

**Universidad Nacional de Lomas De Zamora**

**Facultad de Ciencias Agrarias**



**Trabajo Final de Grado**

**“Respuestas de especies forrajeras a la salinidad, la alcalinidad y a la  
inoculación con microorganismos en los estadios de germinación y  
crecimiento vegetativo temprano”**

Autor: Corlito, Maximiliano

Directora: García, María Dina

Codirectora: Pesqueira, Julieta

**2021**

---

	II
Carátula.....	I
Índice general.....	II
Índice de figuras.....	V
Índice de tablas.....	VII
Abreviaturas y símbolos.....	VIII
<b>1 Resumen.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Introducción.....</b>	<b>5</b>
2.1. Situación y características de los suelos salinos y alcalinos .....	5
2.2. Efectos de la salinidad y la alcalinidad en las plantas.....	7
2.3. Especies tolerantes a suelos salinos y/o sódicos con elevado potencial forrajero .....	14
2.4. Inoculación con microorganismos benéficos.....	16
<b>3. Objetivos.....</b>	<b>18</b>
3.1 Objetivos generales.....	18
3.2 Objetivos específicos.....	19
<b>4. Hipótesis.....</b>	<b>19</b>
<b>5. Materiales y Métodos.....</b>	<b>20</b>
5.1. Experimento 1: Efectos de la salinidad y el pH sobre la germinación y el T <sub>50</sub> de <i>C. gayana</i> , <i>P. coloratum</i> , <i>L. tenuis</i> , <i>L. corniculatus</i> y <i>M. albus</i> .....	20
5.1.1. Soluciones de incubación.....	20
5.1.2. Condiciones de incubación.....	20

5.1.3. Material vegetal.....	20
5.1.4. Parámetros evaluados.....	21
5.1.5. Diseño estadístico.....	21
5.2. Experimento 2: Efecto de la salinidad, el pH y la inoculación de las semillas con BPCV sobre la emergencia y el crecimiento temprano de plantas de <i>C. gayana</i> cv. Katambora.....	22
5.2.1. Tratamientos salino/alcalinos e inoculación con BCPV.....	22
5.2.2. Crecimiento de las plantas. ....	23
5.2.3. Contenido relativo de agua (CRA).....	24
5.2.4. Estabilidad de las membranas celulares.....	25
5.3. Análisis estadístico.....	25
<b>6. Resultados.....</b>	<b>26</b>
6.1. Experimento 1: Efectos de la salinidad y el pH sobre la germinación y el $T_{50}$ de <i>C. gayana</i> , <i>P. coloratum</i> , <i>L. tenuis</i> , <i>L. corniculatus</i> y <i>M. albus</i> .....	26
6.1.1. PG y GR de semillas de <i>C. gayana</i> , <i>P. coloratum</i> , <i>L. tenuis</i> , <i>L. corniculatus</i> y <i>M. albus</i> .....	26
6.1.2. $T_{50}$ .....	28
6.2. Experimento 2: Efecto de la salinidad, el pH y la inoculación de semillas con BCPV sobre la emergencia y el crecimiento temprano de plantas de <i>C. gayana</i> cv. Katambora .....	30
6.2.1. Emergencia.....	30
6.2.2. Número de macollos por planta .....	31
6.2.3. PSV, PSR, y relación V/R.....	31

6.2.4. Contenido de clorofila.....	34
6.2.5. Contenido relativo de agua (CRA) .....	34
6.2.6. Estabilidad de las membranas celulares foliares estimado mediante el porcentaje de pérdida de electrolitos (PPE).....	35
<b>7. Discusión.....</b>	<b>36</b>
7.1. Experimento 1. Efectos de la salinidad y el pH sobre la germinación y el T <sub>50</sub> de <i>C. gayana</i> , <i>P. coloratum</i> , <i>L. tenuis</i> , <i>L. corniculatus</i> y <i>M. albus</i> .....	36
7.2. Experimento 2: Efecto de la salinidad, el pH y la inoculación de semillas con BCPV sobre la emergencia y el crecimiento temprano de plantas de <i>C. gayana</i> cv. Katambora .....	37
<b>8. Conclusiones.....</b>	<b>42</b>
<b>9. Bibliografía.....</b>	<b>43</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1:** Vista general de la cámara donde se llevó a cabo el experimento. Las semillas de *C. gayana* cv. Katambora fueron sembradas en los recipientes con perlita y vermiculita con los tratamientos correspondientes.

**Figura 2:** Poder germinativo (PG, porcentaje de germinación de las semillas luego de 19 días del comienzo de la imbibición en agua desionizada, en relación con el total de semillas sembradas) de los genotipos evaluados. Los valores representan la media de 5 repeticiones  $\pm$  EEM. Letras diferentes indican diferencia significativa según Tukey ( $p \leq 0,05$ )

**Figura 3:** Germinación relativa a la germinación en agua (GR) luego de 19 días de imbibición en las soluciones N10 y N50, A10 y A50. Los valores representan la media de 5 repeticiones  $\pm$  EEM. Letras diferentes indican diferencia significativa según Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

**Figura 4:** Tiempo al 50 % de germinación ( $T_{50}$ ) de las semillas embebidas en las soluciones N10, N50, A10 y A50. Los valores representan la media de 5 repeticiones  $\pm$  EEM. Letras diferentes indican diferencia significativa según Tukey ( $p \leq 0,05$ ) dentro de cada genotipo.

**Figura 5:** Evolución de la germinación relativa a la germinación en agua (GR, en %) de las semillas embebidas en las soluciones N10, N50, A10 y A50. Los valores representan la media de 5 repeticiones  $\pm$  EEM.

**Figura 6:** Efecto de la salinidad, el pH y la inoculación con Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV) sobre el porcentaje de emergencia de plántulas de *C. gayana* cv. Katambora. Las columnas son promedios de seis repeticiones y las barras indican los errores estándar de la media. El ANVA no mostró diferencias significativas entre las medias de los tratamientos.

**Figura 7:** Efecto de la salinidad y el pH sobre el Peso Seco del Vástago (PSV) de plántulas de *C. gayana* cv. Katambora. Las barras indican el error estándar

de la media. Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

**Figura 8:** Plantas de *C. gayana* cv Katambora en el día de la cosecha. Los tratamientos ordenados de izquierda a derecha son: control, N25, N50, A25 y A50. En este caso corresponden a las plantas que no fueron inoculadas con bacterias PGPR.

**Figura 9:** Comparación de plantas cosechadas de *C. gayana* cv Katambora. El tratamiento de la izquierda corresponde al N25 y el de la derecha a A25.

**Figura 10:** Comparación de plantas cosechadas de *C. gayana* cv Katambora. El tratamiento de la izquierda corresponde al N25 y el de la derecha a N50.

**Figura 11:** Efecto de la salinidad y el pH sobre el contenido relativo de agua (CRA) de plántulas de *C. gayana* cv. Katambora. Las barras indican el error estándar de la media. Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

**Figura 12:** Efecto de la inoculación con Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV) sobre el Porcentaje de Perdida de Electrolitos (PPE) de plántulas de *C. gayana* cv. Katambora. Las barras indican los errores estándar de la media. Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1:** Clasificación de los suelos según la conductividad eléctrica del extracto saturado en  $\text{dS m}^{-1}$ , según el United States Salinity Laboratory (1954).

**Tabla 2:** Clasificación de suelos en función de la conductividad eléctrica, porcentaje de sodio intercambiable y pH. Fuente: Montico 2006.

**Tabla 3:** Comparación de la germinación acumulada (G) de las semillas de cada genotipo embebidas 19 días en agua o en la solución N10. Los valores representan la media de 5 repeticiones.

**Tabla 4:** Efecto de la salinidad, el pH y la inoculación con Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV) sobre el porcentaje de emergencia de plántulas de *C. gayana* cv. Katambora.

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ANVA Análisis de la varianza

BPCV Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal

CE Conductividad eléctrica

CIC Capacidad de Intercambio Catiónico

CRA Contenido relativo de agua

DDS Días después de la siembra

DFFF Densidad de flujo fotónico fotosintético

G Germinación acumulada

GR Germinación acumulada expresada como porcentaje de la germinación en agua.

PF Peso fresco

PG Poder Germinativo

PPE Porcentaje de pérdida de electrolitos

PS Peso seco

PSI Porcentaje de sodio de intercambio

PSR Peso seco de la raíz

PSV Peso seco del vástago

Pt Peso turgente

T<sub>50</sub> Tiempo hasta el 50% de germinación

VG Velocidad de germinación

## 1. RESUMEN

La superficie global afectada por la salinidad y la alcalinidad supera los 900 millones de hectáreas. Sólo la provincia de Buenos Aires posee más de 4,7 millones de ha de suelos arcillosos con alto contenido de sales sódicas.

Diversas especies vegetales exhiben características de tolerancia que las hacen potencialmente útiles para estudiar los mecanismos de respuesta que generan tolerancia a la salinidad y alcalinidad. Por ejemplo, *Chloris gayana* y *Panicum coloratum* muestran diversos niveles de adaptación a estas condiciones edáficas. Además, existen leguminosas como *Lotus tenuis* y *Melilotus albus*, cuyos niveles de tolerancia a condiciones de salinidad y alcalinidad edáfica permiten evaluar una posible consociación con las poáceas mencionadas, lo cual incrementaría el valor nutritivo de la pastura. Una evaluación exhaustiva de estas especies en condiciones controladas permitiría discriminar entre los efectos de la salinidad y la alcalinidad sobre la germinación y el crecimiento de las plantas y si la inoculación con microorganismos promotores del crecimiento mejora el desempeño de las mismas en estas condiciones.

En este contexto, el primer objetivo del trabajo fue comparar los efectos de la salinidad y la alcalinidad en la germinación y el T<sub>50</sub> de las semillas de *C. gayana* cv. Katambora (PGG Wrighton S.A.), *P. coloratum* cvs. Klein Verde y Bambatsi (Peman), *M. albus*, *L. tenuis* cv. Nahuel (Biscayart), *L. tenuis* (Picasso) y *L. corniculatus* (semilla identificada de Picasso S.A.). Para esto, se llevó a cabo un diseño completamente aleatorizado con un arreglo factorial de 7 genotipos x 2 niveles de salinidad x 2 valores de pH. Las semillas se incubaron 19 días bajo un fotoperiodo de 12 horas a 25 °C y 20 °C durante los períodos de luz y oscuridad, respectivamente. Las soluciones de germinación surgieron de la combinación en proporciones 1:1 de sales de Na<sup>+</sup> neutras (NaCl - Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y alcalinas (NaHCO<sub>3</sub> - Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Las concentraciones salinas utilizadas fueron de 10 y 50 mM, lo cual resultó en cuatro tratamientos: N10 (control) y N50 para las sales neutras (pH = 6,5) y A10 y A50 para las sales alcalinas (pH = 10,2). La germinación (%) se calculó como el número de semillas germinadas en un tratamiento / Número de semillas germinadas en agua x 100. Las medias se

sometieron al análisis de la varianza (ANVA) y cuando éste mostró diferencias significativas se compararon con la prueba de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

La salinidad (N50) no afectó la germinación de ninguna especie evaluada. La alcalinidad sólo inhibió la germinación de las semillas de *P. coloratum* cv. Klein Verde, que en A10 germinaron un 38 % menos que en la solución control. La combinación de alcalinidad y salinidad (A50) inhibió drásticamente la germinación de semillas de todos los genotipos excepto de *C. gayana*. La germinación de las semillas incubadas en A50 fue del 72 % para *C. gayana* y osciló entre el 0 % y el 20 % para el resto de los genotipos. La salinidad aumentó ligeramente el  $T_{50}$  de todos los genotipos (12 %) pero la alcalinidad no lo afectó.

El segundo objetivo fue evaluar los efectos de la salinidad, el pH y la inoculación de las semillas con compuestos comerciales que contenían BPCV sobre la emergencia, el crecimiento y el desarrollo temprano de plantas de *C. gayana* cv. Katambora. Para cumplir con este objetivo se sembraron 30 semillas sobre recipientes plásticos con sustrato compuesto por una mezcla de perlita y vermiculita. Los recipientes se colocaron sobre bandejas con solución nutritiva completa más el tratamiento de salinidad/pH correspondiente. Las plantas crecieron bajo 16 horas de fotoperíodo con temperaturas máxima y mínima medias de 27,7 y 23,4 °C durante los periodos de luz y oscuridad, respectivamente. La duración del periodo de evaluación fue de 24 días. El día de la cosecha se determinó el peso fresco y seco del vástago y la raíz, el contenido de clorofila, número de macollos, el contenido relativo de agua y la permeabilidad de las membranas. El experimento consistió en un diseño completamente aleatorizado con estructura factorial de 2 niveles de salinidad x 2 valores de pH x 4 inoculantes, con 6 repeticiones por tratamiento. Las concentraciones salinas utilizadas para el ensayo fueron de 25 y 50 mM para cada una de las soluciones, lo cual resultó en los tratamientos N25 y N50 para las sales neutras (pH = 6,4) y A25 y A50 para las sales alcalinas (pH = 10). Para los tratamientos de inoculación se realizaron diluciones de compuestos comerciales que contenían: *Bacillus subtilis* (Inoculante Promotor BS de Nitrasoil), *Azospirillum brasilense* INTA AZ39 + Bioprotector (ambos de Nitrasoil), *A. brasilense* + *Pseudomonas fluorescens* (de Barenbrug) y bioprotector (de Nitrasoil) como tratamiento control.

Ninguno de los tres factores evaluados (salinidad, pH e inoculación) afectó la emergencia de *C. gayana*. El pH alcalino inhibió el desarrollo de macollos, independientemente de la salinidad. La combinación de salinidad con alcalinidad produjo disminución en los pesos secos del vástago. El peso seco de las raíces de plantas expuestas a alcalinidad fue 75 % menor que el control; mientras que el incremento de la concentración salina, independientemente del pH, redujo 41 % el PSR. La relación entre los pesos secos del vástago y de la raíz (V/R) se mantuvo estable salvo en plantas expuestas a 50 mM en las cuales disminuyó 22 % respecto a la concentración de 25 mM. Únicamente el factor pH tuvo efecto significativo sobre el contenido de clorofila. Las plantas que crecían en pH neutro mostraron un 76 % más de clorofila que las que crecían en pH alcalino (10,82 y 6,15 unidades SPAD, respectivamente). El CRA se redujo un 16 % cuando se combinaron los factores salinidad y alcalinidad. El porcentaje de pérdida de electrolitos en tejidos foliares, utilizado como indicador del daño de la membrana celular, aumentó levemente con alcalinidad, independientemente de la concentración salina. Sin embargo, en plantas previamente inoculadas con *A. brasilense* + *P. fluorescens*, y expuestas a las mismas combinaciones de concentración salina y pH, el PPE fue 23 % menor que en las plantas sin inocular.

Conclusiones: i) La GR de *C. gayana* en A50, si bien es 35 % menor a la del control, es similar a la observada en N50 y A10, con un T50 32 % mayor que el control; ii) La incubación de las semillas de *P. coloratum*, *L. tenuis*, *L. corniculatus* y *M. albus* en la solución A50 inhibe fuertemente la GR; iii) En etapas tempranas de crecimiento, la biomasa final de plantas de *C. gayana* cv Katambora disminuye cuando se le aplica un estrés salino/alcalino.

Palabras clave: forrajeras subtropicales, estrés, bacterias, pH.

## 2. INTRODUCCION

### 2.1. Situación y características de los suelos salinos y alcalinos

La FAO/UNESCO estimó que la superficie terrestre global afectada por salinidad y alcalinidad supera los 900 millones de hectáreas (Wicke *et al.*, 2011). Esta superficie aumenta a una tasa del orden de 0,25 a 0,50 millones de hectáreas por año, principalmente debido al incremento de la frecuencia de eventos climáticos extremos (sequías, inundaciones, etc) y la expansión de la agricultura bajo riego (Sánchez *et al.*, 2015).

Para el año 2050, se calcula que la producción de alimentos a nivel mundial deberá crecer un 60 % (FAO, 2016). Esto, introducirá en el contexto agropecuario un intenso debate por la cantidad de superficie cultivable, al mismo tiempo que la necesidad de un mejor aprovechamiento de los suelos que hoy sufren algún tipo de degradación como, por ejemplo, salinidad y alcalinidad (Mahjoory, 2011). La salinidad reduce los rendimientos de los cultivos y, por encima de ciertos umbrales, hace inviable completamente su producción (FAO, 2015).

La Argentina es el tercer país con mayor superficie de suelos afectados con sales en el mundo en forma natural (salinización primaria), después de Rusia y Australia (FAO-UNESCO en Lavado, 2007). A diferencia de otros países, que poseen suelos afectados por sales en climas áridos y semiáridos, en Argentina también existen enormes extensiones de estos suelos en climas húmedos y subhúmedos donde las sales provienen de las capas freáticas (Taboada *et al.*, 2003).

