiores en las plantas inoculadas al finalizar el período de recuperación con riego normal, a pesar de mantener un área foliar total y específica similar. En el ensayo de inoculaciones individuales y tolerancia a la sequía rápida, tanto N33 como M25 estimularon la creación de nuevas hojas al finalizar la etapa de sequía y reanudar el riego normal, resultando en un mayor área foliar final y un leve incremento en el crecimiento comparado con los eucaliptos sin inocular. Sin embargo, cuando ambas bacterias fueron coinoculadas en un diseño experimental de imposición rápida de la sequía, la inoculación no provocó el mismo incremento en el área foliar pero aumentó significativamente el desarrollo y crecimiento de las plantas, incluso bajo un régimen de riego normal continuo. Concordantemente con estos resultados, se ha registrado la existencia de efecto sinérgico en diferentes formulaciones combinadas de PGPB, sobre todo en especies herbáceas, con menos estudios sobre especies arbóreas (Choudhary *et al.*, 2016; Ngumbi & Kloepper, 2016). Particularmente, la inoculación con conjuntos diversos específicamente de *Pseudomonas* resultó en una mayor acumulación de biomasa y asimilación de nutrientes (Compant *et al.*, 2019).

La alta correlación obtenida entre el índice de crecimiento y las mediciones de biomasa seca (Figura [R3.11](#)) valida y reafirma la importancia de la dasometría como método cuantitativo en la búsqueda de cultivos con mayor productividad y rendimiento. Medir el índice de crecimiento es sencillo y permite evaluar fácilmente aspectos de manejo en plantaciones forestales, incluso desde estadios muy tempranos. La

implementación de estos métodos logra mejorar la toma de decisiones para el desarrollo silvícola, sin la necesidad de utilizar técnicas destructivas. A pesar de que las mediciones de crecimiento a menudo pueden resultar estadísticamente no significativas, a nivel productivo las pequeñas diferencias entre rodales con distintas prácticas de manejo conducen a grandes diferencias en la ganancia económica de los productores. Pero para que una práctica de manejo se establezca agrónomicamente, los beneficios de la misma deben resultar consistentes entre tandas de cultivo. La inoculación de *E. grandis* con las cepas M25 y N33 embebidas en el SAPH mostró gran consistencia en el efecto promotor del desarrollo, ejerciendo un efecto positivo hacia mayor crecimiento en todos los ensayos donde estuvieron involucradas (Figuras [R1.2](#), [R1.4](#), [R1.9](#), [R3.1](#), [R3.4](#) y [R3.8](#)). En estos ensayos se impusieron distintos tipos de estrés, incluyendo deficiencias nutricionales y sequía. El efecto promotor se observó incluso en la microescala y sobre plántulas de *E. grandis* y *A. thaliana* (Figuras [R1.11](#), [R1.12](#) y [R2.4](#)). La conservación del efecto promotor en condiciones tan diversas es un buen indicativo de la robustez de los resultados obtenidos y del valor potencial que tiene esta formulación como estrategia comercial.

5 - Diferencias entre diseños experimentales y fuentes de variación

Al diseñar métodos de prospección de PGPB para tolerancia a la sequía, los equipos de investigación enfrentan dos requerimientos complementarios: simplificar el sistema para facilitar la identificación de cepas que efectivamente actúen en la mitigación del estrés hídrico y evaluar una amplia cantidad de cepas para maximizar la posibilidad de encontrar las mejores candidatas para aplicar en cada caso, intentando aproximarse a un contexto agrónomicamente comparable (Ngumbi & Kloepper, 2016). La exploración sobre semillas y plántulas en laboratorio permite abarcar un mayor número de cepas rápidamente. Si se combina con ensayos cortos en cámara de cultivo se consigue una aproximación más completa de los efectos de las cepas seleccionadas, considerando que inevitablemente cada tipo de ensayo privilegiará a ciertas candidatas sobre otras que también podrían ser prometedoras (Backer *et al.*, 2018). Aumentar la escala a ensayos de invernadero establece una situación intermedia entre el campo y la cámara de cultivo, donde las condiciones ambientales son menos controladas que en el laboratorio y se manipulan volúmenes de macetas más apropiados en relación al tamaño de las plantas, permitiendo una desecación del sustrato más progresiva en los experimentos de sequía y aproximándose mejor a la realidad que se presenta en la naturaleza (Reynolds *et al.*, 2013). La correlación entre tamaño de plantas y volumen de

agua evapotranspirada apoya esta información, mostrando que cuanto menor sea el espacio proporcional para crecer, más restrictiva será la disponibilidad de agua (Figura [R3.12](#)). Más aún, el análisis de componentes principales realizado en esta tesis reafirma este concepto, mostrando que en los ensayos en cámara de cultivo la variable que mejor explica las variaciones entre plantines bajo un mismo régimen de riego es el contenido relativo de agua, mientras que en el invernadero (donde las macetas eran 20 veces más voluminosas) la mayor parte de la variación se explica con el índice de crecimiento (Figura [R3.13](#)).

Es importante destacar que lo observado en el laboratorio o invernadero no siempre resulta reproducible entre los distintos tipos de ensayos o las diferentes escalas de experimentación y resulta importante identificar y estudiar las diversas fuentes de variabilidad (Rilling *et al.*, 2019). En el caso particular de esta tesis, la combinación de tres elementos relevantes a nivel agronómico, como son los hidrogeles, las bacterias promotoras del crecimiento y los eucaliptos, constituyen los principales nodos de potenciales inconsistencias entre ensayos. Cada uno de ellos presenta diferentes fuentes de variación que pueden alterar el resultado de un cultivo dependiendo del conjunto de factores que los afectan.

En el caso de los hidrogeles, no siempre generan los mismos niveles de beneficios y esto puede deberse a alteraciones en la matriz de los geles, la cual varía por la presencia de sales y químicos en el suelo, modificando su capacidad de retener agua, velocidad de absorción y capacidad de liberación e intercambio. Las condiciones ambientales, la textura del sustrato y los intervalos de rehidratación, afectan la durabilidad del polímero en el suelo, restringiendo su capacidad de acción (Lejcuś *et al.*, 2018; Shen *et al.*, 2015; Ullah *et al.*, 2015). Por otro lado, la cantidad de hidrogel aplicado, el tipo de polímero, tamaño de poro y partícula son otros motivos de inconsistencias señalados por la comunidad científica (Crous, 2017).

En cuanto a las PGPB, el inóculo puede no colonizar efectivamente el entorno en el cual es aplicado o incluso no establecer una interacción favorable con el cultivo destino, principalmente por causas ambientales como la disponibilidad de nutrientes o de agua, temperaturas y pH poco favorables o la competencia con otros microorganismos por el nicho y la presencia de predadores naturales (Rilling *et al.*, 2019). Los bioinoculantes tienen como principales fuentes de variación a la contaminación de los *carriers* con otros microorganismos indeseados y los bajos niveles

de células viables de los microorganismos de interés que las formulaciones pueden retener y entregar (Bashan *et al.*, 2016; Malusá & Vassilev, 2014).

Finalmente, las especies del género *Eucalyptus* usadas en forestación son reconocidas por su heterogeneidad, tanto intra como inter-específica. Además, tienen gran capacidad de hibridación, por lo que suele ser difícil conservar características de interés mediante la producción de semillas en plantaciones abiertas (López *et al.*, 2012). Debido a la alta diversidad genética en individuos provenientes de semilla se ha expandido el uso de cepas clonales preparadas con fines productivos, pero aquellos genotipos seleccionados por mostrar mayor rendimiento frecuentemente tienen dificultad para afrontar estreses abióticos o establecer interacciones positivas con microorganismos (Harrand *et al.*, 2017). Esto vuelve sumamente difícil la elección de un genotipo que pueda actuar efectivamente contra la diversidad de estímulos a los que los eucaliptos se ven expuestos en la naturaleza, generando la variabilidad conocida comercialmente (Booth, 2013).

Conclusión

En resumen, esta tesis ha mostrado exitosamente que el SAPH puede ser utilizado como vehículo para la aplicación de bacterias benéficas en el entorno radical de plantines forestales durante el período de implantación. Se han identificado dos cepas bacterianas del género *Pseudomonas*, capaces de conferir una ventaja consistente en el crecimiento de plantines de *E. grandis* y de favorecer la tolerancia a diversos estreses abióticos, fundamentalmente tolerancia a la sequía, uno de los principales factores que afectan a las plantaciones comerciales de eucaliptos. Los beneficios de las cepas seleccionadas se manifiestan en condiciones de riego normal y también de déficit hídrico, y pueden mostrar un efecto sinérgico ante la coinoculación. Se obtuvieron resultados consistentes entre diferentes diseños experimentales que implicaron diversidad de estreses y escalas de manejo, lo que representa un gran avance en la generación de nuevas tecnologías que permitan la evolución de los sistemas productivos hacia formatos más rentables y sustentables. La combinación de SAPH y bacterias benéficas constituye una alternativa diferente a los fertilizantes sintéticos, amigable con el medio ambiente y con perspectivas prometedoras en la promoción del desarrollo vegetal en tiempos que requieren estrategias productivas que resguarden el bienestar de la naturaleza, basadas en un conocimiento profundo de la biotecnología y la botánica.



