

Universidad Nacional de Lomas De Zamora

Facultad de Ciencias Agrarias



Trabajo Final de Grado

“Germinación de *Panicum virgatum* L. y *Chloris gayana* Kunth en condiciones de salinidad y alcalinidad y efectos del *priming* de las semillas sobre la germinación y crecimiento de plántulas de *Panicum virgatum* L.”

Autora: Gago, Ayelén Manuela

Directora: García, María Dina

Co-directora: Pesqueira, Julieta

2017

ÍNDICE GENERAL

Carátula.....	I
Índice general.....	II
Índice de figuras.....	IV
Índice de tablas.....	VII
1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	4
3. Objetivos.....	15
4. Hipótesis.....	16
5. Materiales y Métodos.....	17
5. 1. Material Vegetal.....	17
5. 2. Germinación.....	17
5. 3. Soluciones salino/alcalinas de germinación y crecimiento.....	18
5. 4. Experimento 1. Efectos de la salinidad y alcalinidad sobre la germinación de semillas de <i>C. gayana</i> y <i>P. virgatum</i>	19
5. 5. Experimento 2. Efecto del pre-tratamiento en agua y diferentes soluciones de KCl sobre la germinación y crecimiento inicial de <i>P. virgatum</i> bajo condiciones de salinidad y alcalinidad.....	19
5. 5. 1. Pre-tratamiento y germinación de las semillas.....	19
5. 5. 2. Crecimiento de las plántulas.....	20

5. 5. 2. 1. Determinación del contenido relativo de agua (CRA).....	21
5. 5. 2 .2. Estimación de la estabilidad de las membranas celulares.....	22
5. 5. 2. 3. Determinación del contenido de Na ⁺ y K ⁺	22
5. 5. 2. 4. Determinación del contenido de malondialdehído foliar.....	23
5. 6. Experimento 3. Efecto del pre-tratamiento en agua y diferentes soluciones de reguladores del crecimiento vegetal sobre la germinación de semillas de <i>P. virgatum</i> bajo condiciones de salinidad y alcalinidad.....	24
5. 7. Análisis estadístico.....	25
6. Resultados.....	26
6. 1. Experimento 1. Efectos de la salinidad y la alcalinidad sobre la germinación de semillas de <i>C. gayana</i> y <i>P. virgatum</i>	26
6. 2. Experimento 2. Efecto del pre-tratamiento en agua y diferentes soluciones de KCl sobre la germinación y crecimiento inicial de <i>P. virgatum</i> bajo estrés salino y alcalino.....	32
6. 2. 1. Germinación.....	32
6. 2. 2. CRA, crecimiento y estabilidad de las membranas celulares de las plántulas.....	35

6. 3. Experimento 3. Efecto del pre-tratamiento en agua y diferentes soluciones de reguladores del crecimiento vegetal sobre la germinación de semillas de <i>P. virgatum</i> bajo estrés salino y alcalino.....	46
7. Discusión.....	56
8. Conclusiones.....	70
9. Consideraciones finales.....	73
10. Bibliografía.....	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Germinación acumulada expresada como porcentaje de la germinación en agua (GR), de semillas de <i>C. gayana</i> y <i>P. virgatum</i> incubadas en soluciones con diferentes niveles salinidad y pH. Barras = error estándar de la media. Letras distintas indican diferencia significativa según el test LSD ($p \leq 0,05$).....	27
Figura 2. Efectos de diferentes niveles de sales de Na^+ y pH sobre el tiempo al 50 % de germinación (T_{50}) de semillas de <i>C. gayana</i> y <i>P. virgatum</i> . Barras = error estándar de la media. Letras distintas indican diferencia significativa según el test LSD ($p \leq 0,05$).....	28
Figura 3. Efectos de diferentes niveles de salinidad y pH sobre la evolución diaria de la germinación (G), expresada como porcentaje de la germinación en agua, de semillas de <i>C. gayana</i> y <i>P. virgatum</i> . DDS = días después de la siembra. Barras = error estándar de la media.....	29
Figura 4. Efectos de diferentes niveles de sales de Na^+ y pH sobre la velocidad de germinación (VG) de semillas de <i>C. gayana</i> y <i>P. virgatum</i> . Barras = error estándar de la media.....	30

- Figura 5.** Efectos de diferentes niveles de salinidad y pH sobre la germinación acumulada (G) de semillas de *P. virgatum*. Barras = error estándar de la media. Letras distintas indican diferencia significativa según el test LSD ($p \leq 0,05$).....33
- Figura 6.** Efectos del pre-tratamiento con soluciones de KCl y la incubación en soluciones con diferentes niveles de salinidad y pH sobre el tiempo al 50% de la germinación (T_{50}) de semillas de *P. virgatum*. Barras = error estándar de la media.....33
- Figura 7.** Efectos del pre-tratamiento con soluciones de KCl y la incubación en soluciones con diferentes niveles de salinidad y pH sobre la velocidad de germinación (VG) de semillas de *P. virgatum*. Barras = error estándar de la media. Letras distintas indican diferencia significativa según el test LSD ($p \leq 0,05$).....35
- Figura 8.** Efectos de diferentes niveles de salinidad y pH de la solución de cultivo sobre el contenido relativo de agua (CRA) en plántulas de *P. virgatum*. Barras = error estándar de la media. Letras distintas indican diferencia significativa según el test LSD ($p \leq 0,05$).....36
- Figura 9.** Efectos del pre-tratamiento con soluciones de KCl y la incubación en soluciones con diferentes niveles de salinidad y pH sobre el peso seco del vástago (PSv) y la raíz (PSr) de plántulas de *P. virgatum*. Barras = error estándar de la media.....38
- Figura 10.** Efectos de diferentes niveles de salinidad y pH sobre el porcentaje de pérdida de electrolitos del vástago (PPEv) y de la raíz (PPEr) de plántulas de *P. virgatum*. Barras = error estándar de la media. Letras distintas indican diferencia significativa según el test LSD ($p \leq 0,05$).....40
- Figura 11.** Efectos del pre-tratamiento con soluciones de KCl y la incubación en soluciones con diferentes niveles de salinidad y pH sobre el contenido de Na^+ del vástago y de la raíz de

plántulas de *P. virgatum*. Barras = error estándar de la media. Letras distintas indican diferencia significativa según el test LSD ($p \leq 0,05$).....42

Figura 12. Efectos del pre-tratamiento con soluciones de KCl y la incubación en soluciones con diferentes niveles de salinidad y pH sobre el contenido de K^+ del vástago y de la raíz de plántulas de *P. virgatum*. Barras = error estándar de la media.....43

Figura 13. Efectos del pre-tratamiento con soluciones de KCl y la incubación en soluciones con diferentes niveles de salinidad y pH sobre la relación K^+/Na^+ del vástago y de la raíz de plántulas de *P. virgatum*. Barras = error estándar de la media.....45

Figura 14. Efectos de diferentes pre-tratamientos: sin pre-tratamiento (C); agua (A), soluciones de ácido giberélico (AG_3 , mM) 0,15; 0,3; 0,6 y 1,2 mM; ácido salicílico (AS, mM) 0,1; 0,5 y 1 y cinetina (CIN, mM) 0,25 y 0,5 sobre la germinación acumulada (G) de semillas de *P. virgatum* incubadas en 50mM-pH9,3. Barras = error estándar de la media. Letras distintas indican diferencia significativa según el test LSD ($p \leq 0,05$).....48

Figura 15. Plántulas anormales de *P. virgatum* incubadas en 50mM-pH9,3.....48

Figura 16. Efectos de diferentes pre-tratamientos: sin pre-tratamiento (C); agua (A), soluciones de ácido giberélico (AG_3 , mM) 0,15; 0,3; 0,6 y 1,2 mM; ácido salicílico (AS, mM) 0,1; 0,5 y 1 y cinetina (CIN, mM) 0,25 y 0,5 sobre el tiempo al 50% de germinación (T_{50}) de semillas de *P. virgatum* incubadas en agua; 25mM-pH6,4; 25mM-pH9,3; 50mM-pH9,3 y 100mM-pH6,4. Barras = error estándar de la media. Letras distintas indican diferencia significativa según el test LSD ($p \leq 0,05$).....49

Figura 17. Efectos de diferentes pre-tratamientos: sin pre-tratamiento (C); agua (A), soluciones de ácido giberélico (AG_3 , mM) 0,15; 0,3; 0,6 y 1,2 mM; ácido salicílico (AS, mM) 0,1; 0,5 y 1 y cinetina (CIN, mM) 0,25 y 0,5 sobre el tiempo al 50% de germinación (T_{50}) de semillas de *P.*

virgatum incubadas en agua; 25mM-pH6,4; 25mM-pH9,3; 50mM-pH6,4 y 50mM-pH9,3. Barras = error estándar de la media. Letras distintas indican diferencia significativa según el test LSD ($p \leq 0,05$)..... 53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Caracterización de diferentes tipos de suelos afectados por salinidad y alcalinidad según nivel de severidad (promedio para 1 m de profundidad del suelo) (adaptado de Wicke <i>et al.</i> , 2011).....	6
Tabla II. Composición de las soluciones de incubación y crecimiento.....	18
Tabla III. Valores p del análisis de varianza (ANVA) de la germinación acumulada, expresada como porcentaje de la germinación en agua (GR), del tiempo al 50 % de la germinación (T_{50}) y de la velocidad de germinación (VG) para las relaciones 1:1 y 9:1 de sales de Na^+ neutras (25 y 100 mM).....	26
Tabla IV. Efecto de la concentración de sales de Na^+ , el pH, la especie y sus respectivas interacciones sobre la velocidad de germinación (VG) de semillas de <i>C. gayana</i> y <i>P. virgatum</i> . Letras distintas en la columna indican diferencia significativa según el test LSD ($p \leq 0,05$).....	31
Tabla V. Efecto del pre-tratamiento, la solución de incubación y su interacción sobre el tiempo al 50% de la germinación (T_{50}) de semillas de <i>P. virgatum</i> . Letras distintas en la columna indican diferencia significativa según el test LSD ($p \leq 0,05$).....	34
Tabla VI. Efecto del pre-tratamiento, la solución de incubación y su interacción sobre el peso seco del vástago (PSv) y de la raíz (PSr) de plántulas de <i>P. virgatum</i> . Letras distintas en la columna indican diferencia significativa según el test LSD ($p \leq 0,05$).....	37

Tabla VII. Efecto del pre-tratamiento, la solución de incubación y su interacción sobre el contenido de Na⁺, K⁺ y relación K⁺/Na⁺ del vástago y de la raíz de plántulas de *P. virgatum*. Letras distintas en la columna significa diferencia significativa según el test LSD ($p \leq 0,05$).....41

Tabla VIII. Análisis de la varianza (ANVA) del efecto del pre-tratamiento y la incubación para la germinación acumulada (G), tiempo al 50 % de la germinación (T₅₀) y velocidad de germinación (VG).....41

Tabla IX. Análisis de la varianza (ANVA) del efecto del pre-tratamiento dentro de cada tratamiento de incubación para la germinación acumulada (G), tiempo al 50 % de la germinación (T₅₀) y velocidad de germinación (VG) dentro de cada nivel de salinidad y pH.....47

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

ANVA Análisis de la varianza

AS Ácido salicílico

°C Grado centígrado

CE Conductividad eléctrica

CIC Intercambio catiónico total

CIN Cinetina(6-furfurylaminopurine)

CRA Contenido relativo de agua

DFFF Densidad de flujo fotónico fotosintético

G Germinación acumulada

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

Gago, Ayelén Manuela

g Gramo

GA₃ :Ácido giberélico

h hora

L Litro

m minuto

MDA Malondialdehído

mg miligramo

ml mililitro

mM miliMolar

PF Peso fresco

PM Peso molecular

PPEr Porcentaje de pérdida de electrolitos de la raíz

PPEv Porcentaje de pérdida de electrolitos del vástago

PS Peso seco

PSI Porcentaje de sodio de intercambio

PSr Peso seco de la raíz

PSv Peso seco del vástago

Pt Peso turgente

s segundo

T₅₀ Tiempo hasta el 50% de germinación

Gago, Ayelén Manuela

TBA ácido tiobarbitúrico

TCA ácido tricloroacético

VG Velocidad de germinación

1. RESUMEN

Los objetivos del presente trabajo fueron: i) Evaluar y comparar parámetros relacionados a la germinación de *Panicum virgatum* L. cv. Shawnee (*Pv*) y *Chloris gayana* Kunth cv. Finecut (*Cg*) en condiciones de salinidad y alcalinidad; ii) Evaluar el efecto del *osmo-priming* de las semillas con soluciones de KCl sobre la germinación y crecimiento inicial de plántulas de *Pv* en condiciones de salinidad y alcalinidad; iii) Evaluar el efecto del *priming* con reguladores del crecimiento vegetal sobre la germinación de semillas de *Pv* en condiciones de salinidad y alcalinidad.

Para cumplir con el primer objetivo, semillas de *Pv* y *Cg* se incubaron en agua o en soluciones de 2 concentraciones de sales de Na⁺ (25 y 100 mM) y 3 pHs (6,4; 9,3 y 10). Los tratamientos consistieron en la combinación de sales de Na⁺ neutras (NaCl y SO₄Na) y alcalinas (NaHCO₃ y Na₂CO₃) en proporciones 9:1 (pHs 6,4 y 9,3, respectivamente) y 1:1 (pHs 6,4 y 10, respectivamente). Los tratamientos resultantes fueron: 25mM-pH6,4 (control); 25mM-pH9,3; 25mM-pH10; 100mM-pH6,4; 100mM-pH9,3 y 100mM-pH10. Diariamente se registraron las semillas germinadas y a los 28 días se calculó la germinación acumulada, el tiempo al 50 % de la germinación (T₅₀) y la velocidad de germinación (VG). La germinación acumulada se expresó como porcentaje de la germinación en agua (GR). Con el fin de cumplir el segundo objetivo, semillas de *Pv* se pre-trataron en agua (*hidro-priming*) o en soluciones de KCl (0,1; 0,3; 0,45 M) y luego se incubaron en agua (control de incubación) o en soluciones de 2 concentraciones de sales de Na⁺ (25 y 100 mM) neutras y alcalinas en proporción 9:1 (pH 6,4 y 9,3, respectivamente). Los tratamientos resultantes fueron: agua (control de incubación); 25mM-pH6,4; 25mM-pH9,3; 100mM-pH6,4 y 100mM-pH9,3. A medida que germinaban, las semillas se transferían a una solución nutritiva completa con el mismo tratamiento salino/alcalino del periodo de germinación. A los 13 días desde la siembra se cosecharon las plántulas y se

determinaron el contenido relativo de agua (CRA), el peso seco del vástago (PSv) y la raíz (PSr), el porcentaje de pérdida de electrolitos del vástago (PPEv) y la raíz (PPEr), y los contenidos de K^+ y Na^+ del vástago y la raíz. Para cumplir el tercer objetivo, semillas de *Pv* se pre-trataron en agua o en soluciones de diferentes concentraciones de ácido giberélico (GA_3), ácido salicílico (AS) y cinetina (CIN) y luego se incubaron en agua o en soluciones de 3 concentraciones de sales de Na^+ (25, 50 y 100 mM) neutras y alcalinas en proporción 9:1 (pH 6,4 y 9,3 respectivamente). Los tratamientos resultantes fueron agua (control); 25mM-pH6,4; 25mM-pH9,3; 50mM-6,4; 50mM-pH9,3; 100mM-pH6,4 y 100mM-pH9,3. En ambos casos diariamente se registraron las semillas germinadas y a los 18 días se calculó la G, el T_{50} y la VG. El tratamiento control para el *priming* consistió en semillas sin pre-tratar.

A partir de la comparación de la germinación de *Cg* y *Pv*, se observó que las semillas de ambas especies incubadas en 25mM-pH6,4; 25mM-pH9,3; 25mM-pH10 y 100mM-pH6,4 presentaron valores de GR iguales o superiores al 90 %. En cambio, la combinación de 100 mM de sales de Na^+ y pH alcalino (pH = 9,3/10) redujo drásticamente la GR de ambas especies. *Cg* presentó mayor GR, VG y menor T_{50} que *Pv* en condiciones de salinidad moderada y alcalinidad (100mM-pH9,3). A partir de semillas de *Pv* sometidas a pre-tratamientos de hidro y osmo-*priming* e incubadas en soluciones con diferentes niveles de salinidad y pH se observó que la combinación de 100 mM de sales de Na^+ y pH neutro redujo la G en menos de un 10 % pero indujo una reducción de la VG del 30 % y un incremento del T_{50} de más del 60 % en relación al control. El aumento del pH en presencia de 25 mM de sales de Na^+ indujo un incremento menor del T_{50} (10%), que el inducido por el incremento de la salinidad de 25 a 100 mM en presencia de pH neutro (50 %). El pre-tratamiento de las semillas con KCl mejoró el T_{50} y la VG respecto de las semillas sin pre-tratar, sin embargo ninguno superó al efecto del hidro-*priming*. El CRA de las plántulas de *Pv* se mantuvo relativamente estable frente a las condiciones del

medio de incubación, sólo la salinidad moderada lo redujo en menos de un 6 %. El PSr fue más sensible a las condiciones del medio de incubación que el PSv. La incubación en 25mM-pH9,3 afectó sólo el PSr. La incubación en 100mM-pH6,4 indujo una reducción moderada del PSv (25,79 %) y severa del PSr (49,30 %). El osmo-*priming* incrementó el PSv y el PSr de las plántulas en relación al control. El aumento de la salinidad (de 25 a 100 mM) indujo incrementos más marcados del PPEr, PPEv y del contenido de Na⁺ del vástago que el incremento del pH. En cambio, ambos factores indujeron incrementos similares del contenido de Na⁺ de la raíz. El incremento del pH indujo una disminución más marcada de los contenidos de K⁺ del vástago y la raíz que el incremento de la salinidad. El osmo-*priming* de las semillas en KCl 0,45 M indujo las mayores reducciones en el contenido de Na⁺ del vástago, tanto en condiciones de salinidad moderada como pH elevado. El *priming* de semillas de *Pv* con reguladores del crecimiento vegetal no mejoró la VG y el T₅₀ respecto de las semillas pre-tratadas en agua cuando la concentración salina del medio de incubación era ≤25 mM, independientemente del pH. En cambio, en las semillas incubadas en 50 mM-pH6,4, el pre-tratamiento con GA₃-1,2 incrementó la VG respecto del control. El pre-tratamiento con AS-0,1 y AS-0,5 redujo el T₅₀ de las semillas incubadas en 100mM-pH6,4 respecto del control y del hidro-*priming*. El hidro-*priming* redujo la G y la VG e incrementó el T₅₀ de las semillas incubadas en 50mM-pH9,3 respecto de las semillas sin pre-tratar. Ninguna de las concentraciones de CIN mejoró los parámetros evaluados.

Conclusiones: i) *Cg* posee mayor tolerancia a niveles altos de estrés salino/alcalino (sal 100 mM y pH 9,3 ó 10) en el estadio de germinación que *Pv*; ii) El incremento del pH afecta las variables relacionadas a la germinación de *Pv* en función del nivel de salinidad considerado. En salinidad 25 mM el incremento del pH no afecta la G, el T₅₀ ni la VG. En cambio, el incremento del pH en presencia de 50 mM de sales de Na⁺ reduce la G, la VG e incrementó el T₅₀, y en presencia de 100 mM inhibe la G; iii) El osmo-*priming* induce el incremento del PSr en relación

al control (sin *priming*); iv) El osmo-*priming* de las semillas con KCl 0,45 M induce la menor acumulación de Na⁺ en el vástago de las plántulas cultivadas en 25mM-pH9,3; vi) El pre-tratamiento con AS-0,1 y AS-0,5 reduce el T₅₀ semillas incubadas en 100mM-pH6,4 en relación al control y al hidro-*priming*.

Palabras claves: forrajeras megatérmicas, salinidad, alcalinidad, *priming*, germinación, hidroponía.

2. INTRODUCCIÓN

La FAO/UNESCO estima que la superficie global afectada por salinidad y alcalinidad supera las 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 (Sánchez *et al.*, 2015), principalmente debido al incremento de la frecuencia de eventos climáticos extremos (sequías, inundaciones) y la expansión de la agricultura de regadío (Sánchez *et al.*, 2009).

Argentina se ubica entre los tres países con mayor superficie de suelos afectados por salinidad en el mundo, detrás de Rusia y Australia (Puchulú, 2008). Sólo en la provincia de Buenos Aires, 7 millones de ha (24 % de la superficie total) están ocupadas por suelos con problemas de hidro-halomorfismo (Miaczynski, 1995). Natracualfes y Natracuoles son los perfiles más representativos (Wicke *et al.*, 2011), los cuales a nivel provincial totalizan un área de más de 4,7 millones de ha (aproximadamente un 16 % de la superficie total). Estos suelos poseen típicamente un horizonte arcilloso, baja permeabilidad y alto contenido de sales sódicas (Miaczynski, 1995). Las condiciones mencionadas generan un ambiente edáfico desfavorable para la germinación y crecimiento de la mayoría de las plantas.

La formación de suelos salinos requiere la existencia de una fuente de sales solubles y de un balance en donde los procesos de acumulación prevalezcan, periódica o permanentemente,

sobre los de lavado. La salinización afecta principalmente zonas áridas y semiáridas, donde las precipitaciones no son suficientes para lavar las sales fuera de la zona de exploración radicular, y donde la elevada evapotranspiración tiende a concentrar las sales en las capas más superficiales. En zonas húmedas y subhúmedas se dan procesos de salinización y acumulación de sodio debido a la combinación de factores de diferente naturaleza: régimen hídrico e inundaciones, geomorfología, dinámica freática y propiedades intrínsecas de los materiales tales como granulometría, porosidad, permeabilidad y conductividad hidráulica. Tal es el caso de la Pampa Deprimida y de la Pampa Arenosa (Casas, 2013; Imbellone *et al.*, 2010).

Durante el último tercio del siglo XX se produjo un desplazamiento de las isoyetas de 500 y 750 mm hacia el oeste de la región pampeana (Sierra *et al.*, 1994). Esta variación climática provocó, por un lado, el avance de la frontera agrícola hacia zonas típicamente mixtas o ganaderas, impulsado aún más por los precios de los *commodities* agrícolas de esos años, y por el otro, el aumento de la frecuencia de inundaciones y el ascenso del nivel freático en las zonas bajas, de pendiente exigua y drenaje deficiente. A su vez, el ascenso de la capa freática con aguas con altos contenidos de sales y sodio intensificó aún más los procesos de salinización y alcalinización. En la provincia de Buenos Aires, más de tres millones de hectáreas se encuentran afectadas por este proceso (Casas, 2013).

Por todo lo mencionado anteriormente, la actividad ganadera de la región quedó desplazada en su mayor parte a ambientes aún más restrictivos desde el punto de vista edáfico.

Los suelos salinos se caracterizan por poseer una elevada concentración de sales solubles. Los iones más comúnmente encontrados son el Cl^- y los sulfatos de Na^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} . La sodificación o alcalinización ocurre cuando en la solución del suelo existe una concentración elevada de sales sódicas de tipo carbonato y bicarbonato de Na^+ (Etchevehere, 1976). Las arcillas saturadas de cationes Na^+ , en presencia de agua de lluvia y CO_2 disuelto, se hidrolizan

liberando iones Na^+ y OH^- a la solución edáfica, lo cual incrementa el pH a valores superiores a ocho.

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 límite inferior de salinidad en los suelos se establece convencionalmente en una conductividad eléctrica del extracto de saturación de 4 dS m^{-1} (a 25°C).

El porcentaje de sodio intercambiable (PSI) (se define como la cantidad de sodio adsorbido por las partículas del suelo, expresado en porcentaje de CIC (capacidad de intercambio catiónico). $\text{PSI} = \text{Na}^+ \text{ intercambiable (meq/ 100g de suelo) / CIC (meq/ 100g de suelo)}$, y es un parámetro comúnmente usado para estimar la concentración de Na^+ de un suelo. El hecho de que un suelo sea sódico ($\text{PSI} \geq 15$) no implica necesariamente que sea alcalino. El criterio generalmente aceptado para definir a un suelo alcalino es que posea un pH mayor a 8,5. Por otro lado, el pH no es un criterio diagnóstico de sodicidad porque existen suelos sódicos con pH menor que 8,5 (Guerrero-Alves *et al.*, 2009).

Si bien existen diversas clasificaciones de los suelos afectados por sales, comúnmente se acepta la siguiente clasificación, sobre la base de los valores obtenidos del extracto de la pasta de suelo saturado (CE_s): i) suelo salino, $\text{PSI} < 15$, $\text{CE}_s > 4 \text{ dS m}^{-1}$, $\text{pH} < 8,2$ sin carbonatos en el extracto de la pasta del suelo saturado, y ii) suelo alcalino, $\text{PSI} \geq 15$, CE_s variable, frecuentemente $< 4 \text{ dS m}^{-1}$, $\text{pH} \geq 8,2$ con presencia de bicarbonato y carbonato de Na^+ en el extracto de la pasta del suelo saturado (Villafañe, 2000). Además, la salinidad y la alcalinidad o sodicidad pueden afectar a los suelos en diversas combinaciones y niveles de severidad (Wicke *et al.*, 2011) (Tabla I).

Tabla I. Caracterización de diferentes tipos de suelos afectados por salinidad y alcalinidad según nivel de severidad (promedio para 1 m de profundidad del suelo) (adaptado de Wicke *et al.*, 2011).

Tipo de suelo salino	Indicador	Nivel de severidad			
		Leve	Moderado	Alto	Extremo
Sódico	PSI (%)	15 - 20	20 - 30	30 - 40	> 40
	CE _s (dSm ⁻¹)	< 4	< 4	< 4	< 4
Salino	PSI (%)	< 15	< 15	< 15	< 15
	CE _s (dSm ⁻¹)	2 - 4	4 - 8	8 - 16	> 16
Salino-sódico	PSI (%)	15-20/4-8	15-20/4-16	15-20/ >25	20-30/ >25
	CE _s (dSm ⁻¹)		30-40/4-8 30-40/8-16	20-30/ 16-25 40-50/4-8	30-40/ >16 40-50/ >8 >50/ >4

Los efectos más significativos y ampliamente estudiados de la salinidad sobre las plantas han sido el estrés osmótico, el desequilibrio iónico, particularmente en los iones K⁺ y Ca²⁺, y la toxicidad directa de los iones sobre los procesos metabólicos (Zhu, 2001; Tester y Davenport, 2003; Munns y Tester, 2008). En gran parte de las especies vegetales la concentración de Na⁺ alcanza niveles tóxicos antes que la de Cl⁻, por lo que a continuación se expondrán los efectos de la acumulación de Na⁺.