Los suelos salinos se caracterizan por poseer una elevada concentración de sales solubles. Los iones más comúnmente encontrados son el  $\text{Cl}^-$  y los sulfatos de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ . La salinidad de la solución del suelo se cuantifica en términos de conductividad eléctrica o de potencial osmótico. Cuanto más alta es la concentración salina, mayor es la conductividad eléctrica y menor el potencial osmótico. El umbral inferior de salinidad en los suelos se establece convencionalmente en una conductividad eléctrica del extracto saturado de 4 dS

$\text{m}^{-1}$  (a 25 °C). En base a la conductividad eléctrica del extracto saturado (CEs), el United States Salinity Laboratory de Riverside (1954) establece grados de salinidad (Tabla 1).

**Tabla 1:** clasificación de los suelos según la conductividad eléctrica del extracto saturado en  $\text{dS m}^{-1}$ , según el United States Salinity Laboratory (1954).

CEs ( $\text{dSm}^{-1}$ )	Descripción
0-2	Suelos normales
2-4	Suelos ligeramente salinos
4-8	Suelos salinos
8-16	Suelos fuertemente salinos
> 16	Suelos extremadamente salinos

Por otro lado, la sodificación o alcalinización ocurre cuando en la solución del suelo existe una concentración elevada de sales sódicas de tipo carbonato y bicarbonato de  $\text{Na}^+$  (Etchevehere, 1976). Las arcillas saturadas de cationes  $\text{Na}^+$ , en presencia de agua de lluvia y  $\text{CO}_2$  disuelto, se hidrolizan liberando iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{OH}^-$  a la solución edáfica, lo cual incrementa el pH. El criterio generalmente aceptado para definir a un suelo alcalino es que posea un pH mayor a 8,5.

El porcentaje de sodio intercambiable (PSI) se define como la cantidad de sodio adsorbido por las partículas del suelo, expresado en porcentaje de la CIC, es decir,  $\text{PSI} = \text{Na}^+ \text{ intercambiable (meq / 100 g de suelo) / CIC (meq / 100 g de suelo) * 100}$ . Este parámetro se usa comúnmente para estimar la concentración de  $\text{Na}^+$  de un suelo. Los suelos alcalinos poseen un PSI mayor a 15 %.

Utilizando la conductividad eléctrica, el porcentaje de sodio intercambiable del complejo de cambio y el pH, se clasifica a los suelos en salinos, salinos-alcalinos y alcalinos (Tabla 2).

**Tabla 2:** Clasificación de suelos en función de la conductividad eléctrica, porcentaje de sodio intercambiable y pH. Fuente: Montico 2006.

Conductividad eléctrica (dS/cm a 25°C)	% de Na <sup>+</sup> intercambiable en el complejo de cambio	pH	Clasificación
< 4	< 15	6,5-7,5	Normal
> 4	< 15	7-8,5	Salino
> 4	> 15	> 8.5	Salino- Alcalino
< 4	> 15	> 8,5	Alcalino

La Pampa Deprimida es una de las regiones del país más afectada por sales, ya que el 50 % de la superficie está ocupada por suelos con diversos niveles de salinidad o alcalinidad. Estos suelos son característicos de sectores de relieve cóncavo, donde hay aporte de agua de escurrimiento y/o superficie freática (Lavado, 1988; Imbellone *et al.*, 2010). Si bien el pastizal natural es el principal recurso forrajero utilizado en la zona, una alternativa para incrementar la producción, a corto plazo, es la introducción de especies forrajeras de buena calidad con potencial para tolerar tales condiciones ambientales, junto con técnicas de manejo que hagan más eficiente y sustentable la producción y, a largo plazo, un programa de mejoramiento genético basado en la variabilidad intraespecífica natural.

## 2.2. Efectos de la salinidad y la alcalinidad en las plantas

Los efectos más significativos y ampliamente estudiados de la salinidad sobre las plantas han sido el estrés osmótico, el desequilibrio iónico y la toxicidad directa de los iones sobre los procesos metabólicos (Zhu, 2001; Tester *et al.*, 2003; Munns *et al.*, 2008). El estrés salino afecta a la gran mayoría de los procesos de las plantas, tales como la germinación, el crecimiento, la fotosíntesis, las relaciones hídricas y el balance nutricional (Parihar *et al.*, 2015).

Los efectos adversos producidos por la alcalinidad más investigados han sido la deficiencia de nutrientes, el incremento de la absorción de sodio en suelos salinos ó sódicos (Yang *et al.*, 2008a, b; Zhang y Mu, 2009, entre otros) y, recientemente, se observó que la alcalinidad induce daño oxidativo en las raíces (Zhang *et al.*, 2017).

### **Efectos de la salinidad sobre la germinación**

La salinidad afecta al proceso de germinación de diferentes maneras. En principio, altera la imbibición de las semillas debido a que se reduce el potencial osmótico del medio circundante (Khan *et al.*, 2008), altera el metabolismo de las proteínas (Dantas *et al.*, 2007) e interrumpe el balance hormonal (Khan *et al.*, 1994).

En un estudio con cariopses de *C. gayana* Kunth y *P. coloratum* L. cosechadas de plantas cultivadas en un suelo alcalino-sódico (pH = 9,8; CE= 0,69 dS m<sup>-1</sup> y PSI = 26,2%) se observó que la germinación de estas semillas fue 25 y 20 % menor, respectivamente, al incrementar la concentración salina de 25 a 150 mM (García *et al.*, 2018). En otro estudio con cariopses de cuatro cultivares de *C. gayana* Kunth (Finecut, Katambora, Tolgar y Toro) se observó que un incremento de la concentración salina de 25 a 150 mM de sales de Na<sup>+</sup> neutras (NaCl - Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) redujo la germinación relativa de 99,8 % a 64,8 %, respectivamente. Además, la velocidad de germinación también disminuyó en ambos casos (Gago *et al.*, 2017).

En *Melilotus officinalis* (semillas recolectadas de plantas que crecían en un cultivo de canola en Irán, se mantuvieron en heladera y se rompió su dormición con ácido sulfúrico) se observó que la germinación no disminuyó de manera significativa con el aumento de la concentración de NaCl en la solución de incubación de 0 a 100 mM; sin embargo, por encima de esta concentración el porcentaje de germinación disminuyó siguiendo una curva sigmoidea y se inhibió completamente a una concentración salina de 300 mM. La concentración requerida para inhibir un 50 % la germinación fue de 207 mM de NaCl (Ghaderifar *et al.*, 2010).

Estos resultados muestran que las semillas de estas especies son capaces de germinar aún en presencia de una alta concentración salina en la solución edáfica.

### **Efectos de la salinidad sobre el crecimiento**

El crecimiento de la planta es otro de los procesos que se ve afectado por la presencia de salinidad en el suelo. La causa principal es la reducción de la absorción de agua y la consecuente disminución de la presión de turgencia celular debido al bajo potencial hídrico del agua en el suelo, producto de las sales disueltas en la misma (Parihar *et al.*, 2015). Taleisnik *et al.*, (1997) midieron el efecto de la salinidad sobre el crecimiento de 6 cultivares de *C. gayana* (Pioneer, Pioneer Local, Katambora, Bell, Boma y Callide) a concentraciones crecientes de NaCl (100 – 400 mM). A pesar de que esta especie mostró una alta tolerancia a la salinidad, se observó una reducción significativa de la acumulación de peso fresco, en la relación entre peso fresco y seco, y en la concentración de peso seco por unidad de área foliar en estas plantas. En otro estudio se midió el crecimiento de raíces de plantas de *C. gayana* cv. Boma cultivadas en invernadero. Este cv. no se vio afectado hasta una concentración salina de 200 mM de NaCl. A partir de este umbral, disminuyó el número de raíces y su tamaño y las mismas acumularon concentraciones mayores de azúcares solubles y de reserva de lípidos (Córdoba *et al.*, 2001). Rogers *et al.* (1996) evaluaron la tolerancia a la salinidad de 9 poblaciones de especies de *Melilotus* que crecieron en soluciones hidropónicas con 5 concentraciones de NaCl (0, 45, 90, 135 y 180 mM) en invernadero. La producción de materia seca no se vio afectada hasta una concentración salina 90 mM, sin embargo, el rendimiento disminuyó un 39 % a una concentración de NaCl 180 mM, con respecto al tratamiento control (0 mM de NaCl). Plantas de *L. tenuis* redujeron un 37 % la producción de biomasa total al exponerse a una concentración salina 100 mM de NaCl (Paz *et al.*, 2012).

### **Efectos de la salinidad sobre el contenido relativo de agua, la fotosíntesis y el contenido de clorofila**

La reducción de la tasa fotosintética en las plantas bajo estrés salino se debe principalmente a la reducción del potencial agua. El contenido relativo de agua (CRA) es una medida del contenido de agua respecto del agua total que el tejido

puede almacenar. Esta medición permite conocer el estado hídrico de la planta. El CRA se relaciona con el potencial hídrico porque éste y sus componentes principales a nivel celular (potencial de presión y de solutos) son función del volumen de agua del protoplasto. En general, la disminución del contenido relativo de agua de 100 % a 90 % se relaciona con la reducción de la expansión celular y el cierre del poro estomático en la hoja. La pérdida de solutos desde las células guarda puede activarse por un descenso del contenido hídrico de la hoja induciendo una mayor síntesis de ABA. Contenidos entre 90 % y 80 % se relacionan con cambios en la composición de los tejidos y algunas alteraciones en las tasas relativas de fotosíntesis y respiración. Niveles de CRA menores al 80 % usualmente implican potenciales hídricos del orden de los -1,5 MPa, o menos, lo cual lleva a cambios en el metabolismo, tales como disminución significativa de la fotosíntesis e incremento de la respiración, entre otros (González *et al.*, 2001; Soares-Cordeiro *et al.*, 2009). En especies mesófilas, en general, en una etapa temprana del estrés hídrico, con un rango de CRA que varía entre el 100 y el 80 %, la disminución de la fotosíntesis neta se produce principalmente por una reducción en la concentración intercelular de CO<sub>2</sub> debido a una disminución de la conductividad estomática. Un estrés hídrico más severo produce una disminución de la tasa potencial de fotosíntesis (que cesa a un CRA de aproximadamente 40 %), la cual no se recupera por un incremento de la concentración intercelular de CO<sub>2</sub> (Lawlor, 2002; Soares-Cordeiro *et al.*, 2009).

El contenido de clorofila se correlaciona directamente con la salud general de la planta (Zhang *et al.*, 2005). Una disminución del contenido de clorofila bajo estrés salino es un fenómeno comúnmente informado y, en varios estudios, la concentración de ésta se utiliza como un indicador sensible del estado metabólico de la célula (Chutipaijit *et al.*, 2011). Por ejemplo, en un estudio llevado a cabo con 3 genotipos diferentes de *C. gayana*, que se cultivaron en concentraciones crecientes de NaCl (5, 10, 15 y 20 dS m<sup>-1</sup>), los valores de SPAD se mantuvieron constantes hasta un nivel de salinidad equivalente a 10 dS m<sup>-1</sup>, y luego se observó una reducción significativa en los valores de SPAD a partir de niveles de salinidad de 15 dS m<sup>-1</sup> en los 3 genotipos (Daba, 2019). *C. virgata*, otra especie halófila, exhibió un incremento de clorofila a, b y carotenoides bajo estrés salino moderado (120 Mm) en comparación con el tratamiento control, sin

embargo, los contenidos disminuyeron a una concentración salina de 160 mM. (Yang *et al.*, 2008). Concentraciones de NaCl (mayores a 200 mM) en conjunto con altos valores de pH (mayores a 9) produjeron un detrimento significativo del contenido de clorofila de las hojas en plantas de *M. officinalis* (Vu *et al.*, 2015). Esto podría deberse a que altos niveles de salinidad y pH podrían inhibir la síntesis de clorofila (Shi *et al.*, 1997).

Una respuesta común a diversos factores de estrés ambiental, entre ellos la salinidad y la toxicidad iónica, es la acumulación de especies reactivas de oxígeno tales como el anión superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), y radical hidroxilo ( $HO^\cdot$ ) que pueden causar daño oxidativo al reaccionar con moléculas de proteína, ácido desoxirribonucleico (ADN) y lípidos (Azevedo Neto *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2007), lo cual induce daño a las membranas celulares (pérdida de integridad de las mismas) y, como consecuencia, incremento de la permeabilidad (Ismail, 2003; Gunes *et al.*, 2007).

### **Tolerancia a la salinidad y mecanismos de tolerancia al estrés salino**

La tolerancia a la salinidad se define como la habilidad de las plantas de crecer y completar su ciclo de vida en un sustrato que contiene altas concentraciones de sales solubles. Las plantas que pueden sobrevivir y crecer con altas concentraciones de sales en la rizosfera se denominan halófitas (Parida *et al.*, 2005).

Las plantas tolerantes desarrollan un conjunto de mecanismos bioquímicos y moleculares para hacer frente al estrés salino. Los mecanismos bioquímicos que conducen a productos y procesos que mejoran la tolerancia a la salinidad actúan de manera aditiva e incluso sinérgica. Las estrategias bioquímicas incluyen: acumulación selectiva o exclusión de iones, control de la toma de iones por parte de las raíces y su transporte hacia las hojas, compartimentalización de iones a nivel celular y de toda la planta, síntesis de solutos compatibles (entre ellos, prolina, glicina betaina (GB), azúcares y polioles), cambios en la fotosíntesis, alteración de la estructura de membranas y síntesis de enzimas que detoxifican las especies reactivas de oxígeno tales como catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX), guayacol peroxidasa (POD ó GPX), glutatión reductasa (GR) y la metaloenzima superóxido dismutasa (SOD) (Parida *et al.*, 2005). También

existen compuestos no enzimáticos que protegen las células vegetales del estrés oxidativo, por ejemplo el ácido ascórbico, que se encuentra en cloroplastos, citosol, vacuolas y espacio apoplástico, y es quizás el antioxidante no enzimático más importante en las plantas, ya que participa en la defensa contra el estrés oxidativo biótico y abiótico por su función en la degradación del  $H_2O_2$  vía el ciclo del glutatión-ascorbato (Athar *et al.*, 2008).

### **Efectos de la alcalinidad sobre las plantas**

Los estudios sobre los efectos de la alcalinidad en la etapa de germinación y el crecimiento de las plantas han mostrado que un pH elevado produce la precipitación de iones metálicos ( $Zn^{2+}$  y  $Fe^{2+}$ ) de la solución edáfica, alteraciones en la absorción/remoción de iones inorgánicos tales como  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Cl^-$ ,  $Ca^{+2}$   $NO_3^-$  y  $H_2PO_4^-$ , perturbación del balance iónico y la homeostasis celular, la alteración del transporte de electrones, la fotosíntesis, el intercambio gaseoso y el contenido de pigmentos (Yang *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010; Roupael *et al.*, 2010; Islam *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011).

Semillas de *M. officinalis*, por ejemplo, redujeron su germinación un 45 % con respecto al tratamiento control (pH = 6) cuando fueron incubadas a un pH de 9 (Ghaderi-far *et al.*, 2010).

Bajo condiciones de alcalinidad, el contenido de aniones inorgánicos decrece, por lo que se torna importante el rol de los ácidos orgánicos (principalmente malato y citrato) en el mantenimiento del equilibrio iónico celular (Javid *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2014). Por otro lado, en suelos alcalinos, grandes cantidades de ácido abscísico (ABA) se pierden en la rizosfera. El ABA es un ácido débil que penetra fácilmente a través de la membrana en su forma protonada, pero no así en su forma aniónica. En condiciones de alcalinidad, el ABA predomina en su forma aniónica, por lo que tiende a acumularse en el compartimento más alcalino, en este caso, la solución del suelo y, en consecuencia, las plantas se vuelven deficientes en esta hormona y más susceptibles a las condiciones de estrés (Degenhardt *et al.*, 2000; Sauter *et al.*, 2001). Ante una misma concentración de  $Na^+$  en la solución edáfica, se ha observado que la alcalinidad genera un aumento de la concentración del contenido de este ion en las hojas (Gago, 2017). Por lo tanto, una concentración

de  $\text{Na}^+$  que no resulta perjudicial para una planta determinada en un suelo neutro puede resultar tóxica en un suelo alcalino. Especies con diferentes niveles de tolerancia a la salinidad/alcalinidad mostraron la misma respuesta, por ejemplo, *Medicago sativa* (Li *et al.*, 2010), *Triticum aestivum* (Guo *et al.*, 2010), *Sorghum bicolor* (Zhao *et al.*, 2014), *Medicago ruthenica* (Guan *et al.*, 2009), *P. virgatum* (Liu *et al.*, 2014), *Chloris gayana* y *P. coloratum* (García *et al.*, 2015), entre otras.

