

# UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO



“Trabajo Final Presentado para Optar al Grado de Ingeniero Agrónomo”

**Implicancias del etileno y los polifenoles en la tolerancia a distintas sales de la leguminosa halófito *Prosopis strombulifera* (Lam.) Benth.**

**MINA, Nicolás Jesús**  
D.N.I.: 30709790

Directora: Dra. Maria Virginia Luna  
Codirectora: Dra. Mariana Andrea Reginato

Departamento de Ciencias Naturales  
Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales

**Río Cuarto – Córdoba**  
**Mayo / 2014**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO  
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA**

**CERTIFICADO DE APROBACIÓN**

**Título del Trabajo Final:** Implicancias del etileno y los polifenoles en la tolerancia a distintas sales de la leguminosa halófila *Prosopis strombulifera* (Lam.) Benth.

**Autor:** Mina, Nicolás Jesús  
**D.N.I. :** 30709790

**Directora:** Dra. Maria Virginia Luna  
**Co-Directora:** Dra. Mariana Andrea Reginato

**Aprobado y corregido de acuerdo con las sugerencias del Jurado Evaluador:**

Ing. Agr. PhD. Juan José Cantero \_\_\_\_\_

Ing. Agr. Cesar Omar Nuñez \_\_\_\_\_

**Fecha de Presentación:** \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**Aprobado por Secretaría Académica:** \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

---

**Secretario Académico**

## **Agradecimientos**

Por el constante apoyo, quiero compartir este trabajo que concluye una etapa muy importante para mí con aquellas personas que siempre estuvieron a mi lado. Carlos y Mónica, mis padres, en especial dedico mi esfuerzo para sumarlo al de ellos, y en conjunto lograr este objetivo tan ansiado. A mis hermanos Carlos y Sarah, compañeros de vida y amigos. Mi señora Giselle, a quien amo y compartiré el resto de mi vida a su lado. A mis amigos, que me ayudaron y ayudan a no bajar nunca los brazos. A Virginia y Mariana, mis directores, que guiaron mi trabajo y sin su colaboración se hubiese hecho muy difícil concluir esta etapa. Y por último a los integrantes en su totalidad de los laboratorios 5 y 6 de Fisiología Vegetal que hicieron más que ameno mi trabajo de los últimos cinco años.

Todos ellos, y nuestro Señor, no solo me acompañaron en mi formación profesional sino que cada día luchan para que sea una mejor persona.

De corazón, mi más sentido agradecimiento.

## **INDICE**

RESUMEN	V
SUMMARY	VI
INTRODUCCION	1
1. El problema de la salinidad	1
2. Características generales de los suelos salinos	1
3. Efectos de la salinidad en el crecimiento de las plantas	2
4. Tolerancia a salinidad. El concepto de halófito	3
5. <i>Prosopis strombulifera</i> , una leguminosa halófito	4
6. Inducción de hormonas vegetales por estrés	7
7. Rol del etileno en la respuesta vegetal al estrés salino	7
8. El sistema antioxidante	10
9. Polifenoles y flavonoides	11
HIPOTESIS	13
OBJETIVOS	13
1. Objetivo general	13
2. Objetivos específicos	13
MATERIALES Y METODOS	14
1. Crecimiento de plántulas en cultivo hidropónico	14
2. Tratamientos salinos	15
3. Determinación de parámetros de crecimiento	17
4. Evaluación de los niveles de etileno	17
5. Extracción y cuantificación de polifenoles	19
6. Análisis estadístico	20
RESULTADOS	21
1. Parámetros de crecimiento	21
2. Producción de etileno	23
3. Niveles de polifenoles	24
DISCUSION	30
CONCLUSIONES	33
BIBLIOGRAFIA	35
ANEXO	41

## **INDICE DE FIGURAS**

<b>Fig. 1.</b> Planta de <i>P. strombulifera</i> en las salinas de San Luis	5
<b>Fig. 2.</b> Inflorescencia y fruto de <i>P. strombulifera</i>	6
<b>Fig. 3.</b> Molécula de etileno	8
<b>Fig. 4.</b> Ruta biosintética del etileno	8
<b>Fig. 5.</b> Vía de catabolismo de etileno	9
<b>Fig. 6.</b> Estructura típica de un flavonoide	11
<b>Fig. 7.</b> Características anatómicas de la sección transversal de folíolos de plantas de 48 días de cultivo	12
<b>Fig. 8.</b> Área de muestreo en las Salinas del Bebedero.	14
<b>Fig. 9.</b> Plántulas de <i>P. strombulifera</i> en cultivo hidropónico.	15
<b>Fig. 10.</b> Curva de calibración utilizada para la cuantificación de etileno.	17
<b>Fig. 11.</b> Diagrama de un cromatógrafo de gases.	19
<b>Fig. 12.</b> Crecimiento de parte aérea de plántulas de <i>Prosopis strombulifera</i> en cultivo hidropónico bajo tratamientos con diferentes sales	21
<b>Fig. 13.</b> Crecimiento de raíces de plántulas de <i>Prosopis strombulifera</i> en cultivo hidropónico bajo tratamientos con diferentes sales	22
<b>Fig. 14.</b> Producción de fenoles totales en hojas de <i>Prosopis strombulifera</i> según los distintos tratamientos salinos	24
<b>Fig. 15.</b> Producción de proantocianidinas en hojas de <i>Prosopis strombulifera</i> según los distintos tratamientos salinos	25
<b>Fig. 16.</b> Producción de flavan-3-oles en hojas de <i>Prosopis strombulifera</i> según los distintos tratamientos salinos	26
<b>Fig. 17.</b> Producción de flavonoides en hojas de <i>Prosopis strombulifera</i> según los distintos tratamientos salinos	27
<b>Fig. 18.</b> Producción de flavonoles en hojas de <i>Prosopis strombulifera</i> según los distintos tratamiento salinos	28
<b>Fig. 19.</b> Producción de ésteres de ácido tartárico en hojas de <i>Prosopis strombulifera</i> según los distintos tratamientos salinos	29
<b>Fig. A.</b> Cultivo hidropónico.	41
<b>Fig. B.</b> Cultivo de plantas para ensayos de etileno.	41
<b>Fig. C.</b> Preparación del dispositivo para cuantificación de etileno.	42
<b>Fig. D.</b> Incubación del dispositivo en oscuridad	43

## RESUMEN

### **Implicancias del etileno y los polifenoles en la tolerancia a distintas sales de la leguminosa halófito *Prosopis strombulifera* (Lam.) Benth.**

La salinización de los suelos disminuye la frontera agrícola y ganadera generando suelos de baja productividad. Esta situación justifica la búsqueda de nuevas alternativas destinadas a ampliar la superficie de siembra en condiciones edáficas limitantes y/o incrementar la productividad de las mismas. Por lo tanto, el mejoramiento genético de especies cultivadas para tolerancia a salinidad se ha convertido en una necesidad urgente para el futuro de la agricultura en regiones áridas y semiáridas.

Al ser *Prosopis strombulifera* una leguminosa halófito se la escogió para evaluar sus mecanismos bioquímicos y fisiológicos de tolerancia a salinidad, y poder corroborar la hipótesis de que tanto, el etileno como los polifenoles, forman parte de estos. Cabe destacar que su característica de leguminosa nos permite pensar en extrapolar los resultados de este trabajo, sumado a otros y con el posterior avance genético, y así colaborar en el desarrollo de especies de interés agrícola tolerantes a salinidad.

El objetivo de este trabajo fue aportar conocimientos sobre los mecanismos bioquímicos y fisiológicos de tolerancia a salinidad en la halófito *Prosopis strombulifera* y su regulación hormonal, interpretando las posibles interrelaciones entre producción de etileno y síntesis de polifenoles, analizando el efecto de cada sal en particular. Se utilizaron semillas de *P. strombulifera* recolectadas en las salinas de San Luis. Los tratamientos salinos consistieron en el agregado de NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y su mezcla isoosmótica al medio de cultivo hidropónico (Hoagland 25%). La cuantificación de etileno se realizó por cromatografía de gases y la determinación de las distintas clases de polifenoles por espectrofotometría.

Si bien los resultados sobre la participación del etileno en la tolerancia a salinidad de esta especie no pudieron ser completados en este estudio, podemos afirmar que los tratamientos salinos estimularon diferencialmente la acumulación de distintos polifenoles tanto en hojas como en raíces. Estos compuestos formarían parte del sistema antioxidante no enzimático en *P. strombulifera* y complementarían la acción del sistema antioxidante enzimático permitiendo la extrema tolerancia de esta especie. Por otra parte, nuestros resultados demuestran que las interacciones iónicas que ocurren entre las distintas sales encontradas frecuentemente en suelos salinos pueden modificar de manera considerable las respuestas fisiológicas a salinidad de una especie determinada.

Palabras clave: salinidad; *Prosopis strombulifera*; etileno; polifenoles.

## SUMMARY

### **Implications of ethylene and polyphenols in different salt tolerance of the legume halophyte *Prosopis strombulifera* (Lam.) Benth.**

Soils salinization decreases the agricultural frontier generating soils of low productivity. This situation justifies the search for new alternatives for expanding crop areas in edaphic conditions and/or increase productivity thereof. For that reason, genetic improvement of crop species for salt tolerance has become an urgent need for the future of agriculture in arid and semiarid regions.

The legume halophyte *Prosopis strombulifera* was chosen to assess their biochemical and physiological mechanisms of salt tolerance, and to corroborate the hypothesis that both, ethylene and polyphenols, are part of these. The characteristic of legume allows to extrapolate the results of this study, together with others studies and the subsequent genetic advance, and contribute to the development of others legumes of agricultural interest.

The aim of this study was to provide knowledge about the biochemical and physiological mechanisms of salt tolerance in the halophyte *P. strombulifera* and their hormonal regulation, analyzing possible relationships between ethylene production and synthesis of polyphenols and bearing in mind the effect of each salt in particular. We used seeds of *P. strombulifera* collected from a saline area at the San Luis province. Salt treatments consisted in addition of NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and their isoosmotic mixture to the hydroponic growth medium (25% Hoagland's solution). Ethylene quantification was performed by gas chromatography and determination of different classes of polyphenols was performed by spectrophotometry.

While the results about the ethylene participation in salt tolerance of this specie cannot be completed in this study, we found that salt treatments differentially stimulated the accumulation of different polyphenols in both, leaves and roots. These compounds will be part of the antioxidant system in *P. strombulifera* and will complement the action of the enzymatic antioxidant system allowing the extreme salt tolerance of this species. Moreover, we demonstrate that ionic interactions between different salts found in soils can greatly modify the physiological responses of a given species to salinity.

Keywords: salinity; *Prosopis strombulifera*; ethylene; polyphenols.

## INTRODUCCION

### 1. El problema de la salinidad

Las condiciones de estrés ambiental, en particular la sequía y la salinidad, son actualmente los principales factores que reducen la producción vegetal a nivel mundial. Especialmente la salinidad, es un problema en aumento que afecta el 20% de la superficie cultivada y casi la mitad del área bajo irrigación, siendo el principal factor limitante de una agricultura sustentable, al punto que el mejoramiento genético de plantas para tolerancia a salinidad se ha convertido en una necesidad urgente para el futuro de la agricultura en regiones áridas y semiáridas (Boyer, 1982; Owens, 2001; Flowers, 2006).

Irán, Pakistán, Egipto y Argentina son ejemplos de países con serios problemas de salinidad en regiones áridas y semiáridas, con una superficie afectada por salinidad de 23.8, 10, 8.7, y 33.1 millones de Ha. respectivamente (FAO, 2008). En la República Argentina, estas 33.100.000 Has están sometidas a excesos de agua y sales (incluyendo sólo los ambientes húmedos y las áreas bajo riego), creándose condiciones ecológicas extremas que reducen drásticamente su productividad debido a un alto dinamismo espacial y temporal dado por factores climáticos, edáficos y de manejo. En el centro-sur de Córdoba estos procesos adquieren una dimensión económica y social debido a la gran superficie afectada y a su ritmo de evolución (Cisneros *et al.*, 1997; 2012).

### 2. Características generales de los suelos salinos

Los suelos salinos se encuentran prácticamente en todas las regiones climáticas, pero se concentran principalmente en zonas de climas áridos y semiáridos, donde la acumulación de sales ocurre como consecuencia de las escasas precipitaciones y la elevada evapotranspiración característica de estos climas, lo que tiende a concentrar las sales en los suelos y en el agua superficial.

La salinidad puede ser clasificada como primaria, o secundaria. En la primera, la salinidad resulta de la acumulación de sales por largos períodos de tiempo por procesos naturales, como el lavado de roca madre que contiene sales solubles como cloruros, sulfatos y carbonatos y la deposición de sales oceánicas arrastradas por el viento y la lluvia. La salinización secundaria resulta de la actividad humana que cambia el balance hidrológico en el suelo entre el agua aplicada (lluvias o irrigación) y el agua utilizada por los cultivos (transpiración) y evaporada desde la superficie (Ghassemi *et al.*, 1995; Munns, 2005).

El grado de salinización y el tipo de sales presentes varía por lo tanto en los diferentes tipos de suelo y con la fuente de provisión de agua de los mismos. Los cationes principales que componen la solución del suelo en ambientes salinos son  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , mientras que los aniones principales



son  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  y  $\text{CO}_3\text{H}^-$  en la mayoría de los casos. Los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  han sido considerados los más importantes, ya que el  $\text{Na}^+$  en particular causa deterioro de la estructura física del suelo, y ambos iones son tóxicos para las plantas (Hasegawa *et al.*, 2000).

Todas las sales pueden afectar el crecimiento vegetal, pero no todas pueden inhibirlo. Las sales no actúan solas en los suelos, sino que interactúan en sus efectos sobre las plantas; algunas de esas interacciones son simples, como las que existen entre los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  y otras son de mayor complejidad (Tester y Davenport, 2003).

### **3. Efectos de la salinidad en el crecimiento de las plantas**

Los efectos del estrés salino son el resultado combinado de complejas interacciones entre diferentes procesos morfológicos, fisiológicos y bioquímicos, resultando en la inhibición del crecimiento vegetal, como efecto más generalizado. Las respuestas de las plantas cultivadas al estrés salino varían con la concentración de sal, el tipo de sal usado, la longitud del período de exposición, las variedades o cultivares y la etapa del crecimiento y desarrollo (Reddy *et al.*, 1997; Sosa *et al.*, 2005).

