

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA**

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA  
AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL**

**DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN VEGETAL**



**UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA**

**Obtención de híbridos de maíz y *Tripsacum  
dactyloides* y evaluación de su utilidad  
potencial en la mejora genética del maíz.**

**TESIS DOCTORAL**

**PRESENTADA POR:**

**María Dina García**

**DIRIGIDA POR:**

**Vicente Moreno Ferrero**

**Valencia, 2012**



Don Vicente Moreno Ferrero Catedrático de Genética del Departamento de Biotecnología de la Universidad Politécnica de Valencia adscrito al Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (centro mixto UPV - CSIC).

Certifica:

Que la memoria titulada “Obtención de híbridos de maíz y *Tripsacum dactyloides* y evaluación de su utilidad potencial en la mejora genética del maíz” presentada por Dña. María Dina García para optar al grado de Doctor Ingeniero Agrónomo ha sido realizada bajo su dirección.

Y para que así conste a todos los efectos y a petición de la persona interesada se expide el presente certificado en Valencia.

Mayo del año 2012.

Vicente Moreno Ferrero



## **AGRADECIMIENTOS**

A mi director de tesis.

A la Universidad Nacional de Lomas de Zamora.

A la Universidad Politécnica de Valencia.

Al Instituto Fitotécnico de Santa Catalina, FCA, UNLP.

A mi familia.



# ÍNDICES

## 1. ÍNDICE TEMÁTICO

Tema	Página
ÍNDICES	IV
1. ÍNDICE TEMÁTICO	IV
2. ÍNDICE DE TABLAS	VII
3. ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS	IX
4. ÍNDICE DE FIGURAS	X
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	XIV
TÍTULO Y AUTOR	1
RESUMEN	2
RESUM	5
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN GENERAL Y ANTECEDENTES	11
1. Situación y problemática	11
1.1. Aprovechamiento de la variabilidad interespecífica para el mejoramiento de los cultivos	11
1.2. Características de los suelos salinos de la provincia de Buenos Aires (Argentina)	12
2. Características del género <i>Tripsacum</i>	15
3. Hibridación de los géneros <i>Zea</i> y <i>Tripsacum</i>	20
3.1. Obtención y análisis citogenético de las plantas híbridas	20
3.2. Fertilidad de las plantas híbridas	21
3.3. Evaluación de la utilidad agronómica de los híbridos	22
4. Nivel de tolerancia a la salinidad y/o alcalinidad del maíz, el <i>T. dactyloides</i> y los híbridos entre las dos especies	23
5. Influencia del estadio de crecimiento de la planta sobre la tolerancia a la salinidad en el maíz	27
6. Parámetros fisiológicos afectados por la salinidad en el maíz y otras plantas cultivadas	28

6.1. La salinidad induce una respuesta bifásica en el crecimiento	29
6.2. Mecanismos involucrados en la reducción del crecimiento causada por la salinidad	30
6.2.1. Hojas	30
6.2.2. Raíces	34
6.3. Relación tallo/raíz	35
6.4. Relaciones hídricas	37
6.5. Daño oxidativo, contenido de pigmentos foliares e integridad y funcionalidad de las membranas celulares	39
6.6. Masa foliar seca por unidad de área foliar (MFE)	43
7. Control de la absorción y transporte del Na <sup>+</sup> en las plantas	44
7.1. Bombas primarias y transportadores de Na <sup>+</sup> de las células vegetales	44
7.2. Termodinámica del transporte de Na <sup>+</sup> en la raíz	47
7.2.1. Influjos de Na <sup>+</sup>	47
7.2.2. Eflujos de Na <sup>+</sup>	48
7.3. Compartimentalización intracelular de Na <sup>+</sup>	49
7.4. Efecto de la concentración de Ca <sup>2+</sup> en la solución nutritiva sobre el influjo neto de Na <sup>+</sup>	49
7.5. Papel de la exclusión del Na <sup>+</sup> en la tolerancia a la salinidad en el maíz	50
HIPÓTESIS DE TRABAJO	53
OBJETIVOS	54
CAPÍTULO I. Regeneración de plantas a partir de embriones inmaduros de <i>Zea mays</i> ssp. <i>mays</i> x <i>Tripsacum dactyloides</i> (L.) L.	56
1. INTRODUCCIÓN	56
2. MATERIALES Y MÉTODOS	58
3. RESULTADOS	60
4. DISCUSIÓN	68



<b>5. CONCLUSIONES</b>	71
CAPÍTULO II. Respuestas a la salinidad y la alcalinidad de maíz, <i>Tripsacum</i> y generaciones avanzadas del híbrido de maíz x <i>Tripsacum</i>	72
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	72
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	77
<b>2.1. Obtención y análisis citogenética de los híbridos</b>	77
<b>2.2. Obtención de las plántulas</b>	78
<b>2.3. Pre-tratamiento del sustrato</b>	80
<b>2.4. Tratamientos y condiciones de cultivo</b>	80
<b>2.5. Mediciones</b>	84
<b>2.6. Análisis de los datos</b>	88
<b>3. RESULTADOS</b>	89
<b>3.1. Experimento I. Efectos de la salinidad y alcalinidad sobre maíz y <i>T. dactyloides</i></b>	89
<b>3.1.1. Efectos del tampón Tris</b>	89
<b>3.1.2. Efectos de la alcalinidad y la salinidad</b>	92
<b>3.1.2.1. Evolución del pH en las soluciones nutritivas</b>	92
<b>3.1.2.2. Efecto de la salinidad y la alcalinidad sobre las plantas de maíz y <i>T. dactyloides</i></b>	94
<b>3.1.2.2.1. Crecimiento</b>	94
<b>3.1.2.2.2. Desarrollo</b>	98
<b>3.1.2.2.3. Contenido Relativo de Agua (CRA), Porcentaje de Pérdida de Electrolitos (PPE) y Masa Foliar Específica (MFE)</b>	103
<b>3.1.2.2.4. Contenido foliar de pigmentos (clorofila a, b y carotenoides) y relación clorofilas a/b</b>	106
<b>3.1.2.2.5. Contenido de cationes</b>	107
<b>3.2. Experimento II: Efectos de la salinidad sobre maíz y generaciones avanzadas de un híbrido de maíz x <i>T. dactyloides</i></b>	116
<b>3.2.1. Obtención y características de los híbridos</b>	116
<b>3.2.2. Efectos de la salinidad sobre las plantas</b>	122

3.2.2.1. Crecimiento	122
3.2.2.2. Desarrollo	125
3.2.2.3. Contenido relativo de agua (CRA), Masa foliar específica (MFE) y Porcentaje de pérdida de electrolitos foliares (PPE <sub>f</sub> )	127
3.2.2.4. Contenido de pigmentos foliares	127
3.2.2.5. Contenido de iones	130
4. DISCUSIÓN	135
4.1. Obtención y evaluación de generaciones avanzadas de un híbrido de maíz x <i>T. dactyloides</i>	135
4.2. Evaluación de la tolerancia a la salinidad de maíz, <i>T. dactyloides</i> y generaciones avanzadas de un híbrido entre ambas especies	136
5. CONCLUSIONES	166
CONSIDERACIONES FINALES	169
CONCLUSIONES GENERALES	174
BIBLIOGRAFÍA	177

## 2. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Taxón, nivel de ploidía y número cromosómico de las especies del género <i>Tripsacum</i> (Kindiger y Dewald, 1997; Li <i>et al.</i> , 1999; de Wet <i>et al.</i> , 1981).	17
Tabla 2. Umbral de conductividad eléctrica (CE <sub>u</sub> , dS m <sup>-1</sup> ) y pendiente ( <i>b</i> , % de reducción del rendimiento/dS m <sup>-1</sup> ) de acuerdo al análisis de regresión de los tratamientos salinos.	25
Tabla 3. Regeneración, porcentajes de supervivencia e incremento diario relativo de peso de callos de un híbrido F1 de maíz x <i>T. dactyloides</i> expuestos a diferentes concentraciones de NaCl (adaptado de Pesqueira <i>et al.</i> , 2003).	26
Tabla 4. Peso fresco y seco del vástago y la raíz de plantas de un híbrido de maíz x <i>T. dactyloides</i> regadas con 250 mM de NaCl y con agua corriente (control) durante 20 días (adaptado de Pesqueira <i>et al.</i> , 2006).	27

Tabla 5. Tamaño promedio de embriones híbridos de maíz y <i>T. dactyloides</i> , cosechados a los 13, 14 y 15 días después de la polinización (DDP).	61
Tabla 6. Regeneración de plantas a partir de embriones híbridos de maíz y <i>T. dactyloides</i> , rescatados entre los 13 y 15 DDP y sembrados en el medio básico de García <i>et al.</i> (1992) con el agregado de 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D.	63
Tabla 7. Respuestas observadas a los 25-30 DDS en embriones híbridos de maíz y <i>T. dactyloides</i> , sembrados en presencia de 4,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de 2,4-D.	65
Tabla 8. Respuestas de los embriones híbridos de maíz (♀) y <i>T. dactyloides</i> (♂), aislados del cariopses a diferentes tiempos después de la polinización y cultivados en el medio nutritivo de García <i>et al.</i> , (1992) libre de reguladores del crecimiento.	67
Tabla 9. Contenido de NaCl y valores (mediana $\pm$ mínimo y máximo) de pH y conductividad, medidos en las soluciones nutritivas frescas.	81
Tabla 10. Concentración de sales de la solución nutritiva básica (adaptada de la solución nutritiva N6, Chu <i>et al.</i> , 1978).	82
Tabla 11. Concentración de macro y micronutrientes de la solución nutritiva básica utilizada (adaptada de la solución nutritiva N6, Chu <i>et al.</i> , 1978).	83
Tabla 12. Composición de la solución nutritiva (control) utilizada para el crecimiento de las plantas a partir de los 7 dds (maíz e híbridos MT41 y MT51) ó 14 dds ( <i>Tripsacum</i> ).	84
Tabla 13. Efecto de la adición de $\text{mmol L}^{-1}$ de Tris 5 en la solución de crecimiento (manteniendo el pH = 5,8) sobre varios parámetros fisiológicos en maíz y <i>T. dactyloides</i> .	91
Tabla 14. Efecto de la adición de 5 $\text{mmol L}^{-1}$ de Tris en la solución de crecimiento (pH=5,8) sobre el contenido de cationes de maíz y <i>T. dactyloides</i> .	92
Tabla 15. Peso seco de la parte aérea y la raíz y relación tallo/raíz de maíz y <i>T. dactyloides</i> creciendo en soluciones nutritivas con diferentes concentraciones de NaCl (1 y 101 mM) pH (5,8 y 8,5).	95
Tabla 16. Pesos secos relativos al control (NaCl 1 mM y pH 5,8) de la parte aérea y la raíz de maíz y <i>T. dactyloides</i> creciendo en soluciones nutritivas con diferentes	96

concentraciones de NaCl (1 y 101 mM) pH (5,8 y 8,5).

Tabla 17. Días desde la siembra a la emergencia de las hojas en plantas de maíz cultivadas en soluciones nutritivas con diferente pH y concentración de NaCl. 199

Tabla 18. Días desde la siembra a la emergencia de las hojas en plantas de *T. dactyloides* cultivadas en soluciones nutritivas con diferente pH y concentración de NaCl. 100

Tabla 19. Filocrono promedio ( $\pm$  EEM) de plantas de maíz y *Tripsacum* cultivadas con distintos niveles de alcalinidad y salinidad. 102

Tabla 20. Efectos de la concentración de NaCl (1 y 101 mM de NaCl) y el pH (5,8 y 8,5) de la solución nutritiva sobre el contenido relativo de agua (CRA) foliar y la pérdida de electrolitos de las hojas y las raíces de maíz y *Tripsacum*. 104

Tabla 21. Contenido de pigmentos foliares de plantas de maíz y *T. dactyloides* cultivadas en soluciones nutritivas con diferente pH y concentración de NaCl. 106

Tabla 22. Comparación de la concentración de  $\text{Na}^+$  de la parte aérea y la raíz de plantas de maíz y *Tripsacum* cultivadas con dos niveles de salinidad (1 y 101 mM de NaCl) y alcalinidad (pH 5,8 y 8,5). 113

Tabla 23. Efectos de la salinidad y la alcalinidad de la solución nutritiva sobre las concentraciones foliares de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  de maíz (línea B73) y *T. dactyloides*. 115

Tabla 24. Fertilidad (promedio  $\pm$  DE) y diámetro del polen de plantas de la segunda progenie de un híbrido de maíz x *T. dactyloides*. 122

Tabla 25. Efecto del genotipo sobre el peso seco del vástago, la raíz, la biomasa total y la relación vástago/raíz de plantas de maíz (línea B73) y generaciones avanzadas (MT41 y MT51) de un híbrido de maíz x *T. dactyloides*. 123

Tabla 26. Peso seco relativo al control (%) del vástago, la raíz y la biomasa total de plantas de maíz (línea B73) y generaciones avanzadas (MT41 y MT51) de un híbrido de maíz x *T. dactyloides* cultivadas con NaCl 101 mM. 124

Tabla 27. Días desde la siembra a la emergencia de las hojas en plantas de maíz (línea B73) y generaciones avanzadas (MT41 y MT51) de un híbrido de maíz x *T. dactyloides* cultivadas con 1 y 101 mM. 126

Tabla 28. Filocrono promedio ( $\pm$  EEM) entre la aparición de la tercera y la quinta hoja de plantas del maíz (línea B73) y generaciones avanzadas (MT41 y MT51) de un híbrido de maíz x *T. dactyloides*. 127

Tabla 29. Contenido de clorofila foliar total en plantas de maíz (línea B73) y generaciones avanzadas (MT41 y MT51) de un híbrido de maíz x *T. dactyloides* cultivadas con dos niveles de NaCl (1 y 101 mM). 130

#### 4. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. <i>T. dactyloides</i> (L.) L. (2n=72). a) Cultivo en Santa Catalina (provincia de Buenos Aires, Argentina) 1 año después de la siembra. b) Detalle de la inflorescencia.	19
Figura 2. Clasificación realizada por Maas y Hoffman (1977) que establece rangos de tolerancia relativa a la salinidad para varias especies cultivadas.	24
Figura 3. Modelo simplificado de los sistemas de percepción y extrusión en respuesta a un estrés salino y bombas primarias de las membranas de células vegetales.	45
Figura 4. Proteínas de las membranas celulares involucradas en el mantenimiento de la homeostasis celular en condiciones de salinidad.	46
Figura 5. Transporte de Na <sup>+</sup> y Cl <sup>-</sup> en las interfases suelo-raíz y células de la estela-vasos xilemáticos de la raíz.	47
Figura 6. Tamaño de los embriones híbridos de distintos genotipos de maíz y <i>T. dactyloides</i> en el momento del rescate de los mismos: a) ZchxT; b) CKxT.	62
Figura 7. Tamaño inicial de los embriones híbridos de maíz y <i>T. dactyloides</i> , sembrados en el medio básico de García <i>et al.</i> (1992) con el agregado de 4,6 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de 2,4-D.	63
Figura 8. Rescate de embriones de híbridos de <i>Z. mays</i> ssp. <i>mays</i> cv. Zapalote chico y <i>T. dactyloides</i> .	66
Figura 9. Híbrido de maíz x <i>T. dactyloides</i> : a) célula somática en metafase, b) Planta adulta.	67
Figura 10. Plantas de maíz (línea B73) y de la progenie de un	79

híbrido de maíz x *T. dactyloides* (MT41 y MT51) el día 7 después de la siembra.

Figura 11. Extracción de la cúpula y las glumas de las unidades de dispersión *T. dactyloides*. 80

Figura 12. Efecto de la adición de Tris sobre la evolución del pH en el transcurso del tiempo de la solución nutritiva de crecimiento sin plantas, con 1 ó 101 mM de NaCl. 90

Figura 13. Evolución de los valores de pH en las soluciones nutritivas sin plantas. Todas las soluciones contenían 5 mM de Tris. 93

Figura 14. Valores de pH en las soluciones nutritivas con plantas de maíz o *Tripsacum* entre los 6 y los 13 días desde el inicio de los tratamientos. 94

Figura 15. Plantas de maíz (línea B73) cultivadas en hidroponía a los 22 DDS (15 días después del comienzo de los tratamientos): a- control (1 mM NaCl, pH=5,8); b- Alcalinidad (1 mM NaCl, pH=8,5); c- Salinidad (101 mM NaCl, pH=5,8); d- Alc+sal (101 mM NaCl, pH=8,5). 97

Figura 16. Plantas de *Tripsacum dactyloides* cultivadas en hidroponía a los 38 DDS y 24 días después del comienzo de los tratamientos. 98

Figura 17. Tiempo térmico acumulado (base 10 °C) desde la siembra hasta la cosecha de las plantas. 99

Figura 18. Número de hojas emergidas en función del Tiempo Térmico en plantas de maíz creciendo en soluciones nutritivas con dos niveles de NaCl (mM) y pH: 1NaCl-pH 5,8; 1NaCl-pH=8,5; 101NaCl-pH=5,8-; 101NaCl-pH=8,5. 101

Figura 19. Número de hojas emergidas en función del Tiempo Térmico en plantas de *T. dactyloides* creciendo en soluciones nutritivas con dos niveles de NaCl (mM) y pH: 1NaCl-pH 5,8; 1NaCl-pH=8,5; 101NaCl-pH=5,8-; 101NaCl-pH=8,5. 102

Figura 20. Efectos de la concentración de NaCl (1 y 101 mM de NaCl) y el pH (5,8 y 8,5) sobre la masa foliar específica de maíz y *Tripsacum*. 105

Figura 21. Raíces de plantas de maíz (línea B73) cultivadas en hidroponía a los 22 DDS y 15 días después del comienzo de los tratamientos. 105

Figura 22. Contenido de pigmentos foliares de plantas de maíz y *T. dactyloides* cultivadas en soluciones nutritivas con 107

diferente pH y concentración de NaCl.

Figura 23. Efectos de la salinidad y la alcalinidad sobre el contenido de  $K^+$  y  $Na^+$  en la parte aérea y en la raíz de del maíz (línea B73) y *T. dactyloides*. 108

Figura 24. Efectos de la salinidad y la alcalinidad sobre el contenido de  $Ca^{2+}$  y la relación  $Ca^{2+}/Na^+$  foliar de maíz (línea B73) y *T. dactyloides*. 110

Figura 25. Efectos de la salinidad (1 y 101 mM de NaCl) y la alcalinidad (pH 5,8 y 8,5) de la solución de cultivo sobre la relación  $K^+/Na^+$  en la parte aérea de maíz (línea B73) y *T. dactyloides*. 111

Figura 26. Absorción (mmol  $Na^+$  total en la planta/g PS de raíz) y translocación a la parte aérea (contenido de  $Na^+$ /contenido de  $Na^+$  en la raíz) de  $Na^+$  en plantas de maíz y *T. dactyloides* cultivadas con dos niveles de salinidad (1 y 101 mM de NaCl) y alcalinidad (pH 5,8 y 8,5). 114

Figura 27. Plantas macolladoras de la tercera progenie de un híbrido de maíz x *T. dactyloides* en estado vegetativo: a) MT41, b) MT51. 116

Figura 28. Plantas de segunda progenie de un híbrido entre maíz ( $2n = 40$ ) y *T. dactyloides*. 117

Figura 29. Espigas y cariopses de *T. dactyloides* (a) e híbridos de maíz x *T. dactyloides* (b, c y d). 118

Figura 30. Cuarta progenie de un híbrido de maíz x *T. dactyloides*: a y b) Plantas; c, d y e) Espigas obtenidas a partir de la autofecundación de las plantas; d) MT41 y e) MT51. 119

Figura 31. Meiosis en plantas de la segunda progenie de un híbrido entre maíz ( $2n = 40$ ) y *T. dactyloides*. 120

Figura 32. Células en Anafase I de plantas segunda progenie de un híbrido entre maíz ( $2n = 40$ ) y *T. dactyloides*. 121

Figura 33. Frecuencia de plantas según la fertilidad del polen en las progenies 4 (P4) y 5 (P5) de un híbrido de maíz x *T. dactyloides*. El número de plantas analizadas fue de 12 y 40, para las progenies 4 y 5, respectivamente. 121

Figura 34. Efecto de la salinidad sobre el PS de la parte aérea, la raíz y la biomasa total y relación parte aérea/raíz del maíz (línea B73) y los híbridos MT41 y MT51. 124

Figura 35. Plantas de maíz (B73) y generaciones avanzadas 125

(MT51 y MT41) de un híbrido de maíz x <i>T. dactyloides</i> , 22 DDS.	
Figura 36. Tiempo térmico acumulado (base 10 °C) entre el inicio de los tratamientos y la aparición de la quinta hoja de las plantas.	126
Figura 37. Efecto de la salinidad sobre el CRA, el PPE y la MFE del maíz línea B73) y los híbridos MT41 y MT51.	128
Figura 38. Efectos de la salinidad sobre el contenido foliar de clorofila a, clorofila b, carotenoides y la relación clorofila a/b de la línea de maíz B73 y los híbridos MT41 y MT51 (generaciones avanzadas de maíz x <i>T. dactyloides</i> ).	129
Figura 39. Efectos de la salinidad sobre el contenido de K <sup>+</sup> y Na <sup>+</sup> en la parte aérea y en la raíz de la línea de maíz (línea B73) y los híbridos MT41 y MT51 (generaciones avanzadas de maíz x <i>T. dactyloides</i> ).	131
Figura 40. Efectos de la salinidad sobre el contenido de Ca <sup>2+</sup> en la parte aérea de maíz (línea B73) y los híbridos MT41 y MT51 (generaciones avanzadas de maíz x <i>T. dactyloides</i> ).	132
Figura 41. Efectos de la salinidad sobre la relación K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> en la parte aérea y en la raíz de la línea de maíz B73 y los híbridos MT41 y MT51 (generaciones avanzadas de maíz x <i>T. dactyloides</i> ).	133
Figura 42. Efectos de la salinidad sobre la absorción de Na <sup>+</sup> y su translocación hacia la parte aérea en el maíz (línea B73) y los híbridos MT41 y MT51 (generaciones avanzadas de maíz x <i>T. dactyloides</i> ).	134



## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

2,4-D	ácido 2,4-diclorofenoxiacético
$\mu\text{M}$	Micromolar
$\mu\text{mol}$	Micromol
$\Psi_a$	potencial hídrico
$\Psi_s$	potencial de soluto
ABA	ácido abscísico
$\text{abs}_{(470)}$	absorción en 470 nm de longitud de onda
$\text{abs}_{(647)}$	absorción en 647 nm de longitud de onda
$\text{abs}_{(663)}$	absorción en 663 nm de longitud de onda
ANVA	análisis de la varianza
atm	Atmósfera
atNHX	atiportador $\text{Na}^+/\text{H}^+$ de las endomembranas
B73	<i>Zea mays</i> ssp <i>mays</i> línea comercial B73 (2n = 20)
B73xT	<i>Zea mays</i> ssp <i>mays</i> línea comercial B73 x <i>T. dactyloides</i>
$\text{CE}_a$	conductividad eléctrica del agua
$\text{CE}_e$	conductividad eléctrica del extracto de saturación del suelo
$\text{CE}_u$	umbral de conductividad eléctrica
$C_i$	conductividad inicial
CK	<i>Zea mays</i> ssp <i>mays</i> cv. Colorado Kevin (2n = 20)
CKxT	<i>Zea mays</i> ssp <i>mays</i> cv. Colorado Kevin x <i>Tripsacum dactyloides</i>

Cla	clorofila a
Clb	clorofila b
CM	configuración meiótica
$C_m$	conductividad máxima
cm	Centímetro
CRA	contenido relativo de agua
DAF	desviación asociada a la frecuencia
DDP	días después de la polinización
DDS	días después de la siembra
DFFF	Densidad de flujo fotónico fotosintético
dS	deci Siemens
EEM	error estándar de la media
$F_v/F_m$	relación fluorescencia variable/fluorescencia máxima de la clorofila
g	Gramo
GD	grados día (°C día)
h	Hora
ha	Hectárea
HKT	transportadores de $K^+$ de alta afinidad (del inglés <i>high affinity K+ transporter</i> )
Kls	<i>Zea mays</i> ssp <i>mays</i> línea Knobless (2n = 20)
KlsxT	<i>Zea mays</i> ssp <i>mays</i> línea Knobless x <i>T. dactyloides</i>
L	Litro
<i>L</i>	conductividad hidráulica

LSD-test	(del inglés <i>least significance difference test</i> )
<i>m</i>	extensibilidad de la pared celular
mc	meristema caulinar
MDS	meses después de la siembra
MFE	masa foliar específica
mg	Miligramo
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
MPa	Megapascal
MT41	híbrido de maíz x <i>Tripsacum dactyloides</i> (cuarta generación)
MT51	híbrido de maíz x <i>Tripsacum dactyloides</i> (cuarta generación)
N107A	<i>Zea mays</i> ssp <i>mays</i> líneaN107A (2n = 40)
N107AxT	<i>Zea mays</i> ssp <i>mays</i> líneaN107A x <i>T. dactyloides</i>
NSCC	canal catiónico no selectivo (del inglés <i>non-selective cation channel</i> )
°C	grado centígrado
P2	progenie 2
Pf	peso fresco
P-H <sup>+</sup> -ATPasa	H <sup>+</sup> -ATPasa del plasmalema
pH <sub>i</sub>	pH inicial
PM	peso molecular

PPE	porcentaje de pérdida de electrolitos
PPE <sub>f</sub>	porcentaje de pérdida de electrolitos foliares
PPE <sub>r</sub>	porcentaje de pérdida de electrolitos de la raíz
PP <sub>i</sub>	pirofosfato inorgánico
PS	peso seco
PS <sub>control</sub>	peso seco promedio de las plantas cultivadas en la solución control
PS <sub>sal</sub>	peso seco de las plantas cultivadas en la solución de NaCl
Pt	peso turgente
S	Segundo
SN	solución nutritiva
SOS1	Del inglés salt overly sensitive 1
T <sub>b</sub>	temperatura base
T <sub>media</sub>	temperatura media
Tris	clorhidrato de Tris-ClH[hidroximetil]-aminometano
TT	tiempo térmico acumulado (°C día)
V-H <sup>+</sup> -ATPasa	H <sup>+</sup> -ATPasa vacuolar
Y	umbral de turgencia de la pared celular
Zch	<i>Zea mays</i> ssp <i>mays</i> var. Zapalote Chico (2n = 20)
ZchxT	<i>Zea mays</i> ssp <i>mays</i> var. Zapalote Chico x <i>T. dactyloides</i>

## TÍTULO Y AUTOR

Tesis Doctoral

**Obtención de híbridos de maíz y *Tripsacum dactyloides* y evaluación de su utilidad potencial en la mejora genética del maíz.**

**Doctorando: Ing. Agr. María Dina García**

Cátedra de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Lomas de Zamora, Ruta 4 km 2, 1836 Llavallol, Buenos Aires, Argentina. Tel/fax: 54-11-42827860.

Correo-e: mariadinagarcia@yahoo.com



## RESUMEN

Los objetivos de este trabajo fueron: i) Evaluar los efectos del tamaño del embrión, el genotipo y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) sobre la regeneración de plantas a partir de embriones híbridos de maíz x *T. dactyloides*; ii) Determinar el nivel de tolerancia a la salinidad y alcalinidad de *T. dactyloides* en estadio vegetativo temprano y compararlo con el del maíz (línea B73, ampliamente difundida como progenitora de híbridos comerciales) en las mismas condiciones; iii) Evaluar el comportamiento de generaciones avanzadas (MT41 y MT51 ) de un híbrido F1 ( $2n = 56$ ) de maíz x *T. dactyloides* altamente estéril que mostró tolerancia a la salinidad por NaCl. Para cumplir el primer objetivo, se polinizaron cuatro genotipos de maíz ( $2n = 20$ ) con *T. dactyloides* ( $2n = 72$ ). Los embriones se aislaron del cariopse a los 13, 14, 15, 16 ó 19 días después de la polinización y se colocaron sobre un medio básico sin reguladores de crecimiento ó con  $4,6 \mu\text{mol L}^{-1}$  de 2,4-D. Para cumplir el segundo objetivo, se cultivaron plantas de maíz y *T. dactyloides* en soluciones nutritivas que contenían 5 mM del tampón clorhidrato de Tris-ClH[hidroximetil]-aminometano y dos niveles de salinidad y dos pH diferentes: 1 mM NaCl-pH 5,8 (control); 1 mM NaCl-pH 8,5; 101 mM NaCl-pH 5,8; 101 mM NaCl-pH 8,5. Para cumplir el tercer objetivo, se cultivaron plantas de maíz (línea B73) y los híbridos MT41 y MT51 en soluciones nutritivas con pH 5,8 y dos niveles de salinidad: 1 y 101 mM de NaCl. Los tratamientos comenzaron a los 7 días (maíz e híbridos) y 14 días (*T. dactyloides*) después de la siembra (DDS) y las determinaciones se realizaron a los 22 y 38 DDS, respectivamente. Los embriones de 1,25 mm de longitud o menos originaron el 99,4 % de los callos con capacidad de regeneración. Tres de los híbridos originaron un número similar de plantas hasta los 6 meses después de la siembra de los embriones. El cuarto híbrido, obtenido del cruzamiento con la línea de maíz B73, dio lugar a callos caulogénicos, pero no se logró la elongación de los

brotos y la regeneración de plantas enteras. Los embriones sembrados en el medio sin 2,4-D no originaron plantas viables. Las plantas regeneradas tenían un número cromosómico somático de  $2n=46$ , características similares a las plantas de *T. dactyloides* y no produjeron semillas viables. *T. dactyloides* fue más sensible a la salinidad (101 mM-NaCl-pH 5,8) que el maíz (51 % vs. 28 % de reducción en el peso seco aéreo con relación al control, respectivamente). La alcalinidad (con 1 o 101 mM de NaCl) indujo reducciones similares del peso seco (PS) aéreo en maíz (45 % y 51 %, respectivamente) y *T. dactyloides* (51 % y 58 %, respectivamente). El PS de la raíz no se vio afectado por la salinidad ni por la alcalinidad. El contenido foliar de  $\text{Na}^+$  de *T. dactyloides* fue 3,7 veces menor que el del maíz. Esta diferencia puede explicarse por la menor absorción (acumulación de  $\text{Na}^+$  total en la planta/PS de la raíz) y translocación de  $\text{Na}^+$  hacia la parte aérea (acumulación total de  $\text{Na}^+$  en el tallo/ $\text{Na}^+$  en la raíz) de *T. dactyloides*, que en ambos casos son un 50 % menores. El único parámetro iónico afectado por la alcalinidad (pH = 8,5) fue el contenido de  $\text{Na}^+$  de la raíz de las plantas de *T. dactyloides* sometidas a estrés salino, las cuales mostraron un incremento del 24% con respecto a las cultivadas con pH 5,8. Las plantas de la segunda progenie del híbrido F1 ( $2n=56$ ) de maíz x *T. dactyloides* mostraron números cromosómicos de  $2n = 21$  y  $23$  (20 de maíz y el resto de *T. dactyloides*) y la fertilidad del polen varió del 31% al 97%. La fertilidad del polen también fue variable en la cuarta (36% al 99%) y quinta (0% al 99%) progenies del híbrido F1. La reducción del PS aéreo causada por la salinidad fue menor en el maíz (12 %) que en el híbrido MT41 (32 %), mientras que el híbrido MT51 (22 %) mostró valores intermedios. Solamente el porcentaje de pérdida de electrolitos foliares ( $\text{PPE}_f$ ) difirió entre los híbridos MT41 (16 %) y MT51 (14 %) y el maíz (12 %). La salinidad redujo el contenido relativo de agua (CRA) y el contenido de clorofila total en el maíz, *T. dactyloides* y los híbridos MT41 y MT51, pero no afectó el  $\text{PPE}_f$  ni la masa foliar específica (MFE), con respecto a



las plantas control. En condiciones de salinidad, el maíz y los híbridos MT41 y MT51 mostraron contenidos foliares de Na<sup>+</sup> similares (0,74; 0,78 y 0,82 mmol g<sup>-1</sup> de PS; respectivamente). El nivel de tolerancia de los híbridos MT41 y MT51 (generaciones avanzadas de un híbrido F1 de maíz x *T. dactyloides* tolerante a la salinidad) fue similar al del maíz y mayor al de *T. dactyloides*. La mayoría de los parámetros evaluados (CRA, MFE, PPE<sub>f</sub>, contenido de clorofila total) mostraron una respuesta a la salinidad similar en maíz y *T. dactyloides*. Más aún, *T. dactyloides* mostró una mayor eficiencia que el maíz en algunos algunos parámetros iónicos asociados con la tolerancia a la salinidad, tales como la capacidad de mantener una baja concentración foliar de Na<sup>+</sup> y una menor absorción y translocación de Na<sup>+</sup> hacia la parte aérea. Estas características no se observaron en los híbridos MT41 y MT51, los cuales mostraron valores similares al maíz en la mayoría de los parámetros evaluados, ya sea en presencia o no de salinidad. En este contexto, la mayor sensibilidad de *T. dactyloides* a la salinidad, en comparación con la del maíz, estaría relacionada, al menos en parte, con una diferente respuesta a nivel del tejido foliar, *i.e.* una menor capacidad de compartimentación del Na<sup>+</sup> hacia la vacuola. Probablemente, los parámetros iónicos favorables de *T. dactyloides*, si bien no confieren por sí mismos tolerancia en la especie, combinados con mecanismos presentes en el maíz resultaron en una tolerancia a la salinidad mejorada en el híbrido F1 (Pesqueira *et al.*, 2006), con respecto a las especies parentales.

**Palabras clave:** maíz, *T. dactyloides*, híbridos interespecíficos, incompatibilidad post-cigótica, caulogénesis, salinidad, alcalinidad, contenido foliar de Na<sup>+</sup>, contenido relativo de agua, masa foliar específica, contenido de clorofila.



## RESUM

Els objectius d'aquest treball han sigut: i) Avaluar els efectes de la grandària de l'embrió, el genotip i l'àcid 2,4-diclorofenoxiacètic (2,4-D) sobre la regeneració de plantes a partir d'embrions híbrids de dacsca x *T. dactyloides*; ii) Determinar el nivell de tolerància a la salinitat i alcalinitat de *T. dactyloides* en estadi vegetatiu primerenc i comparar-ho amb el de la dacsca (línia B73, àmpliament difosa com a progenitora d'híbrids comercials) en les mateixes condicions; iii) Avaluar el comportament de generacions avançades (MT41 i MT51) d'un híbrid F1 ( $2n = 56$ ) de dacsca x *T. dactyloides* altament estèril que ha mostrat tolerància a la salinitat per NaCl. Per a complir el primer objectiu, s'han pol·linitzat quatre genotips de dacsca ( $2n = 20$ ) amb *T. dactyloides* ( $2n = 72$ ). Els embrions s'han aïllat del cariopsi als 13, 14, 15, 16 o 19 dies després de la pol·linització i s'han posat sobre un medi bàsic sense reguladors de creixement o amb  $4,6 \mu\text{mol L}^{-1}$  de 2,4-D. Per a complir el segon objectiu, s'han conreat plantes de dacsca i *T. dactyloides* en solucions nutritives que contenien 5 mm del tampó clorhidrat de Tris-ClH[hidroximetil]-aminometà i dos nivells de salinitat i dos pH diferents: 1 mm NaCl-pH 5,8 (control); 1 mm NaCl-pH 8,5; 101 mm NaCl-pH 5,8; 101 mm NaCl-pH 8,5. Per a complir el tercer objectiu, s'han conreat plantes de dacsca (línia B73) i els híbrids MT41 i MT51 en solucions nutritives amb pH 5,8 i dos nivells de salinitat: 1 i 101 mm de NaCl. Els tractaments començaren als 7 dies (dacsca i híbrids) i 14 dies (*T. dactyloides*) després de la sembra (DDS), i les determinacions es van dur a terme als 22 i 38 DDS, respectivament. Els embrions d'1,25 mm de longitud o menys han originat el 99,4 % dels calls amb capacitat de regeneració. Tres dels híbrids han originat un nombre similar de plantes fins als 6 mesos després de la sembra dels embrions. El quart híbrid, obtingut de l'encreuament amb la línia de dacsca B73, ha donat lloc a calls caulogènics, però no s'ha aconseguit l'elongació dels brots i la regeneració de plantes senceres. Els embrions sembrats en el medi sense 2,4-D no

han originat plantes viables. Les plantes regenerades tenien un nombre cromosòmic somàtic de  $2n=46$ , característiques similars a les plantes de *T. dactyloides*, i no han produït llavors viables. *T. dactyloides* ha sigut més sensible a la salinitat (101 mm-NaCl-pH 5,8) que la dacsca (51 % vs. 28 % de reducció en el pes sec aeri en relació amb el control, respectivament). L'alcalinitat (amb 1 o 101 mm de NaCl) ha induït reduccions similars del pes sec (PS) aeri en dacsca (45 % i 51 %, respectivament) i *T. dactyloides* (51 % i 58 %, respectivament). El PS de l'arrel no s'ha vist afectat per la salinitat ni per l'alcalinitat. El contingut foliar de  $\text{Na}^+$  de *T. dactyloides* ha sigut 3,7 vegades menor que el de la dacsca. Aquesta diferència pot explicar-se per la menor absorció (acumulació de  $\text{Na}^+$  total en la planta/PS de l'arrel) i translocació de  $\text{Na}^+$  cap a la part aèria (acumulació total de  $\text{Na}^+$  en la tija/ $\text{Na}^+$  en l'arrel) de *T. dactyloides*, que en tots dos casos són un 50 % menors. L'únic paràmetre iònic afectat per l'alcalinitat (pH = 8,5) ha sigut el contingut de  $\text{Na}^+$  de l'arrel de les plantes de *T. dactyloides* sotmeses a estrès salí, les quals han mostrat un increment del 24% pel que fa a les conreades amb pH 5,8. Les plantes de la segona progènie de l'híbrid F1 ( $2n=56$ ) de dacsca x *T. dactyloides* han mostrat nombres cromosòmics de  $2n = 21$  i  $23$  (20 de dacsca i la resta de *T. dactyloides*) i la fertilitat del pol·len ha variat del 31% al 97%. La fertilitat del pol·len també ha sigut variable en la quarta (36% al 99%) i cinquena (0% al 99%) progènies de l'híbrid F1. La reducció del PS aeri causada per la salinitat ha sigut menor en la dacsca (12 %) que en l'híbrid MT41 (32 %), mentre que l'híbrid MT51 (22 %) ha mostrat valors intermedis. Solament el percentatge de pèrdua d'electròlits foliars ( $\text{PPE}_f$ ) ha diferit entre els híbrids MT41 (16 %) i MT51 (14 %) i la dacsca (12 %). La salinitat ha reduït el contingut relatiu d'aigua (CRA) i el contingut de clorofil·la total en la dacsca, *T. dactyloides* i els híbrids MT41 i MT51, però no ha afectat el  $\text{PPE}_f$  ni la massa foliar específica (MFE), pel que fa a les plantes control. En condicions de salinitat, la dacsca i els híbrids MT41 i MT51 han mostrat continguts foliars de  $\text{Na}^+$  similars (0,74; 0,78 i 0,82

mmol g<sup>-1</sup> de PS; respectivament). El nivell de tolerància dels híbrids MT41 i MT51 (generacions avançades d'un híbrid F1 de dacsa x *T. dactyloides* tolerant a la salinitat) ha sigut similar al de la dacsa i major al de *T. dactyloides*. La majoria dels paràmetres avaluats (CRA, MFE, PPE<sub>i</sub>, contingut de clorofil·la total) han mostrat una resposta a la salinitat similar en dacsa i *T. dactyloides*. Més encara, *T. dactyloides* ha mostrat una major eficiència que la dacsa en alguns paràmetres iònics associats amb la tolerància a la salinitat, tals com la capacitat de mantenir una baixa concentració foliar de Na<sup>+</sup> i una menor absorció i translocació de Na<sup>+</sup> cap a la part aèria. Aquestes característiques no s'han observat en els híbrids MT41 i MT51, els quals han mostrat valors similars a la dacsa en la majoria dels paràmetres avaluats, siga en presència de salinitat o no. En aquest context, la major sensibilitat de *T. dactyloides* a la salinitat, en comparació amb la de la dacsa, estaria relacionada, almenys en part, amb una resposta diferent pel que fa al teixit foliar, *i. e.* una menor capacitat de compartimentació del Na<sup>+</sup> cap al vacúol. Probablement, els paràmetres iònics favorables de *T. dactyloides*, si bé no confereixen per si mateixos tolerància en l'espècie, combinats amb mecanismes presents en la dacsa han resultat en una tolerància a la salinitat millorada en l'híbrid F1 (Pesqueira *et al.*, 2006), pel que fa a les espècies parentals.

**Paraules clau:** dacsa, *T. dactyloides*, híbrids interespecífics, incompatibilitat postzigòtica, caulogènesi, salinitat, alcalinitat, contingut foliar de Na<sup>+</sup>, contingut relatiu d'aigua, massa foliar específica, contingut de clorofil·la.



## ABSTRACT

The aims of this study were: i) To assess the effect of embryo size, genotype and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) on plant regeneration from hybrid embryos of maize x *Tripsacum dactyloides*; ii) To assess the effect of salinity on diverse physiological parameters of plants of maize (line B73), *T. dactyloides* and the fourth offspring (MT41 and MT51) of an F1 hybrid of maize x *T. dactyloides*; iii) To assess the effect of salinity and alkalinity on plants of maize and *T. dactyloides*. To fulfill the aim i), four genotypes of maize ( $2n = 20$ ) were pollinated with *T. dactyloides* ( $2n = 72$ ). Embryos were isolated from the caryopsis 13, 14, 15, 16 ó 19 days after pollination and placed on the basic medium free of plant growth regulators or supplemented with  $4.6 \mu\text{mol L}^{-1}$  2,4-D. To fulfill the aim ii), plants of maize and hybrids MT41 and MT51 were grown in complete nutrient solutions at pH 5.8, under two salinity levels (in mM): 1 and 101. To fulfill the aim iii), plants of maize and *T. dactyloides* were grown in complete nutrient solutions supplemented with 5 mM of buffer tris(hydroxymethyl)aminomethane, at two levels of pH and NaCl (in mM): 1-pH=5.8 (control); 1-pH=8.5; 101-pH=5.8; 101-pH=8.5. Treatments were applied 7 (maize and hybrids) and 14 (*T. dactyloides*) days after sowing (DAS) and the determinations were carried out 22 and 38 DAS, respectively. Final concentration of NaCl was reached in two days (51 and 101 mM). Embryos of 1.25 mm length or less originated 99.4 % of regenerant calli. Three of the hybrids originated a similar number of plants up to 6 months after embryo plating. The fourth hybrid, maize line B73 x *T. dactyloides*, originated caulogenic calli, but neither shoot elongation nor complete plants were obtained. Embryos plated on 2,4-D free medium did not originate viable plants. Regenerated plants showed a chromosomal somatic number of  $2n=46$ , characteristics similar to that of *T. dactyloides* plants and did not produce viable seeds. Decrease of shoot dry weight (DW) caused by salinity was lower in maize (12 %) than in hybrid MT41 (32

%) and hybrid MT51 (22 %) showed intermediate values. *T. dactyloides* was more sensitive to salinity (101 mM NaCl-pH=5.8) than maize (51 % vs. 28 % of shoot DW decrease related to control plants, respectively). Alkalinity (combined with 1 or 101 mm NaCl) induced similar reductions of shoot DW of maize (45 % and 51 %, respectively) and *T. dactyloides* (51 % and 58 %, respectively). Root DW was neither affected by salinity nor by alkalinity. Among control plants, *T. dactyloides* showed values of specific leaf mass (SLM) and percentage of electrolyte leakage from leaves ( $PEL_l$ ) higher than maize (20%, 202 %, respectively) and a total chlorophyll content 42 % lower than that of maize. Only  $PEL_l$  (%) differed between hybrids MT41 (16) and MT51 (14) and maize (12). Relative water content (RWC) and total chlorophyll content of maize, *T. dactyloides* and MT41 and MT51 hybrids were reduced by salinity but neither  $PEL_l$  nor SLM were affected by salinity, related to the controls. Under salt stress, maize and hybrids MT41 and MT51 showed similar leaf  $Na^+$  contents (media  $\pm$  SE in  $mmol\ g^{-1}$  DW): 0.74; 0.78 and 0.82 respectively. On the other hand, leaf  $Na^+$  content of *T. dactyloides* was 3.7 fold lower than that of maize. This difference could be explained by a lower uptake (total plant  $Na^+$  accumulation/root DW) and translocation of  $Na^+$  to the shoot (total shoot  $Na^+$  accumulation/total root  $Na^+$  accumulation), which were 50 % lower in *T. dactyloides* than in maize. Although *T. dactyloides* showed higher salt sensitivity than maize (expressed as shoot dry weight relative to the control), most of the evaluated parameters (RWC, SLM,  $PEL_l$ , total chlorophyll content) showed similar responses to salinity in both species. Moreover, *T. dactyloides* showed greater efficiency than maize in some mechanisms associated with salinity tolerance, such as the ability to maintain a low leaf  $Na^+$  content and a reduced root  $Na^+$  uptake and translocation to the shoot. These features were not expressed in the hybrids, which were similar to maize in most of the evaluated parameters, both under salt and non-salt stress conditions. In this context, the higher



sensibility of *T. dactyloides* to salinity, compared to maize, may be related, at least partially, to a poor resistance of leaf tissue to  $\text{Na}^+$ , *i.e.* low ability to compartmentalize  $\text{Na}^+$  into the vacuole.

**Key words:** maize, *T. dactyloides*, interspecific hybrids, post-cygotoc incompatibility, caulogénesis, salinity, alkalinity, leaf  $\text{Na}^+$  content, relative water content, specific leaf mass, chlorophyll content.



## INTRODUCCIÓN GENERAL Y ANTECEDENTES

### 1. Situación y problemática

#### 1.1. Aprovechamiento de la variabilidad interespecífica para el mejoramiento del maíz

Las características de adaptación de las especies silvestres a diferentes condiciones ambientales pueden ser aprovechadas en planes de mejora de genotipos comerciales. En algunos cruzamientos entre diferentes especies del género *Zea*, o en cruzamientos intergenéricos entre maíz y *Tripsacum* spp., aparecieron problemas de incompatibilidad post-cigótica. Pese a ello, se pudieron obtener híbridos interespecíficos o intergenéricos mediante el rescate de embriones inmaduros y la subsiguiente inducción de embriogénesis somática (Furini y Jewell, 1995; García y Molina, 1997; García *et al.*, 2000). Estos híbridos pueden ser el punto de partida para la generación de nuevos alopoliploides (especies nuevas que combinan los genomios y, por ende, los genes que determinan aspectos valiosos en ambas especies parentales). Por otro lado, las evidencias de la introgresión de algunos caracteres de *Tripsacum dactyloides* en maíz y de la ocurrencia de recombinación/translocación entre ambos genomas sugieren que es posible la introgresión de genes o la adición/sustitución/translocación de cromosomas o segmentos de cromosomas de *Tripsacum* al maíz.

Estudios previos revelaron que los híbridos entre maíz y *T. dactyloides* mostraban tolerancia a diversos factores de estrés biótico (Throne y Eubanks, 2002; Gurney *et al.*, 2003; Prischmann *et al.*, 2009) y abiótico (Clark *et al.*, 1998; Foy, 1997; Foy *et al.*, 1999; Gilker *et al.*, 2002; Ritchie *et al.*, 2006). En lo que se refiere a la salinidad, callos caulogénicos (i.e. cultivados *in vitro*) y plántulas de la F1 del cruzamiento de un maíz tetraploide ( $2n = 40$ ) x *T. dactyloides* ( $2n = 72$ ) mostraron tolerancia a la salinidad (Pesqueira *et al.*, 2003, 2006) y, más interesante aún, dos

híbridos interespecíficos estables con 39 y 46 cromosomas (Kindiger *et al.*, 1996a) procedentes del cruce entre maíz ( $2n = 20$ ) x *T. dactyloides* ( $2n = 72$ ) producían en campo entre 11 y 16 veces más que el maíz en condiciones de salinidad moderada (Shavrukov *et al.*, 2006).

Los híbridos F1 de maíz x *Tripsacum* tienen polen estéril, aunque se han obtenido semillas viables con baja frecuencia, principalmente por apomixis (Leblanc *et al.*, 1995a, Sokolov *et al.*, 2000). Por otro lado, generaciones avanzadas del híbrido (obtenidas por retrocruzamiento con maíz o por autofecundación) muestran plantas con diferentes características fenotípicas (generalmente tripsacoides) y citogenéticas (Leblanc *et al.*, 2009), así como distintos niveles de fertilidad (Harlan y de Wet, 1977, Sokolov *et al.*, 2000; Molina *et al.*, 2006, entre otros trabajos).

La elección del genotipo de los parentales (maíz y *Tripsacum*) es crítica, tanto para el éxito del cruzamiento (de Wet y Harlan, 1974, García y Molina, 1997, entre otros) como para la introgresión de genes de *Tripsacum* al maíz. Este último es un proceso complejo y los eventos que ocurren en los primeros retrocruzamientos son los principales determinantes del producto final (de Wet y Harlan, 1974; Leblanc *et al.*, 1996). Sólo se han logrado unos pocos híbridos de maíz y *Tripsacum* con un número cromosómico estable ( $2n = 39$  y  $46$  cromosomas) y capaces de reproducirse (Kindiger *et al.*, 1996a). Sin embargo, se requiere más investigación para estudiar la interacción entre el genoma de maíz y *Tripsacum* en los híbridos obtenidos. Además, es fundamental evaluar las características fenotípicas de un mayor número de combinaciones genéticas y obtener plantas fértiles y estables genéticamente para poder incorporar estos genotipos a un plan de mejoramiento de maíz o directamente a la producción agropecuaria.

## **1.2. Características de los suelos salinos de la provincia de Buenos Aires (Argentina)**

Según la FAO (Mapa de Suelos del Mundo de la FAO/UNESCO, datos del año 2000), el área total de suelos (no necesariamente arables) afectada por la salinidad abarca más de 800 millones de ha, incluyendo tanto los suelos salinos como sódicos. Esta superficie equivale a más del 6% del área terrestre total (Arzani, 2008). En Argentina, solamente en la provincia de Buenos Aires, el 24 % de la superficie de la provincia (7,08 millones de ha) está ocupada por suelos hidrohalmórficos (Vázquez *et al.*, 2001).

Al menos el 68 % de los mismos (4,75 millones de ha) se hallan en la Pampa Deprimida (Miaczynski, 1995). Esta región, que incluye las áreas denominadas como la Depresión del Salado y la Región de Laprida, abarca 9,5 millones de ha y se caracteriza por un relieve llano (0,01% de pendiente promedio) con sistemas fluviales poco desarrollados (Tricart, 1973) y suelos (Natracuoles que forman asociaciones con Natracualfes y Natralboles) que presentan típicamente un horizonte arcilloso, baja permeabilidad y alto contenido de sales sódicas (Vázquez y Rojas, 2006). El clima de la región es templado sub-húmedo. Aunque las lluvias se distribuyen a lo largo de todo el año, es característico que haya déficit de lluvias en verano y exceso en invierno (Damario y Pascale, 1988), lo cual, sumado al drenaje lento y el carácter alcalino sódico de los suelos (Crescimanno *et al.*, 1995), determina que sea frecuente la alternancia de anegamiento y sequía. La vegetación de la Pampa Deprimida es un pastizal natural, cuya heterogeneidad florística está asociada con la heterogeneidad geomorfológica y edafológica (Batista *et al.*, 2005). En estos suelos de baja fertilidad y aptitud potencial, se desarrolla un pastizal natural que satisface las necesidades de una ganadería de bajos requerimientos, como es la cría de ganado vacuno, con una escasa participación de pasturas, verdes y otras fuentes alimentación (Vázquez *et al.*, 2001; Vázquez y Rojas, 2006; Vázquez *et al.*, 2006).