Yang *et al.*, (2008) compararon los efectos del estrés salino y alcalino sobre la tasa de crecimiento relativa (g de peso seco  $\text{d}^{-1}$ ) de *C. virgata* y observaron que se vio afectada por ambos tipos de estreses. Este parámetro disminuyó a medida que se incrementaban las concentraciones salinas, sin embargo, la disminución fue más marcada bajo estrés alcalino. Específicamente, la reducción fue de 0,11 a 0,8 al aumentar la concentración de sales neutras desde 0 mM a 160 mM. Al aumentar la concentración de las sales alcalinas la tasa de crecimiento disminuyó de 0,11 a 0,02. Liu y colaboradores (2014) observaron que la inhibición tanto de la germinación como del crecimiento de plántulas de *P. virgatum* debido a un estrés provocado por un pH alto fue mayor que la inhibición producida a una misma concentración de sales neutras. Luna *et al.* (2017) evaluaron algunos rasgos fisiológicos potencialmente responsables de las restricciones del crecimiento en condiciones de suelo alcalino en *P. coloratum*. Estos autores observaron que la fotosíntesis y la actividad del Fotosistema II se encuentran entre los mecanismos más afectados negativamente por la alcalinidad, y pueden ser parcialmente responsables de las limitaciones de crecimiento observadas en esta especie. Además, el crecimiento en el suelo alcalino fue severamente afectado (cerca del 85 %) comparado con el crecimiento en suelo a pH 7. García *et al.* (2018) observaron una fuerte inhibición de la germinación de *C. gayana* cv. Finecut y *P. coloratum* cv. Klein Verde al incrementar la concentración de sales de  $\text{Na}^+$  alcalinas ( $\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{NaHCO}_3$ , pH = 10) de 25 a 150 mM. En un estudio llevado a cabo por Li *et al.* (2010) se midieron los efectos de la alcalinidad sobre la fotosíntesis en plantas de Alfalfa (*M. sativa* L.). Los resultados mostraron que el contenido de clorofila de *M. sativa* se redujo de manera significativa posiblemente porque el alto valor de pH causó que precipitara el  $\text{Mg}^{2+}$  y se inhibiera la síntesis de clorofila (Shi *et al.*, 1997).

Los factores de estrés previamente mencionados plantean la necesidad de evaluar el comportamiento de especies de valor agronómico en distintas etapas de su desarrollo bajo las condiciones de estrés mencionadas y prácticas de manejo que maximicen el rendimiento de las mismas.

### **2.3. Especies tolerantes a suelos salinos y/o sódicos con elevado potencial forrajero**

Dentro de las especies con posibilidades de uso en los suelos restrictivos de la Pampa Deprimida, se encuentran algunas de las poáceas perennes previamente mencionadas con metabolismo C<sub>4</sub>, tales como *P. coloratum* L. y *C. gayana* Kunth. Además, existen leguminosas como *L. tenuis* y *M. albus*, cuyos niveles de tolerancia a condiciones de salinidad y alcalinidad edáfica las hacen potencialmente útiles para una posible consociación con las poáceas mencionadas, lo cual incrementaría el valor nutritivo de la pastura (Berti, 2002; Vignolio *et al.*, 2010).

Una gramínea perenne nativa de África, *C. gayana* Kunth, constituye uno de los forrajes de temporadas cálidas más importantes en las áreas tropicales y subtropicales del mundo (Ponsens *et al.*, 2010). Esta especie es estolonífera y cespitosa, posee un porte erecto y capacidad de formar estolones que enraízan en los nudos y le permiten cubrir el suelo eficientemente, y produce varias floraciones durante el período de crecimiento. El cultivar Katambora produce entre 6 t y 7 t MS/ha, con 60 % a 64 % de digestibilidad y 10 % a 11 % de proteína bruta, tiene alta capacidad de rebrote ante condiciones extremas, posee buena sanidad y también es apta para pastoreo mecánico y henificación (Martín, 2010). Evaluaciones en condiciones controladas mostraron que *C. gayana* es tolerante a la sequía (Ghannoum, 2009; Ponsens *et al.*, 2010), salinidad (Taleisnik *et al.*, 1998; Ribotta *et al.*, 2013), períodos cortos de anegamiento (Imaz *et al.*, 2012; Imaz *et al.*, 2015; Makar, 2019), alcalinidad (Bui, 2013; Avaca, 2015; Pesqueira *et al.*, 2017) y heladas (Jones, 1969; Pesqueira *et al.*, 2016).

*Panicum coloratum* L. var. *coloratum* es una especie gramínea C<sub>4</sub> perenne de crecimiento estival, nativa de África oriental, adaptada a zonas subtropicales y tropicales (Armando *et al.*, 2013). Esta especie puede alcanzar una altura de 80 – 90 cm o en algunos casos hasta más de 1 m (Petruzzi *et al.*, 2003). La

producción promedio de materia seca por año es de aproximadamente 8 t MS/ha y proporciona valores de proteína cruda superiores a 14 % en la estación estival (diciembre) en Argentina. Las principales características de esta forrajera son su resistencia a la sequía y las heladas (Petruzzi *et al.*, 2003; Pesqueira *et al.*, 2016), a la salinidad (Otondo *et al.*, 2014), a la alcalinidad (García *et al.*, 2015) su adaptación a una amplia variedad de suelos y condiciones climáticas (Armando *et al.*, 2013). Esta especie es altamente polimórfica y se reconocen diferentes variedades, entre ellas, la var. *coloratum* y var. *makarikariense* como las más comunes. Sin embargo, la literatura menciona una tercera variedad, la var. *kabumlabula* (Tischler *et al.*, 2004). El cultivar Klein Verde, perteneciente a *P. coloratum* var. *coloratum*, exhibe mayor tolerancia a la salinidad que el cultivar `Bambatsi`, de la var. *makarikariense*. Plantas del cv. Klein verde cultivadas en invernadero en presencia de 200 mM de NaCl mostraron mayor acumulación de biomasa, mayor concentración de K<sup>+</sup> y relación K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> en la parte aérea que plantas del cv. Bambatsi cultivadas en las mismas condiciones (Taleisnik *et al.*, 1998). Estas características de tolerancia hacen que el cv Klein Verde sea considerado más atractivo para explorar variabilidad en tolerancia a la salinidad.

*Lotus tenuis* es una leguminosa herbácea ampliamente utilizada como planta forrajera en zona templadas, presenta hábito de crecimiento postrado, y ramificaciones desde las yemas axilares, cuya densidad varía de acuerdo con el genotipo y las condiciones ambientales (De Battista, 2001). La época de crecimiento es primavera-verano-otoño (PVO) y florece desde noviembre hasta marzo. Esta especie es diploide ( $2n = 2x = 12$ ) y presenta una raíz leñosa engrosada llamada corona, a partir de la cual también ocurren brotaciones (Gebrehiwot *et al.*, 2002). En Argentina, *L. tenuis* colonizó y se naturalizó en los bajos salino-alcalinos de la Pampa Deprimida de la Provincia de Buenos Aires, la cual constituye un caso particular de invasión biológica positiva (León *et al.*, 1979, 1985). Por ser una especie alógama y presentar una importante variabilidad morfo-fisiológica durante el proceso de naturalización, se han generado genotipos e incluso poblaciones con diferentes niveles de tolerancia a las variadas condiciones adversas, típicas de esta región (Pesqueira, 2009). *L. tenuis* es muy valorada por su aporte a la oferta forrajera de los sistemas ganaderos de la región, debido a su buena adaptación en áreas con

predominancia de gramíneas y pobre presencia de leguminosas. Por lo tanto, se la considera la especie más conveniente para mejorar el contenido de nitrógeno y las propiedades de digestibilidad del forraje en aquellas regiones en donde no prosperan ni la alfalfa ni otras leguminosas de interés (Clúa *et al.*, 1997).

El género *Melilotus*, perteneciente a la familia de las leguminosas, comprende varias especies, algunas de las cuales se conocen como trébol de olor. En Argentina, las especies de *Melilotus* fueron introducidas en varias ocasiones, pero los eventos no quedaron debidamente registrados. Por su gran rusticidad, se esparcieron espontáneamente llegando a naturalizarse en varias regiones donde es posible encontrarlas en los bordes de las rutas (Rosso, 2014). Las plantas son erectas, más o menos ramificadas y pueden alcanzar 1,5 m de altura. Esta especie se adapta a un amplio rango de ambientes y en general es tolerante a suelos alcalinos o salinos, pero no soportan la sombra. La inclusión del género *Melilotus* en la cadena forrajera se realiza habitualmente en consociaciones con gramíneas, ya sea templadas o subtropicales, a las que agrega tenor proteico sin perjudicar la producción total de forraje (Bruno *et al.*, 1983). En líneas generales, el *Melilotus* se emplea en situaciones limitantes para el cultivo de alfalfa, ya sea por condiciones de anegamiento o salinidad o por déficit de nutrientes. Sus ventajas destacadas son su alta producción y fácil resiembra y el aumento de valor nutritivo a la especie acompañante.

#### **2.4. Inoculación con microorganismos benéficos**

En el marco de la producción sostenible, herramientas como la utilización de microorganismos benéficos se aplican con el objetivo de mejorar la producción de las plantas (Bhattacharyya *et al.*, 2012). Dentro de estas denominadas “tecnologías limpias” se encuentran los bioinoculantes, basados en la utilización de microorganismos debidamente seleccionados por su alta eficiencia e inocuidad, que permiten reducir los insumos externos y mejorar la cantidad y calidad de los recursos internos, además de ser económicos.

Los bioinoculantes pueden estar formulados con bacterias que ejercen un efecto positivo en las plantas, denominadas Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV) (Vessey, 2003). La inoculación con BPCV mitiga el efecto negativo producido por las sales en diferentes plantas. Las BPCV pueden

estimular el crecimiento de las plantas que se encuentran bajo estrés salino a través de diversos mecanismos directos e indirectos (Kasim *et al.*, 2016). Los mecanismos directos incluyen producción de fitohormonas (por ejemplo, auxinas, citoquininas, etileno y giberelinas), fijación de nitrógeno, movilización de nutrientes y producción de sideróforos (Hayat *et al.*, 2010). Poseen diferentes mecanismos y modos de acción. Estos mecanismos conllevan a un incremento en el largo de raíces, mayor área de exploración y un consecuente aumento de absorción de nutrientes (Egamberdieva *et al.*, 2007). El principal mecanismo indirecto consiste en la reducción de la frecuencia de enfermedades causadas por fitopatógenos.

Diversos autores han ensayado la utilización de este tipo de práctica sobre *C. gayana* y otro tipo de pasturas megatérmicas. Maza *et al.* (2017) estudiaron el efecto de la inoculación de semillas de *C. gayana* cv. Finecut con *Pseudomonas tolaasii* IEXb y *Bacillus atrophaeus* CN4 en condiciones de campo. La inoculación con *B. atrophaeus* CN4 incrementó la producción de biomasa forrajera a los 21 días después de la siembra (DDS) mientras que la inoculación con *P. tolaasii* IEXb mostró resultados similares a los 40 DDS. Por otro lado, la inoculación con estos microorganismos no afectó la biomasa de las raíces. Los resultados obtenidos en este caso muestran la necesidad de realizar evaluaciones a largo plazo sobre el uso de bioinoculantes en pasturas, que incluyan diferentes concentraciones de inóculo y distintas cepas de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal.

Estudios en otras especies forrajeras megatérmicas también muestran resultados promisorios a partir de la inoculación con BPCV. Las bacterias rizoféricas *Bacillus pumilus* y *Bacillus subtilis*, aisladas de suelos salino/sódicos (pH= 9,65 – 10,2;  $CE_s = 4,2 \text{ dSm}^{-1}$ ) y caracterizadas utilizando parámetros morfológicos y bioquímicos, han demostrado tener características de BPCV, tales como la producción de AIA, solubilización de fosfatos y también tolerancia al estrés salino. Estos aislados también han provocado un mayor vigor en plántulas de tomate crecidas en suelos de pH = 9,35 y  $CE_s = 4,2 \text{ dSm}^{-1}$  (Damodaran *et al.*, 2013). Sánchez López *et al.* (2016) aislaron y caracterizaron bacterias con potencial para promover el crecimiento de *Pennisetum*

*clandestinum* en suelos salinos. A partir de muestras de suelo rizosférico se aislaron, entre varias bacterias, *B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis*. Estas cepas mostraron la capacidad de fijar N y producir amonio, exopolisacáridos y celulosa, y tanto en presencia como ausencia de NaCl, produjeron indoles y solubilizaron fósforo. La evaluación de plantas de *P. clandestinum* inoculadas con estas cepas y cultivadas en invernadero evidenció un incremento significativo de la biomasa y el desarrollo. Los resultados de esta investigación demostraron que las cepas aisladas tienen la capacidad de crecer en suelos salinos conservando sus características como promotoras de crecimiento vegetal con efectos positivos sobre *P. clandestinum*.

Hungría *et al.* (2016) evaluaron la capacidad de *Azospirillum brasilense* para estimular el crecimiento de dos genotipos de *Brachiaria spp* en tres sitios de Brasil (donde se estima que hay cerca de 180 millones de hectáreas de pasturas, de las cuales 70 % se encuentran degradadas). En promedio se han producido incrementos de biomasa del 5,4 % y 22,1 % en los tratamientos de fertilización con nitrógeno y fertilización con nitrógeno en combinación con *Azospirillum*, respectivamente.

La utilización de bioinoculantes en especies forrajeras como *C. gayana* se presenta como una alternativa interesante que podría generar buenos resultados como los mencionados previamente en esta y otras especies para ambientes estresantes como los suelos salinos y alcalinos de la Pampa Deprimida.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivos generales

Comparar los efectos de la salinidad y la alcalinidad sobre la germinación y el T<sub>50</sub> de semillas de especies Poáceas y Fabáceas potencialmente tolerantes a los estreses mencionados, tales como *C. gayana*, *P. coloratum*, *L. tenuis*, *L. corniculatus* y *M. albus*.

Evaluar los efectos de la salinidad, la alcalinidad y la inoculación con bacterias promotoras del crecimiento vegetal sobre el crecimiento de plantas de *C. gayana* cv. Katambora en estadios tempranos de desarrollo.

### 3.2 Objetivos específicos

Comparar la germinación acumulada (G) y el tiempo al 50 % de germinación ( $T_{50}$ ) de semillas de *C. gayana*, *P. coloratum*, *L. tenuis*, *L. corniculatus* y *M. albus* incubadas en soluciones con diferentes niveles de salinidad y alcalinidad.

Evaluar los efectos de la salinidad, la alcalinidad y la inoculación de las semillas con BPCV sobre la emergencia, peso seco del vástago y la raíz, el número de macollos, el contenido de clorofila foliar, el contenido relativo de agua y la permeabilidad de las membranas celulares foliares de plantas de *C. gayana* cv. Katambora.

## 4. HIPÓTESIS

La combinación de salinidad moderada (75 mM de  $\text{Na}^+$ ) y pH elevado ( $\cong 10$ ) en la solución de incubación reduce la germinación, e incrementa el tiempo al 50 % de germinación de las semillas de *C. gayana*, *P. coloratum*, *L. tenuis*, *L. corniculatus* y *M. albus*. Las respuestas difieren entre las especies.

Existen diferencias en la tolerancia de *C. gayana* cv. Katambora al efecto del estrés por salinidad comparado con el estrés combinado salinidad-alcalinidad sobre la emergencia, crecimiento, desarrollo y otros parámetros fisiológicos.

La inoculación de semillas de *C. gayana* cv. Katambora con bacterias benéficas resulta en un aumento de la biomasa vegetal aérea y radical (PSV y PSR), número de macollos, contenido de clorofila y CRA y en la disminución del PPE.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Experimento 1: Efectos de la salinidad y el pH sobre la germinación y el T<sub>50</sub> de *C. gayana*, *P. coloratum*, *L. tenuis*, *L. corniculatus* y *M. albus*

#### 5.1.1. Soluciones de incubación

Las soluciones de germinación surgieron de la combinación en proporciones 1:1 de sales de Na<sup>+</sup> neutras (NaCl - Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y alcalinas (NaHCO<sub>3</sub> - Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). El pH de las soluciones se midió con un peachímetro de mesada Thermo-pH-metro digital ALTRONIX TPX-I con electrodo apto para soluciones alcalinas y la conductividad eléctrica con un termo-conductímetro portátil Sper Scientific.

Las concentraciones salinas utilizadas fueron de 10 y 50 mM para ambas combinaciones de sales. El pH de las soluciones de sales de Na<sup>+</sup> neutras y alcalinas fue de 6,5 y de 10,2, respectivamente. Los tratamientos resultantes fueron N10 (tratamiento control; pH=6,5, CE= 10 mM), N50 (pH=6,5, CE= 50 mM), A10 (pH=10,2, CE= 10 mM) y A50 (pH=10,2, CE= 50 mM).

#### 5.1.2. Condiciones de incubación

Las semillas se colocaron sobre dos papeles de filtro estériles en cajas de Petri de 90 mm de diámetro y se hidrataron con 6 ml agua destilada o con soluciones con diferentes niveles de salinidad y pH. Las cajas se mantuvieron tapadas y cubiertas con polietileno para evitar la evaporación. Diariamente, las semillas con la radícula visible de longitud  $\geq 2$  mm se registraron como germinadas y se descartaron. Las semillas se incubaron durante 19 días, con una alternancia diaria de 12 h de luz y oscuridad, a temperaturas máxima media y mínima media de 25 °C y 20 °C durante los periodos de luz y oscuridad, respectivamente.