La elevada concentración de sales en la solución del suelo genera en la planta tanto un estrés osmótico como iónico. El estrés osmótico produce una reducción rápida y transitoria del crecimiento aéreo y radicular, seguida de un período más lento de recuperación. Este efecto no parece dependiente de la concentración de Na⁺ en el tejido, sino más bien de una respuesta a la osmolaridad de la solución externa (Munns, 2002). En cambio, los daños específicos del Na⁺ se asocian con la acumulación de este ión en tejidos adultos y resultan en necrosis de las hojas

viejas. La reducción de la velocidad de crecimiento junto con el aumento en la velocidad de necrosis de tejidos adultos llevan a una merma de los niveles de fotosíntesis neta (Munns 1993, 2002). Los daños específicos por Na^+ muestran mayor variación entre especies que los efectos osmóticos (Munns, 2002), los cuales pueden identificarse en varios niveles (para revisiones ver Munns, 2002; Tester y Davenport, 2003; Munns y Tester, 2008). Procesos esenciales tales como la síntesis de proteínas, la fotosíntesis y el metabolismo de producción de energía y de lípidos se ven afectados. La fotosíntesis disminuye por la reducción de la conductividad estomática, la concentración interna de CO_2 , la síntesis de clorofila y la actividad de la ribulosa 1,5 bifosfato y de la fosfoenolpiruvato-carboxilasa (Wani *et al.*, 2013). Las plantas que crecen en suelos salinos muestran mayor resistencia hidráulica de los vasos xilemáticos en relación a las que crecen en suelos no salinos (Ortega *et al.*, 2006). Además, se produce un desbalance nutricional ya que la salinidad afecta la disponibilidad, la absorción y el transporte de los nutrientes esenciales (Greenway y Munns, 1980; Hasegawa *et al.*, 2000; Munns, 2002; Parida y Das, 2005). Una respuesta común a diversos factores de estrés ambiental es la acumulación de especies reactivas de oxígeno tales como el anión superóxido (O_2^-), oxígeno singlete (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, entre otros), lo cual induce daño a las membranas celulares (pérdida de integridad de las mismas y, como consecuencia, incremento de la permeabilidad) (Blokhina *et al.*, 2003). El estrés osmótico también se ha visto asociado con la acumulación de azúcares solubles, lo que se considera, en forma general, como una respuesta adaptativa (para una revisión ver Couée *et al.*, 2006; Sandhya *et al.*, 2010). También los solutos compatibles (una variedad de compuestos orgánicos, tales como azúcares, poliaminas, betaínas, compuestos de amonio cuaternario, alcoholes polihídricos, prolina y otros aminoácidos) aumentan en respuesta al estrés hídrico y salino, y parecen tener una función protectora (Ashraf

y Harris, 2004; Yoshiba *et al.*, 1997). Ésta se ha relacionado con la modulación de las relaciones hídricas (Nawaz y Ashraf, 2007) o la eliminación de las especies reactivas de oxígeno (Mansour, 2000; Sandhya *et al.*, 2010; Zhu, 2001, entre otros).

La salinización y alcalinización comúnmente ocurren en forma conjunta en la naturaleza, en cuyo caso, a los efectos antes mencionados se añaden los derivados de un pH elevado. Los estudios sobre los efectos de la alcalinidad son limitados, en parte por la dificultad práctica que representa mantener valores altos de pH en el medio en contacto con las raíces (Singh *et al.*, 2002). Sin embargo, en los últimos años se incrementaron los estudios sobre los efectos de la alcalinidad sobre la germinación y el crecimiento de las plantas.

Estos estudios han mostrado que un pH elevado produce la precipitación de iones metálicos (Zn^{2+} y Fe^{2+}) de la solución edáfica, alteraciones de 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 (Li *et al.*, 2010; Islam *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011; Rouphael *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2008) 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 (Gao *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2011; Javid *et al.*, 2011). Por otro lado, en suelos alcalinos grandes cantidades de ácido abscísico (ABA) se pierden en la rizósfera. 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 compartimiento más alcalino, en este caso, la solución del suelo, en consecuencia las plantas se vuelven deficientes en esta hormona y más susceptibles a las condiciones de estrés (Sauter *et al.*, 2001; Degenhardt *et al.*, 2000).

Semillas de *Lathyrus quinquenervius* incubadas en salinidad/alcalinidad moderada recobraron la germinación tras ser transferidas a incubación en agua, mientras que semillas inicialmente incubadas en alcalinidad elevada no logran germinar aún luego de ser incubadas en agua. El pH elevado probablemente descompone la estructura de las semillas generando su muerte (Zhang y Chun-Sheng, 2009).

En plantas de diferentes líneas de poroto niveles crecientes de Na_2CO_3 en la solución de cultivo redujeron la biosíntesis de las clorofilas a y b y aumentaron la pérdida de electrolitos (Radi *et al.*, 2012). La reducción de la biosíntesis de clorofila puede deberse a una reducción en la absorción y translocación del Fe^{2+} (Miller *et al.*, 1984).

Numerosos autores observaron que las sales alcalinas producen un efecto más perjudicial que las sales neutras sobre la germinación y el crecimiento de plantas de especies tales como alfalfa (Li *et al.*, 2010a; Peng *et al.*, 2008), trigo (Guo *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2008), *Setaria viridis* (Guo *et al.*, 2011), arroz (Wang *et al.*, 2011), *Vicia faba* L. (Radi *et al.*, 2012), *P. virgatum* (Liu, 2014; Markan *et al.*, 2013), *Chloris virgata* (Li *et al.*, 2009), *Spartina alterniflora* (Li *et al.*, 2010b), *Chloris gayana* (Pesqueira *et al.*, 2014), *Panicum coloratum* (García *et al.*, 2013; García *et al.* 2015a), girasol (Liu y Shi, 2010), entre otras.

Las condiciones edáficas descritas plantean la necesidad de proponer y evaluar distintas alternativas de manejo que mejoren la germinación y el crecimiento inicial. Una alternativa para incrementar la producción de forraje es la introducción de especies forrajeras de buena calidad con potencial para tolerar tales condiciones edáficas, junto con las recomendaciones de manejo más adecuadas. *Chloris gayana* Kunth y *Panicum virgatum* L. son dos especies gramíneas perennes de producción primavera-verano-estival adaptadas a una amplia variedad de condiciones edafo-climáticas, lo que las hace potencialmente útiles para crecer en el ambiente en cuestión.

P. virgatum (Switchgrass) es una especie megatérmica halógama originaria de Estados Unidos con metabolismo fotosintético C4, la cual se caracteriza por sus bajos requerimientos hídricos, fitosanitarios y nutricionales (Giannoulis *et al.*, 2017). Esta especie muestra una alta variabilidad intraespecífica en la tolerancia a factores de estrés tales como la salinidad (Liu *et al.*, 2014; Schmer *et al.*, 2012), la alcalinidad (Liu *et al.*, 2015), las bajas y altas temperaturas (Hope y McElroy, 1990; Seepaul *et al.*, 2011), el déficit y el exceso hídrico (Liu *et al.*, 2015; Barney *et al.*, 2009). Además de su valor como recurso forrajero, *P. virgatum* ha sido objeto de múltiples estudios desde la década de 1980 por parte del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) por su potencial uso como cultivo bio-energético, dada su elevada producción de biomasa (Mitchell *et al.*, 2016; Rinehart, 2006; McLaughlin y Kszos, 2005; Chuck *et al.*, 2011; Sanderson *et al.*, 2006). Las semillas de *P. virgatum* poseen dormición física (impuesta por las cubiertas) y fisiológica (característica de muchas gramíneas megatérmicas) (Duclos *et al.*, 2013; Haynes *et al.*, 1997; Grabowski *et al.*, 2002; Checovich y Ruiz, 2012), la cual constituye, junto con la baja habilidad para competir con las malezas (Mitchell *et al.*, 2016), la principal limitante para el logro de una implantación exitosa. Si bien existen numerosos tratamientos que permiten superar la dormición, entre ellos la escarificación (Haynes *et al.*, 1997) y la remoción de cubiertas externas (Duclos *et al.*, 2013), el post-madurado en seco a temperatura ambiente por períodos variables de tiempo es uno de los métodos más utilizados (Finch-Savage y Leubner- Metzger, 2006). Wolf y Fiske (1995) informaron que la dormición de *P. virgatum* se pierde luego del almacenamiento durante 2 a 4 años en un ambiente cálido. Sin embargo, Checovich y Ruiz (2012) encontraron variabilidad en el tiempo requerido de post-madurado (desde 30 a más de 210 días) para alcanzar los valores máximos de germinación en distintos cultivares de *P. virgatum* recolectados en la región semiárida central de Argentina. Una

vez superada dicha etapa, puede persistir alrededor de 10 años en el lote mediante propagación sexual y/o asexual (rizomas) (Liu *et al.*, 2015; Mitchell *et al.*, 2016).

C. gayana (Gramma Rhodes) es una especie C4 nativa de África, ampliamente difundida en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo por su adaptabilidad a una gran variedad de condiciones ambientales, persistencia y producción de biomasa con valor nutritivo aceptable (Ávila *et al.*, 2012, Pesqueira *et al.*, en prensa). Al igual que *P. virgatum*, la existencia de una gran variabilidad genética permite encontrar individuos con tolerancia a la sequía (Ponsens *et al.*, 2010), salinidad (Taleisnik *et al.*, 1997; Ribotta *et al.*, 2013; Russell, 1976; Deifel *et al.*, 2006, Otondo *et al.*, 2014), a períodos cortos de anegamiento (Imaz *et al.*, 2012; Imaz *et al.*, 2015), alcalinidad (Bui, 2013; Pérez *et al.*, 2007; Avaca *et al.*, 2015; García *et al.*, 2015b, Pesqueira *et al.*, en prensa) y tolerancia moderada a heladas (Jones, 1969; Bogdan, 1969; Lodge *et al.*, 2010; Pesqueira *et al.*, 2016). La acumulación de Na⁺ en las vacuolas (Deifel *et al.*, 2006) y la excreción de iones, principalmente Na⁺, a través de glándulas foliares (Kobayashi y Masaoka, 2008; Oi *et al.*, 2013) son mecanismos involucrados en la tolerancia a la salinidad de esta especie. Semillas de *C. gayana* sometidas a un medio salino (hasta 200 mM de NaCl) conservan la viabilidad y pueden reiniciar la germinación una vez removido el estrés, al lavarse las sales por precipitación, lo cual indica que la germinación no es una limitante para su implantación exitosa en una pastura (Taleisnik *et al.*, 1997).

La germinación y crecimiento inicial son estadios críticos para el establecimiento exitoso del cultivo, pues es en ese momento cuando se determina el número de plantas logradas por unidad de superficie. La tolerancia a la salinidad varía a lo largo del desarrollo fenológico, los estadios iniciales son particularmente sensibles (Bazzigalupi *et al.*, 2008; Martín *et al.*, 2008; Ochoa, 2011). La presencia de sales en la solución del suelo afecta negativamente la germinación al reducir el agua disponible para la absorción desde la semilla y/o por el efecto

tóxico de los iones Na^+ y Cl^- (Khajeh-Hosseini *et al.*, 2003). En suelos alcalinos, el pH elevado reduce la solubilidad de algunos micronutrientes y por lo tanto disminuye la disponibilidad y absorción de los mismos, especialmente el Fe, Mn, Zn, Cu y B. En tales condiciones edáficas, es frecuente observar un establecimiento pobre del cultivo: germinación atrasada, asincrónica e incluso inhibida. En un cultivo, la germinación y la emergencia de las plántulas en forma rápida y uniforme, permite obtener un conjunto de individuos similares en tamaño y con una distribución homogénea que hace más eficiente el uso de los recursos ambientales (Aguirrezábal *et al.*, 1996). Una de las principales limitantes del rendimiento en condiciones climáticas o edáficas deficientes es la falta de sincronización en el establecimiento del cultivo (Mwale *et al.*, 2003).

El *priming* es un pre-tratamiento que consiste en la imbibición en agua o en diferentes soluciones durante un tiempo variable que permite la imbibición y la activación de los mecanismos metabólicos iniciales, pero previene la emergencia de la radícula (Eskandari, 2013; Varier *et al.*, 2010). El *priming* influye en la germinación y en el desarrollo de las plántulas mediante la modulación de la actividad metabólica previa a la emergencia de la radícula (Ashraf y Foolad, 2005). En general, los resultados muestran un efecto positivo del pre-tratamiento sobre la germinación final, la velocidad de germinación, la uniformidad de emergencia y parámetros fisiológicos y de crecimiento de la plántula. En algunos casos se observaron incluso incrementos del rendimiento (Harris *et al.*, 2007) (para revisiones ver Farooq *et al.*, 2012; Eskandari, 2013; Ashraf y Foolad, 2005).

Mediante este procedimiento se inducen las fases I y II de la curva de imbibición de las semillas, pero se evita llegar a la fase III. Luego, las semillas se secan hasta su contenido de agua inicial (Nawazn *et al.*, 2013). Durante la fase I de la germinación, la imbibición normalmente es rápida como consecuencia del fuerte gradiente de potencial hídrico entre la

semilla y el sustrato húmedo, se produce así la hidratación de las células y sus constituyentes. Esta fase tiene lugar independientemente de la viabilidad de la semilla. En la fase II (fase *lag*) se establece un equilibrio entre el agua que la semilla pierde por evaporación y la que gana de la solución de imbibición y es en donde se da una gran actividad metabólica. La velocidad de hidratación se recupera durante la fase III debido a la expansión y emergencia del embrión desde la semilla, a medida que se completa el proceso de germinación.

Entre los mecanismos involucrados en la respuestas al *priming* durante la germinación se encuentra el incremento de la actividad de numerosas enzimas asociadas la movilización de reservas y eliminación de especies reactivas del oxígeno (Ella *et al.*, 2011), alteración en la absorción y movilización de iones inorgánicos y reparación y síntesis de ADN (Varier *et al.*, 2010)

Numerosos tipos de tratamientos de *priming* han sido evaluados, los más comúnmente usados constan de un periodo de imbibición en diferentes soluciones y/o condiciones (Ashraf y Foolad, 2005): i) agua (*hidro-priming*), ii) soluciones de osmolitos orgánicos o inorgánicos (*osmo-priming*), iii) reguladores del crecimiento vegetal, antioxidantes, micronutrientes (*nutri-priming*) (Farooq *et al.*, 2012), vi) matrices sólidas (*solidmatrix-priming*), v) bajas o altas temperaturas (*termo-priming*), vi) rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (*bio-priming*) (Kaymak *et al.*, 2009; Moeinzadeh *et al.*, 2010), etc.

El *hidro-priming* es una técnica accesible y de bajo costo que en muchos casos ha resultado ser la más efectiva (Caseiro *et al.*, 2004; Fujikura *et al.*, 1993).

El pre-tratamiento osmótico o salino (*osmo-priming*) consiste en sumergir las semillas en soluciones de sales inorgánicas (NaCl, KNO₃, CaCl₂, CaSO₄, etc.) durante un determinado lapso de tiempo. El pre-tratamiento de las semillas con soluciones de distinto potencial osmótico se ha

propuesto como una técnica eficaz para aumentar la tolerancia a la salinidad durante la germinación y emergencia de plántulas de diversas especies (Afzal *et al.*, 2008; Patade *et al.*, 2009; Basra y Afzal, 2005; Sivritepe *et al.*, 2003; Roy y Srivastava, 2000; Abraha y Yohannes, 2013).

Numerosos trabajos demostraron que el *priming* con reguladores del crecimiento vegetal (ácido giberélico, ácido salicílico, cinetina, ácido ascórbico, ácido indolacético, etc.) mejora la germinación y crecimiento inicial de las plántulas tanto en condiciones normales (Machado de Mello *et al.*, 2009; Saeedipour, 2013; Isiaka y Mohd, 2013; Tzortzakis, 2009) como en condiciones estresantes, tales como salinidad (Afzal *et al.*, 2005, 2006; Raeberl y Lee, 199; Naeemand y Muhamad, 2006), bajas temperaturas (Farooq, 2008), exceso de Cd (Sneideris *et al.*, 2015), envejecimiento de las semillas (Azadi *et al.*, 2013), etc. El *priming* con reguladores del crecimiento vegetal es muy dependiente de la concentración de los mismos en la solución (Afzal *et al.*, 2005).

3. OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo fueron i) Evaluar y comparar la germinación acumulada (G), la velocidad de germinación (VG) y el tiempo al 50 % de germinación (T_{50}) de *Panicum virgatum* L. cv. Shawnee y *Chloris gayana* Kunth cv. Finecut en condiciones de salinidad y alcalinidad; ii) Determinar el efecto del *priming* con soluciones de diferentes concentraciones de KCl sobre la G y el crecimiento inicial de las plántulas de *Panicum virgatum* L. cv. Shawnee en condiciones de salinidad y alcalinidad; ii) Determinar el efecto del *priming* en soluciones de hormonas vegetales sobre la germinación de semillas de *Panicum virgatum* L. cv. Shawnee en condiciones de salinidad y alcalinidad.

4. HIPÓTESIS

-La incubación de semillas *Panicum virgatum* L. cv. Shawnee y *Chloris gayana* Kunth cv. Finecut en soluciones salino-alcálinas reduce la germinación acumulada, la velocidad de germinación e incrementa el tiempo al 50 % de la germinación respecto al control.

-Existen diferencias en la tolerancia a condiciones de salinidad y alcalinidad de semillas de *Panicum virgatum* L. cv. Shawnee y *Chloris gayana* Kunth cv. Finecut durante la germinación.

-El *priming* de semillas de *Panicum virgatum* cv. Shawnee incrementa la germinación acumulada, la velocidad de germinación y reduce el tiempo al 50 % de la germinación bajo estrés salino/alcalino.

-El *priming* de las semillas de *Panicum virgatum* L. cv. Shawnee en soluciones de KCl y hormonales vegetales incrementa la G y la VG y reduce el T_{50} en relación al hidro-*priming*.

-El *priming* de semillas de *Panicum virgatum* L. cv. Shawnee con KCl mejora parámetros de crecimiento y fisiológicos de las plántulas cultivadas en soluciones salino/alcálinas.

-El *priming* de las semillas de *Panicum virgatum* L. cv. Shawnee tiene efectos diferentes sobre la G, VG y el T_{50} de acuerdo al nivel de salinidad y pH del medio de incubación.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5. 1. Material Vegetal

Las especies evaluadas fueron *C. gayana* cv. Finecut (Oscar Peman & Asociados S.A.), y *P. virgatum* L. cv. Shawnee.

La estructura botánica que habitualmente se denomina semilla en las especies utilizadas es una unidad de dispersión que comprende el cariopse encerrado en las glumelas y las glumas.

Las semillas de *P. virgatum* L. cv. Shawnee utilizadas no presentaban dormición, la germinación acumulada en agua fue en todos los casos superior al 90 %.

5. 2. Germinación

Las semillas se colocaron sobre dos papeles de filtro en cajas de Petri de 90 mm de diámetro y se hidrataron con 5 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 2 mm o más se registraron como germinadas y se descartaron.

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

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

El T_{50} se calculó de acuerdo a 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_i y n_j son el número acumulado de semillas germinadas en recuentos adyacentes a los tiempos t_i y t_j , respectivamente, cuando $n_i < N/2 < n_j$.

La VG se calculó según la fórmula de Timson (1965), modificada por Zhang (2012):

$$VG (\% d^{-1}) = \Sigma g/ t.$$

Donde, g es el porcentaje de semillas nuevas germinadas en un intervalo diario y t es el periodo total de germinación.

1.3. Soluciones salino/alcalinas de germinación y crecimiento

Los soluciones de germinación y cultivo surgieron de la combinación en proporciones 9:1 y 1:1 de sales de Na⁺ neutras (NaCl - Na₂SO₄) o alcalinas (NaHCO₃ - Na₂CO₃). El pH de las soluciones se midió con un pHchímetro de mesada. En el caso de las soluciones neutras se ajustó el pH al deseado mediante el uso de KOH o HCl. El pH (media ± EEM) obtenido para las soluciones de sales de Na⁺ neutras fue de 6,38 ± 0,03, y de 9,28 ± 0,04 y 10,04 ± 0,02 para el caso de las soluciones de sales de Na⁺ alcalinas en relación 9:1 y 1:1, respectivamente. La proporción de sales neutras fue igual a la de sales alcalinas con el fin de mantener la misma concentración de Na⁺ en los tratamientos neutros y alcalinos de igual concentración salina. Los tratamientos resultantes de estas combinaciones se detallan en la tabla II.

Tabla II. Composición de las soluciones de incubación y crecimiento.

Sn de incubación y crecimiento		Concentración salina	pH	NaCl	Na ₂ SO ₄	NaHCO ₃	Na ₂ CO ₃
				mM			
		Agua	6,4	0	0	0	0
Proporción de sales	9:1	25 mM	6,4	22,5	2,5		
			9,3			22,5	2,5
		50 mM	6,4	45	5		
			9,3			45	5
		100 mM	6,4	90	10		
			9,3			90	10
	1:1	25 mM	9,3	12,5	12,5		
			10	50	50		
		100 mM	6,4			12,5	12,5
			10			50	50

5. 4. Experimento 1. Efectos de la salinidad y alcalinidad sobre la germinación de semillas de *C. gayana* y *P. virgatum*.

Con el objetivo de comparar el efecto de la salinidad y alcalinidad sobre la G, el T₅₀ y la VG de semillas de *C. gayana* Kunth cv. Finecut y *P. virgatum* L. cv. Shawnee, se llevó a cabo un diseño factorial completamente aleatorizado de dos especies x dos concentraciones de sales de Na⁺ (25 y 100 mM) x tres pHs (6,4; 9,3 y 10), con cuatro repeticiones de 200 semillas cada una para *C. gayana* y 50 semillas para *P. virgatum*.

Las semillas se incubaron durante 28 días, con una alternancia diaria de 12 h de luz y oscuridad, a temperatura media mínima de 24,30 ± 0,16 °C y máxima de 25,78 ± 0,14 °C.

Con el objetivo de poder comparar ambas especies, la G de cada tratamiento se expresó como porcentaje de las semillas germinadas en agua de la especie correspondiente (GR, %). Para calcular la VG, los porcentajes de germinación diarios se calcularon en base a la G en agua correspondiente a cada especie.

5. 5. Experimento 2. Efecto del *priming* (pre-tratamiento) en agua y diferentes soluciones de KCl sobre la germinación y crecimiento inicial de *P. virgatum* bajo condiciones de salinidad y alcalinidad.

5. 5. 1. Pre-tratamiento y germinación de las semillas.

Para determinar los efectos del pre-tratamiento y de las condiciones de incubación sobre la germinación y crecimiento inicial de plántulas de *P. virgatum* L. cv. Shawnee se utilizó un diseño factorial completamente aleatorizado con cuatro repeticiones de 50 semillas cada una. Los factores fueron cinco pre-tratamientos y cinco soluciones de incubación con diferentes niveles de salinidad y alcalinidad. Los pre-tratamientos fueron: control (semillas sin pre-tratar) y 24 h de

imbibición en agua destilada o en soluciones de KCl (M) 0,1 (-0,75 MPa); 0,3 (-1,5 MPa) y 0,45 (-2,25 MPa). Los tratamientos de incubación consistieron en dos concentraciones de sales de Na⁺ (25 y 100 mM) neutras (NaCl-Na₂SO₄) y alcalinas (NaHCO₃-Na₂CO₃) en proporción 9:1 (pH = 6,4 y 9,3 respectivamente) (Tabla II). Los tratamientos de incubación resultantes fueron: agua (control); 25 mM-pH6,4; 25mM-pH9,3; 100 mM-pH6,4 y 100 mM-pH9,3.

Las semillas se desinfectaron antes de la aplicación del pre-tratamiento con el objetivo de evitar futuras infecciones que entorpecerían el desarrollo del ensayo. La secuencia de la desinfección consistió en: i) Agitación manual en etanol 70%, 30 segundos; ii) Cuatro enjuagues con agua destilada; iii) agitación en lavandina comercial 10%, 20 minutos; iv) Cuatro enjuagues con agua destilada estéril; v) Secado a temperatura ambiente bajo campana de flujo laminar.

Las semillas desinfectadas se embebieron durante 24 horas a temperatura ambiente ($25,5 \pm 1,07$), oscuridad y agitación constante en agua o diferentes soluciones de KCl (0,1; 0,3 y 0,45 M), a razón de 100 ml de solución cada 4 g de semillas. Luego se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se colocaron sobre papel absorbente para su secado al aire bajo campana de flujo laminar, a temperatura ambiente. Una vez secas se conservaron en bolsas de polietileno cerradas en heladera ($5 - 8$ °C) hasta su utilización, dentro de los 24 horas posteriores. El tratamiento control consistió en semillas desinfectadas sin pre-tratar.

Las semillas se incubaron durante 18 días con una alternancia diaria de luz-oscuridad de 12 h con temperaturas medias máxima y mínima de $28,61 \pm 0,37$ °C y $23,27 \pm 0,20$ °C, respectivamente.

5. 5. 2. Crecimiento de las plántulas.

Las semillas germinadas en los tratamientos descritos en el punto anterior se extrajeron de las cajas de Petri y se colocaron en potes plásticos de 5 cm de diámetro y 10 cm de altura sobre

dos papeles de filtro embebidos con solución nutritiva y el mismo tratamiento de salinidad/alcalinidad del periodo de germinación. Cada pote contenía hasta 10 plántulas. Las plántulas crecieron bajo 16 h de fotoperíodo con una DFFF = $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y temperaturas medias máxima y mínima de $28,61 \pm 0,37 \text{ }^\circ\text{C}$ y $23,27 \pm 0,20 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. La solución nutritiva constaba de las siguientes sales (mM) que aportaron los macro y micro-nutrientes esenciales: $0,751 \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $3,476 \text{ KH}_2\text{PO}_4$; $6,997 \text{ KNO}_3$; $4,234 \text{ (NO}_3)_2\text{Ca} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; $3,505 \text{ (NH}_4)_2\text{SO}_4$; $0,02 \text{ H}_3\text{BO}_3$; $0,02 \text{ MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; $0,02 \text{ ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $0,02 \text{ KI}$; $0,1 \text{ FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $0,1 \text{ Na}_2\text{EDTA}$; $4,1 \times 10^{-4} \text{ Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $4,0 \times 10^{-4} \text{ CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; $0,136 \text{ Cl}_2\text{Ca} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $0,5 \text{ Na}_2\text{HPO}_4$.

Las plántulas se cosecharon 13 días después de la siembra de las semillas. El día de la cosecha también se determinó el contenido relativo de agua (CRA) y el porcentaje de pérdida de electrolitos (PEE) y se tomaron las muestras necesarias para el resto de las determinaciones. Las plántulas 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 de cuatro plántulas seleccionadas al azar se secaron individualmente en estufa a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta peso constante para determinar el peso seco (PS). Las muestras restantes se congelaron en N líquido y se mantuvieron a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

5. 5. 2. 1. Determinación de contenido relativo de agua (CRA).

Con el objetivo de evaluar el efecto de la solución de incubación y del pre-tratamiento sobre el estado hídrico de las plántulas se determinó el CRA. El día de la cosecha se cortaron 3 círculos de la última hoja totalmente expandida de cada planta, se tomó el peso fresco (PF) y, a continuación, 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 contenido CRA se calculó mediante la siguiente fórmula:

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

5. 5. 2 .2. Estimación de la 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 y radiculares, según una adaptación del método de Wang y Huang (2004). El día de la cosecha se seleccionaron al azar cuatro plántulas por tratamiento, se dividió la parte aérea de la radicular, se realizaron tres enjuagues sucesivos con agua destilada y se sumergieron en tubos 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. 5. 2. 3. Determinación del contenido de Na⁺ y K⁺.

La extracción se realizó a partir de tejido seco. Las muestras de tejido aéreo y radicular (10 mg) finamente molidas se colocaron en microtubos (1,5 ml) y se añadió 1 ml de HCl 0,1 N. Los microtubos se agitaron 30 s en vórtex, luego se sumergieron en un baño térmico a 60 °C durante 2 h, se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente y se centrifugaron a 10.000 g durante 5 minutos. Las concentraciones de Na⁺ y K⁺ del líquido sobrenadante se determinaron

en un Fotómetro de llama (Marca Zeltec, Modelo ZF 250). Los valores obtenidos se interpolaron en una curva de calibración.

Las curvas de calibración se confeccionaron con al menos 4 puntos dentro del intervalo de concentraciones probables de encontrar en las muestras. En primer lugar se hizo pasar por el fotómetro de llama una muestra de agua destilada, se corroboró el cero de absorbancia del diluyente y luego se determinó los valores de las soluciones estándar de concentración conocida, desde la más diluida a la más concentrada. La preparación de las soluciones estándar (1000 ppm) requiere la mayor exactitud posible principalmente en el proceso de pesado, por lo que es necesario secar las sales en estufa antes de pesarlas.