Lic. José María Chaín



Dra. Irene Baroli
Prof. Adjunta DP DBBE - FCEN - UBA
Inv. Adjunta IBBEA - CONICET - UBA

Dra. Irene Mabel Baroli



Dra. Gabriela Amodeo



Bibliografía

- Agaba, H., Orikiriza, L. J. B., Esegu, J. F. O., Obua, J., Kabasa, J. D., & Hüttermann, A. (2010). Effects of hydrogel amendment to different soils on plant available water and survival of trees under drought conditions. *Clean - Soil, Air, Water*, 38 (4), 328–335. <https://doi.org/10.1002/clen.200900245>
- Ahkami, A. H., Allen White, R., Handakumbura, P. P., & Jansson, C. (2017). Rhizosphere engineering: Enhancing sustainable plant ecosystem productivity. *Rhizosphere*, 3, 233–243. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2017.04.012>
- Alcobé, F., García, D., Bonomo, I., Peirano, S., Norverto, C., Corinaldesi, L., Brandan, S., von Haefen, C., Irigoin, N., Marcovecchio, J., di Marco, E., Benitez, R., Clemente, N., Gaute, M., & Yorio, M. (2013). *Argentina: Plantaciones forestales y gestión sostenible*. http://forestoindustria.magyp.gob.ar/archivos/gestion-forestal-sostenible/publi_ambiental.pdf
- Allen, C. D., Macalady, A. K., Chenchouni, H., Bachelet, D., McDowell, N., Vennetier, M., Kitzberger, T., Rigling, A., Breshears, D. D., Hogg, E. H. (Ted), Gonzalez, P., Fensham, R., Zhang, Z., Castro, J., Demidova, N., Lim, J. H., Allard, G., Running, S. W., Semerci, A., & Cobb, N. (2010). A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *Forest Ecology and Management*, 259 (4), 660–684. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2009.09.001>
- Alvarez, F., Castro, M., Príncipe, A., Borioli, G., Fischer, S., Mori, G., & Jofré, E. (2012). The plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* strains MEP 218 and ARP 23 capable of producing the cyclic lipopeptides iturin or surfactin and fengycin are effective in biocontrol of sclerotinia stem rot disease. *Journal of Applied Microbiology*, 112 (1), 159–174. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05182.x>
- Álvarez, S., Rodríguez, P., Broetto, F., & Sánchez-Blanco, M. J. (2018). Long term responses and adaptive strategies of *Pistacia lentiscus* under moderate and severe deficit irrigation and salinity: Osmotic and elastic adjustment, growth, ion uptake and photosynthetic activity. *Agricultural Water Management*, 202, 253–262. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2018.01.006>
- Asari, S., Tarkowská, D., Rolčík, J., Novák, O., Palmero, D. V., Bejai, S., & Meijer, J. (2017). Analysis of plant growth-promoting properties of *Bacillus amyloliquefaciens* UCMB5113 using *Arabidopsis thaliana* as host plant. *Planta*, 245 (1), 15–30. <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2580-9>
- Babalola, O. O. (2010). Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnology Letters*, 32 (11), 1559–1570. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0347-0>
- Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., Subramanian, S., & Smith, D. L. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria: Context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 9 (1473), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01473>
- Bailey-Serres, J., Parker, J. E., Ainsworth, E. A., Oldroyd, G. E. D., & Schroeder, J. I. (2019). Genetic strategies for improving crop yields. *Nature*, 575 (7781), 109–118. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1679-0>
- Bakhshandeh, E., Gholamhosseini, M., Yaghoobian, Y., & Pirdashti, H. (2020). Plant growth promoting microorganisms can improve germination, seedling growth and potassium uptake of soybean under drought and salt stress. *Plant Growth Regulation*, 90 (1), 123–136. <https://doi.org/10.1007/s10725-019-00556-5>
- Bárzana, G., Aroca, R., Paz, J. A., Chaumont, F., Martínez-Ballesta, M. C., Carvajal, M., & Ruiz-Lozano, J. M. (2012). Arbuscular mycorrhizal symbiosis increases relative apoplastic water flow in roots of the host plant under both well-watered and drought stress conditions. *Annals of Botany*, 109 (5), 1009–1017. <https://doi.org/10.1093/aob/mcs007>
- Bashan, Y., de-Bashan, L. E., & Prabhu, S. R. (2016). Superior polymeric formulations and emerging innovative products of bacterial inoculants for sustainable agriculture and the environment. In *Agriculturally Important Microorganisms: Commercialization and Regulatory Requirements in Asia* (pp. 15–46). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-2576-1_2

- Bashan, Y., de-Bashan, L. E., Prabhu, S. R., & Hernandez, J. P. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998-2013). *Plant and Soil*, 378 (1–2), 1–33. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x>
- Battie-Laclau, P., Laclau, J. P., Domec, J. C., Christina, M., Bouillet, J. P., de Cassia Piccolo, M., de Moraes Gonçalves, J. L., Moreira, R. M., Krusche, A. V., Bouvet, J. M., & Nouvellon, Y. (2014). Effects of potassium and sodium supply on drought-adaptive mechanisms in *Eucalyptus grandis* plantations. *New Phytologist*, 203 (2), 401–413. <https://doi.org/10.1111/nph.12810>
- Beadle, C., & Sands, P. (2004). Synthesis of the physiological, environmental, genetic and silvicultural determinants of the growth and productivity of eucalypts in plantations. *Forest Ecology and Management*, 193, 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2004.02.010>
- Beale, I., & Ortíz, E. C. (2013). El Sector Forestal Argentino: EUCALIPTOS. *Revista de Divulgación Técnica, Agrícola y Agroindustrial*, 53, 1–10.
- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M. J., & Bakker, P. A. H. M. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, 17 (8), 478–486. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.04.001>
- Berg, G. (2009). Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: Perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84 (1), 11–18. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2092-7>
- Berg, G., Grube, M., Schloter, M., & Smalla, K. (2014). Unraveling the plant microbiome: Looking back and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 5 (148), 1-7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00148>
- Bhardwaj, D., Ansari, M. W., Sahoo, R. K., & Tuteja, N. (2014). Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microbial Cell Factories*, 13 (66), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-66>
- Bonnin, S., Haug, E., Mijailoff, J., & Ponce, S. (2015). Planificación silvícola: *Eucalyptus grandis* en el NE de la provincia de Entre Ríos. En *Cátedra de Silvicultura, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP* (pp. 1–17).
- Booth, T. H. (2013). Eucalypt plantations and climate change. *Forest Ecology and Management*, 301, 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2012.04.004>
- Bréda, N., Huc, R., Granier, A., & Dreyer, E. (2006). Temperate forest trees and stands under severe drought: A review of ecophysiological responses, adaptation processes and long-term consequences. *Annals of Forest Science*, 63 (6), 625–644. <https://doi.org/10.1051/forest:2006042>
- Caldato, S. L., & Schumacher, M. V. (2013). O uso de água pelas plantações florestais - Uma revisão. *Ciência Florestal*, 23 (3), 507–516.
- Castagno, L. N., Estrella, M. J., Sannazzaro, A. I., Grassano, A. E., & Ruiz, O. A. (2011). Phosphate-solubilization mechanism and in vitro plant growth promotion activity mediated by *Pantoea eucalypti* isolated from *Lotus tenuis* rhizosphere in the Salado River Basin (Argentina). *Journal of Applied Microbiology*, 110 (5), 1151–1165. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.04968.x>
- Chaves, M. M., Maroco, J. P., & Pereira, J. S. (2003). Understanding plant responses to drought - From genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*, 30 (3), 239–264. <https://doi.org/10.1071/FP02076>
- Choudhary, D. K., Kasotia, A., Jain, S., Vaishnav, A., Kumari, S., Sharma, K. P., & Varma, A. (2016). Bacterial-Mediated Tolerance and Resistance to Plants Under Abiotic and Biotic Stresses. *Journal of Plant Growth Regulation*, 35 (1), 276–300. <https://doi.org/10.1007/s00344-015-9521-x>
- Cole, J. R., Wang, Q., Fish, J. A., Chai, B., McGarrell, D. M., Sun, Y., Brown, C. T., Porras-Alfaro, A., Kuske, C. R., & Tiedje, J. M. (2014). Ribosomal Database Project: Data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 42, 633–642. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1244>