#### 5.1.3. Material vegetal

Los genotipos evaluados fueron las poáceas *C. gayana* cv. Katambora (PGG Wrighton S.A.), *P. coloratum* cvs. Klein Verde y Bambatsi (Peman) y las Fabáceas *L. tenuis* cv. Nahuel (Biscayart), *L. tenuis* y *L. corniculatus* (semilla identificada de Picasso S.A.) y *M. albus* (Biscayart). En las especies poáceas, la estructura botánica que se denominará semilla de aquí en adelante es una

unidad de dispersión, la cual comprende el cariopse encerrado en las glumas y glumelas.

Estos genotipos fueron seleccionados debido a que son especies forrajeras potencialmente tolerantes a los factores de estrés a los que fueron sometidos en este estudio (salinidad y alcalinidad), además de que se ha demostrado su capacidad de producir biomasa en cantidad y calidad en estos ambientes.

#### 5.1.4. Parámetros evaluados

El poder germinativo (PG) de las semillas se calculó como el porcentaje de germinación de las semillas luego de 19 días desde el comienzo de la imbibición en agua desionizada, en relación al total de semillas sembradas de cada genotipo evaluado.

La germinación acumulada (G) se calculó según la siguiente fórmula:

$$G (\%) = \text{Semillas germinadas} / (\text{Semillas totales} - \text{semillas infectadas}) * 100$$

Las semillas infectadas corresponden a aquellas que se desintegraban al ser apretadas y se consideraron como “semillas muertas” (Peretti, 1994).

Con el objetivo de comparar los genotipos evaluados, la G de cada tratamiento se expresó como porcentaje de las semillas germinadas en agua del genotipo correspondiente (GR, %) (Karim *et al.*, 1992), el cual se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$GR (\%) = \text{Semillas germinadas en un tratamiento} / \text{Semillas germinadas en agua} * 100.$$

El T<sub>50</sub> se calculó de acuerdo con la fórmula de Coolbear *et al.* (1984) modificada por Farooq *et al.* (2005):

$$T_{50} (d) = T_i + \{(N/2) - n_i\} (t_i - t_j) / n_i - n_j$$

Donde, N es el número final de germinación, n<sub>i</sub> y n<sub>j</sub> son el número acumulado de semillas germinadas en recuentos adyacentes a los tiempos t<sub>i</sub> y t<sub>j</sub>, respectivamente, cuando n<sub>i</sub> < N/2 < n<sub>j</sub>.

#### 5.1.5. Diseño estadístico

Con el objetivo de comparar el efecto de la salinidad y alcalinidad sobre la G y el T<sub>50</sub> de semillas de *C. gayana* cv. Katambora, *P. coloratum* cvs. Klein Verde y Bambatsi, *L. tenuis* cv. Nahuel, *L. tenuis* y *L. corniculatus* (semilla identificada de

Picasso S.A.) y *M. albus* (Biscayart), se llevó a cabo un diseño factorial completamente aleatorizado con un arreglo factorial de siete genotipos x dos concentraciones de sales de Na<sup>+</sup> (10 y 50 mM) x dos pHs (6,5 y 10,2), con 5 repeticiones de 200 semillas cada una para *C. gayana*, 100 semillas para *P. coloratum* cvs. Klein Verde y Bambatsi, y 50 para *L. tenuis* cv. Nahuel, *L. tenuis* y *L. corniculatus* (semilla identificada de Picasso S.A.) y *M. albus*.

## **5.2 Experimento 2: Efecto de la salinidad, el pH y la inoculación de las semillas con BPCV sobre la emergencia y el crecimiento temprano de plantas de *C. gayana* cv. Katambora.**

### **5.2.1. Tratamientos salino/alcalinos e inoculación con BPCV**

El experimento consistió en un diseño completamente aleatorizado con estructura factorial de 2 niveles de salinidad x 2 niveles de pH x 4 inoculantes, con 6 repeticiones por tratamiento.

Los niveles de salinidad evaluados fueron de 25 y 50 mM para las combinaciones de sales neutras y alcalinas, tal como se explicó en las soluciones salino-alcalinas de germinación. Por lo tanto, los tratamientos resultantes fueron N25, N50 (pH = 6,4 ± 0,03), A25 y A50 (pH = 10 ± 0,02).

A diferencia de las soluciones de incubación de las semillas para los experimentos de germinación, en las cuales las sales de sodio se disolvieron en agua desionizada, en las soluciones de crecimiento las sales de sodio se disolvieron en una solución nutritiva completa, adaptada de la solución nutritiva de Chu *et al.* 1978, con el agregado de Mo y Cu de acuerdo a la solución de Murashige y Skoog (1962) y 0,5 mM de Na<sup>+</sup> (para aportar Na<sup>+</sup> a las plantas incubadas en la solución control, por tratarse de un micronutriente esencial para las especies C<sub>4</sub>). Para la solución de crecimiento, los macronutrientes de la solución nutritiva completa se diluyeron al 25 % y los micronutrientes al 50 % de las concentraciones utilizadas en las soluciones originales, excepto el Fe cuya concentración se mantuvo al 100 %. De esta manera, la solución de crecimiento aportaba los macro y micronutrientes esenciales, de acuerdo a la siguiente combinación y concentración de sales (en mg L<sup>-1</sup>): 46,25 MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O; 100 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 176,875 KNO<sub>3</sub>; 250 (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Ca 4H<sub>2</sub>O; 115,75 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,8 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 1,65

MnSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O; 0,75 ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O; 0,4 KI; 27,8 FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O; 37,3 Na<sub>2</sub>EDTA; 0,05 Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O; 0,05 CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O; 25 Cl<sub>2</sub>Ca 2H<sub>2</sub>O.

Para los tratamientos de inoculación se realizaron diluciones de compuestos comerciales que contienen: *Bacillus subtilis* (NITRASOIL/ Inoculante PROMOTOR BS), *Azospirillum brasilense* INTA AZ39 (NITRASOIL/ BIO-ENHANCE) + Bioprotector (de Nitrasoil), *A. brasilense* + *Pseudomonas fluorescens* (Barenbrug), y agua destilada + bioprotector (NITRASOIL) como tratamiento control.

### 5.2.2. Crecimiento de las plantas.

Treinta semillas de *C. gayana* cv Katambora se dispusieron en cada recipiente plástico sobre un sustrato compuesto por una mezcla de perlita y vermiculita (en proporción 3:1) y se cubrieron con 1 cm del mismo sustrato (figura 1). Previo a la colocación en los recipientes, el sustrato se colocó en bolsas de malla fina y pretrató de la siguiente manera: i) Inmersión durante 2 h en agua corriente, ii) Drenado del exceso de agua corriente y enjuague con agua destilada, iii) Inmersión en las soluciones de los tratamientos salino/alcalinos correspondientes hasta el día siguiente, iii) Drenado del exceso de solución. Los recipientes se colocaron sobre bandejas con solución de crecimiento y la combinación del nivel de salinidad y pH correspondiente. Las plantas crecieron bajo 16 h de fotoperíodo y temperaturas medias (media ± EEM) máxima y mínima de 27,7 ± 0,4 °C y 23,4 ± 0,4 °C, respectivamente.



**Figura 1:** Vista general de la cámara donde se llevó a cabo el experimento. Las semillas de *C. gayana* cv. Katambora fueron sembradas en los recipientes con perlita y vermiculita con los tratamientos correspondientes.

El día previo a la cosecha se determinaron el número de macollos por planta y el contenido de clorofila.

La cosecha se realizó a los 24 DDS. Las plantas se lavaron tres veces con agua destilada y se secaron con papel absorbente. Luego, la parte aérea y las raíces se separaron y se determinó el peso fresco (PF) de las mismas. Los vástagos y las raíces se secaron individualmente en estufa a 60 °C hasta peso constante para determinar el peso seco (PS). La relación vástago/raíz (Relación V/R) surgió del cociente de ambos valores.

### **5.2.3. Contenido relativo de agua (CRA).**

A los 24 DDS, antes de cosechar las plantas, porciones de 2 cm de la última hoja totalmente expandida de cada planta se cortaron, se pesaron inmediatamente para obtener el peso fresco (PF), se sumergieron en agua destilada y se mantuvieron a temperatura ambiente y baja intensidad de luz (cerca al punto

de compensación luz) durante 6 horas, transcurridas las cuales se pesaron nuevamente para determinar el peso turgente (PT). Después se llevaron a estufa a 60 °C hasta peso constante para determinar el peso seco (PS). El CRA se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{CRA (\%)} = (\text{PF} - \text{PS}) / (\text{PT} - \text{PS}) \times 100$$

#### **5.2.4. Estabilidad de las membranas celulares.**

La estabilidad de las membranas celulares se estimó mediante el porcentaje de pérdida de electrolitos (PPE) a partir de tejidos foliares, según una adaptación del método de Wang y Huang (2004). El día de la cosecha se dividió la parte aérea de la raíz. Las hojas se enjuagaron tres veces con agua destilada, se cortó una porción de 2 cm de la última hoja expandida, la cual se sumergió en un tubo con 10 ml de agua destilada. Previo al agregado de los tejidos, se determinó la conductividad eléctrica del agua destilada ( $C_a$ ) de cada tubo. Tras mantener las muestras en un agitador orbital, a 25 °C y baja intensidad de luz durante 6 h, se determinó la conductividad eléctrica inicial ( $C_i$ ) de la solución. Luego, los tubos que contenían el material vegetal se llevaron a autoclave a 1 atmósfera de presión durante 15 minutos para inactivar las células y liberar todos los iones al medio. Después de 24 h se determinó la conductividad máxima ( $C_m$ ) de la solución a 25 °C. El PPE (%) se calculó como:

$$\text{PPE (\%)} = (C_i - C_a / C_m - C_a) \times 100$$

### **5.3. Análisis estadístico**

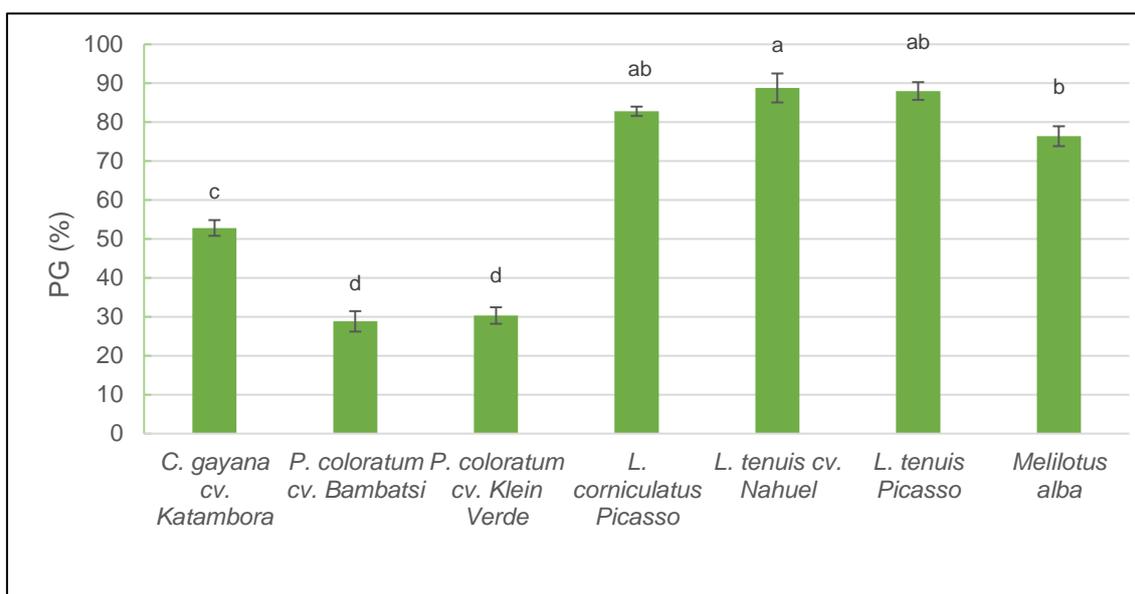
Los datos se analizaron con el programa Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2016). Las medias se sometieron al análisis de varianza (ANVA) ( $\alpha = 0,05$ ). Cuando éste mostró diferencias significativas, las medias se compararon con la prueba de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). La respuesta del  $T_{50}$  a la salinidad y alcalinidad en el experimento de germinación se analizó dentro de cada genotipo. La solución A50 sólo se incluyó en el análisis de los datos de *C. gayana* y *M. albus* porque el porcentaje de germinación del resto de los genotipos en este tratamiento fue demasiado bajo (0 al 9 %) como para obtener un valor de  $T_{50}$  significativo.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Experimento 1: Efectos de la salinidad y el pH sobre la germinación y el $T_{50}$ de *C. gayana*, *P. coloratum*, *L. tenuis*, *L. corniculatus* y *M. albus*

#### 6.1.1. PG y GR de semillas de *C. gayana*, *P. coloratum*, *L. tenuis*, *L. corniculatus* y *M. albus*

El PG de las semillas difirió entre los genotipos (Figura 2), por lo tanto, para comparar la respuesta a la salinidad/alcalinidad se utilizaron los valores de germinación relativos a la germinación en agua para cada genotipo (GR). La G en la solución N10 no difirió significativamente de la germinación en agua para los genotipos evaluados, excepto para *L. corniculatus*, cuya G en N10 fue significativamente superior a la G en agua, pero la diferencia fue leve (9 %) (tabla 3). Por lo tanto, el tratamiento N10 se consideró como el control debido a que no inhibió la germinación en ninguno de los genotipos evaluados, en relación a la germinación en agua.

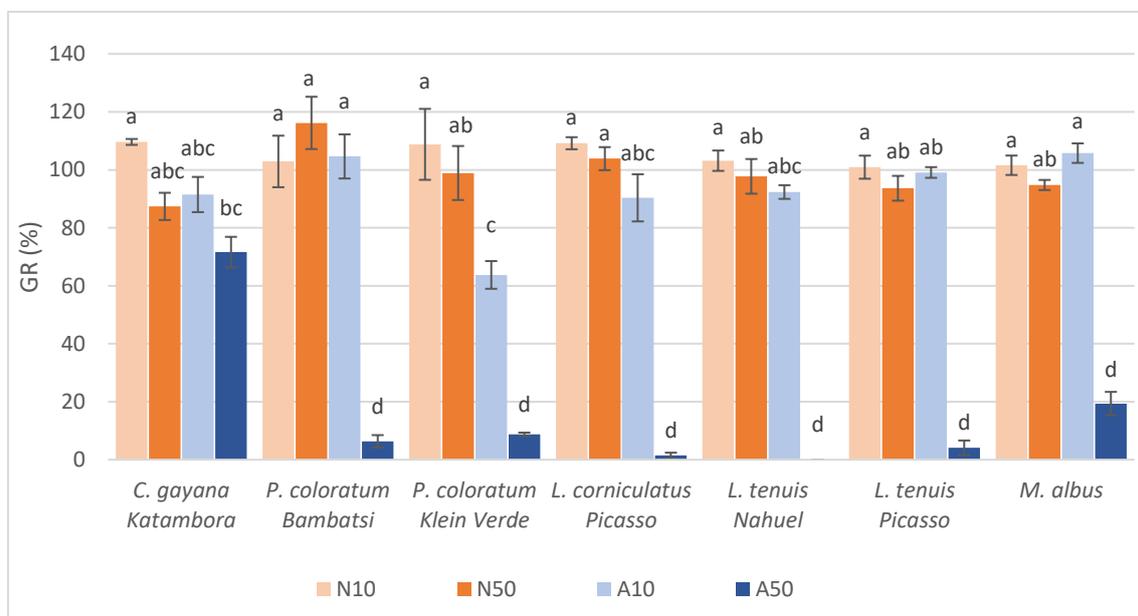


**Figura 2.** Poder germinativo (PG, porcentaje de germinación de las semillas luego de 19 días del comienzo de la imbibición en agua desionizada, en relación con el total de semillas sembradas) de los genotipos evaluados. Los valores representan la media de 5 repeticiones  $\pm$  EEM. Letras diferentes indican diferencia significativa según Tukey ( $p \leq 0,05$ )

**Tabla 3.** Comparación de la germinación acumulada (G) de las semillas de cada genotipo embebidas 19 días en agua o en la solución N10. Los valores representan la media de 5 repeticiones. \* Diferencia significativa de los valores de la fila, según Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

GENOTIPO	G (%)	
	Agua	N10
<i>C. gayana</i> cv. Katambora	52,8 ± 2,0	62,5 ± 4,6
<i>P. coloratum</i> Bambatsi	28,8 ± 2,6	29,7 ± 2,6
<i>P. coloratum</i> cv. Klein Verde	30,3 ± 2,1	33,0 ± 3,7
<i>L. corniculatus</i> Picasso	82,8 ± 1,2	90,4 ± 1,7*
<i>L. tenuis</i> cv. Nahuel	88,8 ± 3,7	91,6 ± 3,1
<i>L. tenuis</i> Picasso	88,0 ± 2,3	88,8 ± 3,5
<i>M. albus</i>	76,4 ± 2,6	77,6 ± 2,6

La salinidad (N50) no afectó la GR de los genotipos evaluados, con respecto al control. La alcalinidad (A10) sólo disminuyó la GR de las semillas de *P. coloratum* cv. Klein Verde, la cual fue 38 % menor a la observada en N10. La combinación de alcalinidad y salinidad (A50) inhibió drásticamente la GR de todos los genotipos, excepto la de *C. gayana* (Figura 3).