En los últimos años, el sector agroalimentario mundial está sometido a un acelerado proceso de transformación. Factores tales como el ingreso al mercado de las grandes economías orientales y el creciente interés en el uso de biocombustibles, han generado un aumento en la demanda de productos agrícolas, lo cual trajo aparejado un incremento marcado en el precio de los mismos (MAA, 2008). Como consecuencia de la situación descrita, en la Argentina se produjo un crecimiento de la superficie cultivada con algunos cereales y oleaginosas (principalmente la soja), lo cual se vio acompañado por procesos de concentración del capital, asociados con el desarrollo de unidades más grandes, en perjuicio de los pequeños y medianos productores (Carballo *et al.*, 2004). Además, en el caso de la soja, por ejemplo, la aplicación de los nuevos paquetes tecnológicos ha hecho posible alcanzar buenas producciones en zonas consideradas marginales o no tradicionales para su cultivo. Por lo tanto, la expansión del cultivo de soja se logró en parte a través de la incorporación de nuevas tierras, pero también por sustitución de otros cultivos (por ejemplo cultivos regionales, como la caña de azúcar y el algodón) y actividades. La producción ganadera, entre otras, se ha desplazado hacia zonas aún más marginales, lo cual se asocia con una disminución de los nacimientos y una mayor mortandad perinatal, consecuencia de la menor condición corporal de las madres (MAA, 2008).

La región de la Cuenca del Salado es la zona de cría predominante en la provincia de Buenos Aires. Como se mencionó antes, es un sistema de producción extensivo, de baja productividad, con variaciones significativas en la oferta forrajera. Según el Programa Provincial De Producción de Ganados y Carnes del Ministerio de Asuntos Agrarios de la provincia de Buenos Aires (MAA, 2010), el potencial de desarrollo pecuario en esta región estaría basado, por un lado, en un incremento de la eficiencia en el manejo del ganado y su mejora genética y, por otro, en la incorporación de una adecuada presupuestación forrajera, con mejora en

calidad y disponibilidad de forrajes. Por lo tanto, la obtención de genotipos nuevos que toleren las condiciones ambientales desfavorables existentes en la región (periodos alternados de sequía y anegamiento, salinidad, alcalinidad y compactación) es una alternativa interesante a explorar. Si bien la salinidad y la alcalinidad en los suelos son problemas ampliamente extendidos alrededor del mundo, el mejoramiento en estos aspectos no ha mostrado un grado de avance acorde a las necesidades (Rengasamy, 2006). Esto puede explicarse, por un lado, por la dificultad en identificar el factor común o predominante cuando el crecimiento de la planta está limitado por una combinación de factores edáficos (Rengasamy, 2006) y por otro, por la complejidad que presenta la tolerancia a la salinidad en las plantas (para revisiones ver Munns, 2002; Leidi y Pardo, 2002; Tester y Davenport, 2003; Flowers, 2004; Cuartero *et al.* 2006; Munns y Tester, 2008; Arzani, 2008; Cuartero *et al.* 2010). En el caso de la alcalinidad, el problema se acrecienta por las dificultades prácticas que representa mantener valores altos de pH en el medio en contacto con las raíces (Singh *et al.*, 2002).

## **2. Características del género *Tripsacum***

*Tripsacum* es un género complejo que comprende 16 especies (de Wet *et al.*, 1981, 1983; Kindiger y Dewald, 1997; Li *et al.*, 1999), todas perennes pero con distinta morfología y adaptadas a diversas condiciones ambientales (Wilkes, 1979). El género *Tripsacum* incluye citotipos diploides ( $2n = 2x = 36$ ), triploides ( $2n = 3x = 58$ ), tetraploides ( $2n = 4x = 72$ ), pentaploides ( $2n = 5x = 90$ ) y hexaploides ( $2n = 6x = 108$ ) (Randolph, 1950; de Wet *et al.*, 1976, 1981, 1983; Kindiger y Dewald, 1997; Li *et al.*, 1999). Además, posee características agronómicas deseables, tales como resistencia a enfermedades e insectos que comúnmente afectan al maíz (de Wet, 1978), tolerancia a exceso de aluminio en el suelo (Foy, 1997;

Foy *et al.*, 1999), aerénquima constitutivo (Ray *et al.*, 1998), buena penetración de raíces en suelos arcillosos (Clark *et al.*, 1998) y reproducción por apomixis pseudogámica facultativa en los citotipos poliploides (Leblanc *et al.*, 1995b).

El género *Tripsacum* es monoico, perenne, y está distribuido ampliamente en el continente americano desde los 42° de latitud Norte hasta los 24° de latitud Sur. Esto es, desde Massachusetts, Estados Unidos, hasta Paraguay, América del Sur. La mayor parte de las especies se encontraron en México, el centro geográfico de diversidad para este género (de Wet *et al.*, 1983; Berthaud y Savidan, 1989).

El género *Tripsacum* se dividió en 2 secciones, en base a la morfología de la inflorescencia (Brink y de Wet, 1983). La sección *Tripsacum* está definida por tener relativamente pocas y rígidas inflorescencias, espiguillas estaminadas con glumas exteriores coriáceas y entrenudos cortos y gruesos. Esta sección incluye 11 especies (Tabla 1) distribuidas a lo largo de todo el rango del género. La sección *Fasciculata* está caracterizada por tener inflorescencias más ramificadas y laxas, espiguillas estaminadas con glumas exteriores membranosas y entrenudos del raquis largos y finos. Esta sección incluye 5 especies (Tabla 1) que ocurren en el centro de diversidad del género en México y América Central (de Wet *et al.*, 1983). En Sudamérica, el género *Tripsacum* está ampliamente distribuido en las cuencas de los ríos Amazonas y Orinoco, desde las cuencas de drenaje del Caribe, hacia el sur hasta el Paraguay, y hacia el este hasta el Mato Grosso en Brasil. Este género ocupa un amplio rango de hábitats a lo largo del límite entre la sabana y el bosque, comúnmente a lo largo de lechos de ríos secos que sufren anegamientos estacionales, a lo largo de las riveras parcialmente sombreadas de los ríos y a los bordes de las laderas y grietas de la Cordillera este. La distribución es discontinua, con colonias de la misma especie frecuentemente separadas decenas de kilómetros (de Wet *et al.*, 1981).



Tabla 1. Taxón, nivel de ploidía y número cromosómico de las especies del género *Tripsacum* (de Wet *et al.*, 1981; Kindiger y Dewald, 1997; Li *et al.*, 1999).

Taxón	Nivel de ploidía y número cromosómico
<b><i>Tripsacum</i> secc. <i>Fasciculata</i></b>	
1. <i>T. pilosum</i> Scribner & Merrill	4x = 72
2. <i>T. jalapense</i> de Wet & Brink	4x = 72
3. <i>T. maizar</i> Hernandez y Randolph y <i>T. maizar</i>	4x = 72 ó 2x = 36
4. <i>T. laxum</i> Nash	2x = 36
5. <i>T. fasciculatum</i> Trin ex Ascherson	
<b><i>Tripsacum</i> secc. <i>Tripsacum</i></b>	
6. <i>T. zopilotense</i> Hernandez	4x = 72
7. <i>T. peruvianum</i> de Wet & Timothy	2n = 72, 90 ó 108
8. <i>T. bravum</i> J. R. Gray	4x = 72
9. <i>T. intermedium</i> de Wet & Harlan	4x = 72
10. <i>T. andersonii</i> Gray	2n = 64
11. <i>T. australe</i>	
var. <i>hirsutum</i> Cutler & Anderson	2x = 36
var. <i>australe</i>	2x = 36
12. <i>T. latifolium</i> Hitchcock	2x = 36
13. <i>T. lanceolatum</i> Rupr. Ex Fourn.	
14. <i>T. cundinamarce</i> de Wet & Timothy	2x = 36
15. <i>T. floridanum</i> Porter ex Vasey	2x = 36
16. <i>T. dactyloides</i> (L.) L.	
var. <i>dactyloides</i>	4x = 72
var. <i>dactyloides</i>	2x = 36
var. <i>meridionale</i> de Wet & Timothy	2x = 36
var. <i>hispidum</i> (Hith.) de Wet & Harlan	4x = 72
var. <i>mexicanum</i> de Wet & Harlan	4x = 72

*T. dactyloides* (L.) L. (Figura 1) es la especie más ampliamente extendida y con mayor variabilidad morfológica (Newell and de Wet, 1974;

de Wet *et al.*, 1976). Representantes típicos de la especie se encuentran en el noreste de México, también está ampliamente distribuida en la zona adyacente de los Estados Unidos, desde Massachusetts hasta Nebraska (42° Lat. N), y en Sudamérica puede encontrarse hasta los 24° Lat. S. Las plantas tienen rizomas cortos y cañas erectas o brevemente decumbentes que llegan hasta los 3 m de altura. Las vainas de las hojas son glabras o pilosas, con las láminas generalmente más o menos glabras y de un ancho de hasta 4,0 cm. Las inflorescencias terminales están compuestas de 1-10 (media 4,8) racimos subdigitados laxos, con espiguillas estaminadas de 5 a 9 cm de largo, y ambas espiguillas del par sésiles. Los representantes sudamericanos de *T. dactyloides* pueden ser reconocidos casi siempre por poseer ramificaciones apesadas que se curvan en conjunto, formando una inflorescencia inclinada. Los representantes sudamericanos de *T. dactyloides* se reconocen como la variedad 'meridionale'. Esta especie se denomina comúnmente como *gamagrass* y ha sido reconocida como un forraje altamente palatable para las praderas del este de Estados Unidos (Rechenthin, 1951), con una productividad superior a otras gramíneas del centro y centro sur de Estados Unidos (Faix *et al.*, 1980). Esta forrajera ha mostrado buen desempeño en sus diversos usos, ya sea para pastoreo directo (Burns *et al.*, 1993; Aiken, 1997), heno (Burns *et al.*, 1996) o silaje (Eun *et al.*, 2004). Recientemente, también se está estudiando su utilidad como cerco vegetativo para controlar la erosión (Dewald *et al.*, 1996; Ritchie *et al.*, 2000) o reducir la polución del agua de escurrimiento agrícola (Rankins *et al.*, 2005; Kaspar *et al.*, 2007) y como un cultivo mejorador de suelos marginales o contaminados (Clark *et al.*, 1998; Gilker *et al.*, 2002).

La utilidad del *T. dactyloides* radica especialmente en la tolerancia a condiciones edáficas adversas, tales como acidez extrema y compactación (Foy, 1997; Clark *et al.*, 1998; Foy *et al.*, 1999; Ritchie *et al.*, 2006), la tolerancia a las bajas temperaturas invernales y una alta producción de materia seca (Faix *et al.*, 1980). Sin embargo, los distintos

germoplasmas de *gamagrass* muestran considerable variación en el rendimiento, calidad forrajera y producción de semilla (Wright *et al.*, 1983; Bidlack *et al.*, 1999), así como una fuerte dormición que reduce la germinación (Kindiger, 1994; Mueller *et al.*, 2000; Huarte y García, 2009; Huarte *et al.*, 2007). Este factor, sumado al lento crecimiento inicial de las plántulas, dificulta el establecimiento de la pastura. Una estratificación fría prolongada (al menos 6 semanas) de las semillas hidratadas ha mostrado ser efectiva para reducir el nivel de dormición de las semillas (Ahring and Frank, 1968; Anderson, 1985). Sin embargo, hasta el momento, el método más exitoso ha sido la siembra de semillas secas en el otoño (Mueller *et al.*, 2000; Aberle *et al.*, 2003; Gibson *et al.*, 2005).



Figura 1. *T. dactyloides* (L.) L. ( $2n=72$ ). a) Cultivo en Santa Catalina (provincia de Buenos Aires, Argentina) 1 año después de la siembra. b) Detalle de la inflorescencia.

Otra especie cultivada es *T. andersonii*, conocido comúnmente como ‘Guatemala grass’, se cultiva en América Central y en América del Sur, aunque crece naturalmente en los bordes de los ríos en las montañas desde Venezuela a Perú. Las colecciones de ‘Guatemala grass’ son sorprendentemente uniformes, prácticamente carecen de variación intra-

poblacional (de Wet *et al.*, 1981). Esta especie es casi completamente estéril sexualmente, tiene un número cromosómico de  $2n = 64$  y estudios preliminares sugieren que combina 54 cromosomas de alguna especie sudamericana de *Tripsacum* (sección Fasciculata) y 10 cromosomas de una raza de maíz sudamericana (*Z. mays* L.) (Talbert *et al.*, 1990). Probablemente se originó a partir de un cruzamiento entre un *Tripsacum* diploide ( $2n = 36$ ) y *Z. mays* ( $2n = 20$ ), lo cual produjo un híbrido con 36 cromosomas de *Tripsacum* + 10 de maíz, que se retrocruzó con el progenitor *Tripsacum* diploide. También podría representar un híbrido entre un *Tripsacum* pentaploide o hexaploide ( $2n = 90$  ó  $108$ ) y maíz como progenitor femenino (de Wet *et al.*, 1981). En las zonas de cultivo, el 'Guatemala grass' se propaga por cortes de estolones.

### **3. Hibridación de los géneros *Zea* y *Tripsacum***

#### **3.1. Obtención y análisis citogenético de las plantas híbridas**

Aunque *Zea* y *Tripsacum* están aislados reproductivamente por barreras gametofíticas y esporofíticas, pueden obtenerse los híbridos mediante el acortamiento de los estigmas del maíz (Mangelsdorf y Reeves, 1931) y posterior rescate de embriones (James, 1979; Bernard y Jewell, 1985) o inducción de embriogénesis somática (Furini y Jewell, 1995; García y Molina, 1997; García *et al.*, 2000).

Aunque los cromosomas de maíz y *Tripsacum* difieren en número y morfología (Galinat, 1973), se han identificado varios loci de maíz que tienen un locus correspondiente en algún lugar en el genoma de *Tripsacum*, por lo que podría tratarse de genes ortólogos. Además, los estudios citológicos han revelado numerosas regiones genómicas donde ocasionalmente ocurre sinapsis y posible recombinación/translocación entre los cromosomas de estas especies que pertenecen a distintos géneros (Maguire, 1961, 1962; Engle *et al.*, 1973; de Wet y Harlan, 1974;

Newell y de Wet, 1974; Rao y Galinat, 1974; Kindiger *et al.*, 1995; Grimanelli *et al.*, 1998; Molina *et al.*, 2006). También se ha logrado la introgresión de genes que controlan algunos caracteres de *T. dactyloides* en maíz, como por ejemplo la apomixis gametofítica (Petrov *et al.*, 1971; Leblanc *et al.*, 1995a; Kindiger *et al.*, 1996a,b), la resistencia a *Puccinia sorghi* (Berquist, 1981) y la formación de aerénquima constitutivo (Ray *et al.*, 1999).

La regeneración de plantas por organogénesis o embriogénesis somática permite obtener varias plantas por embrión cigótico, lo que incrementa de manera notable el número de híbridos regenerados (Furini y Jewell, 1995; García y Molina, 1997; García *et al.*, 2000; García y Molina, 2001). Sin embargo, los genotipos progenitores afectan tanto la frecuencia de formación de embriones híbridos como la inducción y frecuencia de regeneración de plantas *in vitro* (García y Molina, 1997). Por otro lado, la posibilidad de incorporar estos híbridos a un plan de mejoramiento y la utilidad de los mismos varía con las características de los genotipos de las especies progenitoras. Uno de los principales factores a tener en cuenta es el nivel de ploidía de los mismos. Como consecuencia, sería útil contar con un mayor número de combinaciones híbridas entre distintos genotipos de maíz y *Tripsacum spp.*

### **3.2. Fertilidad de las plantas híbridas**

El uso de autopoliploides naturales o artificiales como progenitores en los cruzamientos remotos podría ser una alternativa ventajosa (Matzk, 1997). Sin embargo, los cruzamientos de maíz tetraploide ( $2n = 40$ ) x *T. dactyloides* tetraploide ( $2n = 72$ ) han dado origen a híbridos F1 estériles sexualmente, los cuales producen pocas semillas, principalmente por apomixis (Sokolov *et al.*, 2000).

En tales híbridos, se podría aumentar la fertilidad mediante la obtención del anfidiplóide por duplicación cromosómica. Distintos compuestos inhibidores de la mitosis han sido efectivos para inducir la duplicación cromosómica en cultivo de tejidos. La colchicina se ha usado para inducir la duplicación cromosómica en cultivos de anteras de trigo (Navarro-Alvarez *et al.*, 1994) y de maíz (Wan *et al.*, 1989), en callos organogénicos de especies diploides de *Tripsacum*, tales como *T. dactyloides* var *dactyloides* (Salon y Earle, 1998), *T. dactyloides* var *mexicanum*, *T. dactyloides* var *hispidum*, *T. dactyloides* var *meridionale*, *T. maizar*, *T. pilosum* y *T. zopilotense* (Leblanc *et al.*, 1995c); la pronamida en cultivo de callos de maíz (Beaumont, 1993) y la oryzalina en cultivos de hoja y microestacas de kiwi (Chalak y Legave, 1996).

Los compuestos utilizados para inducir la duplicación cromosómica producen altos porcentajes de mortalidad de los tejidos en cultivo. Por lo tanto, es importante contar con un sistema eficiente de multiplicación y regeneración *in vitro*. Una metodología útil podría ser la micropropagación y/o inducción de callos organogénicos o embriogénicos a partir del tejido somático de los híbridos estériles.

### **3.3. Evaluación de la utilidad agronómica de los híbridos**

Plantas de híbridos F1 de maíz x *T. dactyloides* y su progenie han mostrado tolerancia, ó características asociadas con la tolerancia, a distintos causas de estrés abiótico:

- ✓ Híbridos F1 de maíz y *T. dactyloides* muestran una alta tolerancia a la salinidad *in vitro* e *in vivo* (Pesqueira *et al.*, 2003, 2006).
- ✓ Jatimlinsky *et al.* (2004) observaron que plantas F1 derivadas de un cruzamiento de maíz x *T. dactyloides* exhibían mayor tolerancia al estrés por bajas temperaturas (superiores a 0°C) que sus progenitores.

- ✓ Ray *et al.*, 1999, observaron la introgresión de genes que determinan aerénquima constitutivo en híbridos F1 de maíz x *T. dactyloides* y en plantas obtenidas por sucesivos retrocruzamientos con maíz. En el trabajo mencionado se observó la formación de aerénquima en el 100 % de las plantas del híbrido F1 y del primer retrocruce, en el 50 % de las plantas del segundo retrocruce y en el 75 % de las plantas del tercer retrocruce. El análisis citogenético de estos materiales mostró que la formación de aerénquima estaba asociada con la presencia del brazo corto del cromosoma 16 de *Tripsacum*.
- ✓ Híbridos estables de maíz x *T. dactyloides* produjeron hasta 42,9 tn ha<sup>-1</sup> de biomasa fresca (16 veces más que el progenitor maíz) en condiciones de moderada salinidad (C.E.= 3,44 dS m<sup>-2</sup>, equivalente a 2400 ppm). La composición nutritiva, energía, contenido de proteína y digestibilidad del híbrido para alimentación animal mostró valores similares a los del maíz (Shavrukov *et al.*, 2006).

#### **4. Nivel de tolerancia a la salinidad y/o alcalinidad del maíz, *T. dactyloides* y los híbridos entre las dos especies**

De acuerdo a la reducción del rendimiento causada por el incremento en la conductividad del suelo, Maas y Hoffman (1977) establecieron rangos relativos de tolerancia para los cultivos, definidos por los límites en la Figura 2. Según este criterio, clasificaron al maíz (híbrido Asgrow 88) como un cultivo moderadamente sensible a la salinidad.

Posteriormente, Katerji *et al.* (2000) confirmaron la clasificación anterior, que coloca a la remolacha y al trigo duro como tolerantes a la salinidad y al resto de los cultivos evaluados (maíz, papa, girasol, haba y soja) como moderadamente sensibles, excepto por la soja que fue clasificada como moderadamente tolerante por Maas y Hoffman (1977) (reproducida en USDA-ARS, 2009). Por ejemplo, en el campo, valores de

salinidad de 100 mM ( $\cong 10$  dS m<sup>-1</sup>) de NaCl en la solución del suelo provocan la muerte de las plantas de arroz antes de la madurez y una reducción de los rendimientos en el trigo. Las plantas de cebada, el cereal más tolerante, mueren si se exponen a concentraciones superiores a 250 mM de NaCl en la solución del suelo durante un periodo extendido. Solamente las halófitas continúan creciendo con concentraciones de NaCl mayores de 250 mM, aunque pocas tienen importancia económica (Munns *et al.*, 2006).

Figura 2. Clasificación realizada por Maas y Hoffman (1977) que establece rangos de tolerancia relativa a la salinidad para varias especies cultivadas (adaptado de Ayers y Westcot, 1985). CE<sub>a</sub>: Conductividad eléctrica del agua; CE<sub>e</sub>: Conductividad eléctrica del extracto de saturación del suelo.

Tabla 2. Umbral de conductividad eléctrica (CE<sub>u</sub>, dS m<sup>-1</sup>) y pendiente (*b*, % de reducción del rendimiento/dS m<sup>-1</sup>) de acuerdo al análisis de regresión de los tratamientos salinos (adaptado de Katerji *et al.*, 2000).

Cultivo	Katerji <i>et al.</i> , 2000		Maass y Hoffman (1977)	
	CE <sub>u</sub>	<i>b</i>	CE <sub>s</sub>	<i>b</i>
Remolacha	0,0	0,4	7,0	5,9
Trigo duro	0,0	1,9	5,7	3,8
Papa	0,0	5,6	1,7	12,0
Girasol	0,5	8,7	-	-
Maíz	1,3	10,5	1,7	12,0
Soja	2,0	11,4	5,0	20,0
Tomate	2,4	16,4	2,5	9,9
Habas	2,8	14,4	1,6	9,6



Las empresas que comercializan semillas de *T. dactyloides* lo recomiendan para suelos no salinos, sin embargo no se han realizado trabajos donde se cuantifique su tolerancia a la salinidad ni a la alcalinidad.

En un estudio previo se obtuvieron plantas F1 de maíz x *T. dactyloides* a partir del rescate de embriones inmaduros y la inducción de caulogénesis o embriogénesis somática. Este híbrido mostró alta tolerancia a la salinidad tanto *in vitro* como *in vivo*. Los callos caulogénicos del híbrido mencionado mostraron  $\cong 50\%$  de reducción en el peso seco y el porcentaje de regeneración de plantas luego de 30 días en presencia de 170 mM de NaCl en el medio de cultivo (Pesqueira *et al.*, 2003). En contraste, la presencia de 100 mM de NaCl en el medio de cultivo durante el mismo periodo de tiempo produjo una reducción de 81,54% en el crecimiento de callos de maíz, con respecto al control (Ramagopal, 1986). Los callos caulogénicos del híbrido de maíz x *T. dactyloides* conservaron la capacidad de regenerar plantas aún en presencia de 170 mM de NaCl (Tabla 3, Pesqueira *et al.*, 2003). Si bien no hemos encontrado datos con respecto al maíz, en el arroz (levemente más tolerante a la salinidad que el maíz, según Ayers y Wescot, 1985), 100 mM de NaCl en el medio de cultivo inhibió completamente el proceso de regeneración de brotes a partir de callos caulogénicos (Lutts, 1999).

Las plantas regeneradas y rustificadas del híbrido de maíz x *T. dactyloides* mencionado arriba, regadas durante 20 días con una solución 170 mM de NaCl, mostraron una disminución en el contenido de agua pero no se observaron diferencias significativas en el peso seco con respecto a las plantas control regadas con agua corriente (Pesqueira *et al.*, 2003).

En un experimento posterior (Pesqueira *et al.*, 2006), no se observaron diferencias significativas entre los pesos frescos ni los pesos secos de la parte aérea de plantas del híbrido regadas durante 21 días con 250 mM de NaCl, con respecto a las plantas control (regadas con agua corriente). Por el contrario, las plantas regadas con 250 mM de NaCl

incrementaron el peso seco de las raíces, con respecto al tratamiento control (Tabla 4).

Tabla 3. Regeneración, porcentajes de supervivencia e incremento diario relativo de peso de callos de un híbrido F1 de maíz x *T. dactyloides* expuestos a diferentes concentraciones de NaCl (adaptado de Pesqueira *et al.*, 2003)

Parámetro	Concentración de NaCl					
	0	70	140	170	210	250
Regeneración (%)	61,5a	40b	30c	-	0d	-
Supervivencia (%)	92,3a	60b	40c	-	8,3d	-
IRP/día (g g <sup>-1</sup> d)	0,123a	0,087b	0,071bc	0,057cd	0,059bcd	0,033d

Letras diferentes en la fila indican diferencia significativa (Tuckey,  $\alpha$ : 0,05)

Por otro lado, híbridos estables de maíz x *T. dactyloides* produjeron hasta 42,9 tn ha<sup>-1</sup> de biomasa fresca (16 veces más que el progenitor maíz) en un lote cultivado con moderada salinidad (CE = 3,44 dS m<sup>-2</sup>, equivalente a 2400 ppm ó 41 mM) (Shavrukov *et al.*, 2006).

Tabla 4. Peso fresco y seco del vástago y la raíz de plantas de un híbrido de maíz x *T. dactyloides* regadas con 250 mM de NaCl y con agua corriente (control) durante 20 días (adaptado de Pesqueira *et al.*, 2006)

Tratamiento	Peso (g planta <sup>-1</sup> )			Relación V/R
	Vástago (V)		Raíz (R)	
	Peso fresco	Peso seco	Peso seco	
Control	5,20a	0,98a	0,14a	7,0
250 mM de NaCl	6,18a	1,44a	0,55b	2,6

Letras diferentes en la columna indican diferencias significativas (DMS,  $\alpha$ : 0,05)

## **5. Influencia del estadio de crecimiento de la planta sobre la tolerancia a la salinidad en el maíz**

Los efectos de la salinidad sobre el maíz y otras especies dependen marcadamente del estado fenológico de la planta. Los estadios de plántula y floración han mostrado ser los más sensibles a la salinidad en maíz (Kaddah y Ghowail, 1964; Pasternak *et al.*, 1985) y otras especies, como por ejemplo arroz (Heenan *et al.*, 1988; Lutts *et al.*, 1995), trigo, cebada y triticale (Rawson *et al.*, 1988).

Valores moderados de salinidad no afectaron significativamente la germinación de cariopses de maíz (Kaddah y Ghowail, 1964; Maas *et al.*, 1983; Çiçek y Çakırlar, 2002). Kaddah y Ghowail (1964) observaron que el estadio más sensible del maíz a la salinidad es el de plántula, hasta los 21 días después de la siembra. Estos autores también observaron que, en general, el rendimiento en granos fue mucho más sensible a la salinidad que el rendimiento en biomasa vegetativa aérea. Khan y McNeilly (2005), por ejemplo, cuantificaron la tolerancia a la salinidad en progenies híbridas de maíz a partir del crecimiento de la raíz en una solución con el agregado de sal. Si bien este método no cuantifica necesariamente la tolerancia a nivel de planta entera en condiciones de campo, existe evidencia de que la variación en la respuesta de la plántula a la salinidad persiste en la planta adulta en maíz (Maiti *et al.*, 1996) y otras especies, tales como sorgo, *Trifolium*, alfalfa (Khan y McNeilly, 2005), trigo, cebada y triticale (Rawson *et al.*, 1988).

## **6. Parámetros fisiológicos afectados por la salinidad en el maíz y otras plantas cultivadas**

El estrés salino afecta a diversos procesos fisiológicos de las plantas y causa disminuciones severas del crecimiento y rendimiento de los cultivos. 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  $Ca^{2+}$ , y la toxicidad directa de los iones sobre los procesos metabólicos (Zhu, 2001; Tester y Davenport, 2003; Munns y Tester, 2008).

La salinidad en la solución del suelo genera en la planta tanto un estrés osmótico como iónico. A corto plazo (horas), el estrés salino produce una reducción en el crecimiento del vástago y, en menor medida, de la raíz. Este efecto no parece dependiente de la concentración de  $Na^+$  en el tejido, sino más bien una respuesta a la osmolaridad de la solución externa (Munns, 2002). En cambio, los daños específicos del  $Na^+$  se asocian con la acumulación de  $Na^+$  en los tejidos foliares y resultan en necrosis de las hojas viejas, que comienza en los ápices y márgenes y se extiende hacia la base. En este caso la reducción de la productividad neta y del rendimiento está relacionada con el acortamiento del periodo de vida individual de las hojas (Munns 1993, 2002). El periodo de tiempo en el cual se manifiestan los daños específicos por  $Na^+$  es variable, depende de la efectividad de la compartimentación del  $Na^+$  en los tejidos foliares y en las células. 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).

### **6.1. La salinidad induce una respuesta bifásica en el crecimiento**

Munns (1993) mostró que la salinidad induce una respuesta bifásica en el crecimiento: al principio (la escala de tiempo para esta fase es de semanas), la disminución del potencial hídrico del suelo causada por la salinidad genera un efecto de estrés osmótico sobre la planta; en la segunda fase, la concentración de iones tóxicos aumenta rápidamente, especialmente en las hojas viejas. Éstas mueren a causa de un incremento

rápido de la concentración de sales en la pared celular o en el citoplasma, una vez que se supera la capacidad de acumulación en la vacuola (Munns, 1993). Sin embargo, otros autores observaron efectos específicos del NaCl durante la primera semana después de la salinización. Sümer *et al.* (2004) informaron que, a partir del quinto día de la aplicación del estrés, una solución de PEG con un  $\psi_s$  de -0,46 MPa produjo una fuerte reducción del crecimiento foliar con respecto al control y una solución isoosmótica de NaCl redujo significativamente el crecimiento foliar con respecto al tratamiento con PEG. A partir de estos datos los autores concluyeron que durante la primera fase de la reducción del crecimiento hay una prevalencia del estrés osmótico pero hay un efecto iónico adicional. Además, usando soluciones de varias sales con concentraciones iónicas equivalentes e idéntico potencial osmótico ajustado con PEG, identificaron toxicidad por  $\text{Na}^+$  durante esta primera fase del estrés salino.

En especies tales como el maíz (Cramer y Bowman, 1991a; Neumann, 1993), arroz (Yeo *et al.*, 1991), trigo y cebada (Passioura y Munns, 2000), un incremento brusco de la salinidad produjo reducciones rápidas y transitorias en las tasas de expansión foliar, las cuales se recuperaron hasta un nuevo estado estacionario en un lapso de minutos a pocas horas. Mediante una técnica de presurización en la cual se mantuvieron las plantas salinizadas en su máximo estado hídrico, el crecimiento se mantuvo constante (no hubo reducción ni incremento del crecimiento foliar con la adición y eliminación del NaCl, respectivamente) en un periodo de minutos (Passioura y Munns, 2000) o de algunas horas (Munns *et al.*, 2000a). Sin embargo, en un periodo de días de estrés salino o hídrico, la presurización falló en mantener altas tasas de elongación foliar, lo cual indica que señales provenientes de la raíz invalidan los efectos hídricos (Munns *et al.*, 2000c). La adición de NaCl o concentraciones iso-osmóticas de PEG, manitol o KCl indujo una inhibición del crecimiento similar (Yeo *et al.*, 1991) o mayor en el caso del PEG

(Chazen *et al.*, 1995). Estos resultados indican que la reducción transitoria inicial del crecimiento se debe a cambios en las relaciones hídricas (ver revisión de Munns, 2002). Sin embargo, trabajos más recientes mostraron que, aún en este primer periodo del estrés salino (minutos), algunas respuestas difieren ante un estrés hídrico o salino. Por ejemplo, el incremento de la concentración citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  fue menor en respuesta a 200 mM de sorbitol que a 100 mM de NaCl (Tracy *et al.*, 2008).

## **6.2. Mecanismos involucrados en la reducción del crecimiento causada por la salinidad**

### **6.2.1. Hojas**

En el maíz, una salinidad moderada (80 mM de NaCl) redujo rápidamente la tasa de expansión foliar, la cual se inhibió completamente a los 30 min y alcanzó un nuevo estado de equilibrio (80 % del control) aproximadamente 150 min después de la salinización (Cramer y Bowman, 1991a). Al principio, las plantas tratadas con NaCl 80 mM mostraron también una reducción en el potencial de presión de las hojas, pero luego de 150 min de tratamiento salino la turgencia se recuperó completamente, aunque la elongación foliar continuó restringida con respecto al control. El aumento del umbral de turgencia de la pared celular (valor de turgencia al cual se detiene el crecimiento,  $\gamma$ ) de las células de la zona de crecimiento fue la causa de la reducción en la tasa de elongación foliar (Cramer, 1992a). Estas respuestas se originaron estrictamente a causa de un estrés hídrico; no hubo efectos iónicos aparentes dentro de las 4 h posteriores a la salinización (Cramer y Bowman, 1991b). Sin embargo, respuestas a más largo plazo (24 h de exposición a 75 mM de NaCl) mostraron que el estrés salino continuo afectó también la conductividad hidráulica ( $L$ ) y la extensibilidad de la pared celular ( $m$ ). Además, el  $\text{Ca}^{2+}$  mejoró el crecimiento de las plantas expuestas al NaCl mediante el incremento de la

conductividad hidráulica (Cramer, 1992a). Según el autor, estos resultados sugieren que a medida que aumenta el tiempo de exposición a la salinidad también se incrementan los efectos causados por iones específicos.

En las gramíneas, durante un periodo importante del desarrollo foliar, la elongación de la hoja depende de la expansión irreversible de las células localizadas en la zona basal, cerca del punto de unión de la hoja al nudo. El estrés salino reduce la tasa de crecimiento foliar mediante el acortamiento de la zona de elongación de la hoja y disminución de la intensidad de crecimiento en su zona central y distal (Bernstein *et al.*, 1993; Neves-Piestun y Bernstein, 2001). Los mecanismos que reducen el crecimiento de las hojas y el desarrollo de la parte aérea ante un estrés salino aún no se conocen con precisión. Los resultados publicados han mostrado que la reducción en el crecimiento de la hoja en la primera fase de un estrés salino es independiente de factores tales como el aporte de hidratos de carbono (Munns, 1993; Munns *et al.*, 2000a; De Costa *et al.*, 2007), el contenido de compuestos orgánicos solubles (Azevedo Neto *et al.*, 2004), el estado hídrico (Munns *et al.*, 2000c; Fricke y Peters, 2002), el aporte de nutrientes (Hu *et al.*, 2007), y la concentración de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> en las hojas (Azevedo Neto *et al.*, 2004) y en los tejidos foliares en crecimiento (Fricke, 2004; Neves-Piestun y Bernstein, 2005; Hu *et al.*, 2005, 2007). Si bien se han observado cambios en las propiedades de la pared celular (Cramer y Bowman, 1991a; Cramer, 1992a,b), todavía no se conocen con certeza las señales locales, o provenientes de otros sitios de la planta, que regulan estas propiedades de la pared y las tasas de expansión celular (Zörb *et al.*, 2004; De Costa *et al.*, 2007; Pitann *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2010) y otros parámetros fisiológicos afectados por la salinidad (Gunes *et al.*, 2007; Tuna *et al.*, 2008). Rodríguez *et al.* (2004), por ejemplo, observaron que la inhibición de la elongación foliar inducida por el NaCl se relacionó con una disminución en la concentración apoplástica de especies reactivas de oxígeno en la zona de elongación.

Munns (2002) propuso que, durante los primeros días después del comienzo de un estrés salino, las señales hormonales juegan un papel fundamental en la regulación del crecimiento. Varios autores han observado un aumento de las concentraciones de ácido abscísico (ABA) libre y  $\beta$ -D-Glucopyranosyl abscisato (ABA-GE) en respuesta a un estrés salino (Cramer y Quarrie, 2002; Sauter *et al.*, 2002; Fricke *et al.*, 2004; De Costa *et al.* 2007). Sin embargo, los resultados son contradictorios en cuanto al efecto del ABA sobre el crecimiento foliar ante un estrés hídrico o salino. Algunos autores observaron un efecto inhibitorio (Cramer y Quarrie, 2002, entre otros) pero en otros casos se observó un efecto promotor del ABA sobre crecimiento foliar, por ejemplo en plantas salinizadas de maíz (De Costa *et al.*, 2007), cebada (Fricke *et al.*, 2004), trigo (Gurmani *et al.*, 2009) y poroto (Khadri *et al.*, 2007). Esta contradicción podría explicarse a partir de resultados recientes que muestran que existen variaciones temporales en la relación entre el contenido de ABA y el crecimiento foliar en respuesta a un estrés salino. A partir de dos cultivares de cebada con distinto nivel de tolerancia a la sequía, sometidos a estrés por NaCl, se observó que la inhibición de la transpiración inducida por el incremento del contenido de ABA produjo un efecto promotor del crecimiento entre los primeros 10 minutos y 1 día desde el comienzo de un estrés salino. Posteriormente este patrón de la hormona cambió, lo mismo que la conductividad estomática. Por lo tanto, el cultivar tolerante fue el que mostró un mayor incremento en el contenido de ABA y una mayor inhibición de la transpiración al comienzo del estrés, con respecto al control. En cambio, a los 8 días, el contenido de ABA permaneció superior a los controles en el cultivar sensible pero fue similar a los controles en el cultivar tolerante (Veselov *et al.*, 2008).

De acuerdo a la hipótesis del crecimiento ácido, ampliamente aceptada, la auxina induce la pérdida de rigidez de la pared celular mediante la acidificación del apoplasto. La fuente de protones es la  $H^+$ -



ATPasa del plasmalema, cuya actividad aumenta en respuesta a la auxina (Taiz y Zeiger, 2002). Esta activación en el bombeo de  $H^+$  disminuye el pH de la pared celular, activa enzimas y proteínas de la pared sensibles al pH e inicia la pérdida de rigidez de la pared y la expansión celular (ver revisión de Hager, 2003). Varios autores observaron que, en tejido foliar en crecimiento de maíz, la salinidad no indujo un cambio significativo en la síntesis de  $H^+$ -ATPasa del plasmalemma ni en su actividad hidrolítica (Neves-Piestun y Bernstein, 2001; Zörb *et al.*, 2005b; Pitann *et al.*, 2009). Sin embargo, aún no está claro si la reducción del crecimiento foliar del maíz en la primera fase del estrés salino se relaciona con una disminución en la eficiencia de la  $H^+$ -ATPasa del plasmalemma en la translocación de  $H^+$  y consiguiente alcalinización del apoplasto. Varios autores informaron que plantas del cv. Pioneer 3906 de maíz (relativamente sensible a la salinidad) cultivadas con 100 mM NaCl mostraron disminución en la extrusión de  $H^+$  (Zörb *et al.*, 2005a; Hatzig *et al.*, 2010) y alcalinización del apoplasto (Pitann *et al.*, 2009), con respecto al control. Si bien no se modificó el nivel de la proteína, Zörb *et al.* (2005a) propusieron que la menor eficiencia en el bombeo de  $H^+$  se debió al cambio observado en la proporción de las isoformas de la enzima (incremento de *MHA4* y disminución de *MHA1*) a nivel del ARNm. Sin embargo, los resultados obtenidos con genotipos de maíz tolerantes a la salinidad fueron contradictorios. Pitann *et al.* (2009) informaron que, si bien la salinidad redujo el crecimiento del vástago, no indujo una disminución en la actividad de la  $H^+$ -ATPasa del plasmalema ni el incremento del pH del apoplasto foliar, con respecto al control. Hatzig *et al.* (2010), en cambio, observaron una disminución similar en la actividad de la  $H^+$ -ATPasa en plantas salinizadas de un genotipo tolerante y otro sensible, comparadas con las plantas control, pero el crecimiento del genotipo tolerante se vio menos afectado por la salinidad. Si bien los resultados obtenidos no son concluyentes, queda claro que la eficiencia en el bombeo de  $H^+$  (proceso

que resulta en acidificación y pérdida de rigidez de la pared celular) puede explicar sólo parcialmente la tolerancia a la salinidad.

### 6.2.2. Raíces

A corto y medio plazo (de minutos a días), se observó que el crecimiento de la raíz se recupera mejor que el de las hojas frente a la adición de sal u otro osmótico, e incluso puede no modificarse si el estrés se aplica gradualmente. González Rodríguez *et al.* (1997) no observaron cambios en la extensión de la raíz con respecto al control cuando expusieron plántulas del cultivar de maíz Pioneer 3906 (relativamente sensible a la salinidad) hasta 100 mM de NaCl en forma gradual durante 6 días. En cambio, las plantas expuestas a 100 mM de NaCl en un solo paso (i.e. sin aclimatación) mostraron una rápida inhibición de las tasas de elongación de la raíz, las cuales se recuperaron gradualmente hasta alcanzar el mismo nivel de los controles a las 24 horas del inicio del tratamiento.

En cuanto a las respuestas de las raíces ante un estrés salino, Zidan *et al.* (1990) observaron que la exposición de plántulas de maíz a 100 mM de NaCl produjo una fuerte inhibición de la tasa de crecimiento de la raíz y la tasa aparente de multiplicación celular, así como una reducción del tamaño final de las células epidérmicas y de la longitud de la zona de elongación y una disminución de la conductividad hidráulica de 3 a 6 veces con respecto a plantas no salinizadas (Azaizeh *et al.*, 1992). La adición de  $\text{Ca}^{2+}$  revirtió parcialmente los efectos inhibitorios del NaCl sobre la raíz (Zidan *et al.*, 1990; Azaizeh *et al.*, 1992). Zidan *et al.* (1990) también observaron que la disminución del crecimiento causada por el NaCl no fue producto de una inhibición de la acidificación de las paredes celulares en la zona de crecimiento de la raíz.

Una respuesta común ante un estrés salino es la acumulación de ABA en la raíz (Jia *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2005; Albacete *et al.*, 2008; entre otros) que, en algunos casos, superó varias veces la acumulación observada en el tallo (Jia *et al.*, 2002; Albacete *et al.*, 2008). Si bien los datos no son concluyentes, existe un cuerpo de evidencia importante que indica que el ABA mejora el crecimiento de la raíz ante un estrés salino u osmótico. Uno de los mecanismos responsables sería el incremento de la conductividad hidráulica del plasmalema de las células radicales. La aplicación exógena de concentraciones bajas de ABA indujo un incremento en la permeabilidad del plasmalema de células de la raíz sometidas a estrés salino (Wan, 2010) o cultivadas en condiciones control (Zhu *et al.*, 2005). Por otro lado, se observó que el mantenimiento de la elongación de la raíz primaria de maíz ante un estrés osmótico requiere la acumulación de ABA (Sharp, 2002).

### **6.3. Relación tallo/raíz**

En las interacciones entre tallos y raíces se encuentran importantes ejemplos del control de la partición. Las hojas dependen de las raíces para el suministro de agua y nutrientes, y las raíces necesitan de los carbohidratos que éstas les proporcionan. Cuando plantas bien hidratadas y dotadas de nutrientes sufren una disminución en el aporte de carbohidratos, por ejemplo por sombreado, la partición de carbono sigue el patrón de distribución en el orden de prioridad hojas>tallos>raíces finas. Con un nivel adecuado de carbohidratos pero deficiente en agua y nutrientes, la prioridad en el uso del carbono se invierte, lo cual favorece el crecimiento radicular. Una razón es que los meristemas radicales se extienden en el suelo húmedo y no experimentan el estrés con igual severidad que el tallo (Loomis y Connor, 1992). Varios autores han observado que el crecimiento de la raíz usualmente se ve menos inhibido

que el de la hoja ante la exposición de la planta a un estrés salino o hídrico e incluso puede resultar promovido (Westgate y Boyer, 1985; Sharp *et al.*, 1988; Munns, 2002, Sharp *et al.*, 2004; entre otros). Hsiao y Xu (2000), para explicar los mecanismos que coordinan el crecimiento del tallo y la raíz en condiciones de estrés hídrico edáfico, proponen una combinación entre el transporte de agua y cambios en los parámetros de crecimiento celular. Una reducción repentina del potencial hídrico del suelo induce rápidamente ajuste osmótico en la raíz (Frensch and Hsiao, 1995), lo cual permite la recuperación parcial de la turgencia, el reestablecimiento de un gradiente de potencial hídrico y consiguiente absorción de agua. Además, el umbral de turgencia de la pared de las células de la raíz disminuye (Frensch y Hsiao, 1995). Estos cambios posibilitan que las raíces retomen el crecimiento en condiciones de bajo potencial hídrico. En contraste, en las hojas el ajuste osmótico se produce lentamente y el umbral de turgencia de la pared celular aumenta (Cramer and Bowman, 1991a, entre otros) o no disminuye sustancialmente, lo cual lleva a una disminución del crecimiento ante un estrés osmótico a nivel del suelo. Por otro lado, las regiones de crecimiento, tanto de la parte aérea (Evert *et al.*, 1996) como de las raíces (Frensch and Steudle, 1989; Frensch y Hsiao, 1993), están aisladas del sistema vascular. Mientras que este aislamiento vascular protege a las raíces del bajo potencial osmótico del xilema y facilita la continuidad del crecimiento, en los ápices aéreos determina potenciales hídricos bajos y la posibilidad de una reducción aún mayor por demanda evaporativa (ver revisión de Hsiao y Xu, 2000).

El incremento en la síntesis de ABA ante un estrés hídrico se ha señalado como un factor responsable de la respuesta diferencial entre el crecimiento de la raíz y del tallo. Según Saab *et al.* (1990), a potenciales hídricos bajos, la acumulación de ABA tiene una función directa tanto en el mantenimiento de la elongación de la raíz primaria como en la inhibición del crecimiento del vástago del maíz.

#### **6.4. Relaciones hídricas**

Los efectos de la salinidad sobre las relaciones hídricas de las plantas han sido ampliamente estudiados. Como se mencionó más arriba, en una primera fase del estrés salino hay una prevalencia del efecto osmótico sobre el iónico, aunque los mecanismos que regulan el crecimiento en esta etapa aún no se comprenden adecuadamente. La evidencia experimental muestra que el potencial de presión del tejido en crecimiento permanece constante, luego de una breve caída inicial, y que al principio se produce un incremento del umbral de turgencia de la pared y posteriormente una disminución de la permeabilidad de la membrana (Cramer, 1992a; Cramer, 2003), cambios que afectan negativamente la expansión celular. Cramer (2003) observó diferencias en la tolerancia a la salinidad entre diferentes especies dentro de las 5 h de la salinización, pero éstas no se correlacionaron necesariamente con una tolerancia a la salinidad a largo plazo.

El contenido relativo de agua (CRA), una medida del contenido de agua respecto del agua total que el tejido puede almacenar, permite conocer el estado hídrico de la planta. El CRA se relaciona con el potencial hídrico porque éste y sus componentes principales a nivel celular (potencial de presión y de solutos) son función del volumen de agua del protoplasto. En general, la disminución del contenido relativo de agua de 100 % a 90 % se relaciona con la reducción de la expansión celular y el cierre del poro estomático en la hoja. Contenidos entre 90 % y 80 % se relacionan con cambios en la composición de los tejidos y algunas alteraciones en las tasas relativas de fotosíntesis y respiración. Niveles de CRA menores al 80 % usualmente implican potenciales hídricos del orden de los -1,5 MPa, o menos, lo cual lleva a cambios en el metabolismo, tales como disminución significativa de la fotosíntesis e incremento de la respiración, entre otros (González y González-Vilar, 2001; Soares-Cordeiro

*et al.*, 2009). En especies mesófilas, en general, en una etapa temprana del estrés hídrico, con un CRA superior al 70 %-80 %, la disminución de la fotosíntesis neta se produce principalmente por una reducción en la concentración intercelular de CO<sub>2</sub> debido a una disminución de la conductividad estomática. Un estrés hídrico más severo produce una disminución de la tasa potencial de fotosíntesis (que cesa a un CRA de aproximadamente 40 %), la cual no se recupera por un incremento de la concentración intercelular de CO<sub>2</sub> (Lawlor, 2002; Soares-Cordeiro *et al.*, 2009).

La exposición de las plantas a un estrés salino moderado no siempre produjo disminuciones del CRA. El efecto de la salinidad sobre el CRA se ha relacionado con el nivel de tolerancia del genotipo evaluado, la intensidad del estrés (Singh *et al.* 2007) y el estadio fenológico de la planta (Argente *et al.*, 2006). La exposición a una salinidad moderada (100 a 150 mM) de NaCl indujo una disminución marcada del CRA en genotipos adaptados a condiciones ambientales muy diferentes, por ejemplo *Populus x canescens* (Bolu y Polle, 2004), *Opuntia ficus-indica*, una especie CAM sensible a la salinidad (Franco-Salazar y Véliz, 2007), cebada y trigo duro (Veselov *et al.*, 2009), entre otras. La exposición de plantas de maíz a 100 mM de NaCl no produjo una disminución en el CRA foliar (Bastías *et al.*, 2004b; Hu *et al.*, 2007), pero sí se observó una disminución significativa del potencial osmótico y no hubo cambios en el potencial de presión, debido a la activación del mecanismo de ajuste osmótico (Bastías *et al.*, 2004b). En cambio, otros autores observaron que la exposición de plantas de maíz a concentraciones moderadas de NaCl (100 a 150 mM de NaCl) indujo una reducción significativa del CRA con respecto al control (Saneoka *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2006). Además, Saneoka *et al.* (1995) observaron que la reducción del CRA y del crecimiento fue menor en una línea de maíz que acumulaba glicinabetaína comparada con líneas casi isogénicas carentes de glicinabetaína. Sin embargo, las líneas no

mostraron diferencias significativas en el potencial hídrico, potencial osmótico ni el potencial de presión dentro de cada tratamiento. Los resultados mencionados muestran que, en diversas especies, el potencial de presión de las hojas no cambia por efecto de la salinidad, aunque el CRA disminuye, con respecto a los controles no salinizados. Boyer *et al.* (2008) observaron el mismo fenómeno en tejidos foliares de plantas de cebada y trigo duro. Estos autores utilizaron el método de flotación para determinar el CRA (Weatherley, 1950; Barrs y Weatherley, 1962) y observaron que las células absorbían agua en exceso, para después secretarla hacia el apoplasto. Este líquido acumulado en el apoplasto disminuye el CRA porque incrementa la masa del tejido, aumentando el peso “turgente” del tejido de manera anormal y por lo tanto disminuyendo el CRA. El origen fundamental del artefacto es el ajuste osmótico, el cual mantiene el tejido turgente en la planta intacta.

## **6.5. Daño oxidativo, contenido de pigmentos foliares e integridad y funcionalidad de las membranas celulares**

Bajo condiciones de estrés ambiental, las membranas vegetales sufren cambios que se han asociado frecuentemente con el incremento de la permeabilidad y pérdida de integridad de las mismas (Blokina *et al.*, 2003). En consecuencia, la medición de la liberación de solutos a partir de un tejido vegetal es un método que se usa desde hace tiempo para estimar la permeabilidad de la membrana en relación con un estrés ambiental tal como la sequía y/o las altas temperaturas (Sánchez *et al.*, 1983; Wang y Huang, 2004), las bajas temperaturas (Aroca *et al.*, 2005), la salinidad o la toxicidad iónica (Ismail, 2003; Gunes *et al.*, 2007).

Dado que el contenido de electrolitos puede variar entre muestras, Stuart (1939) recomendó expresar la pérdida de electrolitos como un porcentaje del total de electrolitos presentes en el tejido. Para obtener los

datos, el procedimiento común es colocar muestras de tejido en un volumen estandarizado de agua destilada, permitir la salida de solutos del tejido por un periodo de 6 a 24 h y medir la conductividad inicial. Tras las mediciones, las células de las muestras se matan mediante calor (Pinhero *et al.*, 1997; Liu y Huang, 2000; DaCosta *et al.*, 2004; Wang y Huang, 2004, entre otros) o congelación rápida en N líquido (Aroca *et al.*, 2005, entre otros) y se dejan liberar solutos por un periodo adicional, usualmente 24 h. Entonces se mide nuevamente la conductividad para obtener la conductividad total. En la metodología mencionada no se requiere generar estrés en los tejidos *in vitro*. Whitlow *et al.* (1992) consideran que tanto la conductividad eléctrica de la solución donde se mantienen los tejidos, como la conductividad eléctrica expresada como porcentaje del total para una muestra dada pueden ser útiles para determinar la liberación relativa de electrolitos si la concentración interna y la superficie de corte son constantes entre las muestras.