Desde el punto de vista fisiológico, los estadios de germinación y crecimiento de plántula son las etapas críticas en el establecimiento de una especie bajo condiciones naturales en estos ambientes.

Los dos componentes del estrés salino, efecto osmótico y toxicidad iónica, también tienen efectos deletéreos específicos a nivel celular. Según Munns *et al.* (1995), en plantas cultivadas habría una primera fase de reducción del crecimiento causada por el potencial osmótico de la solución del suelo que rodea a las raíces, que disminuye la disponibilidad de agua por las mismas y en consecuencia afectaría a todas las especies de manera similar. Esta fase sería de corta duración en aquellas especies de crecimiento rápido. La segunda fase comenzaría cuando las hojas han acumulado sal en cantidades que resultan tóxicas, provocando daño metabólico y reduciendo así el aporte de asimilados a las zonas en crecimiento. Este es el efecto iónico específico del estrés salino (Munns, 2005). Evidentemente, esta fase sería más corta y notable en aquellas especies incapaces de excluir la sal o compartimentalizarla en las vacuolas. Shannon y Grieve (1999) han propuesto que el componente osmótico del estrés salino contribuye a la reducción del crecimiento, cambios en color de la hoja y en la relación raíz/tallo mientras que los efectos iónicos se manifiestan generalmente como daños en las hojas y meristemas o como síntomas típicos de desórdenes nutricionales. Por otra parte, las altas concentraciones intracelulares de  $\text{Na}^+$  y/o de  $\text{Cl}^-$  son tóxicas, puesto que inhiben la actividad de muchos sistemas enzimáticos y de algunos procesos celulares tales como síntesis de proteínas o procesamiento del mRNA (Yeo, 1998; Zhu, 2001; Forment *et al.*, 2002).

#### 4. Tolerancia a salinidad. El concepto de halófito.

La tolerancia al estrés salino ha sido definida como la habilidad inherente que poseen las plantas de resistir los efectos de altas concentraciones de sales en las raíces o en las hojas sin un efecto adverso significativo (Shannon y Grieve, 1999). Las plantas pueden clasificarse de acuerdo a su sensibilidad a la salinidad en glicófitas y halófitas (Levitt, 1980; Shannon, 1994). Las plantas halófitas son aquellas que pueden completar su ciclo de vida en una concentración salina de al menos 200 mM bajo condiciones similares a aquellas encontradas en el ambiente natural (Flowers *et al.*, 1986). Según esta definición clásica podemos separar dos tipos de plantas halófitas; las halófitas naturales y aquellas plantas que toleran la salinidad pero que normalmente no se encuentran en ambientes salinos (Flowers y Colmer, 2008).

Las plantas halófitas pueden vivir bajo las condiciones salinas más variadas, no sólo tolerando altos niveles de salinidad, sino presentando niveles óptimos de crecimiento bajo estas condiciones (Khan y Ungar, 2000). Sin embargo, los procesos biosintéticos fundamentales para el metabolismo de la planta, como fotosíntesis y respiración son igualmente sensibles a salinidad en estas especies que en glicófitas (Volkmar *et al.*, 1998).

La prevención de los daños por estrés y distintas vías de reparación son necesarias para la supervivencia celular bajo niveles metabólicamente inhibitorios de estrés iónico y osmótico tanto en especies glicófitas como halófitas. Estas estrategias pueden incluir el ajuste osmótico, acumulación de osmoprotectores, manejo del estrés oxidativo, inducción de proteínas de estrés (proteínas LEA o chaperonas) y otras adaptaciones fisiológicas como modificaciones en el crecimiento y en la tasa transpiratoria.

Por lo tanto, la tolerancia a salinidad depende en gran parte de la compartimentalización celular de iones tóxicos ya que tanto halófitas como glicófitas no pueden tolerar altas concentraciones iónicas en el citoplasma.

Las plantas tolerantes tienen la capacidad de compartimentalizar los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en la vacuola, para mantener en el citoplasma concentraciones sustancialmente más bajas de iones que evitan así la inhibición de procesos metabólicos. Esta capacidad de regular la concentración iónica a través de la compartimentalización es uno de los aspectos más importantes de la tolerancia a salinidad. Resulta obvio pensar entonces que en plantas tolerantes deben operar distintos mecanismos de control del transporte de  $\text{Na}^+$  en varios niveles: 1) selectividad en la incorporación de iones por las células de la raíz, 2) regulación de la carga al xilema, 3) remoción de sales del xilema hacia la corriente transpiratoria por células de los tejidos adyacentes 4) compartimentalización eficiente en vacuolas de los iones que inevitablemente llegan a los tejidos (Blumwald *et al.*, 2000). Sin embargo, un papel positivo para la incorporación de iones bajo condiciones salinas es el mantenimiento de las concentraciones iónicas para el ajuste osmótico, evitando pérdida de agua de la célula, siendo este mecanismo metabólicamente más favorable para la planta ya que permite ahorrar la energía que se

utiliza en la síntesis de solutos orgánicos para el ajuste osmótico (Reddy *et al.*, 1997; Manchanda y Garg, 2008). Para neutralizar la incorporación excesiva de cationes, las plantas han desarrollado diversos mecanismos alternativos tales como la acumulación de aniones como  $\text{Cl}^-$  y/o  $\text{NO}_3^-$  (Martínez-Ballesta *et al.*, 2004) o la acumulación de iones orgánicos para secuestrar  $\text{Na}^+$  del citoplasma. Sin embargo, y a pesar del costo energético, muchas especies acumulan osmolitos orgánicos como prolina, betaína, polioles, azúcar-alcoholes y azúcares solubles que actúan protegiendo el citoplasma y les permiten tolerar el estrés osmótico. Aunque el rol principal de estos osmolitos sería el ajuste osmótico, también podrían estar involucrados en el secuestro de especies reactivas del oxígeno (EROs) que se generan durante el estrés salino (Chen y Murata, 2002).

Por lo tanto, la ventaja de las especies halófitas sobre las glicófitas puede resultar simplemente de una regulación bioquímica más eficiente o de unos pocos mecanismos bioquímicos adicionales de tolerancia (Bohnert *et al.*, 1995), aunque algunas líneas de evidencia sugieren que todas las plantas usan los mismos mecanismos regulatorios que le confieren tolerancia a salinidad, y que las diferencias entre especies glicófitas y halófitas son de naturaleza cuantitativa más que cualitativa (Zhu, 2001).

Por esta razón, se ha vuelto necesario incrementar el conocimiento de la fisiología y bioquímica especializada de especies halófitas, las cuales le proveen su excepcional grado de tolerancia a salinidad, y el cual continúa siendo insuficiente, a pesar de los esfuerzos realizados en la última década.

## **5. *Prosopis strombulifera*, una leguminosa halófito**

Las leguminosas son relevantes para los sistemas de cultivos sustentables y pueden ofrecer muchos beneficios económicos y ambientales. En nuestro país existen ejemplos de leguminosas exitosamente adaptadas a ambientes salinos y diferenciadas evolutivamente en su estrategia de tolerancia a la sal. Estas leguminosas son de gran importancia, ya que pueden mejorar la fertilidad de los suelos salinos en los que se encuentran y ayudar a reintroducir la agricultura en aquellos suelos pobres debido a su capacidad como fijadoras de N en simbiosis con rizobios (Manchanga y Garg, 2008).

Dentro de estas leguminosas pueden encontrarse algunos miembros de la subfamilia Mimosoideas como el género *Prosopis*, en el cual existen muchas especies que son importantes como componentes arbóreos y arbustivos de zonas salinas en América (Burkart, 1937; 1952; 1976). El área de distribución del género *Prosopis* es muy amplia, principalmente en zonas áridas y semiáridas del mundo, existiendo 44 especies que crecen principalmente en América del Sur. Dentro del género podemos encontrar variados tipos biológicos, es decir, subarbustos, arbustos y árboles que en su mayoría se comportan como oportunistas respecto del uso del agua, manteniendo pulsos de crecimiento en momentos de disponibilidad hídrica y entrando en receso vegetativo durante las

etapas de sequía (Passera, 2000). Las especies del género *Prosopis* presentan además propiedades fisiológicas excepcionales como altas tasas fotosintéticas y fijación de nitrógeno aún en temperaturas de 45 °C, crecimiento en suelos alcalinos con pH de hasta 9, como así también un alto grado de tolerancia a la salinidad, ubicándose entre las especies del ambiente terrestre más resistentes a concentraciones salinas extremas (Felker, 2007).

Por esto podemos encontrar múltiples adaptaciones morfofisiológicas en ellas que le confieren características especiales para poder vivir en estos ambientes, como el ajuste osmótico, gruesas cutículas y células epidérmicas de gran volumen para evitar la pérdida de agua. Con respecto al mecanismo para fijar el CO<sub>2</sub> atmosférico, estas plantas poseen un metabolismo C<sub>3</sub>, pero presentan una alta eficiencia fotosintética, característica que las hacen parecer a plantas C<sub>4</sub>, observándose altas tasas fotosintéticas para los ambientes en los que se encuentran (Passera, 2000).

La especie subarbustiva *Prosopis strombulifera* (Lam.) Bentham (Fig. 1) se distribuye desde el desierto de Arizona (USA) hasta la Patagonia (Argentina), zonas donde debe tolerar prolongados períodos de sequía, siendo muy abundante en las áreas salinas de Córdoba y San Luis (Cantero *et al.*, 1996). Es un subarbusto de base leñosa y altura variable (50 cm a 1.5 m), tallos flexuosos con estípulas espinosas, divergentes y rectas, hojas uni-yugas, pinas con folíolos alternos algo distanciados, con 3 a 8 folíolos de cada lado de la pina.



**Fig. 1.** Planta de *P. strombulifera* en las salinas de San Luis.

Las flores se presentan en inflorescencias globosas con cáliz purpúreo y corola amarillenta. Su fruto es una legumbre subcoriácea, cilíndrica, recta o algo arqueada y formada por 5-12 anillos

regulares firmes, solitario o más frecuentemente 8-9 que radian de un pedúnculo de 1.5-4 cm de longitud (Fig. 2). Cada fruto es de 2-5 cm largo y 0.6-1 cm ancho, amarillo limón brillante. Cada fruto contiene de 5 a 12 semillas amarillo-verdosas, aplanadas, ovoides, comprimidas; 3.2-5.4 mm en la longitud, 2.3-2.8 mm ancho y 1.4-1.6 mm de espesor.



**Fig. 2.** Inflorescencia y fruto de *P. strombulifera*

Esta especie es xerófita, se propaga vegetativamente por largos rizomas horizontales leñosos, jugando un rol importante en la vegetación que rodea las salinas. Por otra parte, *Prosopis strombulifera* presenta altos niveles de variabilidad genética, lo que quizás tenga significación adaptativa, ya que esta variabilidad posiblemente le sea necesaria para responder a los ambientes extremos en los que se desarrolla, colonizando nuevas áreas gracias a las raíces gemíferas que presenta (De la Vega, 1996).

Sus frutos poseen diversas propiedades medicinales y son utilizados como astringentes y diuréticos, para la fiebre, e inflamaciones de garganta. Las raíces contienen altas cantidades de taninos y se usan para curtiembres (Ffolliot y Thames, 1983).

De la Vega (1996) informó que esta especie era capaz de sobrevivir en cultivos hidropónicos con 1 M de NaCl, observándose tanto a nivel de raíz como de hoja cambios metabólicos (enzimáticos) que acompañan la adaptación de esta especie a concentraciones cada vez más altas de sal, lo cual permite definir a esta especie como halófito.

En los suelos salinizados del sur de Córdoba y sudoeste de San Luis donde se encuentran poblaciones de esta especie, las proporciones de NaCl y de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> son similares, a pesar de que la concentración de esta última sal es a veces mayor (Sosa *et al.*, 2005). Este y otros estudios recientes

sugieren una necesidad creciente de comparar los efectos del Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en el crecimiento vegetal con los de NaCl a fin de comprender mejor las respuestas de las plantas a estas dos sales presentes en suelos salinizados (Iqbal, 2003; Bie *et al.*, 2004; Shi y Sheng, 2005; Naeem y Qureshi, 2005; Manivannan *et al.*, 2008). Estudios comparativos de los efectos de distintas sales de Cl<sup>-</sup> y SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> en la germinación de *P. strombulifera* demostraron que soluciones que contenían el anión SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> fueron considerablemente más inhibitorias que las soluciones de Cl<sup>-</sup> en concentraciones isoosmóticas (Sosa *et al.*, 2005; Llanes *et al.*, 2005).

Estos resultados, sumados a su alta tolerancia a salinidad, su carácter de leguminosa y a las modificaciones anatómicas registradas bajo salinidad por NaCl y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Reinoso *et al.*, 2004; 2005) sugieren que esta especie puede servir como un excelente modelo para estudiar los mecanismos de tolerancia a salinidad en plantas halófitas, analizando la participación del etileno y compuestos antioxidantes como los polifenoles. Tales estudios pueden tener relevancia a futuro para la mejora de leguminosas de importancia económica a través de ingeniería genética, desarrollando cultivos tolerantes a diferentes tipos de estrés abiótico con el fin de que las superficies de tierras desaprovechadas puedan ser convertidas en cultivables. A su vez permitiría mejorar la productividad agrícola y el aprovechamiento de los recursos disponibles.

## **6. Inducción de hormonas vegetales por estrés**

Las respuestas de las plantas a estrés implican complejos cambios bioquímicos que incluyen modificaciones en el balance de fitohormonas endógenas, disminuyendo los niveles de algunas y elevando el de otras. Es bien conocido que la concentración endógena de ácido abscísico (ABA) en las plantas varía en función de los cambios ambientales, desempeñando un papel fundamental en el control de mecanismos bioquímicos y moleculares de tolerancia a diversos tipos de estrés, principalmente estrés hídrico y salino (Bray, 2002). Otras hormonas, además de ABA, se acumulan en presencia de sal, como el ácido jasmónico (JA), poliaminas y etileno (Reginato *et al.*, 2012).