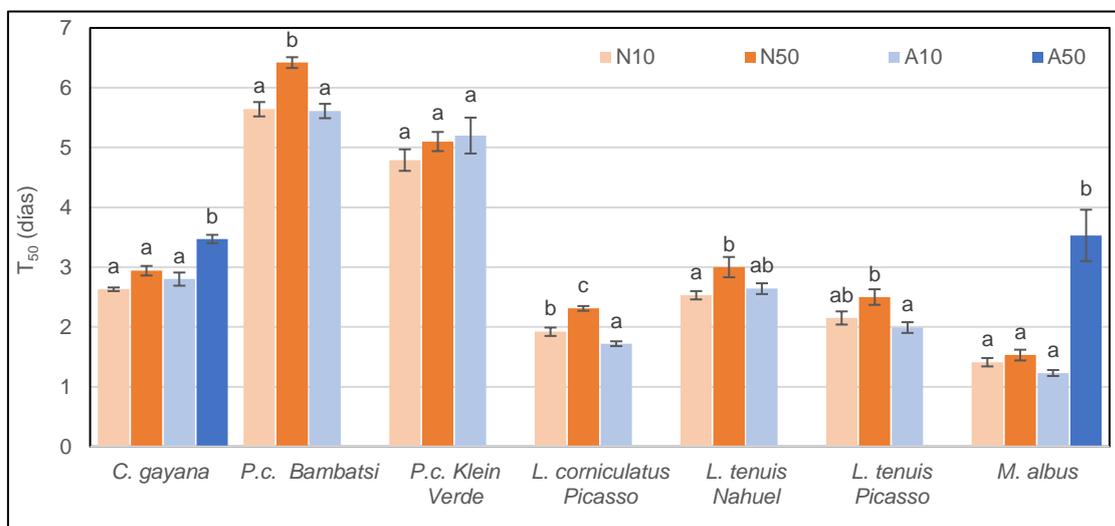
**Figura 3.** Germinación relativa a la germinación en agua (GR) luego de 19 días de imbibición en las soluciones N10, N50, A10 y A50. Los valores representan la

media de 5 repeticiones  $\pm$  EEM. Letras diferentes indican diferencia significativa según Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

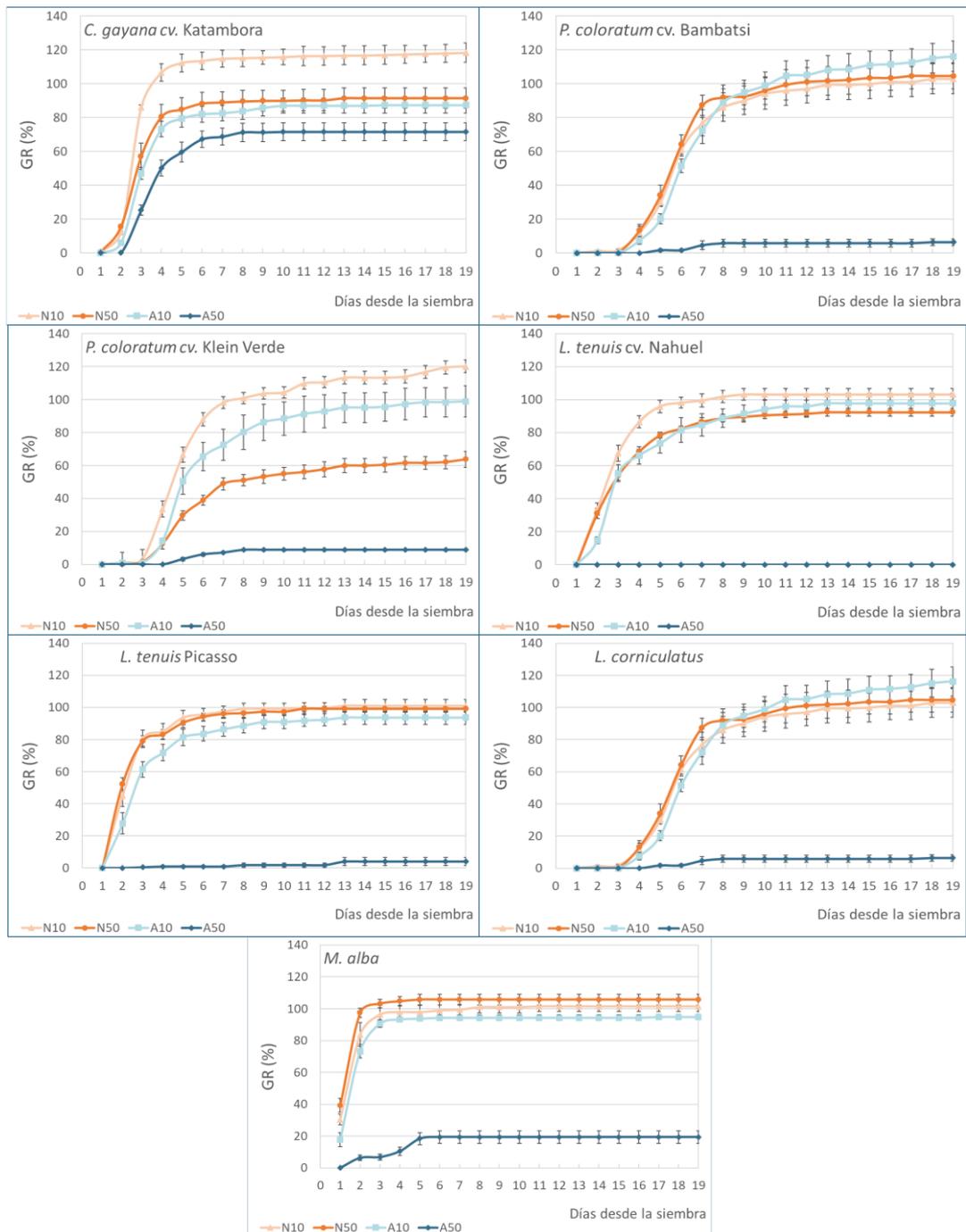
### 6.1.2. T<sub>50</sub>

El T<sub>50</sub> de las semillas incubadas en agua difirió entre genotipos, por lo tanto, el efecto de la salinidad y alcalinidad sobre el T<sub>50</sub> se evaluó dentro de cada genotipo.

La alcalinidad combinada con un nivel bajo de salinidad (A10) no indujo incrementos del T<sub>50</sub>, con respecto al control (N10), en ninguno de los genotipos evaluados. Las semillas de *P. coloratum* cv. Bambatsi, *L. tenuis* cv. Nahuel y *L. corniculatus* mostraron un incremento leve del T<sub>50</sub> en presencia de 50 mM de sales de Na<sup>+</sup>, con respecto al control. Las semillas de *C. gayana* y *M. albus* fueron las que mejor toleraron el tratamiento A50, y mostraron valores de GR de 71,6 y 19,4 %, respectivamente. El T<sub>50</sub> de ambas especies aumentó en las semillas incubadas en A50, con respecto las incubadas en la solución control, pero el incremento fue menor en *C. gayana* que en *M. albus* (Figuras 4 y 5).



**Figura 4.** Tiempo al 50 % de germinación (T<sub>50</sub>) de las semillas embebidas en las soluciones N10, N50, A10 y A50. Los valores representan la media de 5 repeticiones  $\pm$  EEM. Letras diferentes indican diferencia significativa según Tukey ( $p \leq 0,05$ ) dentro de cada genotipo.



**Figura 5.** Evolución de la germinación relativa a la germinación en agua (GR, en %) de las semillas embebidas en las soluciones N10, N50, A10 y A50. Los valores representan la media de 5 repeticiones  $\pm$  EEM.

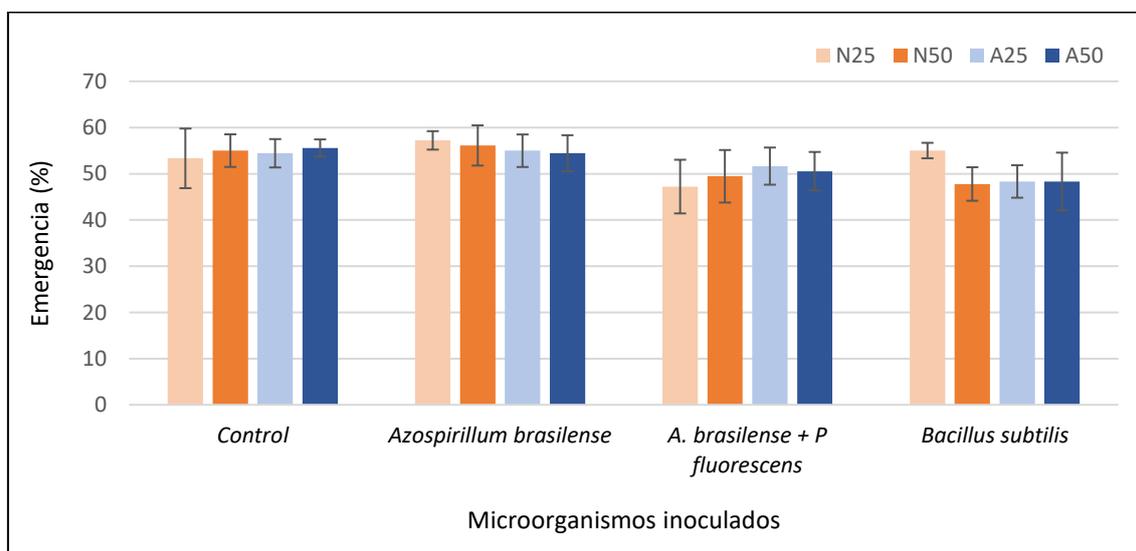
## 6.2. Experimento 2: Efectos de la salinidad, el pH y la inoculación de las semillas con BPCV sobre la emergencia y el crecimiento temprano de plantas de *C. gayana* cv. Katambora.

### 6.2.1. Emergencia

Ninguno de los tres factores evaluados (salinidad, pH e inoculación) afectó el porcentaje de emergencia de *C. gayana* (Tabla 4 y figura 6).

**Tabla 4:** Efecto de la salinidad, el pH y la inoculación con Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV) sobre el porcentaje de emergencia de plántulas de *C. gayana* cv. Katambora.

Fuente de variación	p
Inoculación	0,0957
pH	0,8655
salinidad	0,7692
Inoculación*pH	0,7562
Inoculación*salinidad	0,8447
pH*salinidad	0,8177
Inoculación*pH*salinidad	0,8389



**Figura 6:** Efecto de la salinidad, el pH y la inoculación con Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV) sobre el porcentaje de emergencia de plántulas de *C. gayana* cv. Katambora. Las columnas son promedios de seis repeticiones

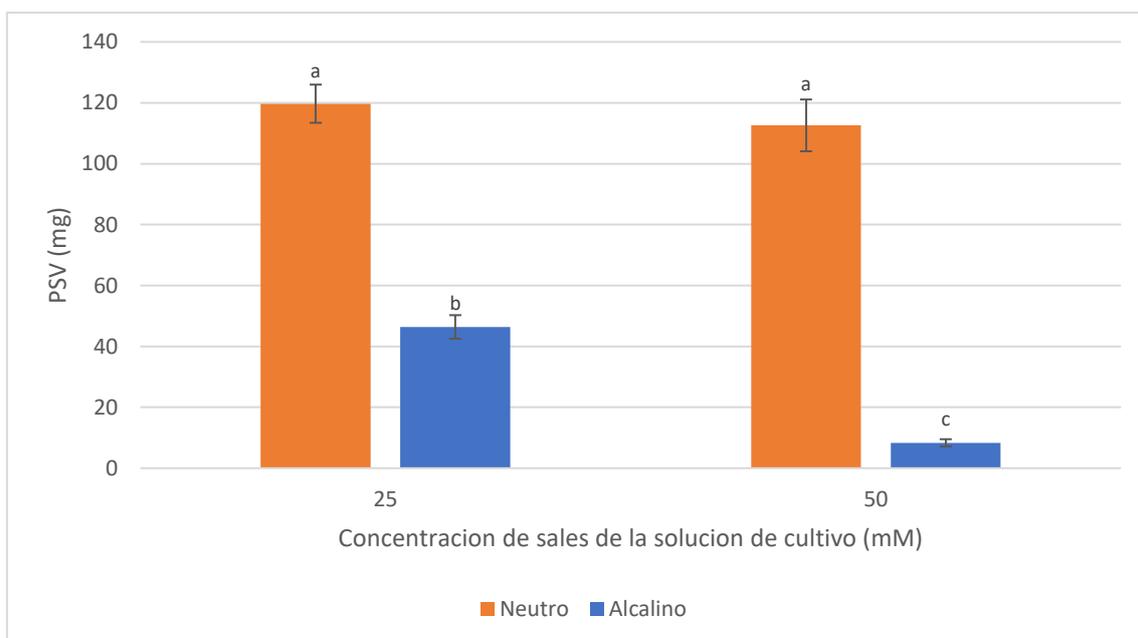
y las barras indican los errores estándar de la media. El ANVA no mostró diferencias significativas entre las medias de los tratamientos.

### 6.2.2. Número de macollos por planta

De los tres factores evaluados (salinidad, pH e inoculación) sólo el factor pH tuvo un efecto significativo sobre la cantidad total de macollos ( $p < 0,0001$ ). Las plantas que crecían en pH neutro mostraron  $\cong 4$  veces más macollos que las que crecían en pH alcalino. El número de macollos por planta fue de (media  $\pm$  EEM)  $4,57 \pm 0,15$  y  $1,05 \pm 0,06$ , en pH neutro y alcalino, respectivamente.

### 6.2.3. PSV, PSR, y relación V/R

El pH ( $p < 0,0001$ ) y la salinidad ( $p = 0,0002$ ) afectaron el PSV y la interacción entre los factores pH y salinidad fue significativa ( $p = 0,0099$ ). El PSV de las plantas que crecían en pH neutro no difirió entre niveles de salinidad. El incremento del pH redujo el PSV en un 61 % en las plantas que crecían en salinidad 25 mM y del 93 % en las que crecían en 50 mM. El incremento del nivel de salinidad de 25 a 50 mM de las plantas que crecían en pH 10 indujo una reducción del 82 % del PSV (Figuras 7 y 8).



**Figura 7:** Efecto de la salinidad y el pH sobre el Peso Seco del Vástago (PSV) de plántulas de *C. gayana* cv. Katambora. Las barras indican el error estándar

de la media. Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

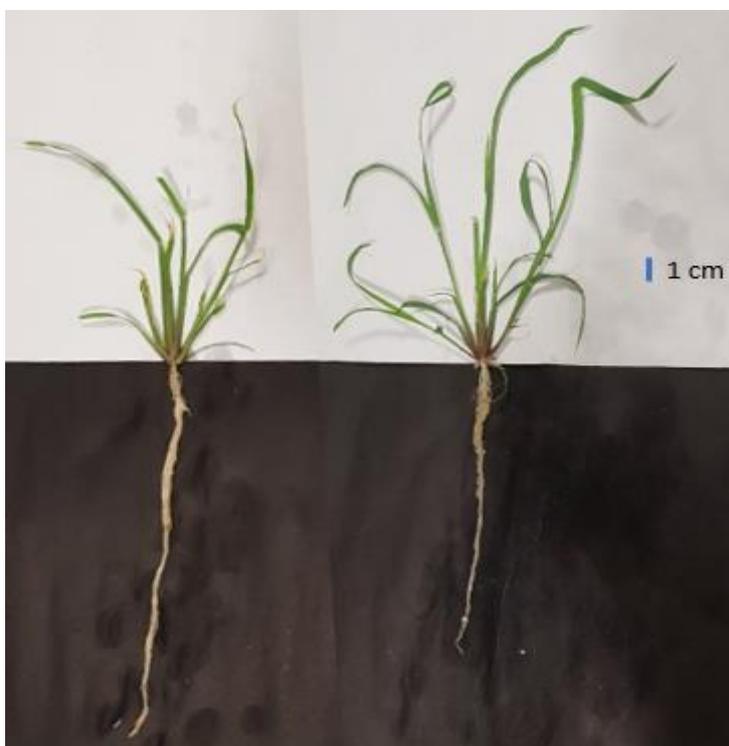


**Figura 8:** Plantas de *C. gayana* cv Katambora en el día de la cosecha. Los tratamientos ordenados de izquierda a derecha son: N25, N50, A25 y A50. En este caso corresponden a las plantas que no fueron inoculadas con bacterias PGPR.

El pH ( $p < 0,0001$ ) y la salinidad ( $p < 0,0001$ ) afectaron el peso seco de las raíces. La interacción entre ambos factores no fue significativa ( $p < 0,6317$ ). El PSR de las plantas cultivadas en pH 10 (11,27) fue un 75 % menor que el de las plantas cultivadas en pH 6,4 (44,99). El incremento de la salinidad de 25 a 50 mM indujo la disminución del PSR en un 41 %, (en  $\text{mg L}^{-1}$ ) de 35,37 a 20,89. (Figuras 9 y 10).