En general la exposición de las plantas a un estrés hídrico o salino induce un incremento en la permeabilidad de las membranas celulares, aunque algunos autores no han observado cambios, aún en condiciones experimentales similares. Diferencias genotípicas podrían explicar esta contradicción aparente. El maíz (Valentovič *et al.*, 2006; Sandhya *et al.*, 2010) y el trigo (Sairam and Srivastava, 2001), por ejemplo, mostraron un incremento en la liberación de electrolitos a partir del tejido foliar en respuesta a un estrés hídrico. La raíz también mostró un incremento en la liberación de electrolitos en plantas de maíz sometidas a estrés hídrico (Kolarovič *et al.*, 2006; Valentovič *et al.*, 2006; Tsougkrianis *et al.*, 2007). El estrés salino produjo un incremento en la pérdida de electrolitos a partir del tejido foliar y radical en especies tales como arroz (Lutts *et al.*, 1996) y maíz (Gunes *et al.*, 2007), entre otras. En diversas especies, el incremento en la permeabilidad de la membrana estuvo asociado a un aumento de indicadores de estrés oxidativo, tales como el nivel de peroxidación lipídica



(e.g. contenido de malondialdehído) (Bolu y Polle, 2004; Valentovič *et al.*, 2006; Gunes *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2007) y la actividad de enzimas antioxidantes, como ascorbato peroxidasa, catalasa o glutathion peroxidasa (Singh *et al.*, 2007; Sandhya *et al.*, 2010). Por el contrario, Bastías *et al.* (2004b) no observaron el incremento en la permeabilidad de la membrana de plantas de maíz expuestas a 100 mM, con respecto a plantas cultivadas en condiciones control.

El estrés salino, así como otros factores de estrés abiótico, inducen daño oxidativo a las células vegetales a causa de la generación de especies reactivas de oxígeno (Azevedo Neto *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2007; entre otros). En las células fotosintéticas, factores de estrés tales como la sequía, la salinidad o el tratamiento con ABA limitan el aporte de CO<sub>2</sub> a la rubisco y, en condiciones de alta intensidad de luz o temperatura, la tasa de producción de poder reductor puede superar la tasa de utilización en el ciclo de Calvin, si supera la capacidad de los mecanismos de protección que tienden a disminuir el exceso del poder reductor generado (ver revisión de Chaves *et al.*, 2009). Estas condiciones de estrés también se han visto asociadas con la acumulación de azúcares solubles, los cuales se consideran, 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). 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, entre otros). La minimización del oxígeno reactivo y la maximización de la remoción del mismo parece ser una respuesta

importante a la salinidad elevada, entre otros factores de estrés (Zhu, 2001).

Las especies activas de oxígeno causan el deterioro de los lípidos de la membrana, lo cual lleva a un aumento de la liberación de solutos de las células (Mishra y Choudhuri, 1999). Por otro lado, efectos específicos del estrés salino sobre la senescencia de la hoja se han relacionado con la acumulación de iones tóxicos ( $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ ) y la disminución de  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  (Yeo y Flowers, 1983; Leidi *et al.*, 1991; Yeo *et al.*, 1991).

El mantenimiento de la integridad de la membrana es fundamental para mejorar la tolerancia al estrés, ya sea mediante mecanismos que tienden a disminuir el estrés oxidativo o mecanismos encargados de detoxificar la célula de las especies reactivas de oxígeno.

Otra respuesta comúnmente inducida por la salinidad en maíz (Lohaus *et al.*, 2000; Cha-um y Kirdmanee, 2009; Turan *et al.*, 2009) y otras especies cultivadas (Lutts *et al.*, 1996) es la disminución de la concentración foliar de clorofila. En el maíz, la disminución en la concentración de clorofila total inducida por NaCl se relacionó con menores tasas de asimilación de  $\text{CO}_2$  y transpiración (Lohaus *et al.*, 2000) y menor rendimiento cuántico máximo del PSII y tasa de asimilación neta de  $\text{CO}_2$  (Cha-um y Kirdmanee, 2009). Sin embargo, la degradación de la clorofila no fue un parámetro útil para diferenciar nivel de tolerancia a la salinidad en el maíz (Cha-um y Kirdmanee, 2009), a diferencia de otras especies tales como arroz (Lutts *et al.*, 1996) y trigo (Argentel *et al.*, 2006).

## **6.6. Masa foliar seca por unidad de área foliar (MFE)**

El incremento de la biomasa foliar no es un resultado directo de la expansión de la hoja, sino que resulta de dos procesos: i) incremento de las dimensiones del órgano (*i.e.* largo, ancho, diámetro); y ii) aumento en la masa seca del órgano (Drouet and Pagès, 2003). La masa foliar seca por

unidad de área foliar es la relación entre la masa seca de la hoja y el área foliar, generalmente expresada en  $\text{g m}^{-2}$ , y determina la cantidad de área foliar formada con cierta fracción de la biomasa foliar. A nivel de la hoja, la MFE junto con el contenido de clorofila determinan la capacidad de intercepción de luz (Niinemets, 2010).

La MFE puede variar en gran medida en función de la especie (Poorter *et al.*, 2009), la edad y estadio de desarrollo del órgano y su posición dentro de la arquitectura de la planta (Drouet *et al.*, 2005), así como en función de condiciones ambientales tales como la irradiancia, la temperatura y la inmersión. Otros factores ambientales, tales como la concentración de  $\text{CO}_2$ , el aporte de nutrientes y el nivel hídrico, afectan moderadamente la MFE y el resto de los factores ambientales sólo tienen un efecto marginal sobre la MFE (Poorter *et al.*, 2009).

La salinidad induce un estrés osmótico y, por tanto, la respuesta de la MFE es cualitativamente la misma que la inducida por el estrés hídrico. Sin embargo, la compartimentación del NaCl acumulado hacia la vacuola es una respuesta adaptativa específica de las plantas al estrés salino. El incremento de la MFE en respuesta a la salinidad por NaCl se observó en especies con niveles diferentes de tolerancia, por ejemplo *Vigna unguiculata* (Lacerda *et al.*, 2006), *Glicine max* (Wang *et al.*, 2002) y *Flaveria* sp. (Apel *et al.*, 1995), entre otras. También se ha observado un incremento del grosor de la hoja en respuesta a la salinidad, ya sea por incremento del tamaño o número de capas de las células en el mesófilo (Longstreth y Nobel, 1979) o por incremento del grosor de la cutícula (Kebede *et al.*, 1994).

## **7. Control de la absorción y transporte del $\text{Na}^+$ en las plantas**

### **7.1. Bombas primarias y transportadores de $\text{Na}^+$ de las células vegetales**

En las plantas, las bombas primarias del plasmalema y del tonoplasto proveen la fuerza motriz (potencial electroquímico de  $H^+$ ) para el transporte secundario de iones (Figura 3). La P- $H^+$ -ATPasa es la responsable primaria del marcado  $\Delta pH^+$  encontrado a través de la membrana plasmática. Esta enzima cataliza la extrusión de  $H^+$  dependiente de ATP desde el citosol hacia el espacio extracelular, creando así las diferencias de pH y potencial eléctrico a través de la membrana plasmática (con el interior negativo). En las células vegetales, la vacuola es el mayor reservorio intracelular. La acidificación de la vacuola en *Arabidopsis* está mediada por dos sistemas: la  $H^+$ -ATPasa vacuolar o ATPasa tipo V (V- $H^+$ -ATPasa) y la  $H^+$ -pirofosfatasa vacuolar, ambas ubicadas en el tonoplasto (Figuras. 3 y 4) (Taiz y Zeiger, 2002). La  $H^+$ -pirofosfatasa usa pirofosfato inorgánico como fuente de energía, lo cual le da la ventaja de conservar el ATP y por lo tanto mejorar el desempeño de la célula sometida a un ambiente más demandante (Waditee *et al.*, 2006).

Las plantas son capaces de excluir el  $Na^+$  a espacios donde no resulte tóxico para la célula a través de un antiportador  $Na^+/H^+$ , identificado como SOS1 (AtNHX7) en *Arabidopsis* (Figura 3), codificado por el gen SOS1 (*salt overly sensitive 1*). El antiportador SOS1 está regulado por los productos de al menos otros dos genes, SOS2 y SOS3. SOS2 es una serina/treonina quinasa aparentemente activada por calcio a través de la función de la SOS3, una protein fosfatasa regulada por calcio. La compartimentación vacuolar del  $Na^+$  resulta en parte a partir de la actividad de una familia de antiportadores  $Na^+-H^+$  tales como el AtNHX1 de *Arabidopsis* (Figura 4). El hecho de que la actividad de este transportador dependa del gradiente de pH generado a través del plasmalema por las  $H^+$ -ATPasas y  $H^+$ -pirofosfatasas sugiere que éstas deben ser importantes para la tolerancia a la salinidad en las plantas (para revisiones ver Yamaguchi y Blumwald, 2005; Waditee *et al.*, 2006; Duby y Boutry, 2009).

Si bien las plantas responden en forma específica a la adición de  $\text{Na}^+$  en segundos, aún se desconoce el mecanismo mediante el cual las plantas perciben la adición de  $\text{Na}^+$  y el cambio en el potencial osmótico. Según la evidencia disponible, el  $\text{Na}^+$  extracelular podría ser percibido por un receptor de membrana, mientras que el  $\text{Na}^+$  intracelular podría ser percibido ya sea por proteínas de membrana, como alguna de las muchas enzimas sensibles al  $\text{Na}^+$  del citoplasma (Waditee *et al.*, 2006). La primer respuesta medida ante un incremento de  $\text{Na}^+$  en la solución que rodea las raíces es un aumento en el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico libre (Munns y Tester, 2008).

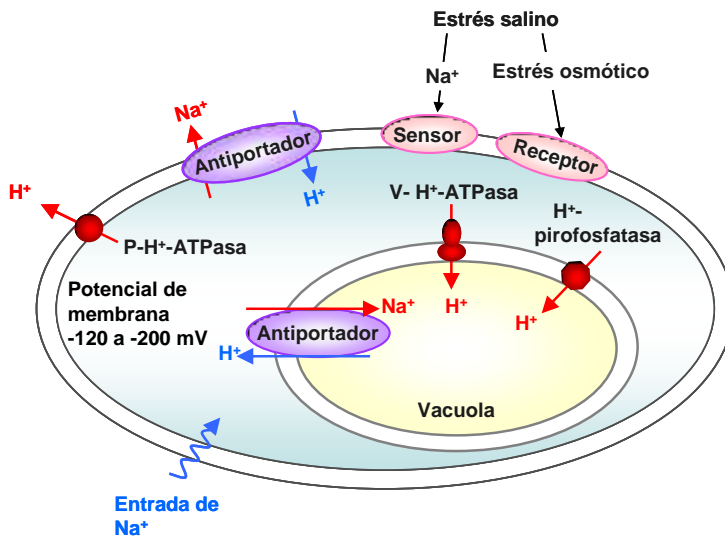


Figura 3. Modelo simplificado de los sistemas de percepción y extrusión en respuesta a la salinidad y bombas primarias de las membranas de células vegetales. Adaptado de Sanders y Bethke (2000) y Waditee *et al.* (2006).

## 7.2. Termodinámica del transporte de $\text{Na}^+$ en la raíz

### 7.2.1. Influjo de $\text{Na}^+$

La electronegatividad del citosol con respecto al exterior celular favorece la absorción pasiva del  $\text{Na}^+$  (Figura 5a). El  $\text{Na}^+$  ingresa a la célula

a través de los transportadores de  $K^+$  de alta afinidad HKT1 y a través de canales catiónicos no selectivos (Munns y Tester, 2008) (Figura 5b).

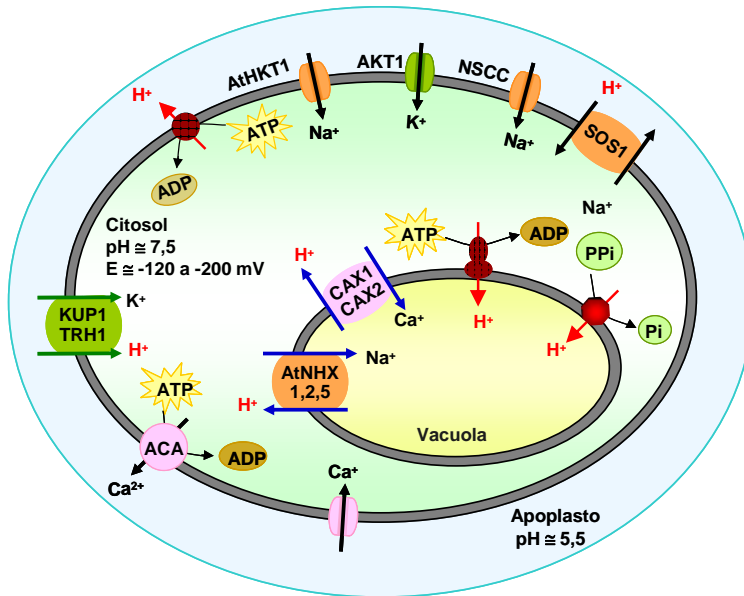
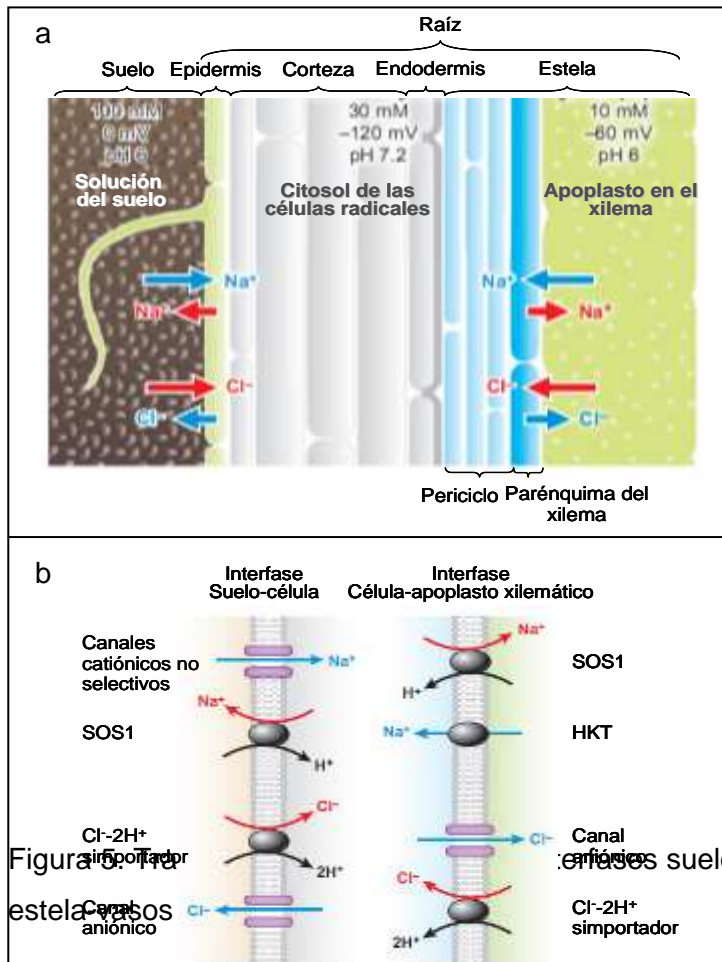


Figura 4. Proteínas de las membranas celulares involucradas en el mantenimiento de la homeostasis celular en condiciones de salinidad: bombas de  $H^+$  (ATPasas y pirofosfatasa), bombas de  $Ca^{2+}$  (ACA,  $Ca^{2+}$ -ATPasa de la membrana plasmática y el tonoplasto); transportadores secundarios (SOS1, antiportador  $Na^+/H^+$ ; KUP1/TRH1, co-transportador  $Na^+/H^+$  de alta afinidad; atHKT1, transportador que permite el influjo de  $Na^+$ , CAX1 o 2, antiportador  $Ca^{2+}/H^+$ ; atNHX1, 2 o 5, antiportador  $Na^+/H^+$  de las endomembranas) y canales iónicos (canal de entrada de  $K^+$ ; NSCC, canal catiónico no selectivo, canal de  $Ca^{2+}$ , aún no confirmado en plantas superiores). La diferencia de potencial a través del plasmalema ( $E$ ) es típicamente 120 a 200 mV, con el interior negativo; y 0 a 20 mV a través del tonoplasto con el interior positivo.

Si bien el influjo de  $Na^+$  es nocivo para la célula vegetal, este mecanismo es parte de un mecanismo de tolerancia a la salinidad. El análisis funcional de AtHKT1, el cual transporta  $Na^+$  en *Arabidopsis*, señala

la importancia de la recirculación del  $\text{Na}^+$  desde los tallos a las raíces vía el flujo del floema (para una revisión, ver Rodríguez-Navarro y Rubio, 2006). Los mutantes de este gen muestran un incremento en la acumulación de  $\text{Na}^+$  en los órganos aéreos y una disminución en la raíz con respecto al genotipo silvestre (Berthomieu *et al.*, 2003).



a) Termodinámica del transporte de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en una sección longitudinal de raíz de trigo;

b) Mecanismos propuestos para el transporte activo y pasivo de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en las dos interfases.

Las flechas rojas y azules indican transporte activo y pasivo, respectivamente.

Abreviaturas: SOS1, salt overlay sensitive mutant 1; HKT, high affinity  $\text{K}^+$  transporter.

Adaptado de Munns y Tester 2008.

### 7.2.2. Eflujo de $\text{Na}^+$

En las plantas multicelulares, el papel del eflujo de  $\text{Na}^+$  debe considerarse según el tipo de tejido y en el contexto de la planta completa,

ya que el  $\text{Na}^+$  excluido por una célula puede representar un problema para las células vecinas.

El antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de la membrana plasmática *SOS1* (*AtNHX7*) cataliza el eflujo de  $\text{Na}^+$  de manera específica. En plantas transgénicas de *Arabidopsis*, *SOS1* se expresa preferencialmente en las células epidérmicas del ápice de las raíces y en las células parénquimáticas en la unión xilema/floema de raíces, tallos y hojas (Shi *et al.*, 2002). Una función fisiológica de *SOS1* es el eflujo de  $\text{Na}^+$  desde la raíz al medio externo y también está involucrado en el control del transporte de  $\text{Na}^+$  a larga distancia entre hojas y raíces (Shi *et al.*, 2002). Por un lado, la sobreexpresión de *SOS1* redujo el contenido de  $\text{Na}^+$  y mejoró la tolerancia a la salinidad en plantas transgénicas de *Arabidopsis* (Shi *et al.*, 2003). Por otro lado, la reducción de la expresión de *SOS1* en *Thellungiella salsuginea*, especie que usualmente puede crecer en soluciones de  $\text{NaCl}$  tan concentradas como el agua del mar, la convirtió en una planta tan sensible al  $\text{Na}^+$  como *Arabidopsis* (Oh *et al.*, 2009).

### **7.3. Compartimentación intracelular de $\text{Na}^+$**

La compartimentación de  $\text{Na}^+$  en la vacuola contribuye no sólo a disminuir la concentración de  $\text{Na}^+$  en el citoplasma, sino también a mantener el potencial de presión celular, lo cual la protege de la pérdida de agua en soluciones salinas (Blumwald, 2000). Otros orgánulos tales como los plastos y la mitocondria también pueden acumular  $\text{Na}^+$  y por lo tanto contribuir a la compartimentación subcelular total del  $\text{Na}^+$ .

En *Arabidopsis*, *AtNHX1-6* probablemente están involucrados en la compartimentación intracelular de  $\text{Na}^+$ . *AtNHX1* y *AtNHX2* se localizan en el tonoplasto y sus niveles de transcripción están regulados positivamente por el ABA o por el estrés osmótico. La sobreexpresión del gen que



codifica la proteína AtNHX1 mejoró sustancialmente la tolerancia a salinidad en varias especies (para una revisión ver Pardo *et al.*, 2006).

#### **7.4. Efecto de la concentración de $\text{Ca}^{2+}$ en la solución nutritiva sobre el influjo neto de $\text{Na}^+$**

El NaCl produce una reducción de la actividad del  $\text{Ca}^{2+}$  en la solución externa adyacente al plasmalema de las células de la raíz (Cramer y Läuchli, 1986; Cramer *et al.*, 1986). Bajo condiciones salinas, el incremento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la solución externa actuó como protector de la membrana y mejoró su funcionalidad (Cramer *et al.*, 1985) e incrementó la conductividad hidráulica de la raíz (Azaizeh *et al.*, 1992) en plantas de algodón y maíz, respectivamente. En el maíz, por ejemplo, una mayor concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la solución salina redujo significativamente las concentraciones de  $\text{Na}^+$  en la zona de crecimiento foliar de dos cultivares que diferían en su capacidad de excluir el  $\text{Na}^+$  (Cramer, 1992a).

Si bien los mecanismos involucrados en la interacción entre el  $\text{Ca}^{2+}$  y el NaCl aún no han sido completamente esclarecidos, los resultados publicados sobre el tema concuerdan en que la adición de NaCl y de  $\text{Ca}^{2+}$  a la solución de cultivo reduce la actividad de la mayoría de los iones, por cambios en la fuerza iónica, apareamiento entre iones y precipitación (Cramer y Läuchli, 1986; Cramer *et al.*, 1986; Zidan *et al.*, 1991). Zidan *et al.* (1991) observaron que la mitad de la inhibición máxima del influjo de  $^{22}\text{Na}^+$  en segmentos de raíces de maíz incubados en soluciones que contenían desde 0,25 a 100 mM de NaCl se logró con una actividad de  $\text{Ca}^{2+}$  en la solución de  $0,26 \pm 0,10$  mM. De acuerdo a estos resultados, los autores sugieren que se debe requerir una actividad de  $\text{Ca}^{2+}$  mínima en la solución externa que asegure la saturación del ligamiento electrovalente y reversible del  $\text{Ca}^{2+}$  en los sitios de la membrana plasmática que tienen un papel parcial en la regulación del influjo del  $\text{Na}^+$ . Por lo tanto, una

resistencia considerable al influjo de  $\text{Na}^+$  se mantendría siempre y cuando un nivel crítico del  $\text{Ca}^{2+}$  o actividad iónica en la solución externa sature efectivamente estos sitios esenciales de ligamiento del  $\text{Ca}^{2+}$  en la superficie del plasmalema. Como los niveles de  $\text{Na}^+$  crecientes en la rizósfera reducen la actividad del  $\text{Ca}^{2+}$  (Cramer *et al.*, 1986, entre otros), ésta podría llegar a niveles menores al requerido para saturar la membrana, llevando entonces a un influjo acelerado de iones  $\text{Na}^+$ . Resultados obtenidos con plantas cultivadas en campo apoyan esta hipótesis, ya que el agregado de  $\text{Ca}^{2+}$  al suelo no produjo un efecto sobre el influjo de  $\text{Na}^+$  a la planta o sobre el crecimiento de la misma, porque los niveles típicos de  $\text{Ca}^{2+}$  en los suelos salinos están alrededor de 15 mM, muy por encima de los 0,5 mM de actividad del  $\text{Ca}^{2+}$  requeridos para saturar el plasmalemma (Zidan *et al.*, 1991).

#### **7.5. Papel de la exclusión del $\text{Na}^+$ en la tolerancia a la salinidad en el maíz**

El maíz muestra una gran variación intraespecífica en la habilidad de excluir el sodio (Schubert y Läuchli, 1986, 1990; Mühlíng y Läuchli, 2002; Eker *et al.*, 2006). Sin embargo, los resultados publicados son contradictorios con respecto al papel de la exclusión del  $\text{Na}^+$  en la tolerancia del maíz a la salinidad. Algunos autores informaron que la mayor tolerancia a la salinidad por NaCl está asociada con la capacidad de algunos genotipos de maíz de excluir el  $\text{Na}^+$  (Maas y Grieve, 1987; Cramer, 1992a; Fortmeier y Schubert, 1995; Mühlíng y Läuchli, 2002; Eker *et al.*, 2006). Por el contrario, otros autores no encontraron relación entre el nivel de  $\text{Na}^+$  en el tallo y la tolerancia a la salinidad (Alberico y Cramer, 1993; Cramer *et al.*, 1994a) y sugirieron que la tolerancia a la salinidad en el maíz se relaciona más bien con la capacidad de las células de

compartimentar el  $\text{Na}^+$  en la vacuola, o sea mantener un nivel bajo de  $\text{Na}^+$  en el citoplasma.

Resultados recientes (Goudarzi y Pakniyat, 2008) señalan que la mayor tolerancia a la salinidad por cloruro de sodio observada en trigo, con respecto al maíz, estaría relacionada en gran medida con la capacidad de la primera especie de mantener la homeostasis en la relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$ , mediante la acumulación de un contenido menor de  $\text{Na}^+$  y mayor de  $\text{K}^+$ . Las variaciones en la tolerancia a la salinidad entre genotipos de maíz también se han asociado con la capacidad de mantener una relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  relativamente alta (Çiçek y Çakırlar, 2002; Eker *et al.*, 2006; Goudarzi y Pakniyat, 2008). Una relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  alta ha sido mostrada como un parámetro fiable para la determinación de tolerancia a la salinidad en especies tales como tomate (Dasgan *et al.*, 2002), algodón (Ashraf, 2002) y trigo (Colmer *et al.*, 2006, entre otros). Sin embargo, se encontraron diferencias entre los genotipos de maíz en los mecanismos que llevan al incremento de la relación  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  foliar en respuesta a la salinidad. En todos los genotipos de maíz estudiados, la presencia de  $\text{Na}^+$  en la solución de cultivo indujo un incremento en la concentración foliar de  $\text{Na}^+$  (Lohaus *et al.*, 2000; Çiçek y Çakırlar, 2002; Eker *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2007; Goudarzi y Pakniyat, 2008). Sólo en algunos genotipos (Goudarzi y Pakniyat, 2008; Azad *et al.*, 2012), la presencia de 80 ó 100 mM de  $\text{Na}^+$  indujo cambios en la absorción tanto del  $\text{Na}^+$  como del  $\text{K}^+$  (incremento y disminución, respectivamente). Otros autores observaron un aumento en la absorción de  $\text{Na}^+$  pero sin cambios regulares en la concentración foliar de  $\text{K}^+$  en respuesta al incremento de la concentración de  $\text{Na}^+$  en la solución (Lohaus *et al.*, 2000; Çiçek y Çakırlar, 2002). En cambio, concentraciones altas de  $\text{Na}^+$  (250 mM) indujeron una disminución significativa en el contenido foliar de  $\text{K}^+$  con respecto al control en 19 variedades híbridas de maíz (Eker *et al.*, 2006). Estos autores observaron, además, que las diferencias genotípicas en el contenido de  $\text{K}^+$  fueron bajas comparadas con

las del  $\text{Na}^+$  y que el genotipo más sensible a la salinidad no difirió del más tolerante en la concentración de  $\text{K}^+$  del vástago. Los resultados mencionados y el hecho de que la relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  del vástago fue 4 veces mayor en el genotipo más tolerante que en el más sensible, llevaron a los autores a concluir que el principal mecanismo que contribuyó a la mayor tolerancia en las variedades evaluadas fue la menor acumulación de  $\text{Na}^+$ , más que una acumulación mejorada de  $\text{K}^+$  en los vástagos. La variedad más tolerante también mostró una relación  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$  superior al resto de las evaluadas en ese trabajo (Eker *et al.*, 2006).

## HIPÓTESIS DE TRABAJO

- ✓ Los embriones de algunos cruzamientos inviables abortan por un mal funcionamiento del endosperma, lo cual interrumpe el abastecimiento de nutrientes. Estos embriones tienen el potencial para desarrollarse en un medio de cultivo artificial.
- ✓ A partir de embriones inmaduros u otros explantos híbridos de maíz y especies relacionadas, es posible inducir organogénesis o embriogénesis somática y obtener plantas híbridas.
- ✓ Los híbridos F1 de maíz por *T. dactyloides* presentan un nivel alto de esterilidad. La fertilidad puede ser restablecida mediante en generaciones avanzadas obtenidas por retrocruzamiento o autofecundaciones.
- ✓ La tolerancia a la salinidad observada en las plantas F1 del híbrido de maíz x *T. dactyloides* puede mantenerse en generaciones avanzadas del híbrido.
- ✓ La tolerancia a la salinidad observada en las plantas F1 del híbrido de maíz x *T. dactyloides* se debe a una combinación de mecanismos presentes por separado en las especies progenitoras.



## OBJETIVOS

- ✓ Obtener híbridos a partir de cruzamientos incompatibles entre *Z. mays* ssp. *mays*  $2n = 20$  ó  $40$  y *T. dactyloides* mediante el rescate y cultivo *in vitro* de los embriones inmaduros.
- ✓ Evaluar los factores que influyen en la regeneración de plantas a partir de embriones de *Zea* en cultivo (genotipo, medio de cultivo y edad del explanto), para obtener altas frecuencias de regeneración de plantas.
- ✓ Determinar el número cromosómico y la fertilidad de la progenie de un híbrido F1 ( $2n = 56$ ) de maíz ( $2n = 40$ ) x *T. dactyloides* ( $2n = 72$ ).
- ✓ Determinar el nivel de tolerancia a la salinidad y alcalinidad de plantas de *T. dactyloides* en estadio vegetativo temprano y compararlo con plantas de maíz (línea B73, ampliamente difundida como progenitora de híbridos comerciales) en las mismas condiciones.
- ✓ Evaluar los efectos de la salinidad y la alcalinidad sobre diferentes parámetros fisiológicos (CRA, MFE,  $PPE_f$ , contenido de pigmentos foliares, contenido de  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Na^+$  y desarrollo) de plantas de maíz y *T. dactyloides*.
- ✓ Obtener generaciones avanzadas (mediante retrocruzamientos, con una u otra de las especies parentales, o autofecundaciones) de un híbrido de maíz x *T. dactyloides*.
- ✓ Evaluar el nivel de tolerancia a la salinidad de las generaciones avanzadas de un híbrido F1 de maíz x *T. dactyloides* que mostró tolerancia a 250 mM de NaCl en estadio vegetativo y compararlo con la respuesta del maíz (línea B73).
- ✓ Evaluar los efectos de la salinidad sobre diferentes parámetros fisiológicos (contenido relativo de agua (CRA), masa foliar específica (MFE), porcentaje de pérdida de electrolitos foliar ( $PPE_f$ ), contenido de pigmentos foliares, contenido de cationes ( $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Na^+$ ) y desarrollo

de plantas de maíz (línea B73) y generaciones avanzadas de un híbrido de maíz x *T. dactyloides*.



# **CAPÍTULO I. Regeneración de plantas a partir de embriones inmaduros de *Zea mays* ssp. *mays* x *Tripsacum dactyloides* (L.) L.**

## **1. INTRODUCCIÓN**

La hibridación remota (es decir, entre especies relativamente alejadas en términos filogenéticos) ofrece un gran potencial para ampliar la variabilidad genética por introgresión de características deseables en las especies cultivadas (e.g., introducción de uno o varios genes o adición/sustitución/translocación de cromosomas o segmentos cromosómicos) o por generación de nuevos alopoliploides que combinen características deseables inicialmente separadas en ambas especies parentales (Matzk *et al.*, 1997).

Aunque *Zea* y *Tripsacum* están aislados reproductivamente por barreras gametofíticas y esporofíticas, los híbridos pueden obtenerse mediante el acortamiento de los estigmas del maíz (Mangelsdorf y Reeves, 1931) y posterior rescate de embriones (James, 1979; Bernard y Jewell, 1985). Varios autores han estudiado la utilidad potencial de estos híbridos como punto de partida para incorporar al maíz resistencia a enfermedades (Berquist, 1981), aerénquima constitutivo (Ray *et al.*, 1999), apomixis gametofítica (Petrov, 1971; Leblanc *et al.*, 1995a; Kindiger *et al.*, 1996a,b; Sokolov *et al.*, 2000), tolerancia a salinidad (Pesquiera *et al.*, 2003, 2006) y tolerancia a bajas temperaturas (Jatimliansky *et al.*, 2004).

La producción de híbridos de maíz y *Tripsacum* no ha sido muy eficiente, aún con la ayuda del cultivo de embriones. James (1979) obtuvo 19 híbridos (14 clásicos, con el complemento gamético completo de cada padre, y 5 no clásicos, que mostraron células somáticas con 20 cromosomas de maíz y hasta 8 de *Tripsacum*) de 15.070 cruzamientos entre varios genotipos de maíz y *Tripsacum* (0,0012 %), Bernard y Jewell (1985) obtuvieron 142 plantas de 4956 cruzamientos (7,07 %) y García y Molina (1997) obtuvieron 3 plantas de 59 embriones sembrados en un

medio nutritivo sin reguladores de crecimiento. Sin embargo, son pocos los antecedentes relacionados con la regeneración de plantas por organogénesis o embriogénesis somática a partir de embriones obtenidos de cruzamientos entre el maíz y sus parientes silvestres (Furini y Jewell, 1995, García y Molina, 1997; García *et al.*, 2000). La utilización eficiente de esta técnica permitiría regenerar varias plantas por embrión e incrementar de esta manera el número de híbridos regenerados y, además, daría la posibilidad de aprovechar la variación somaclonal que puede surgir en procesos de regeneración por vía indirecta, es decir a partir de callos. En este sentido, se ha observado que el cultivo de callos organogénicos de maíz durante largos períodos induce la ocurrencia de alteraciones cromosómicas (García y Molina, 1998) que, en este caso, podrían aumentar la frecuencia de intercambio entre los cromosomas de las especies hibridadas.

Los principales factores que afectan la frecuencia de inducción de organogénesis y embriogénesis somática en maíz y otras especies e híbridos de *Zea* son el genotipo, la edad del explanto y el medio de cultivo, principalmente el tipo y la concentración del regulador de crecimiento utilizado (Tomes y Smith, 1985; García y Molina, 1997; García y Molina, 2001; entre otros). En maíz (García *et al.*, 1991a-b), maíz x *T. dactyloides* (García y Molina, 1997) y maíz tetraploide x *Z. mays ssp. parviglumis* (García y Molina, 2001), se ha observado un incremento notable en la frecuencia de inducción de embriogénesis somática a medida que disminuye el tamaño del embrión. Las mayores frecuencias de inducción en los genotipos mencionados se han obtenido con embriones entre los estadios globular y de transición (0,1 a 0,45 mm de longitud, sin contar el suspensor), a pesar de la dificultad que ofrece la extracción de los embriones en estos estados tempranos del desarrollo. En estos mismos genotipos, las mejores respuestas se obtuvieron utilizando como regulador de crecimiento el 2,4-D a concentraciones de 1 a 4  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . En el híbrido

maíz x *T. dactyloides* (García y Molina, 1997), la adición de kinetina al medio de cultivo afectó negativamente la capacidad de regeneración, la formación de raíces adventicias y la supervivencia de las plantas.

Varios autores han realizado estudios morfológicos e histológicos del cultivo de embriones inmaduros de maíz en presencia de 2,4-D y han descrito la regeneración de plantas a partir de callos blancos, compactos, con estructuras similares a los escutelos de los embriones cigóticos (embriogénesis tipo I) (Fransz y Schel, 1987), callos friables altamente embriogénicos (embriogénesis tipo II) (Armstrong y Green, 1985; Kamo y Hodges, 1986) o callos que originan estructuras similares a hojas y raíces adventicias (organogénesis) (Springer *et al.*, 1979; Van Lammeren, 1988).

Los cruzamientos de maíz x *T. dactyloides* han dado origen a híbridos F1 sexualmente estériles (Sokolov *et al.*, 2000). La aplicación de un programa de selección somaclonal tras un proceso de hibridación interespecífica puede ser una herramienta metodológica para conseguir híbridos simétricos con ciertas reordenaciones cromosómicas o híbridos asimétricos fértiles.

Los objetivos de este trabajo han sido: a) evaluar la respuesta *in vitro* de embriones inmaduros obtenidos de cruzamientos entre distintos genotipos de *Zea mays* ssp. *mays* y *T. dactyloides*; b) obtener callos que conserven la capacidad de regenerar plantas por largos períodos, con el fin de implementar un programa de selección somaclonal.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales vegetales utilizados fueron:

- *Zea mays* ssp *mays* ( $2n = 20$ ): Cultivar Colorado Klein (CK), var. Zapalote Chico (Zch), línea Knobless (Kls) – las dos últimas cedidas por el Maize Genet. Coop. Stock Center, Missouri – y la línea comercial B73.

- *Zea mays* ssp *mays* (2n = 40): Línea N107A (cedida por el Maize Genet. Coop. Stock Center, Missouri).

- *Tripsacum dactyloides* (2n = 72). Cedido por el Dr. Bird (CIMMYT, México)

A partir de cruzamientos entre los distintos genotipos de maíz y *T. dactyloides* se han obtenido los siguientes híbridos:

- cultivar C.K. x *T. dactyloides* (CKxT)
- var. Zapalote Chico x *T. dactyloides* (ZchxT)
- línea Knobless x *T. dactyloides* (KlsxT)
- línea B73 x *T. dactyloides* (B73xT) y
- línea N107A x *T. dactyloides* (N107AxT).

Las plantas madres se sembraron en el invernadero el 1 de octubre de 2001. Entre el 5/12 y el 20/12 se realizaron los cruzamientos. Las espigas de maíz se mantuvieron cubiertas con bolsas de papel hasta la emergencia de los estigmas, los cuales se cortaron inmediatamente antes de la aplicación del polen de *T. dactyloides*. Las espigas se cubrieron nuevamente para evitar contaminación con polen de maíz y a las 48 h se pulverizaron superficialmente con 460  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Las espigas se cosecharon a los 13, 14, 15, 16 ó 19 días después de la polinización (DDP). Los cariopses desarrollados se separaron y se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio (2,5 % de Cloro activo). Los embriones se aislaron del cariopse y se colocaron sobre el medio de cultivo con o sin 2,4-D en dos orientaciones, según el propósito del experimento:

- en el medio que contenía 2,4-D, los embriones se colocaron con el eje embrionario hacia abajo con el fin de inducir organogénesis o embriogénesis somática a partir del escutelo.

- en el medio sin reguladores del crecimiento, los embriones se colocaron hacia arriba para inducir la germinación de los mismos.

La incubación se realizó a 28°C-30°C de temperatura, con un flujo fotónico fotosintético de 31  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y un fotoperíodo de 16 h. El medio de inducción estaba compuesto por el medio básico de García *et al.* (1992) libre de reguladores de crecimiento o con 4,6  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de 2,4-D. Los callos se mantuvieron mediante subcultivos mensuales en el mismo medio. Los brotes obtenidos en el medio de iniciación se repicaron al medio básico sin reguladores del crecimiento y se incubaron en las mismas condiciones de temperatura y fotoperíodo. Las plantas regeneradas se transplantaron a macetas con lombricompost y se cubrieron individualmente con polietileno. Aproximadamente a las tres semanas, las plantas rustificadas se transplantaron al suelo dentro del invernadero.

El reactivo de Lugol se utilizó para determinar la fertilidad del polen, el cual se consideró fértil cuando mostraba al menos las  $\frac{3}{4}$  partes del grano coloreado.

La Desviación asociada a cada frecuencia (DAF) se calculó según la siguiente fórmula:

$$100 [p (1- p) / n ]^{0,5}$$

Donde: p = frecuencia y n = número de embriones contabilizados.

Las medias se analizaron mediante el Análisis de la Varianza y el test de Diferencias Mínimas Significativas ( $P < 0,05$ ).

### 3. RESULTADOS

A partir de los cruzamientos de maíz y *T. dactyloides* se obtuvieron espigas con cariopses desarrollados en el tercio superior. Los cariopses de todos los genotipos evaluados mostraron un endosperma turgente y translúcido hasta los 16 DDP. En cambio, a los 19 DDP, los cariopses (híbrido CKxT) se observaban achatados debido al escaso contenido de endosperma. A pesar de la falta de desarrollo del endosperma, los

embriones de este híbrido prácticamente duplicaron su tamaño (promedio en mm  $\pm$  EEM) entre los 15 y 19 DDP (de  $1,30 \pm 0,09$  a  $2,54 \pm 0,22$ ).

El tamaño de los embriones híbridos varió de acuerdo al genotipo de la planta madre y la edad de los mismos (Tabla 5), pero también se observó variación dentro de la misma espiga (Figura 6). Dentro de cada genotipo, el tamaño promedio del total de embriones sembrados en el medio de inducción fue similar al tamaño promedio de los embriones que originaron organogénesis o embriogénesis somática (Figura 7), pero solamente los embriones que medían menos de 1,25 mm de longitud originaron callos a partir de los cuales se obtuvieron brotes, excepto un embrión de 1,85 mm del híbrido CKxT.

Tabla 5. Tamaño promedio de embriones híbridos de maíz y *T. dactyloides*, cosechados a los 13, 14 y 15 días después de la polinización (DDP). Valores seguidos de letras distintas en la columna difieren significativamente ( $P < 0,05$ ).

Híbrido	Longitud promedio de los embriones (mm) $\pm$ EEM*					
	13 DDP	n	14 DDP	n	15 DDP	n
CKxT	$0,95 \pm 0,08a$	22	$1,14 \pm 0,10a$	27	$1,30 \pm 0,09a$	33
ZchxT	$0,76 \pm 0,06b$	31	$0,61 \pm 0,04b$	35	nr	
B73xT	$0,74 \pm 0,05b$	36	nr		nr	
KlsxT	nr		nr		$1,17 \pm 0,08a$	57
N107BxT	nr		$1,06 \pm 0,12a$	24	nr	

nr: no realizado.

Entre los 25 y 30 días después de la siembra (DDS) de los embriones, se observaron: i) callos compactos, blancos, con estructuras similares a los escutelos de los embriones cigóticos (Figura 8a), a partir de

las cuales posteriormente emergían los coleóptilos; ii) callos organogénicos verdes, globulares, que originaron raíces y estructuras similares a hojas (Figura 8b); y iii) callos que originaron ambos tipos de estructuras. Los brotes regenerados enraizaron en el medio básico libre de reguladores del crecimiento. Si bien las frecuencias de inducción de callos con capacidad de regeneración variaron significativamente entre los híbridos evaluados, el número de plantas regeneradas hasta los 6 meses después de la siembra (MDS) fue similar para los híbridos ZchxT, CKxT y KlsxT, debido a que dieron lugar a diferentes números de plantas regeneradas por explanto competente (Tabla 6). En el híbrido B73xT, si bien se observó la inducción de embriogénesis somática, no se pudo conseguir la elongación de los brotes y la regeneración de plantas enteras (Tabla 6).

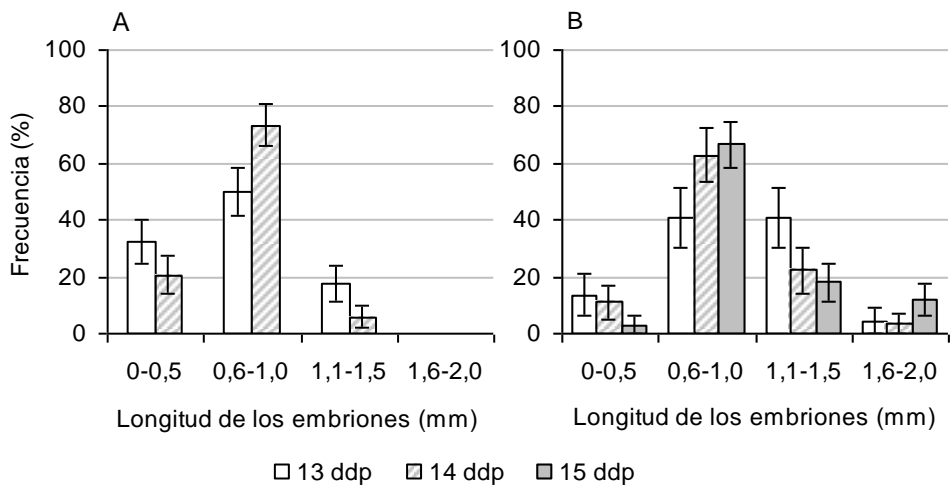


Figura 6. Tamaño de los embriones híbridos procedentes del cruce entre distintos genotipos de maíz y *T. dactyloides* en el momento del rescate de los mismos: A) ZchxT; B) CKxT. Los datos que se muestran para cada edad de los embriones se tomaron a partir de una sola espiga. Las barras indican la desviación asociada a la frecuencia.

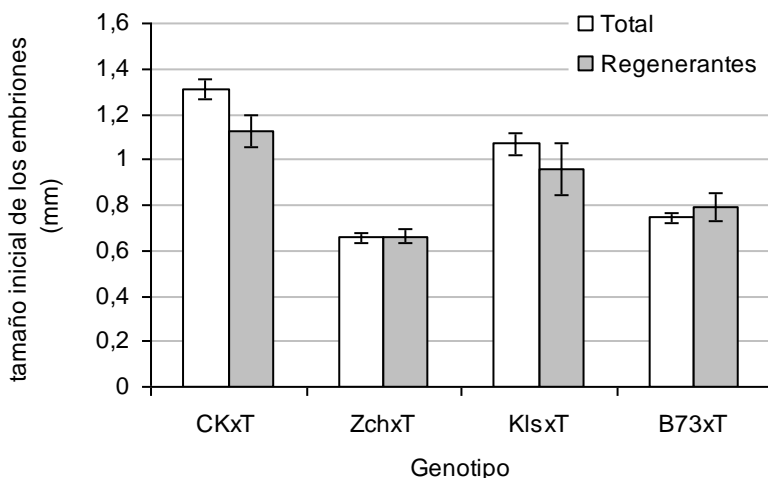


Figura 7. Tamaño inicial de los embriones híbridos de maíz y *T. dactyloides*, sembrados en el medio básico de García *et al.* (1992) con el agregado de  $4,6 \mu\text{mol L}^{-1}$  de 2,4-D. Las barras representan  $\pm$  EEM.

Tabla 6. Regeneración de plantas a partir de embriones híbridos de maíz y *T. dactyloides*, rescatados entre los 13 y 15 DDP y sembrados en el medio básico de García *et al.* (1992) con la adición de  $4 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de 2,4-D. \* Las observaciones se hicieron 25 a 30 días después de la siembra. MDS: meses después de la siembra.

Respuesta	Híbrido			
	ZchxT	CKxT	KlsxT	B73xT
Organogénesis/ embriogénesis somática (% embriones $\pm$ DAF)*	46,3 $\pm$ 8	19,1 $\pm$ 6	8,8 $\pm$ 5	15,8 $\pm$ 6
Número de plantas regeneradas 6 MDS	12	13	13	0
Promedio de plantas regeneradas/explanto competente 6 MDS	0,63	1,44	4,33	0
Número de embriones sembrados	41	47	34	38

\*DAF: desviación asociada a la frecuencia



A los 6 meses después de la siembra (MDS) de los embriones, la frecuencia de callos organogénicos (sobre el total de embriones sembrados) disminuyó un 63,54 % y un 50 % en los híbridos ZchxT y KlsxT, respectivamente y se mantuvo igual en el híbrido CKxT. A partir de los 6 MDS, los callos perdieron su capacidad de regeneración con los sucesivos repiques. Solamente el híbrido ZchxT originó callos (4,88 % sobre los embriones sembrados) que conservaban su capacidad organogénica a los 6 MDS de los embriones y la mantuvieron por más de 24 meses de repiques sucesivos. En este periodo, los callos organogénicos del híbrido ZchxT (originados a partir de 2 de los embriones sembrados) regeneraron aproximadamente 100 plantas.

Otras respuestas observadas a partir de los embriones cultivados en presencia de 2,4-D fueron: rizogénesis, callos compactos o translúcidos no organogénicos, germinación normal, o crecimiento solamente del coleóptilo o de la radícula (Tabla 7). En ningún caso estas respuestas originaron plantas capaces de sobrevivir el período de rustificación.

Los embriones sembrados en el medio sin reguladores de crecimiento (Tabla 8) mostraron bajos porcentajes de germinación normal (crecimiento del coleóptilo y la radícula). El crecimiento del coleóptilo solamente (es decir, sin desarrollo de la radícula, Figura 8c) y la ausencia de desarrollo fueron las respuestas más frecuentes en todos los genotipos evaluados. Si bien se obtuvieron plantas (vástago + raíz embrional o raíces adventicias) *in vitro*, en ningún caso superaron el período de rustificación. En los casos en que se formaron raíces adventicias, nunca se observó más de una por planta.

Las plantas regeneradas hasta los 6 MDS mostraron un número cromosómico somático de  $2n=46$  (Figura 9a) y un fenotipo similar a las plantas de *T. dactyloides*. Las plantas híbridas son macolladoras (Figura 9b), las flores femeninas se disponen en una espiga con 2 hileras de cariopses (Figura 8d), los cuales están cubiertos por las glumas, pero no

encerrados en una cúpula (estructura formada por el engrosamiento del raquis que cubre gran parte del cariopse de *T. dactyloides*). El raquis se desarticula a la madurez. Las flores masculinas se agrupan en panojas terminales separadas de las espigas o a continuación de las mismas.

La fertilidad del polen de los híbridos, estimada con el reactivo de Lugol, varió entre el 0 % y el 12,4 %. No se observaron semillas viables.

Tabla 7. Respuestas observadas a los 25-30 DDS en embriones híbridos de maíz y *T. dactyloides*, sembrados en presencia de  $4,6 \mu\text{mol L}^{-1}$  de 2,4-D.

Respuesta (% de embriones sembrados $\pm$ DAF <sup>*</sup> )	Genotipo			
	CKxT	ZchxT	KIsxT	B73xT
Embriogénesis somática	14,9 $\pm$ 5,2	31,7 $\pm$ 7,3	2,9 $\pm$ 2,9	15,8 $\pm$ 5,9
Organogénesis	4,3 $\pm$ 2,9	9,8 $\pm$ 4,6	2,9 $\pm$ 2,9	0,0 $\pm$ 0,0
Embriogénesis somática y organogénesis	0,0 $\pm$ 0,0	4,9 $\pm$ 3,4	2,9 $\pm$ 2,9	0,0 $\pm$ 0,0
Callo rizogénico	4,3 $\pm$ 2,9	2,4 $\pm$ 2,4	23,5 $\pm$ 7,3	26,3 $\pm$ 7,1
Callo no organogénico	44,7 $\pm$ 7,2	43,9 $\pm$ 7,7	47,1 $\pm$ 8,6	42,1 $\pm$ 8,0
Crecimiento del coleóptilo	2,1 $\pm$ 2,1	4,9 $\pm$ 3,4	14,7 $\pm$ 6,1	2,6 $\pm$ 2,6
Coleóptilo + callo rizogénico	17,0 $\pm$ 5,5	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
Crecimiento de la raíz	0,0 $\pm$ 0,0	2,4 $\pm$ 2,4	2,9 $\pm$ 2,9	2,6 $\pm$ 2,6
Sin crecimiento	12,8 $\pm$ 4,9	0,0 $\pm$ 0,0	2,9 $\pm$ 2,9	10,5 $\pm$ 5,0
Total embriones sembrados	47	41	34	38

DAF: desviación asociada a la frecuencia

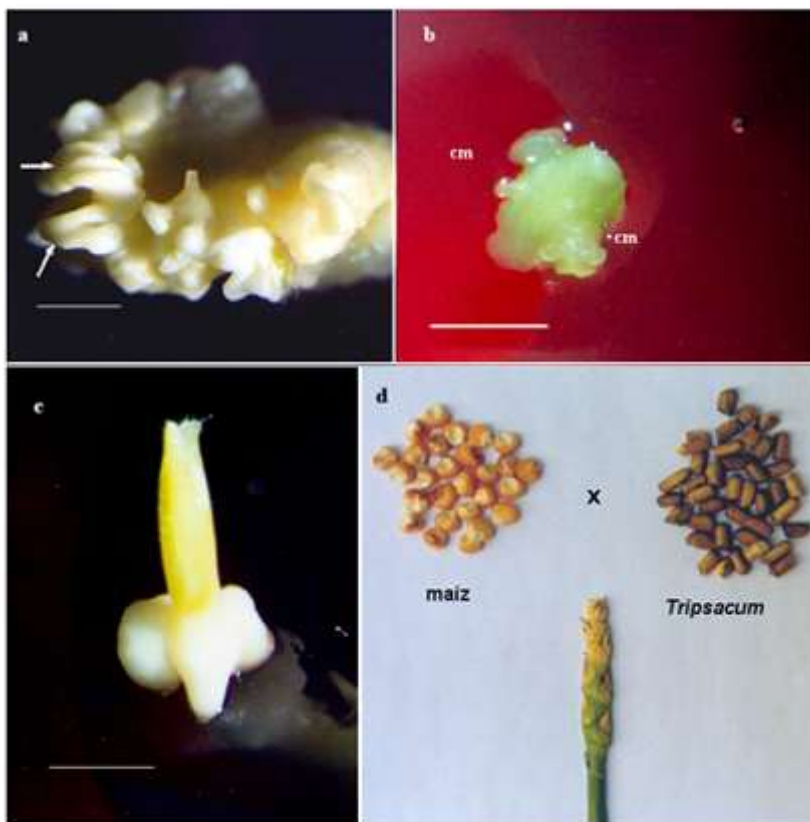


Figura 8. Rescate de embriones híbridos de *Z. mays* ssp. *mays* cv. Zapalote chico y *T. dactyloides*: a) embriones somáticos originados a partir del escutelo de un embrión, 28 días después de la siembra en un medio con  $4,6 \mu\text{mol L}^{-1}$  de 2,4-D; b) organogénesis a partir del escutelo de un embrión, 30 días después de la siembra en un medio con  $4,6 \mu\text{mol L}^{-1}$  de 2,4-D; c) embrión, 28 días después de la siembra en un medio sin reguladores de crecimiento; d) cariopses de los progenitores y espiga del híbrido regenerado. Las flechas señalan estructuras similares a escutelos; mc: meristemas caulinares; barra = 1 mm.