5. 5. 2. 4. Determinación del contenido de malondialdehído foliar.

El nivel de peroxidación lipídica en las hojas se estimó en términos del contenido de MDA, un producto de la peroxidación de los lípidos, mediante el método de Heath y Packer (1968). Una muestra de hoja fresca (0,1 g) se homogeinizó en 2 ml de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% y el homogeinado se centrifugó a 10000 g por 15 min. A una alícuota de 1,0 ml del sobrenadante se le agregaron 4,0 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,1% en 20% de TCA. La mezcla se calentó a 95 °C durante 30 m y se enfrió rápidamente en baño de hielo. Con el objeto de eliminar la turbidez de la emulsión obtenida, nuevamente se centrifugó a 10000 g durante 10 minutos. La absorbancia del sobrenadante se midió a 532 nm y se le restó el valor de la absorción no específica a 600 nm. El contenido de MDA se calculó usando la siguiente fórmula y se expresó como nmol de MDA g⁻¹ de peso fresco.

$$\frac{\text{nmol de MDA}}{\text{g PF}} = \frac{(A_{535} - A_{600}) \times \text{mmol}}{1,56 \times 10^5 \text{ ml}} * \frac{10^6 \text{ nmol} \times 1 \text{ ml}}{1 \text{ mmol } 0,1 \text{ gPF}}$$

5. 6. Experimento 3. Efecto del *piming* (pre-tratamiento) en agua y diferentes soluciones de reguladores del crecimiento vegetal sobre la germinación de semillas de *P. virgatum* bajo condiciones de salinidad y alcalinidad.

Con el objetivo de evaluar el efecto del pre-tratamiento con reguladores del crecimiento vegetal y las condiciones de incubación sobre la germinación de semillas de *P. virgatum* L. cv. Shawnee se realizó un diseño factorial completamente aleatorizado con cuatro repeticiones de 40 semillas cada una. Los factores evaluados fueron once pre-tratamientos x siete soluciones de incubación. Los pre-tratamientos consistieron en la imbibición de las semillas, previamente desinfectadas (procedimiento descrito en el ítem 5. 5. 1.), durante 24 h a temperatura ambiente ($23,53 \pm 0,71$ °C), oscuridad y agitación constante en agua o diferentes soluciones de ácido giberélico (mM) 0,15 (GA₃-0,15), 0,3 (GA₃-0,3), 0,6 (GA₃-0,6) y 1,2 (GA₃-1,2); ácido salicílico (mM) 0,1 (AS-0,1), 0,5 (AS-0,5) y 1 (AS-1) y cinetina (6-furfurylamino purine) (mM) 0,25 (CIN-0,25) y 0,5 (CIN-0,5) a razón de 100 ml de solución cada 4 g de semillas. Luego se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se colocaron sobre papel absorbente para su secado al aire bajo campana de flujo laminar, a temperatura ambiente. Una vez secas se conservaron en bolsas de polietileno cerradas en heladera (5 - 8 °C) durante 9 días hasta su utilización. Para cada uno de los tres compuestos se prepararon soluciones madres 2 mM. El pH se ajustó a 6,5 en todos los casos. Las soluciones de pre-tratamiento se prepararon por dilución en agua destilada de las respectivas soluciones madre y se almacenaron en heladera hasta su utilización. Las semillas del tratamiento control no recibieron ningún pre-tratamiento. La incubación se realizó en cámara de germinación durante 18 días con temperaturas diurnas de 27 ± 1 y nocturnas de 23 ± 1 °C. Las semillas se incubaron en agua (control) y en soluciones de tres concentraciones de sales de Na⁺ (50, 25 y 100 mM) neutras (NaCl - Na₂SO₄) o alcalinas (NaHCO₃ - Na₂CO₃) en proporción 9:1 (pH 6,4 y 9,3, respectivamente) (Tabla II). Los soluciones

resultantes fueron agua (control); 25mM-pH6,4; 25mM-pH9,3; 50mM-6,4; 50mM-pH9,3; 100mM-pH6,4 y 100mM-pH9,3.

A los 18 días desde el comienzo de la imbibición, las semillas no germinadas de todos los tratamientos se incubaron en agua durante 7 días y diariamente se registró el número de semillas germinadas. La G en agua se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

G en agua (%): Número de semillas germinadas en agua destilada / (Semillas totales - semillas infectadas).

5. 7. Análisis estadístico

Los datos se analizaron con el programa Infostat (Di Renzo *et al.*, 2016). Las medias se compararon mediante el análisis de la varianza (ANVA) ($\alpha = 0,05$), cuando éste detectó diferencias significativas las mismas se separaron entre tratamientos mediante el test de LSD de Fisher ($p \leq 0,5$). Para todas las mediciones se presenta la media y el error estándar (Media \pm EE) de cuatro repeticiones.

6. RESULTADOS

6. 1. Experimento 1. Efectos de la salinidad y la alcalinidad sobre la germinación de semillas de *C. gayana* y *P. virgatum*.

No se detectaron diferencias significativas entre la relación 1:1 y 9:1 de sales neutras (NaCl – Na₂SO₄) para ninguna de las concentraciones salinas evaluadas (25 y 100 mM) (Tabla III). Por lo tanto, ambas relaciones se analizaron como un solo tratamiento dentro de cada concentración salina, *i.e.* 25mM-pH6,4 y 100mM-pH6,4, respectivamente. En consecuencia los tratamientos resultantes fueron 25mM-pH6,4 (control); 25mM-pH9,3; 25mM-pH10; 100mM-pH6,4; 100mM-pH9,3; 100mM-pH10.

Tabla III. Valores p del análisis de varianza (ANVA) de la germinación acumulada, expresada como porcentaje de la germinación en agua (GR), del tiempo al 50 % de la germinación (T₅₀) y de la velocidad de germinación (VG) para las relaciones 1:1 y 9:1 de sales de Na⁺ neutras (25 y 100 mM).

Fuente de variación	Grados de libertad	p		
		GR	VG	T ₅₀
25mM-pH6,3 1:1/9:1	1	0,153	0,672	0,969
100mM-pH6,3 1:1/9:1	1	0,821	0,627	0,229

Todos los factores, *i.e.* especie, concentración y pH, y su interacción tuvieron un efecto significativo sobre la G ($p < 0,0001$).

Niveles bajos de salinidad (25 mM), independientemente del pH, y niveles moderados de salinidad (100 mM) y pH neutro no modificaron la de *P. virgatum* respecto al control (25mM-pH6,4). Los valores de GR de *C. gayana* de todos los tratamientos se diferenciaron significativamente respecto al control (25mM-pH6,4). Sin embargo, la reducción de la GR de las semillas incubadas en 25 mM-pH9,3; 25mM-pH10 y 100mM-pH6,4 respecto al control fue en

todos los casos menor al 15% (Figura 1). La combinación de niveles moderados de salinidad y pH alcalino (9,3 y 10) afectó significativamente la GR de ambas especies respecto al control. La GR de las semillas de *C. gayana* incubadas en 100mM-pH9,3 fue 5,4 veces superior a la de *P. virgatum* en ese tratamiento (Figura 1).

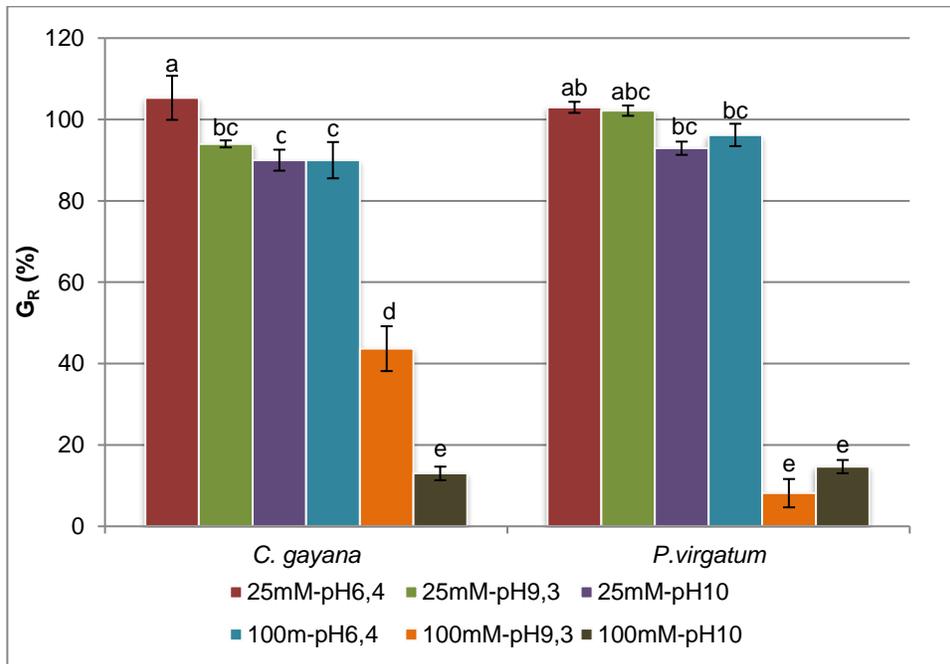


Figura 1. Germinación acumulada, expresada como porcentaje de la germinación en agua (GR), de semillas de *C. gayana* y *P. virgatum* incubadas en soluciones con diferentes niveles salinidad y pH. Barras = error estándar de la media. Letras distintas indican diferencia significativa según el test LSD ($p \leq 0,05$).

Todos los factores, *i.e.* especie, concentración salina y pH, y su interacción tuvieron un efecto significativo sobre el T_{50} ($p < 0.0001$).

El T_{50} de *C. gayana* fue significativamente menor que el de *P. virgatum* para todos los niveles de salinidad y alcalinidad (Figura 2).

Todos los tratamientos, excepto 25mM-pH9,3, indujeron el incremento del T_{50} de las semillas de *P. virgatum* en relación al control. El incremento del pH dentro de un mismo nivel de salinidad indujo el incremento del T_{50} de las semillas de *P. virgatum* pero no de las de *C. gayana*. La incubación en 100 mM de sales de Na^+ neutras o alcalinas aumentó significativamente los valores de T_{50} de ambas especies respecto del control. La combinación de salinidad 100 mM y pH 9,3 y 10 indujo el incremento del T_{50} de *P. virgatum* 4,2 y 4,08 veces en relación al control, respectivamente. Dicho aumento fue menos marcado en *C. gayana*, cuyo T_{50} se incrementó sólo 1,4 y 1,6 veces en las soluciones 100mM-9,3 y 100mM-pH10, en relación al control, respectivamente (Figuras 2 y 3).

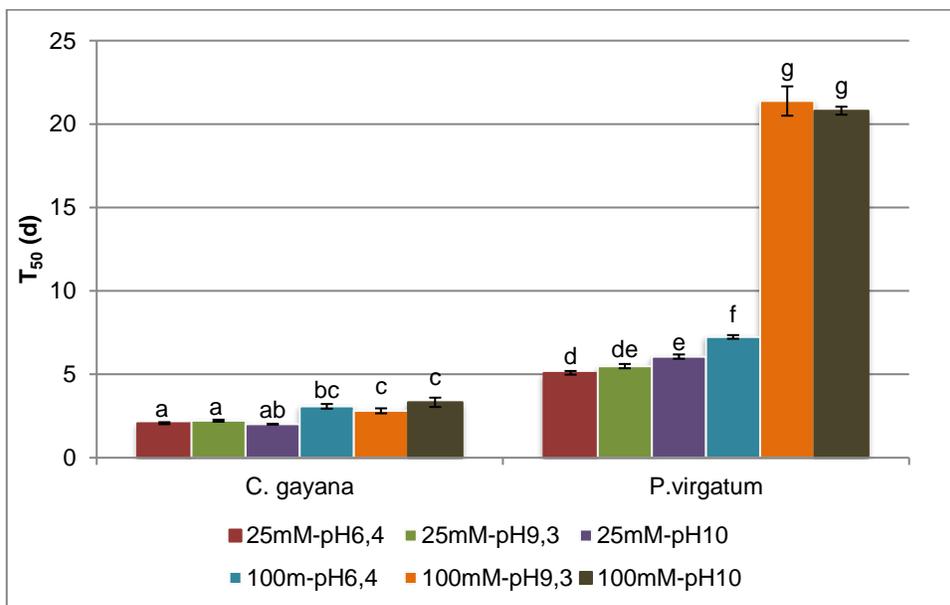


Figura 2. Efectos de diferentes niveles de sales de Na^+ y pH sobre el tiempo al 50 % de germinación (T_{50}) de semillas de *C. gayana* y *P. virgatum*. Barras = error estándar de la media. Letras distintas indican diferencia significativa según el test LSD ($p \leq 0,05$).

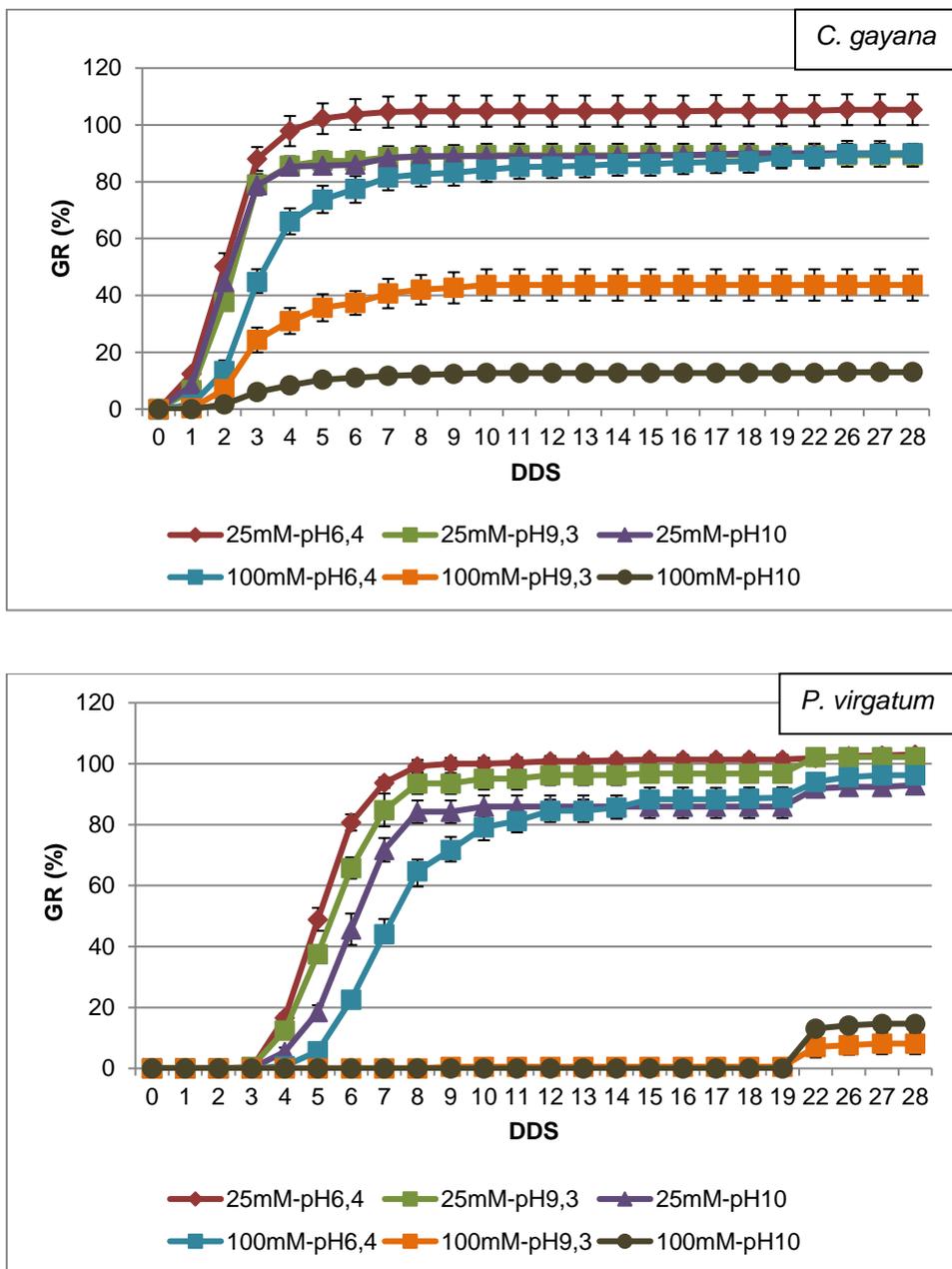


Figura 3. Efectos de diferentes niveles de salinidad y pH sobre la evolución diaria de la germinación expresada como porcentaje de la germinación en agua (GR), de semillas de *C. gayana* y *P. virgatum*. DDS = días después de la siembra. Barras = error estándar de la media.

Los tres factores, *i.e.* especie, concentración salina y pH, tuvieron un efecto significativo sobre la VG; y sólo la interacción entre pares de factores fue significativa (Tabla IV). La VG de *C. gayana* superó significativamente a la de *P. virgatum* en todas las condiciones de incubación evaluadas. Cada incremento de la concentración salina y del pH redujo la VG respecto del control. El aumento de la salinidad (de 25mM-pH6,4 a 100mM-pH6,4) y del pH (de 25mM-pH6,4 a 25mM-pH9,3) indujeron reducciones de la VG de 41,45 % y 14,10 %, respectivamente. En cambio, el aumento de ambos factores en forma conjunta (de 25mM-pH6,4 a 100mM-pH9,3) redujo la VG un 79,6 %. El incremento del pH de 6,4 a 10 afectó la VG en función del nivel de salinidad considerado. En salinidad baja el incremento del pH redujo la VG sólo un 18 % mientras que en presencia de salinidad moderada la reducción de la VG fue casi del 90 % (Figura 4).

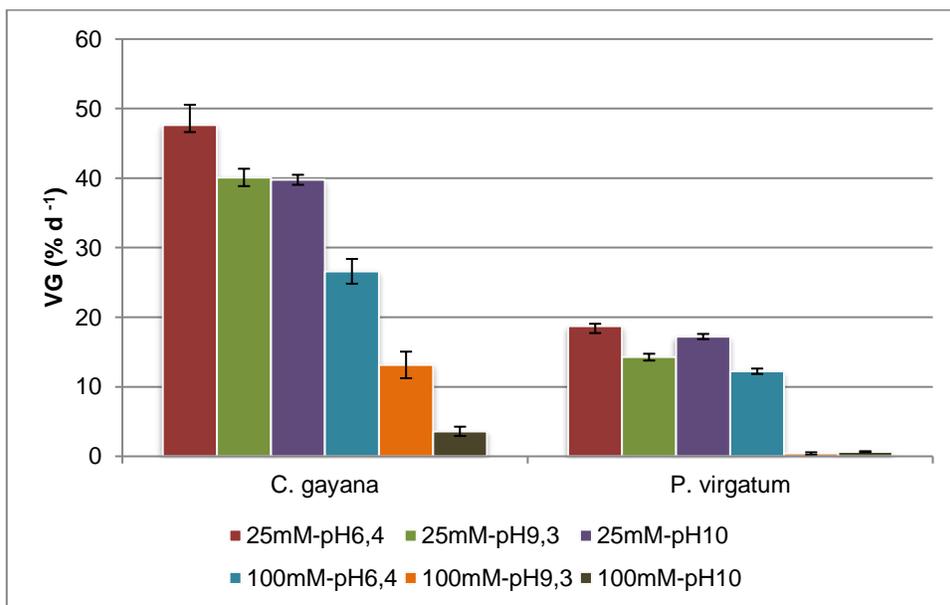


Figura 4. Efectos de diferentes niveles de sales de Na⁺ y pH sobre la velocidad de germinación (VG) de semillas de *C. gayana* y *P. virgatum*. Barras = error estándar de la media.

Tabla IV. Efecto de la concentración de sales de Na⁺, el pH, la especie y sus respectivas interacciones sobre la velocidad de germinación (VG) de semillas de *C. gayana* y *P. virgatum*.

Letras distintas en la columna indican diferencia significativa según el test LSD ($p \leq 0,05$).

Fuente de variación	Grados de libertad	p
Salinidad	1	< 0,0001
pH	2	< 0,0001
Especie	1	< 0,0001
Salinidad*pH	2	< 0,0001
Salinidad*Especie	1	< 0,0001
pH*Especie	2	0,009
Salinidad*pH*Especie	2	0,054
Error	52	

Especie	VG (% d ⁻¹)	
	Sal (mM)	
	25	100
<i>C. gayana</i>	43,77 ± 1,76 a	17,48 ± 2,69 b
<i>P. virgatum</i>	17,23 ± 0,52 b	6,38 ± 1,52 c

pH	VG (% d ⁻¹)	
	Sal (mM)	
	25	100
6,4	33,17 ± 3,99 a	19,42 ± 2,05 c
9,3	28,49 ± 4,28 b	6,77 ± 2,57 d
10	27,18 ± 4,92 b	2,12 ± 0,64 e

pH	VG (% d ⁻¹)	
	Especie	
	<i>C. gayana</i>	<i>P. virgatum</i>
6,4	37,11 ± 3,18 a	15,47 ± 0,87 d
9,3	26,45 ± 5,12 b	8,81 ± 3,19 e
10	21,85 ± 6,93 c	7,46 ± 2,58 e

6. 2. Experimento 2. Efecto del pre-tratamiento en soluciones de KCl sobre la germinación y crecimiento inicial de plántulas de *P. virgatum* bajo estrés salino y alcalino.

6. 2. 1. Germinación

De los dos factores evaluados, pre-tratamiento y solución de incubación, sólo este último tuvo un efecto significativo sobre la G de semillas de *P. virgatum* ($p = 0,256$ y $p < 0,0001$, respectivamente).

Los valores de G de las semillas incubadas en 25mM-pH6,4 y 25mM-pH9,3 fueron similares a los del control (incubación en agua). El incremento de la salinidad de 25mM-pH6,4 a 100mM-pH6,4 redujo la G sólo un 6,44 % respecto al control. En cambio, el incremento de la salinidad y el pH en forma conjunta (100mM-pH9,3) inhibió casi totalmente la G (Figura 5).

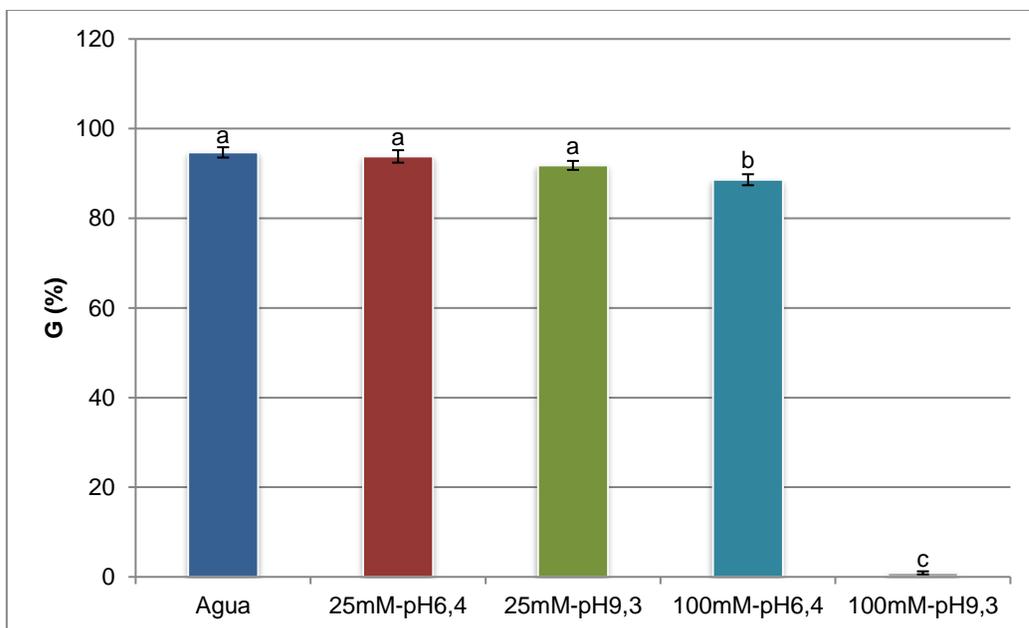


Figura 5. Efectos de diferentes niveles de salinidad y pH sobre la germinación acumulada (G) de semillas de *P. virgatum*. Barras = error estándar de la media. Letras distintas indican diferencia significativa según el test LSD ($p \leq 0,05$).

Ambos factores, pre-tratamiento y solución de incubación, tuvieron un efecto significativo sobre el T_{50} ($p < 0,0001$). La interacción entre estos factores no fue significativa ($p = 0,19$) (Tabla V). El T_{50} de las semillas incubadas en 25mM-pH6,4 fue similar al control. El aumento del pH de 6,4 a 9,3 en presencia de 25 mM de sales de Na^+ indujo un incremento del T_{50} del 8,45 %. El incremento de la concentración salina de 25 a 100 mM indujo un aumento del T_{50} del 57,74 %. La baja germinación de las semillas incubadas en 100mM-pH9,3 no permitió calcular el T_{50} (Figura 6).

Todas las soluciones de pre-tratamiento evaluadas indujeron una disminución significativa del T_{50} respecto del control sin pre-tratar. El pre-tratamiento en agua fue el más efectivo, indujo una reducción del T_{50} del 23,5 % respecto al control (Figura 6).

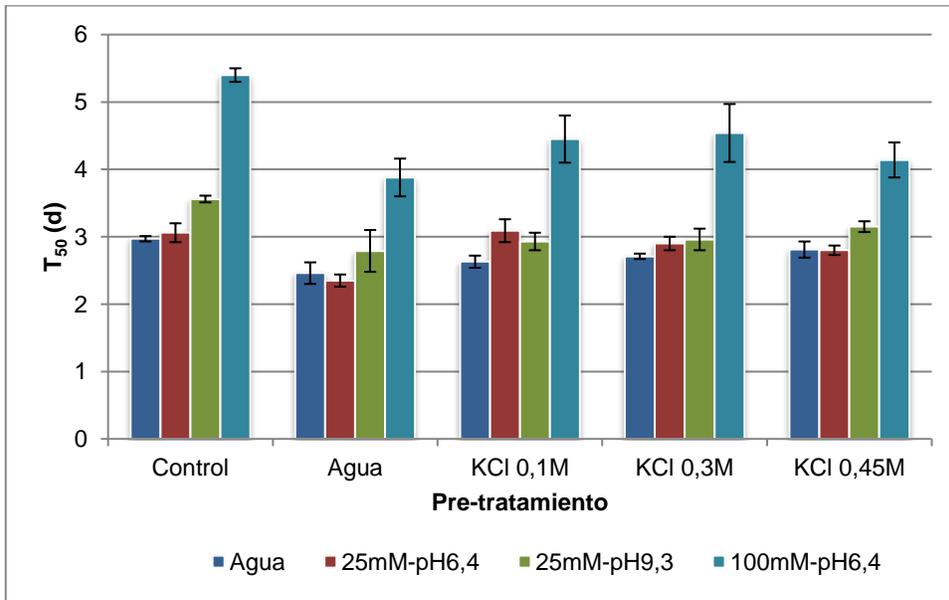


Figura 6. Efectos del pre-tratamiento con soluciones de KCl y la incubación en soluciones con diferentes niveles de salinidad y pH sobre el tiempo al 50% de la germinación (T_{50}) de semillas de *P. virgatum*. Barras = error estándar de la media.

Tabla V. Efecto del pre-tratamiento, la solución de incubación y su interacción sobre el tiempo al 50% de la germinación (T_{50}) de semillas de *P. virgatum*. Letras distintas en la columna indican diferencia significativa según el test LSD ($p \leq 0,05$).