**Figura 9:** Comparación de plantas cosechadas de *C. gayana* cv Katambora. El tratamiento de la izquierda corresponde al N25 y el de la derecha a A25.



**Figura 10:** Comparación de plantas cosechadas de *C. gayana* cv Katambora. El tratamiento de la izquierda corresponde al N25 y el de la derecha a N50.

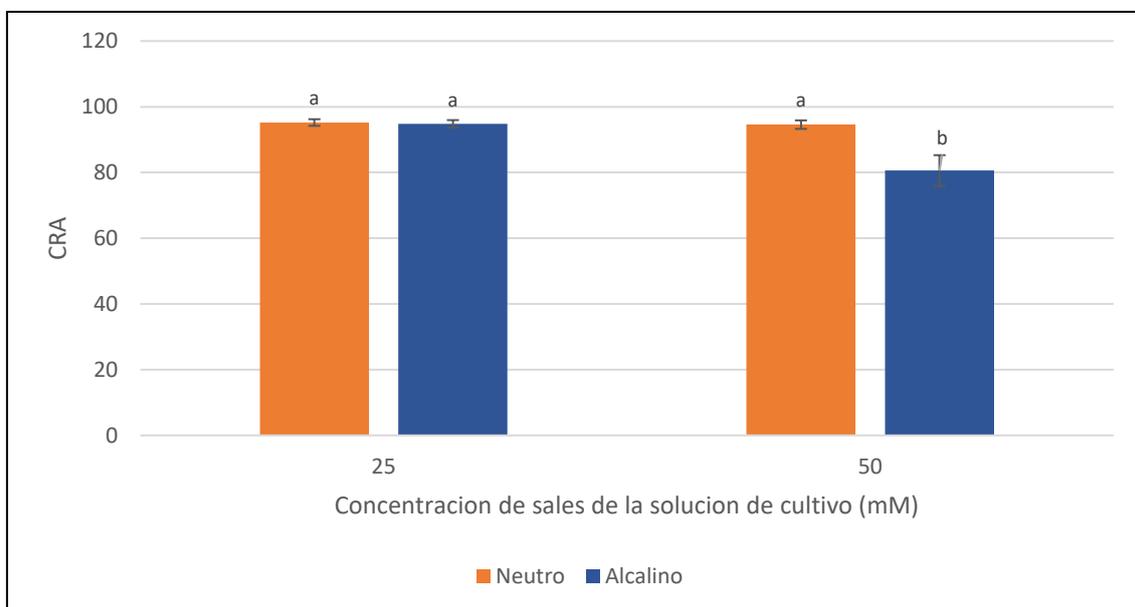
Únicamente la salinidad tuvo un efecto significativo sobre la relación V/R ( $p = 0,02$ ). La interacción entre los factores no fue significativa ( $p = 0,2055$ ). Las plantas que crecían en una concentración salina 25 mM mostraron una relación V/R 28 % mayor que las que crecían en una concentración 50 mM (6,27 y 4,9; respectivamente).

#### 6.2. 4. Contenido de clorofila

De los tres factores evaluados (salinidad, pH e inoculación), el pH tuvo un efecto significativo sobre el contenido de clorofila ( $p < 0,0001$ ). Las plantas que crecían en pH neutro mostraron un 76 % más de clorofila que las que crecían en pH alcalino (10,82 y 6,15 unidades SPAD, respectivamente).

#### 6.2. 5. Contenido relativo de agua (CRA)

El pH ( $p = 0,0147$ ) y la salinidad ( $p = 0,0044$ ) afectaron el CRA y la interacción entre factores pH y salinidad fue significativa ( $p = 0,0225$ ). El CRA sólo se redujo en presencia de 50 mM de sales de sodio alcalinas (pH = 10), con respecto al resto de los tratamientos (Figura 11).

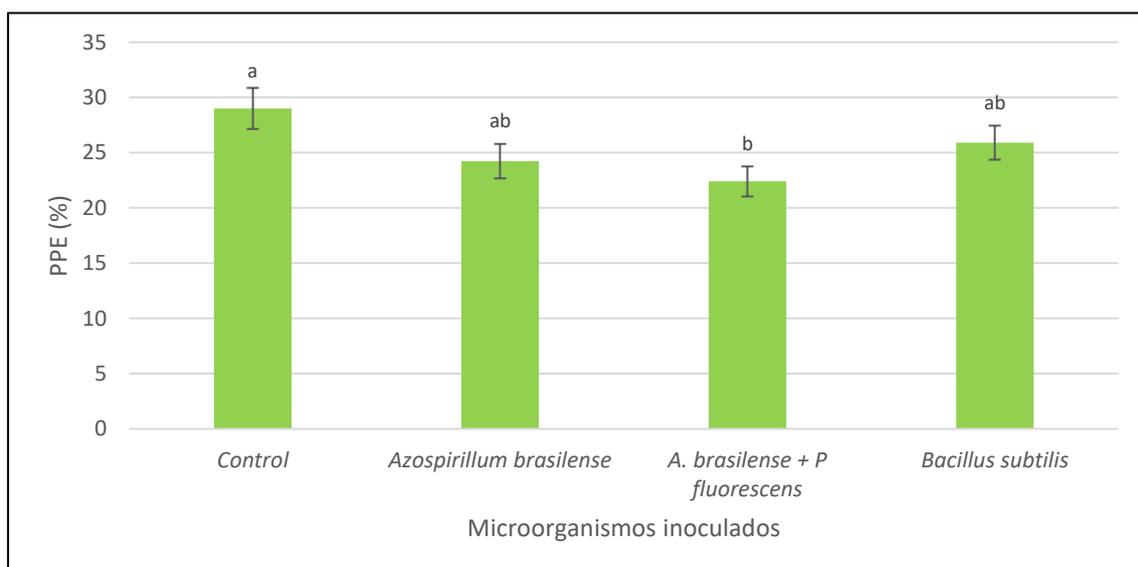


**Figura 11:** Efecto de la salinidad y el pH sobre el contenido relativo de agua (CRA) de plántulas de *C. gayana* cv. Katambora. Las barras indican el error

estándar de la media. Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

### 6.2.6. Estabilidad de las membranas celulares foliares estimado mediante el porcentaje de pérdida de electrolitos (PPE)

El pH ( $p = 0,0028$ ) y la inoculación ( $p = 0,0256$ ) modificaron la estabilidad de las membranas de las células del vástago. El incremento de pH indujo un aumento del PPE del 21 %. A pH neutro, el PPE fue de 23 % y a pH alcalino de 27,8 %. Las plantas obtenidas de semillas inoculadas con *A. brasilense* + *P. fluorescens* mostraron un 23 % menos de PPE que las plantas control. Los valores de PPE de todas las plantas obtenidas de semillas inoculadas con microorganismos promotores del crecimiento vegetal fueron similares (Figura 12).



**Figura 12:** Efecto de la inoculación con Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV) sobre el porcentaje de pérdida de electrolitos (PPE) de plántulas de *C. gayana* cv. Katambora. Las barras indican los errores estándar de la media. Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1. Experimento 1: Efectos de la salinidad y el pH sobre la germinación y el T<sub>50</sub> de *C. gayana*, *P. coloratum*, *L. tenuis*, *L. corniculatus* y *M. albus*

Los resultados de este estudio muestran que *C. gayana* cv. Katambora fue la especie que mejor se comportó ante la combinación de alcalinidad y salinidad. La presencia de 50 mM de sales alcalinas de sodio (pH = 10,2) inhibió la GR de *C. gayana* sólo un 34,7 %, con respecto al control; mientras que la germinación del resto de los genotipos evaluados se inhibió fuertemente ante el estrés impuesto.

La mayor parte de los genotipos no mostraron diferencias entre los tratamientos N10 y A10 a excepción de *P. coloratum* cv. Klein Verde, que en el tratamiento A10 disminuyó significativamente la GR.

*C. gayana* cv. Finecut y *P. coloratum* cv. Klein verde mostraron respuestas similares en estudios previos de nuestro grupo de trabajo. El PG de *C. gayana* no se vio afectado en presencia de 50 mM de sales alcalinas de Na<sup>+</sup> (pH=10), en relación al control (25mM de sales neutras de Na<sup>+</sup>, pH6) (94,4 ± 3,3 y 96,5 ± 2,4, respectivamente). La germinación de *P. coloratum*, en cambio, disminuyó de 93,9 % en el tratamiento control a 33,2 % en el tratamiento que contenía 50 mM de sales alcalinas de Na<sup>+</sup> (pH=10) (García *et al.*, 2018). Los valores de T<sub>50</sub> de las semillas de *C. gayana* cv. Katambora coinciden con los publicados por Taleisnik *et al.* (1997). Estos autores observaron que la tasa de absorción de agua por parte de las semillas no fue afectada por el nivel de salinidad (0–400 mM NaCl) y la tasa de germinación fue inicialmente rápida y disminuyó progresivamente indicando que la mayoría de las semillas germinaron en los primeros 3 días después de la siembra en distintos cultivares de *C. gayana* (Boma, Callide, Bell, Katambora y dos cultivares de Pioneer). En *P. coloratum*, el incremento de la concentración salina de 10 a 50 mM, a pH neutro, indujo el aumento del T<sub>50</sub> de las semillas del cv. Bambatsi de 5,64 d a 6,42 d. Lo mismo sucedió con las semillas de las fabáceas evaluadas, *L. corniculatus* (Picasso) y *L. tenuis* cv. Nahuel, las cuales mostraron incrementos de los valores del T<sub>50</sub> al aumentar la concentración salina de 10 a 50 mM en pH neutro. Gago (2017) obtuvo resultados similares en *P. virgatum*; a diferentes pHs (6,4 9,3 y 10), a medida

que aumentaba la concentración salina en cada caso (25 a 100 mM), el  $T_{50}$  incrementaba su valor (Figura 2 de dicho estudio).

El incremento del pH con bajo nivel de salinidad no incrementó el  $T_{50}$  de las semillas en ninguno de los genotipos evaluados. El  $T_{50}$  de las semillas de *P. coloratum* cv. Klein Verde, *L. tenuis* (Picasso) y *M. albus* incubadas en N50 y A10 no difirió del  $T_{50}$  de las semillas incubadas en la solución control (N10). Si bien *M. albus* fue la fabácea que más germinó en A50 ( $\cong 20\%$ ), el  $T_{50}$  de sus semillas aumentó 2,5 veces en este tratamiento, con respecto al control (Figura 4).

Como se mencionó previamente, *C. gayana* fue la poácea que mejor se comportó a este nivel de concentración salina y pH a pesar de que su  $T_{50}$  se diferenció significativamente del tratamiento control, el retraso en la germinación no alcanzó a un día de diferencia con respecto a éste.

## **7.2. Experimento 2: Efecto de la salinidad, el pH y la inoculación de las semillas con BPCV sobre la emergencia y el crecimiento temprano de plantas de *C. gayana* cv. Katambora**

A partir de la comparación de los resultados obtenidos durante la germinación de todos los genotipos evaluados, se observó que *C. gayana* cv. Katambora fue la especie que toleró mejor las condiciones de mayor estrés aplicadas, por lo cual se la utilizó para evaluar el estrés salino y alcalino y la inoculación con microorganismos PGPR sobre la emergencia y crecimiento temprano de las plantas cultivadas en hidroponía.

Los factores pH y salinidad afectaron significativamente los parámetros evaluados en *C. gayana*, excepto el porcentaje de emergencia.

La salinidad, en los tratamientos con pH neutro, no afectó el PSV. Sin embargo, la alcalinidad redujo significativamente el peso de los vástagos de *C. gayana* Katambora. A una misma concentración salina (25 mM) pero en alcalinidad (pH = 10) el PSV se redujo de 120 a 45 mg. El efecto de la reducción fue aún más marcado a una concentración salina mayor (50 mM) (Figura 7).

Tanto el aumento del pH de 6,4 a 10 como el incremento de la salinidad de 25 a 50 mM redujo significativamente el PSR de *C. gayana* Katambora. Como se mencionó previamente, el PSR de las plantas cultivadas en pH 10 (11,27 mg) fue un 75 % menor que el de las plantas cultivadas en pH 6,4 (44,99 mg). El incremento de la salinidad de 25 a 50 mM indujo la disminución del PSR en un 41 %, de 35,37 a 20,89 mg. Córdoba *et al.* (2001) también observaron la reducción del peso seco de las raíces de plantas de *C. gayana* cv. Boma por un incremento de la concentración salina de sales de NaCl de 0 mM a 200 mM en la solución de cultivo. En el tratamiento control (sin NaCl) el peso de las raíces fue de 180 mg y al aumentar la concentración de las sales, este se redujo a 100 mg. El incremento posiblemente fue más marcado en este trabajo debido a que las plantas sufrieron el estrés desde el estadio de germinación, en cambio, en el trabajo de Córdoba, este fue aplicado en incrementos constantes.

La combinación de salinidad y alcalinidad (A50) redujo en forma marcada los pesos secos del vástago (93 %) y la raíz (75 % al incrementar el pH de 6,4 a 10 y 41 % al aumentar la salinidad de 25 a 50 mM) de *C. gayana* con respecto al control. En trabajos previos del grupo se obtuvieron resultados similares en *C. gayana* cv Finecut. Estas plantas fueron expuestas durante 30 días a combinaciones de pH 7 y pH 10 con 3 concentraciones de sales de Na<sup>+</sup> (50, 100 y 200 mM) y se compararon con plantas expuestas a condiciones control (0 mM-pH=7). Los tratamientos fueron aplicados por aclimatación salina a diferencia de este trabajo. Se observó que el PSV disminuyó un 50,7 % con pH 7 y 200 mM de sal en relación al control. A un mismo nivel de concentración salina, pero en pH alcalino el descenso fue mucho mayor (90,1 %) (Pesqueira *et al.*, 2014). Además, como se mencionó previamente en el trabajo de Luna *et al.* (2017) en *P. coloratum*, se observó que el crecimiento de esta especie en suelo alcalino (pH=10) fue un 85 % menor en comparación al suelo neutro (pH=7). El incremento del pH de la solución de cultivo podría interferir con los mecanismos que confieren tolerancia a la salinidad. Por ejemplo, Gago (2017) observó que ante una misma concentración de Na<sup>+</sup> en la solución, se observó que la alcalinidad genera un aumento de la concentración del contenido de este ion en las hojas. Por lo tanto, una concentración de Na<sup>+</sup> en la solución de cultivo que no

resulta perjudicial para una planta determinada en condiciones de pH neutro, en ocasiones, puede resultar tóxica en un pH alcalino (Gago, 2017).

El contenido relativo de agua, una medida del estado hídrico de la planta disminuyó un 15 % en el tratamiento a una salinidad de 50 mM y pH 10,2. Como se mencionó previamente, la disminución del CRA a niveles cercanos al 80 % como en este último caso se relaciona con la reducción de la expansión celular y el cierre del poro estomático en la hoja. Además, se relaciona con cambios en la composición de los tejidos y algunas alteraciones en las tasas relativas de fotosíntesis y respiración. Este nivel de CRA indica que se encuentra muy cerca de un potencial hídrico del orden de los -1,5 MPa, o menos, lo cual podría llevar a cambios en el metabolismo, tales como disminución significativa de la fotosíntesis e incremento de la respiración, entre otros. En este caso, además de la salinidad, el efecto de la alcalinidad y el efecto tóxico del Na<sup>+</sup> podrían estar produciendo otras alteraciones metabólicas. En otro trabajo, *C. gayana* cv. Finecut, en presencia de 200 mM de NaCl, mostró una disminución del CRA del 6 % en relación al control (sin agregado de NaCl), y el pH (8.5) no afectó este parámetro (Avaca, 2015). Esto último podría deberse a que el valor de pH no fue tan alto como en el de este trabajo. Según Taleisnik *et al.* (1997), *C. gayana*, en presencia de 400 mM de NaCl, disminuyó dicho porcentaje en  $\cong 10$  %, con respecto al control.

El PPE es considerado como un buen índice fisiológico que refleja el grado del daño causado a las membranas de células vegetales por estrés salino o alcalino. El incremento de pH en este experimento indujo un aumento del PPE de los tejidos foliares con respecto pH neutro. Esto indicaría que las membranas se dañaron por el estrés lo cual provocó un aumento de la permeabilidad de las mismas (Peng *et al.*, 2008). Otros autores obtuvieron resultados similares al aumentar las condiciones de estrés. Por ejemplo, Gago (2017) observó que la incubación de plantas de *P. virgatum* en salinidad moderada y pH neutro (100mM-pH6,4) y baja salinidad y pH alcalino (25mM-pH9,3) indujeron mayores incrementos del PPE en el vástago (3,16 y 2,55 veces) en relación a los de las plantas cultivadas en solución nutritiva sin el agregado de sales de Na<sup>+</sup> y pH = 6,4. En plántulas de alfalfa el incremento del pH de 7 a 9 no afectó la pérdida de

electrolitos en tejidos foliares en presencia de 96 mM de sales de Na<sup>+</sup>. En este caso, la pérdida se vio incrementada en presencia de 120 mM de sales de Na<sup>+</sup> (Peng *et al.*, 2008).