- Compant, S., Samad, A., Faist, H., & Sessitsch, A. (2019). A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *Journal of Advanced Research*, 19, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.004>
- Crous, J. W. (2017). Use of hydrogels in the planting of industrial wood plantations. *Southern Forests*, 79 (3), 197–213. <https://doi.org/10.2989/20702620.2016.1221698>
- Dai, A. (2011). Drought under global warming: A review. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Climate Change*, 2 (1), 45–65. <https://doi.org/10.1002/wcc.81>
- d'Annunzio, R., Sandker, M., Finegold, Y., & Min, Z. (2015). Projecting global forest area towards 2030. *Forest Ecology and Management*, 352, 124–133. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2015.03.014>
- Daystar, J., Gonzalez, R., Reeb, C., Venditti, R., Treasure, T., Abt, R., & Kelley, S. (2014). Bioenergy supply chain & LCA. *BioResources*, 9 (1), 394-444.
- de Vries, F. T., Griffiths, R. I., Knight, C. G., Nicolitch, O., & Williams, A. (2020). Harnessing rhizosphere microbiomes for drought-resilient crop production. *Science*, 368, 270–274. <http://science.sciencemag.org/>
- Dell, B. (Bernard), Malajczuk, N., Xu, D., Grove, T. S., & Australian Centre for International Agricultural Research. (2001). *Nutrient disorders in plantation eucalypts* (segunda edición). ACIAR Monograph Series.
- di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. (2018). *Infostat versión 2016*. InfoStat Group, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba. <http://www.infostat.com.ar>
- Diaz, D., Tesón, N., & García, M. de los Á. (2006). Efectos ambientales de las forestaciones de eucaliptos en el noreste de Entre Ríos. *XXI Jornadas Forestales de Entre Ríos*, 1–15.
- Di-Gaudio, A. V., Tubert, E., Laino, L. E., Chaín, J. M., Pitta-Alvarez, S. I., Amodeo, G., & Regalado, J. J. (2020). A new and rapid micropropagation protocol for *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden. *Forest Systems*, 29 (1). <https://doi.org/10.5424/fs/2020291-15965>
- Dray, S., & Dufour, A.-B. (2007). The ade4 Package: Implementing the Duality Diagram for Ecologists. *Journal of Statistical Software*, 22 (4), 1–20. <http://www.jstatsoft.org/>
- Estrella, M. J., Muñoz, S., Soto, M. J., Ruiz, O., & Sanjuán, J. (2009). Genetic diversity and host range of rhizobia nodulating *Lotus tenuis* in typical soils of the Salado River Basin (Argentina). *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (4), 1088–1098. <https://doi.org/10.1128/AEM.02405-08>
- Finkel, O. M., Castrillo, G., Herrera Paredes, S., Salas González, I., & Dangl, J. L. (2017). Understanding and exploiting plant beneficial microbes. *Current Opinion in Plant Biology*, 38, 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.04.018>
- Fitzpatrick, C. R., Salas-González, I., Conway, J. M., Finkel, O. M., Gilbert, S., Russ, D., Pereira, P. J., Teixeira, L., & Dangl, J. L. (2020). The Plant Microbiome: From Ecology to Reductionism and Beyond. *Annual Reviews of Microbiology*, 74, 81–100. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-022620>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2016). *Global forest resources assessment 2015: how are the world's forests changing?* (segunda edición). www.fao.org/publications
- García, M. de los Á. (2017). Producción de eucaliptos en vivero. *Curso: Principios Técnicos Para El Cultivo de Especies Forestales de Entre Ríos*, 1–19. https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta-concordia_cartilla_produccion_en_vivero.pdf
- Golfari, L. (1985). Distribución regional y condiciones ecológicas de los eucaliptos cultivados en la Argentina: problemas inherentes. *Publicación Técnica Nº 1*, Centro de Investigaciones y Experiencias Forestales (CIEF), 1–19.

- Graciano, C., Faustino, L. I., & Zwieniecki, M. A. (2016). Hydraulic properties of *Eucalyptus grandis* in response to nitrate and phosphate deficiency and sudden changes in their availability. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 179 (2), 303–309. <https://doi.org/10.1002/jpln.201500207>
- Graciano, C., Guiamét, J. J., & Goya, J. F. (2005). Impact of nitrogen and phosphorus fertilization on drought responses in *Eucalyptus grandis* seedlings. *Forest Ecology and Management*, 212, 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2005.02.057>
- Grossnickle, S. C. (2005). Importance of root growth in overcoming planting stress. *New Forests*, 30, 273–294. <https://doi.org/10.1007/s11056-004-8303-2>
- Gupta, A., Rico-Medina, A., & Caño-Delgado, A. I. (2020). The physiology of plant responses to drought. *Science*, 368, 266–269. <http://science.sciencemag.org/>
- Harfouche, A., Meilan, R., & Altman, A. (2014). Molecular and physiological responses to abiotic stress in forest trees and their relevance to tree improvement. *Tree Physiology*, 34 (11), 1181–1198. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpu012>
- Harrand, L., Oberschelp, J., & Mastrandrea, C. (2017). Mejoramiento Genético de especies cultivadas en Entre Ríos. *Curso: Principios Técnicos Para El Cultivo de Especies Forestales de Entre Ríos*, 1–19. https://inta.gov.ar/sites/default/files/materiales_geneticos_y_tecnologia_de_la_madera.pdf
- Hasanuzzaman, M. (2020). Plant ecophysiology and adaptation under climate change: Mechanisms and perspectives II: Mechanisms of adaptation and stress amelioration. In *Plant Ecophysiology and Adaptation under Climate Change: Mechanisms and Perspectives II: Mechanisms of Adaptation and Stress Amelioration*. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-2172-0>
- Hasegawa, M., Kishino, H., & Yano, T.-A. (1985). Journal of Molecular Evolution Dating of the Human-Ape Splitting by a Molecular Clock of Mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 22, 160–174.
- Hernandez, M. J., Montes, F., Ruiz, F., Lopez, G., & Pita, P. (2016). The effect of vapour pressure deficit on stomatal conductance, sap pH and leaf-specific hydraulic conductance in *Eucalyptus globulus* clones grown under two watering regimes. *Annals of Botany*, 117 (6), 1063–1071. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw031>
- Herrmann, L., & Lesueur, D. (2013). Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97 (20), 8859–8873. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5228-8>
- Hong, S. H., Ham, S. Y., Kim, J. S., Kim, I. S., & Lee, E. Y. (2016). Application of sodium polyacrylate and plant growth-promoting bacterium, Micrococcaceae HW-2, on the growth of plants cultivated in the rooftop. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 113, 297–303. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.04.018>
- Javot, H., Lauvergeat, V., Santoni, V., Martin-Laurent, F., Güçlü, J., Vinh, J., Heyes, J., Franck, K. I., Schäffner, A. R., Bouchez, D., & Maurel, C. (2003). Role of a single aquaporin isoform in root water uptake. *Plant Cell*, 15 (2), 509–522. <https://doi.org/10.1105/tpc.008888>
- Jawjit, W., Kroeze, C., Soontaranun, W., & Hordijk, L. (2007). Options to reduce the environmental impact by *eucalyptus*-based Kraft pulp industry in Thailand: model description. *Journal of Cleaner Production*, 15 (18), 1827–1839. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2006.10.003>
- Josse, J., & Husson, F. (2016). missMDA: A package for handling missing values in multivariate data analysis. *Journal of Statistical Software*, 70. <https://doi.org/10.18637/jss.v070.i01>
- Kargar, M., Suresh, R., Legrand, M., Jutras, P., Clark, O. G., & Prasher, S. O. (2017). Reduction in Water Stress for Tree Saplings Using Hydrogels in Soil. *Journal of Geoscience and Environment Protection*, 5 (1), 27–39. <https://doi.org/10.4236/gep.2017.51002>
- Khan, N., Bano, A., Rahman, M. A., Guo, J., Kang, Z., & Babar, M. A. (2019). Comparative Physiological and Metabolic Analysis Reveals a Complex Mechanism Involved in Drought Tolerance in Chickpea