Tabla 8. Respuestas de los embriones híbridos de maíz (♀) y *T. dactyloides* (♂), aislados del cariopses en diferentes días después de la polinización (DDP) y cultivados en el medio nutritivo de García *et al*, (1992) libre de reguladores del crecimiento.

Respuestas (% sobre el total de embriones sembrados)	Genotipo materno y edad de los embriones híbridos (DDP)					
	KIs (16)	Zch (13)	Zch (14)	KIs (15)	KIs (19)	N107A (14)
Coleóptilo + radícula	17,7	0,0	27,3	0,0	33,3	0,0
Coleóptilo	58,8	66,7	36,7	45,4	22,2	66,7
Raíz	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	8,3
Sin desarrollo	23,5	33,3	36,7	54,6	38,9	25,0
Callo	0,0	0,0	0,0	18,2	5,6	0,0
Plantas con raíces adventicias	52,9	11,1	0,0	0,0	5,6	0,0
Plantas	52,9	11,1	9,1	0,0	11,1	0,0
n	17	9	11	11	18	12

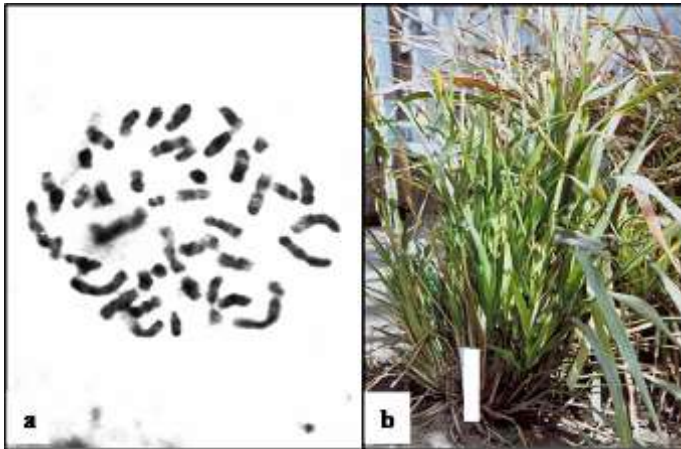


Figura 9. Híbrido de maíz x *T. dactyloides*: a) célula somática en metafase, mostrando  $2n=46$  cromosomas; b) Planta adulta a los 18 meses de la regeneración por embriogénesis somática.

#### 4. DISCUSIÓN

En los híbridos evaluados, el 99,4 % de los callos con capacidad de regeneración se originó a partir embriones de 1,25 mm o menos de longitud. En trabajos previos con maíz e híbridos de maíz y *Z. mays* ssp *parviglumis* o *T. dactyloides*, también se ha observado una influencia marcada del estadio de desarrollo del embrión sobre la inducción de callos con capacidad de regenerar plantas, ya sea por organogénesis o embriogénesis somática. En todos los casos, la respuesta embriogénica disminuyó con la edad de los embriones y las mayores frecuencias de inducción de embriogénesis somática (hasta el 100 %) se obtuvieron con embriones menores a 0,5 mm de longitud (García *et al.*, 1991b; García *et al.*, 2000; García y Molina, 2001). Sin embargo, los embriones menores a 0,5 mm de longitud son difíciles de obtener, al menos en número suficiente. Por un lado, los embriones se confunden con el endosperma y, además, la heterogeneidad de tamaño dentro de la espiga hace que se pierda un porcentaje alto de los embriones más pequeños. García y Molina (1997), a partir de un cruzamiento de maíz ( $2n=20$ ) x *T. dactyloides*, observaron que a los 12 DDP los cariopses mostraban un endosperma turgente y translúcido y los embriones se encontraban en los estadios globular o de transición y medían menos de 0,5 mm de longitud sin contar el suspensor. De aproximadamente 150 cariopses desarrollados, se rescataron solamente 56 embriones. El resto no se encontró debido probablemente al escaso tamaño. De acuerdo a la compatibilidad de los genotipos progenitores, se observó que el número de cariopses que comienzan a desarrollarse tras la polinización es muy variable, desde 0 hasta aproximadamente 75 por espiga (datos no mostrados). Por este motivo, la obtención de plantas de algunos de los híbridos depende de la posibilidad de rescatar el mayor número posible de los embriones formados. En los genotipos evaluados, entre el 17 % y el 47 % de los

embriones de 0,50 a 1,25 mm de longitud originó callos con capacidad de regeneración. Si bien el tamaño promedio de los embriones también varió con el genotipo de la planta madre (Tabla 3), entre los 13 y 15 días después de la polinización, al menos el 40 % de los embriones medía entre 0,50 y 1,25 en todos los cruzamientos.

A partir de los embriones híbridos de maíz y *T. dactyloides* se originaron tres tipos de callos con capacidad de regenerar plantas: uno coincide con la descripción morfológica de la embriogénesis somática tipo I en maíz (Armstrong y Green, 1985; Tomes y Smith, 1985; Fransz y Schel, 1987; Luppoto y Lusardi, 1988), otro con la descripción de la organogénesis, también en maíz (Springer *et al.*, 1979; Van Lammeren, 1988) y en el tercero se observaron ambos tipos de desarrollo.

En el híbrido B73xT, si bien se observó la inducción de embriogénesis somática, no se pudo lograr la elongación de los brotes y la regeneración de plantas enteras (Tabla 7). Esta respuesta podría estar determinada por la baja capacidad de regeneración de la línea B73 observada por varios autores (Tomes y Smith, 1985; Hodges *et al.*, 1986; Armstrong *et al.*, 1992).

Aunque las frecuencias de inducción de callos con capacidad de regenerar plantas difirió entre genotipos de la especie utilizada como hembra (Tabla 3), el número de plantas regeneradas hasta los 6 meses después de la siembra fue muy similar para 3 de ellos (12 plantas del híbrido ZcxT y 13 de los híbridos CKxT y KlsxT), debido a que varió el número de plantas regeneradas por explanto competente. A los 24 MDS, solamente los callos de uno de los genotipos conservaron su capacidad de regeneración, lo que incrementó notablemente el número de plantas regeneradas (aproximadamente 100 a partir de los callos originados de 2 de los embriones sembrados). Por lo tanto, la capacidad de regeneración de los diferentes genotipos estuvo determinada no sólo por la frecuencia de inducción de organogénesis/embriogénesis somática, sino también por

el número de plantas regeneradas por explanto competente (Tabla 7) y el tiempo que los callos permanecieron con capacidad de regeneración. Trabajos previos mostraron resultados similares para la regeneración de plantas híbridas de maíz tetraploide y *Z. mays* ssp *parviglumis* - *T. dactyloides* (García y Molina, 1998; García y Molina, 2001).

Los embriones inmaduros de maíz, aislados del cariopse a partir de los 9 días después de la polinización (0,1 mm de longitud sin contar el suspenso) y cultivados en medios nutritivos sin reguladores del crecimiento (Van Lammeren, 1988) ó con la adición de 0,05, 0,1 ó 0,2 mgL<sup>-1</sup> de Picloram (García *et al.* 1991a), germinaron y originaron plantas adultas. Sin embargo, en el presente estudio, los embriones híbridos de maíz (2n=20 ó 40) y *T. dactyloides*, aislados del cariopse entre los 13, 14, 15, 16 y 19 DDP y cultivados en un medio nutritivo sin reguladores de crecimiento, mostraron bajos porcentajes de germinación y anomalías relacionadas principalmente con la emergencia de la radícula y la formación posterior de raíces adventicias a partir del brote (Tabla 6). Resultados similares se obtuvieron a partir de embriones híbridos de maíz 2n=40 x *T. dactyloides* (García y Molina, 1997) y de maíz 2n=40 x maíz 2n=20 (García y Molina, 1995). En el último híbrido, la adición de Picloram en el medio de siembra o de AIA al medio de enraizamiento no fue efectiva para inducir la formación de raíces. Estos resultados sugieren que la incompatibilidad post-cigótica observada en estos cruzamientos no está relacionada solamente con los fallos de desarrollo del endosperma, sino con irregularidades intrínsecas del embrión, las cuales impiden tanto la germinación normal (aún con un aporte exógeno de nutrientes) como el establecimiento posterior de la plántula.

## 5. CONCLUSIONES

- i. Tras el cruce entre distintos genotipos de maíz y *T. dactyloides*, los embriones híbridos de 0,35 a 1,25 mm de longitud, obtenidos entre los 13 y 15 DDP, originaron callos con capacidad de regenerar plantas en medio con  $4,6 \mu\text{mol L}^{-1}$  de 2,4-D.
- ii. Uno de los híbridos originó callos que conservaron la capacidad de regenerar plantas durante más de 2 años.
- iii. Los embriones sembrados en un medio de cultivo sin reguladores de crecimiento mostraron muy poco desarrollo radicular y las plantas no sobrevivieron el período de rustificación *ex vitro*.



## **CAPÍTULO II. Respuestas a la salinidad y la alcalinidad de maíz, *T. dactyloides* y generaciones avanzadas del híbrido de maíz x *T. dactyloides***

### **1. INTRODUCCIÓN**

El área total de suelos afectada por la salinidad abarca más de 800 millones de ha, incluyendo tanto los suelos salinos como sódicos (FAO, 2000). En Argentina, solamente en la provincia de Buenos Aires, una superficie de 7,08 millones de ha (el 24 % de la superficie de la provincia) está ocupada por suelos hidrohalomórficos (Vázquez *et al.*, 2001). Estos suelos (Natracuoles que forman asociaciones con Natracualfes y Natralboles) presentan típicamente un horizonte arcilloso, baja permeabilidad y alto contenido de sales sódicas (Vázquez y Rojas, 2006). Las características mencionadas, sumadas a una baja pendiente (0,01 % de pendiente promedio) y la distribución de las lluvias en la región, determinan que sea frecuente la alternancia de anegamiento y sequía. A pesar de los esfuerzos realizados, el mejoramiento de los cultivos para incrementar la tolerancia a la salinidad y sodicidad no ha mostrado un grado de avance acorde a las necesidades que existen actualmente. Esto puede explicarse tanto por la dificultad en identificar el factor común o predominante cuando el crecimiento de la planta está limitado por una combinación de factores edáficos (Rengasamy, 2006) como por la complejidad que presenta la tolerancia a la salinidad en las plantas (para revisiones ver Leidi y Pardo, 2002; Munns, 2002; Tester y Davenport, 2003; Flowers, 2004; Cuartero *et al.*, 2006; Arzani, 2008; Munns y Tester, 2008). En el caso de la alcalinidad, el problema se acrecienta por las dificultades prácticas que representa mantener valores altos de pH en el medio en contacto con las raíces (Singh *et al.*, 2002).

El maíz (*Zea mays* ssp. *mays*) es una especie moderadamente sensible a la salinidad (Maas y Hoffman, 1977). *T. dactyloides*, una especie

emparentada con el maíz, es una forrajera perenne de ciclo estival, altamente productiva y palatable (Burns *et al.*, 1993; Aiken, 1997; Burns *et al.*, 1996; Eun *et al.*, 2004). Las empresas que comercializan *T. dactyloides* como forrajera no la recomiendan para suelos salinos, pero la respuesta a la salinidad por NaCl y alcalinidad aún no ha sido cuantificada. Esta especie presenta características agronómicas deseables, tales como resistencia a las enfermedades e insectos que comúnmente afectan al maíz (de Wet, 1978), tolerancia a exceso de Aluminio en el suelo (Foy, 1997; Foy *et al.*, 1999), aerénquima constitutivo (Ray *et al.*, 1998), buena penetración de raíces en suelos arcillosos (Clark *et al.*, 1998) y reproducción por apomixis pseudogámica facultativa en los citotipos poliploides (Leblanc *et al.*, 1995b). Aunque *Zea* y *Tripsacum* están aislados reproductivamente por barreras gametofíticas y esporofíticas, pueden obtenerse los híbridos mediante el acortamiento de los estigmas del maíz (Mangelsdorf y Reeves, 1931) y posterior rescate de embriones (James, 1979; Bernard y Jewell, 1985) o inducción de embriogénesis somática (Furini y Jewell, 1995; García y Molina, 1997; García *et al.*, 2000). Estudios previos informaron que híbridos entre maíz y *T. dactyloides* mostraron tolerancia a diversos factores de estrés biótico (Gurney *et al.*, 2003; Prischmann *et al.*, 2009; Throne y Eubanks, 2002) y abiótico (Clark *et al.*, 1998; Foy, 1997; Foy *et al.*, 1999; Gilker *et al.*, 2002; Ritchie *et al.*, 2006). En lo que se refiere a salinidad, por ejemplo, callos caulogénicos (cultivados *in vitro*) y plántulas de la F1 del cruzamiento de un maíz tetraploide ( $2n = 40$ ) x *T. dactyloides* ( $2n = 72$ ) mostraron tolerancia a la salinidad. Las plantas regeneradas y rustificadas, regadas durante 21 días con una solución de 250 mM de NaCl, no mostraron diferencias en el peso seco ni en el peso fresco de la parte aérea con respecto a las plantas control, es decir regadas con agua corriente. Por el contrario, las plantas regadas con 250 mM de NaCl incrementaron el peso seco de las raíces, con respecto al tratamiento control (Pesqueira *et al.*, 2006). Los contenidos

de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{K}^+$  de la parte aérea no se modificaron pero el contenido de  $\text{Na}^+$  aumentó 2,6 veces en las plantas regadas con 250 mM de NaCl con respecto a las plantas control.

Por otro lado, dos híbridos interespecíficos estables (39 y 46 cromosomas, Kindiger *et al.*, 1996a) produjeron hasta 42,9 tn ha<sup>-1</sup> de biomasa fresca (16 veces más que el progenitor maíz) en condiciones de moderada salinidad (C.E.= 3,44 dS m<sup>-2</sup>, equivalente a 2400 ppm) (Shavrukov *et al.*, 2006).

Los híbridos F1 de maíz x *Tripsacum* tienen polen estéril, aunque se han obtenido bajas frecuencias de semillas viables, principalmente por apomixis (Leblanc *et al.*, 1995a, Sokolov *et al.*, 2000). Por otro lado, las generaciones avanzadas del híbrido (obtenidas por retrocruzamiento con maíz o por autofecundación) dan plantas con diferentes características fenotípicas (generalmente tripsacoides) y citogenéticas (Leblanc *et al.*, 2009), así como distintos niveles de fertilidad (Harlan y de Wet, 1977, Sokolov *et al.*, 2000; Molina *et al.*, 2006, entre otros).

Los efectos de la salinidad sobre el maíz y otras especies dependen marcadamente del estado fenológico de la planta. Los estadios de plántula y floración han mostrado ser los más sensibles a la salinidad en maíz (Kaddah y Ghowail, 1964; Maas *et al.*, 1983; Pasternak *et al.*, 1985) y otras especies, como por ejemplo arroz (Heenan *et al.*, 1988; Lutts *et al.*, 1995), trigo, cebada y triticale (Rawson *et al.*, 1988). El estrés salino afecta diversos procesos fisiológicos de las plantas y causa disminuciones severas del crecimiento y rendimiento de los cultivos. Los efectos más significativos y ampliamente estudiados de la salinidad sobre las plantas han sido el estrés osmótico, el desequilibrio iónico, particularmente con  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , y la toxicidad directa de los iones sobre los procesos metabólicos (Zhu, 2001; Tester y Davenport, 2003; Munns y Tester, 2008).

A corto plazo (horas), el estrés salino produce una reducción en el crecimiento del vástago y, en menor medida, de la raíz. Este efecto no

parece dependiente de la concentración de  $\text{Na}^+$  en el tejido, sino más bien una respuesta a la osmolaridad de la solución externa (Munns, 2002). En cambio, los daños específicos del  $\text{Na}^+$  se asocian con la acumulación de  $\text{Na}^+$  en los tejidos foliares y resultan en necrosis de las hojas viejas, que comienza en los ápices y márgenes y se extiende hacia la base. En este caso, la reducción de la productividad neta y del rendimiento está relacionada con el acortamiento del periodo de vida individual de las hojas (Munns 1993, 2002). El periodo de tiempo en el cual se manifiestan los daños específicos por  $\text{Na}^+$  es variable y depende de la efectividad de la compartimentación del  $\text{Na}^+$  en los tejidos foliares y en las células. Los daños específicos por  $\text{Na}^+$  muestran mayor variación entre especies que los efectos osmóticos (Munns, 2002), los cuales pueden identificarse en varios niveles (para revisiones ver Tester y Davenport, 2003; Munns y Tester, 2008).

Varios autores han observado que la exposición de la planta al NaCl u otro agente que ocasione estrés osmótico usualmente afecta menos el crecimiento de la raíz que el de la hoja (Munns, 2002; entre otros). Los mecanismos que reducen el crecimiento de las hojas y el desarrollo de la parte aérea ante un estrés salino aún no se conocen con precisión. Si bien se han observado cambios en las propiedades de la pared celular (Cramer y Bowman, 1991a, 1994), todavía no se conocen con certeza las señales locales o provenientes de otros sitios de la planta que regulan estas propiedades de la pared y las tasas de expansión celular (Zörb *et al.*, 2004; De Costa *et al.*, 2007; Pitann *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2010) así como otros parámetros fisiológicos afectados por la salinidad (Gunes *et al.*, 2007; Tuna *et al.*, 2008). La tolerancia a la salinidad es una característica determinada por numerosos genes (Dong *et al.*, 2009, entre otros). Conocer en detalle los diferentes mecanismos involucrados en la tolerancia a un estrés puede ser de gran utilidad para obtener genotipos tolerantes a dicho factor de estrés mediante un plan de mejoramiento

genético, ya sea por métodos tradicionales (Schubert *et al.*, 2009) o biotecnológicos (Cuartero *et al.*, 2006), así como para implementar estrategias de manejo que incrementen la producción en condiciones de estrés (Hu y Schmidhalter, 2005, entre otros).

Los resultados mencionados arriba sugieren que los híbridos entre diferentes géneros (i.e., *Zea x Tripsacum*) pueden expresar características ausentes en sus especies progenitoras y que la fertilidad puede ser restaurada tras la eliminación de la mayoría de los cromosomas de *Tripsacum*. Por otro lado, el apareamiento observado entre las especies parentales señala la posibilidad de recombinación entre las mismas.

Como se mencionó anteriormente, los resultados publicados muestran que algunos híbridos de maíz x *T. dactyloides* presentan una alta o moderada tolerancia a la salinidad por NaCl (Pesqueira *et al.*, 2003, 2006; Shavrukov *et al.*, 2006). En lo que se refiere a las especies parentales, si bien el maíz muestra variabilidad intraespecífica en la respuesta, numerosos estudios lo caracterizan como una especie moderadamente sensible a la salinidad por NaCl (Maas y Hoffman, 1977, Khan *et al.*, 2010; Geilfus *et al.*, 2010, entre otros). Sin embargo, no se han encontrado datos en la bibliografía que permitan clasificar a *T. dactyloides* en cuanto a su grado de tolerancia a la salinidad.

Por otro lado, hasta el momento se dispone de poca información con relación a la tolerancia y efectos fisiológicos de la alcalinidad sobre el maíz (Degenhardt y Gimmler, 2000; Clark y Zeto, 1996), referida principalmente a la deficiencia de micronutrientes tales como el Fe (Kosegarten y Koyro, 2001; Çelik y Katkat, 2008) y el Zn (Alloway 2009; Shukla y Mukhi 1980) causada en el maíz por la alcalinidad edáfica. Hasta donde sabemos, no hay datos publicados sobre la respuesta de *T. dactyloides* a la alcalinidad.

Dentro de este marco teórico, los objetivos de este capítulo fueron:

- i) Determinar el nivel de tolerancia a la salinidad y alcalinidad de plantas de *T. dactyloides* en estadio vegetativo temprano y compararlo con plantas de maíz (línea B73, ampliamente difundida como progenitora de híbridos comerciales) en las mismas condiciones.
- ii) Evaluar los efectos de la salinidad y la alcalinidad sobre diferentes parámetros fisiológicos (CRA, MFE, PPE<sub>f</sub>, contenido de pigmentos foliares, contenido de K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> y Na<sup>+</sup> y desarrollo) de plantas de maíz y *T. dactyloides*.
- iii) Obtener generaciones avanzadas (mediante retrocruzamientos, con una u otra de las especies parentales, o autofecundaciones) de un híbrido F1 (2n = 56) de maíz (2n = 40) x *T. dactyloides* (2n = 72) y determinar el número cromosómico y la fertilidad de las plantas obtenidas.
- iv) Evaluar el nivel de tolerancia a la salinidad de las generaciones avanzadas del híbrido F1 de maíz x *T. dactyloides* que mostró tolerancia a 250 mM de NaCl en estadio vegetativo.
- v) Evaluar los efectos de la salinidad sobre diferentes parámetros fisiológicos (contenido relativo de agua (CRA), masa foliar específica (MFE), porcentaje de pérdida de electrolitos foliar (PPE<sub>f</sub>), contenido de pigmentos foliares, contenido de cationes (K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> y Na<sup>+</sup>) y desarrollo de plantas de maíz (línea B73) y generaciones avanzadas de un híbrido de maíz x *T. dactyloides*.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Obtención y análisis citogenético de los híbridos**

Plantas de la línea de maíz N107B (2n=40, cedida por el Maize Genetics Coop. Stock Center, Urbana, Illinois) se polinizaron con *T. dactyloides* (2n=72). Los embriones inmaduros originaron callos embriogénicos y organogénicos en el medio básico (García *et al.*, 1992)

con el agregado de  $4 \mu\text{molL}^{-1}$  de 2,4-D (García y Molina, 1997). Los brotes regenerados enraizaron en el medio básico libre de reguladores de crecimiento. A partir de un embrión se originaron 130 plantas F1 (García *et al.*, 2000). La progenie (P1) de las plantas F1 se obtuvo a partir del retrocruzamiento de estas plantas con maíz o *T. dactyloides*. A partir de la polinización libre entre las plantas P1 o por autofecundación de las mismas se obtuvo la segunda progenie (P2). Las progenes tercera (P3) y cuarta (P4) se obtuvieron a partir de la polinización libre (entre las mismas plantas) o la autofecundación de la P2 y la P3, respectivamente. Los cariopses obtenidos por autofecundación de las plantas P4 dieron origen a las plantas evaluadas en este trabajo (MT41 y MT51).

Las panojas inmaduras de las plantas P2 se fijaron en solución Farmer (3:1 etanol absoluto-ácido acético) y se colorearon con solución acética de hematoxilina al 2 %. Las configuraciones de apareamiento se observaron durante diacinesis-metafase I. La fertilidad del polen se determinó usando la solución Lugol. El polen se consideró fértil cuando mostraba al menos el 75 % del grano coloreado.

## 2.2. Obtención de las plántulas

**Maíz e híbridos.** Los cariopses del maíz (línea B73, control) y los híbridos MT41 y MT51 se sumergieron en una solución que contenía 2 mM de KCl y 1 mM de CaCl y se mantuvieron sobre un agitador orbital durante 6 horas. Luego se sembraron en macetas de plástico de 750 ml de volumen, en una mezcla de perlita-vermiculita (3:1) previamente humedecida con solución básica (Tablas 10 y 11) al 10 %. Las macetas se cubrieron con polietileno negro y se mantuvieron en oscuridad a  $24 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 4 días. El día 5 después de la siembra (DDS) comenzó el riego por capilaridad con la solución nutritiva básica (Tablas 10 y 11) al 10 % hasta los 7 DDS. Desde los 5 DDS hasta la cosecha (22 DDS) las plantas

se mantuvieron bajo un fotoperiodo de 16 h con una densidad de flujo fotónico fotosintético (DFFF) de  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y una humedad relativa entre el 70 % y 80 %. El día 7 las plantas se pasaron a la solución de crecimiento (Tabla 12) y comenzaron los tratamientos, con al menos dos hojas emergidas en todas las plantas (Figura 10). La concentración final de NaCl se alcanzó en dos etapas (51 mM y 101 mM, los días 7 y 8, respectivamente).



Figura 10. Plantas de maíz (línea B73) y de la progenie de un híbrido de maíz x *T. dactyloides* (MT41 y MT51) el día 7 después de la siembra.

***Tripsacum***. A las unidades de dispersión de *T. dactyloides* (cariopse + cúpula) se les removió la cúpula (Figura 11). Los cariopses se sembraron en bandejas que contenían una mezcla de perlita y vermiculita (3:1) humedecida con la solución básica (Tablas 10 y 11) al 10 % y se mantuvieron en oscuridad a  $24 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 8 días. A los 8 DDS las plántulas se transplantaron a macetas que contenían el mismo sustrato y se regaron por capilaridad con la misma solución nutritiva (solución básica



al 10 %). Desde los 8 DDS hasta la finalización del experimento (38 DDS) las plantas se mantuvieron bajo un fotoperiodo de 16 h, con una DFFF de  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y una humedad relativa entre el 70 % y 80 %. El día 14 después de la siembra, las plantas se pasaron a la solución de crecimiento (Tabla 12) y comenzaron los tratamientos, cuando la tercera hoja todavía no era visible. La concentración final de NaCl se alcanzó en 2 etapas (51 mM y 101 mM, a los días 14 y 15 después de la siembra, respectivamente).

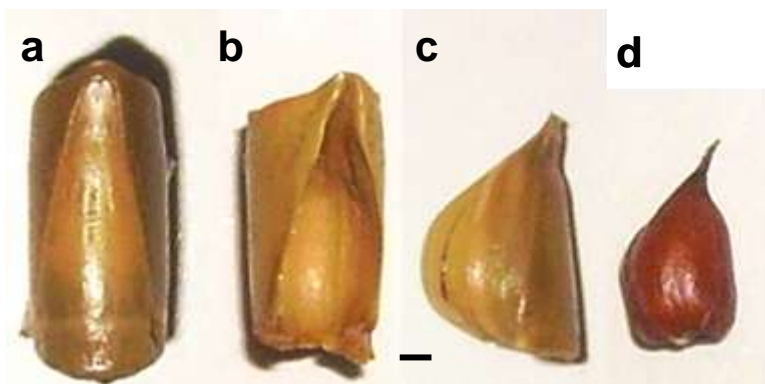


Figura 11. Extracción de la cúpula y las glumas de las unidades de dispersión de *T. dactyloides*: **a.** Unidad de dispersión completa; **b.** Cúpula **c.** Cariopse cubierto por las glumas; **d.** Cariopse sin las glumas. Barra = 1 mm.

### 2.3. Pretratamiento del sustrato

Antes de la siembra el sustrato se lavó con agua corriente durante 30 minutos, se trató con 15 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  durante 2 h, se enjuagó 2 veces con agua destilada y se sumergió durante otras 2 h en la solución nutritiva básica (Tabla 10) al 10 %.

### 2.4. Tratamientos y condiciones de cultivo

**Experimento 1: Efectos de la salinidad y alcalinidad sobre maíz y *T. dactyloides*.** La solución de crecimiento control (Tabla 12) estaba compuesta por la solución nutritiva básica (N6 modificada, tablas 10 y 11) pero con la concentración de los macronutrientes reducida al 25 % y de los micronutrientes al 50 % (excepto el Fe que se mantuvo al 100 %) y 5 mM de Tris(hidroximetil)aminometano (Tris). La concentración de Na<sup>+</sup> se llevó a 1,2 mM con Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y el pH se ajustó a 5,8. La concentración final de Tris (5 mM) se alcanzó al cuarto día del inicio de los tratamientos (hasta ese momento la solución nutritiva contenía 3 mM de Tris). Las plantas se pulverizaron diariamente con FeSO<sub>4</sub> (0,2 %) y ZnSO<sub>4</sub> (0,1 %), para evitar deficiencias de estos nutrientes. La Tabla 9 muestra los tratamientos y sus respectivos valores de pH y conductividad, medidos en las soluciones frescas.

Además, para evaluar el efecto del Tris sobre las plantas, un grupo de plantas de cada genotipo se mantuvo en la solución nutritiva de crecimiento sin Tris (Tablas 9 y 12).

Tabla 9. Contenido de NaCl y valores (mediana ± mínimo y máximo) de pH y conductividad, medidos en las soluciones nutritivas frescas.

Tratamiento	NaCl (mM)	pH	Conductividad (mS cm <sup>-1</sup> )
Control sin Tris	1,2	5,8 ± 0,05	0,83 ± 0,10
Control	1,2	5,8 ± 0,05	1,15 ± 0,10
Alcalinidad	1,2	8,5 ± 0,20	0,80 ± 0,05
Salinidad	101,2	5,8 ± 0,05	10,30 ± 0,30
Alcalinidad+Sal	101,2	8,6 ± 0,20	10,10 ± 0,90

El recambio de la solución se realizó cada 3 ó 4 días. El pH de las soluciones se ajustó con ácido nítrico o KOH en el momento de la preparación de las mismas.

Durante el periodo en que se aplicaron los tratamientos, las plantas se mantuvieron bajo un fotoperiodo de 16 h con una DFFF de  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y una humedad relativa entre el 70 % y 80 %. Los promedios ( $\pm$  EEM) de temperaturas máximas y mínimas registradas durante este periodo fueron de  $26,7 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,3$  y  $21,8 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,2$ .

Tabla 10. Concentración de sales de la solución nutritiva básica (adaptada de la solución nutritiva N6, Chu *et al.*, 1978).

<b>Macronutrientes</b>	<b>mg L<sup>-1</sup></b>	<b>mM</b>
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	185	0,751
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	400	3,476
KNO <sub>3</sub>	707,5	6,997
(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Ca 4H <sub>2</sub> O	1000	4,234
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	463	3,505
<b>Micronutrientes</b>		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,6	0,02
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	3,3	0,02
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1,5	0,02
KI	0,8	0,02
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	27,8	0,1
Na <sub>2</sub> EDTA	37,3	0,1
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,1	$4,1 \times 10^{-4}$
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0,1	$4,0 \times 10^{-4}$
Cl <sub>2</sub> Ca 2H <sub>2</sub> O	20	0,136
<b>Sodio</b>		
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	70,98	0,5

**Experimento 2: Efectos de la salinidad sobre el maíz y generaciones avanzadas de un híbrido de maíz x *T. dactyloides*.** La solución de crecimiento fue la misma que para el ensayo 1 (Tabla 12), sin

el agregado de Tris. Para los tratamientos salinos se agregó 100 mM de NaCl a la solución de crecimiento y el pH se ajustó a 5,8. Las conductividades medidas de las soluciones, con una variación máxima de  $\pm 0,1$  (en dS/m), fueron: 0,83 (control) y 10 (NaCl 101 mM). Las soluciones se renovaron cada 2 días.

Tabla 11. Concentración de macro y micronutrientes de la solución nutritiva básica utilizada (adaptada de la solución nutritiva N6, Chu *et al.*, 1978).

\*PM: Peso molecular

<b>Macronutrientes</b>	<b>mg L<sup>-1</sup></b>	<b>mM</b>	<b>PM* (g)</b>
N (nitrato de potasio)	100,22	7,15	14,01
N (nitrato de Ca)	118,63	8,47	14,01
N (amonio)	98,22	7,01	14,01
P	91,15	2,94	30,97
S	48,1	1,50	32,066
K	297,36	7,61	39,09
Mg	18,25	0,75	24,30
Ca (del CaCl)	5,44	0,14	40,08
Ca (del Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> )	169,68	4,23	40,08
<b>Micronutrientes</b>			
Cl (del ClCa)	9,66	0,24	40,08
Cl (del Cl <sub>2</sub> Co <sub>6</sub> H <sub>2</sub> O)	0,0075	0,0002	40,08
Fe	5,6	0,10	55,85
B	0,28	0,03	10,81
Mn	1,07	0,02	54,94
Zn	0,34	0,01	65,39
I	0,612	0,00	126,90
Cu	0,025	0,00	63,55
Mo	0,02	0,00	95,94
Na (del NaEDTA)	4,6	0,20	22,99
Na (del Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	22,99	1,00	22,99

Durante el periodo en que se aplicaron los tratamientos, las plantas se mantuvieron bajo un fotoperiodo de 16 h con una DFFF de  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y una humedad relativa entre el 70 % y 80 %. Los promedios ( $\pm$  EEM) de temperaturas máximas y mínimas registradas durante este periodo fueron de  $26,7 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,3$  y  $21,8 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,2$ , respectivamente.

Tabla 12. Composición de la solución nutritiva (control) utilizada para el crecimiento de las plantas a partir de los 7 DDS (maíz e híbridos MT41 y MT51) ó 14 DDS (*T. dactyloides*).

<b>Macronutrientes</b>	<b>mg L<sup>-2</sup></b>	<b>mM</b>
N (como nitrato)	54,7125	3,9052
N (como amonio)	24,5550	1,7527
P	22,7875	0,7358
S	12,0250	0,3750
K	74,3400	1,9018
Mg	4,5625	0,1878
Ca	43,7800	1,0923
<b>Micronutrientes</b>		
Cl	4,8337	0,1206
B	0,1400	0,0130
Mn	0,5350	0,0097
Zn	0,1700	0,0026
I	0,3060	0,0024
Cu	0,0125	0,0002
Mo	0,0100	0,0001
Fe	5,6000	0,1003
<b>Sodio</b>		
Na (del Na <sub>2</sub> EDTA)	4,6000	0,2001
Na (del NaHPO <sub>2</sub> )	22,9900	1,0000
<b>pH = 5,8</b>		

## 2.5. Mediciones

**Filocrono.** Las temperaturas máximas y mínimas del aire de la cámara de cultivo se midieron al nivel de las macetas durante todo el experimento. Los grados día (GD, °C día) se calcularon con la fórmula que se indica a continuación (Gilmore and Rogers, 1958, Arnold, 1960):

$$GD = (T_{\text{media}} - T_b) \text{ 1 día (}^\circ\text{C día)}$$

Donde  $T_{\text{media}}$  es la temperatura media del aire, calculada como el promedio de la temperatura diaria mínima y la temperatura diaria máxima y  $T_b$  es la temperatura base. Varios autores consideran que los cultivos de verano tienen una temperatura base de aproximadamente 10 °C (Warrington and Kanemasu, 1983, Major *et al.*, 1990; Sinclair, 1986, entre otros), por lo cual se consideró una temperatura base de 10 °C para las especies evaluadas.

El tiempo térmico acumulado a partir de la siembra se calculó como:

$$TT = \sum GD \text{ (}^\circ\text{C día)}.$$

Mediante una regresión lineal se relacionó el número de días desde la siembra contra TT. Para determinar si los tratamientos afectaron el filocrono de los distintos genotipos, el intervalo de TT entre la aparición de la tercera y la quinta hoja (para maíz y los híbridos), o entre la segunda y la quinta hoja (para *T. dactyloides*), se calcularon a partir de la ecuación de regresión. Este valor se dividió por el número de hojas emergidas en el periodo considerado (dos en maíz y los híbridos y tres en *T. dactyloides*) y así se obtuvo el filocrono promedio para cada combinación genotipo-tratamiento (Van Esbroeck *et al.*, 1997). Se consideró como hoja emergida aquella visible cuando la planta se observaba lateralmente al nivel de la misma.

Para determinar la relación entre el número de hojas visibles y los GD desde la siembra se realizaron regresiones lineales del número de hojas contra los GD para cada genotipo (maíz, híbridos MT41 y MT51 y *T. dactyloides*) y cada tratamiento.

**Biomasa total.** Para determinar la biomasa aérea y de la raíz, las plantas se cosecharon a los 22 (maíz e híbridos) ó 38 (*T. dactyloides*) días después de la siembra, se separó la raíz de la parte aérea y se llevó a estufa a 70°C hasta peso constante. En el momento de la cosecha todas las plantas tenían entre 6 y 7 hojas emergidas.

**Contenido relativo de agua (CRA) y masa foliar específica (MFE).** El día de la cosecha se cortaron 3 círculos de la quinta hoja (o 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 25°C y baja intensidad de luz durante 6 horas, transcurridas las cuales se pesaron nuevamente para determinar el peso turgente (Pt). Después se llevaron a estufa a 70°C hasta peso constante para determinar el peso seco (Ps). El contenido relativo de agua (CRA) se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{CRA} = (\text{Pf} - \text{Ps} / \text{Pt} - \text{Ps}) \times 100$$

Para calcular la masa foliar específica (MFE) se cortaron 3 círculos (de superficie conocida) de la quinta hoja (o de la última hoja totalmente expandida) y se llevaron a estufa a 70°C hasta peso constante para determinar el peso seco (Ps). La masa foliar específica (MFE) se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{MFE} = \text{Masa foliar} / \text{superficie foliar}$$

**Estabilidad de las membranas celulares.** La estabilidad de las membranas celulares se estimó calculando el porcentaje de pérdida de electrolitos (PPE) a partir de tejidos foliares, según una adaptación del método de Wang y Huang (2004). El día de la cosecha, se cortaron 3 círculos de la quinta hoja (o última hoja totalmente expandida) de cada planta, se enjuagaron tres veces con agua destilada y se sumergieron en tubos con 10 ml de agua destilada. Tras mantener las muestras en un agitador orbital, a 25° C y baja intensidad de luz durante 6 h, se determinó la conductividad inicial ( $C_i$ ) de la solución. Luego, los tubos que contenían los tejidos foliares 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:

$$\text{Porcentaje de Pérdida de Electrolitos (\%)} = (C_i / C_m) \times 100$$

**Contenido de pigmentos.** El método utilizado para la extracción y determinación de los pigmentos foliares fue el descrito por Lichtenthaler (1987). Para ello, 100 mg de hojas frescas (tomadas el día de la cosecha de las plantas) se trituraron en frío con 1 ml de acetona. El extracto obtenido se centrifugó a 10.000 rpm durante 4 minutos a 4°C. Se midió la absorbancia del sobrenadante a 470, 647 y 663 nm. Para la conversión de los datos de absorbancia a  $\mu\text{g}$  de pigmento por ml de extracto, se aplicaron las ecuaciones:

$$\text{Clorofila a} = 11,24 \times \text{abs}_{(663)} - 2,04 \times \text{abs}_{(647)}$$

$$\text{Clorofila b} = 20,13 \times \text{abs}_{(647)} - 4,19 \times \text{abs}_{(663)}$$



$$\text{Carotenoides} = \frac{1000 \times \text{abs}_{(470)} - 1,9 \times \text{Cl a} - 63,14 \times \text{Cl b}}{214}$$

**Cationes ( $\text{Na}^+$  -  $\text{K}^+$  -  $\text{Ca}^{2+}$ ).** A 25 mg de tejido seco y finamente molido, se le agregaron 2,5 ml de HCl 0,1N. Los tubos se agitaron y se sumergieron en un baño térmico a 60°C durante 2 horas. Luego se enfriaron a temperatura ambiente y se centrifugaron 5 minutos a 10.000 rpm. El sobrenadante se recuperó y se realizaron las diluciones correspondientes con agua bidestilada para las mediciones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , y con una solución de óxido de lantano ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ) para evitar interferencias en las mediciones de  $\text{Ca}^{2+}$ . Las concentraciones de sodio y potasio se determinaron en un Fotómetro de llama (Marca Metrolab, modelo 315) y las de calcio en un fotómetro de absorción atómica (marca Metrolab, modelo AA250). Los valores obtenidos se interpolaron en una curva de calibración para los tres elementos a determinar.

**Parámetros de exclusión de  $\text{Na}^+$ .** Estos parámetros se calcularon según las fórmulas de Schubert *et al.* (2009). La absorción de  $\text{Na}^+$  a nivel de la superficie de la raíz se calculó como la relación entre el contenido de  $\text{Na}^+$  total de la planta y el peso seco de la raíz. Baja absorción de  $\text{Na}^+$  indica una exclusión de  $\text{Na}^+$  eficiente. La translocación de  $\text{Na}^+$  desde la raíz a la parte aérea se calculó como la relación entre contenido total de  $\text{Na}^+$  de la parte aérea y el contenido total de  $\text{Na}^+$  de la raíz. Este parámetro describe la exclusión del  $\text{Na}^+$  de la parte aérea.

## 2.6. Análisis de los datos

Para los experimentos se utilizó un diseño totalmente el azar. Los tratamientos fueron combinaciones factoriales de 2 (genotipos) x 2 (pHs) x 2 (tratamientos salinos) en el experimento 1 (efectos de la salinidad y la alcalinidad sobre el maíz y el *T. dactyloides*). En el experimento 2 (efectos

de la salinidad sobre maíz e híbridos entre maíz y *T. dactyloides*) las combinaciones fueron 3 (genotipos) x 2 (tratamientos salinos).

Los promedios de los valores obtenidos de 6 repeticiones de cada genotipo por tratamiento se sometieron al análisis de la varianza. La comparación entre las medias se realizó mediante el test de Diferencias Mínimas Significativas a un nivel de probabilidad del 5 % (InfoStat, 2008). Salvo aclaración, los valores de las tablas y figuras están expresados como la media  $\pm$  error estándar de la media (EEM).

Los valores relativos de peso seco de los diferentes tratamientos con respecto al control correspondiente se determinaron de la siguiente manera:

$$\text{Peso seco relativo} = (\text{PS}_{\text{Trat}} / \text{PS}_{\text{control}}) \times 100$$

Donde:

$\text{PS}_{\text{Trat}}$  = Peso seco de las plantas cultivadas en alguno de los tratamientos aplicados (salinidad, alcalinidad o la combinación de ambos factores)

$\text{PS}_{\text{control}}$  = Peso seco promedio de las plantas cultivadas en la solución control

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. Experimento I. Efectos de la salinidad y alcalinidad sobre maíz y *T. dactyloides***

##### **3.1.1. Efectos del tampón Tris**

Las soluciones nutritivas en las cuales el pH se ajustó entre 8,5 y 8,6 (por adición de KOH o de 5 mM de Tris), mostraron una disminución del pH en el transcurso del tiempo (Figura 12).

El valor mínimo de pH se midió el segundo día y a partir de ese momento se estabilizó. La adición de Tris (en lugar de KOH) mantuvo el

pH de las soluciones más estable. La concentración de NaCl (1 ó 101 mM) de la solución nutritiva no afectó la evolución del pH (Figura 12).

Las soluciones que se prepararon con pH 5,8, con o sin el agregado de 5 mM de Tris, mantuvieron un valor de pH similar al inicial hasta los 4 días de la preparación de las mismas (Figura 12).

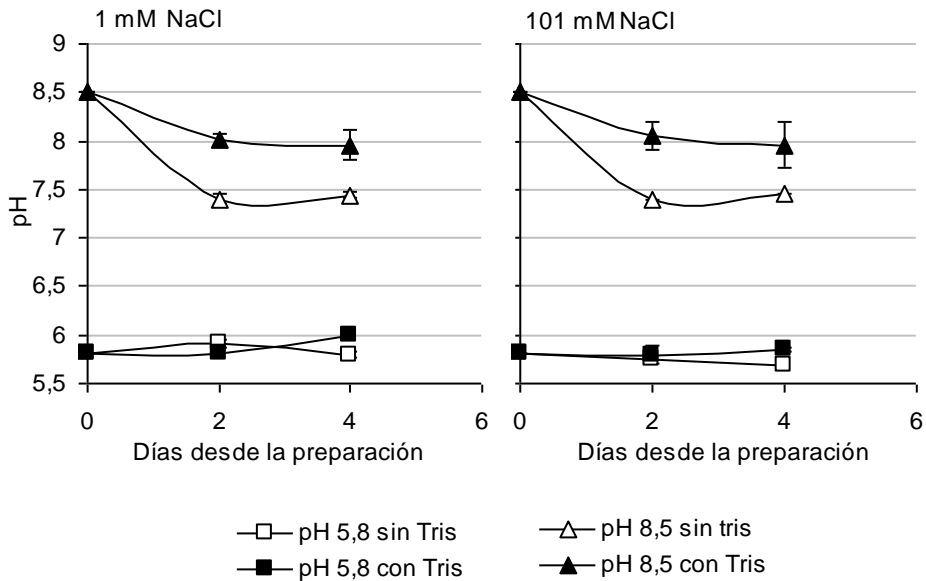


Figura 12. Efecto de la adición de Tris sobre la evolución del pH en el transcurso del tiempo de la solución nutritiva de crecimiento sin plantas (con 1 o 101 mM de NaCl).

El crecimiento de los genotipos de las especies evaluadas no se vio disminuido por la presencia de Tris 5 mM en la solución de cultivo, comparado con la solución sin Tris, manteniendo ambas soluciones con un valor de pH = 5,8. Por el contrario, en el maíz se observó un incremento significativo en los pesos secos del vástago y de la raíz en presencia de Tris. Solamente la pérdida de electrolitos foliares difirió significativamente

en el maíz, mostrando una mayor integridad de las membranas celulares las plantas que crecieron en presencia del tampón (Tabla 13).

Tabla 13. Efecto de la adición de 5 mmol L<sup>-1</sup> de Tris en la solución de crecimiento (manteniendo el pH = 5,8) sobre varios parámetros fisiológicos en maíz y *T. dactyloides* (promedio ± EEM). Letras diferentes en la fila indican diferencia significativa según el test LSD ( $p \leq 0,05$ ).

Especie	Parámetro	Tratamiento	
		Control	Tris 5 mM
Maíz	PS vástago (g)	1,05 ± 0,1a	1,69 ± 0,2b
	PS raíz (g)	0,30 ± 0,0a	0,49 ± 0,1b
	CRA (%)	98,76 ± 0,3a	99,47 ± 0,2a
	PPE <sub>foliar</sub> (%)	11,75 ± 0,4a	9,82 ± 0,4b
	PPE <sub>raíz</sub> (%)	10,05 ± 0,9a	11,97 ± 0,6a
	MFE (mg cm <sup>-2</sup> )	1,70 ± 0,1a	1,92 ± 0,1a
	Filocrono promedio (°Cdía)	45,5 ± 1,5a	45,5 ± 1,5a
<i>Tripsacum</i>	PS vástago (g)	0,69 ± 0,1a	0,66 ± 0,1a
	PS raíz (g)	0,12 ± 0,0a	0,11 ± 0,0a
	CRA (%)	97,17 ± 1,0a	97,83 ± 0,4a
	PPE <sub>foliar</sub> (%)	18,93 ± 1,5a	18,65 ± 0,6a
	PPE <sub>raíz</sub> (%)	11,61 ± 1,5a	11,16 ± 0,5a
	MFE (mg cm <sup>-2</sup> )	2,25 ± 0,2a	2,38 ± 0,3a
	Filocrono promedio (°Cdía)	88,6 ± 1,1a	91,8 ± 2,3a

Las plantas de maíz que crecieron en la solución nutritiva que contenía 5 mmol L<sup>-1</sup> de tampón Tris mostraron contenidos de K<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup>, en la parte aérea y en la raíz, levemente menores que las plantas que crecieron en la solución sin Tris. El resto de los valores de contenido de cationes no se modificó por efecto del Tris (Tabla 14).

Tabla 14. Efecto de la adición de 5 mmol L<sup>-1</sup> de Tris en la solución de crecimiento (pH=5,8) sobre el contenido de cationes de maíz y *T. dactyloides* (promedio ± EEM). Letras diferentes en la fila indican diferencia significativa según el test LSD ( $p \leq 0,05$ ).

Especie	Parte de la planta	Ion	Contenido del ion (mmol g <sup>-1</sup> de PS)	
			Control	Tris 5 mM
Maíz	Parte aérea	K <sup>+</sup>	1,17 ± 0,07b	0,88 ± 0,03a
		Na <sup>+</sup>	s/d	0,03 ± 0,003
		Ca <sup>2+</sup>	0,13 ± 0,01a	0,12 ± 0,01a
	Raíz	K <sup>+</sup>	0,43 ± 0,04a	0,42 ± 0,03a
		Na <sup>+</sup>	0,80 ± 0,04b	0,60 ± 0,05a
		Ca <sup>2+</sup>	s/d	s/d
<i>Tripsacum</i>	Parte aérea	K <sup>+</sup>	0,73 ± 0,01a	0,79 ± 0,03a
		Na <sup>+</sup>	0,04 ± 0,01a	0,03 ± 0,004a
		Ca <sup>2+</sup>	0,06 ± 0,01a	0,04 ± 0,01a
	Raíz	K <sup>+</sup>	0,52 ± 0,05a	0,49 ± 0,05a
		Na <sup>+</sup>	0,16 ± 0,02a	0,11 ± 0,01a
		Ca <sup>2+</sup>	s/d	s/d

### 3.1.2. Efectos de la salinidad y la alcalinidad

#### 3.1.2.1. Evolución del pH en las soluciones nutritivas.

En las soluciones recién preparadas se midió un valor de pH = 8,5 ± 0,02 y 8,5 ± 0,06 (promedio ± EEM), para los tratamientos alcalinidad y alcalinidad + salinidad, respectivamente. El pH de estas soluciones disminuyó hasta estabilizarse en un valor de 8 ± 0,1 (promedio ± EEM) a partir del segundo día de su preparación. En cambio, las soluciones a las cuales se les ajustó el valor del pH a 5,8 en el momento de la preparación,

mostraron un leve incremento, con valores promedio de  $6 \pm 0,03$  al cuarto día de su preparación (Figura 13).

Dos días después de la preparación, las variaciones en los valores de pH difirieron entre las soluciones con  $pH_i$  8,5 y 5,8 ( $p = 0,007$ ). Las que tenían un  $pH_i$  8,5 mostraron una acidificación de  $0,47 \pm 0,06$  unidades de pH mientras que en las que tenían un  $pH_i$  5,8 se observó un ligero aumento ( $0,01 \pm 0,04$  unidades de pH). La presencia o no de NaCl no afectó significativamente las variaciones en los valores del pH (Figura 13).