Sin embargo, se observó que la inoculación con BPCV mejoró la estabilidad de las membranas celulares. Las plantas obtenidas de semillas inoculadas con la combinación de bacterias *A. brasilense* + *P. fluorescens* redujeron su PPE con respecto al de las plantas del tratamiento control (sin inocular). El incremento de la permeabilidad de la membrana celular está asociado a un aumento de indicadores de estrés oxidativo en varias especies de plantas (Bolu *et al.*, 2004; Valentovič *et al.*, 2006; Gunes *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2007) y la actividad de enzimas antioxidantes como ascorbato peroxidasa, catalasa o glutatión peroxidasa (Singh *et al.*, 2007; Sandhya *et al.*, 2010). Los resultados obtenidos sugieren que la inoculación con BPCV podría tener un efecto positivo reduciendo el estrés oxidativo producido por la salinidad y la alcalinidad.

En plantas forrajeras los macollos son la unidad principal de crecimiento, el aumento en la producción forrajera puede atribuirse a un aumento en densidad y/o peso de los mismos (Garay *et al.*, 1999). Lemaire *et al.*, (2009) consideran que los componentes morfológicos están determinados genéticamente, aunque éstos pueden ser afectados por variables ambientales (como la salinidad y la alcalinidad) alterando de esta forma la estructura de las pasturas. En este trabajo se observó que la salinidad no afectó el número de macollos de las plantas de *C. gayana*. Sin embargo, la alcalinidad inhibió casi por completo la aparición de macollos. Como se mencionó previamente, las plantas que crecían en pH neutro mostraron  $\cong 4$  veces más macollos que las que crecían en pH alcalino,  $4,57 \pm 0,15$  y  $1,05 \pm 0,06$ , respectivamente. Pittaro (2014) demostró que clones de *P. coloratum* var. *coloratum*, presentaron variabilidad en el número de macollos de acuerdo con las condiciones de salinidad, algunos de ellos incrementaron las ramificaciones con 200 mM NaCl respecto del control (0 mM NaCl), pero esto no se tradujo en un aumento de biomasa. En otras Poáceas como trigo, sin embargo, la salinidad afectó negativamente la tasa de aparición y desarrollo de macollos y estimuló su muerte, lo cual redujo significativamente el número de macollos primarios y secundarios. También se observó una disminución, aunque

en menor medida, del porcentaje de espiguillas por macollos en los cultivares 'Anza' y 'Yecora Rojo' de trigo (Maas *et al.*, 1994).

El incremento del pH de la solución de cultivo de 6,5 a 10,2 indujo una disminución del 76 % del contenido de clorofila en *C. gayana* cv. Katambora. Sin embargo, el incremento de la salinidad de 25 mM a 50 mM en la solución de cultivo no afectó el contenido de clorofila. En otras especies también se observó que la combinación de salinidad y alcalinidad producía mayor estrés que un mismo nivel de salinidad y pH neutro. Por ejemplo, la cantidad total de clorofila (a+b) de *C. virgata* se redujo a niveles mayores bajo estrés salino-alcalino ( $\text{NaHCO}_3$ :  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  = 1:1; pH= 9,93-9,97) que salino ( $\text{NaCl}$ :  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  = 1:1; pH= 6,28-6,65). Se observó que la alcalinidad redujo el contenido (sobre masa fresca) de clorofila total cuando se compararon soluciones con igual concentración salina y diferente pH ( $\text{NaHCO}_3$ :  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  = 1:1; pH= 9,93-9,97) que salino ( $\text{NaCl}$ :  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  = 1:1; pH= 6,28-6,65). Por ejemplo, el contenido de clorofila total en la mayor concentración salina evaluada (160 mM) fue un  $\cong$  60 % menor en pH alcalino que en pH neutro (Yang, 2008).

Diversos autores observaron que los contenidos de los pigmentos fotosintéticos bajo estrés alcalino fueron menores que bajo estrés salino, posiblemente porque el estrés alcalino causó que precipitara el magnesio y como consecuencia se haya inhibido la síntesis de clorofila (Shi *et al.*, 1997). Alternativamente, el estrés alcalino podría haber incrementado la actividad de la enzima degradadora de clorofila (clorofilasa) (Reddy *et al.*, 1986).

Como se mencionó previamente, sólo la salinidad tuvo un efecto significativo sobre la relación V/R. Las plantas que crecían en una concentración salina 25 mM mostraron una relación V/R 28 % mayor que las que crecían en una concentración de 50 mM (6,27 y 4,9, respectivamente). El déficit hídrico (causado por el efecto de la salinidad) afectó al desarrollo del sistema radicular. La relación de la biomasa vástago-raíz parece estar gobernada por un equilibrio funcional entre el agua incorporada por la raíz y la fotosíntesis realizada por el vástago. La expansión foliar se ve afectada de forma temprana cuando se reduce la incorporación de agua a la planta. Esta inhibición reduce el consumo de carbono y energía y una proporción más amplia de los asimilados de la planta se

distribuyen al sistema radical donde pueden estimular su crecimiento. Estos factores conllevan a un mayor crecimiento de las raíces hacia zonas del suelo que permanecen húmedas (Taiz y Zeiger, 2006).

## 8. CONCLUSIONES

A partir de la comparación de las respuestas de semillas de diferentes genotipos de *C. gayana*, *P. coloratum*, *L. tenuis*, *L. corniculatus* y *M. albus* a la incubación en soluciones con diferentes concentraciones de sales de Na<sup>+</sup> neutras o alcalinas se concluyó que:

- La incubación de las semillas de *P. coloratum*, *L. tenuis*, *L. corniculatus* y *M. albus* en la solución A50 (pH = 10,2 y 50 mM sales de Na<sup>+</sup>) inhibe fuertemente la GR.
- La GR de *C. gayana* Katambora en A50, si bien es 35 % menor a la del control (N10, pH = 6,5 y 50 mM sales de Na<sup>+</sup>), es similar a la observada en N50 (sal 50 mM y pH 6,5) y A10 (sal 10 mM y pH 10,2), con un incremento del T<sub>50</sub> de sólo 0,84 día.
- La incubación en N50 no afecta la GR de ninguno de los genotipos evaluados, en relación al control.
- La incubación en A10 sólo induce una disminución significativa ( $\cong$  40 %) de la GR de *P. coloratum* cv. Klein verde, en relación al control.
- Entre los dos cultivares de *P. coloratum* se observó variabilidad intraespecífica en las respuestas, tanto en la GR como en el T<sub>50</sub>.

A partir de la evaluación del efecto de la salinidad, alcalinidad y la respuesta de la inoculación de las semillas de *Chloris gayana* cv. Katambora se observó que:

- La inoculación con *A. brasilense* + *P. fluorescens* redujo el PPE en los tejidos foliares con respecto al de las plantas del tratamiento control (sin inocular). El resto de los inoculantes evaluados no generaron diferencias en ninguna de las variables respuesta. La emergencia de *C. gayana* Katambora no se ve afectada a estos niveles de salinidad y pH.

- La alcalinidad disminuye el desarrollo de macollos y el contenido de clorofila.
- El PPE se ve afectado ante un incremento de pH
- En etapas tempranas del crecimiento y con la aplicación de los tratamientos desde la germinación la biomasa final de plantas de *C. gayana* Katambora disminuye con alcalinidad (61,2 %) y con alcalinidad combinada con salinidad (93,0 %).

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Armando L. V., Carrera A. D. Tomas M. A. 2013. Collection and morphological characterization of *Panicum coloratum* L. in Argentina. Genetic Resources and Crop Evolution, 60: 1737-1747.
- Athar H.R., Khan A., Ashraf M. 2008. Exogenously applied ascorbic acid alleviates salt-induced oxidative stress in wheat. Environmental and Experimental Botany, 63: 224-231.
- Avaca, F. M. 2015. Efectos de la alcalinidad y la salinidad sobre la germinación y el tiempo medio de germinación de *Chloris gayana* Kunth. Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Católica Argentina. Disponible en: <http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/tesis/efectossalinidad-alcalinidad-germinacion.pdf>.
- Azevedo Neto A.D., Prisco J.T., Abreu C.E.B., Enéas-Filho J. Gomes-Filho E. 2006. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. Environmental and Experimental Botany, 56: 87-94.
- Berti R. N. 2002. Empleo de *Melilotus albus* Ders. var. Anua Ceo en sistemas de producción de carne y leche en la región chaqueña. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. url: <https://inta.gob.ar/documentos/empleo-de-melilotus-albus-desr.-var.-annua-ceo-en-sistemas-de-produccion-de-carne-y-leche-en-la-region-chaquena>

- Bhattacharyya P.N., Jha D.K. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28: 1327-1350.
- Bolu W.H., Polle A. 2004. Growth and stress reactions in roots and shoots of a salt-sensitive poplar species (*Populus x canescens*). *Tropical Ecology* 45: 161-171.
- Bui E. 2013. Possible role of soil alkalinity in plant breeding for salt-tolerance. *Biology Letters* 9(5): 20130566.
- Bruno O., Fossatti J., y Quaino O. 1983. Incorporación de trébol de olor blanco en grama rhodes. *Producción Animal*, 10: 333-341.
- Chu C.C. 1978. The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. *Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture*, 4(5): 43-50.
- Chutipaijit S., Cha-um S., Sompornpailin K. 2011. High contents of proline and anthocyanin increase protective response to salinity in *Oryza sativa* L. spp. *indica*. *Australian Journal of Crop Science*, 5(10):1191-1198.
- Clúa A.A., Giménez D.O., Fernández L., 1997. Increase in forage yield in narrowleaf birdsfoot (*Lotus tenuis* Waldst y Kit ex Willd) in a permanent pasture with foliar applied gibberellic acid (GA3), and phosphorus. *Plant Growth Regulation*, 21: 223-228.
- Coolbear P., Francis A., Grierson. D. 1984. The effect of low temperature pre-sowing treatment under the germination performance and membrane integrity of artificially aged tomato seeds. *Journal of Experimental Botany*, 35: 1609-1617.
- Córdoba A., Seffino L.G., Moreno H., Arias C., Grunberg K., Zenoff A., Taleisnik E. 2001. Characterization of the effect of high salinity on roots of *Chloris gayana* Kunth: carbohydrate and lipid accumulation and growth. *Grass and Forage Science*, 56: 162-168.
- Daba A.W., Qureshi A.S., Nisaren B.N. 2019. Evaluation of Some Rhodes Grass (*Chloris gayana*) Genotypes for Their Salt Tolerance, Biomass Yield and Nutrient Composition. *Applied Sciences*, 9(1):143.
- Damodaran T., Sah V., Rai R.B., Sharma D.K., Mishra V.K., Jha S.K., Kannan R. 2013. Isolation of salt tolerant endophytic and rhizospheric bacteria by natural selection and screening for promising plant growth-promoting

- rhizobacteria (PGPR) and growth vigour in tomato under sodic environment. *African Journal of Microbiology Research*, 7(44): 5082-5089.
- Dantas B.F., De Sa R.L., Aragao C.A. 2007. Germination, initial growth and cotyledon protein content of bean cultivars under salinity stress. *Revista Brasileira de Sementes*, 29:106-110.
- De Battista J. 2001. Trébol de cuernitos. Trébol de cuernitos de hoja angosta. En: *Forrajeras y Pasturas del ecosistema Templado húmedo de la Argentina*. Maddaloni J. y Ferrari L. (Ed.), UNLZ-INTA, Buenos Aires, 79-92.
- Degenhardt B., Gimmler H., Hose E., Hartung W. 2000. Effect of alkaline and saline substrates on ABA contents, distribution and transport in plant roots. *Plant Soil*, 225: 83-94.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. url: <http://www.infostat.com.ar>
- Egamberdieva D. 2007. The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. *Applied Soil Ecology*, 36(2-3):184-189.
- Etchevehere P.H. 1976. Normas de Reconocimiento de suelos. 2da. Edición actualizada INTA, CIRN, Dept. de Suelos de Castelar, Colección Suelos Nro. 52.
- FAO. 2016. El estado mundial de la agricultura y la alimentación. Resumen técnico. Roma. url: <http://www.fao.org/3/i6030s/i6030s.pdf>
- FAO. 2015. Estado mundial del recurso suelo. Resumen técnico. Roma. url: <http://www.fao.org/3/a-i5126s.pdf>
- Farooq M., Basra S.M.A., Hafeez K., Ahmad N. 2005. Thermal hardening: a new seed vigor enhancement tool in rice. *Journal of Integrative Plant Biology*, 47(2): 187-193.
- Gago A.M. 2017. Comparación de la germinación de *Panicum virgatum* y *Chloris gayana* y efectos del priming de las semillas sobre la germinación y crecimiento de plántulas de *P. virgatum* en condiciones de salinidad y alcalinidad. Tesina Final de grado. Universidad Nacional de Lomas de Zamora, Facultad de Ciencias Agrarias.

- Gago A.M., Corlito M., Pesqueira J., García M.D. 2017. Comparación de la germinación y la velocidad de germinación de semillas de cultivares de *Chloris gayana* Kunth en presencia de diferentes concentraciones de sales de Na<sup>+</sup> neutras (pH=7) y alcalinas (pH=9). Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica, 52:190-191.
- Gao Z., Han J., Mu C., Lin J., Li X., Lin L., Sun S. 2014. Effects of Saline and Alkaline Stresses on Growth and Physiological Changes in Oat (*Avena sativa* L.) Seedlings. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj- napoca 42(2):357-362.
- Garay Hernández A., Matthew C., Hodgson J. 1999. Tiller size-density compensation in ryegrass miniature swards subject to differing defoliation heights and a proposed productivity index. Grass and Forage Science, 54(4): 347-356.
- García M.D., Pesqueira J., Otondo J. 2018. Pureza física y germinación de cariopses de *Chloris gayana* Kunth y *Panicum coloratum* L. cosechados de plantas cultivadas en un suelo alcalino-sódico. Revista de Investigaciones Agropecuarias INTA, 44(1): 84-91.
- García M.D., La Greca C.L., Bermúdez P.S., Manuela G.A., Pesqueira J. 2015. Salinity and alkalinity effects on germination and time to 50 % germination (T<sub>50</sub>) of *Chloris gayana*, *Panicum coloratum* and *Panicum virgatum*. 5th International Symposium of Forage Breeding. (Disponible: <http://www.agro.uba.ar/ISFB2015> verificado: 20 de octubre de 2015).
- Gebrehiwot L., Beuselinck P.R., Roberts C.A. 2002. Seasonal Variations in condensed tannin concentration of three *Lotus* species. Agronomy Journal, 94(5): 1059-1065.
- Ghaderi-Far F., Gherekhloo J., Alimagham M. 2010. Influence of environmental factors on seed germination and seedling emergence of yellow sweet clover (*Melilotus officinalis*). Planta Daninha, 28(3): 463-469.
- Ghannoum O. 2009. C4 photosynthesis and water stress. Annals of botany, 103(4): 635-44.
- González L., González-Vilar M. 2001. Determination of Relative Water Content. En: "Handbook of Plant Ecophysiology Techniques", ed. Reigosa Roger M.J., Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.

- Guan B., Zhou D., Zhang H., Tian Y., Japhet W., Wang P. 2009. Germination responses of *Medicago ruthenica* seeds to salinity, alkalinity, and temperature. *Journal of Arid Environments*, 73(1): 135–138.
- Gunes A., Inal A., Alpaslan M., Eraslan F., Bagci E.G., Cicek N. 2007. Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) grown under salinity. *Journal of Plant Physiology* 164: 728-736.
- Guo R., Shi L., Ding X., Hu Y., Tian S., Yan D., Shao S., Gao Y., Liu R., Yang Y. 2010. Effects of saline and alkaline stress on germination, seedling growth, and ion balance in wheat. *Agronomy Journal*, 102(4): 1252-1260.
- Hayat R., Ali S., Amara U., Khalid R., Ahmed I. 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology*, 60: 579-598.
- Hu G., Liu Y., Zhang X., Yao F., Huang Y., Ervin E.H. 2015. Physiological Evaluation of AlkaliSalt Tolerance of Thirty Switchgrass (*Panicum virgatum*) Lines. *PLoS ONE* 10(7): e0125305.
- Hungría M., Nogueira M.A., Araujo, R.S. 2016. Inoculation of *Brachiaria spp.* with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*: an environment-friendly component in the reclamation of degraded pastures in the tropics. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 221: 125-131.
- Imaz J.A., Gimenez D.O., Grimoldi A.A., Striker G.G. 2012. The effects of submergence on anatomical, morphological and biomass allocation responses of tropical grasses *Chloris gayana* and *Panicum coloratum* at seedling stage. *Crop & Pasture Science*, 63: 1145-1155.
- Imaz J.A., Gimenez D.O., Grimoldi A.A., Striker G.G. 2015. Ability to recover overrides the negative effects of flooding on growth of tropical grasses *Chloris gayana* and *Panicum coloratum*. *Crop & Pasture Science*, 66: 100-106.
- Imbellone P., Giménez J.E., Panigatti J.L. 2010. Suelos de la región pampeana. Procesos de Formación. Argentina. Buenos Aires: Editorial INTA. 288p.
- Islam M., Akhter M., Sabagh A., Liu L.Y., Nguyen N.T., Ueda A., Saneoka H. 2011. Comparative studies on growth and physiological responses to saline and alkaline stresses of Foxtail millet ('*Setaria italica*'L.) and Proso millet ('*Panicum* L.). *Australian Journal of Crop Science*, 5: 1269-1277.