## **7. Rol del etileno en la respuesta vegetal al estrés salino**

El etileno es otra de las principales fitohormonas que regula muchos aspectos del crecimiento y desarrollo vegetal. Está involucrado en procesos normales de la planta como la ruptura de la dormición, crecimiento y diferenciación de tallos, crecimiento y diferenciación radical, formación de raíces adventicias, abscisión de hojas y frutos, apertura de flores, maduración de frutos y senescencia. Su producción en los tejidos es usualmente baja, pero en ciertos estadios del desarrollo, como en los mencionados anteriormente, los niveles de esta hormona aumentan considerablemente (Yang y Hoffman, 1984).

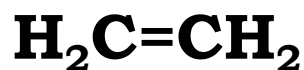


Fig. 3. Molécula de etileno.

El etileno (Fig. 3) es sintetizado a partir de metionina vía S-adenosil metionina (SAM) y el aminoácido 1 aminociclopropano-1 carboxílico (ACC). Las enzimas que catalizan la conversión de SAM a ACC y ACC a etileno son la ACC sintasa y ACC oxidasa respectivamente (Fig. 4). La ACC sintasa produce, además de ACC, 5 metiltioadenosina que es utilizada para la síntesis de nueva metionina a través de un ciclo modificado. Esta vía preserva el grupo metil-tio con gasto de 1 ATP por ciclo, lo que permite que altas tasas de síntesis de etileno sean mantenidas aún cuando el pool de metionina libre es pequeño (Bleecker y Kende, 2000).

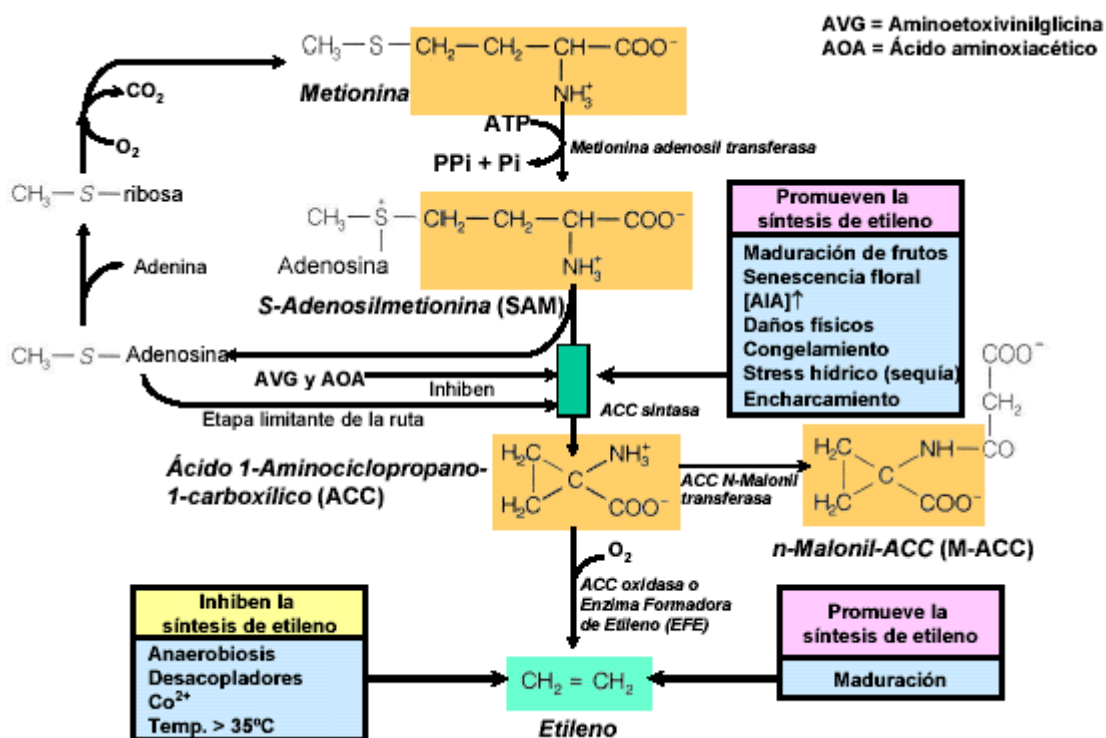


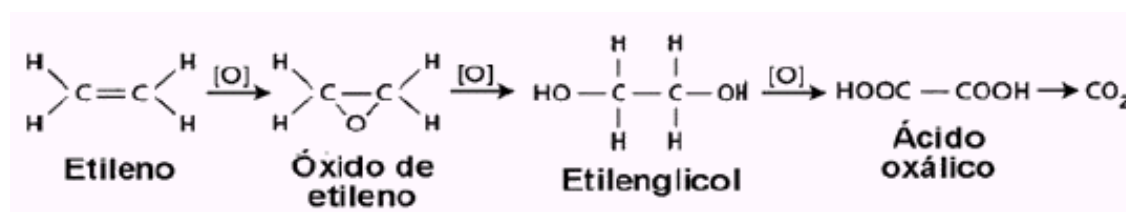
Fig. 4. Ruta biosintética del etileno.

SAM es un metabolito primario, crucial en la síntesis de PAs y el principal donante de grupos metilo en muchas reacciones, como la síntesis de lignina y metilación de ác. nucleicos y proteínas. Las enzimas ACC sintasa y ACC oxidasa constituyen familias de multigenes y muestran una regulación diferencial en respuesta a un rango de estímulos ambientales y del desarrollo (Cervantes, 2002).

La formación del etileno a partir de ACC implica una reacción que requiere la presencia de oxígeno por lo cual la vía biosintética será inhibida por niveles reducidos de oxígeno (Mattoo & Suttle, 1991). Así como la concentración de oxígeno, existen otros factores ambientales que determinan variaciones en la tasa de biosíntesis del etileno, como por ejemplo, la temperatura, la variación de la concentración iónica, situaciones de stress hídrico, mecánico, entre otros, que inducen o inhiben la síntesis del etileno (Kende, 1993).

El etileno también es sintetizado en respuesta a diversos estímulos externos, como “wounding”, invasión de patógenos y anaerobiosis (Yang y Hoffman, 1984). Además, se han informado incrementos en la producción de esta hormona durante la germinación bajo condiciones de estrés salino con NaCl, particularmente en trigo (Lu *et al.*, 1991), soja (Pennazio *et al.*, 1991), maíz (Datta *et al.*, 1998) y también en plántulas de lechuga cultivadas con 150 mM de NaCl (Zapata *et al.*, 2003). Si bien el etileno generalmente es considerado un inhibidor del crecimiento, hay un creciente número de investigaciones que muestran estimulación del crecimiento inducida por etileno (Pierik *et al.*, 2006). Por lo tanto, la salinidad puede influenciar la producción de etileno dependiendo de las especies, el estado de desarrollo de la planta y la duración del tratamiento, estando los niveles de estos compuestos íntimamente relacionados (Zapata *et al.*, 2003).

En la mayor parte de los tejidos el etileno es oxidado completamente a CO<sub>2</sub> o liberado por difusión a la atmósfera (Fig. 5). Por lo tanto, el catabolismo de etileno no está involucrado en su actividad hormonal.



**Fig. 5.** Vía de catabolismo de etileno

Como ya se ha referido anteriormente, el etileno desempeña varios papeles en el metabolismo de las células vegetales, entre los cuales la regulación de las tasas de crecimiento. La inducción de la síntesis de etileno tiene como consecuencia una inhibición del alargamiento de las células vegetales, donde variados y complejos mecanismos parecen estar envueltos (Scott *et al.*, 1999).

Primeramente, se propone que el etileno estuviese envuelto en la promoción de la reorganización de microtúbulos corticales, disminuyendo el alargamiento de los tejidos y aumentando la expansión radial. Posteriormente, se sugirió que la hormona en causa estuviese envuelta en la regulación de la expresión de peroxidasas pertenecientes a las paredes celulares de las células, envueltas en la



extensibilidad y crecimiento celulares. De hecho, la inducción de la expansión celular por el etileno está relacionada con la promoción de la actividad de peroxidasas y con la disminución de  $H_2O_2$  contenido en las paredes celulares de las células expandidas. Existe una regulación de la actividad de las enzimas peroxidasas y, consecuentemente, de los niveles de  $H_2O_2$  por el etileno, pudiendo de este modo controlar el alargamiento y la dirección del crecimiento de tejidos y órganos vegetales (Smalle Straeten, 1997).

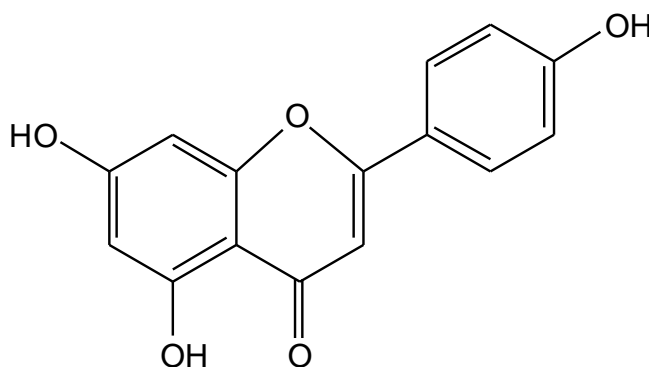
## 8. El sistema antioxidante

Las condiciones de estrés pueden provocar en las plantas un incremento en la producción de especies activas del oxígeno y por consiguiente un aumento del estrés oxidativo en las células. Estos radicales libres o especies activas del oxígeno (EAOs) inevitablemente se producen y acumulan cuando el metabolismo aeróbico o fotosintético es afectado por estas condiciones de estrés (Halliwell y Gutteridge, 2007). Las EAOs son moléculas con moderada ( $H_2O_2$ , peróxido de hidrógeno;  $O_2^-$ , radical superóxido) o elevada ( $\bullet OH$ , radical hidroxilo;  $^1O_2$ , oxígeno singulete) reactividad química y pueden reaccionar con las macromoléculas de las células modificando su estructura y su función, dando lugar a alteraciones que pueden conducir a la muerte celular. Las EAOs son una paradoja para las plantas, por un lado pueden ser deletéreas para las funciones celulares pero también son importantes como moléculas señal. La producción de EAOs es una consecuencia inevitable de la vida aeróbica, y las plantas han desarrollado numerosos mecanismos para contrarrestar sus efectos, incluyendo cambios en la expresión génica. Situaciones que incrementan las EAOs han sido consideradas como procesos perjudiciales; sin embargo, la evidencia sugiere que un incremento en la oxidación puede ser clave para inducir respuestas celulares que permitan mantener la homeostasis redox, en la cual el balance antioxidante-EAOs interactúa temporal y espacialmente como una señal metabólica que modula procesos que finalmente inducen aclimatación (Foyer y Noctor, 2005; Scheibe *et al.*, 2005). Por lo tanto, para evitar que las EAOs alcancen niveles incompatibles con el normal desarrollo de las células, las plantas poseen sistemas de defensa que incluyen antioxidantes no enzimáticos y enzimáticos. Dentro del primer grupo, se encuentran una serie de metabolitos secundarios de las plantas, llamados flavonoides. Estos compuestos se caracterizan por ser polifenólicos y solubles en agua.

## 9. Polifenoles y flavonoides

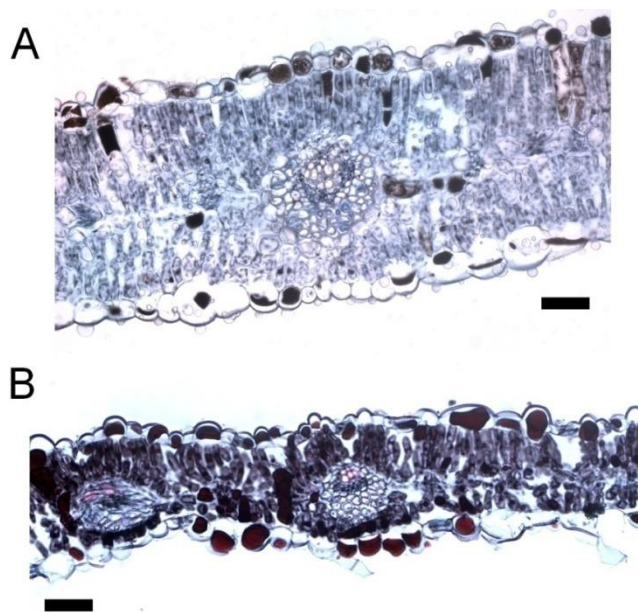
Los polifenoles constituyen uno de los grupos más abundantes y ampliamente distribuidos de compuestos naturales en el reino vegetal. Actualmente se conocen más de 8000 estructuras fenólicas (Tsao 2010). Su estructura se caracteriza por la presencia de múltiples grupos fenólicos asociados en una estructura más o menos compleja, generalmente de alto peso molecular. Estos compuestos son resultado del metabolismo secundario de la planta y desempeñan diversas funciones, siendo esenciales en el metabolismo de la planta. Una de las funciones principales es estructural (impregnación de lignina de las paredes celulares), siendo además muy importantes en la pigmentación de flores y frutos (antocianinas), en la polinización, en la resistencia a patógenos y predadores y en la protección contra la luz UV.

Uno de los grupos más significativos dentro de los polifenoles, son los flavonoides (Fig. 6). Estos compuestos son hidrosolubles y están presentes en la planta principalmente como glicósidos (conjugados con un azúcar como glucosa o fructosa), los cuales se acumulan en las vacuolas.



**Fig. 6.** Estructura típica de un flavonoide.

En plantas, la síntesis y acumulación de estos polifenoles es generalmente estimulada en respuesta a estrés biótico y abiótico (Dixon y Paiva, 1995; Naczk y Shahidi, 2004) como salinidad (Navarro *et al.*, 2006). Dentro del amplio grupo de compuestos polifenólicos se encuentran los taninos condensados, los cuales han sido reconocidos como agentes protectores contra herbívoros, aunque también se ha relacionado su acumulación con la respuesta a diferentes condiciones de estrés (Cai *et al.*, 2004). Resulta interesante la observación de que concentraciones crecientes de NaCl y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y su mezcla isoosmótica, estimularon la producción de taninos y también de ligninas en plántulas de *Prosopis strombulifera* independientemente de la intensidad de la luz y condiciones de temperatura, de acuerdo a nuestros resultados con tinción específica en cortes de raíces, tallos y hojas analizados mediante microscopía óptica (Fig. 7) (Reinoso *et al.*, 2004; 2005; Reginato, 2009).