Fuente de variación	Grados de libertad	p
Pre-tratamiento	4	< 0,0001
Sn de incubación	3	< 0,0001
Pre-tratamiento*Sn de incubación	12	0,19
Error	60	

Pre-tratamiento	T_{50} (d)
Control	3,75 ± 0,26 c
Agua	2,87 ± 0,19 a
KCl 0,1 M	3,27 ± 0,20 b
KCl 0,3 M	3,28 ± 0,22 b
KCl 0,45 M	3,23 ± 0,16 b

Sn de incubación	T_{50} (d)
Agua	2,72 ± 0,06 a
25mM-pH6,4	2,84 ± 0,08 ab
25mM-pH9,3	3,08 ± 0,09 b
100mM-pH6,4	4.48 ± 0,17 c

Ambos factores, incubación y pre-tratamiento, y su interacción tuvieron un efecto significativo sobre la VG ($p < 0,0001$). La VG de las semillas sin pre-tratar e incubadas en 25mM-pH6,4 y 25mM-pH9,3 fueron similares al control en agua. La incubación en 100mM-pH6,4 redujo la VG en promedio un 30 % respecto del control, mientras que la combinación de salinidad moderada y pH alcalino inhibió completamente la germinación.

El pre-tratamiento con soluciones de KCl incrementó la VG de semillas incubadas en todas las niveles de salinidad y pH, sin embargo ninguna concentración de KCl superó significativamente al pre-tratamiento en agua (Figura 7).

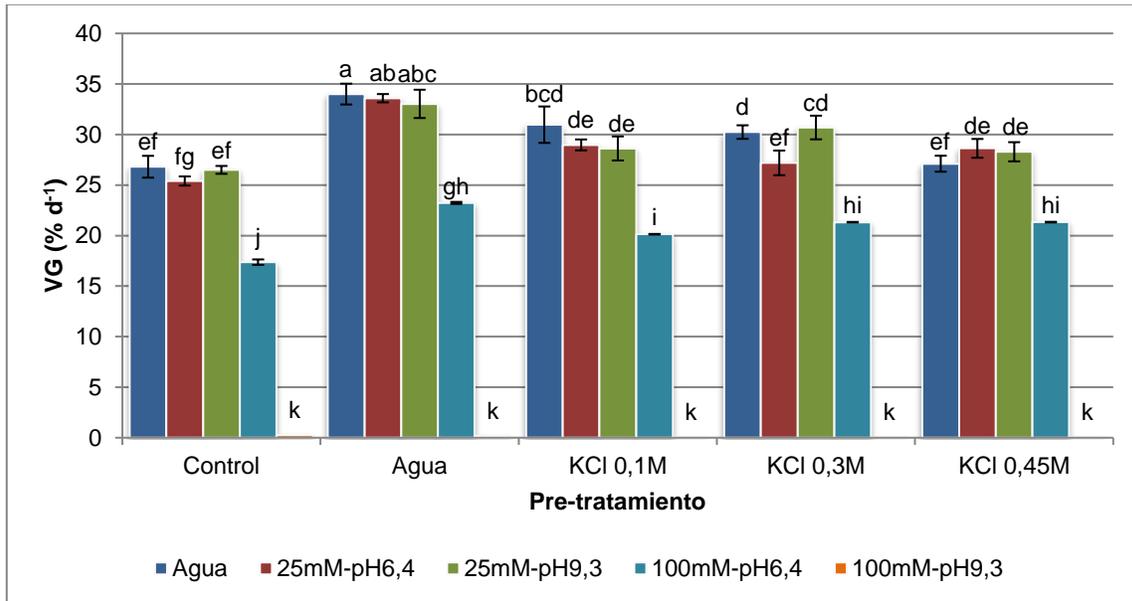


Figura 7. Efectos del pre-tratamiento con soluciones de KCl y la incubación en soluciones con diferentes niveles de salinidad y pH sobre la velocidad de germinación (VG) de semillas de *P. virgatum*. Barras = error estándar de la media. Letras distintas indican diferencia significativa según el test LSD ($p \leq 0,05$).

6. 2. 2. CRA, crecimiento y estabilidad de las membranas celulares de las plántulas

La incubación en solución 100mM-pH9,3 inhibió fuertemente la germinación, por lo que no se disponen de datos en plántulas correspondientes a dicho tratamiento.

De los dos factores evaluados, pre-tratamiento y solución de incubación, solo este último tuvo un efecto significativo sobre el CRA ($p = 0,668$ y $p = 0,005$). El CRA (media \pm EEM) de las plántulas cultivadas en 25mM-pH6,4 y 25mM-pH9,3 fue similar al de las cultivadas en la

solución control ($85,34 \pm 1,64$; $90,42 \pm 1,26$; $87,27 \pm 0,96$, respectivamente). Sólo se observó una leve disminución del CRA (5,85%) en las plántulas que se cultivaron en presencia de 100 mM-pH6,4, en relación al control (Figura 8).

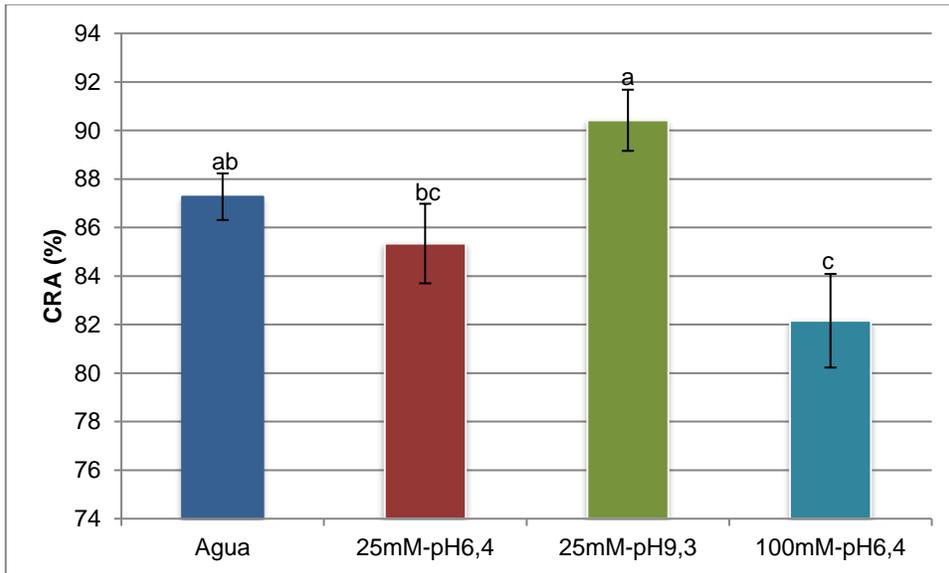


Figura 8. Efectos de diferentes niveles de salinidad y pH de la solución de cultivo sobre el contenido relativo de agua (CRA) en plántulas de *P. virgatum*. Barras = error estándar de la media. Letras distintas indican diferencia significativa según el test LSD ($p \leq 0,05$).

Tanto el pre-tratamiento como la solución de incubación afectaron significativamente el PSv y el PSr. La interacción entre los factores no fue significativa (Tabla VI). El PSr fue más sensible al incremento del pH de 6,4 a 9,3 que el PSv. El aumento de la concentración salina de 25 a 100 mM redujo significativamente el PSv ($5,91 \pm 0,26$) y el PSr ($1,1 \pm 0,05$), en relación al control respectivo ($7,87 \pm 0,23$; $2,17 \pm 0,05$). El pre-tratamiento tuvo un efecto positivo sobre el PSv y el PSr. Los pre-tratamientos con soluciones de KCl (0,1; 0,3 y 0,45 M) indujeron un incremento significativo del PSv ($7,77 \pm 0,27$; $7,62 \pm 0,26$; $7,66 \pm 0,24$) y del PSr ($1,75 \pm 0,11$;

1,75 ± 0,11; 1,78 ± 0,1) respecto al control (6,64 ± 0,33; 1,56 ± 0,10). El pre-tratamiento en agua (7,42 ± 0,27) indujo un incremento significativo sólo del PSv, respecto al control (Figura 9).

Tabla VI. Efecto del pre-tratamiento, la solución de incubación y su interacción sobre el peso seco del vástago (PSv) y de la raíz (PSr) de plántulas de *P. virgatum*. Letras distintas en la columna indican diferencia significativa según el test LSD ($p \leq 0,05$).

Fuente de variación	Grados de libertad	p	
		PSv	PSr
Pre-tratamiento	4	0,004	< 0,0001
Sn de incubación	3	< 0,0001	< 0,0001
Pre-tratamiento*Sn de incubación	12	0,87	0,32
Error	136		

Pre-tratamiento	PSr (g)	PSv (g)
Control	1,56 ± 0,1 b	6,64 ± 0,33 b
Agua	1,67 ± 0,11 ab	7,42 ± 0,27 a
KCl 0,1 M	1,75 ± 0,11 a	7,77 ± 0,27 a
KCl 0,3 M	1,75 ± 0,05 a	7,62 ± 0,26 a
KCl 0,45 M	1,78 ± 0,11 a	7,66 ± 0,24 a
Sn de Incubación	PSr (g)	PSv (g)
Agua	2,17 ± 0,05 a	7,87 ± 0,23 a
25mM-pH6,4	2,19 ± 0,06 a	7,78 ± 0,17 a
25mM-pH9,3	1,28 ± 0,05 b	8 ± 0,19 b
100mM-pH6,4	1,1 ± 0,05 c	5,91 ± 0,26 a

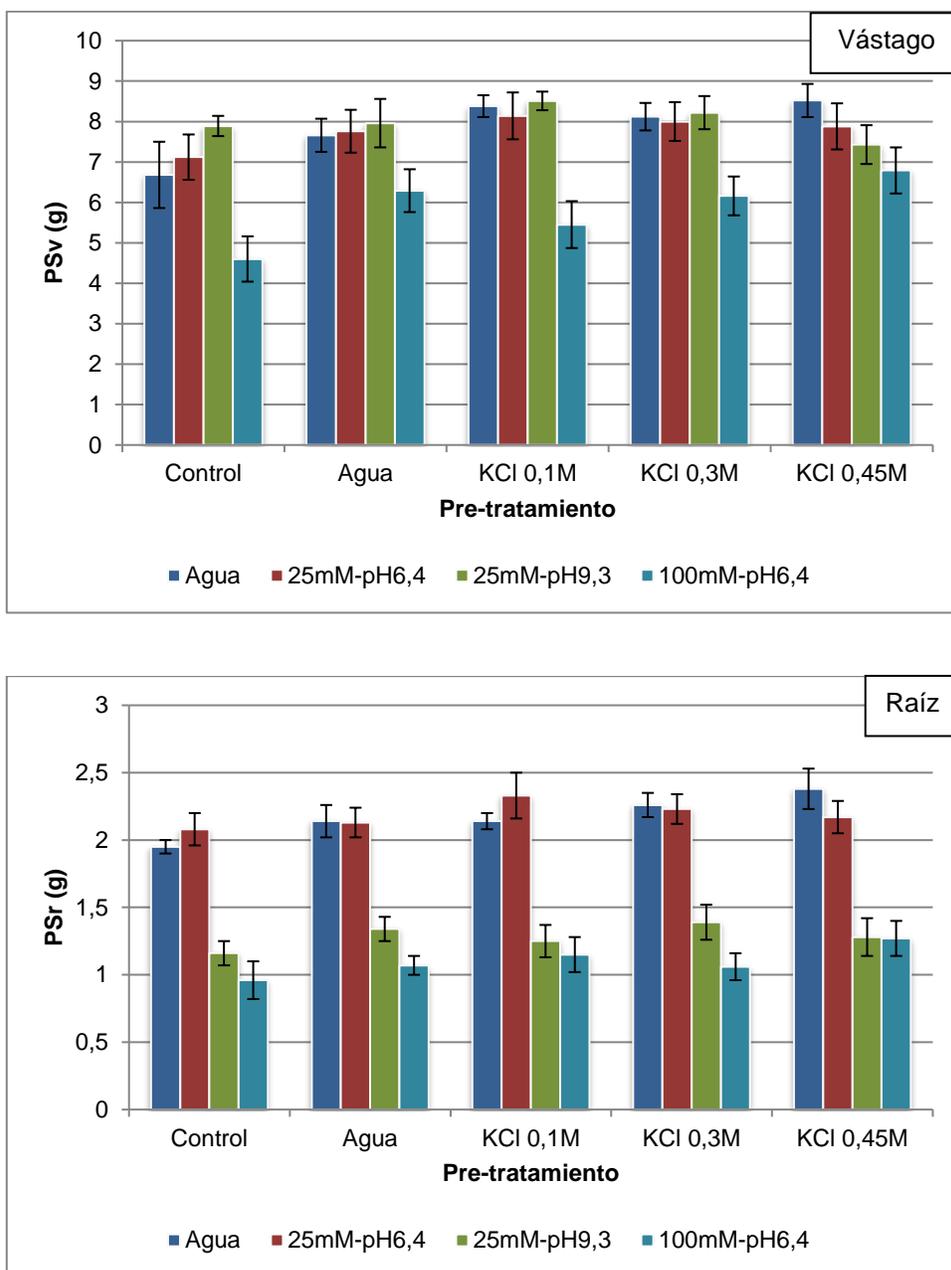
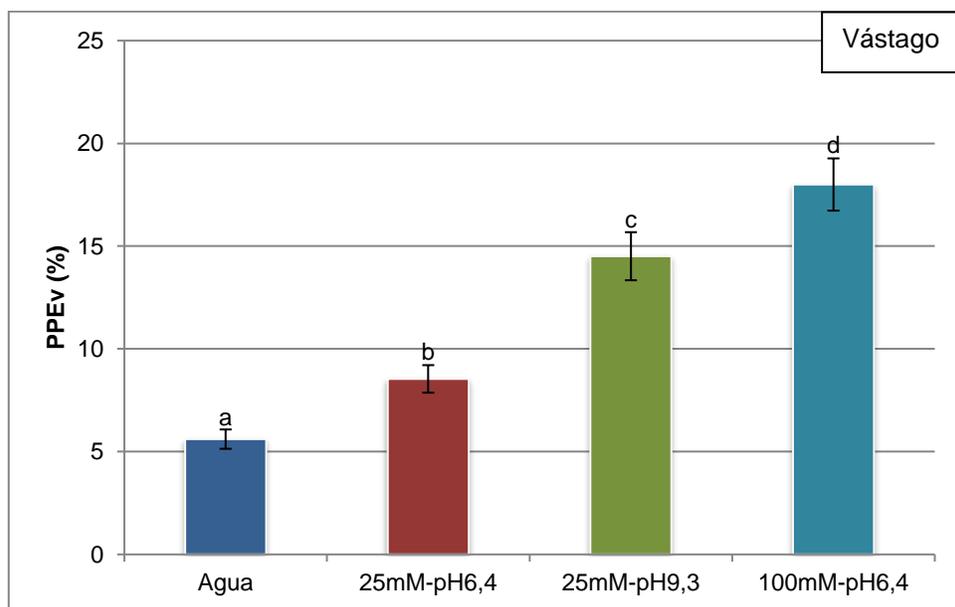


Figura 9. Efectos del pre-tratamiento con soluciones de KCl y la incubación en soluciones con diferentes niveles de salinidad y pH sobre el peso seco del vástago (PSv) y la raíz (PSr) de plántulas de *P. virgatum*. Barras = error estándar de la media.

La estabilidad de las membranas celulares del vástago y de las raíces, expresada como el PPE, fue afectada por la solución de incubación ($p < 0,0001$), no así por los pre-tratamientos ($p = 0,07$). Cada incremento del nivel de salinidad y de pH indujo incrementos del PPE del vástago (PPEv) y de la raíz (PPEr). El incremento de la salinidad de la solución de incubación de 25 a 100 mM afectó más el PPEv y el PPEr respecto al control, que el incremento del pH de 6,4 a 9,3 (3,16 y 2,54; 1,92 y 2,32 veces más, respectivamente) (Figura 10).

Ninguno de los factores evaluados afectó el contenido de MDA de los tejidos foliares.



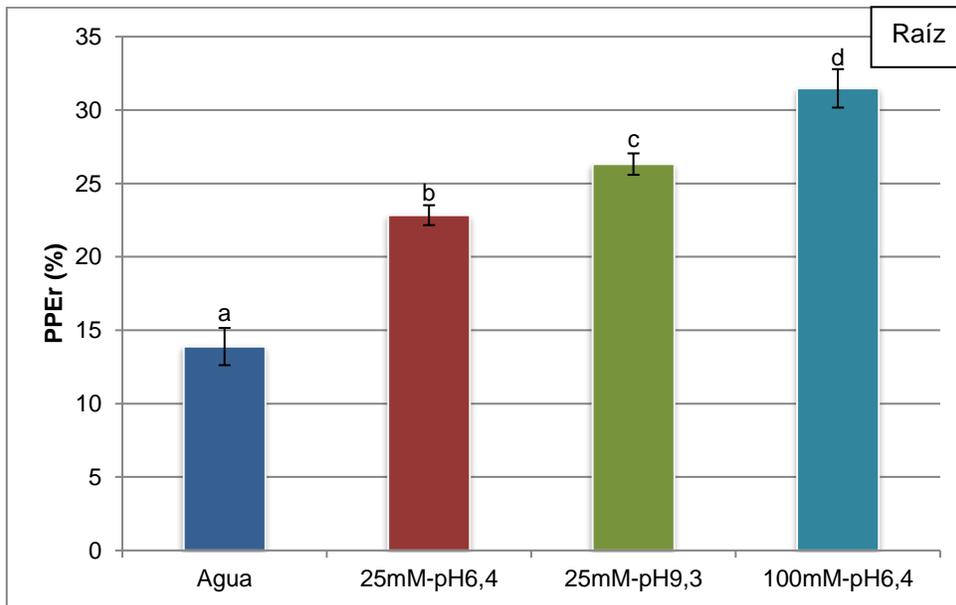


Figura 10. Efectos de diferentes niveles de salinidad y pH sobre el porcentaje de pérdida de electrolitos del vástago (PPEv) y de la raíz (PPEr) de plántulas de *P. virgatum*. Barras = error estándar de la media. Letras distintas indican diferencia significativa según el test LSD ($p \leq 0,05$).

Ambos factores, el pre-tratamiento y la solución de incubación, y su interacción afectaron significativamente el contenido de Na^+ del vástago (Tabla VII). Cada incremento de la salinidad ó del pH indujo incrementos significativos del contenido de Na^+ del vástago de las plántulas de semillas sin pre-tratar ó pre-tratadas en agua, KCl 0,1 M ó KCl 0,3 M. Las plántulas de semillas pre-tratadas en KCl 0,45 M sólo mostraron incrementos del contenido de Na^+ del vástago ante incrementos de la salinidad. El incremento del nivel de salinidad de 25 mM a 100 mM provocó, en todos los casos, incrementos mayores del contenido de Na^+ que el incremento del pH de 6,4 a 9,3. El pre-tratamiento no afectó el contenido de Na^+ del vástago de las plántulas cultivadas en la solución control ó 25mM-pH6,4. En cambio, el contenido de Na^+ del vástago de las plántulas cultivadas en 25mM-pH9,3 y pre-tratadas con KCl 0,45 M fue 1,63 veces menor en

relación al control (sin pre-tratamiento). Todos pre-tratamientos de las semillas evaluados indujeron una disminución del contenido de Na^+ del vástago de las plántulas cultivadas en salinidad (100mM-pH6,4) con respecto al control (sin pre-tratamiento de la semilla), sin embargo el pre-tratamiento en la solución de KCl 0,45 M fue el más efectivo (Figura 11).

Solamente la solución de incubación afectó el contenido de Na^+ de la raíz (Tabla VII). Todas las soluciones de incubación evaluadas indujeron incrementos significativos del contenido de Na^+ de la raíz respecto al control. El cultivo de las plántulas en soluciones 100 mM de sales de Na^+ neutras o 25 mM de sales de Na^+ alcalinas provocó incrementos similares en el contenido de Na^+ de la raíz (Figura 11).

Tabla VII. Efecto del pre-tratamiento, la solución de incubación y su interacción sobre el contenido de Na^+ , K^+ y relación K^+/Na^+ del vástago y de la raíz de plántulas de *P. virgatum*. Letras distintas en la columna significa diferencia significativa según el test LSD ($p \leq 0,05$).

Fuente de variación	Grados de libertad	p					
		Na^+ del vástago	Na^+ de la raíz	K^+ del vástago	K^+ de la raíz	K^+/Na^+ vástago	K^+/Na^+ Raíz
Pre-tratamiento	4	< 0,0001	0,545	0,108	0,039	0,439	0,486
Sn de incubación	3	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Pre-tratamiento*Sn de incubación	12	< 0,0001	0,095	0,049	0,537	0,537	0,598
Error	56						

Sn de incubación	Concentración de cationes (mmol g^{-1} PS)			K^+/Na^+	
	K^+ del vástago	K^+ de la raíz	Na^+ de la raíz	Vástago	Raíz
Agua	1508 \pm 54 a	1618 \pm 123 a	332 \pm 48 a	33.61 \pm 3.01 a	5.73 \pm 0.57 a
25mM-pH6,4	1213 \pm 36 b	969 \pm 61 b	1683 \pm 72 b	2.78 \pm 0.14 b	0.58 \pm 0.04 b
25mM-pH9,3	445 \pm 18 d	551 \pm 18 d	2731 \pm 135 c	0.63 \pm 0.03 b	0.21 \pm 0.01 b
100mM-pH6,4	877 \pm 51 c	764 \pm 43 c	2927 \pm 90 c	0.69 \pm 0.03 b	0.26 \pm 0.01 b

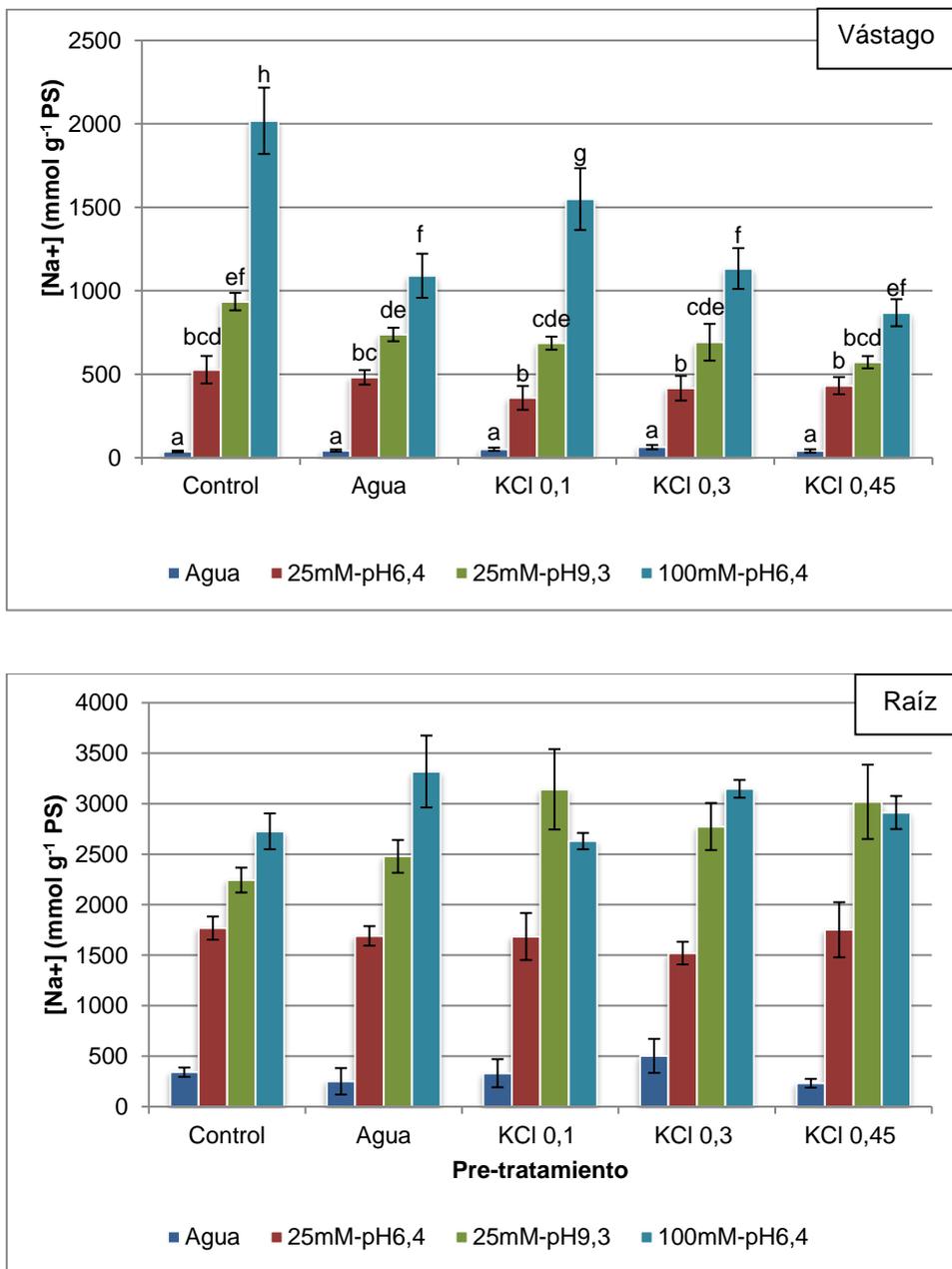
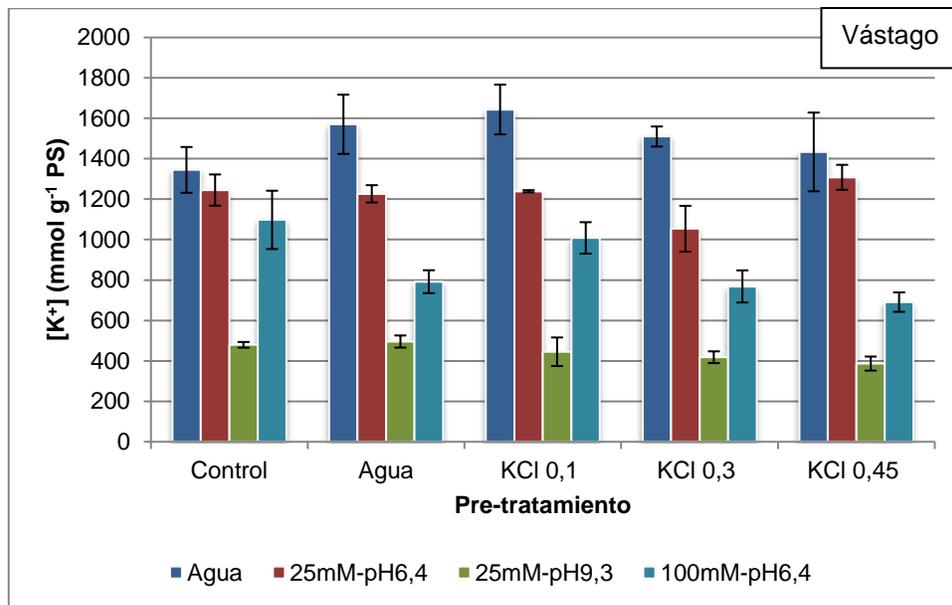


Figura 11. Efectos del pre-tratamiento con soluciones de KCl y la incubación en soluciones con diferentes niveles de salinidad y pH sobre el contenido de Na⁺ del vástago y de la raíz de plántulas de *P. virgatum*. Barras = error estándar de la media. Letras distintas indican diferencia significativa según el test LSD ($p \leq 0,05$).

Ambos factores, pre-tratamiento y solución de incubación, tuvieron un efecto significativo sobre el contenido de K^+ de la raíz ($p = 0,039$ y $p < 0,0001$), y no se detectó interacción entre ellos (Tabla VII). El contenido de K^+ de la raíz se redujo con incrementos de la concentración salina y del pH. Ningún pre-tratamiento incrementó el contenido de K^+ respecto al control (Figura 12).