- (*Cicer arietinum* L.) Induced by PGPR and PGRs. *Scientific Reports*, 9 (2019), 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38702-8>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35 (6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Laharrague, N., Borodowski, E., Petri, G., von Haefen, C., Funes, L. S., Peña, M., Arroyo, C. M., de Igarzabal, P., Barreiro, E., French, G., Frisa, C., & Lavignolle, J. (2015). *Informe nacional del relevamiento censal de aserraderos*. Secretaría de Agroindustria, Ministerio de Producción y Trabajo. https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/ss_desarrollo_foresto_industrial/censos_inventario/_archivos/censo/000000_Informe%20Nacional%20de%20Aserraderos%202015.pdf
- Lambertsen, L., Sternberg, C., & Molin, S. (2004). Mini-Tn7 transposons for site-specific tagging of bacteria with fluorescent proteins. *Environmental Microbiology*, 6 (7), 726–732. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00605.x>
- Landis, T. D., & Haase, D. L. (2012). Applications of Hydrogels in the Nursery and During Outplanting. *USDA Forest Service Proceedings*, 68, 53–58. http://www.fs.fed.us/rm/pubs/rmrs_p068.html
- Lê, S., Josse, J., Rennes, A., & Husson, F. (2008). FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software*, 25 (1), 1–18. <http://www.jstatsoft.org/>
- Lejcuś, K., Śpitalniak, M., & Dabrowska, J. (2018). Swelling behaviour of superabsorbent polymers for soil amendment under different loads. *Polymers*, 10 (271), 1–13. <https://doi.org/10.3390/polym10030271>
- Li, H., Testerink, C., & Zhang, Y. (2021). How roots and shoots communicate through stressful times. *Trends in Plant Science*, 26 (9), 940–952. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.03.005>
- López, J. A., Harrand, L., Salto, C. S., Marcó, M. A., & Surenciski, M. R. (2012). *Resúmenes Jornadas de Actualización Técnica*. EEA Concordia INTA.
- López-Bucio, J., Campos-Cuevas, J. C., Hernández-Calderón, E., Velásquez-Becerra, C., Farías-Rodríguez, R., Macías-Rodríguez, L. I., & Valencia-Cantero, E. (2007). *Bacillus megaterium* Rhizobacteria Promote Growth and Alter Root-System Architecture Through an Auxin- and Ethylene-Independent Signaling Mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20 (2), 207–217. <https://doi.org/10.1094/MPMI>
- Lorensi De Souza, E., Antonioli, Z. I., Machado, R. G., Eckhardt, D. P., de Fátima, S., & Dahmer, B. (2014). *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden inoculated with *Pisolithus microcarpus* (UFSC-Pt116) in land subject to the sandy process in Southern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45 (4), 1145–1151. www.sbmicrobiologia.org.br
- Lugtenberg, B. (2015). Principles of plant-microbe interactions: Microbes for sustainable agriculture. In *Principles of Plant-Microbe Interactions: Microbes for Sustainable Agriculture*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-08575-3>
- Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63, 541–556. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>
- Mafia, R. G., Alfnas, A. C., Ferreira, E. M., Henrique, D., Binoti, B., Ventura, G. M., & Munteer, A. H. (2009). Root colonization and interaction among growth promoting rhizobacteria isolates and eucalypts species. *Revista Árvore*, 33(1), 1–9.
- Malusá, E., Sas-Paszt, L., & Ciesielska, J. (2012). Technologies for beneficial microorganisms inocula used as biofertilizers. *The Scientific World Journal*, 2012, 1–12. <https://doi.org/10.1100/2012/491206>
- Malusá, E., & Vassilev, N. (2014). A contribution to set a legal framework for biofertilisers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98 (15), 6599–6607. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5828-y>

- Maseda, P. H., & Fernández, R. J. (2006). Stay wet or else: Three ways in which plants can adjust hydraulically to their environment. *Journal of Experimental Botany*, 57 (15), 3963–3977. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl127>
- Maseda, P. H., & Fernández, R. J. (2015). Growth potential limits drought morphological plasticity in seedlings from six *Eucalyptus* provenances. *Tree Physiology*, 36 (2), 243–251. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpv137>
- Mayak, S., Tirosh, T., & Glick, B. R. (2004). Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. *Plant Science*, 166 (2), 525–530. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2003.10.025>
- Medrano Gil, H., Bota Salort, J., Cifre Llompart, J., Flexas Sans, J., Ribas Carbó, M., & Gulías León, J. (2007). Eficiencia en el uso del agua por las plantas. *Investigaciones Geográficas*, 43, 63–84. <https://doi.org/10.14198/ingeo2007.43.04>
- Meena, K. K., Sorty, A. M., Bitla, U. M., Choudhary, K., Gupta, P., Pareek, A., Singh, D. P., Prabha, R., Sahu, P. K., Gupta, V. K., Singh, H. B., Krishanani, K. K., & Minhas, P. S. (2017). Abiotic stress responses and microbe-mediated mitigation in plants: The omics strategies. *Frontiers in Plant Science*, 8 (172), 1–25. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00172>
- Merchant, A., Callister, A., Arndt, S., Tausz, M., & Adams, M. (2007). Contrasting physiological responses of six *Eucalyptus* species to water deficit. *Annals of Botany*, 100 (7), 1507–1515. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm234>
- Montesano, F. F., Parente, A., Santamaria, P., Sannino, A., & Serio, F. (2015). Biodegradable Superabsorbent Hydrogel Increases Water Retention Properties of Growing Media and Plant Growth. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 4, 451–458. <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2015.03.052>
- Moreira, A. L., & Araújo, F. F. (2013). Bioprospecção de isolados de *Bacillus* spp. como potenciais promotores de crescimento de *Eucalyptus urograndis*. *Revista Árvore*, 37 (5), 933–943.
- Moslemi, Z., Habibi, D., Asgharzadeh, A., Ardakani, M. R., Mohammadi, A., & Sakari, A. (2011). Effects of super absorbent polymer and plant growth promoting rhizobacteria on yield and yield components of maize under drought stress and normal conditions. *African Journal of Agricultural Research*, 6 (19), 4471–4476. <https://doi.org/10.5897/AJAR10.462>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15 (3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Myburg, A. A., Grattapaglia, D., Tuskan, G. A., Hellsten, U., Hayes, R. D., Grimwood, J., Jenkins, J., Lindquist, E., Tice, H., Bauer, D., Goodstein, D. M., Dubchak, I., Poliakov, A., Mizrachi, E., Kullán, A. R. K., Hussey, S. G., Pinard, D., van der Merwe, K., Singh, P., ... Schmutz, J. (2014). The genome of *Eucalyptus grandis*. *Nature*, 510 (7505), 356–362. <https://doi.org/10.1038/nature13308>
- Naghili, H., Tajik, H., Mardani, K., Rouhani, S. M. R., Ehsani, A., & Zare, P. (2013). Validation of drop plate technique for bacterial enumeration by parametric and nonparametric tests. *Veterinary Research Forum*, 4 (3), 179–183.
- Naveed, M., Hussain, M. B., Zahir, Z. A., Mitter, B., & Sessitsch, A. (2014). Drought stress amelioration in wheat through inoculation with *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. *Plant Growth Regulation*, 73 (2), 121–131. <https://doi.org/10.1007/s10725-013-9874-8>
- Naveed, M., Mitter, B., Reichenauer, T. G., Wieczorek, K., & Sessitsch, A. (2014). Increased drought stress resilience of maize through endophytic colonization by *Burkholderia phytofirmans* PsJN and *Enterobacter* sp. FD17. *Environmental and Experimental Botany*, 97, 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.09.014>