**Fig. 7.** Características anatómicas de la sección transversal de folíolos de plantas de 48 días de cultivo (Reginato 2009). Controles (A) y tratadas con NaCl + Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Y<sub>0</sub>= -2.6 MPa) (B) .Escala = 50 μm.

El daño celular por UV-B en plantas puede ser evitado eficazmente por los fenoles (Simic y Jovanovich, 1994), y se ha demostrado que participan en roles de protección de las células ante el estrés oxidativo secundario en situaciones de estrés biótico y abiótico, mediante el secuestro de EAOs (Sreenivasulu *et al.*, 2000; Berli *et al.*, 2010) convirtiéndolos en buenos candidatos como antioxidantes. Además de sus propiedades redox, los taninos poseen también propiedades como agentes quelantes de iones metálicos (Zhan y Zhao, 2003), por lo que podrían actuar como quelantes de algunos iones y así evitar su permanencia en el citoplasma cuando las vacuolas se han saturado. Por otra parte, los polifenoles exhiben un amplio espectro de propiedades medicinales, como antialérgicos, antiinflamatorios, antimicrobianos, cardio-protectores y efectos vasodilatadores (Balasundram *et al.*, 2006).

Dadas las características mencionadas de planta halófila acumuladora de altos niveles de iones en sus tejidos, es lógico suponer que *P. strombulifera*, podría disponer de un efectivo sistema de defensa antioxidante altamente eficiente para el secuestro y homeostasis de las EAOs, el cual sería responsable de la protección celular frente al estrés oxidativo ocasionado por la elevada salinidad.

## HIPÓTESIS

a) La tolerancia a salinidad en la halófito *Prosopis strombulifera* estaría relacionada a la modificación de parámetros morfológicos, efectiva restricción y compartimentalización de iones, mantenimiento de la tasa fotosintética y efectiva defensa antioxidante. En la regulación de estos mecanismos estaría involucrada la producción de etileno y polifenoles.

b) Estas respuestas serían afectadas de manera diferencial por concentraciones equivalentes de NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y su mezcla isoosmótica.

## OBJETIVOS

### 1. Objetivo general

Aportar conocimientos sobre los mecanismos bioquímicos y fisiológicos de tolerancia a salinidad en la halófito *Prosopis strombulifera* y su regulación hormonal, interpretando las posibles interrelaciones entre producción de etileno y síntesis de polifenoles, analizando el efecto de cada sal en particular.

### 2. Objetivos específicos

a) Determinar el efecto de los distintos tratamientos salinos (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaCl y la mezcla isoosmótica) en los parámetros de crecimiento (altura total y longitud de raíces) de plántulas de esta especie cultivadas en hidroponía.

b) Determinar la producción de etileno en plántulas de *P. strombulifera* controles y sometidas a los distintos tratamientos salinos (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaCl y la mezcla isoosmótica de ambas sales) en cultivo hidropónico.

c) Identificar y cuantificar niveles endógenos de los distintos polifenoles (detectados previamente con tinción específica en cortes histológicos) en hojas de plántulas controles y salinizadas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Crecimiento de plántulas en cultivo hidropónico

Se recolectaron frutos de *Prosopis strombulifera* durante el período Marzo-Abril de 2010 en las salinas de San Luis. La localización geográfica fue 33° 43' latitud sur, 66° 37' longitud oeste a 400-500m de altitud, con una temperatura media anual de 15-20 °C (Fig. 8). Esta área pertenece al bosque de algarrobos situado en una depresión salina entre las isohietas anuales de 300 a 400 mm en la región fitogeográfica de “El Monte”. El suelo tiene una textura franco-arenosa, con abundante material calcáreo y moderada salinidad en la superficie (conductividad eléctrica de 8000 mho/cm<sup>2</sup>) (Anderson et al., 1970).

Las vainas fueron recogidas al azar de 100 plantas dentro de la misma población. Las semillas se seleccionaron visualmente por su tamaño uniforme y aspecto saludable y se escarificaron 12 min con ácido sulfúrico concentrado (98%), se lavaron 12 h en agua corriente y se colocaron a germinar en estufa a 37 °C durante 24 h. Cuando las radículas alcanzaron aproximadamente 2 cm de longitud fueron colocadas en bandejas plásticas, a razón de 200 plantas por bandeja en un volumen de 4 L de solución hidropónica.



**Fig. 8.** Área de muestreo en las Salinas del Bebedero. Foto satelital indicando la zona de muestreo y aspecto general del paisaje.

Para el ensayo de producción de etileno, se cultivaron 35 plántulas en bandejas pequeñas con una capacidad de 250 cm<sup>3</sup> (Fig. 9). Para la hidroponía se utilizó una solución de Hoagland al 10% y al cabo de una semana se aumentó la concentración al 25%. Las bandejas se llevaron a cámara de crecimiento con 16 hs de luz a 250 micromol. m<sup>-2</sup> seg<sup>-1</sup> y 8 hs de oscuridad, a 28 y 20 °C de temperatura respectivamente y 60% de HR. Para mantener una aireación adecuada en las bandejas se utilizó un sistema de bombas peristálticas de acuario.



**Fig. 9.** Plántulas de *P. strombulifera* en cultivo hidropónico.

## **2. Tratamientos salinos**

El diseño utilizado para los experimentos es un Diseño aleatorio simple (Steel y Torrie, 1980) con cuatro tratamientos.

Cuando las plántulas alcanzaron 21 días de edad, se comenzó con los tratamientos que consistieron en el agregado de 38 mM de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 50 mM de NaCl ( $\Psi_0 = -0.3$  MPa) cada 48 h para monosalinos y la mezcla isoosmótica de ambas sales para el bisalino (Tabla 1). Las plántulas controles permanecieron en Hoagland 25% durante todo el experimento ( $\Psi_0 = -0.11$  MPa). Los pulsos de sal fueron aditivos hasta obtener un potencial final de -2.6 MPa, el cual corresponde a una concentración de 700 mM de NaCl y 530 mM de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

**Tabla 1.** Pulsos salinos sucesivos aplicados cada 48 h a partir de los 21 días de edad de las plántulas.

PULSO SALINO	ml de Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> por litro de Hoagland 25%	ml de NaCl por litro de Hoagland 25%	Bisalina sulfato/cloruro	ψ <sub>o</sub>
1° pulso 21 días de cultivo Cambio	37.9 13,3ml 132,6ml 170,5ml	50 17,5ml 175ml 225ml	18,95/25 6,63/8,75 66,3/87,5	-0.3
2° Pulso	75.8	100	37,9/50	-0.47
3° pulso	113.7	150	56,8/75	-0.65
4° Pulso	151.6	200	75,85/100	-0.82
5° Pulso Recolección 29 días de cultivo	189.5 66,32 ml 663,25 ml 852,75 ml	250 87,5ml 875ml 1125ml	94,8/125 33,18/43,75 331,8/437,5	-1
6° Pulso	227.4	300	113,75/150	-1.18
7° Pulso	265.3	350	132,7/175	-1.35
8° Pulso- Cambio	303.2 106, 12ml 1061,2ml 1364,4ml	400 140ml 1400ml 1800ml	151,7/200 53,1/70 531/700	-1.53
9° Pulso	341.1	450	170,6/225	-1.71
10° Pulso Recolección- 40 días de cultivo	379.2	500	189,6/250	-1.88
11° Pulso	416.9	550	208,5/275	-2.06
12° Pulso	454,8 159,2ml 1591,8ml 2046,6ml	600 210ml 2100ml 2700ml	227,5/300 79,63/105 7796,25/1050	-2.24
13° Pulso	492.7	650	246,4/325	-2.42
14° Pulso Recolección 48 días de cultivo	530.6	700	265,4/350	-2.6

### 3. Determinación de parámetros de crecimiento

Luego de 24 h de que los cultivos alcanzaron potenciales osmóticos de -0,3 MPa, -1 MPa, - 1,53 MPa, -2,06 MPa y -2.6 MPa (21, 29, 36, 43 y 50 días desde el inicio del experimento) se midieron 30 plántulas controles y 30 de cada tratamiento salino, registrándose altura total de tallos y longitud total de raíces.

### 4. Evaluación de los niveles de etileno

Previamente a las determinaciones se confeccionó una curva de calibración del cromatógrafo con etileno (Fig. 10). Para ello, se tomaron 500 µl del gas puro y se los colocó en un frasco de vidrio de 10 ml con cierre hermético. Luego se realizaron diluciones seriadas para evitar la saturación de la columna, hasta obtener valores de área de picos de etileno para la construcción de la curva.

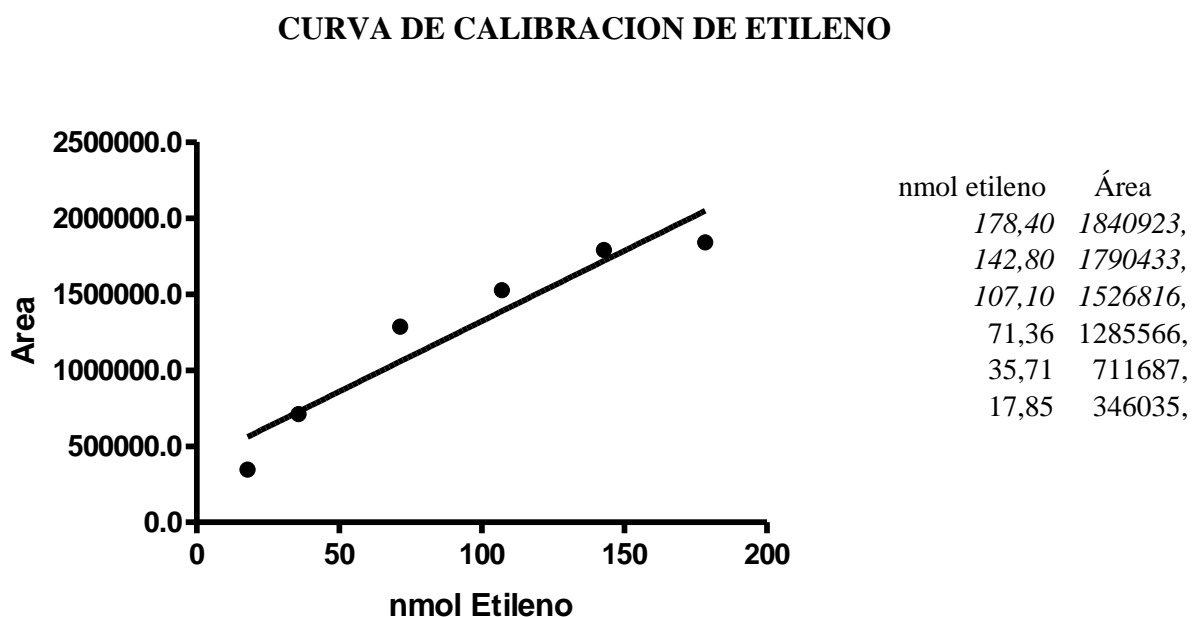


Fig. 10. Curva de calibración utilizada para la cuantificación de etileno.

La producción de etileno se determinó luego de haberse aplicado el último pulso de sal a las plántulas para llegar a los  $\Psi_0 = -1, -1.88$  y  $-2.6$  MPa, respectivamente. Para ello se realizaron distintos ensayos (Ver fotografías en Anexo):

- 1) Se cultivaron 25 plántulas en bandejas pequeñas con una capacidad de 250 cm<sup>3</sup>. Las mismas se colocaron dentro de recipientes plásticos herméticos de 1000 cm<sup>3</sup> de volumen total, sellando cuidadosamente con parafilm. Luego de 24 hs de incubación en cámara de

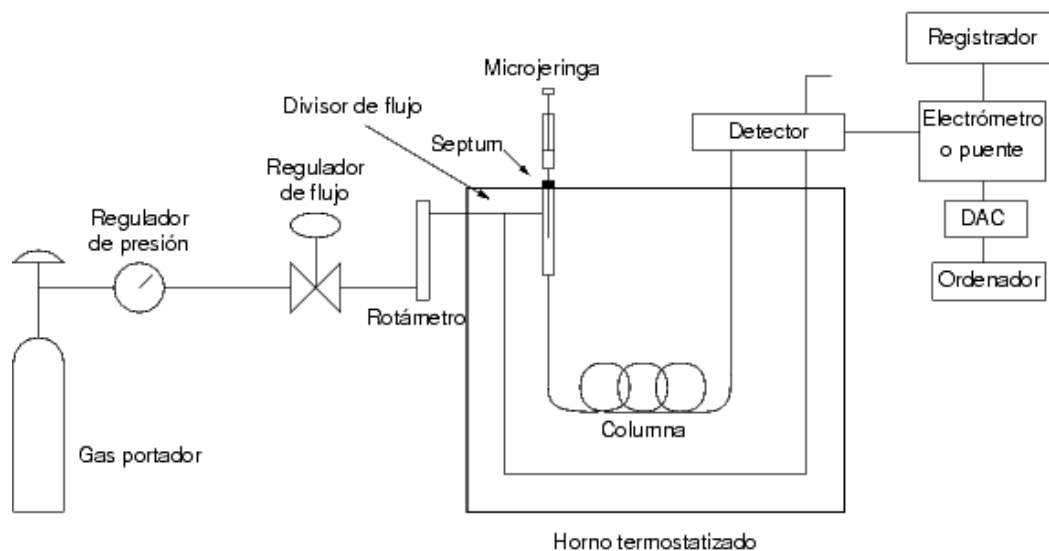


crecimiento se tomaron 500  $\mu$ l de cada muestra gaseosa con una jeringa graduada. Debido a que no se detectó producción de etileno se realizaron otros ensayos variando alguna de las condiciones.