El incremento del pH de 6,4 a 9,3 en presencia de 25 mM de sales de Na^+ produjo una disminución más marcada en el contenido de K^+ del vástago y de la raíz que el incremento de la salinidad de 25 a 100 mM. La reducción del contenido de K^+ de la raíz fue mayor que el incremento del contenido de Na^+ de la misma en relación al control en todas las soluciones de cultivo evaluadas (Figuras 11 y 12).

Solamente el factor solución de incubación afectó el resto de los parámetros, *i.e.* contenido de K^+ del vástago y relación K^+/Na^+ del vástago y de la raíz (Tabla VII).



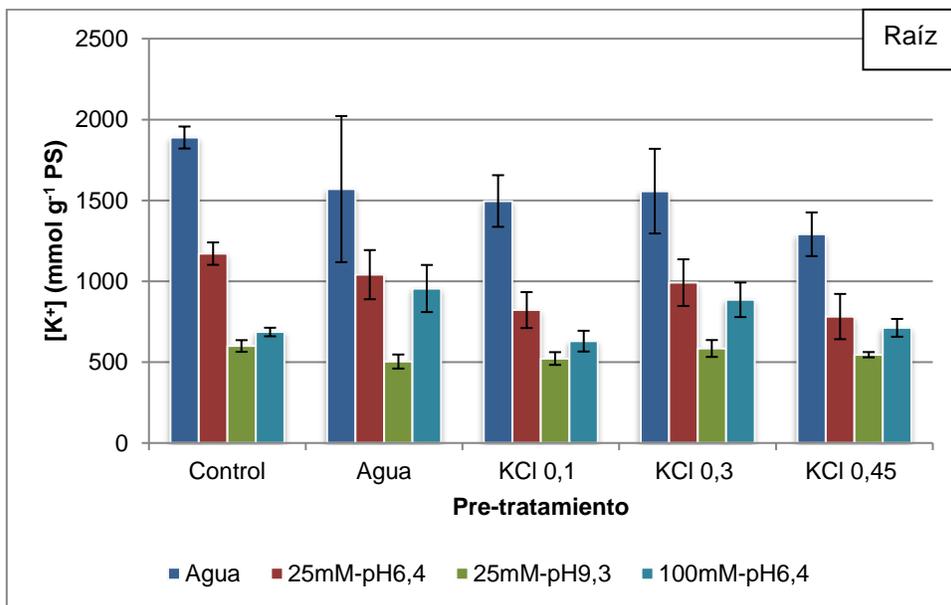


Figura 12. Efectos del pre-tratamiento con soluciones de KCl y la incubación en soluciones con diferentes niveles de salinidad y pH sobre el contenido de K^+ del vástago y de la raíz de plántulas de *P. virgatum*. Barras = error estándar de la media.

Todas las soluciones de incubación evaluadas provocaron una reducción similar de la relación K^+/Na^+ del vástago y la raíz en relación al control. En cada tratamiento, la relación K^+/Na^+ del vástago fue superior a la de la raíz (Figura 13).

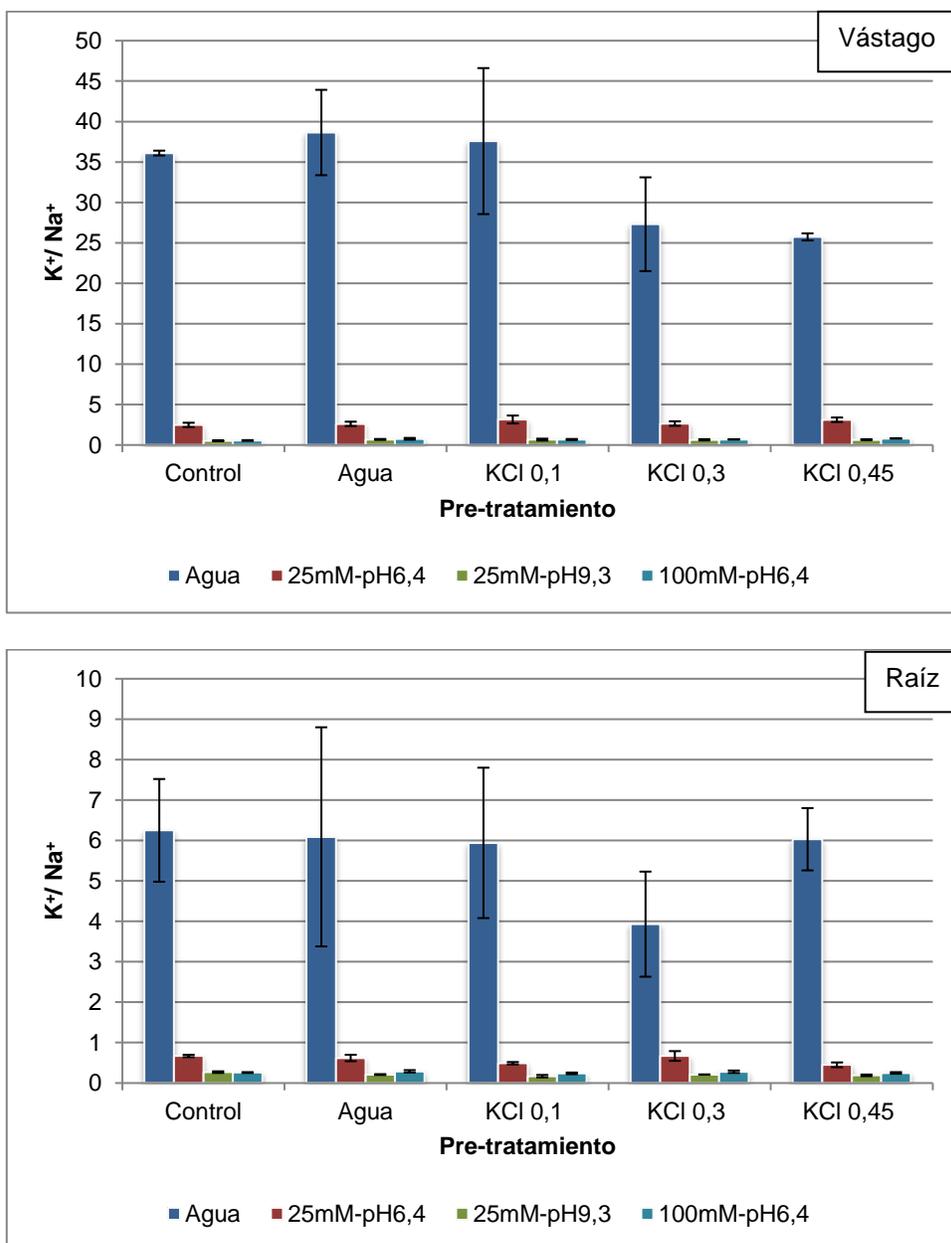


Figura 13. Efectos del pre-tratamiento con soluciones de KCl y la incubación en soluciones con diferentes niveles de salinidad y pH sobre la relación K^+/Na^+ del vástago y de la raíz de plántulas de *P. virgatum*. Barras = error estándar de la media.

6. 3. Experimento 3. Efecto del pre-tratamiento en agua y en soluciones de diferentes hormonas vegetales sobre la germinación de semillas de *P. virgatum* bajo estrés salino y alcalino.

Ambos factores, *i.e.* pre-tratamiento de las semillas y solución de incubación, y su interacción tuvieron un efecto significativo sobre la G, VG y T_{50} (Tabla VIII). Considerando la existencia de interacción entre ambos factores para todas las variables evaluadas, se analizó el efecto del pre-tratamiento dentro de cada solución de incubación y el efecto de la solución de incubación dentro de cada pre-tratamiento.

Tabla VIII. Análisis de la varianza (ANVA) del efecto del pre-tratamiento y la incubación para la germinación acumulada (G), tiempo al 50 % de la germinación (T_{50}) y velocidad de germinación (VG).

Fuente de variación	p		
	G	T_{50}	VG
Pre-tratamiento	0,0159	< 0,0001	< 0,0001
Sn de Incubación	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Pre-tratamiento*Sn de Incubación	0,0019	< 0,0001	< 0,0001

Los valores de G de los tratamientos 25mM-pH6,4, 25mM-pH9,3 y 50mM-pH6,4 fueron similares al control, independientemente del pre-tratamiento aplicado. Los valores de G de las semillas incubadas en 100mM-pH6,4 fueron similares al control, sólo se redujeron en menos de un 12 % en las pre-tratadas en GA_3 -0,3 y GA_3 -0,6. La G de las semillas incubadas en 50mM-pH9,3 difirió significativamente del control para todos los pre-tratamientos evaluados ($p < 0,0001$). La incubación en 100mM-pH9,3 inhibió completamente la germinación, por lo tanto estos resultados no se incluyeron en el análisis estadístico.

Las respuestas del T_{50} y la VG a las distintas soluciones de incubación fue variable según el pre-tratamiento considerado y los datos no mostraron una tendencia clara (datos no mostrados). Sólo en el G de semillas incubadas en 50mM-pH9,3 el pre-tratamiento mostró un efecto significativo (Tabla IX). Las semillas pre-tratadas en agua y CIN-0,5 mostraron G menores que las no pre-tratadas (Figura 14). Además, en esta solución de incubación se observaron plántulas anormales (Peretti, 1994): elongación del coleóptile con retraso o ausencia de emergencia de radícula (Figura 15).

Tabla IX. Análisis de la varianza (ANVA) del efecto del pre-tratamiento dentro de cada tratamiento de incubación para la germinación acumulada (G), tiempo al 50 % de la germinación (T_{50}) y velocidad de germinación (VG) dentro de cada nivel de salinidad y pH.

Sn de Incubación	Grados de libertad	p		
		G	T_{50}	VG
Agua	10	0,727	< 0,0001	0,0005
25mM-pH6,4	10	0,6994	< 0,0001	0,001
25mM-pH9,3	10	0,3182	< 0,0001	< 0,0001
50mM-pH6,4	10	0,5841	0,06	0,021
50mM-pH9,3	10	0,023	0,0121	0,042
100mM-pH6,4	10	0,7819	< 0,0001	0,058

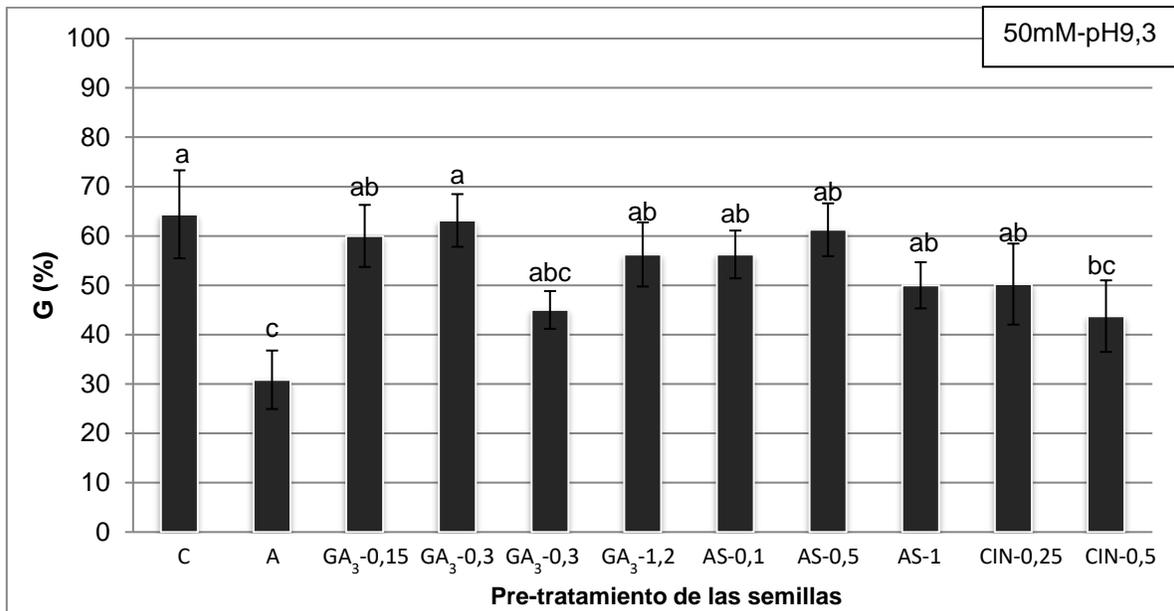


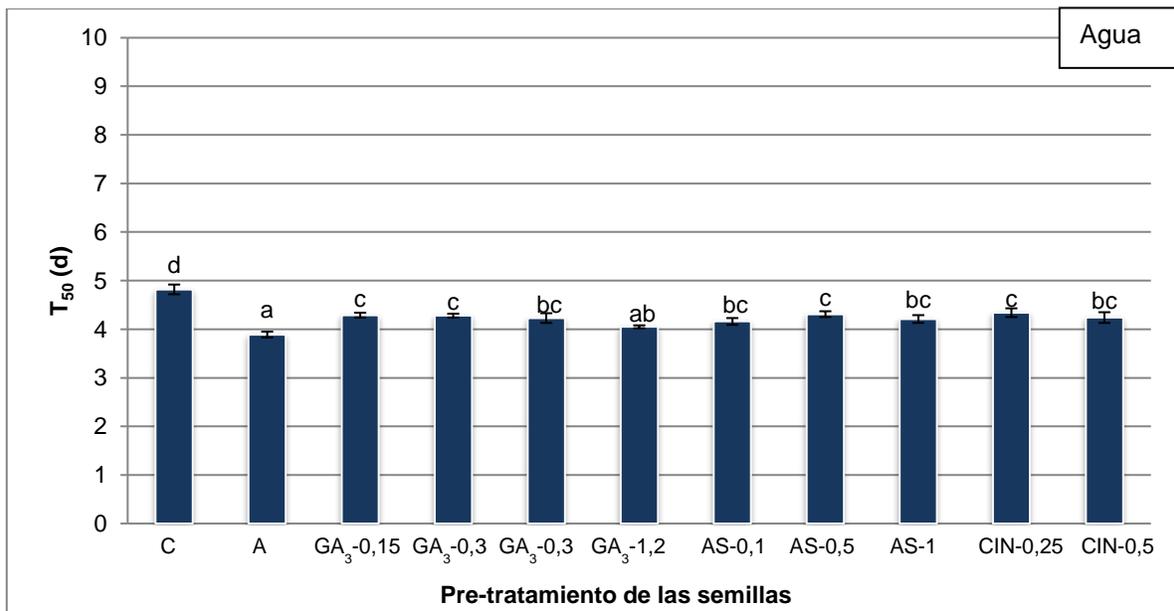
Figura 14. Efectos de diferentes pre-tratamientos: sin pre-tratamiento (C); agua (A), soluciones de ácido giberélico (AG₃, mM) 0,15; 0,3; 0,6 y 1,2 mM; ácido salicílico (AS, mM) 0,1; 0,5 y 1 y cinetina (CIN, mM) 0,25 y 0,5 sobre la germinación acumulada (G) de semillas de *P. virgatum* incubadas en 50mM-pH9,3. Barras = error estándar de la media. Letras distintas indican diferencia significativa según el test LSD ($p \leq 0,05$).

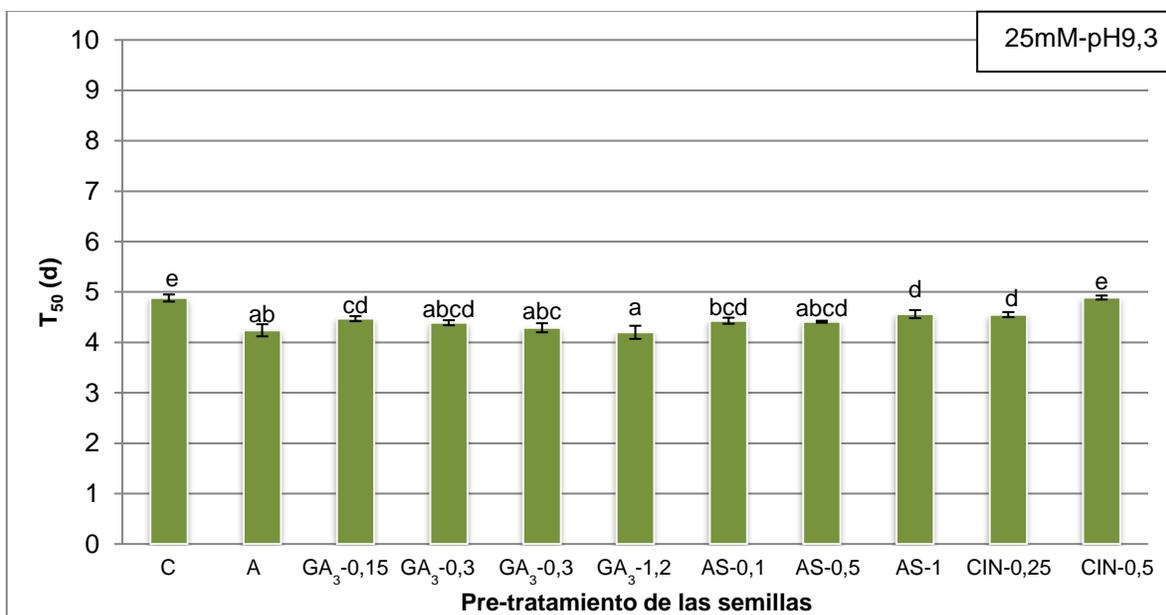
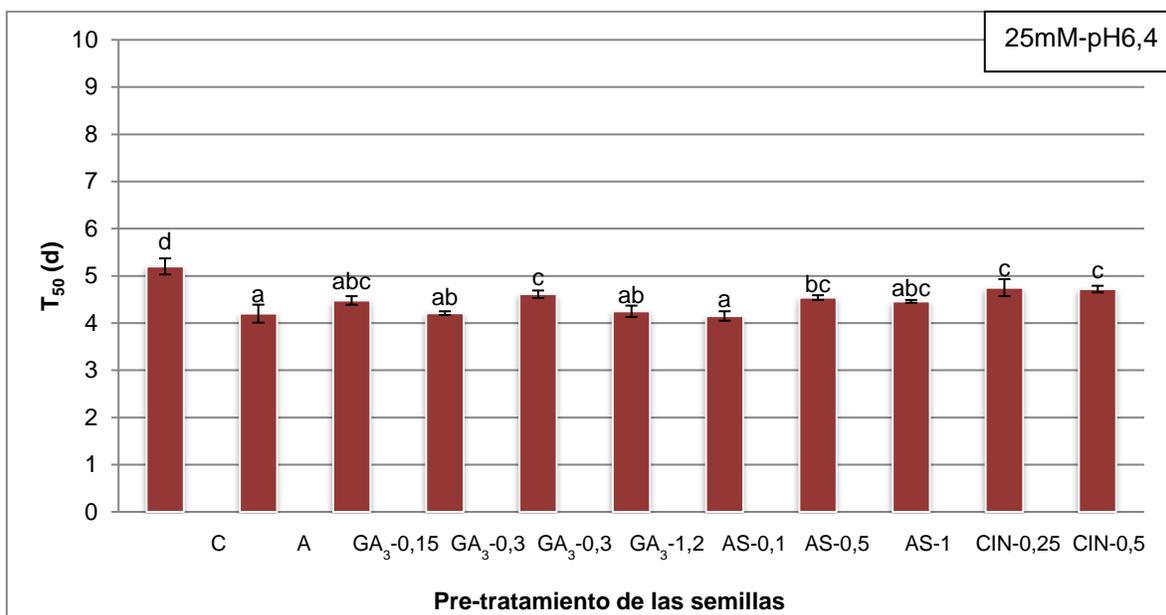


Figura 15. Plántulas anormales de *P. virgatum* incubadas en 50mM-pH9,3.

El pre-tratamiento tuvo un efecto significativo sobre el T_{50} en todas las soluciones de incubación, excepto en 50mM-pH6,4 (Tabla IX).

Diferentes pre-tratamientos fueron efectivos en la reducción del T_{50} de las semillas incubadas en agua, 25mM-pH6,4 y 25mM-pH9,3 respecto del control sin pre-tratar. Sin embargo, ninguno de los reguladores del crecimiento vegetal evaluados redujo el T_{50} de las semillas respecto del pre-tratamiento en agua. Por su parte, el pre-tratamiento en agua incrementó significativamente el T_{50} de las semillas incubadas en 50mM-pH9,3, respecto al control sin pre-tratar. Si bien numerosos pre-tratamientos redujeron significativamente el T_{50} de semillas incubadas en 100mM-pH6,4 respecto del control, las semillas pre-tratadas con AS-0,1 y AS-0,5 se diferenciaron significativamente incluso respecto del pre-tratamiento en agua (Figura 16).





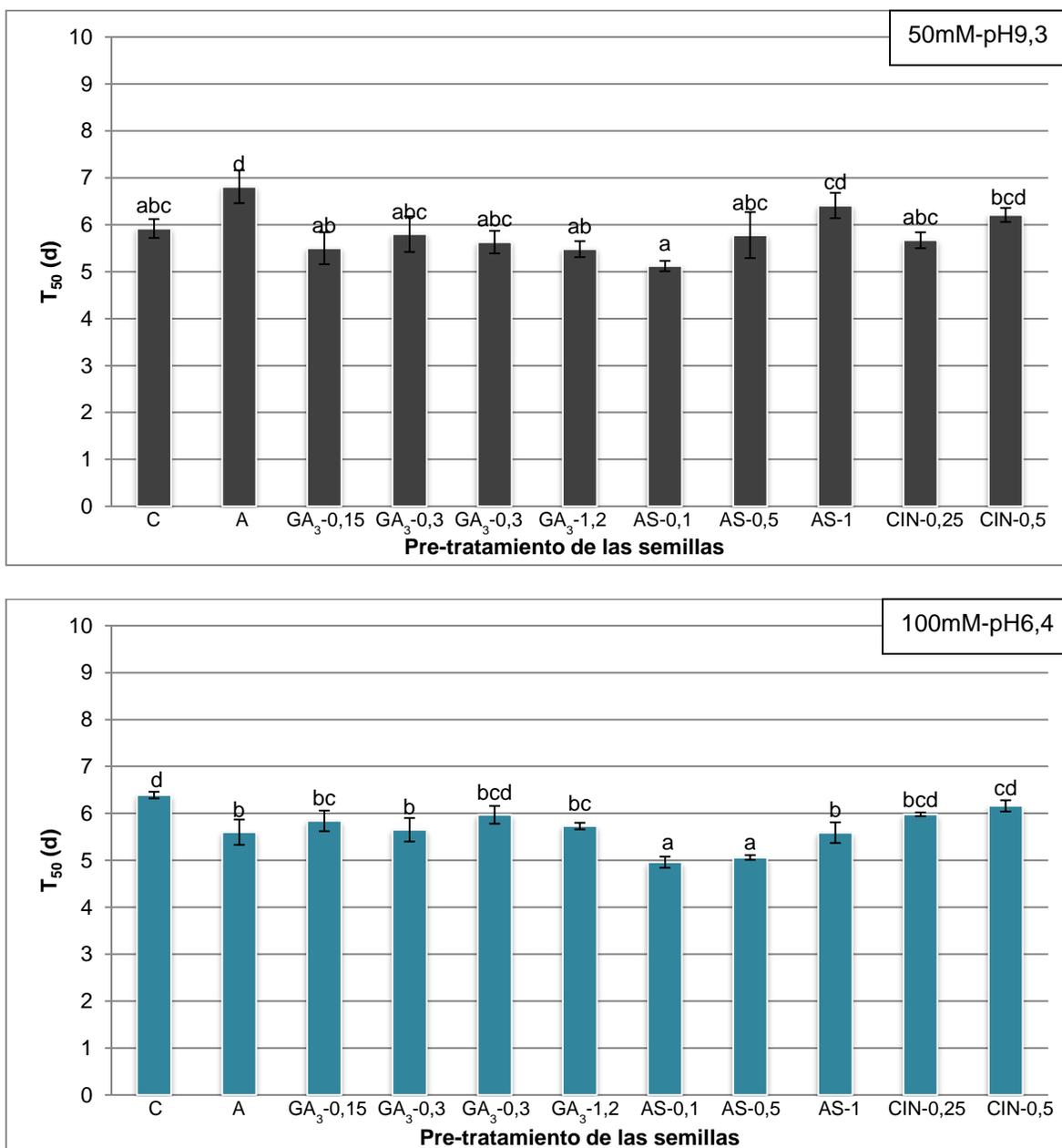
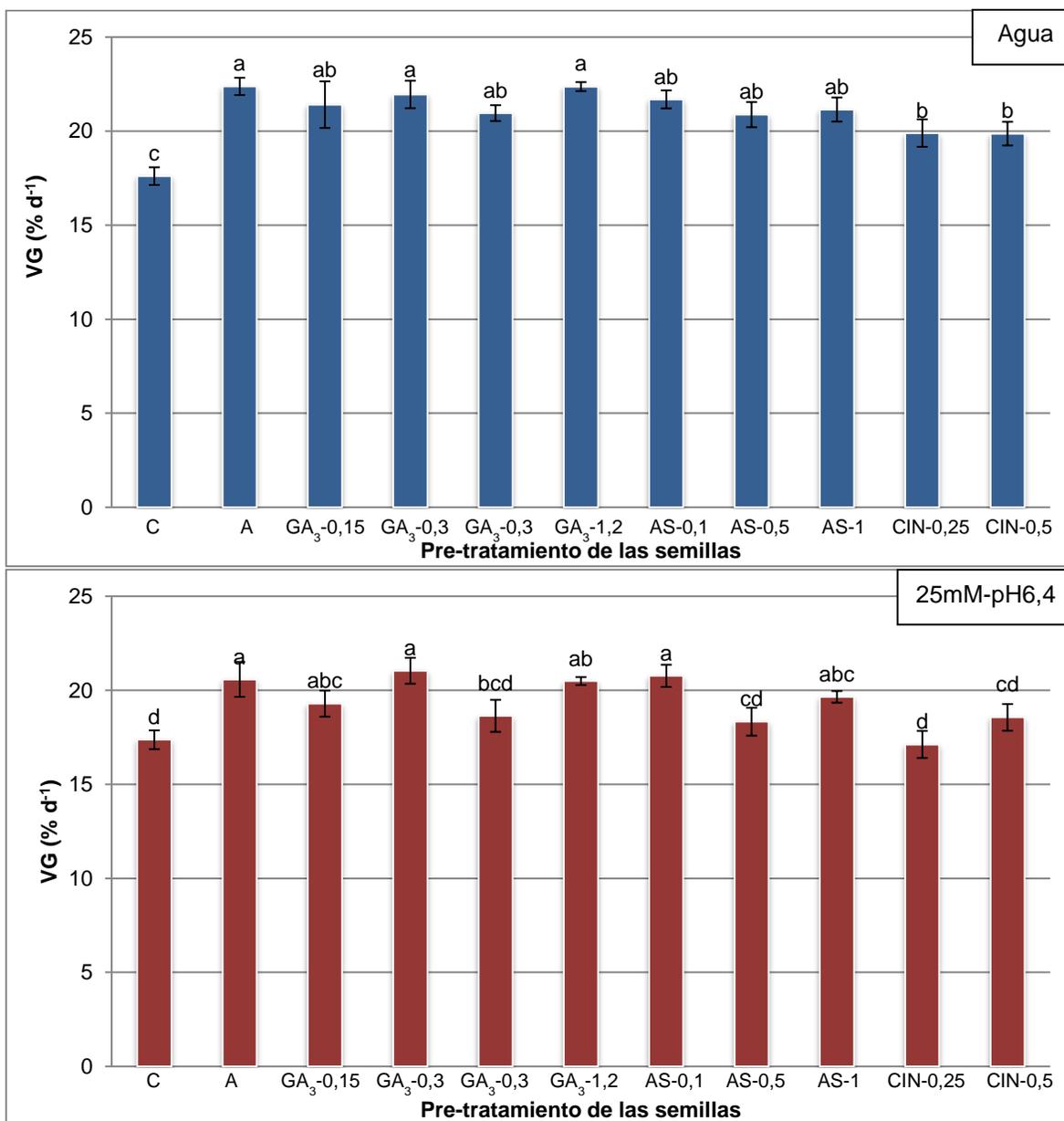