- Naylor, D., & Coleman-Derr, D. (2018). Drought stress and root-associated bacterial communities. *Frontiers in Plant Science*, 8 (2223), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02223>
- Ngumbi, E., & Kloepper, J. (2016). Bacterial-mediated drought tolerance: Current and future prospects. *Applied Soil Ecology*, 105, 109–125. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.04.009>
- Nie, H., Liu, M., Zhan, F., & Guo, M. (2004). Factors on the preparation of carboxymethylcellulose hydrogel and its degradation behavior in soil. *Carbohydrate Polymers*, 58 (2), 185–189. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.06.035>
- Nouvellon, Y., Laclau, J. P., Epron, D., Kinana, A., Mabiata, A., Rouspard, O., Bonnefond, J. M., le Maire, G., Marsden, C., Bontemps, J. D., & Saint-André, L. (2010). Within-stand and seasonal variations of specific leaf area in a clonal *Eucalyptus* plantation in the Republic of Congo. *Forest Ecology and Management*, 259 (9), 1796–1807. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2009.05.023>
- Oksińska, M. P., Magnucka, E. G., Lejcuś, K., & Pietr, S. J. (2016). Biodegradation of the cross-linked copolymer of acrylamide and potassium acrylate by soil bacteria. *Environmental Science and Pollution Research*, 23 (6), 5969–5977. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6130-6>
- Oliveira, A. K. M., de Gualtieri, S. C. J., & Bocchese, R. A. (2011). Gas exchange of potted *Tabebuia aurea* plants under hydric stress. *Acta Scientiarum - Agronomy*, 33 (4), 641–647. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v33i4.11254>
- Orikiriza, L. J. B., Agaba, H., Eilu, G., Kabasa, J. D., Worbes, M., & Hüttermann, A. (2013). Effects of Hydrogels on Tree Seedling Performance in Temperate Soils before and after Water Stress. *Journal of Environmental Protection*, 4 (7), 713–721. <https://doi.org/10.4236/jep.2013.47082>
- Palacios, F. X., Apocada, M. J., & Crisci, J. V. (2020). *Análisis multivariado para datos biológicos: teoría y su aplicación utilizando el lenguaje R* (Vazquez Mazzini, Ed.; 1ª edición). Fundación de Historia Natural Félix de Azara.
- Pask, A., Pietragalla, J., Mullan, D., Chávez, P., & Reynolds, M. (2013). *Fitomejoramiento Fisiológico II: Una Guía de Campo para la Caracterización Fenotípica de Trigo*. CIMMYT.
- Payn, T., Carnus, J. M., Freer-Smith, P., Kimberley, M., Kollert, W., Liu, S., Orazio, C., Rodriguez, L., Silva, L. N., & Wingfield, M. J. (2015). Changes in planted forests and future global implications. *Forest Ecology and Management*, 352, 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2015.06.021>
- Paz, I. C., Santin, R. C., Guimarães, A. M., Rosa, O. P., Dias, A. C., Quecine, M. C., Azevedo, J. L., & Matsumura, A. T. (2012). *Eucalyptus* growth promotion by endophytic *Bacillus* spp. *Genetics and Molecular Research*, 11 (4), 3711–3720. <https://doi.org/10.4238/2012.August.17.9>
- Perez, J. J., Francois, N. J., Maroniche, G. A., Borrajo, M. P., Pereyra, M. A., & Creus, C. M. (2018). A novel, green, low-cost chitosan-starch hydrogel as potential delivery system for plant growth-promoting bacteria. *Carbohydrate Polymers*, 202, 409–417. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.07.084>
- Piquer-Rodríguez, M., Torella, S., Gavier-Pizarro, G., Volante, J., Somma, D., Ginzburg, R., & Kuemmerle, T. (2015). Effects of past and future land conversions on forest connectivity in the Argentine Chaco. *Landscape Ecology*, 30 (5), 817–833. <https://doi.org/10.1007/s10980-014-0147-3>
- Premachandra, D., Hudek, L., & Brau, L. (2016). Bacterial Modes of Action for Enhancing of Plant Growth. *Journal of Biotechnology & Biomaterials*, 6 (3), 1–8. <https://doi.org/10.4172/2155-952x.1000236>
- Puente, M. L., García, J. E., Pathauer, P., & Peticari, A. (2010). Inoculation with *Azospirillum brasilense* is a useful tool in *Eucalyptus globulus* management. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 8 (2), 124–130.
- Qados, A. M. S. A. (2015). Effects of Super Absorbent Polymer and *Azotobacter vinelandii* on Growth and Survival of *Ficus benjamina* L. Seedlings under Drought Stress Conditions. *International Research Journal of Agricultural Science and Soil Science*, 5 (2), 45–57. <https://doi.org/10.14303/irjas.2015.024>

- Ramette, A., Frapolli, M., Saux, M. F. le, Gruffaz, C., Meyer, J. M., Défago, G., Sutra, L., & Moëgne-Loccoz, Y. (2011). *Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2,4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. *Systematic and Applied Microbiology*, 34 (3), 180–188. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.10.005>
- Rasband, W. S. (2018). *ImageJ* (No. 2016). U. S. National Institutes of Health. <https://imagej.nih.gov/ij/>
- Reynolds, M., Pask, A., Mullan, D., & Chávez, P. (2013). *Fitomejoramiento Fisiológico I: Enfoques Interdisciplinarios para Mejorar la Adaptación del Cultivo*. CIMMYT.
- Richardson, A. E., Barea, J. M., McNeill, A. M., & Prigent-Combaret, C. (2009). Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil*, 321, 305–339. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-9895-2>
- Rilling, J. I., Acuña, J. J., Nannipieri, P., Cassan, F., Maruyama, F., & Jorquera, M. A. (2019). Current opinion and perspectives on the methods for tracking and monitoring plant growth–promoting bacteria. *Soil Biology and Biochemistry*, 130, 205–219. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.12.012>
- Romano, I., Venterino, V., & Pepe, O. (2020). Effectiveness of Plant Beneficial Microbes: Overview of the Methodological Approaches for the Assessment of Root Colonization and Persistence. *Frontiers in Plant Science*, 11 (6), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00006>
- Romero, F. M., Marina, M., & Pieckenstain, F. L. (2016). Novel components of leaf bacterial communities of field-grown tomato plants and their potential for plant growth promotion and biocontrol of tomato diseases. *Research in Microbiology*, 167 (3), 222–233. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.11.001>
- Romijn, E., Lantican, C. B., Herold, M., Lindquist, E., Ochieng, R., Wijaya, A., Murdiyarso, D., & Verchot, L. (2015). Assessing change in national forest monitoring capacities of 99 tropical countries. *Forest Ecology and Management*, 352, 109–123. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2015.06.003>
- RStudio Team. (2020). *RStudio: Integrated Development for R*. RStudio. PBC. <http://www.rstudio.com/>
- Santoyo, G., del Orozco-Mosqueda, M. C., & Govindappa, M. (2012). Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: A review. *Biocontrol Science and Technology*, 22 (8), 855–872. <https://doi.org/10.1080/09583157.2012.694413>
- Sapes, G., Roskilly, B., Dobrowski, S., Maneta, M., Anderegg, W. R. L., Martinez-Vilalta, J., & Sala, A. (2019). Plant water content integrates hydraulics and carbon depletion to predict drought-induced seedling mortality. *Tree Physiology*, 39 (8), 1300–1312. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpz062>
- Schulte, P. J., & Hinckley, T. M. (1985). A Comparison of Pressure-Volume Curve Data Analysis Techniques. *Journal of Experimental Botany*, 36(171), 1590–1602. <http://jxb.oxfordjournals.org/>
- Shen, X., Shamshina, J. L., Berton, P., Gurau, G., & Rogers, R. D. (2015). Hydrogels based on cellulose and chitin: Fabrication, properties, and applications. *Green Chemistry*, 18 (1), 53–75. <https://doi.org/10.1039/c5gc02396c>
- Shi, Y., Li, J., Shao, J., Deng, S., Wang, R., Li, N., Sun, J., Zhang, H., Zhu, H., Zhang, Y., Zheng, X., Zhou, D., Hüttermann, A., & Chen, S. (2010). Effects of Stockosorb and Luquasorb polymers on salt and drought tolerance of *Populus popularis*. *Scientia Horticulturae*, 124 (2), 268–273. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.12.031>
- Singh, J. S., Pandey, V. C., & Singh, D. P. (2011). Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 140, 339–353. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2011.01.017>
- Skirycz, A., Vandenbroucke, K., Clauw, P., Maleux, K., de Meyer, B., Dhondt, S., Pucci, A., Gonzalez, N., Hoerberichts, F., Tognetti, V. B., Galbiati, M., Tonelli, C., van Breusegem, F., Vuylsteke, M., & Inzé, D. (2011). Survival and growth of *Arabidopsis* plants given limited water are not equal. *Nature Biotechnology*, 29 (3), 212–214.