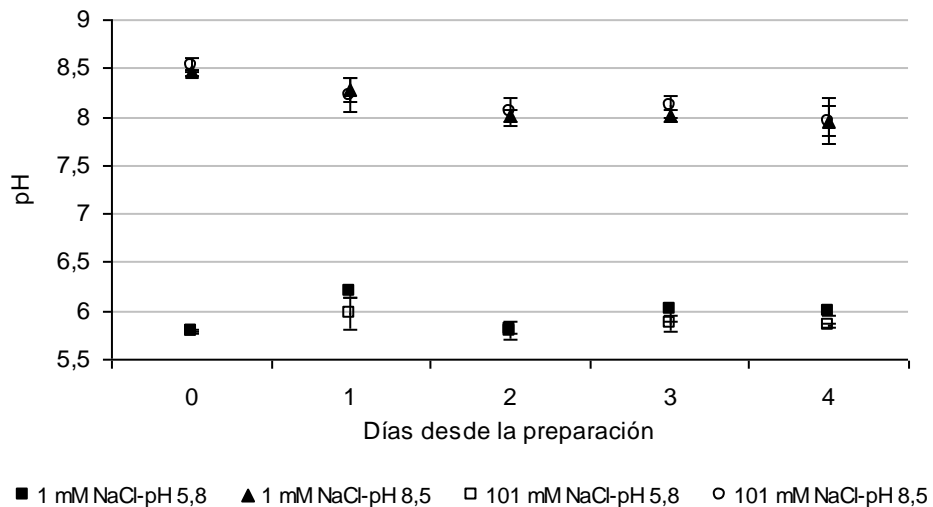


Figura 13. Evolución de los valores de pH en las soluciones nutritivas sin plantas. Todas las soluciones contenían 5 mM de Tris. Barras=  $\pm$  EEM.

En los tratamientos con  $pH=5,8$  y  $pH=8,5$ , la acidificación del medio (promedio  $\pm$  EEM, en unidades de pH) dos días después del recambio de las soluciones fue mayor en presencia de plantas de maíz ( $0,77 \pm 0,36$  y  $0,92 \pm 0,02$ , respectivamente) o de *T. dactyloides* ( $0,68 \pm 0,29$  y  $0,88 \pm 0,09$ , respectivamente) que en las soluciones libres de plantas ( $0,01 \pm 0,01$  y  $0,47 \pm 0,01$ ) (Figuras 13 y 14).

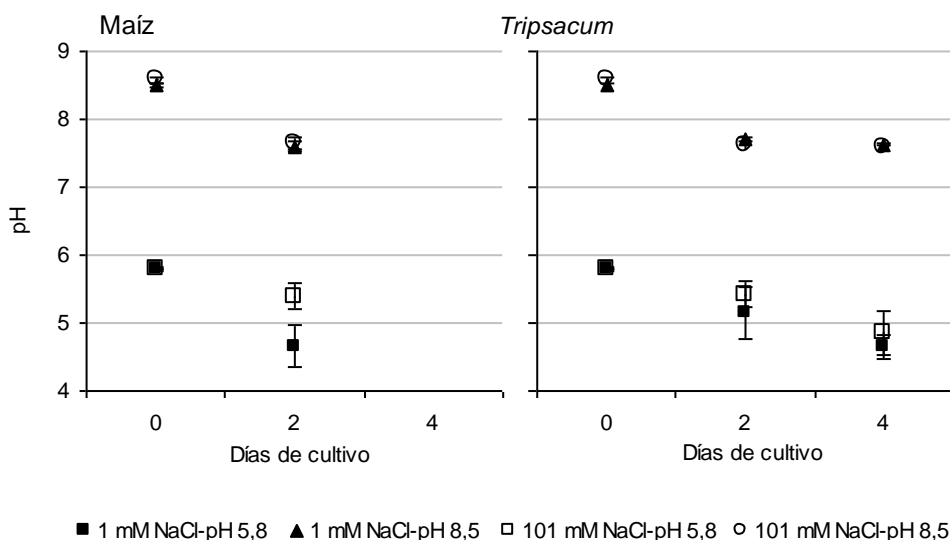


Figura 14. Valores de pH en las soluciones nutritivas con plantas de maíz o *T. dactyloides* entre los 6 y los 13 días desde el inicio de los tratamientos. Barras =  $\pm$  EEM

### 3.1.2.2. Efecto de la salinidad y la alcalinidad sobre las plantas de maíz y *T. dactyloides*.

#### 3.1.2.2.1. Crecimiento.

El peso seco de la parte aérea del maíz superó al de *T. dactyloides* ( $p \leq 0,0001$ ) (Tabla 15). Tanto la salinidad (101 mM de NaCl) como la alcalinidad de la solución nutritiva afectaron negativamente el peso seco de la parte aérea en los genotipos de ambas especies ( $p \leq 0,0001$ ) con respecto al control (Figuras 15 y 16). Las interacciones genotipo x concentración de NaCl ( $p = 0,003$ ) y pH x concentración de NaCl ( $p = 0,024$ ) fueron significativas. En el maíz, la alcalinidad de la solución nutritiva, con o sin el agregado de 100 mM de NaCl, produjo las mayores reducciones del PS del vástago con respecto al control (45 % y 51 %, respectivamente) (Tabla 16). En esta especie, el peso seco del vástago en presencia de 101 mM de NaCl (pH 5,8) fue menor al del control (28 %),

pero significativamente superior al de ambos tratamientos de alcalinidad (pH 8,5, con o sin el agregado de 100 mM de NaCl). Los dos últimos no difirieron significativamente entre sí. En cambio, *T. dactyloides* no mostró diferencias en los pesos secos del vástago entre los tratamientos de alcalinidad, salinidad y la combinación de ambos factores, los cuales produjeron reducciones significativas con respecto al control (53 %, 51 % y 58 %, respectivamente) (Tabla 16).

La raíz de *T. dactyloides* mostró un peso seco menor que la del maíz ( $p < 0,0001$ ). El pH y la concentración de NaCl de la solución no afectaron el peso seco de la raíz (Figura 21). No se detectó interacción significativa entre los tratamientos para este parámetro (Tabla 15).

Tabla 15. Peso seco de la parte aérea y la raíz y relación tallo/raíz de maíz y *T. dactyloides* creciendo en soluciones nutritivas con diferentes concentraciones de NaCl (1 y 101 mM) pH (5,8 y 8,5). Letras diferentes en la fila indican diferencia significativa según el test LSD ( $p \leq 0,05$ ).

Genotipo	NaCl (mM)	pH	Peso seco (g)		V/R
			Vástago	Raíz	
Maíz	1	5,8	1,69 ± 0,17a	0,49 ± 0,06a	3,49 ± 0,15b
	1	8,5	0,93 ± 0,06c	0,45 ± 0,03ab	2,08 ± 0,06e
	101	5,8	1,22 ± 0,08b	0,45 ± 0,03ab	2,78 ± 0,24cd
	101	8,5	0,84 ± 0,10cd	0,38 ± 0,02b	2,18 ± 0,23de
<i>Tripsacum</i>	1	5,8	0,66 ± 0,09d	0,11 ± 0,01c	5,63 ± 0,19a
	1	8,5	0,37 ± 0,07e	0,09 ± 0,02 c	3,91 ± 0,33b
	101	5,8	0,32 ± 0,05e	0,10 ± 0,01c	3,35 ± 0,24bc
	101	8,5	0,28 ± 0,04e	0,08 ± 0,01c	3,68 ± 0,27b



Los tres efectos principales, el genotipo ( $p < 0,0001$ ), el pH y la concentración de NaCl de la solución nutritiva, produjeron diferencias significativas ( $p < 0,0001$ ) en la relación vástago/raíz. Las interacciones genotipo x salinidad y pH x salinidad fueron significativas ( $p = 0,0088$ ).

En *Tripsacum*, la relación vástago/raíz del control (pH = 5,8 y 0 mM de NaCl) superó a la del resto de los tratamientos, al igual que el peso seco del vástago, ya que los pesos secos de la raíz se mantuvieron sin llegar a detectar diferencias significativa entre tratamientos (Tabla 15).

Tabla 16. Pesos secos relativos al control (NaCl 1 mM y pH 5,8) de la parte aérea y la raíz de maíz y *T. dactyloides* creciendo en soluciones nutritivas con diferentes concentraciones de NaCl (1 y 101 mM) pH (5,8 y 8,5). Letras distintas en la fila indican diferencia significativa según el test LSD ( $p \leq 0,05$ ).

Parte de la planta	[NaCl] mM	pH	Peso seco relativo al control (%)	
			Maíz	<i>Tripsacum</i>
Tallo	1	8,5	55,33 ± 3,6 a	56,75 ± 6,84 a
	101	5,8	72,41 ± 4,6 a	48,82 ± 10,6 b
	101	8,5	49,46 ± 5,9 a	42,13 ± 7,5 a
Raíz	1	8,5	92,00 ± 6,8 a	80,79 ± 13,1 a
	101	5,8	91,21 ± 6,7 a	83,41 ± 11,9 a
	101	8,5	78,01 ± 4,7 a	68,12 ± 12,8 a
Biomasa Total	1	8,5	63,59 ± 4,3 a	60,33 ± 10,8 a
	101	5,8	76,64 ± 4,4 a	53,96 ± 8,1 b
	101	8,5	55,89 ± 5,3 a	46,00 ± 7,5 a

En el maíz, si bien el control mostró una relación vástago/raíz superior a los tratamientos, también hubo diferencias entre tratamientos

(Tabla 15). La adición de 100 mM de NaCl, manteniendo el pH = 5,8, indujo la disminución de la relación vástago/raíz con respecto al control, pero el valor fue superior a la del tratamiento de alcalinidad (pH 8,5, sin el agregado de sal). El tratamiento que combinaba salinidad y alcalinidad mostró una relación vástago/raíz intermedia, lo cual puede explicarse porque este tratamiento también indujo la disminución del crecimiento de la raíz con respecto al control (Tabla 15).

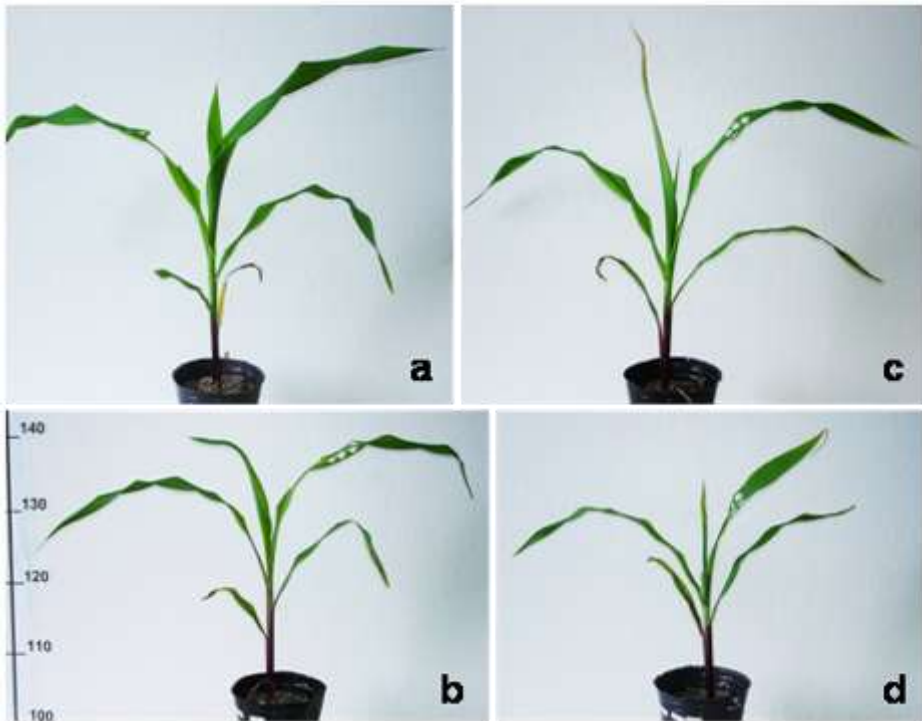
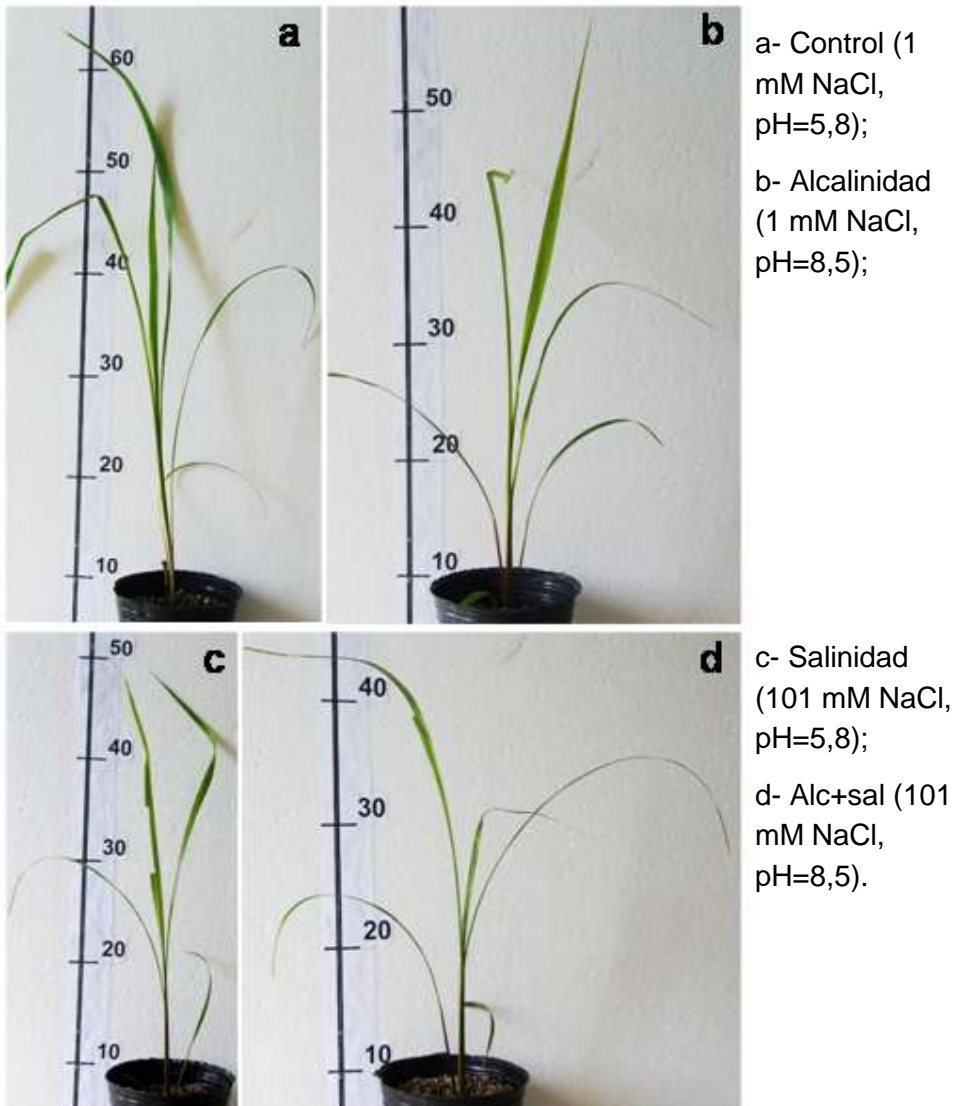


Figura 15. Plantas de maíz (línea B73) cultivadas en hidroponía a los 22 DDS (15 días después del comienzo de los tratamientos): a- control (1 mM NaCl, pH=5,8); b- Alcalinidad (1 mM NaCl, pH=8,5); c- Salinidad (101 mM NaCl, pH=5,8); d- Alc+sal (101 mM NaCl, pH=8,5). Nótese los ápices necróticos de las hojas jóvenes en los tratamientos que contenían NaCl.

Figura 16. Plantas de *T. dactyloides dactyloides* cultivadas en hidroponía a los 38 DDS y 24 días después del comienzo de los tratamientos.



### 3.1.2.2.2. Desarrollo

Sobre la base del tiempo térmico (TT) acumulado (Figura 17) entre la siembra y la aparición de las hojas en el maíz (Tabla 17) y *T. dactyloides*

(Tabla 18) se determinaron los valores del filocrono para cada especie (Figuras 18 y 19, respectivamente).

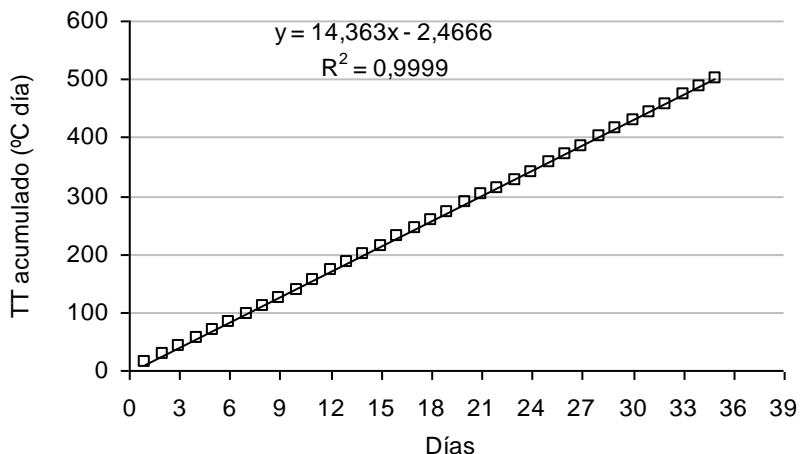


Figura 17. Tiempo térmico acumulado (base 10 °C) desde la siembra hasta la cosecha de las plantas.

Tabla 17. Días desde la siembra a la emergencia de las hojas en plantas de maíz cultivadas en soluciones nutritivas con diferente pH y concentración de NaCl. Letras diferentes en la columna indican diferencia significativa según el test LSD ( $p \leq 0,05$ ).

Solución nutritiva		Tiempo en la emergencia de hojas (dds)			
NaCl (mM)	pH	Hoja 3	Hoja 4	Hoja 5	Hoja 6
1	5,8	7,0 ± 0,0a	10,5 ± 0,2a	13,3 ± 0,2a	16,5 ± 0,3a
1	8,5	6,8 ± 0,2a	10,7 ± 0,2a	14,3 ± 0,3bc	19,3 ± 0,5b
101	5,8	7,0 ± 0,0a	10,5 ± 0,2a	13,5 ± 0,2ab	17,7 ± 0,5a
101	8,5	7,0 ± 0,0a	11,0 ± 0,0a	14,8 ± 0,5c	19,5 ± 0,5b

Los tres efectos principales (i.e. el genotipo, el pH y la concentración de NaCl), produjeron diferencias significativas en el valor del

filocrono promedio ( $p \leq 0,0003$ ). La interacción genotipo x concentración de NaCl fue significativa ( $p = 0,0001$ ). En el tratamiento control (pH=5,8 sin NaCl) el filocrono promedio del maíz ( $^{\circ}\text{C}$  día) fue aproximadamente la mitad del de *T. dactyloides*, es decir que, a la temperatura promedio de cultivo, aproximadamente  $24^{\circ}\text{C}$ , el tiempo (días) entre la aparición de dos hojas sucesivas (promedio  $\pm$  EEM) fue de  $3,2 \pm 0,2$  para el maíz (Tabla 17) y  $6,4 \pm 0,2$  para *T. dactyloides* (Tabla 18).

Tabla 18. Días desde la siembra a la emergencia de las hojas en plantas de *T. dactyloides* cultivadas en soluciones nutritivas con diferente pH y concentración de NaCl. Letras diferentes en la columna indican diferencia significativa según el test LSD ( $p \leq 0,05$ ).

Solución nutritiva		Tiempo en la emergencia de hojas (dds)			
NaCl (mM)	pH	Hoja 2	Hoja 3	Hoja 4	Hoja 5
1	5,8	$11,0 \pm 0,6a$	$17,2 \pm 0,2a$	$24,2 \pm 0,6a$	$30,2 \pm 0,5a$
1	8,5	$11,5 \pm 0,4a$	$18,0 \pm 1,0a$	$25,8 \pm 1,1a$	$32,3 \pm 0,9b$
101	5,8	$11,3 \pm 0,4a$	$18,2 \pm 1,0a$	$26,2 \pm 1,0a$	$33,3 \pm 0,7bc$
101	8,5	$10,8 \pm 0,5a$	$18,5 \pm 0,9a$	$26,0 \pm 0,8a$	$34,8 \pm 0,8c$

Las plantas de maíz cultivadas en la solución alcalina (pH = 8,5), con 1 ó 101 mM de NaCl, mostraron incrementos significativos en el valor del filocrono promedio con respecto al control (18 % y 24 %, respectivamente). El agregado de NaCl, manteniendo un pH=5,8, no modificó el valor del filocrono promedio con respecto al control (Tabla 19). En *T. dactyloides*, la alcalinidad, la salinidad y la combinación de ambos factores indujeron incrementos significativos de los valores del filocrono promedio con respecto al control (9 %, 15 % y 26 %, respectivamente). A

su vez, el tratamiento que combinaba alcalinidad y salinidad difirió de los tratamientos en los que se aplicaban los factores por separado (Tabla 19).

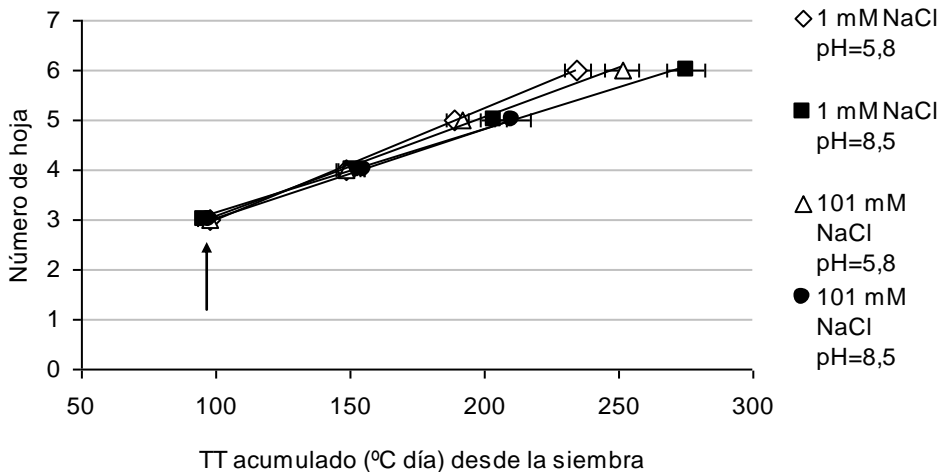


Figura 18. Número de hojas emergidas en función del Tiempo Térmico en plantas de maíz creciendo en soluciones nutritivas con dos niveles de NaCl (mM) y pH: 1NaCl-pH 5,8; 1NaCl-pH=8,5; 101NaCl-pH=5,8-; 101NaCl-pH=8,5. El gráfico muestra las líneas de tendencia. Las ecuaciones de regresión para los tratamientos mencionados son:  $y = 0,0222 x + 0,7841$ ;  $y = 0,0168 x + 1,4507$ ;  $y = 0,0198 x + 1,0868$ ;  $y = 0,0178 x + 1,2499$ , respectivamente.  $R^2 \geq 0,994$  para todos los tratamientos. La flecha indica el comienzo de los tratamientos. Las barras indican  $\pm$  EEM.

Si bien los tres efectos principales indujeron diferencias significativas en el filocrono promedio (Tabla 19), concretamente desde la emergencia de la quinta hoja, tanto en maíz como en *T. dactyloides*, se observaron diferencias en el filocrono inducidas por el pH ( $p = 0,0005$ ) y el nivel de salinidad de la solución nutritiva ( $p = 0,0003$ ). La interacción genotipo x concentración de NaCl fue significativa ( $p = 0,0032$ ).

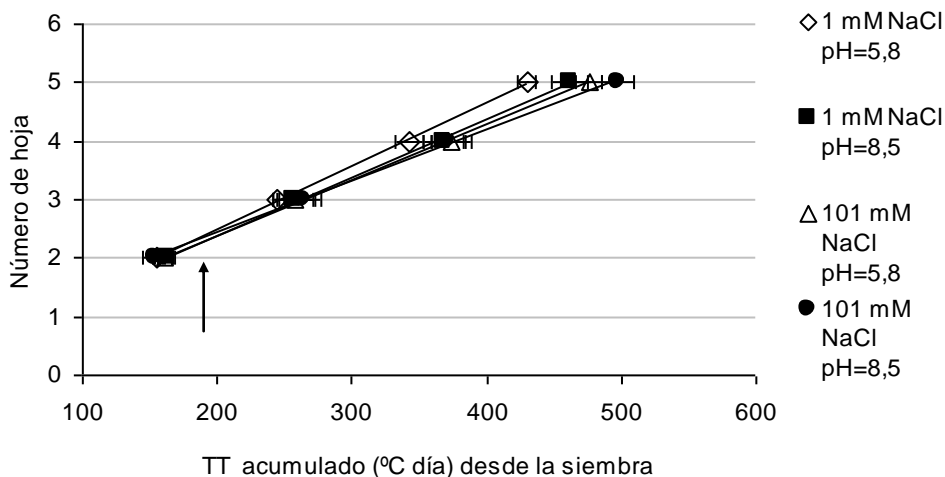


Figura 19. Número de hojas emergidas en función del Tiempo Térmico en plantas de *T. dactyloides* creciendo en soluciones nutritivas con dos niveles de NaCl (mM) y pH: 1NaCl-pH 5,8; 1NaCl-pH=8,5; 101NaCl-pH=5,8-; 101NaCl-pH=8,5. El gráfico muestra las líneas de tendencia. Las ecuaciones de regresión para los tratamientos mencionados son:  $y = 0,0108x + 0,3224$ ;  $y = 0,0099x + 0,4127$ ;  $y = 0,0094x + 0,519$ ;  $y = 0,0088x + 0,6875$ , respectivamente.  $R^2 > 0,998$  para todos los tratamientos. La flecha indica el comienzo de los tratamientos. Las barras indican  $\pm$  EEM.

Tabla 19. Filocrono promedio ( $\pm$  EEM) de plantas de maíz y *T. dactyloides* cultivadas con distintos niveles de alcalinidad y salinidad. Letras diferentes en la columna indican diferencia significativa según el test LSD ( $p \leq 0,05$ ).

Solución nutritiva		Filocrono (°C día)	
NaCl (mM)	pH	Maíz	<i>Tripsacum</i>
1	5,8	45,5 $\pm$ 1,5a	91,8 $\pm$ 2,3a
1	8,5	53,8 $\pm$ 1,6bc	99,7 $\pm$ 3,1b
101	5,8	46,7 $\pm$ 1,6ab	105,3 $\pm$ 1,8b
101	8,5	56,3 $\pm$ 3,4c	115,9 $\pm$ 5,3c

La alcalinidad en el maíz (con 1 mM ó 101 mM de NaCl) y todos los tratamientos (alcalinidad, salinidad y la combinación de ambos) en *T. dactyloides* indujeron un incremento, con respecto al control, del tiempo entre la siembra y la emergencia de la quinta hoja (Tablas 17 y 18, Figuras 18 y 19).

### **3.1.2.2.3. Contenido Relativo de Agua (CRA), Porcentaje de Pérdida de Electrolitos (PPE) y Masa Foliar Específica (MFE)**

Dos de los tres factores principales, el genotipo ( $p = 0,002$ ) y la concentración de NaCl ( $p = 0,0001$ ), indujeron diferencias significativas en el CRA. La interacción pH x concentración de NaCl fue significativa ( $p = 0,0006$ ). El CRA (en %, promedio  $\pm$  EEM) del maíz fue mayor que el de *T. dactyloides* ( $97,5 \pm 0,36$  y  $96,0 \pm 0,36$ , respectivamente). Las plantas que crecían en presencia de NaCl mostraron un CRA menor que el de las plantas que crecían en soluciones libres de NaCl (95,7 % vs. 97,9 %, respectivamente) (Tabla 20). En *T. dactyloides* la alcalinidad también indujo una disminución del CRA con respecto al control, pero el menor CRA se observó en presencia de NaCl con un pH=5,8 (Tabla 20).

El genotipo ( $p < 0,0001$ ) y la concentración de NaCl de la solución produjeron diferencias significativas en el PPE foliares ( $PPE_f$ ,  $p = 0,0233$ ). Las interacciones genotipo x concentración de NaCl ( $p = 0,0096$ ) y pH x concentración de NaCl (0,0202) fueron significativas. En el control (sin NaCl y pH=5,8), el  $PPE_f$  (%) de *T. dactyloides* fue dos veces superior a la del maíz. En el maíz, sólo el tratamiento que combinaba alcalinidad y salinidad indujo un incremento significativo del  $PPE_f$ , cuyo valor superó 1,6 veces al del control. *T. dactyloides* no mostró diferencias en el  $PPE_f$  inducidas por el pH o la concentración de NaCl de la solución (Tabla 20).



Tabla 20. Efectos de la concentración de NaCl (1 y 101 mM de NaCl) y el pH (5,8 y 8,5) de la solución nutritiva sobre el contenido relativo de agua (CRA) foliar y el porcentaje de pérdida de electrolitos de las hojas y las raíces de maíz y *T. dactyloides* (T.d.). Letras diferentes en la columna indican diferencia significativa según el test LSD ( $p \leq 0,05$ ).

Especie	NaCl (mM)	pH	CRA (%)	Pérdida de electrolitos (%)	
				Hoja	Raíz
Maíz	1	5,8	99,5 ± 0,2a	9,8 ± 0,4a	12,0 ± 0,6
	1	8,5	98,2 ± 0,5ab	9,5 ± 0,3a	10,1 ± 0,8
	101	5,8	96,9 ± 0,4c	10,7 ± 0,4a	11,8 ± 1,3
	101	8,5	96,2 ± 0,5c	15,8 ± 2,1b	10,6 ± 0,8
T.d.	1	5,8	97,4 ± 0,4b	18,7 ± 0,6c	11,2 ± 0,5
	1	8,5	96,3 ± 0,6c	17,6 ± 0,5bc	15,8 ± 2,9
	101	5,8	94,2 ± 0,6d	17,7 ± 1,2bc	15,1 ± 1,3
	101	8,5	96,4 ± 0,5c	18,1 ± 0,9bc	12,8 ± 0,8

El PPE de la raíz (PPE<sub>r</sub>) difirió entre los genotipos ( $p = 0,0071$ ) pero no entre los tratamientos de pH y salinidad (Tabla 20). El PPE<sub>r</sub> (promedio ± EEM, en %) de *T. dactyloides* fue superior al del maíz ( $13,7 \pm 0,87$  y  $11,1 \pm 0,45$ , respectivamente). Las interacciones para este parámetro no fueron significativas.

La masa foliar específica (MFE) difirió entre los genotipos ( $p = 0,0006$ ) pero no entre los tratamientos de pH y concentración de NaCl. La MFE (en g m<sup>-2</sup>, promedio ± EEM) de *T. dactyloides* fue superior a la del maíz ( $2,4 \pm 0,09$  vs  $2,0 \pm 0,05$ , respectivamente). No se detectaron interacciones significativas entre los tratamientos para este parámetro (Figura 20).

Las raíces de las plantas de maíz cultivadas en presencia de 101 mM de NaCl mostraron un incremento en el número de ramificaciones

secundarias (datos no mostrados) en comparación con las cultivadas en ausencia de NaCl, independientemente del pH de la solución (Figura 21).

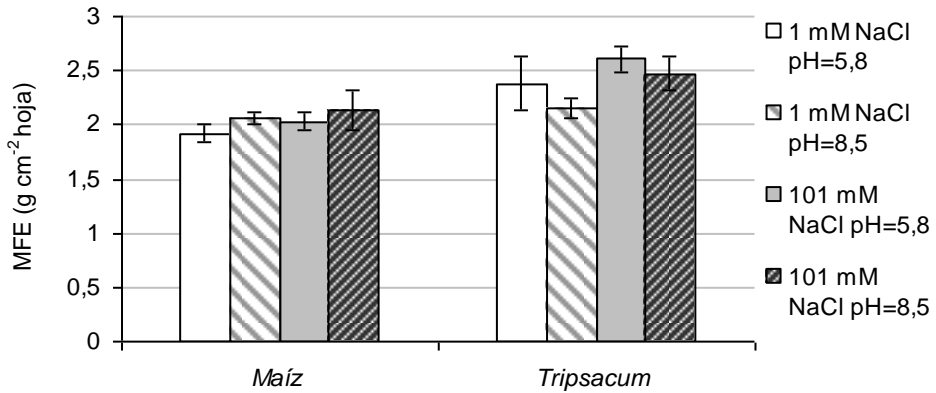


Figura 20. Efectos de la concentración de NaCl (1 y 101 mM de NaCl) y el pH (5,8 y 8,5) sobre la masa foliar específica de maíz y *T. dactyloides*. Las barras indican  $\pm$  EEM.

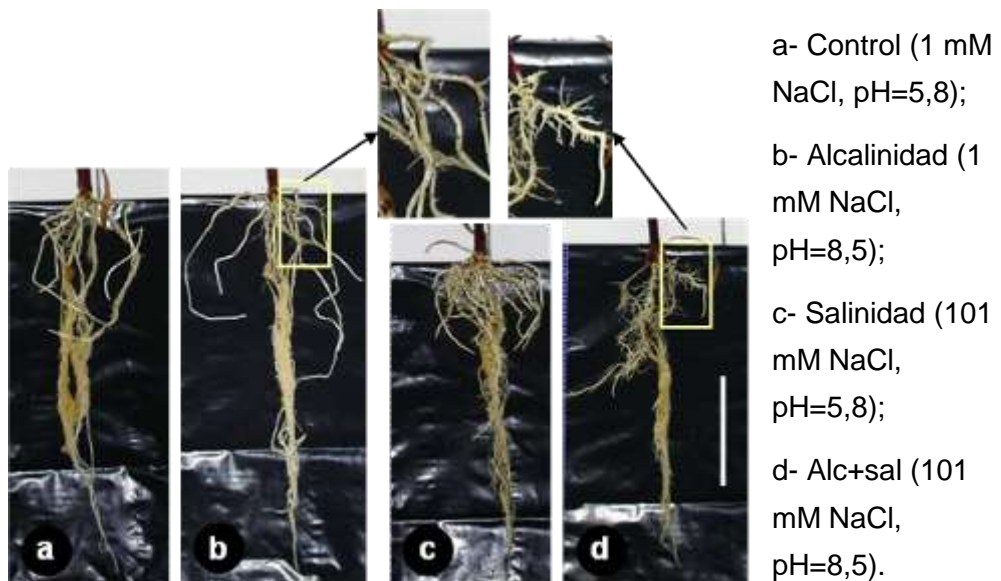


Figura 21. Raíces de plantas de maíz (línea B73) cultivadas en hidroponía a los 22 DDS y 15 días después del comienzo de los tratamientos.

### 3.1.2.2.4. Contenido foliar de pigmentos (clorofila a, b y carotenoides) y relación clorofilas a/b

Los tres factores principales (el genotipo, la salinidad y la alcalinidad) afectaron el contenido de clorofila a ( $p < 0,0001$ ;  $p = 0,014$  y  $0,027$ ; respectivamente). El contenido (promedio  $\pm$  EEM,  $\text{mg g}^{-1}$  de peso fresco foliar) de clorofila a del maíz ( $4,12 \pm 0,21$ ) superó al de *T. dactyloides* ( $2,76 \pm 0,16$ ). La salinidad y la alcalinidad disminuyeron el contenido de clorofila a (de  $3,74 \pm 0,2$  a  $3,05 \pm 0,18$  y de  $3,70 \pm 0,17$  a  $3,09 \pm 0,20$ , respectivamente), con relación al control (Figura 22). El contenido de clorofila b del maíz ( $1,97 \pm 0,11$ ) superó ( $p < 0,0001$ ) al de *T. dactyloides* ( $1,18 \pm 0,09$ ) pero no se modificó por la salinidad ni la alcalinidad. El contenido de clorofila total mostró reducciones del 16 % y 14% a causa de la salinidad y la alcalinidad, respectivamente (Tabla 21).

Tabla 21. Contenido de pigmentos foliares de plantas de maíz y *T. dactyloides* (T.d.) cultivadas en soluciones nutritivas con diferente pH y concentración de NaCl. Letras diferentes en la columna indican diferencia significativa según el test LSD ( $p \leq 0,05$ ).

Especie	NaCl (mM)	pH	Clorofila foliar total ( $\text{mg g}^{-1}$ PF)
Maíz	1	5,8	$7,66 \pm 0,47$
	1	8,5	$6,04 \pm 0,81$
	101	5,8	$5,76 \pm 0,57$
	101	8,5	$4,89 \pm 0,51$
T.d.	1	5,8	$4,39 \pm 0,47$
	1	8,5	$3,52 \pm 0,47$
	101	5,8	$3,52 \pm 0,51$
	101	8,5	$4,00 \pm 0,47$

No se detectaron interacciones significativas entre los tratamientos para los contenidos de Cla, Clb ni clorofila total. Ninguno de los factores afectó el contenido de carotenoides ni la relación Cla/Clb (Figura 22).

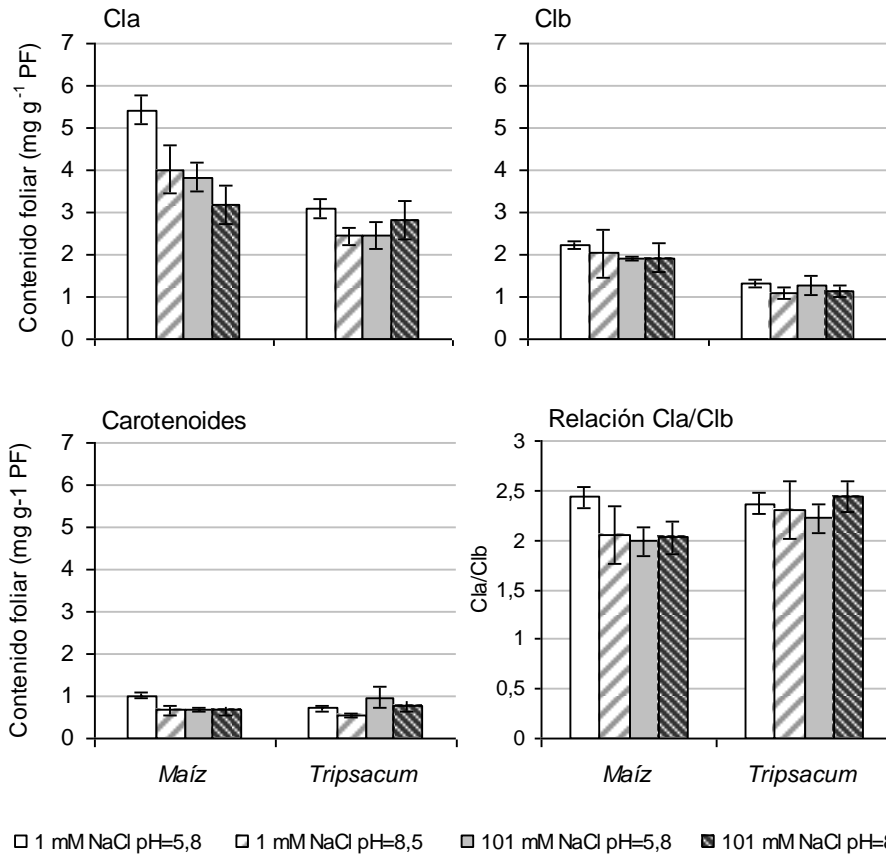


Figura 22. Contenido de pigmentos foliares de plantas de maíz y *T. dactyloides* cultivadas en soluciones nutritivas con diferente pH y concentración de NaCl. Las barras indican  $\pm$  EEM.

### 3.1.2.2.5. Contenido de cationes.

**Contenido de  $K^+$ ,  $Na^+$  y  $Ca^{+2}$  de la parte aérea.** Dos de los tres factores principales, el genotipo ( $p = 0,0001$ ) y la concentración de NaCl ( $p = 0,001$ ) mostraron diferencias significativas en los contenidos (mmol g<sup>-1</sup> PS foliar)

de  $K^+$ ,  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  de la parte aérea. El maíz tenía un contenido de  $K^+$  (media  $\pm$  EEM) superior a *T. dactyloides* ( $0,77 \pm 0,04$  vs.  $0,63 \pm 0,04$ ; respectivamente) y la salinidad indujo una reducción del 37 % en el contenido de  $K^+$  del vástago con respecto a las plantas cultivadas con bajo nivel de NaCl (de  $0,86 \pm 0,02$  a  $0,54 \pm 0,02$ ) (Figura 23).

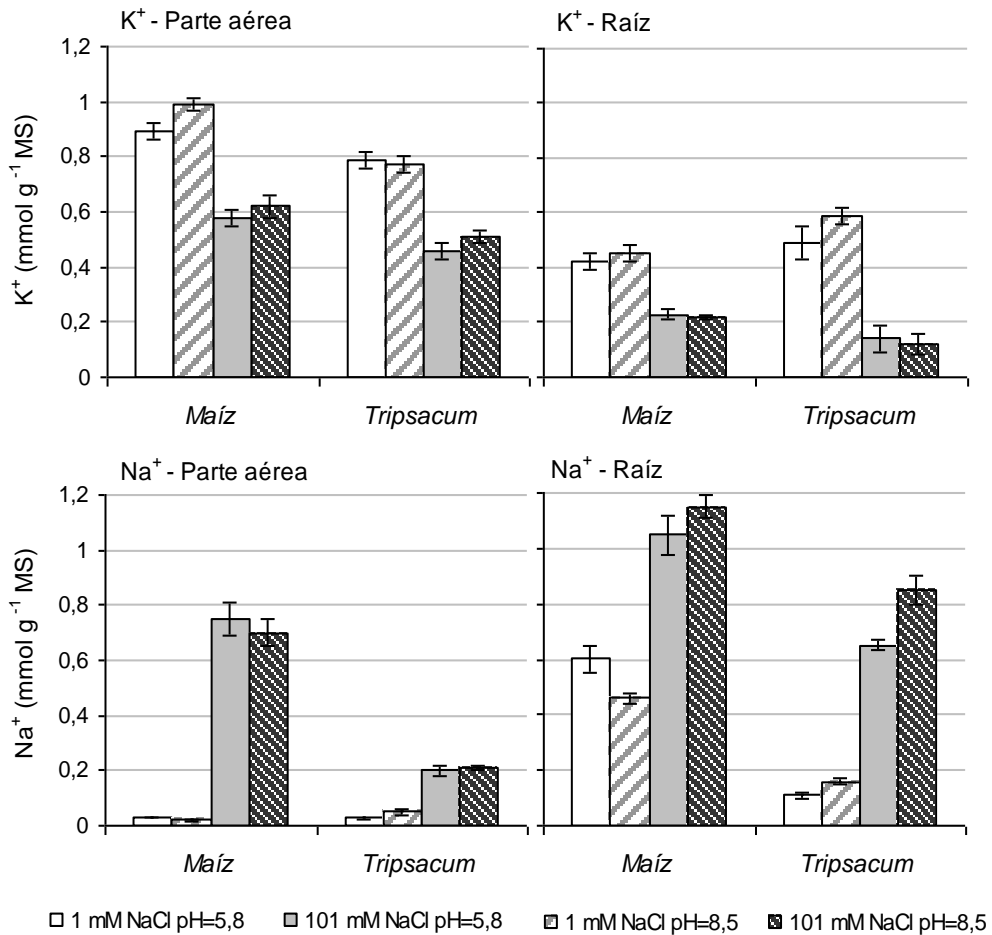


Figura 23. Efectos de la salinidad y la alcalinidad sobre el contenido de  $K^+$  y  $Na^+$  en la parte aérea y en la raíz de maíz (línea B73) y *T. dactyloides*. Las barras indican  $\pm$  EEM.

La interacción genotipo x nivel de NaCl fue significativa para los contenidos de Na<sup>+</sup> y de Ca<sup>2+</sup>. El contenido de Na<sup>+</sup> del maíz fue igual al de *T. dactyloides* en las plantas control ( $0,03 \pm 0,003$  y  $0,04 \pm 0,004$ ; respectivamente). La salinidad incrementó el contenido de Na<sup>+</sup> en ambas especies, pero en condiciones de salinidad el contenido de Na<sup>+</sup> del maíz ( $0,73 \pm 0,04$ ) superó al de *T. dactyloides* ( $0,2 \pm 0,01$ ). En el tratamiento control (1 mM NaCl-pH=5,8) el contenido foliar de Ca<sup>2+</sup> del maíz fue 3 veces mayor al de *T. dactyloides* (Figura 24).

La alcalinidad (1 mM NaCl-pH=5,8) no modificó los contenidos foliares de Ca<sup>2+</sup> en maíz ni en *T. dactyloides*, con respecto al control. La salinidad (pH=5,8 y pH=8,5) redujo un 50 % el contenido foliar de Ca<sup>2+</sup> en el maíz pero no lo modificó en *T. dactyloides* (Figura 24).

Dos de los tres factores principales, el nivel de NaCl ( $p = < 0,0001$ ) y el pH ( $p = 0,003$ ), afectaron la relación K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> del vástago. Las interacciones genotipo x nivel de NaCl ( $p = 0,003$ ) y nivel de NaCl x pH ( $p = 0,005$ ) fueron significativas. La relación K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> de la parte aérea de las plantas no sometidas a tratamiento salino fue mayor en el maíz que en *T. dactyloides* ( $26,54 \pm 1,51$  vs.  $20,80 \pm 1,99$ ; respectivamente). La presencia de 101 mM de NaCl en la solución de cultivo indujo una reducción de la relación K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> de la parte aérea de  $\cong 31$  veces en el maíz y de  $\cong 9$  veces en *T. dactyloides*. Como consecuencia, las plantas salinizadas de maíz y de *T. dactyloides* mostraron valores similares en la relación K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> del vástago ( $0,86 \pm 0,07$  vs.  $2,38 \pm 0,15$ ; respectivamente). Las plantas salinizadas mostraron relaciones K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> similares a pHs 5,8 y 8,5 ( $1,60 \pm 0,28$  y  $1,69 \pm 0,24$ ; respectivamente). En cambio, las plantas cultivadas con 1 mM de NaCl en la solución nutritiva mostraron una reducción del 25 % en la relación K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> de la parte aérea por efecto del incremento del pH de 5,8 a 8,5 (de  $27,08 \pm 1,9$  a  $20,25 \pm 1,42$ ; respectivamente) (Figura 25).

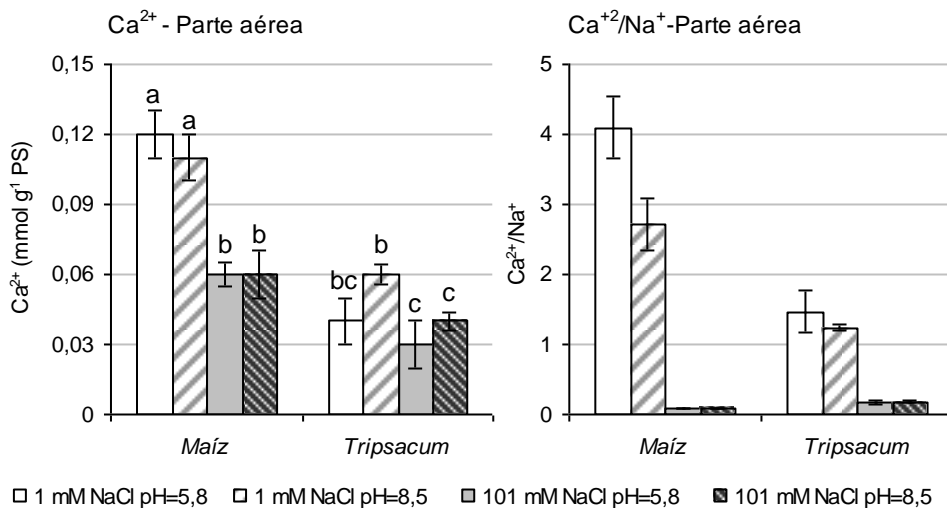


Figura 24. Efectos de la salinidad y la alcalinidad sobre el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  y la relación  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$  foliar de maíz (línea B73) y *T. dactyloides*. Las barras indican  $\pm$  EEM. Letras diferentes indican diferencia significativa según el test de Tuckey ( $p \leq 0,05$ ).

**Contenido de  $\text{K}^{+}$  y  $\text{Na}^{+}$  de la raíz.** Dos los tres factores principales, el genotipo y el nivel de NaCl, mostraron diferencias significativas en el nivel de  $\text{K}^{+}$  de la raíz ( $p = 0,0006$  y  $p < 0,0001$ ; respectivamente). *T. dactyloides* tenía un contenido de  $\text{K}^{+}$  (media  $\pm$  EEM en  $\text{mg g}^{-1}$  de MS) superior al del maíz ( $0,42 \pm 0,07$  vs.  $0,33 \pm 0,03$ ; respectivamente). A su vez, las plantas salinizadas mostraron una disminución del 44 % en el contenido de  $\text{K}^{+}$  con respecto a las no salinizadas ( $0,27 \pm 0,02$  y  $0,48 \pm 0,02$ ; respectivamente).

Los tres factores principales, el genotipo ( $p < 0,0001$ ), el nivel de NaCl ( $p < 0,0001$ ) y el pH ( $p = 0,033$ ) indujeron diferencias significativas en el contenido de  $\text{Na}^{+}$  de la raíz (Figura 23). Las interacciones nivel de NaCl x pH y genotipo x pH fueron significativas ( $p = 0,013$  y  $0,001$ , respectivamente). El aumento de la concentración de NaCl de la solución

nutritiva de 1 a 101 mM indujo el incremento del contenido de  $\text{Na}^+$  de las raíces (media  $\pm$  EEM en  $\text{mg g}^{-1}$  de MS), tanto en las plantas cultivadas con pH 5,8 (de  $0,29 \pm ,08$  a  $0,83 \pm 0,07$ ) como en las cultivadas con pH 8,5 (de  $0,29 \pm 0,05$  a  $1,03 \pm 0,06$ ). Las plantas que crecieron con bajo nivel de NaCl mostraron contenidos similares de  $\text{Na}^+$  en la raíz con pHs 5,8 ó 8,5 ( $0,29 \pm 0,08$  y  $0,29 \pm 0,05$ , respectivamente). La concentración de  $\text{Na}^+$  de la raíz (media  $\pm$  EEM en  $\text{mg g}^{-1}$  de MS) aumentó un 32 % con el incremento del pH de 5,8 a 8,5 ( $0,38 \pm 0,08$  vs.  $0,50 \pm 0,12$ , respectivamente) en las plantas de *T. dactyloides* pero no se modificó en el maíz ( $0,83 \pm 0,09$  vs.  $0,87 \pm 0,12$ ; respectivamente) (Figura 23).

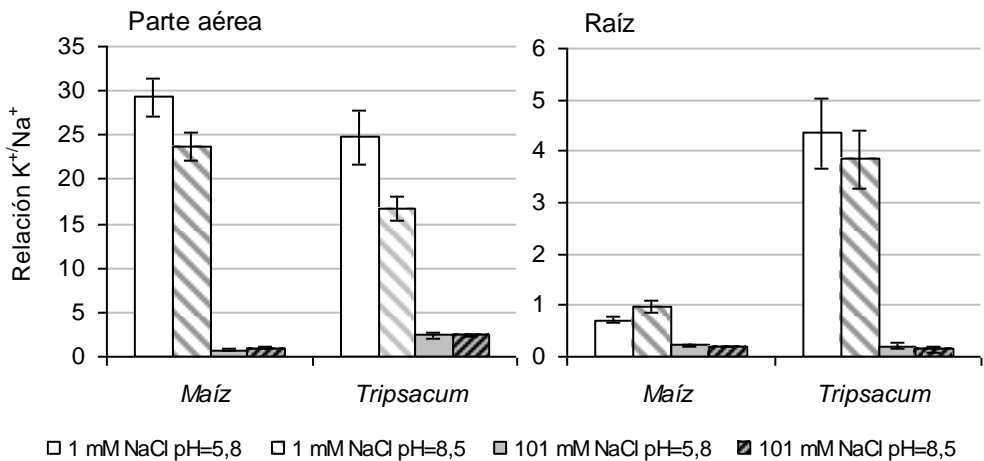


Figura 25. Efectos de la salinidad (1 y 101 mM de NaCl) y la alcalinidad (pH 5,8 y 8,5) de la solución de cultivo sobre la relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  de maíz (línea B73) y *T. dactyloides*. Las barras indican  $\pm$  EEM.