- 2) En un segundo ensayo, se colocaron 35 plantas por bandeja (para descartar que las plántulas fueran insuficientes en tal volumen (recipiente de 1000 ml, donde se introdujo la bandeja pequeña para poder capturar el gas)). Luego de 24 hs de incubación en cámara de crecimiento en oscuridad (para evitar la degradación del etileno que ocurre en presencia de luz), se procedió a recolectar la muestra gaseosa. Con esta prueba tampoco se pudo detectar la presencia del gas.
- 3) En un tercer ensayo, se utilizaron 35 plantas por bandeja aplicando pulsos salinos más drásticos, para generar un estrés mayor en la planta y con ello desencadenar la producción de etileno. Para ello cuando las plántulas alcanzaron 29 días de edad, se comenzó con los tratamientos que consistieron en el agregado de 189,5 mM de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y 250 mM de  $\text{NaCl}$  ( $\Psi_o = -1$  MPa) para monosalinos y la mezcla isoosmótica de ambas sales para el bisalino. Posteriormente, a los 40 días se aplicó un segundo shock salino ( $\Psi_o = -1.88$  MPa), y a los 48 días un tercero para alcanzar la concentración final ( $\Psi_o = -2.6$  MPa). Al igual que en los casos anteriores, no detectó la presencia de la hormona en las muestras.
- 4) Luego de apreciar que con este tercer ensayo no se detectó la presencia de etileno, se dejaron incubar las mismas bandejas por 48 y 72 horas más respectivamente para ver si con el paso del tiempo, eventualmente, se concentraría más la hormona dentro del recipiente hermético y así poder cuantificarla a través del cromatógrafo. Nuevamente, se obtuvieron resultados negativos.

#### **4.1. - Cuantificación de etileno por cromatografía de gases**

La muestra se inyectó directamente en un cromatógrafo de gases (Konik KNK-300 HRGC) (Fig. 11) con una columna de alúmina activada (0,32 x 1,8 cm) y detector de ionización de llama. Las temperaturas del inyector, de la columna y del detector se mantuvieron constantes en 110° y 170° C, respectivamente, con nitrógeno como gas portador a una tasa de flujo de 35 ml/min (Beltrano *et al.*, 1997).



**Fig. 11.** Diagrama de un cromatógrafo de gases.

Adicionalmente se realizó una prueba para corroborar que los recipientes utilizados para la cuantificación eran herméticos y no había pérdida de etileno. Se inyectó un volumen de 500  $\mu\text{l}$  de etileno puro en los recipientes herméticos de 1000  $\text{cm}^3$  y se tomó una muestra de 500  $\mu\text{l}$  del gas diluido y se inyectó en el cromatógrafo. Posteriormente se realizó una nueva inyección a las 24 hs de incubación y se corroboró que el área del pico de etileno permanecía constante, demostrando que no hay fuga del gas del recipiente.

## 5. Extracción y cuantificación de polifenoles

### 5.1. - Extracción

Se homogeneizaron 100 mg de material liofilizado (24 muestras por triplicado) con  $\text{N}_2$  líquido y se extrajeron 3 veces en agitador magnético con un volumen total de 24 ml de solvente de extracción (metanol/agua (80:20, v/v)). Luego de cada extracción, el extracto se centrifugó, se recolectó el sobrenadante para luego reducir en evaporador rotatorio a un volumen final de aprox. 4 ml. El extracto se filtró con filtros 0.45  $\mu\text{m}$  y se conservó en freezer a  $-80^\circ\text{C}$ .

### 5.2. - Determinación espectrofotométrica de las principales clases de polifenoles

**5.2.1 Fenoles totales:** Método de Folin-Ciocalteu según Barbolan *et al.* (2003). Se utilizaron 25  $\mu\text{l}$  de extracto, 1,25 ml de agua destilada, 125  $\mu\text{l}$  del reactivo de Folin-Ciocalteu, 0,5 ml de carbonato de

sodio al 20%. La solución se homogeneizó y se dejó reposar por 30 min para que ocurra la reacción. Se determinó la absorbancia a 750 nm. Se utilizó ácido gálico como estándar.

**5.2.2 Flavonoides totales:** se cuantificó según Kim *et al.* (2003). A 100 µl de extracto se le adicionaron 60 µl of 5 % NaNO<sub>2</sub>. Luego de 5 min. 40 µl of 10 % AlCl<sub>3</sub> se adicionaron junto con 400 µl of 1 M NaOH. Se diluyó con 200 µl agua destilada, y se determinó la absorbancia a 510 nm. Se utilizó catequina como estándar.

**5.2.3 Flavan-3-oles totales:** se determinó luego de la derivatización con p-(dimethylamino)-cinnamaldehydo (DMACA) (Nigel y Glories, 1991). 10 µl de extracto se diluyeron con 90 µl de metanol. Se agregó 250 µl HCl (0,24 N en MeOH) y 250 µl de DMACA (0,2% en MeOH. Se dejó por 30 min a temperatura ambiente para que ocurra la reacción y se determinó la absorbancia a 640 nm. Se utilizó catequina como estándar.

**5.2.4 Taninos condensados o proantocianidinas:** se determinaron según Waterman y Mole (1994). Se preparó el reactivo Butanol (128 mg FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 5 ml HCl concentrado, diluyendo hasta 100 ml con n-butanol). Se utilizaron 50 µl de extracto con 700 µl del reactivo butanol y se calentó 95°C en un baño térmico por 45 min. Luego se enfrió la muestra, se agregó 250 µl de n-butanol y se determinó la absorbancia a 550 nm. Se utilizó cianidina como estándar.

**5.2.5 Esteres de ácido tartárico y flavonoles:** 25 µl de extracto se diluyó con 225 µl de etanol 10%. Se adicionó 250 µl de HCL 0,1% en 95% de etanol y 1 ml de HCl 2%. Se homogeneizó la solución y se determinó la absorbancia a 320 nm para los ésteres de ác. tartarico y a 360 nm para flavonoles. Se utilizaron ácido cafeico y quercetina como estándares, respectivamente.

## 6. Análisis estadístico

Como las unidades experimentales sujetas a los distintos tratamientos fueron seleccionadas al azar, el diseño adecuado para realizar el análisis de los datos es un Arreglo Factorial sobre un Diseño de Bloques Completamente al Azar. Para realizar el análisis de los datos se utilizó el software estadístico InfoStat (Universidad Nacional de Córdoba). Primero se verificaron los supuestos necesarios para el análisis paramétrico (Normalidad y Homogeneidad de Varianzas). En los casos en que se verificaron los supuestos se realizó un ANOVA, y en los casos que no se verificaron se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. En caso de detectar diferencias significativas luego del análisis paramétrico, se utilizó el test a posteriori de Bonferroni.

## RESULTADOS

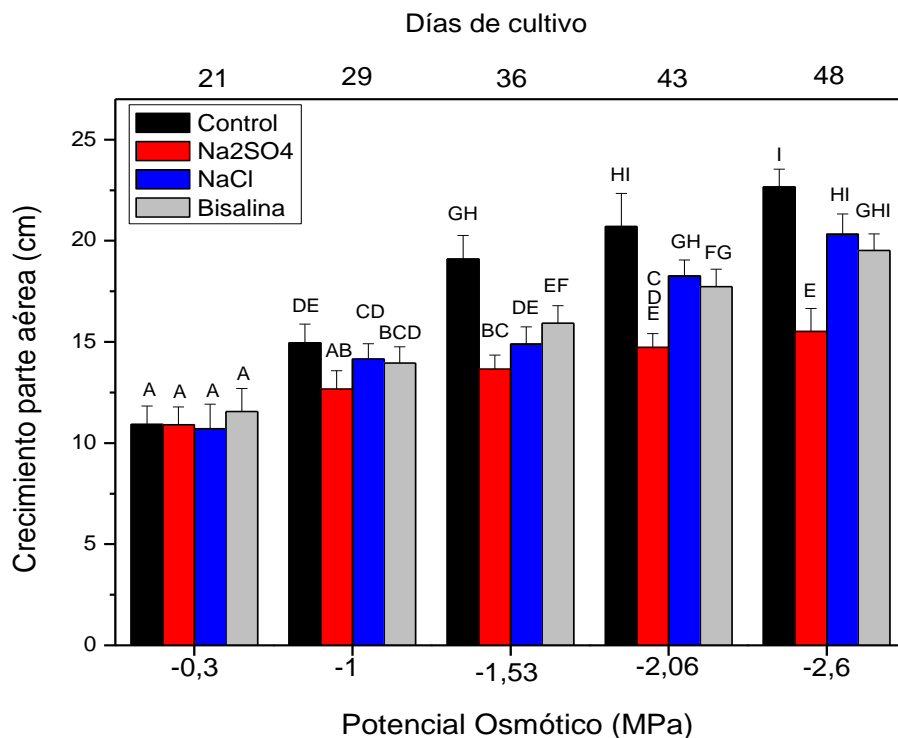
### 1. Parámetros de crecimiento

#### 1.1. Crecimiento de parte aérea

Como se puede apreciar en la Figura 12, el tratamiento que más afectó el crecimiento de la parte aérea de las plantas fue aquel que utilizó la sal  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  como agregado al medio hidropónico. Si bien a los 29 días de cultivo la diferencia con los otros tratamientos fue menor que al progresar el ensayo, ya se encontraron diferencias significativas respecto al control y al tratamiento con NaCl.

A los 36 días de cultivo el efecto de los tres tratamientos fue marcado, tal que en todos se vieron diferencias significativas en relación al control.

Desde el día 43, en adelante (-2,06 y -2,6 Mpa) se empezó a notar una reversión en los efectos, ya que si bien las plantas tratadas con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  fueron las más afectadas (fuerte inhibición del crecimiento, con marcados síntomas de toxicidad como clorosis y necrosis de hojas más viejas), las tratadas con NaCl no tuvieron diferencias significativamente estadísticas respecto al control y en las plantas que se trataron con la mezcla isoosmótica se apreció el efecto atenuante del NaCl sobre el  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

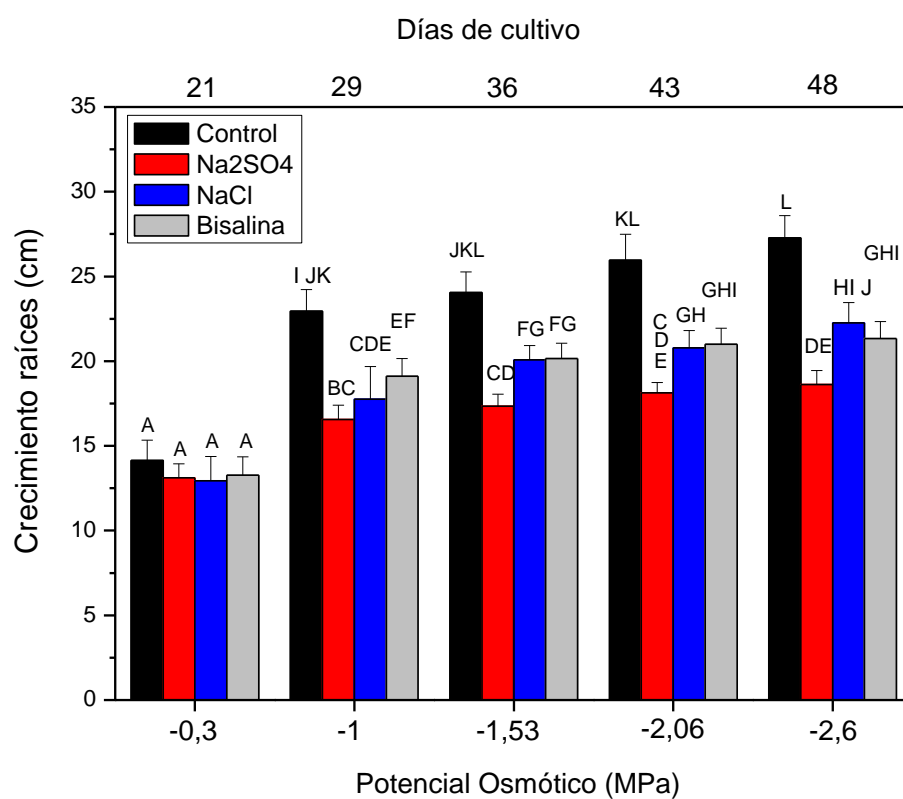


**Fig. 12.** Crecimiento de parte aérea de plántulas de *Prosopis strombulifera* en cultivo hidropónico bajo tratamientos con diferentes sales ( $n = 30 \pm \text{DE}$ ). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

## 1.2. Crecimiento de raíces

En relación al crecimiento de raíces, se puede apreciar el efecto inhibitorio de los tratamientos salinos en comparación con el crecimiento de las plántulas control desde los 29 días de cultivo. Las plantas tratadas con la sal de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  fueron las que menor crecimiento radical tuvieron, observándose el efecto cada vez mas intenso al progresar el ensayo. Cabe aclarar que en todos los potenciales se encontraron diferencias significativas.

Entre las plantas tratadas con  $\text{NaCl}$  y con la solución bisalina, en ningún potencial se encontró significancia estadística (Fig. 13).



**Fig. 13.** Crecimiento de raíces de plántulas de *Prosopis strombulifera* en cultivo hidropónico bajo tratamientos con diferentes sales ( $n = 30 \pm \text{DE}$ ). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

## **2. Producción de etileno**

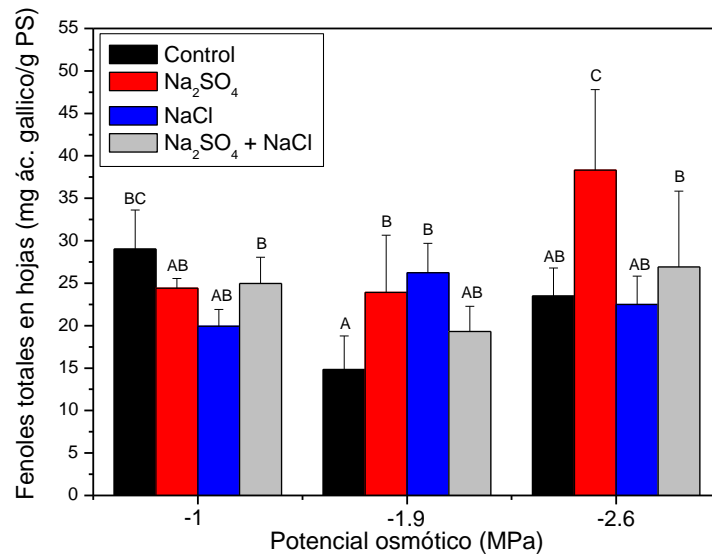
Con respecto a la producción de etileno en plántulas de *P. strombulifera*, no se detectó la liberación de esta hormona en ninguno de los tratamientos y potenciales analizados. Esto quizás pueda deberse a la metodología utilizada. Una de las posibilidades es que las plántulas presenten una muy baja producción individual de etileno, la cual no llega a ser detectada con un pequeño número de plantas por recipiente. Por este motivo se probaron diversas metodologías como se explicó en detalle en la sección Materiales y métodos. Sin embargo, y a pesar de las diversas pruebas realizadas no se pudo detectar la presencia del gas. Por lo tanto, no se pudo continuar con los estudios propuestos de aplicaciones de inhibidores de la acción de etileno y cuantificación de ACC en los tejidos.