- Stephens, S. S., & Wagner, M. R. (2007). Forest Plantations and Biodiversity: A Fresh Perspective. *Journal of Forestry*, 105 (6), 307–313. <https://academic.oup.com/jof/article/105/6/307/4599271>
- Takahashi, F., & Shinozaki, K. (2019). Long-distance signaling in plant stress response. *Current Opinion in Plant Biology*, 47, 106–111. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.10.006>
- Tariq, A., Pan, K., Olatunji, O. A., Graciano, C., Li, Z., Li, N., Song, D., Sun, F., Wu, X., Dakhil, M. A., Sun, X., & Zhang, L. (2019). Impact of phosphorus application on drought resistant responses of *Eucalyptus grandis* seedlings. *Physiologia Plantarum*, 166 (4), 894–908. <https://doi.org/10.1111/ppl.12868>
- Thavamanikumar, S., Southerton, S., & Thumma, B. (2014). RNA-Seq using two populations reveals genes and alleles controlling wood traits and growth in *Eucalyptus nitens*. *PLoS ONE*, 9(6), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101104>
- Tng, D. Y. P., Janos, D. P., Jordan, G. J., Weber, E., & Bowman, D. M. J. S. (2014). Phosphorus limits *eucalyptus grandis* seedling growth in an unburnt rain forest soil. *Frontiers in Plant Science*, 5 (527), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00527>
- Toju, H., Peay, K. G., Yamamichi, M., Narisawa, K., Hiruma, K., Naito, K., Fukuda, S., Ushio, M., Nakaoka, S., Onoda, Y., Yoshida, K., Schlaeppi, K., Bai, Y., Sugiura, R., Ichihashi, Y., Minamisawa, K., & Kiers, E. T. (2018). Core microbiomes for sustainable agroecosystems. *Nature Plants*, 4 (5), 247–257. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0139-4>
- Tubert, E., Vitali, V. A., Alvarez, M. S., Tubert, F. A., Baroli, I., & Amodeo, G. (2018). Synthesis and evaluation of a superabsorbent-fertilizer composite for maximizing the nutrient and water use efficiency in forestry plantations. *Journal of Environmental Management*, 210, 239–254. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.12.062>
- Ullah, F., Othman, M. B. H., Javed, F., Ahmad, Z., & Akil, H. M. (2015). Classification, processing and application of hydrogels: A review. *Materials Science and Engineering C*, 57, 414–433. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.07.053>
- Utkhao, W., & Yingjajaval, S. (2015). Changes in leaf gas exchange and biomass of *Eucalyptus camaldulensis* in response to increasing drought stress induced by polyethylene glycol. *Trees - Structure and Function*, 29 (5), 1581–1592. <https://doi.org/10.1007/s00468-015-1240-1>
- Viero, P. W. M., & Little, K. M. (2006). A comparison of different planting methods, including hydrogels, and their effect on eucalypt survival and initial growth in South Africa. *Southern African Forestry Journal*, 208 (1), 5–13. <https://doi.org/10.2989/10295920609505256>
- Vignatti, P., Gonzalez, M. E., Jofré, E. C., Bolívar-Anillo, H. J., Moraga, J., Viaud, M., Collado, I. G., & Pieckenstein, F. L. (2020). Botrydial confers *Botrytis cinerea* the ability to antagonize soil and phyllospheric bacteria. *Fungal Biology*, 124 (1), 54–64. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.11.003>
- Vurukonda, S. S. K. P., Vardharajula, S., Shrivastava, M., & SkZ, A. (2016). Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*, 184, 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.12.003>
- Wang, S., Ouyang, L., Ju, X., Zhang, L., Zhang, Q., & Li, Y. (2014). Survey of Plant Drought-Resistance Promoting Bacteria from *Populus euphratica* Tree Living in Arid Area. *Indian Journal of Microbiology*, 54 (4), 419–426. <https://doi.org/10.1007/s12088-014-0479-3>
- Wardlaw, I. F. (2005). Consideration of apoplastic water in plant organs: A reminder. *Functional Plant Biology*, 32 (6), 561–569. <https://doi.org/10.1071/FP04127>
- Warren, C. R., Aranda, I., & Cano, F. J. (2011). Responses to water stress of gas exchange and metabolites in *Eucalyptus* and *Acacia* spp. *Plant, Cell and Environment*, 34 (10), 1609–1629. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02357.x>

- Warren, C. R., Aranda, I., & Cano, F. J. (2012). Metabolomics demonstrates divergent responses of two *Eucalyptus* species to water stress. *Metabolomics*, 8 (2), 186–200. <https://doi.org/10.1007/s11306-011-0299-y>
- Wei, Z., & Jousset, A. (2017). Plant Breeding Goes Microbial. *Trends in Plant Science*, 22 (7), 555–558. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.04.007>
- Whitehead, D., & Beadle, C. L. (2004). Physiological regulation of productivity and water use in *Eucalyptus*: A review. *Forest Ecology and Management*, 193, 113–140. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2004.01.026>
- Yang, J., Kloepper, J. W., & Ryu, C. M. (2009). Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science*, 14 (1), 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.10.004>
- Yao, J., Sun, D., Cen, H., Xu, H., Weng, H., Yuan, F., & He, Y. (2018). Phenotyping of *Arabidopsis* drought stress response using kinetic chlorophyll fluorescence and multicolor fluorescence imaging. *Frontiers in Plant Science*, 9 (603), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00603>
- Zohuriaan-Mehr, M. J., & Kabiri, K. (2008). Superabsorbent Polymer Materials: A Review. *Polymer Journal*, 17 (6), 451–477. www.SID.ir
- Zohuriaan-Mehr, M. J., Omidian, H., Doroudiani, S., & Kabiri, K. (2010). Advances in non-hygienic applications of superabsorbent hydrogel materials. *Journal of Materials Science*, 45 (21), 5711–5735. <https://doi.org/10.1007/s10853-010-4780-1>



Anexos

Anexo 1

Aportes económicos no reintegrables (AENRs) otorgados por la nación bajo el marco de la ley N° 25.080 (prorrogada por la ley N° 26.432). Los datos se muestran discriminados por año (período 2000 a 2019), actividad forestal y provincia, junto con el número de productores forestales beneficiarios registrados.

Fuente:

Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca, Subsecretaría de Agricultura, Dirección Nacional de Desarrollo Foresto-Industrial.

https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/ss_desarrollo_foresto_industrial/estadisticas/AENRs_2000_2019.pdf

Por Año

Año	Monto aprobado en \$	Superficie Forestación en ha	Superficie Poda en ha	Superficie Raleo en ha	Superficie Manejo del Rebrote en ha	Superficie Enriquecimiento del Bosque Nativo en ha	Superficie Total Beneficiada en ha	Forestadores en nro.
2000	949.869							1.404
2001	519.519							741
2003	23.398.261	46.397	15.864	4.586	2.317	1.562	70.726	4.670
2004	11.028.712	21.903	4.732	1.461	1.017	1.558	30.671	1.830
2005	24.215.470	34.213	20.045	6.821	3.168	430	64.676	1.729
2006	26.683.213	31.331	19.390	7.195	2.168	499	60.584	2.360
2007	42.640.824	36.995	30.176	15.172	2.475	716	85.534	3.886
2008	48.629.996	30.306	25.865	9.125	1.934	527	67.756	4.941
2009	83.090.999	36.676	28.204	7.300	1.612	480	74.272	4.526
2010	84.572.284	33.487	29.242	9.272	2.608	681	75.289	2.710
2011	81.161.982	28.388	23.959	5.501	839	392	59.079	3.460
2012	149.795.080	43.759	46.333	13.156	4.221	1.618	109.088	3.050
2013	99.999.935	21.569	31.512	12.165	3.157	469	68.872	1.131
2014	122.353.597	17.666	32.107	8.187	2.029	1.606	61.595	2.057
2015	100.585.088	13.910	18.737	7.426	911	771	41.755	882
2016	267.049.744	26.047	53.453	16.028	3.209	979	99.715	1.782
2017	198.531.613	15.878	36.802	9.069	1.092	771	63.611	1.114
2018	178.874.730	17.153	23.035	9.792	1.390	385	51.756	755
2019	592.216.494	28.399	59.835	13.608	4.308	718	106.326	1.754
Total general	2.136.297.411	484.078	499.289	155.865	38.456	14.160	1.191.307	44.782

Nota: En 2000 y 2001 solo se pagaron adelantos de planes agrupados. En 2002 no se pagaron planes de la Ley n° 25.080. Para el 2019, AENRs al 3 de diciembre de 2019. No incluye superficie ni planes con beneficios fiscales.

Por provincia

Provincia	Monto aprobado en \$	Superficie Forestación en ha	Superficie Poda en ha	Superficie Raleo en ha	Superficie Manejo del Rebrote en ha	Superficie Enriquecimiento del Bosque Nativo en ha	Superficie Total Beneficiada en ha	Forestadores en nro.
BUENOS AIRES	62.983.141	19.706	5.817	1.008	4.309		30.840	818
CATAMARCA	18.944	13	26	5			44	6
CHACO	9.679.894	1.177	1.556	457		458	3.648	346
CHUBUT	83.672.523	16.283	13.299	8.110		121	37.813	457
CORDOBA	12.164.427	4.669	2.398	753		90	7.909	144
CORRIENTES	760.811.068	161.205	220.319	79.883	5.879	9	466.754	3.269
ENTRE RIOS	356.153.352	58.771	78.575	13.793	26.546	572	178.257	3.323
FORMOSA	6.997.567	956	638	284		785	2.663	1.525
JUJUY	8.263.902	1.376	160	77		610	2.223	45
LA PAMPA	480.874	426	43				469	11
LA RIOJA	733.684	391					391	2
MENDOZA	24.933.802	5.454	2.317	7	20		7.798	720
MISIONES	716.103.129	190.257	161.346	45.893	386	9.480	407.362	33.224
NEUQUEN	44.927.884	15.081	10.000	4.694	13		29.789	217
RIO NEGRO	8.043.036	1.857	1.271	863		6	3.998	81
SALTA	16.120.681	1.643	461			723	2.826	58
SAN JUAN	2.288.395	669	147	33	19		868	88
SAN LUIS	1.757.265	198	72				270	128
SANTA CRUZ	5.363	13					13	4
SANTA FE	5.991.563	1.220	317	2	1.265		2.804	62
SGO. DEL ESTERO	10.985.355	1.989	431	2		1.051	3.472	197
TUCUMAN	3.181.560	726	95		18	257	1.097	57
Total	2.136.297.411	484.078	499.289	155.865	38.456	14.160	1.191.307	44.782