Dos de los tres factores principales, el genotipo ( $p < 0,0001$ ) y el nivel de NaCl ( $p < 0,0001$ ), mostraron diferencias en la relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  de la raíz. La interacción genotipo x nivel de NaCl fue significativa ( $p < 0,0001$ ). La relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  de las plantas sin salinizar fue  $\cong 5$  veces mayor



en *T. dactyloides* que en el maíz ( $4,26 \pm 0,36$  vs.  $0,87 \pm 0,05$ ; respectivamente). La presencia de 101 mM de NaCl en la solución de cultivo produjo una reducción de la relación  $K^+/Na^+$  de  $\cong 10$  veces en *T. dactyloides* (de  $4,26 \pm 0,36$  a  $0,41 \pm 0,03$ ) y de  $\cong 4$  veces en el maíz (de  $0,87 \pm 0,05$  a  $0,21 \pm 0,01$ ), con respecto a las plantas sin salinizar. Esto llevó a que las plantas salinizadas de *T. dactyloides* y maíz y mostraran relaciones  $K^+/Na^+$  similares ( $0,21 \pm 0,01$  y  $0,41 \pm 0,03$ ; respectivamente) (Figura 25).

**Comparación de los contenidos de  $K^+$  y  $Na^+$  de la parte aérea y la raíz.** En los genotipos de las dos especies evaluadas, maíz y *T. dactyloides*, el contenido de  $K^+$  (media  $\pm$  EEM en  $mmol\ g^{-1}$  de MS) fue menor en la raíz que en la parte aérea ( $p = 0,001$ ) en las plantas control ( $0,44 \pm 0,02$  vs.  $0,94 \pm 0,02$  y  $0,53 \pm 0,04$  vs.  $0,78 \pm 0,02$ ; respectivamente) y en las salinizadas ( $0,23 \pm 0,02$  vs.  $0,6 \pm 0,02$  y  $0,13 \pm 0,03$  vs.  $0,49 \pm 0,02$ ; respectivamente) (Figura 23). En cambio, tanto en el maíz como en *T. dactyloides*, el contenido de  $Na^+$  (media  $\pm$  EEM en  $mmol\ g^{-1}$  de MS) de la raíz superó al de la parte aérea ( $p = 0,0001$ ) en las plantas control y en las salinizadas (Tabla 22).

**Absorción de  $Na^+$  (contenido total de  $Na^+$  de la planta por unidad de peso seco de la raíz) y translocación desde la raíz al tallo.** El genotipo y la concentración de NaCl afectaron la absorción de  $Na^+$  ( $p < 0,0001$ ). La interacción genotipo x concentración de NaCl fue significativa ( $p < 0,0001$ ). En ambos niveles de salinidad, 1 y 101 mM de NaCl, la absorción de  $Na^+$  (media EEM, en  $mmol$  de  $Na^+$   $g^{-1}$  PS de raíz) por las plantas de maíz ( $0,61 \pm 0,03$  y  $2,91 \pm 0,15$ , respectivamente) fue aproximadamente el doble del absorbido por las plantas de *T. dactyloides* ( $0,32 \pm 0,02$  y  $1,47 \pm 0,05$ , respectivamente). El aumento del nivel de NaCl

en la solución nutritiva de 1 a 101 mM incrementó  $\cong 5$  veces la absorción de  $\text{Na}^+$  en ambas especies (Figura 26). El pH no afectó la absorción de  $\text{Na}^+$  ( $p = 0,31$ ).

Tabla 22. Comparación de la concentración de  $\text{Na}^+$  de la parte aérea y la raíz de plantas de maíz y *T. dactyloides* cultivadas con dos niveles de salinidad (1 y 101 mM de NaCl) y alcalinidad (pH 5,8 y 8,5). Letras diferentes en la columna indican diferencia significativa según el test LSD ( $p \leq 0,05$ ).

Parte de la planta	NaCl (mM)	pH	Concentración de $\text{Na}^+$ (mM)	
			Maíz	<i>T. dactyloides</i>
Parte aérea	1	5,8	0,03 $\pm$ 0,003a	0,03 $\pm$ 0,004a
	1	8,5	0,04 $\pm$ 0,003a	0,05 $\pm$ 0,01a
	101	5,8	0,75 $\pm$ 0,06c	0,20 $\pm$ 0,02c
	101	8,5	0,70 $\pm$ 0,05c	0,21 $\pm$ 0,004c
Raíz	1	5,8	0,60 $\pm$ 0,05b	0,11 $\pm$ 0,01b
	1	8,5	0,46 $\pm$ 0,02b	0,16 $\pm$ 0,01bc
	101	5,8	1,05 $\pm$ 0,07d	0,65 $\pm$ 0,02d
	101	8,5	1,15 $\pm$ 0,04d	0,85 $\pm$ 0,05e

El genotipo ( $p = 0,0079$ ) y la concentración de NaCl ( $p < 0,0001$ ) afectaron la translocación de  $\text{Na}^+$  del tallo a la raíz (relación entre el contenido de  $\text{Na}^+$  de la parte aérea y de la raíz). La interacción genotipo x concentración de NaCl fue significativa ( $p < 0,0001$ ). El aumento del nivel de NaCl de 1 a 101 mM en la solución de cultivo no modificó la translocación del  $\text{Na}^+$  hacia tallo en *T. dactyloides* ( $0,32 \pm 0,02$  vs.  $0,28 \pm 0,02$ , respectivamente) pero indujo un incremento de  $\cong 10$  veces en el maíz (de  $0,07 \pm 0,01$  a  $0,67 \pm 0,05$ ). El pH de la solución nutritiva no afectó la translocación de  $\text{Na}^+$  hacia el tallo ( $p = 0,18$ ; Figura 26).

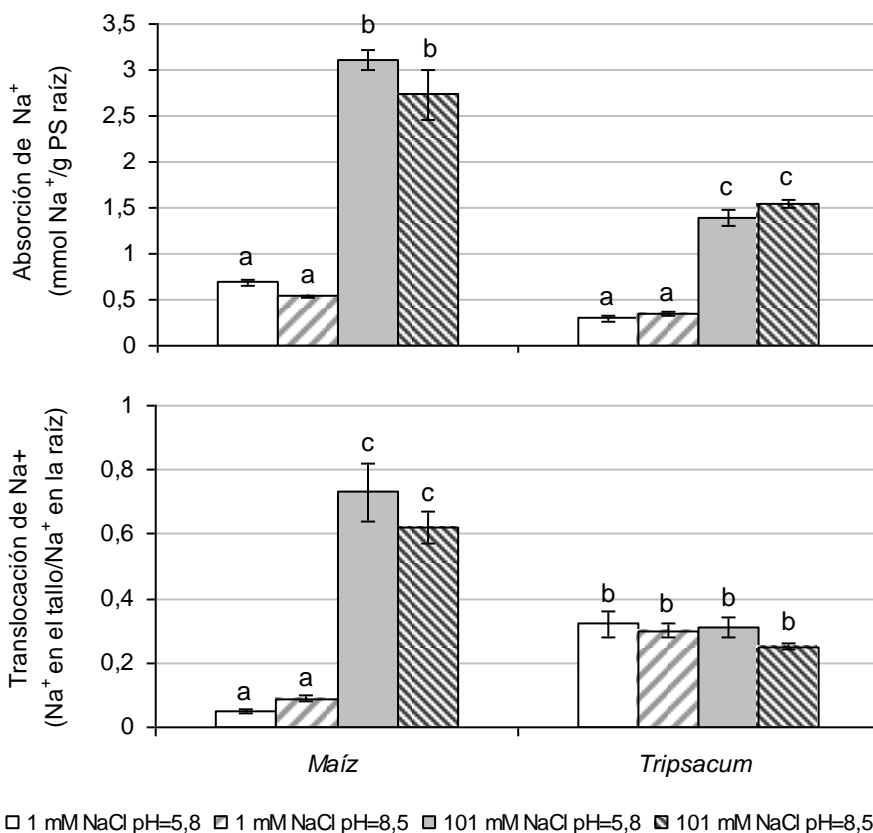


Figura 26. Absorción (mmol Na<sup>+</sup> total en la planta/g PS de raíz) y translocación a la parte aérea (contenido de Na<sup>+</sup>/contenido de Na<sup>+</sup> en la raíz) de Na<sup>+</sup> en plantas de maíz y *T. dactyloides* cultivadas con dos niveles de NaCl (1 y 101) y de pH (pH 5,8 y 8,5). Barras = ±EEM. Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

**Concentraciones de K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> y Ca<sup>+2</sup> de la parte aérea.** El contenido de agua relativo al peso seco foliar (g de agua g<sup>-1</sup> de peso seco foliar, media ± EEM) fue menor ( $p < 0,0001$ ) en *T. dactyloides* ( $3,71 \pm 0,18$ ) que en el maíz ( $7,01 \pm 0,21$ ) y en las plantas cultivadas con 101 mM de NaCl ( $4,72 \pm 0,41$ ) que en las no salinizadas ( $6,00 \pm 0,35$ ).

El genotipo ( $p < 0,0001$ ) y el nivel de NaCl ( $p < 0,0001$ ) afectaron la concentración de Na<sup>+</sup> de la parte aérea. La interacción genotipo x pH fue significativa ( $p < 0,0001$ ). Las plantas no salinizadas de maíz y *T. dactyloides* mostraron concentraciones similares de Na<sup>+</sup> (media  $\pm$  EEM, en mmol kg<sup>-1</sup>) en la parte aérea ( $4,94 \pm 0,38$  vs.  $9,06 \pm 0,68$ ), pero el maíz mostró una mayor concentración de Na<sup>+</sup> que *T. dactyloides* en presencia de 101 mM de NaCl ( $112,69 \pm 7,19$  vs.  $69,87 \pm 3,48$ ).

Tabla 23. Efectos de la salinidad y la alcalinidad de la solución nutritiva sobre las concentraciones foliares de K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> de maíz (línea B73) y *T. dactyloides* (T.d.).

Especie	NaCl (mM)	pH	Concentración de cationes (mmol kg <sup>-1</sup> agua)		
			Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>
Maíz	1	5,8	4,1 $\pm$ 0,5	111,0 $\pm$ 2,9	15,8 $\pm$ 1,0
	1	8,5	5,8 $\pm$ 0,3	129,3 $\pm$ 3,7	15,0 $\pm$ 2,1
	101	5,8	114,6 $\pm$ 8,3	90,8 $\pm$ 6,1	9,9 $\pm$ 0,8
	101	8,5	110,8 $\pm$ 13	100,7 $\pm$ 11,5	9,6 $\pm$ 0,5
T.d.	1	5,8	8,2 $\pm$ 0,8	159,8 $\pm$ 33,2	10,2 $\pm$ 1,6
	1	8,5	10,0 $\pm$ 1,1	132,4 $\pm$ 28,6	12,3 $\pm$ 1,2
	101	5,8	72,8 $\pm$ 5,5	137,3 $\pm$ 29,2	11,8 $\pm$ 2,2
	101	8,5	66,9 $\pm$ 4,5	162,2 $\pm$ 8,9	12,1 $\pm$ 1,3

La concentración de K<sup>+</sup> (media  $\pm$  EEM, en mmol kg<sup>-1</sup> de agua) fue superior en *T. dactyloides* que en el maíz ( $147,92 \pm 12,76$  vs.  $107,95 \pm 4,56$ ). La salinidad no afectó la concentración de K<sup>+</sup> ( $p = 0,5$ ). La salinidad indujo la disminución en el contenido de Ca<sup>2+</sup> ( $p = 0,02$ ). La interacción genotipo x NaCl fue significativa. El incremento del contenido de NaCl no afectó el contenido de Ca<sup>2+</sup> en las plantas de *T. dactyloides* pero indujo una disminución del 37 % en las de maíz (Tabla 23). El pH no afecto el

contenido de agua relativo al peso seco foliar ( $p = 0,6$ ) ni las concentraciones foliares de  $\text{Na}^+$  ( $p = 0,7$ ),  $\text{K}^+$  ( $p = 0,7$ ) y  $\text{Ca}^{2+}$ .

### 3.2. Experimento II: Efectos de la salinidad sobre maíz y generaciones avanzadas de un híbrido de maíz x *T. dactyloides*.

#### 3.2.1. Obtención y características de los híbridos.

En lo que se refiere a las características vegetativas de los híbridos, si bien las plantas de las progenies 2 y 3 fueron similares al maíz, el 100 % de las mismas tenía entre 1 y 5 macollos por planta (Figura 27). En cambio, en la progenie 4 sólo se observó hasta un macollo en el 12,5 % de las plantas y los híbridos MT41 y MT51 (progenie 5) mostraron hasta 2 macollos en el 45 % y en el 6 % de las plantas, respectivamente.

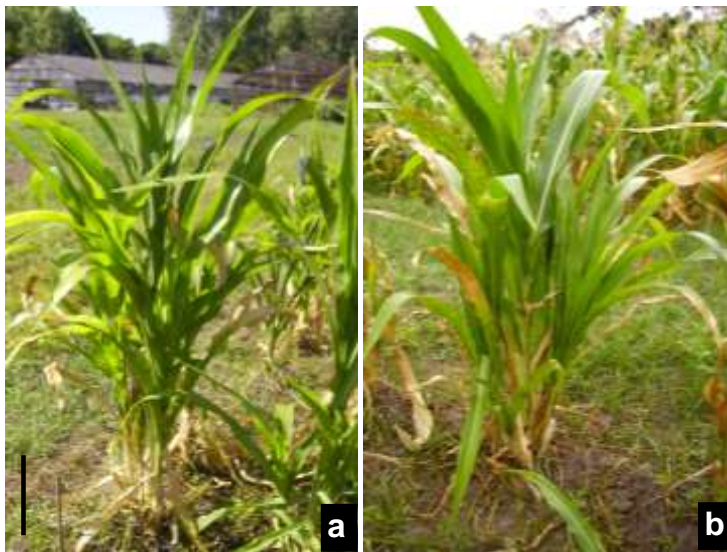


Figura 27. Plantas macolladoras de la tercera progenie de un híbrido de maíz x *T. dactyloides* en estado vegetativo: a) MT41, b) MT51

Las plantas de la progenie 2 mostraron hasta 29 espigas por planta y hasta 20 espigas por nudo. El número de hileras de granos por espiga osciló entre 1 y 8. Las plantas mostraron una panoja terminal con flores estaminadas y espigas laterales con flores femeninas, como ocurre en el maíz (Figura 28a), pero también se observaron flores pistiladas y estaminadas en la misma inflorescencia, como en *Tripsacum* (Figuras 28b y c). En las espigas con menor número de hileras, los cariopses se encontraban encerrados (desde el interior hacia el exterior) por glumas coriáceas y una cúpula dura (engrosamiento del raquis, Figura 29b), de manera similar a las unidades de dispersión de *T. dactyloides* (Figura 29a).

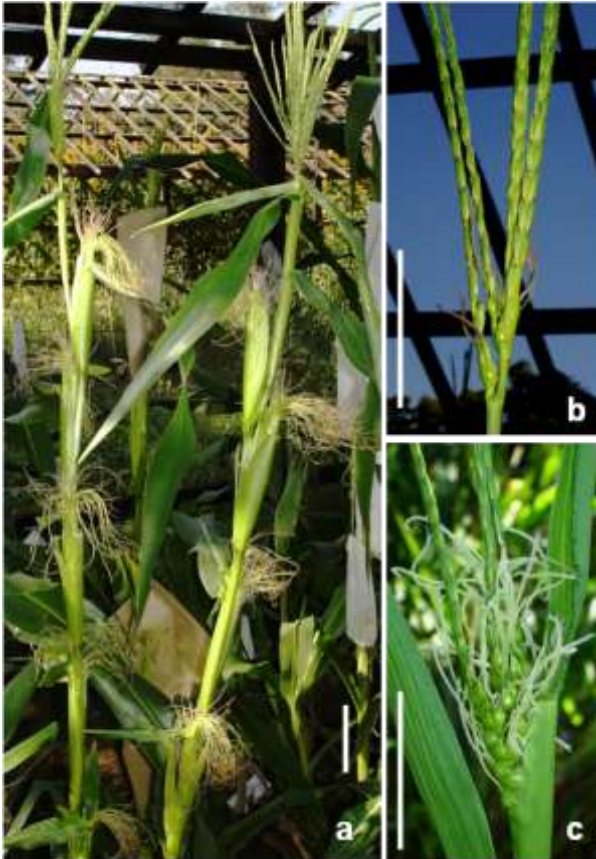


Figura 28. Plantas de segunda progenie de un híbrido entre maíz ( $2n = 40$ ) y *T. dactyloides*. a) Se observan espigas en todos los nudos y múltiples espigas por nudo; b y c) Se observan las flores pistiladas y las estaminadas en la misma inflorescencia; b) Inflorescencia terminal; c) Inflorescencia lateral. Barra = 10.

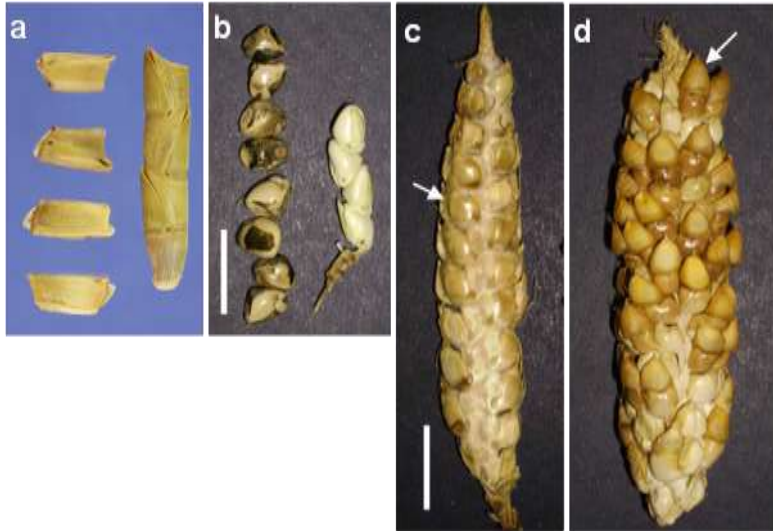


Figura 29. Espigas y cariopses de *T. dactyoides* (a) e híbridos de maíz x *T. dactyoides* (b, c y d). a) Nótese que los cariopses están encerrados en una cúpula y cubiertos por glumas coriáceas y dispuestos en la espiga formando una sola hilera; b-c-d) Espigas obtenidas por autofecundación o polinización libre de las plantas de la segunda progenie de un híbrido entre maíz ( $2n = 40$ ) y *T. dactyoides*. b) Cariopses y espiga similares a los de *Tripsacum*; c) Cariopses dispuestos en 4 hileras en la espiga y cubiertos por las glumas coriáceas (flecha); d) Espiga con varias hileras de cariopses desnudos. Barra = 1 cm.

Se observaron espigas similares a las del maíz a partir de la autofecundación de las plantas de la progenie 4 (Figura 30). Estas plantas mostraron entre 1 y 10 espigas por planta, al igual que la progenie 5 (híbridos MT41 y MT51).

El análisis de la meiosis de tres plantas de la progenie 2 (P2) mostró números cromosómicos  $2n=21$  y 23.

La planta madre del genotipo MT51 mostró  $2n = 23$  cromosomas. La configuración meiótica (CM) más frecuente de esta planta fue de  $7II + 3III$  (Figura 31) y la fertilidad del polen fue del 85,96 %.

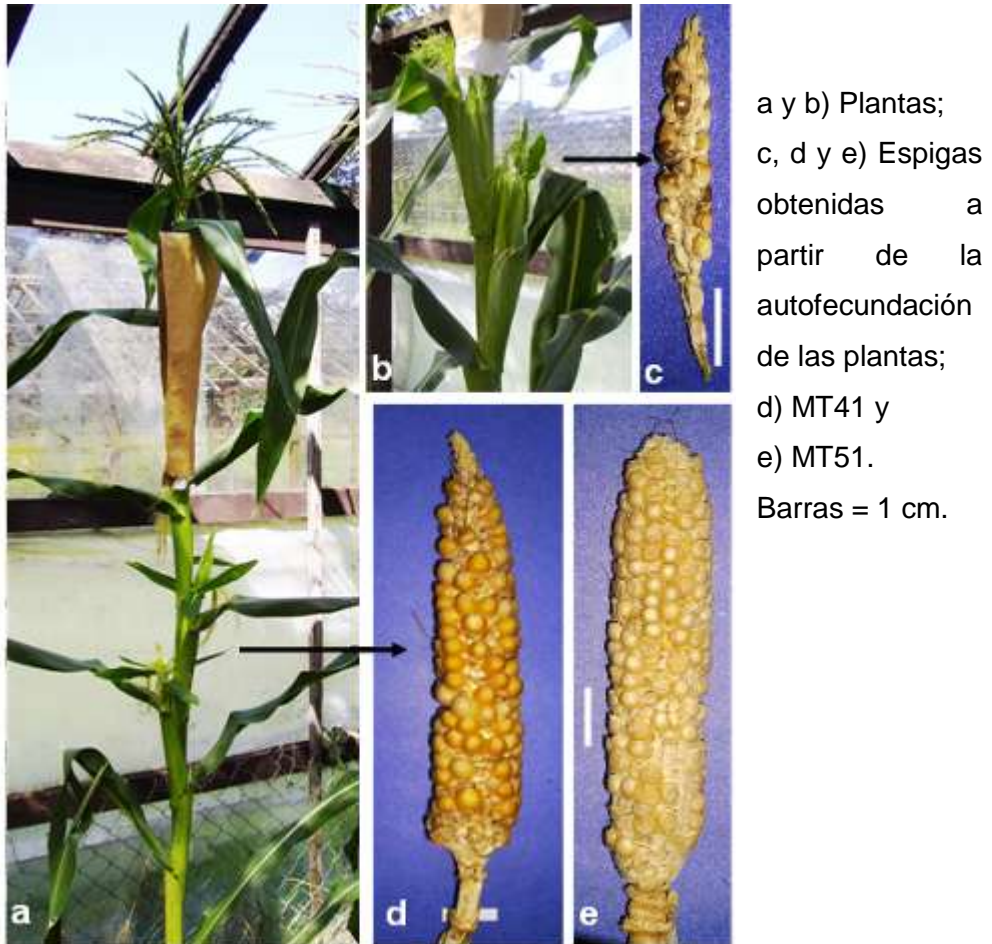


Figura 30. Cuarta progenie de un híbrido de maíz x *T. dactyloides*.

Dos plantas mostraron números cromosómicos de  $2n=21$  y  $2n=23$  cromosomas, dentro de un mismo antecio floral. Cuando en ambas plantas se contaron 23 cromosomas, su configuración meiótica más frecuente fue de  $9II+1III$ . Sin embargo, cuando se contaron 21 cromosomas, las configuraciones meióticas observadas difirieron entre plantas. La planta



madre del genotipo MT41 mostró 1I+8II+2III y la fertilidad del polen fue de 91,67 %. La otra planta mostró 2I+5II+3III y una fertilidad del polen del 31,03% (Figura 31). También se observaron anomalías tales como cromosomas retrasados y fusión citoplasmática (Figura 32).

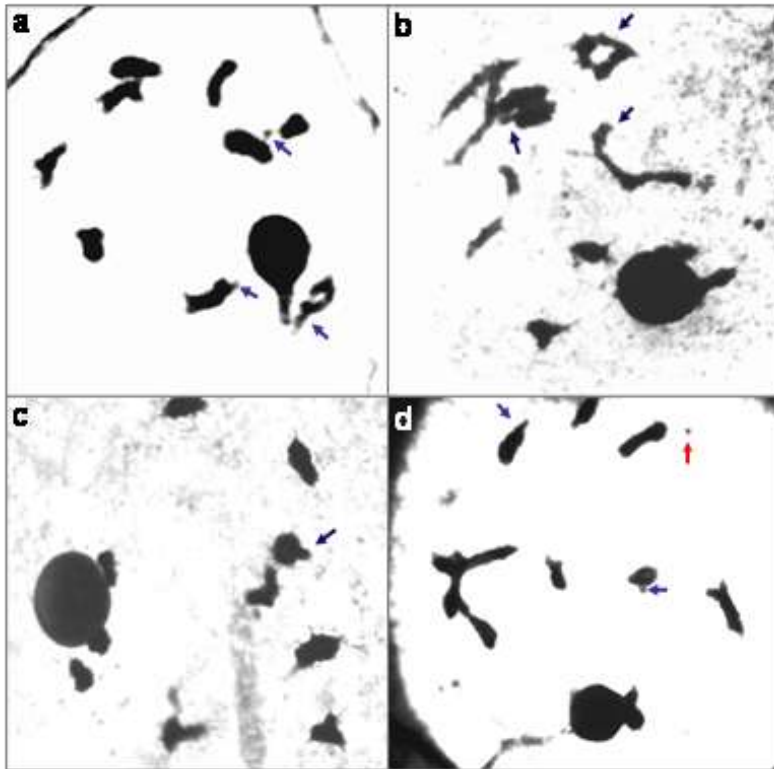


Figura 31. Meiosis en plantas de la segunda progenie de un híbrido entre maíz ( $2n = 40$ ) y *T. dactyloides*. Los meiocitos en diacinesis muestran 20 cromosomas de maíz + 1 ó 3 cromosomas de *T. dactyloides* (flechas). a–b) CM: 7II+3III ( $2n=23$ ); c) CM: 9II+1III ( $2n=21$ ); d) CM: 1I+ 8II+2 III ( $2n=23$ ).

En otras tres plantas de la progenie 2, todas derivadas de la misma planta madre, se observaron dos tamaños de polen bien diferenciados. Los granos de polen de menor tamaño se encontraban aislados o en grupos y eran todos fértiles.

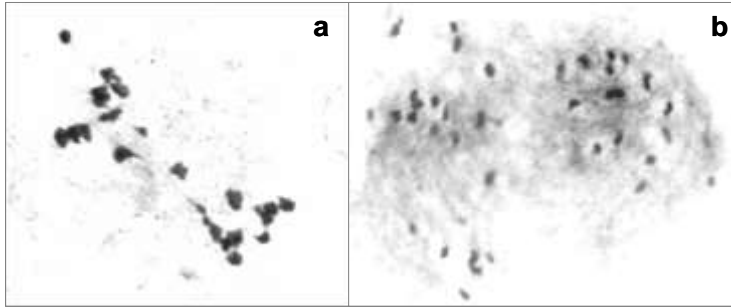


Figura 32. Células en Anafase I de plantas segunda progenie de un híbrido entre maíz ( $2n = 40$ ) y *T. dactyloides*. a) Se observan cromosomas retrasados, b) Se observan citoplasmas fusionados y cromosomas desfasados.

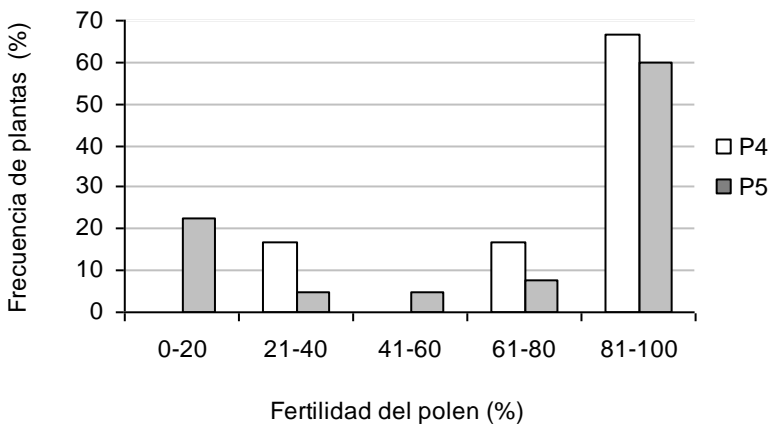


Figura 33. Frecuencia de plantas según la fertilidad del polen en las progenies 4 (P4) y 5 (P5) de un híbrido de maíz x *T. dactyloides*. El número de plantas analizadas fue de 12 (P4) y 40 (P5).

La viabilidad del polen de las plantas de la progenie 2 (P2) varió entre el 31 % y el 97%. Las plantas a partir de las cuales derivaron los genotipos MT41 y MT51 mostraron valores de fertilidad del polen del 92 % y 86 %, respectivamente (Tabla 24). Las plantas de las progenies 4 y 5

mostraron valores de fertilidad del polen del 36 % al 99 % y del 0 % al 99 % para las progenies 4 y 5, respectivamente (Figura 33).

Tabla 24. Fertilidad (promedio  $\pm$  DE) y diámetro del polen de plantas de la segunda progenie de un híbrido de maíz x *T. dactyloides*. Las plantas que tienen el mismo número derivan de una misma planta madre. Las plantas 4a y 5 fueron las que dieron origen a los genotipos evaluados (MT41 y MT51, respectivamente).

Planta	Fertilidad del polen (%)	Diámetro del polen ( $\mu\text{m}$ )		Granos pequeños (%)
		Granos grandes	Granos pequeños	
4a	91,7 $\pm$ 3,1	69,5	-	0,0
4b	94,9 $\pm$ 4,8	82,5	-	0,0
5	86,0 $\pm$ 5,8	67,5	-	0,0
12	31,0 $\pm$ 14,3	68,0	-	0,0
21a	97,3 $\pm$ 3,7	75,8	-	0,0
21b	59,6 $\pm$ 12,6	69,0	-	0,0
23a	92,1 $\pm$ 2,6	63,8	20,7	0,7
23b	76,4 $\pm$ 8,9	71,0	24,4	2,9
23c	92,6 $\pm$ 1,9	71,00	26,0	2,3

### 3.2.2. Efectos de la salinidad sobre las plantas

#### 3.2.2.1. Crecimiento

La salinidad (101mM de NaCl) de la solución nutritiva afectó negativamente el peso seco de la parte aérea ( $p = 0,003$ ) y la biomasa total ( $p = 0,008$ ) de las plantas (Figura 35) pero no se observaron diferencias significativas en el peso seco de la raíz ni en la relación vástago/raíz (Figura 34). Los genotipos mostraron diferencias significativas en el peso seco de la parte aérea ( $p = 0,030$ ), la raíz ( $p < 0,0001$ ), la biomasa total ( $p < 0,0001$ ) y la relación vástago/raíz ( $p = 0,0003$ ) (Tabla 25). La interacción

genotipo x tratamiento no fue significativa para estos parámetros. El mayor peso seco del vástago se observó en el maíz, el menor en el híbrido MT51 y el híbrido MT41 mostró valores intermedios (Tabla 25). Aunque los híbridos MT51 y MT41 no difirieron en el peso seco de la parte aérea, la biomasa total del híbrido MT51 fue la menor de los tres genotipos evaluados, debido a un menor crecimiento de la raíz. El menor crecimiento de la raíz del híbrido MT51 en comparación con los otros dos genotipos también se reflejó en la relación vástago/raíz, que fue mayor a la de los otros genotipos (Tabla 25 y Figura 34).

Tabla 25. Efecto del genotipo sobre el peso seco del vástago, la raíz, la biomasa total y la relación vástago/raíz (promedio  $\pm$  EEM). Letras distintas en la fila indican diferencia significativa según el test LSD ( $p \leq 0,05$ ).

<b>Peso seco (g/planta)</b>	<b>Genotipo</b>		
	<b>B73</b>	<b>MT41</b>	<b>MT51</b>
Parte aérea	0,77 $\pm$ 0,06a	0,66 $\pm$ 0,05ab	0,58 $\pm$ 0,04b
Raíz	0,42 $\pm$ 0,02a	0,36 $\pm$ 0,02a	0,24 $\pm$ 0,02b
Biomasa total	1,19 $\pm$ 0,08a	1,02 $\pm$ 0,06a	0,82 $\pm$ 0,06b
Relación vástago/raíz	1,87 $\pm$ 0,12a	1,96 $\pm$ 0,19a	2,50 $\pm$ 0,07b

La reducción de la biomasa aérea causada por la salinidad fue menor en el maíz que en el híbrido MT41 y el híbrido MT51 mostró valores intermedios (Tabla 26, Figura 34).

Las plantas de maíz cultivadas en la solución nutritiva que contenía 101 Mm de NaCl mostraron la menor reducción del peso seco total con respecto al control.

Tabla 26. Peso seco relativo al control (%) del vástago, la raíz y la biomasa total de las plantas cultivadas con NaCl 101 mM. Letras distintas en la columna indican diferencia significativa según el test LSD ( $p \leq 0,05$ ).

Genotipo	Peso seco relativo al control (%)		
	Vástago	Raíz	Biomasa total
B73	88,1 ± 5,9a	109,2 ± 6,7a	95,1 ± 5,6a
MT41	67,9 ± 6,3b	86,1 ± 12,9ab	73,95 ± 6,0b
MT51	78,1 ± 5,5ab	71,5 ± 5,2b	76,13 ± 5,1b

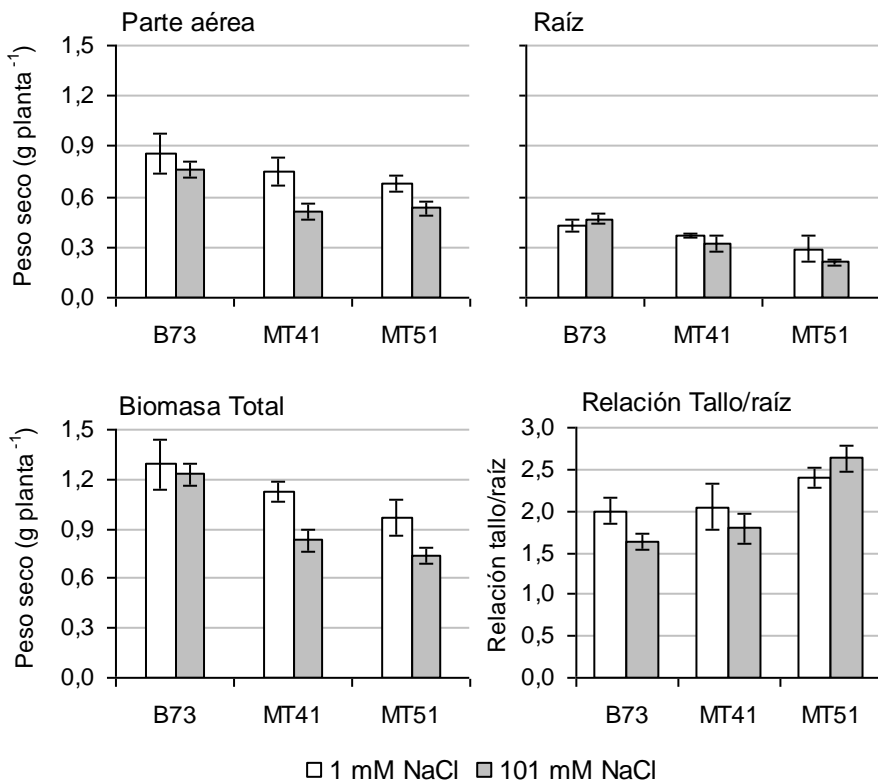
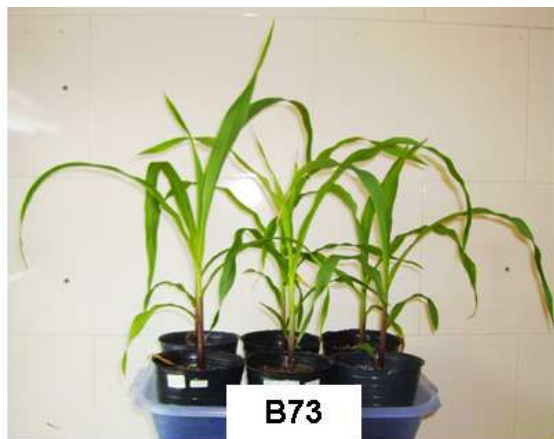


Figura 34. Efecto de la salinidad sobre el PS de la parte aérea, la raíz y la biomasa total y la relación parte aérea/raíz del maíz (línea B73) y los híbridos MT41 y MT51. Las barras indican ± EEM.

Los híbridos MT41 y MT51 mostraron reducciones similares del peso seco total por efecto de la salinidad, por una reducción significativa del peso seco (PS) de la parte aérea en el primero y de la raíz en el segundo, con respecto al maíz (Tabla 26, Figura 34).



En cada foto, de izquierda a derecha, se muestran las plantas cultivadas con 1 mM (primera hilera de plantas) ó 101 mM NaCl (segunda y tercera hileras de plantas) en la solución nutritiva. Barra = 10 cm.

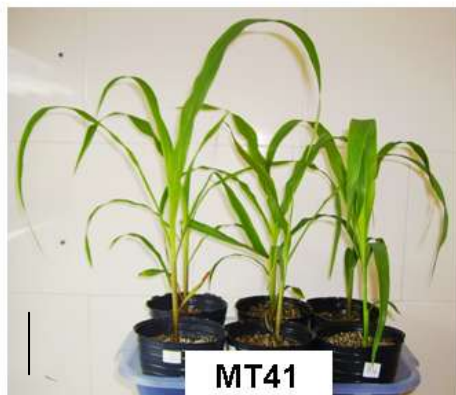


Figura 35. Plantas de maíz (B73) y generaciones avanzadas (MT51 y MT41) de un híbrido de maíz x *T. dactyloides*, 22 DDS.

### 3.2.2.2. Desarrollo

Sobre la base del tiempo térmico acumulado entre el inicio de los tratamientos (Figura 36) y los días hasta la emergencia de la quinta hoja

(Tabla 27) se determinó el filocrono promedio (tiempo térmico transcurrido entre la aparición de dos hojas sucesivas) entre la tercera y la quinta hoja.

Tabla 27. Días desde la siembra a la emergencia de las hojas en plantas de maíz (línea B73) y generaciones avanzadas (MT41 y MT51) de un híbrido de maíz x *T. dactyloides* cultivadas con 1 y 101 mM de NaCl.

Genotipo	[NaCl] mM	Tiempo en la emergencia de hojas (dds)			
		Hoja 2	Hoja 3	Hoja 4	Hoja 5
B73	1	6,2 ± 0,2	9,0 ± 0,0	12,2 ± 0,3	15,3 ± 0,3
	101	6,3 ± 0,2	9,2 ± 0,2	11,8 ± 0,2	15,2 ± 0,2
MT41	1	6,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	11,2 ± 0,3	15,3 ± 0,3
	101	6,0 ± 0,0	8,5 ± 0,2	11,2 ± 0,2	14,5 ± 0,2
MT51	1	6,33 ± 0,2	8,8 ± 0,2	11,8 ± 0,5	15,2 ± 0,5
	101	6,2 ± 0,2	8,7 ± 0,3	11,7 ± 0,5	15,2 ± 0,8

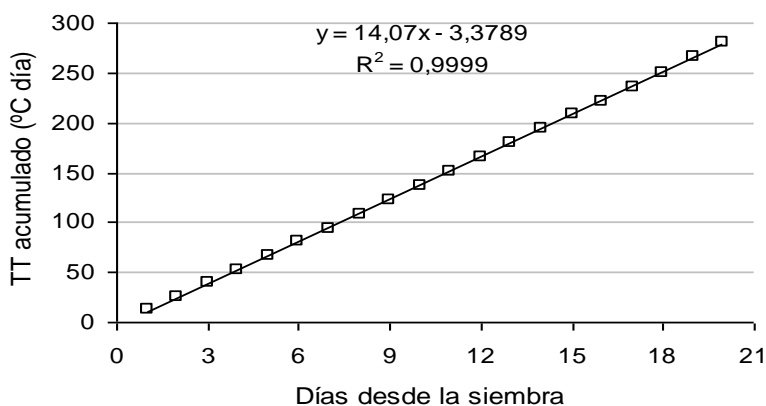


Figura 36. Tiempo térmico acumulado (base 10 °C) entre el inicio de los tratamientos y la aparición de la quinta hoja de las plantas.

Ni el genotipo ni la concentración de NaCl de la solución nutritiva produjeron diferencias significativas sobre el filocrono promedio entre la tercera y la quinta hoja (Tabla 28). Sin embargo, durante el periodo en que

se llevó a cabo el experimento, el híbrido MT51 no mostró la emergencia de la sexta hoja en el tratamiento salino. Esto sugiere que la emergencia de las hojas nuevas, a partir de la quinta, podría verse afectada por los tratamientos, lo cual no se evaluó en este experimento.

Tabla 28. Filocrono promedio ( $\pm$  EEM) entre la aparición de la tercera y la quinta hoja de plantas del maíz (línea B73) y generaciones avanzadas (MT41 y MT51) de un híbrido de maíz x *T. dactyloides*.

Genotipo	Filocrono promedio ( $^{\circ}\text{C día}^{-1}$ )	
	1 mM NaCl	101 mM NaCl
B73	44,6 $\pm$ 2,4	42,2 $\pm$ 0,0
MT41	44,0 $\pm$ 1,8	42,2 $\pm$ 0,0
MT51	44,6 $\pm$ 3,0	45,7 $\pm$ 4,0

### 3.2.2.3. Contenido relativo de agua (CRA), Masa foliar específica (MFE) y Porcentaje de pérdida de electrolitos foliares (PPE<sub>f</sub>)

El CRA y la MFE no difirieron entre los genotipos. La salinidad afectó negativamente el CRA ( $p = 0,0005$ ) pero no modificó la MFE con respecto al control (Figura 37).

La interacción genotipo x tratamiento no fue significativa para estos parámetros. El PPE difirió entre los genotipos ( $p = 0,001$ ), pero no entre los niveles de salinidad. Los valores (media  $\pm$  EEM, en %) de la línea B73 (11,8  $\pm$  0,4) fueron inferiores a los determinados para los híbridos MT41 (15,7  $\pm$  1,3) y MT51 (14,2  $\pm$  0,7) (Figura 37).

### 3.2.2.4. Contenido de pigmentos foliares

La línea de maíz B73 y los híbridos MT41 y MT51 no mostraron diferencias significativas en los contenidos foliares de clorofila a, clorofila b,



ni de carotenoides. La salinidad indujo una disminución en los contenidos de clorofila a ( $p = 0,0022$ ), clorofila b ( $p = 0,0023$ ) y carotenoides ( $p = 0,0063$ ). La interacción genotipo x tratamiento no fue significativa para estos parámetros (Figura 38).

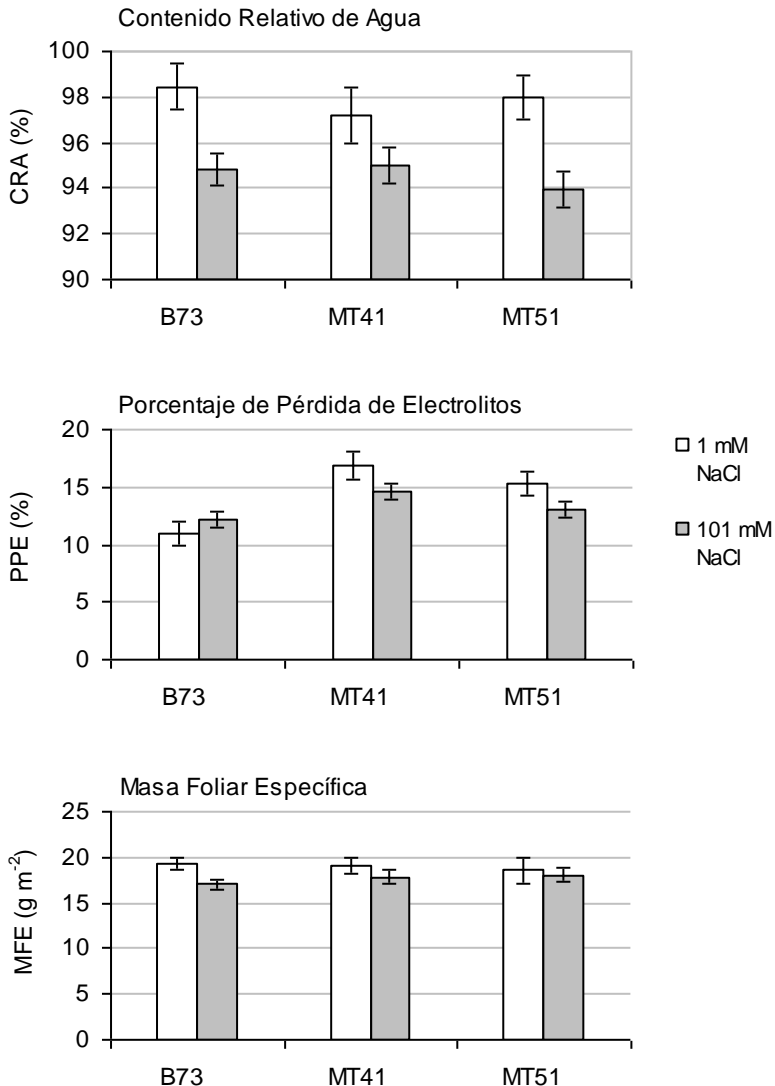


Figura 37. Efecto de la salinidad sobre el CRA, el PPE y la MFE del maíz línea B73) y los híbridos MT41 y MT51. Las barras indican  $\pm$  EEM.

La salinidad produjo una disminución del 21 % en el contenido de clorofila total, con respecto al control (Tabla 29).

La relación Cla/Clb fue menor para el híbrido MT51 que para los otros dos genotipos evaluados ( $p = 0,0005$ ) pero no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos salinos (Figura 38). La interacción genotipo x tratamiento no fue significativa para la relación Cla/Clb.

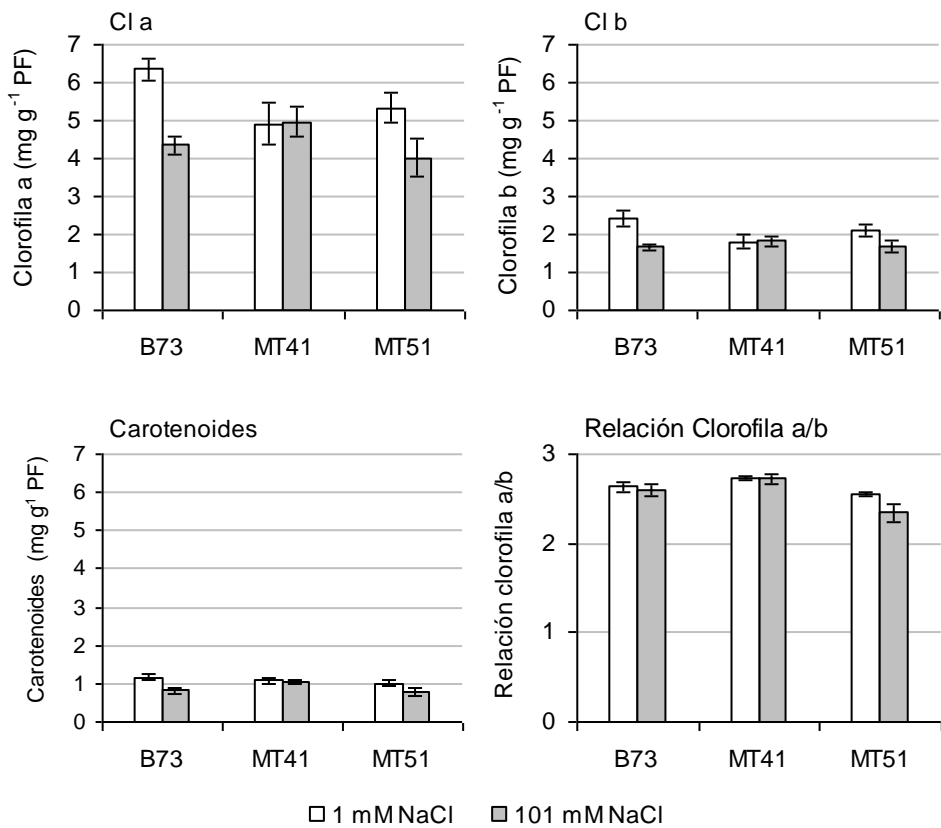


Figura 38. Efectos de la salinidad sobre el contenido foliar de clorofila a, clorofila b, carotenoides y la relación clorofila a/b de la línea de maíz B73 y los híbridos MT41 y MT51 (generaciones avanzadas de maíz x *T. dactyloides*). Las barras indican  $\pm$  EEM.

Tabla 29. Contenido de clorofila foliar total en plantas de maíz (línea B73) y generaciones avanzadas (MT41 y MT51) de un híbrido de maíz x *T. dactyloides* cultivadas con dos niveles de NaCl (1 y 101 mM).

Genotipo	Contenido de clorofila total (mg g <sup>-1</sup> PF)	
	1 mM NaCl	101 mM NaCl
B73	8,78 ± 0,38	5,55 ± 0,28
MT41	6,72 ± 0,74	6,28 ± 0,43
MT51	7,42 ± 0,54	5,42 ± 0,61

### 3.2.2.5. Contenido de iones

**Contenido de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> de la parte aérea.** En ausencia de tratamiento salino, los genotipos evaluados no mostraron diferencias significativas en los contenidos (media ± EEM, en mmol g<sup>-1</sup> de MS) de K<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup> de la parte aérea ( $p = 0,450$  y  $0,39$ , respectivamente) (Figura 39) pero sí se observaron diferencias en el contenido de Ca<sup>2+</sup> ( $p = 0,04$ ), cuya concentración fue superior en el híbrido MT41 ( $0,23 \pm 0,02$ ) que en el híbrido MT51 ( $0,16 \pm 0,01$ ), mientras que la línea B73 mostró un valor intermedio ( $0,18 \pm 0,01$ ) (Figura 40). La salinidad indujo un incremento en la concentración de Na<sup>+</sup> (de  $0,05 \pm 0,002$  a  $0,78 \pm 0,02$ ;  $p = 0,0001$ ) y una disminución en la de K<sup>+</sup> (desde  $1,22 \pm 0,03$  a  $1,06 \pm 0,03$ ;  $p = 0,002$ ), con respecto al control (Figura 39), pero no afectó el contenido de Ca<sup>2+</sup> ( $p = 0,27$ ) (Figura 40). La relación Ca<sup>2+</sup>/Na<sup>+</sup> no difirió entre genotipos ( $p = 0,55$ ) pero disminuyó significativamente ( $p < 0,0001$ ) en las plantas cultivadas en presencia de 101 mM de NaCl, con respecto los controles (Figura 40).

La relación K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> no difirió entre genotipos ( $p = 0,33$ ). La presencia de 101 mM de NaCl en la solución nutritiva produjo una reducción de  $\cong 20$  veces en la relación K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> con respecto al control (de  $26,76 \pm 1,76$  a  $1,37 \pm 0,07$ ;  $p = 0,0001$ ) (Figura 41).

La interacción genotipo x nivel de NaCl fue no significativa para los parámetros mencionados.