### 3. Niveles de polifenoles

#### 3.1. Fenoles totales

Los tratamientos estimularon diferencialmente la acumulación de los distintos polifenoles en hojas de *P. strombulifera*. A baja salinidad (-1 MPa) los distintos tratamientos salinos no afectaron la acumulación de fenoles. A los 40 días de cultivo (-1,9 MPa), estos polifenoles presentaron concentraciones significativamente mayores tanto en plantas tratadas con NaCl, como con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en relación a las plantas control.

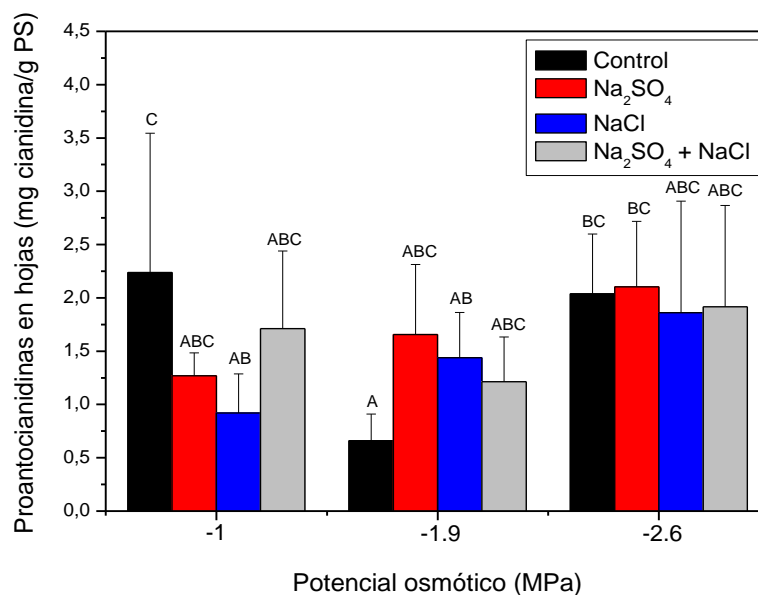
Las plántulas tratadas con altas concentraciones de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (-2,6 MPa, 48 días de cultivo) presentaron los niveles más elevados de fenoles totales. Aquí se observaron diferencias estadísticamente significativas en relación a los otros tratamientos y al control (Fig. 14).



**Fig. 14.** Producción de fenoles totales en hojas de *Prosopis strombulifera* según los distintos tratamientos salinos (n = 4 ± DE). Letras diferentes indican diferencias significativas (p < 0,05).

### 3.2. Proantocianidinas

Los niveles de proantocianidinas no fueron afectados por ningún tratamiento salino, no encontrándose diferencias significativas en ninguno de los potenciales estudiados, salvo al inicio (29 días de cultivo) donde hubo una marcada diferencia entre las plantas control y las tratadas con NaCl (Fig. 15).



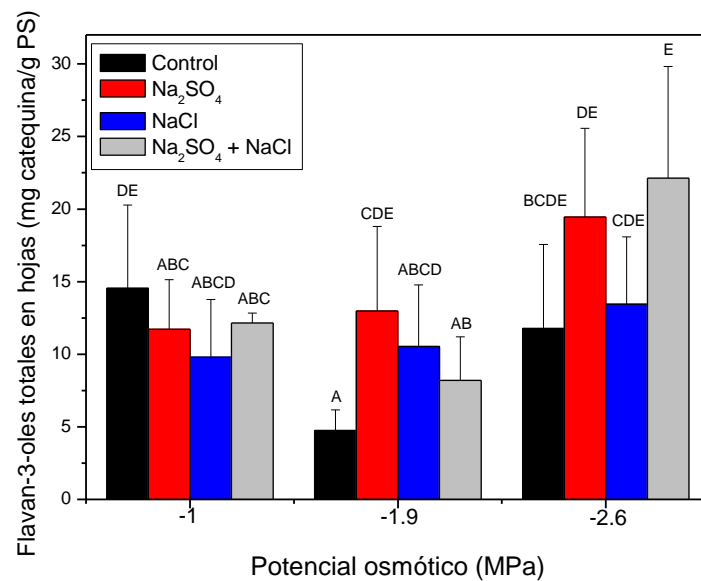
**Fig. 15.** Producción de proantocianidinas en hojas de *Prosopis strombulifera* según los distintos tratamientos salinos ( $n = 4 \pm DE$ ). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).



### 3.3. Flavan-3-oles

La concentración de flavan-3-oles a los 29 días de cultivo fue significativamente mayor en las plantas control en relación a las tratadas con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y a las tratadas con la mezcla de sales.

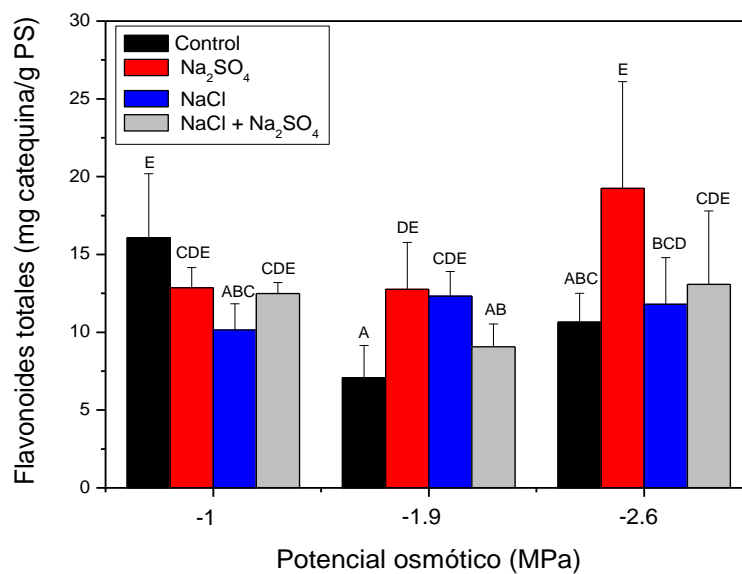
Cuando el potencial osmótico alcanzó los  $-1,9$  MPa se observó un rotundo cambio en las concentraciones de flavan-3-oles, con un incremento en la concentración de estos compuestos en las plantas tratadas con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , sin diferencias significativas respecto al tratamiento con  $\text{NaCl}$  pero si en relación a las plantas control y las tratadas con la mezcla de sales (Fig. 16).



**Fig. 16.** Producción de flavan-3-oles en hojas de *Prosopis strombulifera* según los distintos tratamientos salinos ( $n = 4 \pm \text{DE}$ ). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

### 3.4. Flavonoides

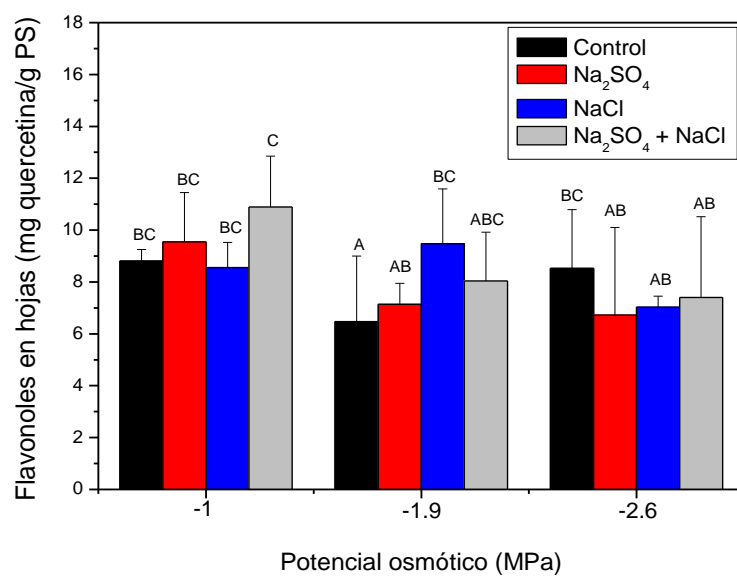
La concentración de flavonoides totales en parte aérea de plantas de *P. strombulifera* fue muy dispar al ir progresando el ensayo. A los 29 días de cultivo la concentración en plantas control fue significativamente diferente al tratamiento con NaCl. A los 40 días, se observó un incremento significativo en el contenido de flavonoides en plantas tratadas con NaCl con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . A los 48 días se observó la mayor concentración de flavonoides en plantas tratadas con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , con diferencias significativas respecto al control y al tratamiento con NaCl (Fig. 17).



**Fig. 17.** Producción de flavonoides en hojas de *Prosopis strombulifera* según los distintos tratamientos salinos ( $n = 4 \pm \text{DE}$ ). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

### 3.5. Flavonoles

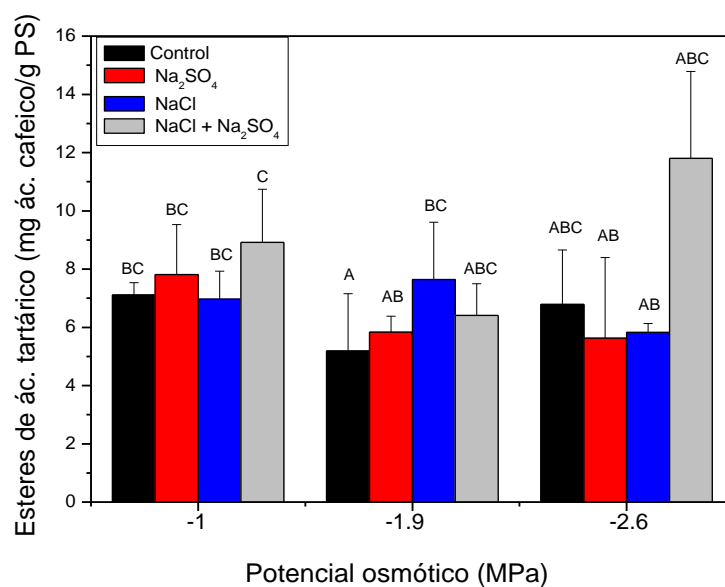
Con respecto a la concentración de flavonoles, se observó un incremento significativo solo en el potencial -1,9 MPa en plantas tratadas con NaCl respecto a las plantas control (Fig. 18).



**Fig. 18.** Producción de flavonoles en hojas de *Prosopis strombulifera* según los distintos tratamiento salinos ( $n = 4 \pm DE$ ). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

### 3.6. Esteres de ácido tartárico

Como se puede observar en la Figura 19, sólo a los 40 días de cultivo, correspondiente a un potencial osmótico de -1,9 MPa, se encontró diferencia significativa en la concentración del éster en la parte aérea de plantas tratadas con NaCl respecto a las plantas control.



**Fig. 19.** Producción de ésteres de ácido tartárico en hojas de *Prosopis strombulifera* según los distintos tratamientos salinos ( $n = 4 \pm DE$ ). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

## DISCUSION

Morfológicamente, el síntoma típico del daño por salinidad es la inhibición del crecimiento debido a la inhibición en la elongación celular, siendo las raíces los órganos más afectados (Okusanya y Ungar, 1984).

En *Prosopis strombulifera* la respuesta a salinidad fue diferente dependiendo del tipo de sal usada y del potencial osmótico en el medio de cultivo. Nuestros resultados demuestran que NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y la mezcla isoosmótica de estas dos sales tienen efectos muy diferentes sobre distintos parámetros de crecimiento y sobre la acumulación de iones por las plantas (Reginato *et al.*, 2014). El tratamiento salino que más afectó el crecimiento de la parte aérea de las plantas fue aquel que utilizó la sal Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como agregado al medio hidropónico. Estas plántulas presentaron una fuerte inhibición del crecimiento en relación a plántulas controles y a los tratamientos con NaCl, con marcados síntomas de toxicidad como clorosis y necrosis en las hojas más viejas, con posterior abscisión de las mismas. Por otra parte, los datos de crecimiento de plántulas obtenidos con el tratamiento bisalino tanto para la parte aérea como radical, confirman la existencia de estos fenómenos de toxicidad por SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> ya informados previamente (Reginato, 2009). Esta toxicidad específica del anión SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> es parcialmente aliviada con la mezcla de sales, al igual que en la respuesta germinativa, registrándose una inhibición del crecimiento menor en las plántulas tratadas con la mezcla de sales que aquellas tratadas con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Esto sugiere que existiría un efecto aniónico específico importante sobre la permeabilidad de las membranas generado por el anión SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (Buchner *et al.*, 2004) que es aliviado en la solución bisalina por su dilución y por algún fenómeno de antagonismo iónico cuyo mecanismo sería fundamental dilucidar en estudios futuros.

Distintas especies emplean diferentes caminos para combatir el estrés iónico impuesto por la alta salinidad. Esto incluye diversos mecanismos de control iónico como restricción en la absorción de iones, un aumento en la exclusión de los mismos y su compartimentalización, y control estricto del transporte a larga distancia, fundamentalmente hacia las hojas. Se ha demostrado que anatómicamente y morfológicamente *P. strombulifera* no posee glándulas de sal en las hojas, sus tejidos desarrollan gran vacuolización, su sistema radical adquiere características particulares como precoz lignificación y suberización de la endodermis frente a salinidad, por lo cual puede ser considerada una euhalófito cuando crece en condiciones de elevada salinidad por NaCl (Reinoso *et al.*, 2004, 2005; Reginato *et al.*, 2014).

Las plantas producen gran cantidad de compuestos polifenólicos (principalmente flavonoides) como metabolitos secundarios, que tienen diversas funciones fisiológicas y forman parte del sistema de defensa antioxidante no enzimático de la planta.