- Ismail A.M. 2003. Response of maize and sorghum to excess of boron and salinity. *Biologia Plantarum*, 47: 313-316.
- Javid M., Nicolas M., Ford R. 2011. Current Knowledge in Physiological and Genetic Mechanisms Underpinning Tolerances to Alkaline and Saline Subsoil Constraints of Broad Acre Cropping in Dryland Regions, Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations. En "Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations" Prof. Shanker A., Venkateswarlu B (Ed.), InTech. Rijeka, Croatia: url: <https://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/18403.pdf>
- Jones R.M. 1969. Mortality of some tropical grasses and legumes following frosting in the first winter after sowing. *Tropical Grasslands*, 3: 57-63.
- Karim, M.A., Utsunomiya, N., Shigenaga, S. 1992. Effect of sodium chloride on germination and growth of hexaploid triticale at early seedling stage. *Japanese Journal of Crop Science*. 61: 279-284.
- Kasim, W.A., Reda M., Rania M., Mohamed N., Heba M. 2016. Effect of biofilm forming plant growth promoting rhizobacteria on salinity tolerance in barley. *Annals of Agricultural Sciences*, 61(2): 217-227.
- Khan M.A., Weber D.J. 2008. *Ecophysiology of high salinity tolerant plants (tasks for vegetation science)*. 1st edn. Springer, Amsterdam.
- Khan M.A., Rizvi Y. 1994. Effect of salinity, temperature and growth regulators on the germination and early seedling growth of *Atriplex griffithii* var. *Stocksii*. *International Journal of Plant Sciences*, 72(4):475-479.
- Lavado R. 1988. Origin, Characteristics and Management of Solonetz Soils in Argentina. *Proceedings of the International Symposium on Solonetz Soils*, 128-134.
- Lavado R.S. 2007. Visión sintética de la distribución y magnitud de los suelos afectados por salinidad en la Argentina. Recuperado de [http://www.conicet.gov.ar/new\\_scp/detalle.php?keywords=&id=29764&capitulos=yes&detalles=yes&capit\\_id=451821](http://www.conicet.gov.ar/new_scp/detalle.php?keywords=&id=29764&capitulos=yes&detalles=yes&capit_id=451821).
- Lawlor D.W., 2002. Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: stomata vs. metabolism and the role of ATP. *Annals of Botany*, 89: 871-885.

- Lemaire G., Da Silva S. C., Agnusdei M., Wade M., Hodgson J. 2009. Interactions between leaf lifespan and defoliation frequency in temperate and tropical pastures: a review. *Grass and Forage Science*, 64(4): 341-353.
- León, R. J. C., Agnusdei, M. G., Burkart, S. E., Grecco, Fernández R. C., Movia, C. P., Oosterheld, M., Perelman, S. E., Rusch, G. (1985), 'Las comunidades herbáceas al sur de la Depresión del Salado', *Actas XII Reunión Argentina de Ecología*, A-45.
- León R.J.C., S.E. Burkart y C.P. Movia. 1979. Relevamiento fitosociológico del pastizal del norte de la Depresión del Salado, (Partidos de Magdalena y Brandsen, provincia de Buenos Aires). INTA, Serie Fitogeográfica No. 17.
- Li R., Shi F., Fukuda K., Yang Y. 2010. Effects of salt and alkali stresses on germination, growth, photosynthesis and ion accumulation in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Soil Science and Plant Nutrition*, 56: 725-733.
- Liu Y., Wang Q., Zhang Y., Cui J., Chen G., Xie B., Wu C., Liu H. 2014. Synergistic and antagonistic effects of salinity and pH on germination in switchgrass (*Panicum virgatum* L.). *PLoS One*, 9(1): 1-11.
- Luna D.F., Aguirre A., Pittaro G., Bustos D., Ciacci B., Taleisnik E. 2017. Nutrient deficiency and hypoxia as constraints to *Panicum coloratum* growth in alkaline soils. *Grass and Forage Science*, 72: 640-653.
- Maas E. V., Lesch S. M., Francois L. E., Grieve C. M. 1994. Tiller development in salt-stressed wheat. *Crop Science*, 34(6): 1594-1603.
- Mahjoory A.R. 2011. The salt-soil system placement (Taxonomy) in relation to global changes and challenges. *World Soil Resources Reports*, (105):15-16.
- Makar D. 2019. Respuestas morfofisiológicas de *Chloris gayana* Kunth, *Panicum coloratum* L. y *Panicum virgatum* L. a la alcalinidad, sodicidad, presencia de broza y anegamiento durante la etapa vegetativa. Tesina de grado. Universidad Nacional de Lomas de Zamora. Facultad de Ciencias Agrarias.
- Makar D., Gago A.M., Corlito M., De Loof A.E., Villordo A.E., Pesqueira J., García M.D. 2017. Establecimiento de plantas de *Panicum coloratum*, *Panicum virgatum* y *Chloris gayana* en un suelo alcalino-sódico. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 52: 199-200.

- Martín G. O. 2010. Pasturas cultivadas para el NOA: Grama Rhodes. *Producir* XXI, 18(219): 48-52.
- Maza M., Banegas N., Parellada E.A., Ferrero M.A., Viruel E. 2017. Bioinoculation of *Chloris gayana* cv. Finecut with *Pseudomonas tolaasii* IEXb and *Bacillus atrophaeus* CN4: a preliminary study in Saline Depressed Plane of Tucumán, Argentina. *Revista Agronomica del Noroeste Argentino*, 37(1): 39-44.
- Montico S. 2006. Principios para el manejo de situaciones con suelos salinos y alcalinos. *Revista Agromensajes*, 34: 2-4
- Munns R., Tester M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 651-681.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- Otondo J., Pesqueira J., Markan E., García M.D. 2014. Implantación de *Panicum coloratum* y *Chloris gayana* en suelos bajos salino-alcalinos. Tercera Reunión de la Red Argentina de Salinidad. Chascomús, Buenos Aires.
- Parida A. K., Das A. B. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60(3): 324-349.
- Parihar P., Singh S., Singh R., Singh V. P., Prasad S. M. 2015. Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(6): 4056-4075.
- Paz R., Rocco R., Reinoso H., Menéndez A., Pieckenstain F., Ruiz O. 2012. Comparative Study of Alkaline, Saline, and Mixed Saline–Alkaline Stresses with Regard to Their Effects on Growth, Nutrient Accumulation, and Root Morphology of *Lotus tenuis*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 31(3): 448-459.
- Peng Y.L., Gao Z.W., Gao Y., Liu G.F., Sheng L.X., Wang D.L. 2008. Eco-physiological characteristics of alfalfa seedlings in response to various mixed salt-alkaline stresses. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(1): 29-39
- Peretti A. 1994. Manual para análisis de semillas. Ed. hemisferio sur. Buenos Aires, Argentina.

- Pesqueira J., Otondo J., García M.D. 2017. Producción de biomasa, cobertura y calidad forrajera de *Chloris gayana* y *Panicum coloratum* en un suelo alcalino sódico de la Depresión del Salado. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 43(3): 231-238.
- Pesqueira J., Huarte R.H., García M.D. 2016. Producción de biomasa y respuesta a la fertilización de especies forrajeras subtropicales cultivadas en La Pampa deprimida bonaerense. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 42(1): 79-86.
- Pesqueira J., Markan E.D., Bermudez P.S., García M.D. 2014. La alcalinidad y la salinidad disminuyen el crecimiento e incrementan la peroxidación lipídica en *Chloris gayana*. III Congreso de la Red Argentina de Salinidad.
- Pesqueira J., García Ortolá, A., Ruiz, O.A. 2009. Cambios bioquímicos, morfológicos y ecofisiológicos en plantas del género *Lotus* bajo estrés salino. Universidad Politécnica de Valencia.
- Petruzzi H. J., Stritzler N. P., Adema E. O., Ferri C. M., Pagella J. H. 2003. Mijo Perenne- *Panicum coloratum*. Publicación técnica N° 51. INTA Anguil "Ing. Agr. Guillermo Covas", La Pampa, Argentina. url: <https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-publi51.pdf>
- Pittaro M.G. 2014. Caracterización fenotípica y genotípica De germoplasma de *panicum coloratum* l var. *Coloratum* para la tolerancia a la Salinidad. Tesis de posgrado. Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Agropecuarias
- Ponsens J., Hanson J., Schellberg J., Moeseler B.M. 2010. Characterization of phenotypic diversity yield and response to drought stress in a collection of Rhodes grass (*Chloris gayana* Kunth) accessions. *Field Crops Research* 118:57-72.
- Reddy M.P., Vora A.B. 1986. Changes in pigment composition, Hill reaction activity and saccharides metabolism in bajra (*Pennisetum typhoides* S & H) leaves under NaCl salinity. *Photosynthetica*, 20: 50-55.
- Ribotta A.N., Griffa S.M., Díaz D., Carloni E.J., López Colomba E., Tommasino E.A., Quiroga M., Luna C., Grunberg K. 2013. Selecting salt-tolerant clones and evaluating genetic variability to obtain parents of new diploid and tetraploid germplasm in rhodesgrass (*Chloris gayana* K.). *South African Journal of Botany*, 84: 88-93.

- Rogers M.E., Evans P.M. 1996. Do *Melilotus spp* have a role for saline areas in Australia? Proceedings of the 8th Australian Agronomy Conference, Toowoomba, pp 486-489. url:<http://agronomyaustraliaproceedings.org/images/sampled/1996/contributed/486Rogers.pdf>
- Rouphael Y., Cardarelli M., Mattia E., Tullio M., Rea E., Colla G. 2010. Enhancement of alkalinity tolerance in two cucumber genotypes inoculated with an arbuscular mycorrhizal biofertilizer containing *Glomus intraradices*. *Biology and Fertility of Soils*, 46: 499-509.
- Rosso B. 2014. Conservación de los recursos genéticos de las especies forrajeras en el Banco Activo de la EEA-INTA Pergamino. 37º. Congreso de la Asociación Argentina de Producción Animal, Buenos Aires, Argentina.
- Sánchez López D.B., Pérez Pazos J.V., David Hinestroza H.A. 2016. Efecto de las PGPB sobre el crecimiento *Pennisetum clandestinum* bajo condiciones de estrés salino. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18: 65-72.
- Sánchez R.M., Dunuel Guerra L., Scherger M. 2015. Evaluación de las áreas bajo riego afectadas por salinidad y/o sodicidad en Argentina. Programa Nacional Agua. FAO-INTA. url: [http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/rlc/utf017arg/anexosyapendices/5. Documento Estimaci%C3%B3n Areas Salinas en Argentina.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/rlc/utf017arg/anexosyapendices/5. Documento Estimaci%C3%B3n Areas Salinas en Argentina.pdf)
- Sandhya V., Ali Sk. Z., Grover M., Reddy G., Venkateswarlu B. 2010. Effect of plant growth promoting *Pseudomonas spp.* on compatible solutes, antioxidant status and plant growth of maize under drought stress. *Plant Growth Regulation*. 62: 21-30.
- Sauter A., Davies W.J., Hartung W. 2001. The long-distance abscisic acid signal in the droughted plant: the fate of the hormone on its way from root to shoot. *Journal of Experimental Botany*, 52(363): 1991-1997.
- Shi D.C., Wang D.L. 2005. Effects of various salt-alkaline mixed stresses on *Aneurolepidium chinense* (Trin.). *Plant and soil*, 271: 15-16.
- Shi D.C., Zhao K.F. 1997. Effects of NaCl and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> on growth of *Puccinellia tenuiflora* and on present state of mineral elements in nutrient solution. *Acta Pratacultura*, 6: 51-61.

- Singh M.P., Singh D.K., Rai M. 2007. Assessment of growth, physiological and biochemical parameters and activities of antioxidative enzymes in salinity tolerant and sensitive Basmati rice varieties. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 193(6): 398-412.
- Soares-Cordeiro A.S., Carmo-Silva A.E., Bernardes Da Silva A., Marques Da Silva J., Keys A.J., Arrabaça M.C. 2009. Effects of rapidly imposed water deficit on photosynthetic parameters of three C4 grasses. *Photosynthetica*, 47: 304-308.
- Taboada M.A., Damiano F., Lavado R.S. 2003. Inundaciones en la región pampeana. Consecuencias sobre los suelos. Disponible en: [http://www.agro.uba.ar/carreras/agronomía/materias/taller\\_II/taboada\\_damiano.pdf](http://www.agro.uba.ar/carreras/agronomía/materias/taller_II/taboada_damiano.pdf). Acceso: 20/11/2008.
- Taiz L., Zeiger E. 2006. *Plant physiology*. 4th ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Taleisnik E., Perez H., Córdoba A., Moreno H., García Seffino L., Arias C., Grunberg K., Bravo S., Zenoff A. 1998. Salinity effects on the early development stages of *Panicum coloratum*: cultivar differences. *Grass and Forage Science*, 53: 270-278.
- Taleisnik E., Peyrano G., Arias C. 1997. Response of *Chloris gayana* cultivars to salinity. Germination and early vegetative growth. *Tropical Grassland*, 31: 232-240.
- Tester M., Davenport R. 2003. Na<sup>+</sup> tolerance and Na<sup>+</sup> transport in higher plants. *Annals of Botany*, 91(5): 503-527.
- Tischler C.R., Ocumpaugh W.R. 2004. Kleingrass, Blue Panic, and Vine Mesquite. In *Warm-season (C4) grasses*. *Agronomy Monographs*, 45(18): 623-649.
- United States Salinity Laboratory Staff. 1954. *Diagnosis and improvement of saline and alkaline soils*. Agriculture handbook 60. Ed. L. A. Richards, 160 pp.
- Valentovič P., Luxová M., Kolarovič L., Gašparíková O., 2006. Effect of osmotic stress on compatible solutes content, membrane stability and water relations in two maize cultivars. *Plant Soil Environment* 52: 186-191.
- Vessey K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil*, 255: 571-586.

- Vignolio O.R., Cambareri G.S., Maceira N.O. 2010. *Lotus tenuis* (Fabaceae). Productividad y manejo agronómico. Revista Argentina de Producción Animal, 30(1): 97-116.
- Vu T.S., Zhang D., Xiao W., Chi C., Xing Y., Fu D., Yuan Z. 2015. Mechanisms of combined effects of salt and alkaline stresses on seed germination and seedlings of *Melilotus officinalis* (Fabaceae) in Northeast of China. Pakistan Journal of Botany, 47(5): 1603-1611.
- Wang H., Wu Z., Chen Y., Yang C., Shi D. 2011. Effects of salt and alkali stresses on growth and ion balance in rice (*Oryza sativa* L.). Plant Soil and Environment, 57(6): 286-294.
- Wang Z., Huang B. 2004. Physiological recovery of Kentucky bluegrass from simultaneous drought and heat stress. Crop Science, 44(5): 1729-1736.
- Wang W., Vinocur B., Altman A. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. Planta, 218:1-14.
- Wicke B., Edward S., Dornburg V., Vashev B., Gaiser T., Turkenburg W., Faaij A. 2011. The global technical and economic potential of bioenergy from salt-affected soils. Energy and Environmental Science, 4: 2669-2681.
- Yang C., Shi D., Wang D. 2008. Comparative effects of salt and alkali stresses on growth, osmotic adjustment and ionic balance of an alkali-resistant halophyte *Suaeda glauca* (Bge.). Plant Growth Regulation. 56: 179–190.
- Yang C., Jianaer A., Shi D., Wang D. 2008. Comparison of the effects of salt stress and alkali-stress on photosynthesis and energy storage of an alkali-resistant halophyte *Chloris virgata*. Photosynthetica, 46: 273-278.
- Zhang H., Liu X.-L., Zhang R.-X., Yuan H.-Y., Wang M.-M., Yang H.-Y., Ma H.-Y., Liu D., Jiang C.-J., Liang Z.-W. 2017. Root Damage under Alkaline Stress Is Associated with Reactive Oxygen Species Accumulation in Rice (*Oryza sativa* L.). Frontiers in Plant Science, 8: 1–12.
- Zhang J.T., Chun-Sheng M. 2009. Effects of saline and alkaline stresses on the germination, growth, photosynthesis, ionic balance and anti-oxidant system in an alkali-tolerant leguminous forage *Lathyrus quinquenervius*. Soil Science and Plant Nutrition, 55(5): 685-697.
- Zhang M.H., Qin Z.H., Liu X. 2005. Remote sensed spectral imagery to detect late blight in field tomatoes. Precision Agriculture, 6: 489-508.

Zhao Y., Lu Z., He L. 2014. Effects of saline-alkaline stress on seed germination and seedling growth of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 173(7): 1680-1691.

Zhu J-K. 2001. Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science*, 6: 66-71.