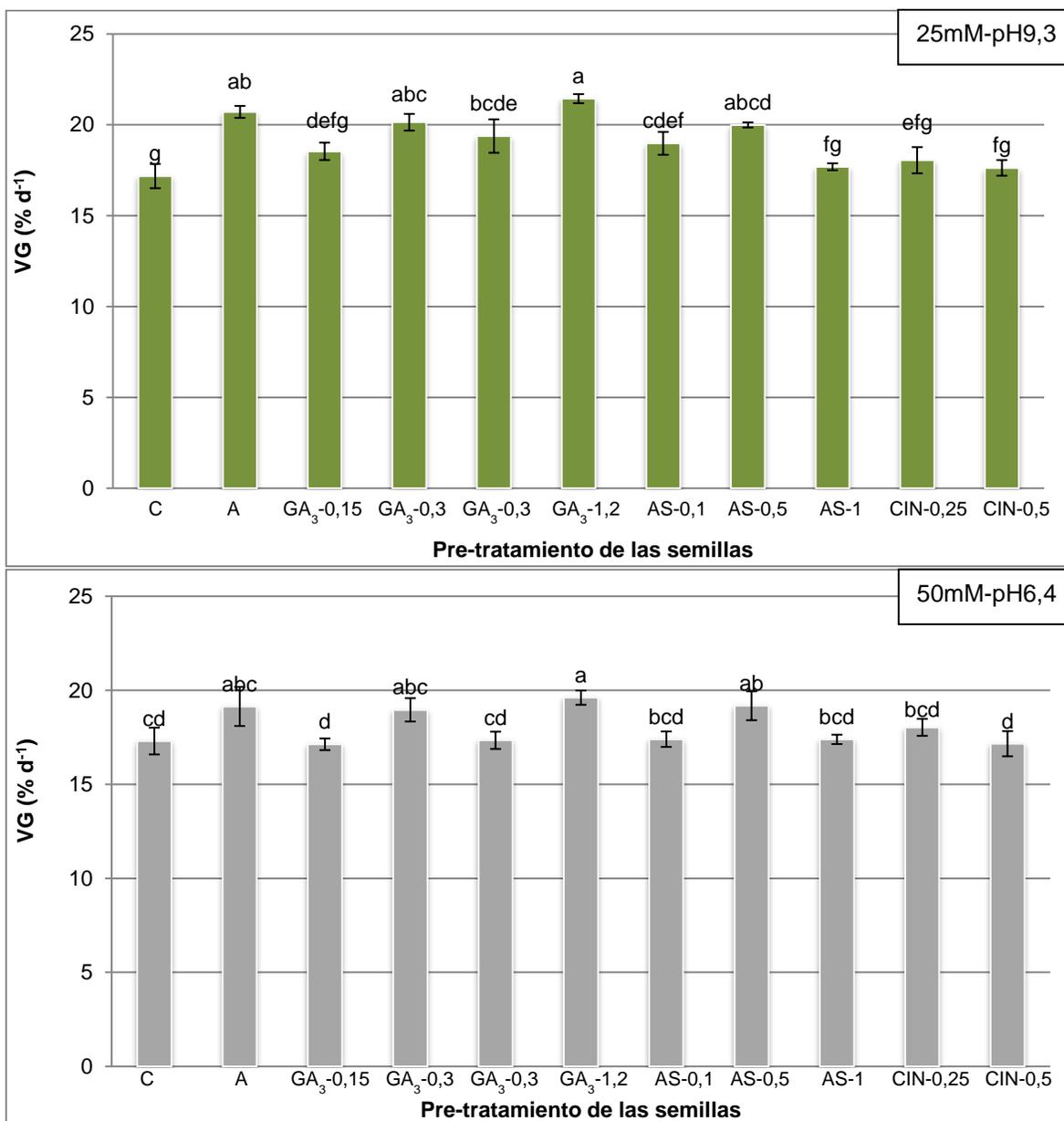
Figura 16. Efectos de diferentes pre-tratamientos: sin pre-tratamiento (C); agua (A), soluciones de ácido giberélico (AG₃, mM) 0,15; 0,3; 0,6 y 1,2 mM; ácido salicílico (AS, mM) 0,1; 0,5 y 1 y cinetina (CIN, mM) 0,25 y 0,5 sobre el tiempo al 50% de germinación (T₅₀) de semillas de *P. virgatum* incubadas en agua; 25mM-pH6,4; 25mM-pH9,3; 50mM-pH9,3 y 100mM-pH6,4. Barras

= error estándar de la media. Letras distintas indican diferencia significativa según el test LSD ($p \leq 0,05$).

El pre-tratamiento tuvo un efecto significativo sobre la VG en todas las soluciones de incubación, excepto en 100mM-pH6,4 (Tabla IX).

El pre-tratamiento de las semillas incubadas en agua, 25mM-pH6,4 y 25mM-pH9,3 con distintas concentraciones de GA₃ y AS, incrementaron la VG respecto del control, pero no en relación al pre-tratamiento en agua. El pre-tratamiento con GA₃-1,2 aumentó significativamente la VG respecto al control en las semillas incubadas en 50mM-pH6,4. El pre-tratamiento en agua redujo 2,2 veces la VG de las semillas incubadas en 50mM-pH9,3 respecto del control (Figura 17).





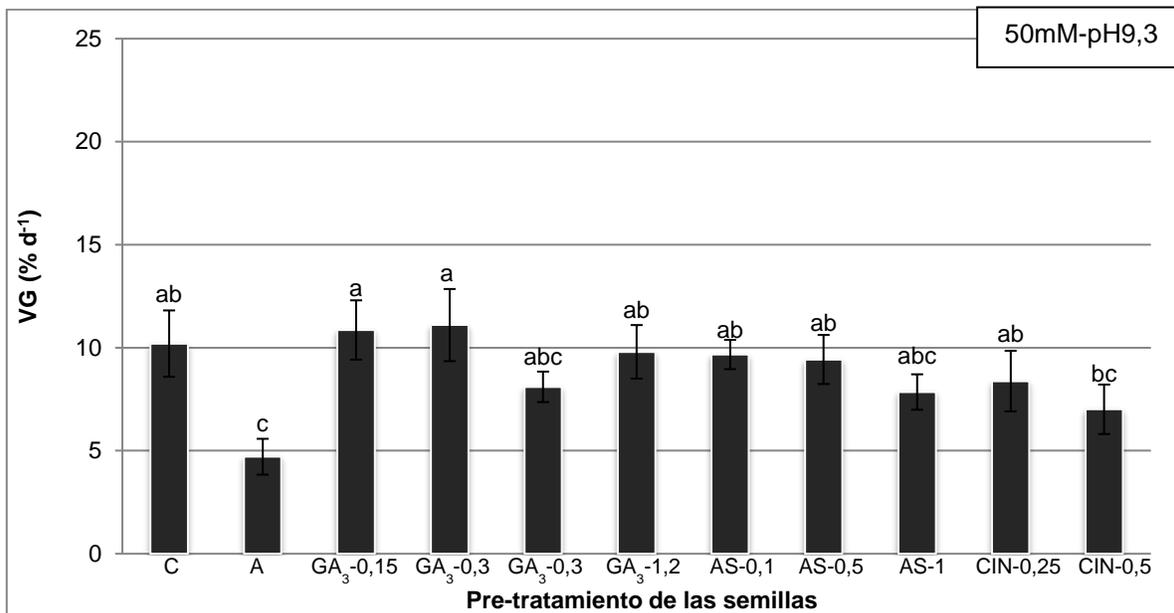


Figura 17. Efectos de diferentes pre-tratamientos: sin pre-tratamiento (C); agua (A), soluciones de ácido giberélico (AG₃, mM) 0,15; 0,3; 0,6 y 1,2 mM; ácido salicílico (AS, mM) 0,1; 0,5 y 1 y cinetina (CIN, mM) 0,25 y 0,5 sobre el tiempo al 50% de germinación (T₅₀) de semillas de *P. virgatum* incubadas en agua; 25mM-pH6,4; 25mM-pH9,3; 50mM-pH6,4 y 50mM-pH9,3. Barras = error estándar de la media. Letras distintas indican diferencia significativa según el test LSD ($p \leq 0,05$).

Transcurridos 18 días desde el comienzo de la imbibición, las semillas remanentes (no germinadas) de todos los tratamientos se transfirieron a incubación en agua durante 7 días. Las semillas incubadas inicialmente en 50mM-pH9,3 y 100mM-pH9,3, al ser incubadas en agua, no alcanzaron valores de germinación similares al control independientemente del pre-tratamiento. La G en agua de las semillas remanentes (media \pm EEM) fue de $1,11 \pm 0,27$ y $2,33 \pm 0,64$, respectivamente.

7. DISCUSIÓN

La solución edáfica de los suelos salino/ sódicos de la zona de la Cuenca del Salado muestran, en general, valores muy altos de pH (9 a 9,5) y moderados de CE_s (4 a 5 $dS\ m^{-1}$) (Myazinsky, 1995). Sin embargo la alternancia de períodos húmedos y secos, modifica el estado hídrico del suelo y en consecuencia la concentración salina del mismo. De este modo los valores de conductividad de la solución del suelo pueden ser mayores a los mencionados.

La germinación y el crecimiento inicial de las plántulas son estadios críticos en el desarrollo vegetal (Zhang, 2012; Khan *et al.*, 2009; Taghvaei *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2011; Tsegay y Gebreslassie, 2014). La implantación de pasturas de especies megatérmicas en suelos con problemas de halomorfismo desde la superficie suele ser errática y se han registrado numerosos casos de implantación fallida (Otondo, 2011; Grabiwsky *et al.*, 2002). Entre las principales limitantes para el logro de un stand adecuado de plantas se encuentran el alto porcentaje de semillas vanas, el bajo poder germinativo, la dormición de semillas y el bajo vigor de las plántulas. A ello se le suman las características propias del suelo (exceso o déficit de humedad, salinidad, alcalinidad y deficiencia de nutrientes), la preparación de la cama de siembra, el método y la profundidad de siembra, la competencia con otras especies, entre otros factores (Bandera *et al.*, 2012).

En presencia de niveles bajos de sales de Na^+ (25 mM), *C. gayana* muestra una rápida imbibición y germinación. Más del 80 % de las semillas germinaron dentro de los tres primeros días después de la siembra, en coincidencia con lo publicado por Taleisnik (1997). Por su parte, la presencia de cubiertas seminales gruesas en *P. virgatum* imponen una imbibición más lenta (Jensen y Boe, 1991; Tsegay y Grebeslassie, 2014) y en consecuencia un T_{50} mayor que el de *C. gayana*. En las condiciones de incubación control utilizadas en este estudio (25mM-pH6,4), las semillas de *C. gayana* y *P. virgatum* muestran valores de T_{50} de 2,07 y 5,09 días,

respectivamente. Esta ventaja de *C. gayana* sobre *P. virgatum* respecto del T_{50} se mantiene incluso bajo condiciones de estrés salino y alcalino. La incubación en 100mM-pH9,3 y 100mM-pH10 induce un incremento más marcado del T_{50} de *P. virgatum* (4,2 y 4,09 veces, respectivamente) que del T_{50} de *C. gayana* (1,36 y 1,60 veces, respectivamente), en relación a las semillas de cada especie incubadas en solución control.

Tanto *C. gayana* como *P. virgatum* presentan valores de germinación acumulada en relación a la germinación en agua superiores al 90 % en niveles bajos de salinidad (25 mM) independientemente del pH, y niveles moderados de salinidad (100 mM) y pH neutro. Estos resultados coinciden con los reportados por otros autores para *C. gayana* (Avaca *et al.*, 2015; Wehr *et al.*, 2016; García *et al.*, 2013) y *P. virgatum* (Liu *et al.*, 2014; Dan *et al.* 2010). Sin embargo, *C. gayana* presentó mayor tolerancia que *P. virgatum* a condiciones de salinidad moderada (100 mM) y alcalinidad (pH = 9,3) durante la etapa de germinación. La reducción del porcentaje de germinación en tales condiciones respecto del control fue de 58,54 % para el caso de *C. gayana* y de 92,09 % para *P. virgatum*.

A partir de la comparación de la germinación de semillas de *P. virgatum* incubadas en tres niveles de sales de Na^+ y pH neutro o alcalino, se observó que el incremento del pH afecta las variables relacionadas a la germinación en función del nivel de salinidad considerado. En presencia de 25 mM de sales de Na^+ , el incremento del pH no afecta la G, el T_{50} ni la VG. En cambio, el incremento del pH en presencia de 50 mM de sales de Na^+ reduce la G, VG e incrementa el T_{50} ; y en presencia de 100 mM de sales de Na^+ se inhibe completamente el proceso germinativo. Además, las reducciones de los valores de G y VG inducidas por la salinidad, alcalinidad y la combinación de ambos factores muestran que el efecto negativo generado por la incubación con sales alcalinas no se debe solamente a los efectos individuales de la salinidad y la alcalinidad, sino que existe un efecto sinérgico. Liu *et al* (2014) evaluaron el

efecto del estrés salino/ alcalino sobre la germinación y crecimiento inicial de plántulas de *P. virgatum* y observaron que la G fue superior al 80 % hasta niveles de salinidad de 60 Mm y pH= 7, a partir de allí, cada incremento de la salinidad y/o alcalinidad la redujo marcadamente. Estos autores observaron un efecto sinérgico del estrés salino/alcalino sobre el porcentaje de germinación, la longitud de la plúmula, el contenido de azúcares solubles, el contenido de MDA y prolina en las plántulas. El sinergismo de la salinidad/ alcalinidad sobre diferentes parámetros de crecimiento y desarrollo se halló en otras especies como trigo (Taleisnik *et al.*, 1997), alfalfa (Li *et al.*, 2010a), *Lathyrus quinquenervius* (Zhang y Chun-Sheng, 2009) y *Spartina alterniflora* (Li *et al.*, 2010b).

Una de las mayores limitantes para la adopción de *P. virgatum* como una alternativa en el planteo forrajero es su pobre establecimiento, afectado por el tamaño y la dormición de las semillas (Duclos *et al.*, 2013; Haynes *et al.*, 1997; Grabowski *et al.*, 2002; Checovich y Ruiz, 2012), el lento crecimiento de las plántulas (Madakadze *et al.*, 2010), la interacción entre la profundidad de siembra y el tipo de suelo (Berti y Johnson , 2013; Aiken y Springer , 1995) y la poca habilidad para competir con la malezas (Mitchell *et al.*, 2016).

El pre-tratamiento o *priming* de las semillas es una técnica de pre-siembra que podría permitir mejorar la germinación de *P. virgatum* bajo las condiciones de salinidad y alcalinidad descriptas. El *priming* con distintas concentraciones de KCl no incrementó la germinación acumulada de las semillas de *P. virgatum* incubadas en agua y en soluciones salino/ alcalinas. Por el contrario, el hidro-*priming* y el *priming* con CIN-0,5 redujeron significativamente la germinación de las semillas incubadas en 50mM-pH9,3 respecto al control.

Por otro lado se observa que el *priming* de las semillas de *P. virgatum* tiene efectos diferentes sobre la G, VG y T₅₀ de acuerdo a la solución de incubación. El hidro-*priming* de las semillas incubadas en agua, 25mM-pH6,4 y 25mM-pH9,3 no afectó la G pero redujo el T₅₀ e incrementó

la VG respecto al control. En cambio, el *hidro-priming* tuvo un efecto negativo sobre todas las variables evaluadas de las semillas incubadas en 50mM-pH9,3. En la bibliografía se citan también otros casos en que, bajo ciertas condiciones, el efecto del *priming* sobre la germinación es negativo. Por ejemplo, Varier *et al.* (2010) observaron que el pre-tratamiento reduce la longevidad de semillas de elevado vigor. Hussain (2015) observó una reducción del 87,1 % en el porcentaje de germinación de semillas de arroz (*Oryza sativa* L.) pre-tratadas en agua, polietilenglicol ó espermidina y almacenadas durante 210 días a 25 °C respecto del control (semillas frescas no pre-tratadas), mientras que en semillas sin pre-tratar e iguales condiciones de almacenamiento la reducción fue sólo del 8,5 %. El pre-tratamiento en agua o con hormonas vegetales (mezcla comercial *Stimulate*®, GA₃ 50 mg. L⁻¹, CIN 90 mg. L⁻¹y ácido indolbutírico 50 mg. L⁻¹) redujo la germinación de las semillas y el vigor de plántulas de maíz tras un periodo de almacenamiento (30 días) (Pallaoro *et al.*, 2016). El pre-tratamiento con manitol en dos especies medicinales, *Melissa officinalis* L. y *Cuminum cyminum* L. redujo el porcentaje de germinación en agua (Younesi y Moradi, 2015).

La incubación las de semillas de *P. virgatum* en 50 mM de sales de Na⁺ alcalinas (pH = 9,3) indujo la formación de plántulas anormales, independientemente del pre-tratamiento. Condiciones de estrés hídrico y salino también promovieron la formación de plántulas anormales (crecimiento radicular nulo tras su emergencia desde la semilla) en *Brassica napus* L. (Heshmat *et al.*, 2011).

Luego de la incubación en agua, los valores de germinación acumulada de las semillas incubadas inicialmente en 50mM-pH9,3 y 100mM-pH9,3 fueron menores al 3 %, y en ningún caso alcanzaron valores similares al control. Esto muestra que la incubación en agua no revirtió los efectos de la incubación en medios salino-alcalinos. De manera similar, Taleisnik *et al.* (1998) observaron que semillas de *P. coloratum* que no germinaron en una solución de NaCl 200 mM, tampoco germinaron, o germinaron en muy bajo porcentaje al ser incubadas luego en

agua destilada, por lo que los autores estimaron que las semillas perdieron la viabilidad. Niveles elevados de salinidad también pueden inducir la dormición de las semillas, debido a cambios en el balance hormonal de las mismas: incremento en el contenido de ABA (ácido abscísico) y reducción del contenido de giberelinas. El-Keblawy (2010) encontró que la inhibición de la germinación de semillas de *P. turgidum* impuesta por salinidad (200 mM de NaCl) es aliviada, completa o parcialmente, por la aplicación de giberelinas, fusicoccin, cinetina y thiourea. En trigo, el pasaje a incubación en agua sólo incrementó el porcentaje de germinación a valores similares al control en el caso de semillas incubadas inicialmente en salinidad moderada (20-80mM y pH = 6,5), mientras que el efecto de la incubación en medio salino/alcalino (60-80mM y pH = 9) tuvo un efecto irreversible. Esto sugiere que el pH elevado del medio lleva a una descomposición estructural y muerte de las semillas, en tanto que la salinidad sólo retrasa el proceso de germinación (Guo *et al.*, 2010).

Los tratamientos de *priming* con diferentes concentraciones de KCl redujeron significativamente el T_{50} respecto al control, sin embargo el hidro-*priming* fue el más efectivo. El *priming* con soluciones salinas de NaCl y $CaCl_2$ (-0,1 MPa) de semillas de la especie arbórea *Calotropis procera* L. mejoró la germinación y la velocidad de germinación (calculada como 1/ tiempo medio de germinación) en todos los niveles de salinidad evaluados (-0,01 a -0,15 MPa) (Taghvaei *et al.*, 2012). Todos los reguladores de crecimiento a las concentraciones evaluadas en este trabajo (excepto CIN-0,5) indujeron la reducción del T_{50} de las semillas incubadas en agua, 25mM-pH6,4 y 25mM-pH9,3 en relación al control. Sin embargo, ningún pre-tratamiento logró superar significativamente los efectos del pre-tratamiento en agua. La VG mostró una respuesta similar. Según Bajehbaj (2010) la mayor velocidad con la que se produce la germinación en semillas de girasol pre-tratadas respecto a las semillas sin pre-tratar se debe a que esta técnica mejora la eficiencia en la absorción de agua de las semillas y permite que la

actividad metabólica se inicie mucho antes de la emergencia de la radícula, probablemente debido al efecto estimulador en la división celular.

La diferencia de potencial hídrico entre la semilla y la solución de imbibición es el principal factor que afecta la tasa con la que el agua fluye entre ambos. La presencia de osmolitos en solución, en este caso KCl, disminuye el potencial osmótico, lo cual disminuye el gradiente de potencial hídrico entre la solución y la semilla, y por consiguiente reduce la tasa de absorción. En girasol, la mayor tasa de absorción, y no la cantidad total de agua absorbida, fue la responsable del menor tiempo necesario para iniciar el proceso de germinación de semillas pre-tratadas en agua respecto de aquellas pre-tratadas en solución salina (Kaya *et al.*, 2006). Existen antecedentes en los que el pre-tratamiento en agua, una técnica accesible y de bajo costo, fue también la más efectiva (Caseiro *et al.*, 2004; Fujikura *et al.*, 1993; Heshmat *et al.*, 2011; Abbasdokht *et al.*, 2010).

El pre-tratamiento de las semillas de *P. virgatum* con 1,2 mM de GA₃ redujo la VG de las semillas incubadas en la solución 50 mM de sales de Na⁺ neutras (pH = 6,4). Madakadze (2010) informó que el *priming* con GA₃ 1 mM incrementó y aceleró la germinación final de las semillas de *P. virgatum* cv. New Jersey incubadas en agua a 8 y 16 ° C. El *priming* con GA₃ 3 mM incrementó tanto el porcentaje de germinación como la velocidad de germinación de *Penstemon digitalis* cv. Husker Red (Machado de Mello *et al.*, 2009). El pre-tratamiento con GA₃ (0,06 mM) incrementó la velocidad de germinación (semillas germinadas por día), la longitud de la plúmula y de la raíz de plántulas de maíz, debido a un aumento de la actividad enzimática (Saeedipour, 2013). En cebada (*Hordeum vulgare* L.) se observó que el *priming* con GA₃ (0,15 mM) aumentó la velocidad de germinación debido a una mayor movilización de las reservas, especialmente bajo condiciones de estrés salino (Tabatabaei, 2014).

El pre-tratamiento con soluciones 0,1 y 0,5 mM de AS redujo el T_{50} (22,38 y 20,81 %), e incrementó la VG (26,75 y 29,11 %) y la G (6,03 y 9,45 %) de semillas de *P. virgatum* cv. Shawnee incubadas en 100 mM-pH6,4, en relación las semillas sin pre-tratar. El *priming* con AS podría incrementar la tolerancia a niveles moderados de salinidad y pH neutro durante la germinación, lo cual permitiría el establecimiento del cultivo en menor tiempo. Numerosos estudios previos han postulado al AS como una molécula involucrada en la inducción de tolerancia ante condiciones de estrés vegetal, tanto biótico (plagas, enfermedades) como abiótico (sequía, salinidad, altas y bajas temperaturas) (Rajjou *et al.* 2006; Borsani, *et al.* 2001; Afzal *et al.*, 2009).

Muchos autores consideran que el AS está involucrado en la respuesta al estrés a través del proceso de señalización, más que debido a un efecto directo (Senaratna *et al.*, 2000; Singh y Usha, 2003; Gunes *et al.*, 2007). El *priming* de las semillas con AS mejora la tolerancia a estreses abióticos (salinidad y bajas temperaturas, principalmente) a través de una mayor y más rápida germinación y mayor crecimiento de las plántulas en trigo (Afzal *et al.*, 2006) y maíz (Ahmad *et al.*, 2012; Farooq *et al.*, 2008), activación de mecanismos de protección contra el daño oxidativo en maíz (Farooq *et al.*, 2008; Ahmad *et al.*, 2012) y arabidopsis (Borsani *et al.*, 2001), mayor división celular en el meristema apical de las raíces de trigo, lo cual afecta también el balance hormonal (auxinas, citoquininas y ABA) (Afzal *et al.*, 2006), mantención del contenido hídrico de los tejidos, reducción de la permeabilidad de la membrana en maíz (Farooq *et al.*, 2008), e incremento del contenido de pigmentos fotosintéticos y del área foliar en *Vicia faba* L. (Azooz *et al.*, 2009).

De los factores evaluados en este trabajo, sólo la mayor concentración salina (100 mM) indujo una disminución leve del contenido de agua de las plántulas de *P. virgatum*, cuantificado a través del CRA. El CRA de las plántulas cultivadas en 100mM-pH6,4 fue un 5,85 % menor en

relación al control. El incremento del pH no afectó el CRA en presencia de 25 mM de sales de Na⁺. En general, la disminución del CRA de 100 % a 90 % se relaciona con la reducción de la expansión celular y el cierre del poro estomático en la hoja. (González y González-Vilar, 2001; Soares-Cordeiro *et al.*, 2009). Hu (2015) encontró variaciones del contenido relativo de agua en líneas de *P. virgatum* sometidas a condiciones de estrés salino/ alcalino (150 mM de una mezcla en relación 1:1 de sales de Na⁺ alcalinas y pH 9,5) de entre 1 y 31 % en relación al control (cultivo en solución nutritiva sin el agregado de sales de Na⁺). Guo (2010) también observó que el incremento de la concentración salina a partir de 60 mM de sales de Na⁺ o del pH de 6,5 a 9 en la solución de incubación redujo el contenido de agua de los vástagos y raíces de plántulas de trigo. Dicho efecto fue más marcado bajo condiciones de estrés salino/ alcalino (60/ 80 mM de sales de Na⁺ y pH = 9) que en respuesta al estrés generado por cada factor en forma individual, y en las raíz respecto al vástago. En *Lupinus angustifolius* cv. Yandee, el incremento del pH de la solución de cultivo de 5,2 a 7,5 redujo el potencial hídrico un 36 % a los 19 días de haber iniciado el tratamiento (Tang *et al.*, 1993). En avena (*Avena sativa* L.), la incubación en 168 mM de sales de Na⁺ neutras redujo significativamente el contenido de agua en relación al control. En cambio, niveles salinos 3,5 veces menores (48 Mm) en medio alcalino (pH \cong 10) indujeron una reducción del contenido de agua de más del 25 % (Gao *et al.*, 2014).

Diversos factores de estrés ambiental inducen la acumulación de especies reactivas de oxígeno (Azevedo Neto *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2007; Pang y Wang, 2008, entre otros), las cuales al reaccionar con las membranas celulares generan la formación de productos tóxicos, tales como el MDA, y aumentan la permeabilidad de las mismas, lo cual favorece la pérdida de electrolitos (Ella *et al.*, 2003; Peng *et al.*, 2008). Por lo tanto, el PPE y el contenido de MDA permiten estimar el daño a nivel de las membranas generado por el estrés salino/alcalino. 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 PPEv (3,16 y 2,55 veces) que del PPEr (2,32 y 1,92 veces), en relación a los de las plantas cultivadas en solución nutritiva sin el agregado de sales de Na⁺ y pH = 6,4. El PPEr fue superior al PPEv en todos los tratamientos. Hu (2015) encontró variaciones en el porcentaje de pérdida de electrolitos en líneas de *P. virgatum* sometidas a condiciones de estrés salino/alcalino (150 mM de una mezcla en relación 1:1 de sales de Na⁺ alcalinas y pH 9,5) de entre 44 y 184 % en relación al control (cultivo en solución nutritiva sin el agregado de sales de Na⁺). En plántulas de alfalfa el incremento del pH de 7 a 9 no afectó la pérdida de electrolitos foliares en presencia de 96 mM de sales de Na⁺, sin embargo en presencia de 120 mM de sales de Na⁺ la incrementó significativamente (Peng *et al.*, 2008).

Ni la salinidad ni el pH de la solución de incubación afectaron el contenido de MDA de las plantas de *P. virgatum* cv. Shawnee.