Los flavonoides son un grupo de metabolitos secundarios muy heterogéneo. Particularmente los taninos, han sido reconocidos como agentes protectores contra herbívoros, aunque también se ha

relacionado a la acumulación de taninos condensados con la respuesta a diferentes condiciones de estrés (Cai *et al.*, 2004). Los taninos y ligninas (estas últimas también se vieron incrementadas en nuestros estudios anatómicos) aumentaron en plantas de arveja y arroz bajo elevada irradiación UV-B (Rozema *et al.*, 1997), sugiriendo los autores que este hecho puede ser considerado como una característica adaptativa a estos ambientes terrestres. El daño celular por UV-B en plantas puede ser evitado eficazmente por una selectiva filtración de esta longitud de onda por los fenoles, ya que el potencial redox favorable y la estabilidad de sus radicales fenólicos convierten a estos compuestos en buenos candidatos como antioxidantes (Simic y Jovanovich, 1994), por lo que podrían estar involucrados en roles de protección de las células como en el secuestro de especies reactivas de oxígeno, las cuales producen un estrés oxidativo secundario en situaciones de estrés biótico y abiótico. Además de sus propiedades redox, los taninos poseen propiedades como agentes quelantes de iones metálicos (Zhan y Zhao, 2003), por lo que su síntesis en condiciones de salinidad podría ser estimulada para quelar la excesiva cantidad de iones  $\text{Na}^+$  y así evitar su permanencia en el citoplasma cuando las vacuolas se han saturado.

Los flavonoides han sido objeto de estudio intensivo en las últimas décadas debido a sus propiedades beneficiosas para la salud, que se atribuyen principalmente a la elevada capacidad antioxidante *in vitro*, sobre todo de los flavan-3-oles, que son los principales responsables de las propiedades antioxidantes del té, vino, chocolate, etc.

Los flavan-3-oles interrumpen eficientemente reacciones de oxidación en cadena, como la oxidación lipídica, y quelan metales de transición que pudieran favorecer las reacciones de Fenton y Haber-Weiss. El hecho que los flavan-3-oles sean solo un pequeño porcentaje de los fenoles totales indica que en las situaciones estudiadas, la activación de la ruta de los fenil propanoides tiene lugar a nivel de las primeras reacciones de la vía (Hernandez, 2007).

Las funciones que pueden tener los flavan-3-oles en las plantas no son mutuamente excluyentes, de manera que aunque, por ejemplo, las proantocianidinas puedan servir como sumidero alternativo de carbono fotosintético, también pueden ejercer su función en la resistencia a estreses bióticos (Hernandez, 2007).

El incremento en la síntesis de flavonoides observado en nuestras plántulas salinizadas, sugiere un posible rol de estos compuestos en la protección celular como antioxidantes, dada la estrecha correlación entre mayor producción de los mismos en respuesta a una mayor intensidad en el estrés (Reinoso *et al.*, 2004; 2005). Las plántulas tratadas con altas concentraciones de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  presentaron los niveles más elevados de flavonoides, particularmente flavan-3-oles, lo que coincide con síntomas de toxicidad en estas plantas. Las plántulas tratadas con la mezcla de sales también acumularon niveles significativos de estos compuestos, lo que confirmaría que es la presencia del anión sulfato lo que genera toxicidad.

Adicionalmente, el tratamiento con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  provocó un fuerte daño oxidativo en los tejidos de las plántulas, con una significativa acumulación de malondialdehído (MDA, un indicador de la

peroxidación de lípidos) y de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, coincidente con los síntomas de toxicidad observados en estas plantas (Reginato *et al.*, 2012).

Las halófitas son plantas naturalmente tolerantes a salinidad y muchas de ellas son utilizadas con fines económicos (obtención de aceites, forraje, producción de metabolitos, etc). Este estudio representa una contribución para una mejor comprensión de las respuestas fisiológicas de las plantas halófitas a la salinidad, las cuales recientemente han sido señaladas como una herramienta útil para generar cultivos tolerantes a salinidad en el futuro, ya sea incorporándolas como cultivos alternativos, como es el caso de *Aster tripholium* y *Salicornia rubra* (Erdei y Bogemans, 2009), o como donadoras de genes para la mejora genética de especies de importancia económica.

*Prosopis strombulifera* es una halófitas que acumula polifenoles y posiblemente otros compuestos bioactivos en distintos órganos. Sus frutos han sido utilizados como astringentes y diuréticos, para la fiebre, e inflamaciones de garganta, y debido al alto contenido tánico de las raíces también se ha usado para curtiembres (Ffolliot y Thames, 1983). Dentro de los distintos grupos de antioxidantes naturales, los polifenoles constituyen un grupo de gran importancia, ya que poseen múltiples propiedades que permiten su aplicación en la industria alimenticia, cosmética y farmacéutica. Por lo tanto, estos resultados nos permiten proponer a *P. strombulifera* como una interesante especie que puede ser potencialmente utilizada para el aislamiento y obtención de distintas biomoléculas de interés, y como un excelente modelo para estudios que involucren la obtención de marcadores bioquímicos y moleculares que permitan una mayor comprensión de los mecanismos de tolerancia a salinidad.

Por otra parte, los resultados obtenidos en este estudio con la utilización de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y mezcla de sales reafirman la idea discutida en trabajos previos respecto a la inconveniencia de extrapolar resultados obtenidos en laboratorio utilizando NaCl como único agente salinizante a condiciones reales de campo, ya que si consideramos la composición iónica de la mayor parte de los suelos salinizados, debemos tener en cuenta que las interacciones iónicas que ocurren entre las distintas sales pueden modificar de manera considerable las respuestas fisiológicas a salinidad de una especie determinada.

Con respecto a la producción de etileno y su rol en esta halófitas, nuevos experimentos nos permitirán clarificar este tópico.

## CONCLUSIONES

Una explicación posible para el éxito adaptativo de esta especie y su respuesta halofítica frente a NaCl podría involucrar distintos mecanismos que operan en la planta brindando tolerancia (Reinoso *et al.*, 2004; 2005; Llanes *et al.*, 2012; Llanes *et al.*, 2013; Reginato *et al.*, 2012; Reginato *et al.*, 2014), que se enumeran a continuación:

✿ Regulación de la incorporación, control estricto del transporte a larga distancia y efectiva acumulación de iones  $\text{Na}^+$  en vacuolas a través de la operación de varios transportadores iónicos en tonoplasto, manteniendo el potencial de turgencia de la hoja.

✿ Utilización tanto de  $\text{Na}^+$  como de  $\text{K}^+$  para osmorregulación, con niveles equivalentes de ambos cationes cuando las plántulas presentan un crecimiento óptimo.

✿ Algún mecanismo de exclusión de  $\text{Cl}^-$ , ya sea por restricción en la incorporación o incremento del secuestro en vacuolas.

✿ Ajuste osmótico entre la vacuola y el citoplasma para mantener el balance iónico, vía síntesis y acumulación de solutos compatibles como prolina y pinitol.

✿ Modificaciones anatómicas en raíces y parte aérea para favorecer una mayor captación de agua y compartimentalización de iones que le permiten tolerar la sal e inclusive ver estimulado su crecimiento hasta una elevada concentración.

✿ Regulación de la tasa transpiratoria, ya que estas plántulas presentaron una menor tasa transpiratoria en relación a las plántulas controles y a las tratadas con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , y por lo tanto una mayor eficiencia en el uso del agua.

✿ Mantención de los niveles de PAs en hojas semejantes a los controles, debido a tasas equilibradas de síntesis, conjugación y degradación bajo salinidad, lo que le permitiría a estas plántulas continuar su normal funcionamiento y crecimiento.

✿ Estricto control hormonal por ABA de los mecanismos de tolerancia mencionados anteriormente.

✿ La síntesis y acumulación de polifenoles, con un importante rol antioxidante y de protección celular, a través del secuestro de especies reactivas del oxígeno.



🌿 El incremento en la producción y acumulación de polifenoles bajo condiciones de salinidad y principalmente cuando el anión  $\text{SO}_4^{2-}$  está presente en el medio, puede indicar un rol para estos compuestos en la protección del daño oxidativo inducido por el estrés salino severo. Estos compuestos formarían parte del sistema antioxidante no enzimático en *P. strombulifera* y complementarían la acción del sistema antioxidante enzimático permitiendo la extrema tolerancia de esta especie.

## BIBLIOGRAFIA

- Anderson, D., Del Aguila J., Bernardon A. 1970. Las formaciones vegetales en la provincia de San Luis. Revista de Investigación Agropecuaria, INTA. Serie 2, **Biología y Producción Vegetal**, Vol VII (3):153-183. Buenos Aires, República Argentina.
- Balasundram N., Sundram K, Sammar S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by products, Antioxidant activity, occurrence and potential uses. **Food Chem.** 1:191-203.
- Barbolan A., Zorro L., Guillen D., Barroso C. 2003. Study of the polyphenol content of red and white grape varieties by liquid chromatography-mass spectrometry and its relationship to anti-oxidant power. **J. Chromatogr. A.** 1012:31-38.
- Beltrano, J., Montaldi E., Bértoli C., Carbone A. 1997. Emission of water stress ethylene in wheat (*Triticum aestivum* L.) ears: effects of rewatering. **Plant Growth Regul.** 21: 121-126
- Berli FJ, Moreno D, Piccolo P, Hespanhol-Viana L, Silva MF, Bressan-Smith R, cavarnaro JB, Bottini R. 2010. Abscisic acid is involved in the response of grape (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec leaf tissues to ultraviolet-B radiation by enhancing ultraviolet-absorbing compounds, antioxidant enzymes and membrane sterols. **Plant Cell Environ.** 33(1): 1-10.
- Bie Z., Ito T., Shinohara Y. 2004. Effects of sodium sulfate and sodium bicarbonate on the growth, gas exchange and mineral composition of lettuce. **Sci. Horticult.** 99: 215-224.
- Blecker A., Kende H. 2000. Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** 2000. 16:1-18
- Blumwald E., Aharon G., Apse M. 2000. Sodium transport in plant cells. **Biochim. Biophys. Acta** 1465: 140-151.
- Bohnert H., Nelson D., Jensen R. 1995. Adaptations to Environmental Stresses. **Plant Cell** 7: 1099-1111.
- Boyer J. S. 1982. Plant productivity and environment. **Science** 218: 443-448.
- Bray E. A. 2002. Abscisic acid regulation of gene expression during water- deficit stress in the era of the *Arabidopsis* genome. **Plant Cell Environ.** 25: 153-161.
- Buchner P., Takahashi H., Hawkesford M. J. 2004. Plant sulphate transporters: coordination of uptake, intracellular and long-distance transport. **J. Exp. Bot.** 55: 1765-1773.
- Burkart A. 1937. Estudios morfológicos y etológicos en el género *Prosopis*. **Darwiniana** 3: (1) 27-48.
- Burkart A. 1952. **Las Leguminosas Argentinas**. Acme Agency Ed. Buenos Aires. Argentina.
- Burkart A. 1976. A monograph of the genus *Prosopis* (Leguminosae subfam. Mimosoideae) Catalogue of the recognized species of *Prosopis*. **J. Arnold Arbo.** 57: 450-525.
- Cai Y., Luo Q., Sun M., Corke H. 2004. Antioxidant activity and polyphenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Sci.** 74: 2157-2184.

- Cantero J. J., Cantero A., Cisneros J. M. 1996. **La vegetación de los paisajes hidro-halomórficos del centro de Argentina**. Ed. Fundación Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.
- Cervantes E. 2002. **Ethylene: new interactions, still ripening**. Meeting report. NATO Advanced Research Workshop on Biology and Biotechnology of the Plant Hormone Ethylene, 23–27 April 2002, Murcia, Spain.
- Chen T. H., Murata N. 2002. Enhancement of tolerance to abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. **Curr. Op. Plant Biol.** 5: 250-257.
- Cisneros J., Cantero J.J., Cantero Gutiérrez A. 1997. Relaciones entre la fluctuación del nivel freático, su salinidad y el balance hídrico, en los suelos salinos-sódicos del centro de Argentina. **Revista UNRC.** 17 (1): 23-35.
- Cisneros J. M., Cholaky C. G., Cantero Gutierrez A., Gonzalez J. G., Reynero M. A., Diez A., Bergesio L. 2012. **Erosión hídrica, principios y técnicas de manejo**. UniRío Editora. Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.
- Datta K., Varma S., Angrish R., Kumar V., Kumari P. 1998. Alleviation of salt stress by plant growth regulators in *Triticum aestivum* L. **Biol. Plant.** 40: 269-275.
- De la Vega A. 1996. **Variabilidad genética y estructuración poblacional en especies del género *Prosopis* (Leguminosae). Recurso biótico para reforestar zonas áridas**. Tesis Doctoral, ETSIA. Universidad Pública de Navarra. España.
- Dixon R. A., Paiva N. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism, *Plant Cell* 7: 1085-1097.
- Do Polyamines Participate in the Long-Distance Translocation of Stress Signals in Plants?. **Russ. J Plant Physiol.** 49(1): 120–130.
- Erdei L., Bogemans J. 2009. Domestication of halophyte species: from laboratory to production and market. **Actas Primer Congreso de la Red Argentina de Salinidad**. Pág. 20.
- FAO 2008. FAO land and plant nutrition management service. Disponible online en: <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush/>.
- Felker P. 2007. Unusual physiological properties of the arid adapted tree legume *Prosopis* and their applications in developing countries. En: **Perspectives in Biophysical Plant Ecophysiology: A Tribute to Park Nobel**. De la Barrera E.y Smith W. (Eds.) Mildred E. Mathias Botanical Garden University of California, Los Angeles. pp.1-41.
- Ffolliott P., Thames J. 1983. **Manual sobre taxonomía de *Prosopis* en México, Perú y Chile**. Rome, FAO. pp 35.
- Flowers T. 2006. Preface. Plants and Salinity Special Issue. **J. Exp. Bot.** 57: 5, p. iv.
- Flowers T., Colmer T. 2008. Salinity tolerance in halophytes. **New Phytol.** 179: 945-963.
- Flowers T., Hajibagheri M., Clipson N. 1986. Halophytes. **Q. Rev. Biol.** 61: 313-337.
- Forment J., Naranjo M. A., Roldán M., Serrano R., Vicente O. 2002. Expression of *Arabidopsis* SR-like splicing proteins confers salt tolerance to yeast and transgenic plants. **Plant J.** 30: 511-519.