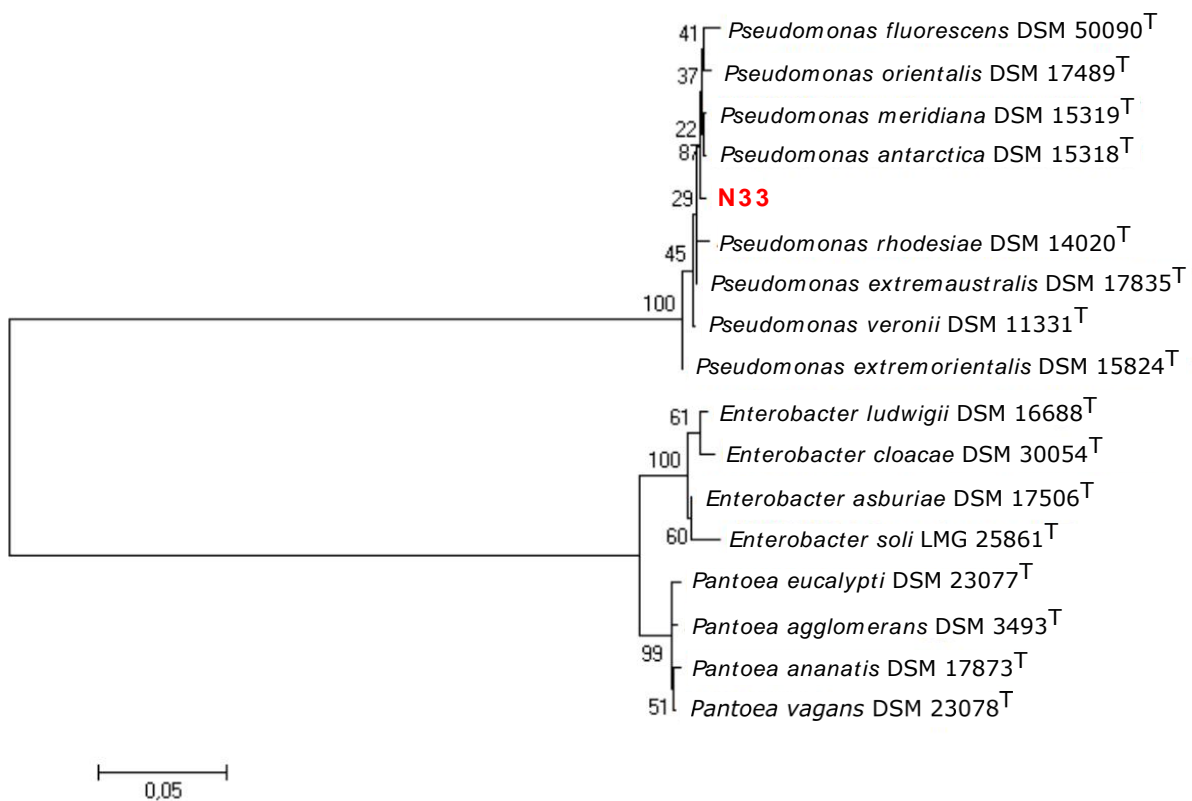
Nota: No incluye superficie ni planes con beneficios fiscales. Información al 26 de octubre de 2019.

Anexo 2

Identificación taxonómica de la cepa N33.

El estudio fue realizado en el Instituto Tecnológico de Chascomús (INTECH, CONICET-UNSAM), por los doctores Luis Nazareno Castagno y María Elisa González, del laboratorio de 'Interacciones planta-microorganismo', dirigido por el Dr. Fernando Pieckenstain. El análisis se basó en la comparación de la secuencia de ARN ribosomal 16S de la cepa N33 con secuencias de cepas de referencia obtenidas de la base de datos curada RDP (Ribosomal Database Project release 11.5, Cole *et al.*, 2014). Para establecer la posición filogenética de la cepa N33 las secuencias se alinearon usando el modulo Clustal implementado por el programa MEGA versión 7.0 (Kumar *et al.*, 2018). El árbol filogenético se construyó mediante el método de Máxima Verosimilitud.

Para conocer la secuencia de ARNr 16S, la cepa N33 fue cultivada en agitación por 48 horas a 28°C en medio LB. El ADN total se extrajo a partir de 3 mL de cultivo, siguiendo el protocolo descrito por Estrella y colaboradores (Estrella *et al.*, 2009). La secuencia del ARNr 16S se amplificó por PCR utilizando los cebadores universales para bacterias: 41f (5' -GCTCAAGATTGAACGCTGGCG- 3') y 1488r (5' -CGGTTACCTTGTTACGACTTCACC- 3'). Los productos de la amplificación fueron purificados usando el Kit comercial GFX (GE Healthcare, Little Chalfont Buckinghamshire, Reino Unido) y enviados al servicio Macrogen, Korea para su secuenciación.



Árbol filogenético de la cepa N33. Se muestra el árbol filogenético basado en secuencias parciales del ARNr16S (1319 nucleótidos) usando los modelos de Hasegawa-Kishino-Yano (1985) y de distribución gamma (G+I). Los números en los puntos de ramificación indican el resultado del análisis de bootstrap con 1000 réplicas. El análisis fue realizado con el programa MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2018).

Como información complementaria, la siguiente tabla muestra los porcentajes de identidad resultantes de alinear la secuencia obtenida de la cepa N33 con el resto de las cepas pertenecientes al género *Pseudomonas*. De cada una de ellas se muestra el código de identificación en la Colección Alemana de Microorganismos (<https://www.dsmz.de>). La secuencia nucleotídica obtenida de la cepa N33 fue depositada en la base de datos GenBank bajo el código de acceso MT792080.

Especie	ID cepa tipo	N° acceso NCBI	Porcentaje de identidad	Referencia
<i>Pseudomonas extremaustralis</i>	DSM17835	AJ583501.3	99.63%	Ayub,N.D., Pettinari,M.J., Ruiz,J.A. and Lopez,N.I. A polyhydroxybutyrate-producing <i>Pseudomonas</i> sp. isolated from Antarctic environments with high stress resistance <i>Curr. Microbiol.</i> 49 (3), 170-174 (2004)
<i>Pseudomonas veronii</i>	DSM11331	AF064460.1	99.56%	Elomari,M., Coroler,L., Hoste,B., Gillis,M., Izard,D. and Leclerc,H. DNA relatedness among <i>Pseudomonas</i> strains isolated from natural mineral waters and proposal of <i>Pseudomonas veronii</i> sp. nov <i>Int. J. Syst. Bacteriol.</i> 46 (4), 1138-1144 (1996)
<i>Pseudomonas antarctica</i>	DSM15318	AJ537601.1	99.48%	Reddy,G.S., Matsumoto,G.I., Schumann,P., Stackebrandt,E. and Shivaji,S. Psychrophilic pseudomonads from Antarctica: <i>Pseudomonas antarctica</i> sp. nov., <i>Pseudomonas meridiana</i> sp. nov. and <i>Pseudomonas proteolytica</i> sp. nov <i>Int. J. Syst. Evol. Microbiol.</i> 54 (PT 3), 713-719 (2004)
<i>Pseudomonas meridiana</i>	DSM15319	AJ537602.1	99.48%	Reddy,G.S., Matsumoto,G.I., Schumann,P., Stackebrandt,E. and Shivaji,S. Psychrophilic pseudomonads from Antarctica: <i>Pseudomonas antarctica</i> sp. nov., <i>Pseudomonas meridiana</i> sp. nov. and <i>Pseudomonas proteolytica</i> sp. nov <i>Int. J. Syst. Evol. Microbiol.</i> 54 (PT 3), 713-719 (2004)
<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	DSM14020	AF064459.1	99.26%	Coroler,L., Elomari,M., Hoste,B., Gillis,M., Izard,D. and Leclerc,H. <i>Pseudomonas rhodesiae</i> sp. nov., a new species isolated from natural mineral waters <i>Syst. Appl. Microbiol.</i> 19, 600-607 (1996)
<i>Pseudomonas orientalis</i>	DSM17489	AF064457.1	99.26%	Dabboussi,F., Hamze,M., Elomari,M., Verhille,S., Baida,N., Izard,D. and Leclerc,H. Taxonomic study of bacteria isolated from Lebanese spring waters: proposal for <i>Pseudomonas cedrella</i> sp. nov. and <i>P. orientalis</i> sp. nov <i>Res. Microbiol.</i> 150 (5), 303-316 (1999)
<i>Pseudomonas extremorientalis</i>	DSM15824	AF405328.1	99.04%	Ivanova,E.P., Gorshkova,N.M., Sawabe,T., Hayashi,K., Kalinovskaya,N.I., Lysenko,A.M., Zhukova,N.V., Nicolau,D.V., Kuznetsova,T.A., Mikhailov,V.V. and Christen,R. <i>Pseudomonas extremorientalis</i> sp. nov., isolated from a drinking water reservoir <i>Int. J. Syst. Evol. Microbiol.</i> 52 (PT 6), 2113-2120 (2002)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DSM50090	D84013.1	98.74%	Anzai,Y., Kudo,Y. and Oyaizu,H. The phylogeny of the genera <i>Chryseomonas</i> , <i>Flavimonas</i> , and <i>Pseudomonas</i> supports synonymy of these three genera <i>Int. J. Syst. Bacteriol.</i> 47 (2), 249-251 (1997)

Anexo 3

Condiciones ambientales de la ciudad de La Plata durante el año 2018.