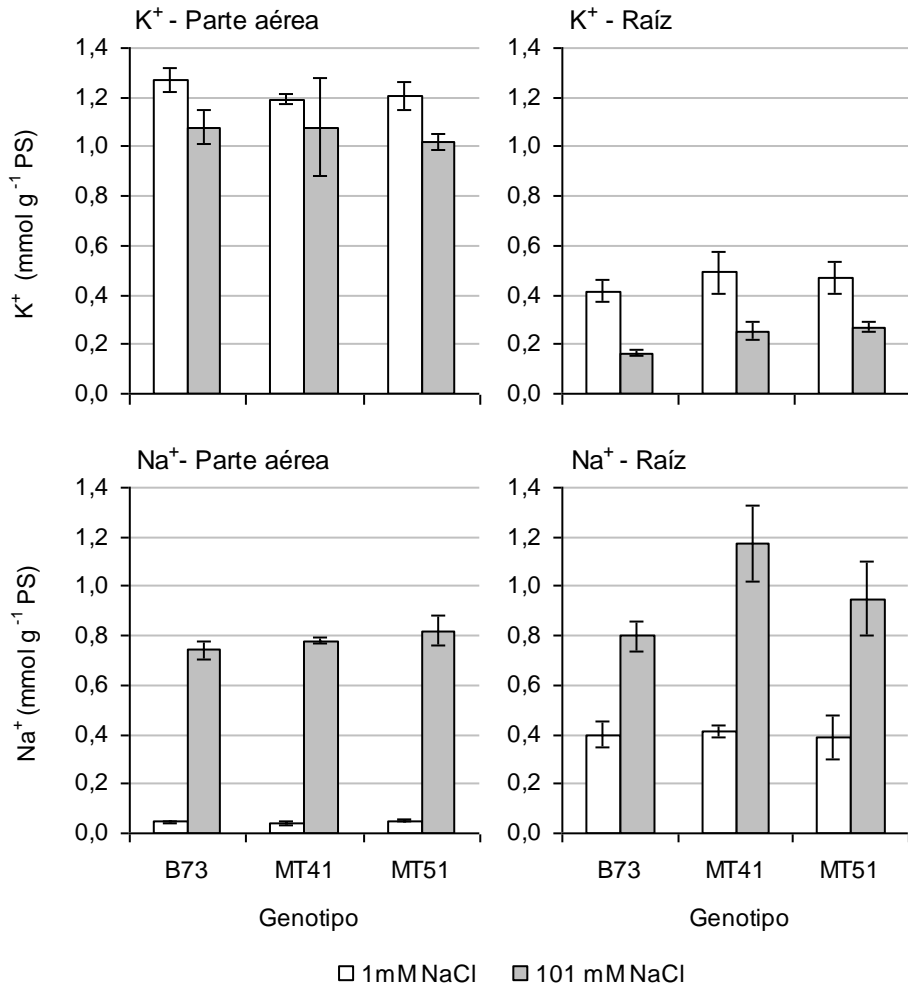


Figura 39. Efectos de la salinidad sobre el contenido de K<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup> en la parte aérea y en la raíz de la línea de maíz (línea B73) y los híbridos MT41 y MT51 (generaciones avanzadas de maíz x *T. dactyloides*). Las barras indican ± EEM.

**Contenido de K<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup> de la raíz.** Los contenidos de K<sup>+</sup> ( $p = 0,18$ ) y Na<sup>+</sup> ( $p = 0,07$ ) de la raíz no mostraron diferencias entre los genotipos evaluados (Figura 39). La interacción genotipo x tratamiento no fue significativa para contenido de K<sup>+</sup> ( $p = 0,46$ ) ni de Na<sup>+</sup> ( $p = 0,09$ ). El contenido de Na<sup>+</sup> (media  $\pm$  EEM en mmol g<sup>-1</sup> de MS) de la raíz superó al de la parte aérea ( $p = 0,0001$ ) tanto en las plantas control ( $0,4 \pm 0,02$  vs.  $0,05 \pm 0,002$ ; respectivamente) como en la que habían recibido el tratamiento salino ( $1,01 \pm 0,008$  vs.  $0,78 \pm 0,02$ ; respectivamente). Por el contrario, el contenido de K<sup>+</sup> (media  $\pm$  EEM en mmol g<sup>-1</sup> de MS) fue menor en la raíz que en la parte aérea ( $p = 0,001$ ) tanto en las plantas control ( $0,45 \pm 0,02$  vs.  $1,22 \pm 0,03$ , respectivamente) como en las que se habían cultivado en condiciones de salinidad ( $0,23 \pm 0,02$  vs.  $1,06 \pm 0,03$ ; respectivamente).

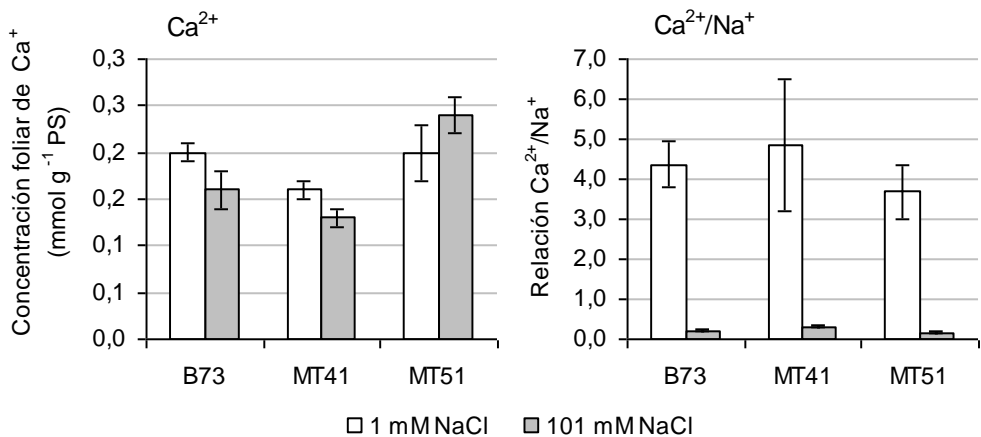


Figura 40. Efectos de la salinidad sobre el contenido de Ca<sup>2+</sup> y la relación Ca<sup>2+</sup>/Na<sup>+</sup> de la parte aérea del maíz (línea B73) y los híbridos MT41 y MT51 (generaciones avanzadas de maíz x *T. dactyloides*). Las barras indican  $\pm$  EEM.

En la raíz, la relación K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> no difirió entre genotipos ( $p=0,58$ ). La presencia de 101 mM de NaCl en la solución de cultivo indujo una

disminución de la relación  $K^+/Na^+$  de 1,14 a 0,24. La interacción genotipo x tratamiento no fue significativa ( $p=0,89$ ) para este parámetro. La relación  $K^+/Na^+$  de la parte aérea superó a la de la raíz  $\cong 23$  veces en las plantas control y  $\cong 6$  veces en las plantas salinizadas (Figura 41).

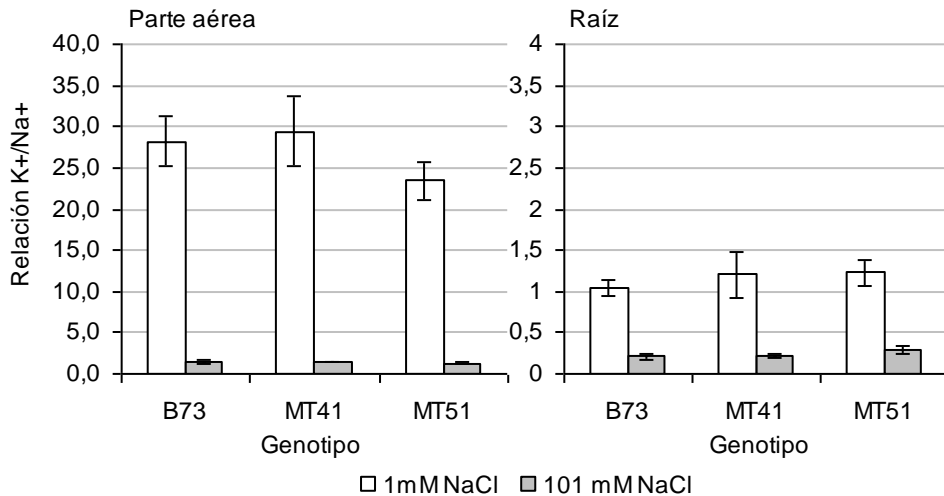


Figura 41. Efectos de la salinidad sobre la relación  $K^+/Na^+$  en la parte aérea y en la raíz de la línea de maíz B73 y los híbridos MT41 y MT51 (generaciones avanzadas de maíz x *T. dactyloides*). Barras =  $\pm$  EEM.

**Absorción de  $Na^+$  (mmol  $Na^+$  en la planta  $g^{-1}$  PS de raíz) y translocación hacia la parte aérea (contenido de  $Na^+$  del tallo/contenido de  $Na^+$  de la raíz).** Tanto el genotipo ( $p = 0,0049$  y  $0,0058$ , respectivamente) como la concentración de NaCl ( $p < 0,0001$ ) afectaron ambos parámetros (Figura 42). La interacción genotipo x concentración de NaCl fue significativa ( $p = 0,0075$  y  $0,035$ , respectivamente).

Las plantas no salinizadas de los tres genotipos evaluados mostraron la misma absorción de  $Na^+$  y translocación hacia el tallo (Figura 42A, B). En cambio, las plantas salinizadas de la línea B73 mostraron una

intensidad de absorción menor que los otros dos genotipos (Figura 42A) y el híbrido MT41 mostró la mayor translocación hacia el tallo (Figura 42B)

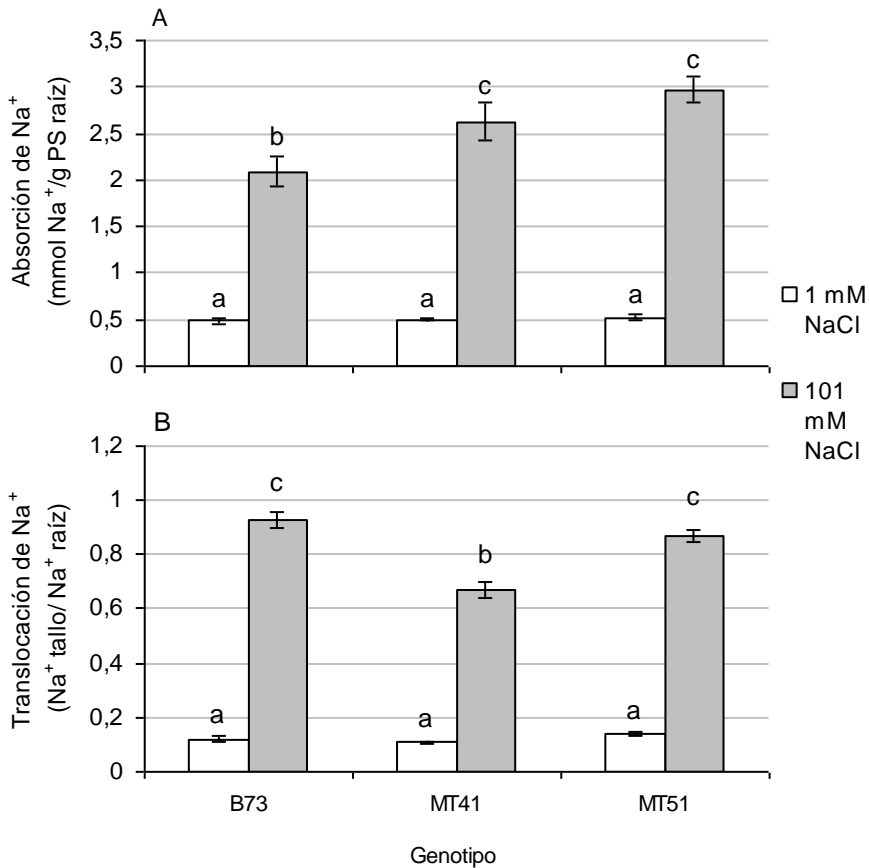


Figura 42. Efectos de la salinidad sobre la absorción de Na<sup>+</sup> y su translocación hacia la parte aérea en el maíz (línea B73) y los híbridos MT41 y MT51 (generaciones avanzadas de maíz x *T. dactyloides*). Las barras indican ± EEM. Letras diferentes indican diferencia significativa según el test de DMS ( $p \leq 0,05$ ).

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1. Obtención y evaluación de generaciones avanzadas de un híbrido de maíz x *T. dactyloides*

Las plantas obtenidas del cruzamiento (F1) de *Z. mays* ssp *mays* ( $2n = 40$ ) x *T. dactyloides* ( $2n = 72$ ) muestran un número cromosómico  $2n = 56$ , fenotipos similares a *T. dactyloides*, una altura promedio de 2,10 m, de 3 a 10 macollos por planta y 4 a 5 espigas por tallo. El periodo de floración de estas plantas se extiende desde noviembre a junio o julio. La mitad de estas plantas muestra un ciclo anual y el resto son bianuales o perennes. La fertilidad del polen varía entre 0 % y 50 %. El 80 % de estas plantas no produjo semillas viables, el restante 20 % produjo 2 a 10 semillas viables por espiga (Molina *et al.*, 2006). Además, estos híbridos F1 muestran tolerancia a las bajas temperaturas superiores a 0°C (Jatimliansky *et al.*, 2004) y a la salinidad por NaCl (Pesqueira *et al.*, 2003, 2006).

De las 40 plantas evaluadas de la progenie 1 (es decir, las que procedían de los híbridos F1), el 35 % muestra  $2n=56$  cromosomas, fenotipos similares a los híbridos F1 y la fertilidad del polen varía entre 0 % y 50 %. Las restantes plantas (65 %) muestran un fenotipo más parecido al maíz que a *T. dactyloides*, aunque tienen hasta 3 macollos por planta y floración continua sobre tallos muy prolíficos durante todo el periodo de crecimiento. La fertilidad del polen varía entre 40 % y 96%.

Las plantas de la progenie 1 con  $2n=56$  y fenotipo similar a los híbridos F1 muestran características citogenéticas similares a las descritas para las plantas F1 y no producen semillas viables. En cambio, las plantas de la progenie 1 similares al maíz muestran diferentes números cromosómicos diversos ( $2n=22, 24, 26, 28$  y  $30$ ) y producen semillas viables (Molina *et al.*, 2006). Los diferentes números cromosómicos son el resultado de la eliminación de 26 a 34 cromosomas de *Tripsacum* en



metáfase I. La meiosis es normal en las células con 22 o 24 cromosomas. Por el contrario, en las células con 26 o más cromosomas se observan cromosomas retrasados, separación espacial de los cromosomas en dos grupos por especie y posterior pérdida de los cromosomas de *Tripsacum*. Kindiger *et al.* (1996b) también observan la pérdida parcial de cromosomas de *Tripsacum* en retrocruzamientos de un híbrido F1 ( $2n = 56$ ) de maíz x *Tripsacum*.

El número de cromosomas de *Tripsacum* representados como univalentes es pequeño en todas las células en metafase I de híbridos reducidos de maíz x *Tripsacum* con 29 cromosomas (Lukina y Chistyakova, 1999), así como en la F1 y su progenie (Molina *et al.*, 2006).

#### **4.2. Evaluación de la tolerancia a la salinidad de maíz, *T. dactyloides* y generaciones avanzadas de un híbrido entre estas especies**

##### **Crecimiento de la parte aérea, la raíz y partición de biomasa.**

En estadios tempranos del desarrollo, el crecimiento de la hoja es uno de los procesos más sensibles a la sequía y la salinidad (Neves-Piestun and Bernstein, 2005, Taleisnik *et al.*, 2009, entre otros).

En un trabajo previo, plantas de un híbrido F1 de maíz x *T. dactyloides* regadas durante de 20 días con solución de NaCl 170 mM (Pesqueira *et al.*, 2003) o 250 mM (Pesqueira *et al.*, 2006; tabla 4) no mostraron reducción en el peso seco de la parte aérea, con relación a las plantas control (regadas con agua corriente). Las plantas de este híbrido eran altamente estériles, y sólo originaron unas pocas semillas viables, probablemente por apomixis. Estas semillas dieron origen a plantas con diferentes niveles de fertilidad, a partir de las cuales se obtuvieron progenies avanzadas por retrocruzamiento, autofecundación y polinización libre entre plantas hermanas.

Los híbridos MT41 y MT51 (progenie 5 del híbrido antes mencionado), se evaluaron en este estudio para determinar si la tolerancia a la salinidad observada en la F1 se mantenía en la descendencia. Sin embargo, en un periodo de 14 días, las plantas de los híbridos MT41 y MT51 muestran una disminución significativa del peso seco aéreo cuando se cultivan en una solución 101 mM de NaCl (32 % y 22 %, respectivamente), con respecto al control. Las plantas de maíz (línea B73) y *T. dactyloides* (el genotipo tetraploide utilizado como progenitor de los híbridos mencionados) también muestran una disminución significativa en el peso seco de la biomasa aérea tras 14 días de cultivo (maíz e híbridos) y 24 días de cultivo (*T. dactyloides*) en una solución con 101 mM de NaCl (Tablas 16 y 26), con respecto a las plantas control de cada genotipo (i.e. cultivadas con 1 mM NaCl).

En el periodo considerado, se observan diferencias en la respuesta a la salinidad entre los genotipos evaluados. Por efecto de la salinidad, *T. dactyloides* y el híbrido MT41 muestran una mayor reducción de la materia seca aérea que el maíz (línea B73) y el híbrido MT51 (Tablas 16 y 26), con relación a los controles.

Hay numerosos estudios donde se evalúa la respuesta de diferentes genotipos de maíz a la salinidad, usualmente en condiciones de crecimiento similares a las del presente estudio, o sea en estadios vegetativos tempranos y con concentraciones moderadas de NaCl (100 a 150 mM). En general, los resultados publicados muestran una variación intraespecífica considerable en la respuesta del maíz a la salinidad por NaCl, en las condiciones de cultivo mencionadas. Por ejemplo, dos cultivares de maíz cultivados en condiciones similares a las utilizadas en este trabajo (i.e. 75 a 100 mM de NaCl durante 15 días) muestran reducciones en el crecimiento vegetativo del 9 % al 36 % con respecto al control, para el genotipo más tolerante y el sensible, respectivamente (Mühling y Läuchli, 2002). Líneas de maíz casi isogénicas, que contienen o

no glicinabetaína, expuestas durante 13 días a un estrés salino (5 días a 50 mM, 3 días a 100 mM y 5 días a 150 mM de NaCl) muestran reducciones del peso seco aéreo del 4 % y 22 % con respecto al control, respectivamente (Saneoka *et al.*, 1995). Seis híbridos de maíz cultivados durante 15 días en 150 mM de NaCl muestran reducciones en el peso seco de la parte aérea del 45 % al 30 %, con respecto al control. En el experimento 2 de este estudio, el peso seco aéreo del maíz (línea B73) muestra una reducción del 12 % por efecto de la salinidad. Comparando estos valores con los observados en otros genotipos de maíz (generalmente cultivares e híbridos), la línea B73 podría considerarse como un genotipo tolerante a la salinidad (o al menos relativamente tolerante) dentro de la especie.

En comparación con la línea B73, la salinidad induce una mayor reducción de la biomasa aérea en el híbrido MT41 (32 %), mientras que el híbrido MT51 (22 %) muestra valores intermedios. *T. dactyloides* también es más sensible a la salinidad (101 mM NaCl-pH 5,8) que la línea de maíz utilizada en este trabajo (51 % vs. 28 % de reducción en la materia seca aérea con relación al control, respectivamente). Si bien los híbridos MT41 y MT51 no mantienen la tolerancia a la salinidad de la F1 de la cual derivan, muestran una menor sensibilidad a la salinidad que *T. dactyloides*.

Un nivel de salinidad elevado (250 mM) indujo el incremento del peso seco de la raíz de las plantas del híbrido F1 de maíz x *T. dactyloides*, con respecto al control, lo cual determinó que la relación vástago/raíz de las plantas salinizadas (2,6) disminuyera 2,7 veces con respecto a las plantas control (7,0). La disminución de la relación parte aérea/raíz del híbrido F1 se debió principalmente al incremento del peso seco de la raíz, ya que la salinidad no afectó significativamente la biomasa aérea seca (Pesqueira *et al.*, 2006, tabla 4). En cambio, en los genotipos evaluados en este trabajo, la salinidad no afectó el crecimiento de la raíz (Tabla 15 y figura 20). Solamente la combinación de salinidad y alcalinidad (101 mM

de NaCl y pH 8,5) redujo un 22 % el peso seco de la raíz en el maíz (Tablas 13 y 14), con respecto al control. En condiciones de salinidad, este incremento en el peso seco de la raíz observado en el híbrido F1 puede significar una mayor superficie en contacto con la solución del suelo, o sea más superficie para la absorción de agua y nutrientes y más volumen para la acumulación de sodio en la raíz. La relación vástago/raíz disminuyó por efecto de la salinidad en *T. dactyloides* y levemente en el maíz en el experimento 1 (1,7 y 1,2 veces, respectivamente), con respecto al control, pero no se modificó en los híbridos MT41 y MT51 ni en el maíz en el experimento 2.

Generalmente, el crecimiento de la raíz es menos sensible a la salinidad que el de la parte aérea. Especies con distintos grados de tolerancia a la salinidad muestran esta respuesta ante un estrés salino moderado, por ejemplo el maíz (Lohaus *et al.*, 2000; Mühlíng y Läubli, 2002), arroz (Misra *et al.*, 1997) y tomate (Dalton *et al.*, 1997). Aún en presencia de un estrés salino severo (250 mM de NaCl durante 6 días), las plantas de 19 genotipos de maíz mostraron una menor reducción en el crecimiento de la raíz que del tallo (aproximadamente 37 % vs. 60 % de disminución del peso seco, respectivamente) (Eker *et al.*, 2006).

En coincidencia con los resultados obtenidos en el presente estudio para el maíz, *T. dactyloides* y los híbridos interespecíficos MT41 y MT51, otros autores observaron que una salinidad moderada no inhibe el crecimiento de la raíz, o lo afecta levemente, cuando se aplica de forma gradual a las plántulas de maíz a partir de los 7 días después de la siembra (Lohaus *et al.*, 2000; Mühlíng y Läubli; 2002). Sin embargo, plántulas de maíz más jóvenes (4 y 10 días de edad), cultivadas en un rango de concentraciones de NaCl de 60 a 150 mM, muestran una fuerte inhibición de la tasa de crecimiento de la raíz, con respecto a las plantas no salinizadas (Zidan *et al.*, 1990; Khan *et al.*, 2003).

Khan *et al.* (2003) evaluaron la respuesta a la salinidad de 100 genotipos de maíz y, aunque encontraron diferencias genotípicas, el crecimiento de la raíz (estimado como % de la longitud con respecto al control) se inhibió en todos los genotipos. Estos resultados se obtuvieron aplicando la salinidad desde el estadio de semilla. De acuerdo a estos resultados, parecería que la salinidad produce una disminución marcada sobre el crecimiento de la raíz solamente cuando se aplica en estadios muy tempranos del desarrollo de la planta (i.e. semillas y plántulas hasta 2 días después de la germinación) y en un solo paso (sin aclimatación).

La partición del carbono entre la parte aérea y la raíz es flexible y muy sensible a cambios en el ambiente (Loomis y Connor, 1992). El mecanismo preciso mediante el cual la sal afecta la partición de carbono no está claro. Lohaus *et al.* (2000) sugirieron que la salinidad induce un incremento relativo de la fuerza de la raíz como destino de fotoasimilados, dado que encontraron una mayor translocación de compuestos nitrogenados vía floema en plantas de maíz expuestas a salinidad. Por otro lado, la menor tasa de crecimiento del vástago de las plantas expuestas a salinidad indicaría una disminución en la fuerza de la parte aérea como destino de fotoasimilados.

## **Desarrollo**

La tasa de senescencia de hojas viejas y de aparición de hojas nuevas es crucial para la supervivencia de una planta. Si la tasa de muerte de las hojas más viejas supera a la tasa de desarrollo de las hojas nuevas, la planta puede no sobrevivir lo suficiente para producir semillas (Munns *et al.*, 2006).

El trigo suele considerarse como una especie más tolerante a la salinidad que el maíz (Ayers y Westcot, 1985). En un ensayo con dos genotipos de trigo, uno más sensible y otro más tolerante, ambos muestran

hojas muertas dentro de las dos primeras semanas de tratamiento con 150 mM de NaCl (Munns *et al.*, 1995). La tasa de hojas muertas es claramente superior en el genotipo sensible que en el tolerante, y cuando la misma alcanza el 20 % del total, el crecimiento de las plantas disminuye y varios individuos comienzan a morir (Munns *et al.*, 1995).

Hasta los 22 (maíz e híbridos) y 38 (*T. dactyloides*) días después de la siembra (*i.e.*, periodo hasta la finalización de los experimentos), o sea 14 y 24 días de salinización, respectivamente, la salinidad (101 mM de NaCl) no induce la senescencia de las hojas más viejas en ninguno de los genotipos evaluados. El filocrono, hasta la emergencia de la quinta hoja, no aumenta por efecto de la salinidad en el maíz (línea B73) ni en los híbridos MT41 y MT51, pero sí en *T. dactyloides* (Tablas 15, 16 y 25). En cambio, la alcalinidad, en combinación o no con la salinidad, incrementa el filocrono en el maíz a partir de la quinta hoja (Tabla 18). En el periodo considerado, las últimas hojas (sexta o séptima, según el genotipo) no llegaron a emerger en algunas de las plantas cultivadas con 101 mM de NaCl y la mayoría de las que emergieron mostró necrosis en el extremo visible, en todos los genotipos evaluados (datos no mostrados).

Neves-Piestun y Bernstein (2001) observaron un efecto similar de la salinidad sobre el desarrollo de maíz. Según estos autores, los efectos de la salinidad (80 mM de NaCl) sobre el plastocrono se hacen evidentes a partir de la hoja 5. Resultados obtenidos por Cramer (1992a) muestran una disminución marcada en la relación  $Ca^{2+}/Na^{+}$  de la zona de crecimiento de la tercera hoja, con respecto al control, para dos cultivares de maíz que diferían en la capacidad de excluir el  $Na^{+}$  (1,7 vs. 0,1 y 6,8 vs. 0,05 para los cultivares con alta y baja capacidad de exclusión de  $Na^{+}$ , respectivamente). La disminución de la relación  $Ca^{2+}/Na^{+}$  podría explicar la necrosis de las hojas nuevas en los genotipos evaluados.

En condiciones de salinidad, uno de los mecanismos que controla el contenido de  $Na^{+}$  de las hojas más viejas en el maíz es, probablemente,

el incremento de la tasa de transporte por el floema (Lohaus *et al.*, 2000). La recirculación de Na<sup>+</sup> por el floema parece ser un mecanismo importante en la tolerancia a la salinidad (Berthomieu *et al.*, 2003).

*Ricinus communis*, una especie moderadamente sensible a la salinidad (Ayers y Westcot, 1985), muestra una correlación positiva con una pendiente relativamente alta entre el contenido de Na<sup>+</sup> foliar y del flujo floemático, mientras que la correlación entre la concentración de Na<sup>+</sup> de la solución nutritiva y la concentración de Na<sup>+</sup> del tejido de la raíz, del flujo xilemático y del tejido foliar muestran pendientes relativamente bajas (Peuke, 2010). Resultados similares se obtuvieron en plantas de maíz cultivadas con 100 mM de NaCl (Lohaus *et al.*, 2000), en las cuales la salinidad induce un incremento marcado en la importación de Na<sup>+</sup> por el xilema hacia la hoja y un incremento aún mayor en la exportación de Na<sup>+</sup> desde la hoja por el floema. O sea, bajo las mismas condiciones de cultivo, la exportación del Na<sup>+</sup> desde la hoja aumenta más fuertemente que la importación hacia la hoja. El 13 % del Na<sup>+</sup> importado por la hoja fue retranslocado en las plantas control y el 32 % en las plantas salinizadas. Aunque la retranslocación de iones por el floema se considera un mecanismo potencialmente importante en la prevención de la acumulación de sales en las hojas totalmente expandidas, podría representar un riesgo para las hojas más jóvenes que son sumideros del flujo floemático.

El porcentaje de Na<sup>+</sup> importado por el xilema hacia la hoja que es exportado por el floema varía con el genotipo. Por ejemplo, se observaron valores de retranslocación de  $\cong 10$  % en cebada (Wolf *et al.*, 1990) y trigo duro (James *et al.*, 2006), 32 % en maíz (Lohaus *et al.*, 2000), 37 % en algodón (Gouia *et al.*, 1994) y 77 % en poroto (Gouia *et al.*, 1994). De acuerdo al nivel de sensibilidad a la salinidad de las especies mencionadas (Maas y Hoffman, 1977; Ayers y Westcot, 1985; Munns *et al.*, 2006;), parecería que hay una tendencia al incremento en la retranslocación de Na<sup>+</sup> desde las hojas a medida que aumenta la sensibilidad de la especie.

Por otro lado, Peuke (2010) observó que el destino del  $\text{Na}^+$  floemático en *R. communis* son las raíces. Además, tanto en especies tolerantes como en las sensibles a la salinidad, el contenido de  $\text{Na}^+$  es menor en los tejidos foliares jóvenes que en los viejos. Por ejemplo, la concentración de  $\text{Na}^+$  en las hojas jóvenes (en expansión) de plantas de maíz y de algodón (especie más tolerante) cultivadas durante dos semanas en presencia de 75 mM de NaCl es aproximadamente la mitad que el de las hojas viejas (totalmente expandidas).

En trigo y cebada se observaron concentraciones muy bajas de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en los ápices caulinares y en el tejido reproductivo, en comparación con las hojas, y una relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  particularmente alta (Munns y Rawson, 1999). Sin embargo, Colmer *et al.* (1995) observaron una marcada diferencia en la relación entre el contenido de  $\text{Na}^+$  de las hojas jóvenes y las hojas viejas entre genotipos emparentados que diferían en el grado de tolerancia a la salinidad. Si bien el nivel de  $\text{Na}^+$  aumenta progresivamente con la edad de la hoja en ambos genotipos, los niveles de  $\text{Na}^+$  son menores en el genotipo más tolerante (el anfiploide trigo x *Lophopyrum elongatum*) que en el más sensible (trigo), y el porcentaje de diferencia en el contenido de  $\text{Na}^+$  entre ambos genotipos se incrementa en las hojas más jóvenes. Estos datos indican que existe variación genética en el nivel de translocación del  $\text{Na}^+$  hacia los tejidos más jóvenes en plantas salinizadas, y que mantener un nivel bajo de  $\text{Na}^+$  en los tejidos en crecimiento podría ser un mecanismo que aumenta la tolerancia a la salinidad. Determinar la distribución del contenido foliar de  $\text{Na}^+$  según la edad del tejido permitiría saber si la necrosis observada en las hojas más jóvenes de los genotipos evaluados en este trabajo se debió a un contenido alto de  $\text{Na}^+$  en los mismos.

### **Masa foliar específica (MFE)**



La MFE o masa foliar seca por unidad de área foliar es la relación entre la masa seca de la hoja y el área foliar, generalmente expresada en  $\text{g m}^{-2}$ , y determina la cantidad de área foliar formada en una cierta fracción de la biomasa foliar. La MFE fue similar en el maíz y los híbridos MT41 y MT51 (Figura 37). *T. dactyloides* muestra una MFE un 20 % mayor que la del maíz. Estos resultados concuerdan con las observaciones de Poorter *et al.* (2009), quienes concluyen que, en las mismas condiciones ambientales, las especies suculentas, las leñosas con hojas perennes y las especies perennes o de lento crecimiento tienen mayor MFE.

Poorter *et al.* (2009), a partir de numerosos resultados publicados, ordenaron los factores ambientales según su influencia sobre la MFE. Según estos autores, los factores ambientales que más afectan la MFE serían la irradiancia, la temperatura y la inmersión, seguidos por el aporte de nutrientes y el nivel hídrico. El resto de los factores sólo ejerce un efecto marginal.

Dado que la salinidad impone un estrés osmótico, actúa cualitativamente como el estrés hídrico, aunque un componente iónico específico puede afectar la MFE en cuanto a la compartimentación del  $\text{Na}^+$  a la vacuola. Diversos autores observaron un incremento de la MFE en respuesta a la salinidad en especies con diferentes niveles de tolerancia. En cambio, el maíz, los híbridos MT41 y MT51 y *T. dactyloides* no muestran diferencias en la MFE entre las plantas salinizadas y las plantas control (Figuras 20 y 37). La alcalinidad ( $\text{pH}=8,5$ ), en presencia o no de 101 mM de NaCl, no tiene efecto sobre la MFE de *T. dactyloides* ni de maíz, con respecto a los controles (Figura 20). Estos resultados indican que la reducción en la biomasa aérea, causada tanto por la salinidad como por la alcalinidad, se debió principalmente a una disminución de la expansión foliar, ya que la masa foliar por unidad de área foliar no se modificó.

Numerosos resultados previos, los cuales muestran que el crecimiento de la hoja es un parámetro muy sensible al estrés, apoyan estas observaciones. Los pesos secos de la parte aérea muestran una respuesta similar al estrés salino que el área foliar en genotipos de maíz que difieren en su nivel de tolerancia a la salinidad (De Costa *et al.*, 2007).

Resultados previos obtenidos en maíz muestran que una semana de exposición a 100 mM de NaCl no afecta la asimilación neta de CO<sub>2</sub> sobre la base del peso fresco de las hojas (Lohaus *at al.*, 2000) pero la presencia de 80 mM de NaCl en la solución nutritiva reduce rápidamente (30 min) la tasa de expansión foliar, la cual se estabiliza en el 80 % del valor inicial a los 90 min (Cramer and Bowman, 1991a). La exposición de dos híbridos de maíz que difieren en la tolerancia a la salinidad a 80 mM NaCl induce una reducción de la relación de área foliar (área foliar por unidad de biomasa total de la planta) pero no tiene efectos significativos sobre la tasa de asimilación neta o fotosíntesis (Cramer *et al.*, 1994b). La salinidad reduce el área foliar específica (área foliar por unidad de masa foliar, o sea la inversa de la masa foliar específica) y la relación de peso foliar (materia seca foliar por unidad de materia seca total), lo cual indica una menor partición de fotoasimilados hacia las hojas. Además, las diferencias en la tolerancia a la salinidad se han correlacionado con diferencias en la tasa de expansión foliar, la relación de área foliar y la tasa de crecimiento relativo, lo cual sugiere que, en estadios tempranos de un estrés salino (e.g. 9 días), la producción de biomasa depende más de la expansión del área foliar para capturar la luz que de la maquinaria bioquímica fotosintética (Cramer *et al.*, 1994b).

En coincidencia con los resultados anteriores, en el maíz, los híbridos MT41 y MT51 y *T. dactyloides*, el parámetro más probablemente afectado por la salinidad también es la expansión del área foliar, ya que la reducción del peso seco aéreo causada por la salinidad no se relacionó con modificaciones en la masa foliar específica y, por lo tanto, un menor

peso seco se relacionaría directamente con una menor área foliar. Además, las plantas cultivadas 14 días (maíz e híbridos) o 24 días (*T. dactyloides*) en presencia de 101 mM de NaCl en la solución nutritiva muestran reducciones del peso seco aéreo pero no de la raíz (Tabla 15 y figura 20), con relación al control. Por lo tanto, una menor superficie fotosintética abastece una demanda similar de fotoasimilados por las raíces. En este contexto teórico, estos resultados sugieren que la salinidad no afectó la fotosíntesis en los genotipos evaluados en este trabajo.

### **Contenido Relativo de Agua (CRA)**

La bibliografía muestra resultados diversos con respecto al efecto de la salinidad sobre el CRA foliar en el maíz. Algunos autores observaron que la exposición de plantas de maíz a concentraciones moderadas de NaCl (100 a 150 mM de NaCl) induce una reducción significativa del CRA con respecto al control (Saneoka *et al.*, 1995; Çiçek y Çakırlar, 2002; Zhang *et al.*, 2006). En cambio, otros autores informaron que la exposición de plantas de maíz a 100 mM de NaCl no produce una disminución en el CRA foliar (Bastías *et al.*, 2004b; Hu *et al.*, 2007), pero sí se observa una disminución significativa del potencial osmótico y no hay cambios en el potencial de presión, debido a la expresión del mecanismo de ajuste osmótico (Bastías *et al.*, 2004b).

La presencia de 101 mM de NaCl produce una disminución significativa del CRA, con respecto al control, en el maíz, *T. dactyloides* y los híbridos MT41 y MT51. Sin embargo, todos los tratamientos muestran valores relativamente altos del CRA en el híbrido MT51, con un máximo del 100 % en los controles y un mínimo del 93 % en los tratamientos salinos (Tabla 20 y figura y 22). Generalmente, la disminución del CRA del 100 % al 90 % se relaciona con la disminución de la expansión celular y de la conductividad estomática en la hoja. La fotosíntesis neta y la fotosíntesis

máxima se inhiben a valores más bajos del CRA (90-70 % y <70 %, respectivamente) (Lawlor, 2002; Soares-Cordeiro *et al.*, 2009).

Las plantas de maíz, los híbridos MT41 y MT51 y *T. dactyloides* crecieron en condiciones ambientales que no favorecían la transpiración, *i.e.* intensidad de luz baja (DFFF de 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), aire calmado y HR  $\cong$  85 %. Líneas de maíz cultivadas en invernadero y expuestas 13 días a estrés salino (5 días a 50 mM, 3 días a 100 mM y 5 días a 150 mM de NaCl) mostraron valores similares del CRA a los observados para la línea B73, los híbridos MT41 y MT51 y *T. dactyloides*, con una disminución máxima del CRA foliar del 99 % al 93 % con respecto al control y del  $\psi_a$  de -0,99 MPa a -1,43 MPa (Saneoka *et al.*, 1995). Plantas de maíz cultivadas en invernadero, con una temperatura promedio de 20°C y una HR promedio de aproximadamente 60 %, muestran valores del CRA que fluctúan entre el 85 % y el 93 % en la cuarta hoja, tanto en plantas salinizadas como en los controles (Hu *et al.*, 2007), probablemente debido a una mayor transpiración.

A partir de la comparación entre genotipos que diferían en la tolerancia a la salinidad, Saneoka *et al.* (1995) observan que la reducción del CRA y del crecimiento es menor en una línea de maíz que contiene glicinabetaina (más tolerante) comparada con líneas casi isogénicas carentes de glicinabetaina (menos tolerante). Sin embargo, las líneas no muestran diferencias significativas en el potencial hídrico, potencial osmótico ni el potencial de presión dentro de cada tratamiento. Los resultados mencionados muestran que, en diversas especies, el potencial de presión de las hojas no cambia por efecto de la salinidad, aunque el CRA disminuye, con respecto a los controles no salinizados.

Boyer *et al.* (2008) observan reducciones hasta del 15 % en el CRA sin cambios en el potencial de presión en plantas salinizadas de trigo y cebada. Estos autores atribuyen la contradicción aparente de los resultados obtenidos a un exceso en la absorción de agua por parte de las

células, lo cual produce un peso turgente excesivamente alto en los tejidos que tienen una concentración de solutos alta (ajuste osmótico). Esto puede llevar a estimaciones del CRA entre 10 % y 15 % inferiores a las reales.

Si bien los genotipos evaluados en este trabajo muestran reducciones significativas del CRA por efecto de la salinidad, el valor mínimo de CRA observado es de 93 % (14 días después del comienzo del tratamiento de salinidad). No se observó el marchitamiento de las hojas durante los experimentos y se produjo gutación (expresión de un potencial de presión positivo en el xilema) en todas las plantas tras el recambio de las soluciones nutritivas, ya sea en presencia o no de NaCl 101 mM. Las plantas cultivadas con 101 mM de NaCl muestran disminuciones del CRA que no superan el 4,3 % (híbrido MT51), con respecto a las plantas no salinizadas. Por lo tanto, las disminuciones del CRA producidas en las plantas salinizadas están más probablemente relacionadas con un incremento en la concentración de solutos generado por el mecanismo de ajuste osmótico que con una disminución del potencial de presión del tejido foliar.

La salinidad afecta negativamente a la absorción de agua por las plantas debido a una disminución del potencial osmótico de la solución de cultivo, pero también por una disminución de la permeabilidad de las células de la raíz (Azaizeh y Steudle, 1991; Azaizeh *et al.*, 1992; Bastías *et al.*, 2004a). Al menos en el corto plazo (minutos a horas) después de la salinización, tanto la disminución de la permeabilidad de la raíz (Wan, 2010) como la disminución del crecimiento foliar (Passioura y Munns, 2000; Munns *et al.*, 2000a) estarían causadas por un efecto osmótico y no iónico. Sin embargo, varios autores han observado que la salinidad no afecta el potencial de presión de las hojas en especies con distintos niveles de tolerancia, por ejemplo en trigo, cebada (Boyer *et al.*, 2008) y maíz (Cramer, 1992a; Erdei y Taleisnik, 1993; De Costa *et al.*, 2007), aunque las plantas muestren una reducción del crecimiento foliar. En el maíz, por

ejemplo, tras una breve caída inicial, el potencial de presión del tejido foliar en crecimiento se mantuvo constante en plantas expuestas a 75 mM de NaCl durante 24 horas debido a una disminución equivalente en los potenciales hídrico y osmótico (Cramer, 1992a). Posteriormente se observó el aumento del umbral de turgencia de la pared y la disminución de la permeabilidad de la membrana (Cramer, 1992a; Cramer, 2003), cambios que tienden a reducir la expansión celular. En el maíz, la reducción del crecimiento foliar sin cambios (o con cambios mínimos) en la presión de turgencia, se ha asociado con el ajuste osmótico (Cramer, 1992a; Erdei y Taleisnik, 1993; De Costa *et al.*, 2007), cambios en las propiedades viscoelásticas de la pared celular (Erdei y Taleisnik, 1993), señales hormonales (De Costa *et al.*, 2007; Gunes *et al.*, 2007; Tuna *et al.*, 2008), cambios en el pH apoplástico (Zörb *et al.*, 2005; Pitann *et al.* 2009) y otras señales (Rodríguez *et al.*, 2004). Respuestas a la salinidad tales como cambios en las propiedades viscoelásticas de la pared celular (Cramer y Bowman 1991a; Cramer, 1992a,b; Cramer y Bowman 1994; Taleisnik *et al.*, 2009), reducción de la expresión de la  $\beta$ -expansina (Geilfus *et al.*, 2010), y señales hormonales, principalmente el nivel de ABA de las hojas (Cramer *et al.*, 1998; Cramer y Quarrie, 2002; De Costa *et al.*, 2007) se encuentran involucradas en la inhibición del crecimiento foliar y, en algunos casos, han explicado las diferencias entre genotipos que diferían en la respuesta al estrés salino.

Para determinar los efectos de la salinidad sobre las relaciones hídricas del maíz, *T. dactyloides* y los híbridos entre ambas especies se requiere más investigación. Por ejemplo, la determinación del potencial hídrico y sus componentes, la determinación del CRA mediante una metodología que evite los artefactos causados por el ajuste osmótico y la aplicación de ABA exógeno o, a la inversa, la inhibición de la síntesis de ABA mediante la aplicación de fluoridone, podrían ayudar a detectar

posibles diferencias en los efectos de la salinidad sobre las relaciones hídricas entre estos genotipos y los mecanismos involucrados.

### **Integridad de las membranas celulares**

El maíz muestra un porcentaje de pérdida de electrolitos foliares (PPE<sub>f</sub>) menor que los híbridos MT41 y MT51 y *T. dactyloides* (Figura 37, Tabla 20). La salinidad no induce el incremento de los valores del PPE<sub>f</sub> en ninguno de los genotipos evaluados. Solamente en el maíz, el PPE<sub>f</sub> aumenta en respuesta a la combinación de salinidad y alcalinidad (101 mM de NaCl y pH 8,5). Estos resultados concuerdan con los de Bastías *et al.* (2004), que no observan cambios en la permeabilidad de la membrana de plantas de maíz expuestas a 100 mM, con respecto a plantas no salinizadas. En cambio, otros autores observan un aumento en la pérdida de electrolitos a partir del tejido foliar y radicular inducido por la salinidad en especies tales como arroz (Lutts *et al.*, 1996) y maíz (Gunes *et al.*, 2007), entre otras. En algunos genotipos de trigo tetraploide, un mayor nivel de daño foliar inducido por la sal se relaciona con una mayor reducción de la biomasa (James *et al.*, 2002).

En diversas especies, el incremento en la permeabilidad de la membrana está asociado a un aumento de indicadores de estrés oxidativo (Bolu y Polle, 2004; Valentovič *et al.*, 2006; Gunes *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2007) y la actividad de enzimas antioxidantes como ascorbato peroxidasa, catalasa o glutatión peroxidasa (Singh *et al.*, 2007; Sandhya *et al.*, 2010). Por lo tanto, el mantenimiento de la integridad de la membrana en los genotipos evaluados ante el estrés salino sugiere que éste no causó daño oxidativo en el tejido foliar. En cambio, la combinación de salinidad y alcalinidad puede haber generado este tipo de daño en el tejido foliar del maíz, pero no en la raíz.

## Contenido de pigmentos foliares

El contenido de clorofila a, b y carotenoides no varía entre el maíz y los híbridos MT41 y MT51. Por otra parte, en las plantas control, los contenidos de clorofila a y b de *T. dactyloides* son 43 % y 42 % menores que los de maíz, respectivamente. El contenido de carotenoides es similar para todos los genotipos (Figuras 22 y 38). La salinidad induce una disminución en el contenido de clorofila total en el maíz (25 % y 37 % en los experimentos 1 y 2, respectivamente), *T. dactyloides* (20 %) y los híbridos MT41 (7 %) y MT51 (27 %), con respecto a los controles. Los contenidos de clorofila total también se reducen en respuesta a la alcalinidad y a la combinación de alcalinidad y salinidad en maíz (21 % y 36 %, respectivamente) y *T. dactyloides* (9 % en ambos tratamientos). La relación Cla/Clb fluctúa en el rango de 2 a 2,7 y no difiere entre los genotipos ni entre los niveles de salinidad y alcalinidad. La disminución de la concentración foliar de clorofila es una respuesta comúnmente inducida por la salinidad en el maíz (Lohaus *et al.*, 2000; Cha-um y Kirdmanee, 2009; Turan *et al.*, 2009) y otras especies cultivadas (Lutts *et al.*, 1996). Sin embargo, Lohaus *et al.* (2000) muestran que 8 días de exposición a 100 mM de NaCl no induce la reducción del contenido de clorofila de la tercera y cuarta hojas en plantas de maíz, aunque sí se reduce un 38 % la tasa de transpiración, con relación al control. En el maíz, la disminución en la concentración total de clorofila inducida por NaCl se relacionó con menores tasas de asimilación de CO<sub>2</sub> y transpiración (Lohaus *et al.*, 2000) y menor rendimiento cuántico máximo del PSII y tasa de asimilación neta de CO<sub>2</sub> (Cha-um y Kirdmanee, 2009). Sin embargo, la degradación de la clorofila no fue un parámetro útil para explicar las diferencias en el nivel de tolerancia a la salinidad en el maíz (Cha-um y Kirdmanee, 2009), a diferencia de lo que ocurre en otras especies tales como arroz (Lutts *et al.*, 1996) y trigo (Argenteal *et al.*, 2006). Pérdidas de hasta el 40 % de los



niveles de clorofila del control fueron insuficientes para afectar las tasas de fotosíntesis en plantas sometidas a un estrés hídrico (Sánchez *et al.*, 1983). En un cultivar sensible de trigo cultivado durante 4 semanas en 150 mM de NaCl, la reducción en la fijación de CO<sub>2</sub> se produjo primero por una disminución de la conductividad estomática y, posteriormente, por limitaciones no estomáticas. Mediciones de la fluorescencia de la clorofila muestran que, a medida que las hojas envejecen, el rendimiento cuántico actual y potencial del proceso fotoquímico del PSII comienza a declinar y la disipación térmica del exceso de energía aumenta, lo cual coincide con concentraciones foliares de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> superiores a 250 mM en la hoja y la degradación de la clorofila. Los parámetros de fluorescencia, por ejemplo la relación  $F_v/F_m$ , disminuyen sólo cuando el contenido de la clorofila se reduce (James *et al.*, 2002).

Los niveles de reducción de la clorofila total de *T. dactyloides* y maíz son similares (20 % y 25 %, respectivamente), pero la concentración foliar de Na<sup>+</sup> (en mM de Na<sup>+</sup> g<sup>-1</sup> agua del tejido) del maíz es superior a la de *T. dactyloides* (114 y 73, respectivamente). Sin embargo, en los genotipos evaluados se desconoce la distribución del Na<sup>+</sup> entre los distintos órganos aéreos y a nivel intracelular. En este contexto, se requiere más estudio para saber si la reducción del contenido de clorofila total causada por la salinidad en el maíz, los híbridos y *T. dactyloides* se asocia con limitaciones no estomáticas de la fotosíntesis y con el nivel citoplasmático de Na<sup>+</sup>.

### **Efecto del tampón Tris**

La solución nutritiva que contiene 5 mmol L<sup>-1</sup> de Tris muestra un valor de pH de 8,5 a 8,6 en el momento de la preparación. A los dos días se mide un pH = 8, valor que se mantiene constante hasta los 4 días después de la preparación. La evolución del pH es similar para ambos

niveles de NaCl, 1 mM ó 101 mM. Cuando el pH = 8,5 se logra mediante el agregado de KOH, la acidificación es más pronunciada, la solución nutritiva muestra un pH  $\cong$  7,4 a los dos días de la preparación (Figura 12). Las plantas de *T. dactyloides* y maíz que crecieron en la solución nutritiva que contenía 5 mmol L<sup>-1</sup> de Tris (pH = 5,8 ajustado con ácido nítrico) no muestran reducción del crecimiento ni modificación de la mayoría de los parámetros evaluados, con relación a las plantas cultivadas en la misma solución pero sin Tris (Tablas 11 y 12). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Singh *et al.* (2002) para 3 cultivares de arroz. Estos autores evaluaron el crecimiento de las plantas durante 8 días en soluciones nutritivas que contenían 2,5 a 10 mM de Tris y el pH neutralizado (pH 7) con ácido nítrico (1 N) y no observaron diferencias en el crecimiento con respecto al control ni síntomas de deficiencia o toxicidad, incluso tras 8 días en 10 mM de Tris. Por lo tanto, el agregado de Tris a las soluciones nutritivas resulta útil para evaluar la respuesta de *T. dactyloides* y maíz a la alcalinidad, ya que estabiliza el pH con un efecto mínimo sobre la fisiología de la planta.

### **Acidificación de la solución nutritiva**

La presencia de plantas, tanto de maíz como de *T. dactyloides*, induce una acidificación más marcada de la solución nutritiva en todos los tratamientos, a pesar de la presencia del tampón Tris. Dos días después del recambio, las soluciones con pH inicial 5,8 y 8,5 muestran una acidificación (promedio  $\pm$  EEM, en unidades de pH) de 0,7 y 0,9, respectivamente, en presencia de plantas, y de 0,01 y 0,47, respectivamente, en ausencia de plantas (Figuras 13 y 14). Ni el nivel de NaCl ni la especie afectan las variaciones en los valores del pH (Figuras 13 y 14). Ambas especies, *T. dactyloides* y maíz, acidifican el medio de manera similar (0,78 y 0,85 unidades de pH, respectivamente), a pesar de

que la masa de la raíz del maíz es  $\cong 5$  veces mayor que la de *T. dactyloides* (promedio de todos los tratamientos en mg de PS planta<sup>-1</sup>: 0,442 vs. 0,095, respectivamente). Estos resultados sugieren una mayor eficiencia en la extrusión neta de H<sup>+</sup> desde la raíz en *T. dactyloides* que en el maíz. Singh *et al.* (2002) también observaron que la presencia de plantas (en este caso, de arroz) induce la disminución del pH hacia la neutralidad en soluciones nutritivas que contienen 2 mM a 5 mM de Tris, en contraste a las soluciones sin plantas, las cuales no muestran modificaciones del pH en el transcurso de 4 días. Según estos autores, a menor concentración de Tris y mayor edad de las plantas más rápida es la caída del pH, lo cual atribuyen a una extrusión neta de H<sup>+</sup> desde las raíces.