- Foyer C.H., Noctor G. 2005. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress. **Plant Cell Environ.** 28: 056-1071.
- Ghassemi F., Jakeman A., Nix H. 1995. **Salinization of land and water resources. Human causes, extent management and case studies.** University of New South Wales Press Ltd, Sydney.
- Halliwell B., Gutteridge JMC. 2007. **Free Radicals in Biology and Medicine.** Oxford University Press, Oxford.
- Hasegawa P., Bressan R., Zhu J-K., Bohnert H. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 51: 463-499.
- Hernández I. 2007. **Acumulación y oxidación de flavan-3-oles y ascorbato en plantas y su significado fisiológico.** Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona, España.
- Iqbal R. M. 2003. Leaf Area and Ion Contents of Wheat Grown under NaCl and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Salinity. **Pak. J. Biol. Sci.** 6 (17): 1512-1514.
- Kende H. 1993. Ethylene biosynthesis. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 44:283-307
- Khan M. A., Ungar I. A. 2000. Alleviation of salinity-enforced dormancy in *Atriplex griffithii* Moq. var. *stocksii* Boiss. **Seed Sci. Technol.** 28: 29-37.
- Kim D.O., Chun O.K., Kim Y.J., Moon H.-Y., Lee C. Y. 2003 Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. **J. Agric. Food Chem.** 51: 6509-6515.
- Levitt J. 1980. **Responses of plants to environmental stresses.** New York; Academic Press.
- Llanes A., Reinoso H., Luna V. 2005. Germination and Early Growth of *Prosopis strombulifera* Seedlings in Different Saline Solutions. **World J. Agric. Sci** 1 (2): 120-128.
- Llanes A., Bertazza O., Palacio G. and Luna V. 2012. Different sodium salts cause different solute accumulation in the halophyte *Prosopis strombulifera*. **Plant Biol.** 15: 118-125.
- Llanes A., Masciarelli O., Ordoñez R., and Luna V. 2013. Differential growth responses to sodium salts involve different ABA catabolism and transport in the halophyte *Prosopis strombulifera*. **Biologia Plantarum**, doi: 10.1007/s10535-013-0365-6.
- Lu W., Kirkham M., Long. Z., Wassom C. 1991. Genotypic variation in ethylene production by maize grown under nutrient deficiency. **J. Plant Physiol.** 137: 483-487.
- Manivannan P., Abdul Jaleel C., Sankar B., Kishorekumar A., Murali P., Somasundaram R., Panneerselvam R. 2008. Mineral uptake and biochemical changes in *Heliantus annuus* under treatment with different sodium salts. **Colloids Surf. B** 62: 58-63.
- Marchanda G. y N. Garg. 2008. Salinity and its effects on the functional biology of legumes. **Acta Physiol. Plant.** 30: 595-618.
- Martinez-Ballesta M. C., Martinez V., Carvajal M. 2004. Osmotic adjustment, water relations and gas exchange in pepper plants grown under NaCl or KCl. **Environ. Exp. Bot.** 52: 161-174.
- Matoo A. y J. Suttle. 1991. **Ethylene in root growth and development.** The Plant Hormone Ethylene. Boca Raton, FL: CRC Press; 159-181.

- Munns R. 2005. Genes and salt tolerance: bringing them together. **New Phytol.** 167: 645-663.
- Munns R., Schachtman D., Condon A. 1995. The significance of a two-phase growth response to salinity in wheat and barley. **Aust. J. Plant Physiol.** 22: 561-569.
- Naczek M., Shahidi F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. **J. Chromatogr. A** 1054: 95-111.
- Naeem M., Qureshi R. 2005. Rice growth and ionic composition under saline hydroponic conditions: II. Supplemented with Cl<sup>-</sup>: SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> ratios. **Pak. J. Agri. Sci.** 42:1-2.
- Navarro J., Flores P., Garrido C., Martinez V. 2006. Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at ripening stages, as affected by salinity. **Food Chem.** 96: 66-73.
- Nigel C.W., Glories Y. 1991 Use of a modified dimethylaminocinnamaldehyde reagent for analysis of flavanols. **Am. J. Enol. Vitic.** 42: 364-366.
- Okusanya O.T., Ungar I.A. 1984. The growth and mineral composition of three species of *Spergularia* as affected by salinity and nutrients at high salinity. **Am. J. Bot.** 71: 439-447.
- Owens S. 2001 Salt of the earth. Genetic engineering may help to reclaim agricultural land lost due to salinization. **EMBO Reports** 2: 877-879
- Passera C. B. 2000. **Fisiología de *Prosopis* spp.** Actas de la III Reunión Nacional de la Asociación Argentina de *Prosopis*. Mendoza, Argentina.
- Pennazio S., Roggero P. 1991. Effects of exogenous salicylate on basal and stress-induced ethylene formation in soybean. **Biol. Plant.** 33: 58-65.
- Pierik R., Tholen D., Poorter H., Visser E., Voeseek L. 2006. The Janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. **Trends Plant Sci.** 11:176-183
- Reddy M., Rao U., Iyengar E. 1997. **Carbon metabolism under salt stress.** En: *Strategies for improving salt tolerance in higher plants.* Eds. Jaiwal P., Singh R., Gulati A. Sci. Pub. Inc. New Hampshire pp. 159-181.
- Reginato M. 2009. **Respuesta de la halófito *Prosopis strombulifera* a diferentes medios salinos. Modificaciones de los parámetros morfofisiológicos y su regulación hormonal.** Tesis Doctoral. UNRC.
- Reginato M., Abdala G., Miersch O., Ruiz O., Moschetti E., Luna V. 2012. Changes in the levels of jasmonates and free polyamines induced by Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and NaCl in roots and leaves of the halophyte *Prosopis strombulifera*. **Biologia Section Botany** 67 (4): 689-697.
- Reginato M., Sosa L., Llanes A., Hampp E., Vettorazzi N., Reinoso H., Luna V. 2014. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and NaCl determine different growth responses and ion accumulation in the halophytic legume *Prosopis strombulifera*. **Plant Biol** 16: 97-106.
- Reinoso H., Sosa L., Ramirez L., Luna V. 2004. Salt-induced changes in the vegetative anatomy of *Prosopis strombulifera* (Leguminosae). **Can. J. Bot.** 82: 618-628.

- Reinoso H., Sosa L., Reginato M., Luna V. 2005. Histological alterations induced by sodium sulfate in the vegetative anatomy of *Prosopis strombulifera* (Lam.) Benth. **World J. Agric. Sci.** 1 (2): 109-119.
- Rozema J., Van de Staaij J., Björn B., Caldwell M. 1997. UV-B as an environmental factor in plant life: stress and regulation. **Trees** 12: 22-28.
- Scheibe R., Backhausen J., Emmerlich V., Holtgreffe S. 2005. Strategies to maintain redox homeostasis during photosynthesis under changing conditions. **J Exp. Bot.** 56: 1481-1489.
- Scott A. Finlayson, In-Jung Lee, John E. Mullet, and Page W. Mongan. 1999. The mechanism of Rhythmic Ethylene Production in Sorghum. The role of fitochrome B and Simulated Shading. **Physiol. Plant.** 119: 1083-1089.
- Shannon M. C. 1994. **The potential for improved salt tolerance of the cultivated soybean.** En: *Current Developments in Salinity and Drought Tolerance of Plants*, pp. 103-113. Ansari R., Flowers T., Azmi A. R. (Eds). Plant Physiol. Div., Atomic Energy Agric. Res. Centre, Tando Jarm, Pakistán.
- Shannon M. C., Grieve C. M. 1999. Tolerance of vegetable crops to salinity. **Sci. Hort.** 78: 5-38.
- Shi D, Sheng Y. 2005. Effect of various salt–alkaline mixed stress conditions on sunflower seedlings and analysis of their stress factors. **Environ. Exp. Bot.** 54: 8-21.
- Simic M., Jovanovich S. 1994. **Inactivation of oxygen radicals by dietary phenolic compounds in anticarcinogenesis.** En *Food Phytochemicals for Cancer Prevention II*. American Chemical Society, Washington DC, pp 20-39.
- Smalle J, Van Der Straeten D. 1997. Ethylene and vegetative development. **Physiologia Plantarum** 100, 593–605.
- Sosa L., Llanes A., Reinoso H., Reginato M., Luna V. 2005. "Osmotic and Specific Ion Effects on the Germination of *Prosopis strombulifera*". **Ann. Bot.** 96 (2): 261-267.
- Sreenivasulu N., Grimm B., Wobus U., Weschke W. 2000. Differential response of antioxidant compounds to salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive seedlings of foxtail millet (*Setaria italica*). **Physiol. Plant.** 109: 435-442.
- Steel G. D., Torrie J. H. 1980. **Bioestadística. Principios y Procedimientos.** Mc Graw-Hill. Bogotá Colombia.
- Tester M., Davenport R. 2003. Na<sup>+</sup> tolerance and Na<sup>+</sup> transport in Higher Plants. **Ann. Bot.** 91: 503-527.
- Tsao R. 2010. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. **Nutrients** 2010, 2, 1231-1246
- Volkmar K., Hu Y., Steppuhn H. 1998. Physiological responses of plants to salinity: A review. **Can. J. Plant Sci.** 78 (1): 19-27.
- Waterman P.G., Mole S. 1994. **Analysis of phenolic plant metabolites.** En: *Methods in Ecology*; Blackwell Scientific Publications: Oxford, U.K.
- Yang S., Hoffman N. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. **Annu. Rev. Plant Physiol.** 35: 155-189.

- Yeo A. R. 1998. Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. **J. Exp. Bot.** 49: 915-929.
- Zapata P., Serrano M., Pretel T., Amorós A., Botella A. 2003. Changes in ethylene evolution and polyamines profiles of seedlings of nine cultivars of *Lactuca sativa* L. in response to salt stress during germination. **Plant Sci.** 164: 557-563.
- Zhan X., Zhao X. 2003. Mechanism of adsorption from aqueous solutions using an adsorbent synthesized from natural condensed tannin. **Water Res.** 37: 3905-3912.
- Zhu J. K. 2001. Plant salt tolerance. **Trends Plant Sci.** 6: 66-71.

## ANEXO

### Fotos Metodología

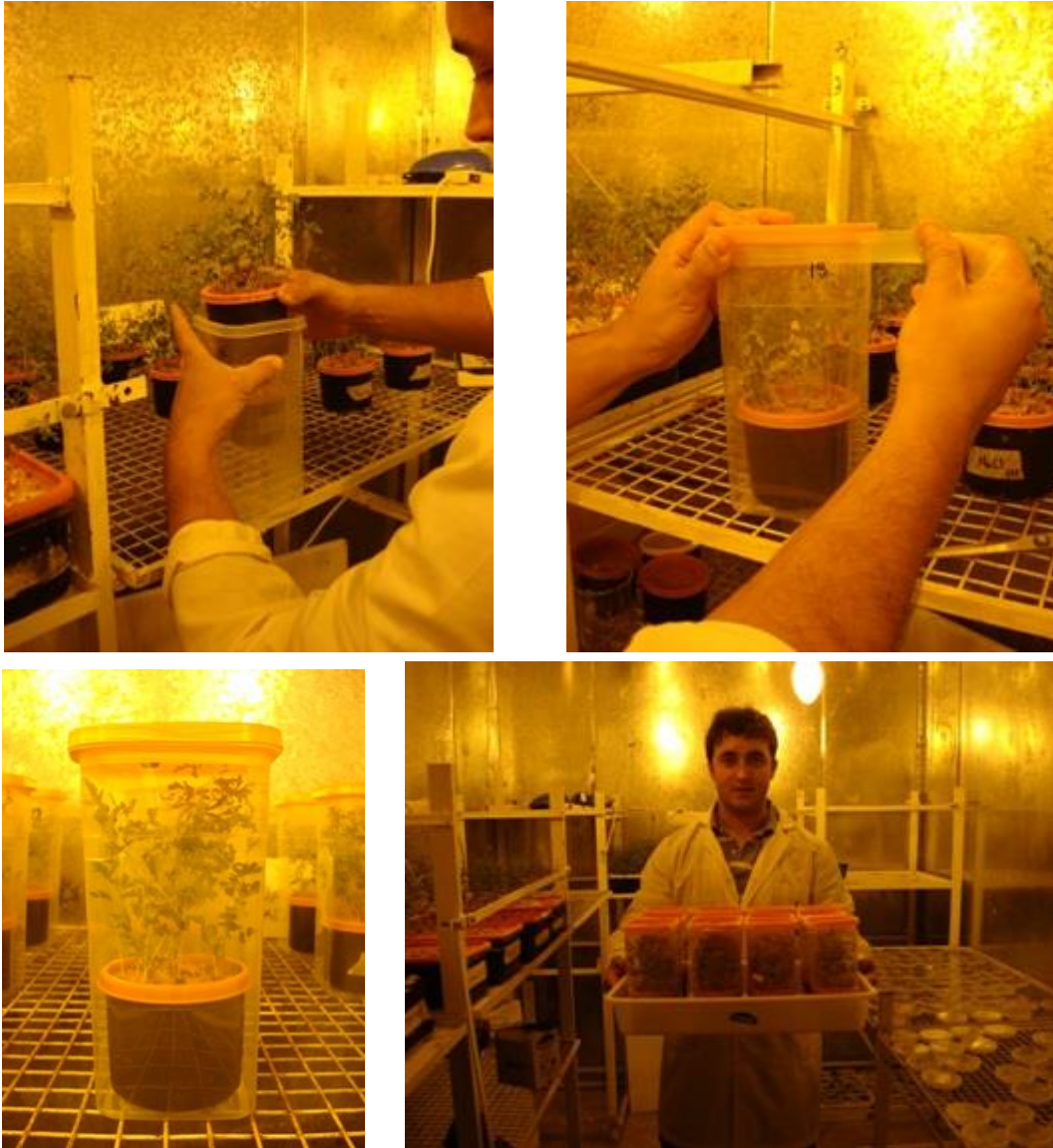


**Fig. A.** Cultivo hidropónico.



**Fig. B.** Cultivo de plantas para ensayos de etileno.





**Fig. C.** Preparación del dispositivo para cuantificación de etileno.



**Fig. D.** Incubación de dispositivo en oscuridad