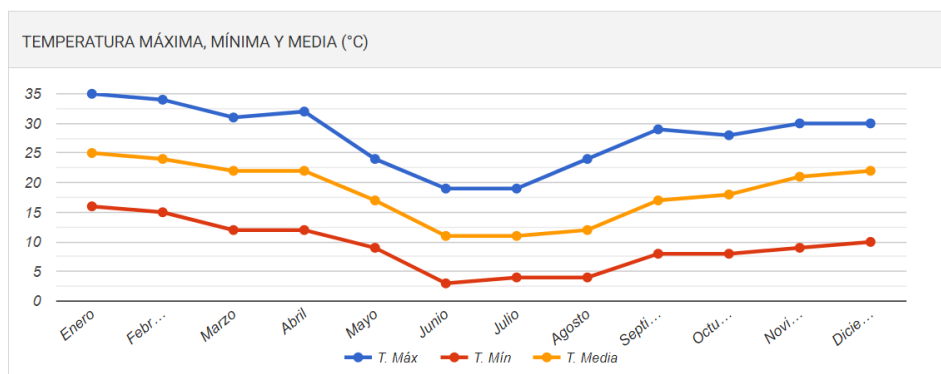
Fuentes:

Servicio Meteorológico Nacional (SMN), repositorio de informes climáticos, monitoreos meteorológicos y boletines climatológicos:

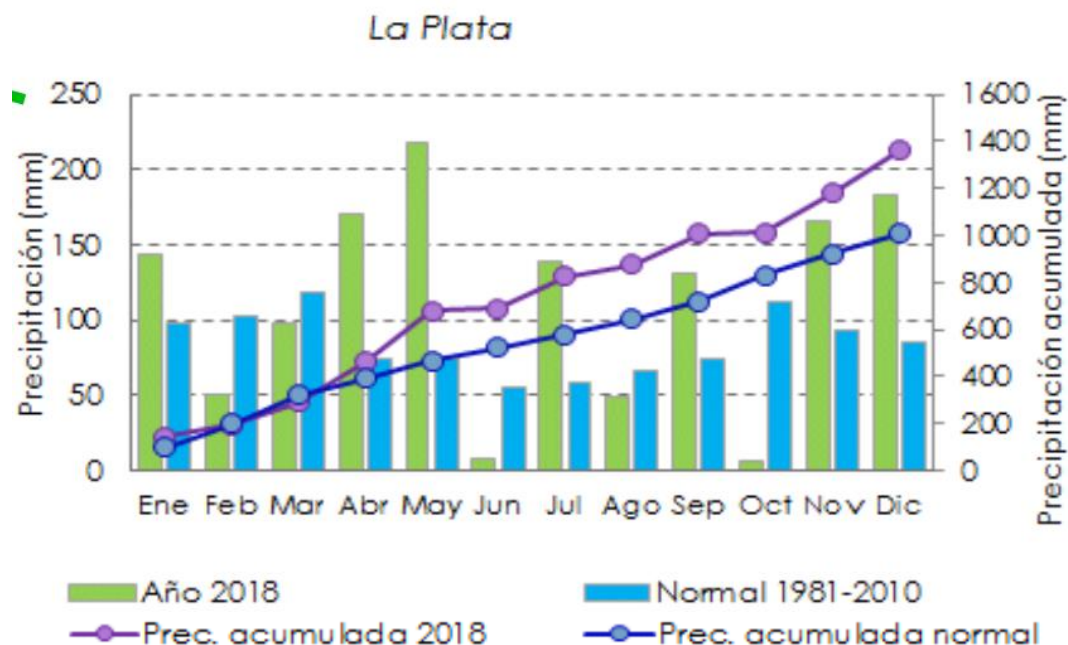
<http://repositorio.smn.gob.ar/>

Boletín climatológico anual 2018 del SMN:

<http://repositorio.smn.gob.ar/bitstream/>



Climograma con el registro de temperaturas máximas, mínimas y medias por mes. Se observa un descenso de 13 °C en la temperatura media, entre febrero y junio, que fueron los meses en los que se llevó a cabo el ensayo de inoculaciones individuales en invernadero (S3.1).

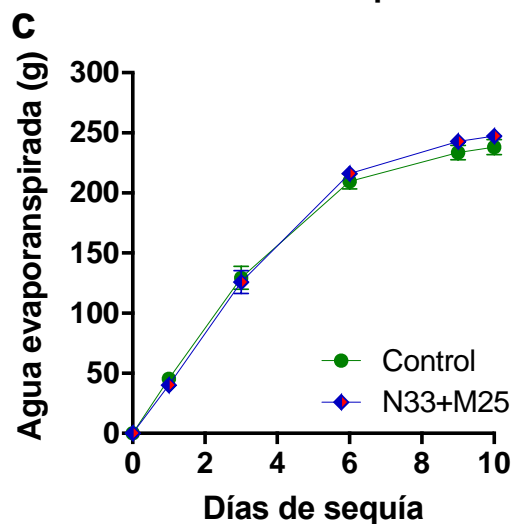
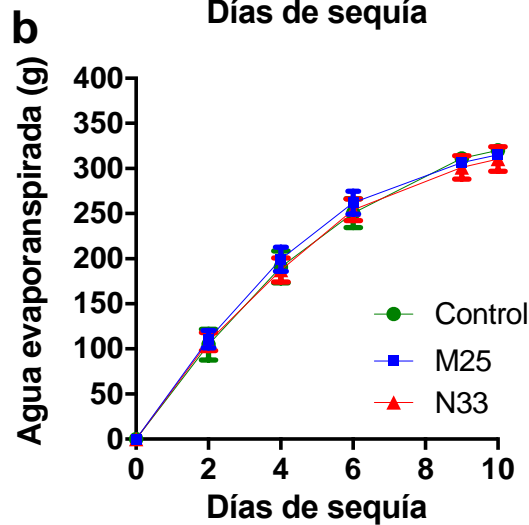
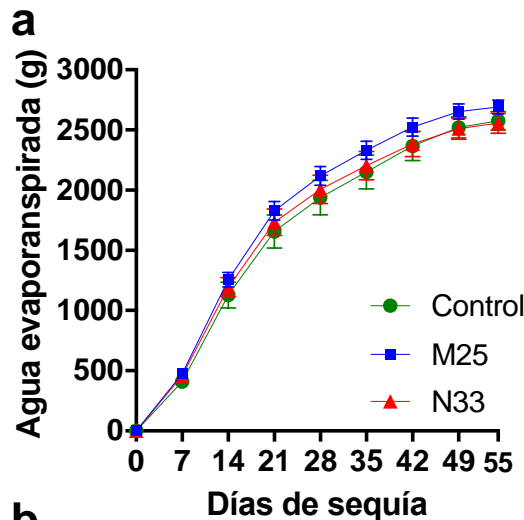


Pluviograma con el registro de precipitaciones mensuales y acumuladas durante 2018, comparado con los datos históricos promedio del período 1981-2010. Se observa una mayor incidencia de lluvias en 2018 respecto a lo esperado según el registro histórico, sobre todo en los meses de abril y mayo, coincidente con el período de sequía del ensayo de inoculaciones individuales en invernadero (S3.1).

Anexo 4

Comparación del agua total evapotranspirada durante el período de sequía en invernadero y en cámara de cultivo. La variable fue evaluada como la diferencia de peso de cada unidad experimental respecto a su peso inicial previo a la suspensión del riego. Los puntos muestran la media de cada tratamiento junto con su error estándar.

(a) Ensayo de inoculaciones individuales y sequía gradual en invernadero, n = 12 ([S3.1](#)).
 (b) Ensayo de inoculaciones individuales y sequía rápida en cámara de cultivo, n = 8 ([S3.2](#)). (c) Ensayo de coinoculación y sequía rápida en cámara de cultivo, n = 10 ([S3.3](#)).



Lic. José María Chaín

Dra. Irene Baroli
 Prof. Adjunta DP DBBE - FCEN - UBA
 Inv. Adjunta IBBEA - CONICET - UBA

Dra. Irene Mabel Baroli

Dra. Gabriela Amodeo