Tanto el incremento de la salinidad de 25 a 100 mM como el incremento del pH de 6,4 a 9,3 afectaron el PSr y el PSv. El PSr fue más sensible al aumento la concentración salina y del pH que el PSv. Esta mayor sensibilidad parece estar asociada al hecho de que las raíces están en contacto directo con la solución de cultivo (Liu *et al.*, 2014; Tsegay y Gebreslassie 2014, Abraha y Yohannes, 2013; Azooz, 2009). La reducción del crecimiento de la planta (cuantificado a través del PSv y PSr) por el aumento en la concentración salina de la solución de incubación es una respuesta común a numerosas especies (para revisiones ver Munns, 2002; Parida y Das, 2005; Zhu, 2001). Djilili y Anderson (1990) observaron una reducción del peso seco ante incrementos en la salinidad del suelo y/o agua de riego, con una disminución más marcada de peso seco de las raíces que de la parte aérea. En alfalfa el incremento de la salinidad (de 0 a 120 mM) indujo una reducción de peso seco de la raíz mayor que la

correspondiente al vástago (Peng *et al.*, 2008). En *Hibiscus rosa-sinensis* cv Bimini Breeze el incremento en la concentración de NaHCO_3 (de 2,5 a 10 mM) también produjo una mayor reducción del peso seco de las raíces que de la parte aérea (Valdez Aguilar y William Reed, 2006). En cambio el incremento de la concentración de sales de Na^+ alcalinas y neutras (de 0 a 80 mM) redujo la velocidad relativa de crecimiento en mayor medida en el vástago que en la raíz (Guo *et al.*, 2010). El estrés salino/ alcalino tuvo un efecto sinérgico sobre la biomasa total de las plántulas de *Lotus tenuis* (Paz *et al.*, 2012) y alfalfa (Peng *et al.*, 2008) respecto del estrés generado por cada factor en forma individual.

Si bien el incremento en la salinidad y alcalinidad redujeron el PSr y PSv, tales reducciones fueron menores para el caso de plántulas emergidas de semillas pre-tratadas. Todas las concentraciones de KCl evaluadas (0,1; 0,3 y 0,45 M) indujeron un incremento significativo del PSr respecto del control sin pre-tratar. Todos los pre-tratamientos, incluso el pre-tratamiento en agua, indujeron un incremento del PSv en relación al control. En otras especies se observaron respuestas similares. El *priming* con NaCl (-0,1 MPa) incrementó el peso seco de plántulas de *Calotropis procera* L. incubadas en una solución de NaCl y CaCl_2 en relación 1:1 (-0,05 MPa) (Taghvaei *et al.*, 2012); el *priming* con KNO_3 (-1,0 MPa) redujo el efecto de la salinidad (solución de NaCl de 5 a 25 dS m^{-1}) sobre el peso seco de las plántulas de girasol (Bajehbaj, 2010) y el *priming* de las semillas con NaCl 6 mM incrementó el peso seco de las plántulas de maíz cultivadas en condiciones de salinidad (entre 34 mM y 103 mM de NaCl), respecto a las obtenidas de semillas sin pre-tratar, (Abraha y Yohannes, 2013). El *priming* con soluciones de NaCl 0,2 M y KNO_3 0,3 M incrementó el peso seco de plántulas de colza (*Brassica napus* L.) incubadas en condiciones de salinidad (entre 50 y 200 mM de NaCl y CaCl_2 , relación 1:1) (Mohammadi, 2009). El incremento del PS de las plántulas inducido por el *priming* puede

deberse al inicio temprano de la germinación y una mayor velocidad de división celular en el ápice radicular (Farooq, 2006).

Niveles bajos de iones Na^+ y altos de K^+ en el citoplasma celular aseguran el cumplimiento de procesos enzimáticos esenciales (Munns *et al.*, 2006). Bajo condiciones de salinidad edáfica, grandes cantidades de Na^+ se acumulan en las células mientras que se reduce la absorción de K^+ (para revisiones ver Munns, 2002; Maathuis y Amtmann, 1999; Hasegawa *et al.*, 2000). Dado el potencial electroquímico negativo de la membrana, un aumento en la concentración extracelular de Na^+ favorece el ingreso pasivo de este ión a través de canales transportadores de baja afinidad de K^+ , pues ambos iones poseen un radio de hidratación similar (Blumwald, 2000). Una relación K^+/Na^+ baja reduce el crecimiento y eventualmente puede tornarse toxica (Viégas *et al.*, 2001).

Cada incremento del nivel de salinidad o pH indujo incrementos significativos del contenido de Na^+ del vástago en las plántulas de *P. virgatum* obtenidas a partir de semillas sin pre-tratar o pre-tratadas en agua, KCl 0,1 M ó KCl 0,3 M. El incremento del contenido de Na^+ fue más sensible al incremento del nivel de salinidad (de 25 mM a 100 mM) que al incremento del pH (6,4 a 9,3). Esto coincide con los efectos de la salinidad y del pH sobre la PPEv y PPEr. Los contenidos de Na^+ y K^+ de las raíces fueron sensibles tanto al incremento de la salinidad como del pH. Al igual que lo observado para el PS, los cambios de los contenidos de Na^+ y K^+ inducidos por la salinidad y la alcalinidad fueron más extremos en las raíces que en los vástagos. En cada tratamiento, el incremento en el contenido de Na^+ fue mayor que la correspondiente reducción en el contenido de K^+ de la raíz en relación al control. El incremento del pH de 6,4 a 9,3 produjo una disminución más marcada en los contenidos de K^+ del vástago y de la raíz que el incremento de la salinidad (de 25 a 100 mM). Respuestas similares se observaron en plantas de *Chloris virgata* (Yang *et al.* 2010), trigo (Yang *et al.* 2008) y avena (Gao *et al.*, 2014) cultivadas en diferentes combinaciones de salinidad (40 a 200 mM, 15 a 75

mM, 48 a 168 mM, respectivamente) y pH alcalino ($\text{pH} \cong 10$). Todas las soluciones de cultivo evaluadas provocaron una reducción similar de la relación K^+/Na^+ del vástago y la raíz respecto al control. La reducción porcentual de los valores de la relación K^+/Na^+ inducida por los distintos tratamientos salino/alcalinos, en relación al control, fueron mayores en el vástago que en la raíz. Esto se explica por el incremento del contenido de Na^+ más que por la reducción del contenido de K^+ . El cultivo en salinidad moderada (100mM-pH6,4) indujo incrementos del contenido de Na^+ del vástago y la raíz de 30,14 y 8,31 veces, respectivamente, mientras el contenido de K^+ se redujo solamente 1,72 y 2,11 veces, respectivamente, en relación a los contenidos de las plantas cultivadas en solución nutritiva sin el agregado de sales de Na^+ . Sin embargo, en valores absolutos la relación K^+/Na^+ del vástago fue siempre mayor a la correspondiente a la raíz. El incremento del contenido de Na^+ y la reducción en el contenido de K^+ son respuestas comunes en numerosas especies ante un aumento de la concentración de sales de Na^+ del medio de cultivo. En plantas de trigo el estrés salino y salino/alcalino indujeron el incremento del contenido de Na^+ y la reducción de la relación K^+/Na^+ . El efecto fue más marcado bajo condiciones de estrés alcalino que salino (Yang *et al.*, 2008) y en las raíces con respecto al vástago (Guo *et al.*, 2010). El cultivo de plantas de *Lotus tenuis* L. en una solución 90 mM de NaCl , con o sin el agregado de NaHCO_3 (10 mM), indujo una reducción de la relación K^+/Na^+ respecto al control (Paz *et al.*, 2012). Incremento y disminución de los contenidos de Na^+ y K^+ , respectivamente, se observaron ante un aumento de la concentración de sal de Na^+ neutra (NaCl) en la solución de crecimiento en *C. gayana* (Taleisnik *et al.*, 1997), *Eucalyptus camaldulensis* y *E. tereticornis* (Nasim *et al.*, 2008), y la concentración de sal de Na^+ alcalina (Na_2CO_3) en *Vicia faba* L. (Radi *et al.*, 2012) o de la sodicidad (expresada como PSI) en arroz (Sharma, 1986).

La salinidad y la alcalinidad de la solución de cultivo afectan la capacidad de absorción de iones de las raíces, derivando en un desbalance iónico, más acentuado en los pH elevados (Wang *et al.*, 2011). La remoción del Na⁺ del citoplasma y su compartimentalización en la vacuola es dependiente del gradiente electroquímico generado por las H⁺-ATPasas ubicadas en la membranas plásmática y el tonoplasto (Parida y Das, 2005). Las plantas son capaces de excluir el Na⁺ a espacios donde no resulta tóxico para la célula a través de antiportadores Na⁺/H⁺ (Zhu, 2001; Hasegawa *et al.*, 2000). La alcalinización del medio reduce la concentración de H⁺ en solución, en consecuencia se altera el potencial eléctrico de la membrana (Yang *et al.* 2008) y la actividad de los antiportadores Na⁺/H⁺. Al respecto, en la halófito *Chloris virgata*, la capacidad de ajustar el contenido de Na⁺ en un medio alcalino (pH = 10) se mantiene en niveles de salinidad menores a 120 mM, sin embargo incrementos en la concentración salina conllevan a un significativo ascenso del contenido de Na⁺, al superarse la capacidad de las células de regular la absorción y transporte de este ión (Yang *et al.*, 2010).

El pre-tratamiento de las semillas de *P. virgatum* no afectó el contenido de Na⁺ del vástago de las plántulas cultivadas en solución control ó 25mM-pH6,4. En cambio, el pre-tratamiento de las semillas con una solución 0,45 M de KCl redujo 1,6 veces el contenido de Na⁺ del vástago de las plántulas cultivadas en alcalinidad (25mM-pH9,3) en relación a las obtenidas de las semillas sin-tratar. Si bien todos los pre-tratamientos evaluados redujeron significativamente el contenido de Na⁺ de las plantas cultivadas en salinidad moderada (100mM-pH6,4) respecto al control sin pre-tratar, el pre-tratamiento en solución 0,45 M de KCl fue el más efectivo. Las plántulas de semillas pre-tratadas en KCl 0,45 M sólo mostraron incrementos del contenido de Na⁺ del vástago ante un aumento en el nivel de salinidad. Otros autores también observaron un efecto del *priming* sobre el contenido de Na⁺ de plántulas cultivadas en presencia de NaCl en la solución de crecimiento. Farhoudi y Sharifzadeh (2006) informaron que el aumento de la

concentración de NaCl (de 0,4 a 16 dS m⁻¹) indujo incrementos significativos del contenido de Na⁺ de plántulas de colza (*Brassica napus* L.), sin embargo tales incrementos fueron menores para el caso de plántulas emergidas de semillas pre-tratadas con NaCl (14 dS m⁻¹). Plantas de trigo emergidas de semillas pre-tratadas con KNO₃ (1,2 MPa) e incubadas en niveles crecientes de salinidad (50 a 150 mM de NaCl) presentaron menor contenido de Na⁺ en la hoja bandera luego de ó durante la antesis que aquellas emergidas de semillas sin pre-tratar e incubadas en iguales condiciones (Abbasdokhta y Edalatpishehb, 2013). En maíz, el *priming* con NaCl (6 dS m⁻¹) redujo un 10 % el contenido de Na⁺ de plántulas respecto de las plantas control (obtenidas de semillas sin pre-tratar) incubadas en condiciones de salinidad (solución de NaCl de 6 dS m⁻¹). En trigo, el *priming* con CaCl₂ (50 mM) redujo la acumulación de Na⁺ de plántulas incubadas en presencia de 125 mM de sales de Na⁺ (Afzal *et al.*, 2008). La mayor tolerancia impuesta por el osmo-*priming* respondería a un incremento en la capacidad de osmoregulación y una mayor estabilidad de las membranas (Farhoudi y Sharifzadeh, 2006)

El *priming* de semillas de arroz con KCl (-1,35 MPa), indujo incrementos del contenido de K⁺, lo cual se asocia directamente a la activación de las α -amilasas y de forma indirecta a un incremento de la velocidad de germinación y del vigor de las plántulas (mayor peso, longitud, y número de raíces secundarias) (Farooq, 2006). Sin embargo, ningún pre-tratamiento de osmo-*priming* realizado a las semillas de *P. virgatum* incrementó la concentración K⁺ de los tejidos de los vástagos ni de las raíces de las plántulas en relación al control.

8. CONCLUSIONES

A partir de la comparación de las respuestas de semillas de *C. gayana* cv. Finecut y *P. virgatum* L. cv. Shawnee a la incubación en soluciones con diferentes concentraciones de sales de Na⁺ neutras o alcalinas se concluyó que:

- La presencia de 25 mM de sal, independientemente del pH, ó 100 mM con pH neutro no modifica o disminuye levemente (10%) la germinación acumulada de ambas especies, respecto al control respectivo (sales de Na⁺ 25 mM y pH 6,4). Sin embargo, la combinación de 100 mM y pH alcalino (9,3 ó 10) reduce drásticamente la germinación.
- Las semillas de *C. gayana* expuestas a un nivel alto de estrés salino/alcalino (sal 100mM y pH 9,3 ó 10) muestran valores más elevados de germinación acumulada y velocidad de germinación, y menores de tiempo al 50% de germinación, que las semillas de *P. virgatum* en esas mismas condiciones de incubación.

A partir de semillas de *P. virgatum* L. cv. Shawnee sometidas a pre-tratamientos de hidro y osmo-*priming* en soluciones 0,1; 0,3 y 0,45 M de KCl e incubadas a diferentes concentraciones de sales de Na⁺ neutras o alcalinas se observó que:

- El incremento del pH de 6,4 a 9,3 no afecta el T₅₀ ni la velocidad de germinación de las semillas en presencia de 25 mM de sal. En presencia de 100 mM el incremento del pH inhibe completamente la germinación.
- Ningún tratamiento de osmo-*priming* incrementa la germinación acumulada respecto al control.

- Todos los tratamientos de osmo-*priming* reducen el tiempo al 50% de germinación e incrementan la velocidad de germinación, sin embargo el hidro-*priming* supera el efecto de las tres concentraciones de KCl.

En plántulas de *P. virgatum* L. cv. Shawnee obtenidas de semillas sometidas a pre-tratamientos de hidro- y osmo-*priming* (0,1; 0,3 y 0,45 M de KCl) y cultivadas en soluciones con diferentes concentraciones de sales de Na⁺ neutras o alcalinas se observó que:

- El incremento de la concentración de sales de Na⁺ de 25 a 100 mM en la solución de crecimiento reduce levemente el CRA (6 %).
- El PSr es más sensible a las condiciones del medio de incubación que el PSv. La incubación en 25mM-pH9,3 afecta sólo el PSr, y en 100mM-pH6,4, si bien afecta ambos parámetros, induce una reducción moderada del PSv (36%) y severa del PSr (97%).
- El osmo-*priming* incrementa el PSv y el PSr de las plántulas en relación al control.
- El incremento de la concentración de sales de Na⁺ de 25 a 100 mM afecta más el porcentaje de pérdida de electrolitos, tanto del vástago como de la raíz, que el incremento del pH de 6,4 a 9,3 en presencia de 25 mM de sales de Na⁺.
- El incremento de la salinidad de 25 a 100 mM afecta más el contenido de Na⁺ del vástago que el incremento de pH. En cambio, ambos factores inducen incrementos similares del contenido de Na⁺ de la raíz. Tanto en el vástago como en la raíz, el incremento del pH afectó más el contenido de K⁺ que el incremento de la salinidad.
- El osmo-*priming* de las semillas en KCl 0,45 M induce la menor acumulación de Na⁺ en el vástago, tanto en condiciones de salinidad moderada como de pH elevado, respecto al control.

Semillas de *P. virgatum* cv. Shawnee sometidas a *hidro-priming* y *priming* con diferentes concentraciones de ácido giberélico, ácido salicílico y cinetina e incubadas en presencia de sales de Na⁺ neutras y alcalinas mostraron que:

- El efecto del pre-tratamiento con reguladores de crecimiento vegetal no supera al del pre-tratamiento en agua cuando la concentración salina del medio de incubación es baja (25 mM), independientemente del pH. En las semillas incubadas en 50 mM-pH6,4 el pre-tratamiento con GA₃-1,2 incrementa la velocidad de germinación respecto del control sin pre-tratar. El pre-tratamiento con AS-0,1 y AS-0,5 reduce el tiempo al 50% de germinación de semillas incubadas en 100mM-pH6,4 respecto al control y al *hidro-priming*. En presencia de 50 mM de sales de Na⁺ alcalinas (pH = 9,3), el *hidro-priming* reduce la G, la VG e incrementa el T₅₀ de las semillas respecto de las semillas sin *priming*.
- Ninguna concentración de cinetina evaluada mejora la germinación final, el tiempo al 50% de germinación ni la velocidad de germinación.

9. CONSIDERACIONES FINALES

Existen diversas especies capaces de producir forraje en condiciones de salinidad y alcalinidad, conocer el comportamiento de las mismas permite identificar aquellas que poseen mayor tolerancia y plasticidad ante tales condiciones y en función de ello recomendar las técnicas de manejo adecuadas. *C. gayana* y *P. virgatum* son dos poáceas adaptadas a una amplia variedad de condiciones edafo-climáticas, lo que las hace potencialmente útiles para la producción de forraje en cantidad y calidad en suelos con problemas de salinidad y alcalinidad.

C. gayana posee mayor tolerancia que *P. virgatum* a condiciones de moderada salinidad y pH alcalino en el estadio de germinación.

En semillas de *P. virgatum* el incremento del pH afecta las variables relacionadas a la germinación en función del nivel de salinidad considerado. En presencia de 25 mM de sales de Na^+ el incremento del pH no afecta las variables relacionadas a la germinación. En cambio, el incremento del pH en presencia de 50 mM de sales de Na^+ reduce la germinación y la velocidad de germinación e incrementa el tiempo al 50 % de la germinación; y en presencia de 100 mM de sales de Na^+ inhibe fuertemente la germinación.

Considerando el efecto del *priming* sobre la germinación y la velocidad de germinación, tanto en condiciones normales como bajo estrés salino y alcalino, se observó que el efecto del pre-tratamiento depende no sólo del compuesto empleado y su concentración, sino también del medio de incubación considerado. En un medio no restrictivo para la germinación (agua o una baja concentración de sales de Na^+ neutras), el hidro-*priming* sería la opción más recomendable, en función de su efecto positivo sobre el tiempo al 50 % de la germinación y la velocidad de germinación. En cambio, en los medios de incubación que contienen concentraciones ≥ 50 mM de sales de Na^+ , el *priming* de las semillas con soluciones tanto de

GA₃ como de AS reducen el tiempo al 50 % de la germinación e incrementan la velocidad de germinación respecto al control. Por el contrario, en presencia de 50 mM de sales de Na⁺ y pH alcalino, el hidro-*priming* tiene un efecto inhibitorio sobre la germinación acumulada, el tiempo al 50 % de la germinación y la velocidad de germinación.

El efecto del osmo-*priming* sobre el T₅₀ y la VG es menor o igual al del hidro-*priming* en todas las condiciones de incubación. Sin embargo los efectos del osmo e hidro-*priming* se diferencian a nivel de las plántulas. El osmo-*priming* induce el incremento del peso seco de la raíz en relación al control (sin *priming*), mientras que el hidro-*priming* no lo afecta. Además, el pre-tratamiento de las semillas con una solución de KCl 0,45 M induce una menor acumulación de Na⁺ en el vástago de las plántulas cultivadas en condiciones de alcalinidad que el hidro-*priming*.

Si bien es amplio el conocimiento referido al efecto positivo del *priming* sobre la germinación de semillas y sobre parámetros de crecimiento y fisiológicos de plántulas de distintas especies, la eficacia de la técnica no siempre es la esperada. Existen múltiples variables que pueden estar relacionadas con el tipo de técnica seleccionada, la naturaleza y concentración del compuesto empleado, el tiempo y las condiciones de exposición al pre-tratamiento, entre otras. Estas variables deben ser ajustadas para cada especie y condición de cultivo en particular. Con el objetivo de perfeccionar la técnica de *priming* para semillas de *P. virgatum* destinadas a condiciones de cultivo particulares, es necesario ampliar el rango de concentraciones y los tiempos de exposición al pre-tratamiento evaluados para los compuestos que indujeron alguna respuesta positiva en la germinación o el crecimiento de las plántulas. También es importante conocer cómo se expresa el efecto de los mismos en estadios más avanzados del desarrollo de las plantas. Por otro lado, futuros estudios deberán hacer énfasis en la interacción entre el *priming* y las condiciones del medio de incubación, ya que un mismo *priming* puede ser efectivo sólo en un cierto rango de condiciones de incubación.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Abbasdokht H., Edalatpishe M. R., Gholami A. 2010. The effect of hydropriming and halopriming on germination and early growth stage of Wheat (*Triticum aestivum* L.). International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering 4(8): 551-555.
2. Abbasdokhta H., Edalatpishehb M. R. . 2013. The effect of priming and salinity on physiological and chemical characteristics of Wheat (*Triticum aestivum* L.). Desert 17: 183-192.
3. Abraha B., Yohannes G. 2013. The role of seed *priming* in improving seedling growth of maize (*Zea mays* L.) under salt stress at field conditions. Agricultural Sciences 4(12): 666-672.
4. Afzal I., Basra S. M .A, Farooq M., Nawaz A. 2006. Alleviation of Salinity Stress in Spring Wheat by Hormonal *Priming* with ABA, Salicylic Acid and Ascorbic Acid. International Journal of Agriculture & Biology 8(1): 23-28.
5. Afzal I., Basra S.M.A., Iqba L. A. 2009. Chilling tolerance in maize: agronomic and physiological Approaches. Crop& Pasture Science 60(6): 501–516.
6. Afzal I., Rauf S., Basra S.M.A., Murtaza G. 2008. Halopriming improves vigor, metabolism of reserves and ionic contents in wheat seedlings under salt stress. Plant soil environ. 54(9): 382-388.
7. Aguirrezábal, L.A.N., Orioli G.A., Hernández L.F., Pereyra V.R., Miravé, J.P. 1996. Girasol: aspectos fisiológicos que afectan el rendimiento. Unidad Integrada Balcarce, Buenos Aires. url: <http://www.biblioteca.org.ar/libros/210709.pdf>

8. Ahmad I., Khaliq T., Ahmad A., Basra S.M.A., Hasnain Z., Ali A. 2012. Effect of seed *priming* with ascorbic acid, salicylic acid and hydrogen peroxide on emergence, vigor and antioxidant activities of maize. *African Journal of Biotechnology* 11(5): 1127-1137.
9. Aiken G. E., Springer T. L. 1995. Seed size distribution, germination, and emergence of 6 switchgrass cultivars. *Journal of Range Management* 48(5): 455-458.
10. Ashraf M., Foolad M. R. 2005. Pre-sowing seed treatment: A shotgun approach to improve germination, plant growth and crop yield under saline and non-saline conditions. *Advances in Agron.* 88: 223-271.
11. Ashraf M., Harris P.J.C. 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Sci.* 166: 3-16.
12. Avaca, F.M., García, M.D., Pesqueira, J. 2015. Efectos de la salinidad y la alcalinidad sobre la germinación y el crecimiento vegetativo temprano de *Chloris gayana* Kunth. Universidad Católica Argentina. url: <http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/tesis/efectos-salinidad-alcalinidad-germinacion.pdf>.
13. Avila R.E., Di Marco O., Agnusdei, M. 2012. Calidad nutritiva de láminas de *Chloris gayana* en estado vegetativo. Efecto de la reducción del tamaño foliar y envejecimiento. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal* 20(1-2): 17-27.
14. Azadi M.S., Tabatabaei S.A. , Younesi E., Rostami M. R., Mombeni M. 2013. Hormone *priming* improves germination characteristics and enzyme activity of sorghum seeds (*Sorghum bicolor* L.) under accelerated aging. *Cercetări Agronomice în Moldova* 3(155): 49-56.
15. 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. *Environ. Exp. Bot.* 56: 87-94.

16. Azooz M.M. 2009. Salt stress mitigation by seed *priming* with salicylic acid in two faba bean genotypes differing in salt tolerance. *Int. J. Agric. Biol.* 11: 343-350.
17. Bajehbaj A. 2010. The effects of NaCl *priming* on salt tolerance in sunflower germination and seedling grown under salinity conditions. *African Journal of Biotechnology* 9(12): 1764-1770.
18. Bakht J., Shafi M., Jamal Y., Sher H. 2011. Response of maize (*Zea mays* L.) to seed *priming* with NaCl and salinity stress. *J. Spanish Journal of Agricultural Research* 2011 9(1): 252-261.
19. Bandera R. , Bertram N , Bolleta A. , Chiacchiera S., Ferri J.M., Galíndez G , Lauric A, Malagrina G. , Otondo J. , Petruzzi H. , Stritzler N. , Torres Carbonell C. 2012. Megatérmicas. INTA. url: http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_-_megatermicas.pdf
20. Barney J.N., Mann J.J., Kyser G.B, Blumwald E., Deynze A.V., Joseph M. DiTomaso. 2009. Tolerance of switchgrass to extreme soil moisture stress: Ecological implications. *Plant Science* 177(6): 724-732.
21. Basra S.M.A., Afzal I. 2005. Inducing salt tolerance in wheat by seed vigor enhancement techniques. *International Journal of Biology and Biotechnology* 2: 173–9.
22. Bazzigalupi O., Pistorale S.M., Andrés A.N. 2008. Tolerancia a la salinidad durante la germinación de semillas provenientes de poblaciones naturalizadas de agropiro alargado (*Thinopyrum ponticum*). *Cien. Inv. Agr.* 35(3): 277-285.
23. Berti M.T., Johnson B.L. 2013. Switchgrass establishment as affected by seeding depth and soil type. *Industrial Crops and Products* 41: 289-293.
24. Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K.V. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann. Bot.* 91: 179-194.

25. Blumwald E. 2000. Sodium transport and salt tolerance in plants. *Current Opinion in Cell Biology*.12:431-434.
26. Bogdan, A.V. 1969. *Chloris gayana* without antocyanin colouration. *Herb. Abstr. Hurley Berks*. 39: 1-13.
27. Borsani O., Valpuesta V., Botella M.A. 2001. Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage mediated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings. *PlantPhysiol*. 12: 1024-1030.
28. Bui, E. 2013. Possible role of soil alkalinity in plant breeding for salt-tolerance. *Biol. Lett*. 9: 20130566.
29. Casas R. 2013. Tratamiento de suelos salino – sódicos en el noroeste de la provincia de Buenos Aires. INTA. url: http://fecic.org.ar/files/Tratamiento_de_Suelos_Salino_Sodicicos.pdf
30. Caseiro R, Bennett MA, Marcos-Filho J. 2004. Comparison of three priming techniques for onion seed lots differing in initial seed quality. *Seed Sci. Technol*. 32: 365-375.
31. Checovich M.L., Ruiz M.A. 2012. Variación en el nivel de dormición de la semilla en distintas variedades de la forrajera estival *Panicum virgatum* L. *RIA* 38(2): 165-170.
32. Chuck G. S., Tobias C., Sun L., Kraemer F., Li C. , Dibble D., Arora R., Bragg J. N., Vogel J. P., Singh S. , Simmons B. A., Pauly M. , Hake S. 2011. Over expression of the maize *Corngrass1* microRNA prevents flowering, improves digestibility, and increases starch content of *Switchgrass*. *PNAS* 108(42): 17550-17555.
33. Coolbear P., A. Francis, and D. Grierson. 1984. The effect of low temperature pre-sowing treatment under the germination performance and membrane integrity of artificially aged tomato seeds. *J. Experimen. Botan*. 35: 1609-1617.

34. Couée I. S. C., Gouesbet G., El Armani A. 2006. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* 57: 449-459.
35. Dan Y. X., Fei D., YunWei Z. 2010. Effects of salt stress on Switchgrass seed germination and seedling growth. *Acta Agrestia Sinica* 18(6): 810-815
36. 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 and Soil.* 225: 83–94.
37. Deifel K.S., Kopittke M. P., Menzies N.W. 2006. Growth Response of Various Perennial Grasses to Increasing Salinity. *Journal of Plant Nutrition* 29: 1573-1584.
38. Dezfuli P.M., Sharif-zadeh F., Janmohammadi M. 2008. Influence of priming techniques on seed germination behavior of maize inbred lines (*Zea mays* L.). *ARPJ Journal of Agricultural and Biological Science* 3(3): 22-25.
39. 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>
40. Dkjili, M.; Anderson, B. 1990. Salt effects on seedling growth of switchgrass and bigbluestem. *Proceedings of the Twelfth North American Prairie Conference: recapturing a vanishing heritage.* Cedar Falls, Iowa. Held 5-9: 13-16.
41. Duclos D.V., Ray D.T., Johnson D. J., Taylor A.G. 2013. Investigating seed dormancy in Switchgrass (*Panicum virgatum* L.): understanding the physiology and mechanisms of coat-imposed seed dormancy. *Industrial Crops and Products* 45: 377-387.
42. El-Keblawy A., Al-Ansari F., Al-Shamsi N. 2010. Impact of dormancy regulating chemicals on salinity induced dormancy in *Lasiurus syndicus* and *Panicum turgidum*: two desert glycophytic grasses. *Plant Growth Regulation* 62:163–170.

43. Ella E.S., Dionisio-Sese M.L., Ismail A.M. 2011. Seed pre-treatment in rice reduces damage, enhances carbohydrate mobilization and improves emergence and seedling establishment under flooded conditions. AoB PLANTS: plr007. url: <https://doi.org/10.1093/aobpla/plr007>
44. Eskandari H. 2013. Effects of priming technique on seed germination properties, emergence and field performance of crops: a review. Intl. J. Agron. Plant. Prod. 4(3): 454-458.
45. Etchevehere P.H. 1976. Normas de Reconocimiento de suelos, Segunda Edición actualizada INTA, CIRN, Dept. de Suelos de Castelar, Castelar, Colección Suelos Nro. 52.
46. Farhoudi R., Harifzadeh F. 2006. The effects of NaCl priming on salt tolerance in canola (*Brassica napus* L.) seedlings grown under saline conditions. Indian J. Crop Science, 1(1-2): 74-78.
47. Farooq M., Aziz T., Basra S. M. A. , Cheema M. A., Rehman H. 2008. Chilling Tolerance in Hybrid Maize Induced by Seed Priming with Salicylic Acid. J. Agronomy & Crop Sci. 194(2): 161-168.
48. Farooq M., Basra S.M.A., Hafeez K., Ahmad N. 2005. Thermal hardening: a new seed vigor enhancement tool in rice. J. Integr. Plant Biol. 47(2): 187-193.
49. Farooq M., Basra S. M. A., Khalid M., Tabassum R., Mahmood T. 2006. Nutrient homeostasis, metabolism of reserves, and seedling vigor as affected by seed priming in coarse rice. Canadian Journal of Botany 84(8): 1196-1202.
50. Farooq M., Wahid A., Siddique K.H.M. 2012. Micronutrient application through seed treatments - a review. J. Soil Sci. Plant Nutr. 12(1): 125-142.
51. Finch-savage, W.E.; Leubner-metzger, G. 2006. Seed dormancy and the control of germination. New Phytologist 171: 501-523

52. Fujikura Y., Kraak H. L., Basra A. S., Karssen C. M. 1993. Hydropriming, a simple and inexpensive priming method. *Seed Sci. Technol.* 21: 639-642.
53. García M.D., Markan E., LaGreca C., Bermudez P., Pesqueira J. 2013. Niveles altos de salinidad y alcalinidad inhiben la germinación e inducen dormición secundaria en *Panicum coloratum* L. y *Chloris gayana* Kunth. 34° Jornadas Argentinas de Botánica Res. p. 188.
54. García M.D., La Greca C.L., Bermúdez P.S., Gago A.M., Markan E.D., Pesqueira J. 2015a. Salinity and alkalinity effects on germination and time to 50% germination (T_{50}) of *Chloris gayana*, *Panicum coloratum* and *Panicum virgatum*. 5th International Symposium of Forage Breeding – Buenos Aires, Argentina 2015.
55. García M.D., Pesqueira J., Gago A., Bermudez P.S., La Greca C.L., Otondo J. 2015b. Physical purity and germination of *Chloris gayana* and *Panicum coloratum* seeds collected from plants grown in an alkaline-sodic soil. 2015. 5th International Symposium of Forage Breeding, Buenos Aires, Argentina.
56. 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. *Not Bot Horti Agrobo.* 42(2):357-362.
57. Giannoulis K., Bartzialis D., Skoufogianni E., Danalatos N. 2017. Nutrient use efficiency and uptake characteristics of *panicum virgatum* for fodder production. *Journal of Agricultural Science* 9(3): 233-244.
58. González L., González-Vilar M., 2001. Cap. 14. Determination of Relative Water Content. En: "Handbook of Plant Ecophysiology Techniques", ed. Reigosa Roger M.J., Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.

59. Grabowski J., Douglas J., Lang D., Meints P., Watson C. 2002. Response of two switchgrass (*panicum virgatum* L.) ecotypes to seed storage environment, storage duration, and prechilling. Whitten Plant Materials Center Coffeerville, MS Technical Report 16(3): 15-24.
60. Greenway H., Munns R. 1980. Mechanism of salt tolerance in nonhalophytes. Annual Review of Plant Physiology 31: 149-190.
61. Guerrero-Alves J. P., Pla-Sentís I., Valera A. 2009. Caracterización morfológica, física, química, mineralógica y génesis de un pedón sódico alcalino ubicado en papelón, estado Portuguesa. Agronomía Trop. 59(2): 189-205.
62. 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(6): 728-736.
63. Guo R., Shi L. X., Ding X. M., Hu Y., Tian S. Y., Yan D.F., Shao S., Gao Y., Liu R., Yang Y. F. 2010. Effects of Saline and Alkaline Stress on Germination, Seedling Growth, and Ion Balance in Wheat. Agron. J. 102:1252-1260.
64. Guo R., Zhou J., W.P., Gong D.Z., Zhong X.L., Gu F.X., Liu Q., Xia X., Tian J.N., Li H.R. 2011. Germination, growth, photosynthesis and ionic balance in *Setaria viridis* seedlings subjected to saline and alkaline stress. Can. J. Plant Sci. 91: 1077-1088.
65. Harris D., Rashid A., Miraj G., Arif M., Shah H. 2007. 'On-farm' seed priming with zinc sulphate solution - A cost-effective way to increase the maize yields of resource poor farmers. Field Crops Res. 102: 119-127.
66. Hasegawa P.M., Bressan R.A., Zhu J.K., Bohnert H.J. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 51:463-99.

67. Haynes J. G., Pill W. G., Evans T. A. 1997. Seed treatments improve the Germination and seedling emergence of Switchgrass (*Panicum virgatum* L.) Haynes J. G., Pill W. G., Evans T. A. Hort Science 32(7): 1222-1226.
68. Heath R.L., Packer L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives in Biochemistry and Biophysics 125: 189-198.
69. Heshmat O., Saeed H.A., Fardin, K. 2011. The improvement of seed germination traits in canola (*Brassica napus* L.) as affected by saline and drought stress. Journal of Agricultural Technology 7(3): 611-622.
70. Hope H.J., McElroy A. 1990. Low-temperature tolerance of switchgrass (*Panicum virgatum* L.). Canadian Journal of Plant Science 70(4): 1091-1096.
71. Hu G., Liu Y., Zhang X., Yao F., Huang Y., Ervin E.H. 2015. Physiological Evaluation of Alkali-Salt Tolerance of Thirty Switchgrass (*Panicum virgatum*) Lines. PLoS ONE. 10(7).
72. Hussain S., Zheng M., Khan F., Khaliq A., Fahad S., Peng S., Huang J., Cui K., Nie L. 2015. Benefits of rice seed priming are offset permanently by prolonged storage and the storage conditions. Scientific Reports 5: 8101.
73. 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.
74. Imaz J.A., Giménez D.O., Grimoldi A.A., Striker G.G. 2015. High recovery ability overrides the negative effects of flooding on growth of tropical grasses *Chloris gayana* and *Panicum coloratum*. Crop and Pasture Science 66(1): 100-106.

75. Islam M., Akhter M., Sabagh A. El. 2011. Comparative studies on growth and physiological responses to saline and alkaline stresses of Foxtail millet (*Setaria italica* L.) and Proso millet (*Panicum miliaceum* L.). Aust. J. Agr. Res. 5(10): 1269-1277.
76. ISTA. 2007. International Rules for Seed Testing. International Seed Testing Association (ISTA), Bassersdorf, Switzerland.
77. Javid M., Nicolas M., Ford R. 2011. Capítulo 9: 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>
78. Jensen N.K., Boe A. 1991. Germination of mechanically scarified neoteric switchgrass seed. Journal of Range Management 44(3): 299-301.
79. Jones, R.M. 1969. Mortality of some tropical grasses and legumes following frosting in the first winter after sowing. Tropical Grasslands 3: 57-63.
80. Kareem I., Ismail M. R. 2013. Osmotic and hormonal priming for rice growth and yield increase. Res. J. Chem. Env. Sci. 1(3): 31-39.
81. Kaya M., Okçu G., Atak M., Çıkkılı Y., Kolsarıcı O. 2006. Seed treatments to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (*Helianthus annuus*L.). Europ. J. Agronomy 24: 291-295.
82. Kaymak H.Ç., Güvenç I., Yaralı F., Dönmez M. F. 2009. The effects of bio-priming with PGPR on germination of radish (*Raphanus sativus* L.) seeds under saline conditions. Turk. J. Agric. For. 33: 173-179.

83. Khajeh-Hosseini M., Powell A.A., Bingham I.J. 2003. The interaction between salinity stress and seed vigour during germination of soybean seeds. *Seed Sci. Technol.* 31: 715-725.
84. Khan M.A., Ansari R., Ali H., Gul B., Nielsen B. L. 2009. *Panicum turgidum*, a potentially sustainable cattle feed alternative to maize for saline areas. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 129: 542-546.
85. Kobayashi H., Masaoka Y. 2008. Salt secretion in Rhodes grass (*Chloris gayana* Kunth) under conditions of excess magnesium. *Soil Science and Plant Nutrition* 54(3):393-399.
86. Li C., Fang B., Yang C., Shi D., Wang D. 2009. Effects of various salt-alkaline mixed stresses on the state of mineral elements in nutrient solutions and the growth of alkali resistant halophyte *Chloris virgata*. *Journal of Plant Nutrition* 32: 1137-1147.
87. Li R., Shi F., Fukuda K., Yang Y. 2010a. 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.
88. Li R., Shi F., Fukuda K. 2010b. Interactive effects of salt and alkali stresses on seed germination, germination recovery, and seedling growth of a halophyte *Spartina alterniflora* (Poaceae). *South African Journal of Botany* 76(2): 380-387.
89. Liu J., Shi D.C. 2010. Photosynthesis, chlorophyll fluorescence, inorganic ion and organic acid accumulations of sunflower in responses to salt and salt-alkaline mixed stress. *Photosynthetica* 48(1): 127-134.
90. Liu Y., Zhang X., Tran H., Shan L., Kim J., Childs K., Ervin E. H., Frazier T., Zhao B. 2015. Assessment of drought tolerance of 49 switchgrass (*Panicum virgatum*) genotypes using physiological and morphological parameters. *Biotechnology for Biofuels* 8:152.

91. Liu Y., Zhang X., Miao J., Huang L., Frazier T., Zhao B. 2014. Evaluation of salinity tolerance and genetic diversity of thirty-three switchgrass (*Panicum virgatum*) populations. *BioEnergy Research* 7(4): 1329-1342.
92. Lodge, G.M., Brennan, M., Harden, S. 2010. Field studies of the effects of pre-sowing weed control and time of sowing on tropical perennial grass establishment, North-West Slopes, New South Wales. *Crop and Pasture Science* 61(2): 182-191.
93. Maathuis F.; Amtmann A. 1999. K⁺ Nutrition and Na⁺ Toxicity: The Basis of Cellular K⁺/Na⁺ Ratios. *Annals of Botany* 84:123-133.
94. Machado de Mello A., Streck N.A., Blankenship E.E., Papparozzi E. 2009. Gibberellic acid promotes seed germination in *Penstemon digitalis* cv. Husker. *Hortscience* 44(3): 870-873.
95. Madakadze I.C., Madakadze R. M., Stewart K., Smith D.L. 2000. Effect of preplant seed conditioning treatment on the germination of switchgrass (*Panicum virgatum* L.). *Seed Science and Technology* 28(2): 403-411.
96. Mansour M.M.F. 2000. Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. *Biol. Plant.* 43: 491-500.
97. Markan E., La Greca C., Gago A., Pesqueira J., García M.D. 2013. Germinación de semillas de *Panicum virgatum* L. bajo estrés por salinidad y alcalinidad. 34° Jornadas Argentinas de Botánica. Res. p. 190.
98. Martín B., Sosa O., Zerpa G., Acebal M. A., Magra G. 2008. Características de una pastura en implantación en sectores con diferencias microaltimétricas en un área deprimida. *Revista Científica Agropecuaria* 12(1): 25-33.
99. McLaughlin S.B., Kszos L.A. 2005. Development of switchgrass (*Panicum virgatum*) as a bioenergy feedstock in the United States. *Biomass and Bioenergy* 28(6): 515-535.

100. Miaczynski C. 1995. Los suelos hidromórficos e hidrohalmórficas de la provincia de Buenos Aires. Rev. Fac. Agr. 15: 23-36.
101. Miller G.W., Pushnik J.C., Welkie, G.W. 1984. Iron chlorosis, a world wide problem, the relation of chlorophyll biosynthesis to iron. Journal of Plant Nutrition 7(1-5): 1-22.
102. Mitchell R., Vogel K.P., Schemer M. 2016. Switchgrass (*Panicum virgatum*) for biofuel production. Extension. url: <http://articles.extension.org/pages/26635/switchgrass-panicum-virgatum-for-biofuel-production>
103. Moeinzadeh A., Sharif-Zadeh F., Ahmadzadeh M., Tajabadi F.H. 2010. Biopriming of sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed with *Pseudomonas fluorescens* for improvement of seed invigoration and seedling growth. Australian Journal of Crop Science 4(7): 564-570.
104. Mohammadi, G.R. 2009. The influence of NaCl priming on seed germination and seedling growth of canola (*Brassica napus* L.) under salinity conditions. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science 5(5): 696-700.
105. Munns R. 1993. Physiological processes limiting plant growth in saline soil: some dogmas and hypotheses. Plant Cell Environ. 16: 15-24.
106. Munns R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. Plant Cell Environ. 25: 239-250.
107. Munns R., James R.A., Läuchli A. 2006. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. J. Exp. Bot. 57 (5): 1025-1043.
108. Munns R., Tester M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. Annu. Rev. Plant Biol. 59: 651-81.

109. Mwale S.S., Hamusimbi C., Mwansa K. 2003. Germination, emergence and growth of sunflower (*Helianthus annuus* L.) in response to osmotic seed priming. *Seed Sci. Technol.* 31: 199-206.
110. Naeem M.A., Muhamad S. 2006. Effect of seed priming on growth of barley (*Hordeum vulgare*) by using brackish water in salt affected soils. *Pak. J. Bot.* 38(3): 613-622.
111. Nasim, M., Qureshi, R., Aziz, T., Saqib, M., Nawaz, S., Sahi, S.T. and Pervaiz, S. 2008. Growth and ionic composition of salt stressed *Eucalyptus camaldulensis* and *Eucalyptus teretecornis*. *Pakistan Journal of Botany* 40: 799-805.
112. Nawaz K., Ashraf M. 2007. Improvement in salt tolerance of maize by exogenous application of glycinebetaine: growth and water relations. *Pak. J. Bot.* 39: 1647-1653.
113. Nawaz J., Hussain M., Jabbar A., Nadeem G. A., Sajid M., Subtain M., Shabbir I. 2013. Seed priming a technique. *International Journal of Agriculture and Crop Science*. Vol. 6 (20), 1373-1381.
114. Ochoa M.A. 2011. Producción de forraje en suelos salinos. INTA. url: <http://inta.gob.ar/documentos/produccion-de-forraje-en-suelos-salinos>
115. Oi T., Hirunagi K., Taniguchi M., Miyake H. 2013. Salt excretion from the salt glands in Rhodes grass (*Chloris gayana* Kunth) as evidenced by low-vacuum scanning electron microscopy. *Flora* 208(1): 52-57.
116. Ortega L., Fry S.C., Taleisnik E. 2006. Why are *Chloris gayana* leaves shorter in salt-affected plants? Analyses in the elongation zone. *Journal of Experimental Botany* 57(14): 3945–3952.
117. Otondo J. 2011. Efectos de la introducción de especies megatérmicas sobre características agronómicas y edáficas de un ambiente halomórfico de la Pampa

- Inundable. Tesis presentada para optar al título de Magister de la Universidad de Buenos Aires, Área Recursos Naturales.
118. Otondo, J., Pesqueira, J., Markan, E., García, M.D. 2014. Implantación de *Panicum coloratum* 382 y *Chloris gayana* en suelos bajos salino-alcálinos. Tercera Reunión de la Red Argentina de 383 Salinidad. Chascomús, Buenos Aires
 119. Pallaoro D.S., Dallabrida Avelino A.C., Camili E.C., Guimarães S.C., de Figueiredo e Albuquerque, M.C. 2016. Priming corn seeds with plant growth regulator. *Journal Seed Science* 38 (3): 227-232.
 120. Pang C.H, Wang B.S. 2008. Oxidative stress and salt tolerance in plants. *Progress in Botany* 69: 231-245.
 121. Parida A.K. y Das A.B. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60: 324-349.
 122. Patade V.Y., Bhargava S., Suprasanna P. 2009. Halopriming imparts tolerance to salt and PEG induced drought stress in sugarcane. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 134(1-2): 24-28.
 123. Paz R.C., Rocco R.A., Reinoso H., Menéndez A.B., Pieckenstain F.L., Ruiz O.A. 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*. *J. Plant Growth Regulation* 31(3): 448-459.
 124. Peng Y.L., Gao Z.W., Gao Y., Liu G.F., Sheng L.X., Wang D.L. 2008. Ecophysiological characteristics of alfalfa seedlings in response to various mixed salt-alkaline stresses. *J. Integr. Plant Biol.* 50(1): 29-39.
 125. Peretti A. 1994. Manual para análisis de semillas. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina.

126. Pérez R.A. , Rossi C.A., Otondo J., Torr  E., Bidart A. 2007. Implantación de gramíneas subtropicales en bajos alcalino-sódicos del pastizal de la Cuenca del Salado. Primera evaluación. Sitio Argentino de Producción Animal, 11 pp. url: https://www.researchgate.net/publication/237653646_Implantacion_de_Gramineas_Subtropicales_en_Bajos_Alcalino-Sodicos_del_Pastizal_de_la_Cuenca_del_Salado_Primer_Evaluacion
127. Pesqueira, J., Huarte, R. H. y 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), pp. 79–86.
128. 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*. 2014. Tercera Reunión de la Red Argentina de Salinidad. Res. p. 81.
129. 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. RIA (en prensa).
130. 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(1): 57-72.
131. Puchulu M.E. 2008. Salinización de los suelos. Su incidencia en la provincia de Tucumán y en la República Argentina. Acta Geológica Lilloana 21(1): 81-94.
132. Radi A.A., Abdel-Wahab D.A., Hamada A.M. 2012. Evaluation of some bean lines tolerance to alkaline soil. Journal of Biology and Earth Sciences 2(1): 18-27.

133. Raeber A.C., Lee C.W. 1991. Gibberellic acid, temperature, light, stratification, and salinity affect germination of *Penstemon parryi* seed. Hortscience 26(12): 1535-1537.
134. Rajjou L., Belghazi M., Huguet R., Robin C., Moreau A., Job C., Job D. 2006. Proteomic investigation of the effect of salicylic acid on *Arabidopsis* seed germination and establishment of early defense mechanisms. Plant Physiology 141: 910-923.
135. 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.
136. Rinehart L. 2006. Switchgrass as a Bioenergy Crop. ATTRA - National Sustainable Agriculture Information Service.
137. 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*. BiolFertil Soils 46: 499-509.
138. Roy N.K., Srivastava A. K. 2000. Adverse effect of salt-stress conditions on chlorophyll content in wheat (*Triticum aestivum*) leaves and its amelioration through pre-soaking treatments. Indian Journal of Agricultural Sciences 70(11): 777-778.
139. Russell J.S. 1976. Comparative salt tolerance of some tropical and temperate legumes and tropical grasses. Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry 16: 103-109.

140. Saeedipour S. 2013. Effects of seed priming phytohormone on germination and seedling growth of maize with different duration of treatment. *Scientific Journal of Agronomy and Plant Breeding* 1(3): 37-43.
141. Sánchez R.M., Dunuel Guerra L., Scherger M. 2009. 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
142. Sanderson M.A., Adler P.R., Boateng A.A., Casler M.D., Sarath G. 2006. Switchgrass as a biofuels feedstock in the USA. *Canadian J. Plant Sci.* 86: 1315-1325.
143. 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 Regul.* 62: 21-30.
144. 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.
145. Schmer M.R., Xue Q., Hendrickson J.R. 2012. Salinity effects on perennial, warm-season (C_4) grass germination adapted to the northern Great Plains. *Can. J. Plant Sci.* 92: 873-881.
146. Seepaul R., Macoon B., Reddy K.R, Baldwin B. 2011. Switchgrass (*Panicum virgatum* L.) intraspecific variation and thermo tolerance classification using *in vitro* seed germination assay. *American Journal of Plant Sciences* 2: 134-147.
147. Senaratna T., Touchell D., Bunn E., Dixon K. 2000. Acetyl salicylic acid (Aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. *Plant Growth Regulation* 30(2): 157-161.

148. Sharma S. K. 1986. Mechanism of tolerance in rice varieties differing in sodicity tolerance. *Plant and Soil* 93: 141-145.
149. Sierra E.M., Hurtado R.H., Spescha L. 1994. Corrimiento de las isoyetas anuales medias decenales de la Región Pampeana. *Rev. Facultad de Agronomía* 14(2): 139-144.
150. Singh B., Usha K. 2003. Salicylic acid induced physiological and biochemical changes in wheat seedlings under water stress. *Plant Growth Regulation* 39(2): 137-141.
151. 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. *J. Agron. Crop Sci.* 193: 398-412.
152. Singh R.K., Mishara B., Chauhan M.S., Yeo A.R., Flowers S.A., Flowers T.J. 2002. Solution culture for screening rice varieties for sodicity tolerance. *J. Agr. Sci.* 139: 327-333.
153. Sivritepe N., Sivritepe H.O., Eris A. 2003. The effects of NaCl priming on salt tolerance in melon seedlings grown under saline conditions. *Scientia Horticulturae* 97(3-4): 229-237.
154. Sneideris L.C., Gavassi M.A., Campos M.L., D'Amico-Damião V., Carvalho R.F. 2015. Effects of hormonal priming on seed germination of pigeon pea under cadmium stress. *An. Acad. Bras. Cienc.* 87(3): 1847-52.
155. 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.
156. Tabatabaei S.A. 2014. The effects of salinity stress on seed reserve utilization and germination percentage of treated seeds of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Cercetări Agronomice în Moldova* 1(157): 23-29.

157. Taghvaei M., Khaef N., Sadeghi H. 2012. The effects of salt stress and prime on germination improvement and seedling growth of *Calotropis procera* L. seeds. J. Ecol. Field Biol. 35(2): 73-78.
158. Taleisnik E., Pérez 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.
159. Taleisnik E., Peyrano G., Arias C. 1997. Response of *Chloris gayana* cultivars to salinity. Germination and early vegetative growth. Tropical Grassland 31: 232-240.
160. Tang C., Cogley B.T, Mokhtara S., Wilson C.E., Greenway H. 1993. High pH in the nutrient solution impairs water uptake in *Lupinus angustifolius* L. Plant and Soil 155(1): 517-519.
161. Tester M., Davenport R. 2003. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. Ann. Bot. 91: 503-527.
162. Timson J. 1965. New method of recording germination data. Nature, N° 4993.
163. Tsegay B.A., Gebreslassie B. 2014. The effect of salinity (NaCl) on germination and early seedling growth of *Lathyrus sativus* and *Pisum sativum* var. abyssinicum. Afr. J. Plant Sci. 8(5): 225-231.
164. Tzortzakis N.G. 2009. Effect of pre-sowing treatment on seed germination and seedling vigour in endive and chicory .Hort. Sci. 36(3): 117-125.
165. Valdez Aguilar L.A., Reed D.W. 2006. Comparison of growth and alkalinity-induced responses in two cultivars of hibiscus (*Hibiscus rosa-sinensis* L.). Hort. Sci. 41(7): 1704-1708.
166. Varier A., Kuriakose Vari A., Dadlani M. 2010. The subcellular basis of seed priming. Current Science 9(4): 450-456.

167. Viégas R.A, da Silveira J., de Lima Junior A. R., Queiroz J.E., Fausto M. 2001. Effects of NaCl-salinity on growth and inorganic solute accumulation in young cashew plants. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 5(2): .216-222.
168. Villafañe, R. 2000. Calificación de los suelos por sales y dispersión por sodio y su aplicación en la evaluación de tierras. *Agronomía tropical* 50(4): 645-658.
169. 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 Environ.* 57: 286-294.
170. Wang Z., Huang B., 2004. Physiological recovery of Kentucky bluegrass from simultaneous drought and heat stress. *Crop Sci.* 44: 1729-1736.
171. Wani A.S, Ahmad A., Hayat S., Fariduddin Q. 2013. Salt-induced modulation in growth, photosynthesis and antioxidant system in two varieties of *Brassica juncea*. *Saudi Journal of Biological Sciences* 20(2): 183-193.
172. Wehr J.B., Kopittke P.M., Dalzell S.A., Menzies N.W. 2016. Germination of leucaena and Rhodes grass seeds in saline and alkaline conditions. *Seed Science and Technology* 44: 1-14.
173. 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 Environ. Sci.* 4: 2669-2681.
174. Wolf, D.D., Fiske, D.A. 1995. Planting and managing switchgrass for forage, wildlife, and conservation. *Virginia Cooperative Extension Publication* 418-013.
175. Yang C., Guo W., Shi D. 2010. Physiological roles of organic acids in alkali-tolerance of alkali-tolerant halophyte *Chloris virgata*. *Agronomy Journal.* 102: 1081–1089.

176. Yang C. W., Wang P., Li C. Y., Shi D. C., Wang D. L. 2008. Comparison of effects of salt and alkali stresses on the growth and photosynthesis of wheat. *Photosynthetica* 46(1): 107-114.
177. Yoshiba Y., Kiyosue T., Nakashima K., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. 1997. Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. *Plant Cell Physiol* 38:1095-1102
178. Younesi O., Moradi A. 2015. Effect of different priming methods on germination and seedling establishment of two medicinal plants under salt stress conditions. *Cercetări Agronomice în Moldova* 3 (163): 43-51.
179. Zhang H. X., Zhou D. W., Tian Y., Huang X.Y., Sun Z.W. 2012. Comparison of seed germination and early seedling growth responses to salinity and temperature of the halophyte *Chloris virgata* and the glycophyte *Digitaria sanguinalis*. *Grass and Forage Science* 68: 596-604.
180. Zhang J., Mu C. 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: 685-697.
181. Zhu J.K. 2002. Salt and Drought Stress Signal Transduction in Plants. *Annu Rev Plant Biol.* 53: 247-273.
182. Zhu J-K. 2001. Plant salt tolerance. *Trends in Plant Sci.* 6: 66-71.