Ni el pH inicial de la solución nutritiva ni la presencia de NaCl afectan significativamente el grado de acidificación inducido por las plantas de maíz y *T. dactyloides* (Figura 14). Estos resultados concuerdan con estudios *in vivo* que muestran que la salinidad no afecta la tasa de acidificación superficial de raíces de maíz (Zidan *et al.*, 1990). Mengel y Schubert (1985) mostraron que raíces de maíz intactas acidifican el agua destilada, que la liberación de H<sup>+</sup> se relaciona con la actividad de la P-H<sup>+</sup>-ATPasa y que el agregado de concentraciones bajas (3 mM) de cloruros de los cationes K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> incrementa 4; 1,6; 2 y 2,6 veces la liberación de H<sup>+</sup> por las raíces, en comparación con los H<sup>+</sup> liberados en el agua desionizada. Resultados más recientes señalan que la actividad de la ATPasa se relaciona directamente con la cantidad de la proteína ATPasa y con la concentración del Na<sup>+</sup> en las raíces, parámetros que se ven incrementados en plantas de maíz tratadas con NaCl y H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> + NaCl, en comparación con plantas sin tratar o tratadas solamente con H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (Martinez-Ballesta *et al.*, 2008). También se ha demostrado que las H<sup>+</sup>-ATPasas de las raíces del maíz responden a cambios en presencia de otros factores ambientales. Por ejemplo, factores tales como un estrés osmótico (Ober y Sharp, 2003), NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Santi *et al.*, 1995, Pouliquin *et al.*,

2000) y ácidos húmicos aislados del lombricompost (Canellas *et al.*, 2002) estimulan la actividad de estas proteínas. Por otro lado, Spickett *et al.* (1993) observaron que la aplicación de vanadato de sodio, un inhibidor de la H<sup>+</sup>-ATPasa del plasmalemma, estimula el influjo neto de Na<sup>+</sup> en ápices de raíces de maíz. Los autores interpretan estos resultados como una disminución del eflujo activo de Na<sup>+</sup> del tejido, ya que se sabe que el eflujo de Na<sup>+</sup> de la célula está mediado por un antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, y la energía que mueve la salida del Na<sup>+</sup> del citoplasma hacia el apoplasto es el gradiente de pH generado por la H<sup>+</sup>-ATPasa del plasmalemma. Estudios realizados con otras especies muestran que la salinidad puede afectar, de manera positiva o negativa, la actividad de las bombas de protones de las membranas.

Varias especies halófitas muestran un incremento substancial en la actividad o en la expresión del gen de la H<sup>+</sup>-ATPasas del plasmalema (PM-ATPasa) o del tonoplasto (V-ATPasa) en respuesta a la salinidad por NaCl. Por ejemplo, la salinidad incrementa la acumulación del RNAm de la P-H<sup>+</sup>-ATPasa en la raíz y hojas expandidas *Atriplex nummularia* (Niu *et al.*, 1993), de la P- y V-H<sup>+</sup>-ATPasa en tallos de *Salicornia*, incrementa la actividad de la V-H<sup>+</sup>-ATPasa en hojas de *Mesembryanthemum crystallinum* (Barkla *et al.*, 1999) y reduce la actividad de la Mg<sup>+2</sup>-H<sup>+</sup>-ATPasa en raíces de tomate (Gronwald *et al.*, 1990). También se han observado diferencias en la modulación de la actividad de las H<sup>+</sup>-ATPasas por NaCl comparando líneas celulares de la misma especie, *Solanum tuberosum*, con niveles contrastantes de tolerancia a la salinidad (Queirós *et al.*, 2009). Los resultados muestran que la actividad de transporte de H<sup>+</sup> dependiente tanto de ATP como de PP<sub>i</sub> es 2 a 3 veces superior en vesículas del tonoplasto de una línea celular tolerante que en el control. Estos autores también observaron que la presencia del Na<sup>+</sup> induce la disipación del gradiente de pH transmembrana a través de un sistema antiporte Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> y que en la línea celular adaptada a la salinidad la afinidad por el Na<sup>+</sup> aumenta

levemente ( $K_m = 40$  mM) con respecto a la línea control ( $K_m = 69$  mM) y la  $V_{max}$  del eflujo de protones es dos veces superior.

Dentro de este contexto teórico, el grado similar de acidificación que muestran las soluciones en contacto con las raíces en todos los tratamientos, sugiere que ni la alcalinidad ni la salinidad por NaCl inhiben la actividad de las  $H^+$ -ATPasas del plasmalema de las células de la raíz en las especies estudiadas. Por el contrario, dado que es esperable que la presencia de  $Na^+$  incremente la actividad de los transportadores  $H^+/Na^+$  de las membranas, lo cual a su vez disipa el gradiente de pH entre el apoplasto y el interior de la célula, una acidificación similar de la solución en contacto con las raíces podría indicar una mayor actividad de las  $H^+$ -ATPs inducida por el NaCl.

### **Contenido de iones inorgánicos ( $Na^+$ , $K^+$ y $Ca^+$ )**

De acuerdo al modelo bifásico del estrés salino propuesto por primera vez por Munns (1993), la salinidad provoca disminuciones del crecimiento vegetativo exclusivamente por un estrés hídrico durante la primera fase. Durante esta primera fase, que puede durar desde pocos días a semanas, los genotipos con diferentes niveles de tolerancia a la salinidad responden de la misma manera. Sin embargo, resultados recientes obtenidos en maíz muestran que, dentro de la primer semana de la imposición de un estrés salino moderado, aunque prevelece el efecto osmótico, puede detectarse un efecto iónico complementario y que el  $Na^+$  es el ion específico relacionado con la reducción del crecimiento durante la primera fase del estrés salino (Sümer *et al.*, 2004).

La acumulación de  $Na^+$  en la parte aérea (Cramer, 1992a; Fortmeier y Schubert, 1995; Goudarzi y Pakniyat, 2008; Schubert *et al.*, 2009) muestra una variación intraespecífica considerable en el maíz y otros cereales, por ejemplo trigo duro (Munns *et al.*, 2000b) y arroz (Yeo y

Flowers, 1983). Sümer *et al.* (2004) observaron contenidos de  $\text{Na}^+$  de  $\cong 0,7$   $\text{mmol g}^{-1}$  de PS en plantas de maíz (cv. Pioneer 3906) cultivadas 6 días en 100 mM NaCl. A los 15 días de tratamiento con NaCl 100 mM (aplicado con incrementos diarios de 10 mM de NaCl), los híbridos Across 8023 (acumulador) y Pioneer 3906 (excluidor) muestran contenidos foliares de  $\text{Na}^+$  ( $\text{mmol g}^{-1}$  PS) de  $\cong 1,3$  y  $0,8$ ; respectivamente (Fortmeier y Schubert, 1995). Azevedo Neto *et al.* (2004), a partir del estudio de la respuesta de 8 genotipos de maíz expuestos a 100 mM de NaCl durante 15 días (aplicado a razón de  $25 \text{ mmol L}^{-1}$  por día), observan contenidos foliares de  $\text{Na}^+$  desde  $\cong 0,6$  a  $1,4 \text{ mmol g}^{-1}$  de PS.

Los resultados de nuestro estudio se obtuvieron a partir plantas sometidas a un estrés salino moderado (101 mM de NaCl) durante un periodo relativamente corto de tiempo (i.e., 14 días en el maíz y generaciones avanzadas de un híbrido de maíz x *T. dactyloides* y 24 días en *T. dactyloides*) en un estadio vegetativo temprano. En presencia de 101 mM NaCl, el contenido foliar de  $\text{Na}^+$  (media  $\pm$  EEM, en  $\text{mmol g}^{-1}$  PS) es similar para las plantas del maíz (línea B73) y los híbridos MT41 y MT51 ( $0,74 \pm 0,07$ ;  $0,78 \pm 0,02$  y  $0,82 \pm 0,11$ ; respectivamente). En este contexto, tanto la línea de maíz B73 como los híbridos de maíz x *T. dactyloides* podrían considerarse como excluidores de  $\text{Na}^+$ , en comparación con los valores informados para los genotipos de maíz mencionados. A su vez, bajo un estrés salino moderado (101 mM de NaCl, tanto con un pH 5,8 como 8,5), el contenido foliar de  $\text{Na}^+$  ( $\text{mmol g}^{-1}$  PS) de las plantas de *T. dactyloides* ( $0,2 \pm 0,02$  y  $0,21 \pm 0,004$ , respectivamente) es  $\cong 3,5$  veces menor al de la línea B73 de maíz ( $0,75 \pm 0,06$  y  $0,7 \pm 0,05$ , respectivamente). La diferencia observada en el contenido foliar de  $\text{Na}^+$  de *T. dactyloides* con respecto al maíz puede explicarse por una menor absorción de  $\text{Na}^+$  por la raíz (en  $\text{mmol Na}^+$  total en la planta/g PS raíz: 1,39

vs. 3,1, respectivamente) y menor translocación de  $\text{Na}^+$  hacia la parte aérea ( $\text{Na}^+$  en el tallo/ $\text{Na}^+$  en la raíz: 0,31 vs. 0,73, respectivamente).

En ausencia de salinidad, el híbrido F1 de maíz x *T. dactyloides* (del cual derivan los híbridos MT41 y MT51) y *T. dactyloides* muestran contenidos foliares (media, en  $\text{mmol kg}^{-1}$  de PS) de  $\text{K}^+$  de 0,8 (Pesqueira *et al.*, 2006), mientras que en el maíz y los híbridos MT41 y MT51 se observan valores levemente superiores (1,3; 1,2 y 1,2; respectivamente). El contenido de  $\text{Na}^+$  (media, en  $\text{mmol kg}^{-1}$  de PS) del híbrido F1 es levemente superior (0,13) al observado en resto de los genotipos mencionados (0,03 a 0,05) y el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  es intermedio (0,094) entre el del maíz (0,12) y *T. dactyloides* (0,04). Si bien el contenido de  $\text{Na}^+$  del híbrido F1 es entre 4,6 y 2,5 veces superior al observado en el resto de los genotipos, hay que considerar que las condiciones de cultivo del híbrido F1 (bajo invernadero, en un suelo argiudol y riego con agua corriente, Pesqueira *et al.*, 2006) y de los genotipos evaluados en este estudio (hidroponía en cámara de cultivo) difieren. Luego de 20 días de riego con una solución con 250 mM de NaCl, el híbrido F1 no muestra diferencias en los contenidos foliares (media, en  $\text{mmol kg}^{-1}$  de PS) de  $\text{K}^+$  (0,8 vs. 0,79; respectivamente) ni de  $\text{Ca}^{2+}$  (0,094 vs. 0,092; respectivamente), con respecto a los controles y el contenido foliar de  $\text{Na}^+$  aumenta solamente 2,5 veces (de 0,13 a 0,33) con respecto al de las plantas no expuestas a la salinidad (Pesqueira *et al.*, 2006). En cambio, los datos del presente estudio muestran que la salinidad indujo la disminución del contenido de  $\text{K}^+$  del maíz (línea B73), de los híbridos MT41 y MT51 y de *T. dactyloides*, con respecto a los controles (Figuras 23 y 39). No se observan efectos de la salinidad sobre el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  de *T. dactyloides* ni de los híbridos MT41 y MT51, pero para el maíz los datos no son consistentes entre los dos experimentos realizados. Por efecto de la salinidad, todos los genotipos evaluados en este trabajo muestran un aumento más marcado en el contenido foliar de  $\text{Na}^+$  que el híbrido F1 de maíz x *T. dactyloides*. El

incremento en el contenido de Na<sup>+</sup> de las plantas expuestas a 101 mM de NaCl está en un rango desde 6,7 veces para *T. dactyloides* hasta  $\cong$ 15 veces para los híbridos MT41 y MT51 y el maíz en el experimento 2 y 25 veces para el maíz en el experimento 1.

Híbridos de maíz cultivados 15 días en 150 mM de NaCl muestran rangos de absorción de Na<sup>+</sup> (en mmol de Na<sup>+</sup>/g de PS de raíz) de 3,4 a 2,2 y de translocación de Na<sup>+</sup> hacia el tallo (Na<sup>+</sup> en el tallo/Na<sup>+</sup> en la raíz) de 0,9 a 0,4, en los genotipos que exhiben la menor y mayor tolerancia al estrés salino, respectivamente (Schubert *et al.*, 2009). La línea de maíz B73 muestra valores de absorción similares a los híbridos de maíz considerados como menos tolerantes según Schubert *et al.* (2009), pero los valores de translocación hacia el tallo son levemente menores (Figura 26) que los de los híbridos más tolerantes. En cambio, *T. dactyloides* muestra valores más bajos en ambos parámetros (Figura 26), aún comparado con los híbridos de maíz más tolerantes según Schubert *et al.* (2009).

Tanto en las plantas cultivadas con bajo como con alto nivel de NaCl en la solución de cultivo, el contenido de agua por unidad de PS foliar (g de agua g<sup>-1</sup> de PS foliar, media  $\pm$  EEM) del maíz (7,53  $\pm$  0,22 y 6,5  $\pm$  0,3; respectivamente) es  $\cong$ 2 veces mayor que el de *T. dactyloides* (4,46  $\pm$  0,16 y 2,96  $\pm$  0,12, respectivamente). De todas maneras, si todo el Na<sup>+</sup> en el tejido estuviera en solución y uniformemente distribuido, las plantas de maíz salinizadas (cultivadas con pH 5,8 ó 8,5) mostrarían una concentración foliar de Na<sup>+</sup> (sobre la base del contenido de agua) 1,6 veces mayor que las de *T. dactyloides* cultivadas en iguales condiciones (Tabla 22).

Diversos estudios han evaluado el efecto del contenido foliar de Na<sup>+</sup> sobre la respuesta de diferentes parámetros fisiológicos en las plantas, por ejemplo el contenido de clorofila (Yeo y Flowers, 1983; Hussain *et al.*,



2003; James *et al.*, 2002), la integridad de la membrana celular (James *et al.*, 2002), el crecimiento vegetativo (Hussain *et al.*, 2003), la conductividad estomática, la asimilación de CO<sub>2</sub> y la eficiencia del fotoquímica del PSII (James *et al.*, 2002); el rendimiento en grano (Sümer *et al.*, 2004); etc. Los resultados obtenidos muestran distintos grados de asociación entre el contenido foliar de Na<sup>+</sup> y la tolerancia a la salinidad entre especies diferentes o entre distintos genotipos de una misma especie. Entre las especies que muestran una mayor correlación entre la exclusión de Na<sup>+</sup> y la tolerancia a la salinidad se encuentran, por ejemplo, *Triticum turgidum* (Munns y James, 2003), *Triticum aestivum* (Poustini y Siosemardeh, 2004) y *Oryza sativa* (Zhu *et al.*, 2004). Sin embargo, aún en estas especies, la exclusión de Na<sup>+</sup> no es el único mecanismo responsable de la variación en la tolerancia a la salinidad. En el arroz, por ejemplo, se observa un gradiente de respuestas en el contenido de clorofila a partir de genotipos que difieren en la concentración foliar de Na<sup>+</sup>, lo cual indicaría que los genotipos difieren en el nivel de resistencia del tejido foliar al NaCl (Yeo y Flowers, 1983). En otras especies, como por ejemplo el trigo, si bien la tolerancia a la salinidad se ha asociado con bajas tasas de transporte del Na<sup>+</sup> a la parte aérea y una alta selectividad por el K<sup>+</sup> sobre el Na<sup>+</sup> (Gorham *et al.*, 1987, 1990; Ashraf y Khanum, 1997), esta relación no se mantiene para todos los genotipos evaluados (Ashraf y McNeilly, 1988; El-Hendawy *et al.*, 2005), lo cual muestra que debe haber otro mecanismo involucrado en la tolerancia a la salinidad. La cebada, por ejemplo, (especie tolerante) presenta una concentración foliar de Na<sup>+</sup> mayor y de K<sup>+</sup> menor que el trigo (moderadamente tolerante) (Munns *et al.*, 2006).

Azevedo Neto *et al.* (2004) observaron que concentraciones foliares bajas de Na<sup>+</sup> no se asocian con una mayor tolerancia a la salinidad en el maíz. En ese estudio, el genotipo más sensible y el más tolerante muestran contenidos foliares de Na<sup>+</sup> similares, cuyos promedios son (mM g<sup>-1</sup> de PS foliar)  $\cong 1,25$  y 1,1, respectivamente (Azevedo Neto *et al.*, 2004).

Sin embargo, Fortmeier y Schubert (1995) observaron toxicidad por acumulación de  $\text{Na}^+$  a partir de la comparación de un cultivar fuertemente excluidor de  $\text{Na}^+$  (Pioneer 3906) con un cultivar acumulador de  $\text{Na}^+$  (Across 8026). Además, Schubert *et al.* (2009) obtuvieron híbridos de maíz con una reducción por un factor de casi 2 tanto en la absorción como en la translocación de  $\text{Na}^+$  desde la raíz al tallo con respecto al híbrido Pioneer 3906. Conviene resaltar que en los mencionados híbridos no se observa toxicidad por  $\text{Na}^+$  aún cuando se cultivaron con un contenido de  $\text{NaCl}$  equivalente de  $10 \text{ dS m}^{-1}$  en el suelo.

El estrés salino induce reducciones similares en los contenidos foliares de  $\text{K}^+$  del maíz (línea B73) y los híbridos MT41 y MT51 (15 %, 10 % y 16 %, respectivamente) pero no modifica el contenido foliar de  $\text{Ca}^{2+}$ , con respecto a las plantas control. El contenido de  $\text{K}^+$  y la relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  no difirieron entre genotipos. Los contenidos foliares de  $\text{K}^+$  de maíz y *T. dactyloides* también muestran reducciones similares en respuesta al estrés salino (35% y 41 %, respectivamente). Según Sümer *et al.* (2004), la variación en el nivel foliar de  $\text{K}^+$  por encima de un nivel crítico ( $0,77 \text{ mmol de K}^+ \text{ g}^{-1}$  de PS, valor establecido por Bergmann 1992) no está involucrada en la reducción del crecimiento, sino que el  $\text{Na}^+$  induce efectos tóxicos que reducen el crecimiento de plantas de maíz en la primera fase del estrés salino. Tanto en *T. dactyloides* como en la línea B73 de maíz, la salinidad reduce el nivel de  $\text{K}^+$  por debajo de los  $0,77 \text{ mmol de K}^+ \text{ g}^{-1}$  de PS (Figura 23), lo cual podría explicar, al menos parcialmente, los efectos de la salinidad sobre el crecimiento. Sin embargo, la alcalinidad produce reducciones similares o mayores (en *T. dactyloides* y maíz, respectivamente) del crecimiento aéreo pero no modifica los niveles de  $\text{K}^+$  con respecto al control (Figura 23 y Tabla 15).

Los híbridos MT41 y MT51 muestran una relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  similar a la del maíz, tanto en las plantas sometidas a estrés salino como en las control (Figura 41). Con un bajo nivel de  $\text{NaCl}$  en la solución nutritiva

(1mM), los valores de la relación  $K^+/Na^+$  de *T. dactyloides* son menores a los del maíz y los híbridos MT41 y MT51 (Figuras 25 y 41). A su vez, la relación  $K^+/Na^+$  del híbrido F1 de maíz x *T. dactyloides* es menor que la de *T. dactyloides* (6,15 vs. 25, respectivamente). Sin embargo, en condiciones de estrés salino, las plantas de *T. dactyloides* y el híbrido F1 de maíz x *T. dactyloides* muestran la misma relación  $K^+/Na^+$  (2,4) (Pesqueira *et al.*, 2006). Esto significa que la salinidad induce una reducción en la relación  $K^+/Na^+$  de 9 veces en *T. dactyloides* y de sólo 2,6 veces del híbrido F1, con respecto a los controles. En cambio, la salinidad induce reducciones más marcadas en los valores de la relación  $K^+/Na^+$  del maíz y los híbridos MT41 y MT51, con respecto a los controles (19, 21 y 16 veces, respectivamente). Las disminuciones de los contenidos de  $K^+$  inducidas por la salinidad, con respecto a los controles no salinizados, son similares en el maíz, los híbridos MT41 y MT51 y *T. dactyloides*. Por lo tanto, el mayor efecto producido por una salinidad moderada (101 mM de NaCl) sobre la relación  $K^+/Na^+$  del maíz con respecto a la de *T. dactyloides* (Figura 25) puede explicarse por una menor absorción de  $Na^+$  por la raíz (en mmol  $Na^+$  total en la planta/g PS raíz: 1,39 vs. 3,1, respectivamente) y menor translocación de  $Na^+$  hacia la parte aérea ( $Na^+$  en el tallo/ $Na^+$  en la raíz: 0,31 vs. 0,73, respectivamente). En el híbrido F1, en cambio, el menor efecto de la salinidad sobre la relación  $K^+/Na^+$  puede explicarse tanto por un menor incremento del contenido foliar de  $Na^+$  como por el hecho de que el contenido foliar de  $K^+$  no se modifica, con respecto a los controles. La relación  $Ca^{2+}/Na^+$  del híbrido F1 también muestra una disminución menos marcada (2,3 veces, Pesqueira *et al.*, 2006) que la de *T. dactyloides* (9 veces) por efecto de la salinidad. A su vez, la disminución de la relación  $Ca^{2+}/Na^+$  inducida por la salinidad, con respecto a los controles, es menor para *T. dactyloides* (9 veces) que para el maíz y los híbridos MT41 y MT51 (20, 16 y 22 veces, respectivamente).

El maíz también presenta variación intraespecífica en la discriminación  $K^+/Na^+$  (Goudarzi y Pakniyat, 2008) y  $Ca^{2+}/Na^+$  (Cramer, 1992a). La capacidad de mantener relaciones foliares  $K^+/Na^+$  y  $Ca^{2+}/Na^+$  relativamente altas en condiciones de salinidad también se ha asociado a una mayor tolerancia al estrés salino en el maíz (Çiçek y Çakırlar, 2002; Cramer, 2002; Eker *et al.*, 2006; Goudarzi y Pakniyat, 2008) y otras especies (Tester y Davenport, 2003; Colmer *et al.*, 2006; Shabala *et al.*, 2005).

Aunque los parámetros iónicos de *T. dactyloides* parecen más favorables que los del maíz con relación a una posible tolerancia a la salinidad, *T. dactyloides* mostró más sensibilidad que el maíz al estrés salino. La salinidad (101 mM NaCl-pH 5,8) produjo menor reducción del crecimiento de la parte aérea en el maíz que en *T. dactyloides* (28 % vs. 51 %, respectivamente). Los otros parámetros fisiológicos evaluados se vieron afectados de forma similar en ambas especies por la salinidad (CRA, MFE,  $PPE_f$  y  $PPE_r$  y contenido de clorofila total). Estos resultados sugieren una mayor capacidad de compartimentación del  $Na^+$  a nivel de las hojas en el maíz que en *T. dactyloides*.

Desde la década de los 70 se conoce que las enzimas citoplásmicas de las plantas superiores, ya sea halófitas o glicófitas, en general son sensibles a la salinidad *in vitro* (Flowers *et al.*, 1977, entre otros). Más aún, numerosas enzimas citoplásmicas muestran un patrón similar de sensibilidad a la salinidad *in vitro*, ya sea que se extraigan de una especie tolerante o una sensible a la salinidad (Greenway y Osmond 1972). Por otro lado, si bien las enzimas apoplásticas son más tolerantes a la salinidad que las citoplásmicas, esta no es una adaptación específica de las halófitas. Las enzimas correspondientes, extraídas de una especie halófitas, una no halófitas y una glicófitas, han mostrado una tolerancia sustancial y, en algunos casos, equivalente a la salinidad *in vitro* (Thiyagarajah *et al.*, 1996). Generalmente, el  $Na^+$  inhibe fuertemente la

mayoría de las enzimas con concentraciones mayores a 100 mM (datos revisados por Munns *et al.*, 1983). Esta última observación, sumada al hecho de que el comportamiento *in vitro* de las enzimas citoplásmicas de plantas superiores halófitas son tan sensibles como las correspondientes enzimas de las glicófitas, significa que las enzimas de ambos grupos se inhibirían fuertemente a la concentración tisular promedio de las halófitas. A partir de estas observaciones surge el concepto de la compartimentación celular del Na<sup>+</sup> como mecanismo de resistencia a la salinidad a nivel del tejido. En la actualidad, ya se han identificado y caracterizado desde el punto de vista funcional y genético numerosas proteínas de membrana que actúan como antiportadores de Na<sup>+</sup>, tanto a nivel del protoplasto como de la vacuola y otros orgánulos (revisado por Pardo *et al.*, 2006).

### **Efectos de la alcalinidad sobre el contenido de iones inorgánicos**

Estudios realizados con especies moderadamente tolerantes a la salinidad, en las cuales la alcalinidad induce un efecto negativo sobre el crecimiento, muestran resultados divergentes con respecto al efecto de la alcalinidad sobre el balance iónico de la planta.

El incremento de pH de 5,8 a 8,5 no afectó a los contenidos de K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> de la parte aérea ni al contenido de K<sup>+</sup> de la raíz del maíz ni de *T. dactyloides*, independientemente del nivel de NaCl en que se cultivaron las plantas. En maíz y *T. dactyloides*, el contenido de Na<sup>+</sup> de la raíz no se modificó por un incremento del pH de 5,8 a 8,5 en las plantas cultivadas con bajo nivel de NaCl pero aumentó un 24% en las plantas de *T. dactyloides* cultivadas con alto nivel de NaCl. El incremento de pH de 5,8 a 8,5 no afectó a la absorción de Na<sup>+</sup> ni la translocación de Na<sup>+</sup> hacia la parte aérea en el maíz ni en *T. dactyloides*.

De manera similar a lo observado en maíz, resultados obtenidos con plantas de arroz muestran que la alcalinidad no afecta los contenidos de Na<sup>+</sup> ni de K<sup>+</sup> en la parte aérea en plantas cultivadas con estrés salino

bajo ( $< 30 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Sin embargo, con niveles mayores de estrés salino, el incremento del contenido de  $\text{Na}^+$  es mayor en las plantas cultivadas con  $\text{pH} \cong 9$  que en las cultivadas con  $\text{pH} \cong 5,6$ , mientras que los contenidos foliares de  $\text{K}^+$  se mantienen en el mismo nivel de los controles (Wang *et al.*, 2011).

En cambio, en plantas de alfalfa cultivadas en soluciones con distintas concentraciones de  $\text{Na}^+$ , la alcalinidad ( $\text{pH} 9,80-10,11$ ) induce un incremento en la concentración de  $\text{Na}^+$  y una disminución de la de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , con respecto a las plantas cultivadas con igual concentración de  $\text{Na}^+$  y  $\text{pH}$  neutro ( $7,01-7,05$ ) (Li *et al.*, 2010). Plantas de trigo cultivadas en soluciones con niveles crecientes de salinidad muestran un incremento en los contenidos de  $\text{Na}^+$  de la parte aérea y de las raíces, mientras que el contenido de  $\text{K}^+$  disminuye, y la magnitud de los cambios en ambos cationes es mayor bajo estrés por alcalinidad ( $\text{pHs} 8,2$  a  $8,8$ ), con respecto a las plantas cultivadas con concentraciones iguales de sal pero  $\text{pH}$  neutro ( $\cong 6,5$ ). En esta especie, el estrés salino no tiene impacto significativo sobre los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^+$  libres, pero la alcalinidad causa un incremento de los mismos.

Por otro lado, en trigo y arroz, la alcalinidad causa una disminución marcada de los niveles foliares de iones inorgánicos tales como el  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$  y el  $\text{SO}_4^-$  y  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , en comparación con las plantas cultivadas con el mismo nivel de salinidad pero  $\text{pH}$  neutro (Guo *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011).

Yang *et al.* (2010), a partir de resultados obtenidos con plantas de *Chloris virgata*, especie tolerante a la alcalinidad, sugieren que la regulación metabólica de los ácidos orgánicos en condiciones de alcalinidad puede jugar un papel importante en el balance intracelular de iones. Estos autores proponen que el mecanismo adaptativo por el cual *Chloris virgata* tolera el estrés por alcalinidad es mediante la estimulación de la secreción de ácidos orgánicos, especialmente los ácidos acético y fórmico. Este mecanismo es importante en la protección de las raíces de un daño por  $\text{pH}$  causado por un estrés alcalino.

En comparación con otras especies, maíz y *T. dactyloides* muestran poco efecto de la alcalinidad sobre los contenidos de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Ca<sup>+</sup>, en presencia o no de estrés por salinidad. Elucidar los mecanismos de respuesta, así como determinar el nivel de variación intraespecífica en la tolerancia a la alcalinidad en estas especies, requiere más estudio.

## 5. CONCLUSIONES

A partir de la obtención y el estudio de generaciones avanzadas de un híbrido F1 casi estéril (2n = 56) de maíz (2n = 20) x *T. dactyloides* (2n = 72) se observa que:

- i. La fertilidad de los híbridos de maíz x *T. dactyloides* se restaura parcialmente tras la eliminación de la mayoría de los cromosomas de *T. dactyloides*.
- ii. Tanto el apareamiento entre cromosomas de maíz y *T. dactyloides*, como los fenotipos de la progenie de los híbridos, los cuales poseen características de ambas especies aún en aquellos casos en los que se han eliminado todos los cromosomas de *T. dactyloides*, indican la posibilidad de recombinación entre las especies parentales

El estudio de los efectos de la salinidad (101 mM de NaCl), la alcalinidad (pH = 8,5) y la combinación de ambos factores (101 mM de NaCl y pH = 8,5) sobre plantas jóvenes de maíz (línea B73), *T. dactyloides* y generaciones avanzadas (MT41 y MT51) de un híbrido entre ambas especies aporta las siguientes evidencias:

- iii. En todos los genotipos evaluados, la salinidad produce la disminución de la biomasa del vástago, el contenido relativo de agua, el contenido de clorofila total y el de carotenoides, pero no

afecta significativamente el peso seco de la raíz, la pérdida relativa de solutos foliares, ni la masa foliar específica.

- iv. El maíz muestra los mayores pesos secos de la parte aérea y de la raíz, así como la menor pérdida relativa de solutos, en condiciones de salinidad, con relación al resto de los genotipos.
- v. El nivel de tolerancia de los híbridos es similar a la del maíz y mayor que la de *T. dactyloides*.
- vi. Hasta la aparición de la sexta hoja, la salinidad no afecta el filocrono del maíz ni de los híbridos.
- vii. La alcalinidad, en el maíz, y todos los tratamientos (alcalinidad, salinidad y la combinación de ambos), en *T. dactyloides*, inducen un incremento del tiempo entre la siembra y la emergencia de la quinta hoja, con respecto a los controles.
- viii. El maíz muestra mayor sensibilidad a la alcalinidad que a la salinidad. En cambio, *T. dactyloides* es tan sensible a la salinidad como a la alcalinidad. Ambas especies responden de manera similar a la alcalinidad.
- ix. Aunque el maíz muestra una tolerancia a la salinidad mayor que *T. dactyloides*, la mayoría de los parámetros evaluados (contenido relativo de agua, masa foliar específica, porcentaje de pérdida de electrolitos foliares, contenido de clorofila total) respondieron a la salinidad de manera similar en ambas especies. Sin embargo, en condiciones de estrés salino, las plantas de *T. dactyloides* muestran parámetros iónicos más favorables que las del maíz, i.e. un contenido foliar de  $\text{Na}^+$  3,7 veces menor, así como menor aborción y translocación de  $\text{Na}^+$  ( $\cong 50\%$ ) hacia la parte aérea.



- x. El maíz y los híbridos muestran contenidos foliares de  $\text{Na}^+$  similares en condiciones de estrés salino.
- xi. El incremento de pH de 5,8 a 8,5 no afecta los contenidos de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  de la parte aérea ni el contenido de  $\text{K}^+$  de la raíz del maíz ni de *T. dactyloides*, independientemente del nivel de NaCl en que se hayan cultivado las plantas.
- xii. En maíz y *T. dactyloides*, el contenido de  $\text{Na}^+$  de la raíz no se modifica por un incremento del pH de 5,8 a 8,5 en las plantas cultivadas con bajo nivel de NaCl pero aumenta un 24% en las plantas de *T. dactyloides* cultivadas con alto nivel de NaCl.
- xiii. El incremento de pH de 5,8 a 8,5 no afecta la absorción de  $\text{Na}^+$  ni la translocación de  $\text{Na}^+$  hacia la parte aérea en el maíz ni en *T. dactyloides*.



## CONSIDERACIONES FINALES

La tolerancia a la salinidad es una característica determinada por numerosos genes (Dong *et al.*, 2009, entre otros). Conocer en detalle los diferentes mecanismos involucrados en la tolerancia a un estrés abiótico ha sido de utilidad para obtener genotipos tolerantes a dicho factor de estrés mediante un plan de mejora genética, ya sea por métodos tradicionales (Schubert, 2009) o biotecnológicos (Cuartero *et al.*, 2006), así como para implementar estrategias de manejo que incrementen la producción en condiciones de estrés (Hu y Schmidhalter, 2005, entre otros).

La capacidad de mantener un nivel foliar de  $\text{Na}^+$  bajo y una mayor eficiencia de los mecanismos que contribuyen a lograr esta característica se han relacionado frecuentemente con la tolerancia a la salinidad en el maíz (Eker *et al.*, 2006; Schubert *et al.*, 2009, entre otros) y otros cereales (para una revisión ver Munns *et al.*, 2006). Sin embargo, esta comparación suele ser válida para genotipos diferentes de una misma especie pero falla cuando se comparan diferentes especies. Más aún, especies o genotipos diferentes muestran distintos grados de asociación entre la tolerancia a la salinidad y la capacidad de mantener un nivel foliar de  $\text{Na}^+$  relativamente bajo (Munns y Tester, 2008). Estos resultados sugieren que hay otros mecanismos involucrados en la tolerancia a la salinidad. De hecho, a partir de numerosos estudios sobre los mecanismos bioquímicos y fisiológicos afectados por la salinidad y la comparación entre las respuestas de genotipos sensibles y tolerantes surge la evidencia de que, en varios casos, al menos a nivel específico, la tolerancia a salinidad está determinada por mecanismos diferentes. Esto queda menos claro a nivel subespecífico, donde hay varios ejemplos que muestran que las diferencias en la tolerancia entre diferentes genotipos de una misma especie están relacionadas con gradientes de algunos factores comunes.

Solamente las respuestas relacionadas con el componente iónico específico comprenden mecanismos que se expresan en diferentes tejidos de la planta, desde las hojas hasta la raíz, y en la mayoría de los genotipos la tolerancia se debe a una combinación de los mismos más que a la actividad de un solo proceso. En distintas especies, la tolerancia a la salinidad se ha relacionado con factores tales como la capacidad de mantener una relación  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$  relativamente elevada en la zona de crecimiento foliar en maíz (Cramer, 1992); una baja absorción de  $\text{Na}^+$  y baja translocación de  $\text{Na}^+$  hacia el tallo en maíz (Schubert *et al.*, 2009); el nivel de recirculación de  $\text{Na}^+$  en el floema y el destino del  $\text{Na}^+$  recirculado en *Arabidopsis* (Berthomieu *et al.*, 2003) y *Ricinus communis* (Peuke, 2010); la capacidad de mantener un nivel de  $\text{Na}^+$  foliar bajo, especialmente en las hojas jóvenes en trigo (Colmer *et al.*, 1995); la capacidad de mantener relaciones foliares  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$  relativamente altas en el maíz (Çiçek y Çakırlar, 2002; Cramer, 2002; Eker *et al.*, 2006; Goudarzi y Pakniyat, 2008) y otras especies (Tester y Davenport, 2003; Colmer *et al.*, 2006; Shabala *et al.*, 2005); y la capacidad de compartimentar el  $\text{Na}^+$  hacia la vacuola (revisado por Pardo *et al.*, 2006). Otras respuestas que se han observado comúnmente asociadas con la tolerancia a la salinidad en los cereales son el vigor de la planta, el ajuste osmótico, la eficiencia transpiratoria, una tasa de crecimiento inicial rápida, una floración precoz que tienda a acortar el periodo de crecimiento y el incremento de la eficiencia del uso del agua (revisado por Tester y Davenport, 2003; Colmer *et al.*, 2005).

En especies básicamente sensibles, el aumento de la tolerancia a la salinidad depende de un número de factores que pueden modificar sustancialmente la respuesta de la planta en las distintas etapas tras la imposición del estrés. La combinación de características diferentes que contribuyen a la tolerancia a la salinidad no se encuentra necesariamente optimizada en el mismo genotipo, y es de esperar que así ocurra en una

especie que carece de historia evolutiva en condiciones de salinidad (Yeo y Flowers, 1983). Combinar esas características en un genotipo es uno de los caminos en la mejora de especies sensibles o moderadamente sensibles a la salinidad, a partir del cual se han obtenido algunos resultados positivos en maíz (De Costa *et al* 2007, Schubert *et al.* 2009), trigo duro y otros cereales (revisado por Munns *et al.*, 2006). En maíz, por ejemplo, a partir del cruce entre una línea altamente excluidora de Na<sup>+</sup> (Pioneer 3906) con una línea menos eficiente en este carácter, pero que mostraba altas tasas de eflujo de Na<sup>+</sup> desde las raíces (Schubert y Laüchli, 1990), se obtuvo una línea con una capacidad de exclusión de Na<sup>+</sup> mejorada con respecto a la línea Pioneer 3906. A su vez, el cruce de esta línea altamente excluidora de Na<sup>+</sup> con líneas que tienen una capacidad de ajuste osmótico mejorada, dio origen a híbridos que muestran un incremento significativo del rendimiento en grano bajo condiciones salinas (EC = 10 dSm<sup>-1</sup>) (Schubert *et al.*, 2009). Estos resultados muestran que un mecanismo determinado que puede mejorar la respuesta de un genotipo a un estrés, en este caso la salinidad por NaCl, puede provenir de una planta que no posee un mejor desempeño en su conjunto.

En este contexto, *T. dactyloides* posee características que podrían ser de utilidad para incorporar a un plan de mejoramiento de maíz, entre las que cabe resaltar el bajo nivel foliar de Na<sup>+</sup>, relacionado con una baja absorción y translocación de Na<sup>+</sup> hacia la parte aérea. La línea de maíz B73, en condiciones similares de cultivo y de salinidad, mostró un contenido foliar de Na<sup>+</sup> similar al del híbrido Pioneer 3906, considerado como un genotipo fuertemente excluidor de Na<sup>+</sup>. Sin embargo, las plantas de *T. dactyloides* sometidas a un estrés salino mostraron una absorción y translocación de Na<sup>+</sup> de la raíz al tallo sensiblemente menores que los de la línea B73, ambos parámetros asociados con la tolerancia a la salinidad. Como resultado, el nivel foliar de Na<sup>+</sup> de *T. dactyloides* fue significativamente menor que el de la línea de maíz B73. Sin embargo, *T.*

*dactyloides* mostró una mayor sensibilidad al NaCl que la línea B73 de maíz, expresado como disminución del peso seco aéreo con respecto al control, lo cual sugiere una menor eficiencia en la compartimentación celular del Na<sup>+</sup> de *T. dactyloides* en comparación con un genotipo de maíz excluidor de Na<sup>+</sup>. Probablemente la combinación de esos mecanismos confirió la tolerancia a la salinidad observada en la F1 entre ambas especies (Pesqueira *et al.*, 2003, 2006). Más aún, el híbrido F1 de maíz x *T. dactyloides* exhibió tolerancia a la salinidad, y mostró parámetros iónicos aún más favorables que *T. dactyloides*. Además, el buen desempeño de los callos caulogénicos del híbrido F1 cultivados *in vitro* en presencia de NaCl (Pesqueira *et al.*, 2003) sugiere una compartimentación eficiente de Na<sup>+</sup> hacia la vacuola en este genotipo. Generaciones avanzadas del híbrido F1 de maíz x *T. dactyloides* mostraron un nivel de tolerancia a la salinidad mayor al de *T. dactyloides* y similar al del maíz.

Determinar la utilidad real de los híbridos entre maíz y *T. dactyloides* como base de partida para obtener un híbrido estable tolerante a la salinidad o para incrementar la tolerancia a la salinidad en el maíz requiere más investigación. Por un lado, haría falta obtener un número mayor de combinaciones genéticas, mediante el cruce de distintos genotipos de maíz y *T. dactyloides*, el rescate de embriones inmaduros y la inducción de embriogénesis somática. De esta forma, aumentaría la posibilidad de obtener un híbrido estable fértil que muestre un mayor nivel de tolerancia a la salinidad. Además, convendría conocer los mecanismos que confieren tolerancia a la salinidad en el híbrido F1 de maíz x *T. dactyloides* para utilizar criterios adecuados de selección en un plan de mejora dirigido al incremento de la tolerancia a la salinidad en estas especies.

Tester y Davenport, en su revisión de 2003, propusieron 4 puntos principales para el control de transporte de Na<sup>+</sup> en especies monocotiledóneas sin glándulas salinas: i) Selectividad de la absorción de

la raíz a nivel de las células de la corteza y la estela; ii) Carga del xilema por las células parenquimáticas en las raíces; iii) Remoción de la sal del xilema en la parte superior de las raíces, el tallo y las vainas foliares, por las células parenquimáticas del xilema; iv) Carga del floema. El estudio de la efectividad relativa de estos cuatro puntos de control del transporte de  $\text{Na}^+$  y de la capacidad de compartimentar el  $\text{Na}^+$  hacia la vacuola de los genotipos evaluados del híbrido F1 de maíz y *T. dactyloides*, u otros diferentes, podría aportar datos valiosos para abordar un programa de mejora genética. Por otro lado, conocer los mecanismos involucrados en las respuestas a la salinidad y alcalinidad de genotipos con diferentes niveles de tolerancia aportará información que puede contribuir a dilucidar los mecanismos que afectan el crecimiento y desarrollo de las plantas en condiciones de estrés.

La posibilidad de incorporar caracteres favorables del maíz en *T. dactyloides* a partir de cruces entre ambas especies es muy improbable, dado que la mayoría de los cromosomas de *T. dactyloides* se pierden en los primeros retrocruzamientos del híbrido. Como se mencionó antes, los resultados obtenidos para *T. dactyloides* (bajo nivel foliar de  $\text{Na}^+$  y alta sensibilidad al  $\text{Na}^+$ ) sugieren una baja capacidad de compartimentación de  $\text{Na}^+$  a nivel celular. Por lo tanto, mejorar la eficiencia en la compartimentación de  $\text{Na}^+$  hacia la vacuola, por ejemplo mediante la sobreexpresión de algún gen de la familia *AtNHX* en tejido foliar por transformación genética, podría ser un enfoque válido para incrementar la tolerancia de esta especie a la salinidad. Existen antecedentes sobre la regeneración de plantas de *T. dactyloides* por caulogénesis y embriogénesis somática (Furini y Jewell, 1991) y la transformación genética mediada por *Agrobacterium*, en la cual se observó la integración del gen delator *GUS* en el genoma y una transmisión estable del transgen en los transformantes primarios (Sairam *et al.*, 2002).





## CONCLUSIONES GENERALES

Los cruzamientos entre diferentes genotipos de maíz ( $2n = 20$  ó  $40$ ) y *T. dactyloides* ( $2n = 72$ ) y el rescate y cultivo de los embriones híbridos inmaduros muestran que:

1. Los embriones híbridos de una longitud menor o igual a 1,25 mm pueden originar callos caulogénicos en un medio de cultivo suplementado con  $4,6 \mu\text{mol L}^{-1}$  de 2,4-D. En este medio, los callos se han mantenido por más de 2 años con capacidad de regenerar brotes, a partir de los cuales se originan plantas en un medio libre de reguladores de crecimiento.
2. Los embriones sembrados en un medio de cultivo sin reguladores de crecimiento muestran muy poco desarrollo radicular y las plantas no sobreviven el período de rustificación *ex vitro*.

A partir de la obtención y el estudio de generaciones avanzadas de un híbrido F1 casi estéril ( $2n = 56$ ) de maíz tetraploide ( $2n = 40$ ) x *T. dactyloides* ( $2n = 72$ ) se observa:

3. La restauración parcial de la fertilidad de los híbridos tras la eliminación de la mayoría de los cromosomas de *T. dactyloides*.
4. Evidencias de la posibilidad de recombinación entre las especies parentales, tales como el apareamiento entre los cromosomas de maíz y *T. dactyloides* y el hecho de que aún aquellos híbridos que han perdido todos los cromosomas de *T. dactyloides* muestran características fenotípicas de ambas especies progenitoras.

El estudio de los efectos de la salinidad (101 mM de NaCl), la alcalinidad (pH = 8,5) y la combinación de ambos factores (101 mM de NaCl y pH = 8,5) sobre plantas jóvenes de maíz (línea B73), *T. dactyloides* y generaciones avanzadas (MT41 y MT51) de un híbrido entre ambas especies, aporta las siguientes evidencias:

5. En todos los genotipos evaluados, la salinidad produce la disminución de la biomasa del vástago, del contenido relativo de agua, del contenido de clorofila total y el de carotenoides, pero no afecta significativamente el peso seco de la raíz, la pérdida relativa de solutos foliares ni la masa foliar específica.
6. En condiciones de salinidad, el maíz muestra los mayores pesos secos de la parte aérea y de la raíz, así como la menor pérdida relativa de solutos, con relación al resto de los genotipos.
7. Hasta la aparición de la sexta hoja, la salinidad no afecta el filocrono del maíz ni de los híbridos.
8. La alcalinidad y la combinación de alcalinidad y salinidad en el maíz, y todos los tratamientos (alcalinidad, salinidad y la combinación de ambos), en *T. dactyloides*, inducen un incremento del tiempo entre la siembra y la emergencia de la quinta hoja, con respecto a los controles.
9. El incremento de pH no afecta los contenidos de  $K^+$ ,  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  de la parte aérea ni el contenido de  $K^+$  de la raíz del maíz ni de *T. dactyloides*, independientemente del nivel de NaCl en que se hayan cultivado las plantas.
10. En maíz y *T. dactyloides*, el contenido de  $Na^+$  de la raíz no se modifica por el incremento del pH en las plantas cultivadas con bajo nivel de NaCl pero aumenta un 24% en las plantas de *T. dactyloides* cultivadas con alto nivel de NaCl.
11. El incremento del pH no afecta la absorción de  $Na^+$  ni la translocación de  $Na^+$  hacia la parte aérea en el maíz ni en *T. dactyloides*.
12. El nivel de tolerancia a la salinidad de los híbridos es similar al del maíz y mayor que el de *T. dactyloides*.

13. El maíz muestra mayor sensibilidad a la alcalinidad que a la salinidad. En cambio, *T. dactyloides* es tan sensible a la salinidad como a la alcalinidad y ambas especies responden de manera similar a la alcalinidad.
14. Aunque el maíz muestra una tolerancia a la salinidad mayor que *T. dactyloides*, la mayoría de los parámetros evaluados (contenido relativo de agua, masa foliar específica, porcentaje de pérdida de electrolitos foliares, contenido de clorofila total) responden a la salinidad de manera similar en ambas especies. Sin embargo, en condiciones de estrés salino, las plantas de *T. dactyloides* muestran parámetros iónicos más favorables que las del maíz, i.e. un contenido foliar de  $\text{Na}^+$  3,7 veces menor, así como menor absorción y translocación de  $\text{Na}^+$  ( $\cong 50\%$ ) hacia la parte aérea. En cambio, en condiciones de salinidad, los híbridos muestran contenidos foliares de  $\text{Na}^+$  similares al maíz.



## BIBLIOGRAFÍA

1. Aberle E.Z., Gibson L.R., Knapp A.D., Dixon P.M., Moore K.J., Brummer E.C., Hintz R., 2003. Optimum planting procedures for eastern gamagrass. *Agron. J.* 95: 1054-1062.
2. Ahring, R.M. and Frank, H., 1968. Establishment of eastern gamagrass from seed and vegetative propagation. *J. Range Manage.* 21: 27-30.
3. Aiken G.E., 1997. Temporal effects on steer performance and nutritive values for eastern gamagrass grazed continuously for different durations. *J. Anim. Sci.* 75: 803-808.
4. Albacete A., Ghanem M.E., Martínez-Andújar C., Acosta M., , Sánchez-Bravo J., Martínez V., Lutts S., Dodd I.C., Pérez-Alfocea F., 2008. Hormonal changes in relation to biomass partitioning and shoot growth impairment in salinized tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *J. Exp. Bot.* 59: 4119-4131.
5. Alberico G.L., Cramer G.R., 1993. Is the salt tolerance of maize related to sodium exclusion? I. Preliminary screening of seven cultivars. *J. Plant Nutr.* 16: 2289-2303.
6. Alloway, 2009. Soil factors associated with zinc deficiency in crops and humans. *Environ. Geochem. Health* 31:537–548.
7. Anderson R.C., 1985. Aspect of the germination ecology and biomass production of eastern gamagrass (*Tripsacum dactyloides* L.). *Bot. Gaz. (Chicago)* 146: 353-364.
8. Apel P., Peisker M., Pfündel E., Mühle K., 1995. *Flaveria pringlei* (C3) and *Flaveria trinervia* (C4) under NaCl stress. *Biol. Plant.* 37: 65-70.
9. Argente M.L., González L.M., y Plana R., 2006. Efecto de altas concentraciones salinas sobre la germinación y el crecimiento del trigo (*Triticum aestivum*) variedad Cuba-C-204. *Cultivos Tropicales* 27: 45-48.

10. Armstrong C.L., Green C.E., 1985. Establishment and maintenance of friable, embryogenic callus and the involvement of L- proline. *Planta* 164: 207-214.
11. Armstrong C.L., Romero-Severson J. Y Hodges T.K., 1992. Improved tissue culture response of an elite maize inbred through backcross breeding, and identification of chromosomal regions important for regeneration by RFLP analysis. *Theor. Appl. Genet.* 84: 755-762.
12. Arnold, C.Y., 1960. Maximum-minimum temperatures as a basis for computing heat units. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.* 76: 292-682.
13. Aroca R., Amadeo G., Fernández-Illescas S., Herman E.M. , Chaumont F., Maarten J. Chrispeels M.J., 2005. The role of aquaporins and membrane damage in chilling and hydrogen peroxide induced changes in the hydraulic conductance of maize roots. *Plant Physiol.* 137: 341-353.
14. Arzani A., 2008. Improving salinity tolerance in crop plants: a biotechnological view. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 44: 373-383.
15. Ashraf M., McNeilly T., 1988. Variability in salt tolerance of nine spring wheat cultivars. *J. Agron. Crop. Sci.* 160:14-21.
16. Ashraf M., Khanum A., 1997. Relationship between ion accumulation and growth in two spring wheat lines differing in salt tolerance at different growth stages. *J. Agron. Crop Sci.* 178: 39-51.
17. Ashraf M., 2002. Salt tolerance of cotton: some new advances. *Crit. Rev. Plant Sci.* 21: 1-30.
18. Ashraf M., Harris P.J.C., 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Sci.* 166: 3-16.
19. Ayers R.S., Westcot D.W., 1985. Water quality for agriculture. *FAO Irrigation and Drainage Paper 29 Rev. 1*, Rome, 174 pp. Disponible en: <http://www.fao.org/DOCREP/003/T0234E/T0234E00.HTM>

20. Azad H.N, Hajibagheri M.R., Kafilzadeh F. and Shabani M., 2012. The effects of NaCl stress on the physiological and oxidative situation of maize (*Zea mays* L.) plants in hydroponic culture. *Curr. Res. J. Biol. Sci.* 4: 17-22.
21. Azaizeh H., Steudle E., 1991. Effects of salinity on water transport of excised maize (*Zea mays* L.) roots. *Plant Physiol.* 97: 1136-1145.
22. Azaizeh H., Gunse B., Steudle E., 1992. Effects of NaCl and CaCl<sub>2</sub> on water transport across root cells of maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Plant Physiol.* 99: 886-894.
23. Azevedo Neto A.D., Prisco J.T., Enéas Filh J., Lacerda C.F., Silva J.V., Costa P.H.A., Gomes Filho E., 2004. Effects of salt stress on plant growth, stomatal response and solute accumulation of different maize genotypes. *Braz. J. Plant Physiol.* 16: 31-38.
24. 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.
25. Barkla B.J., Vera-Estrella R., Maldonado-Gama M., Pantoja O., 1999. Abscisic acid induction of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase activity in *Mesembryanthemum crystallinum* is developmentally regulated. *Plant Physiol.* 120: 811-819.
26. Barrs H.D., Weatherley P.E., 1962. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Aust. J. Biol. Sci.* 15: 413-458.
27. Bastías E.I., Fernandez-García N., Carvajal M., 2004a. Aquaporin functionality in roots of *Zea mays* in relation to the interactive effects of boron and salinity. *Plant Biology* 6: 415-421.

28. Bastías E.I., González-Moro M.B., González-Murua C., 2004b. *Zea mays* L. *amylacea* from the Lluta Valley (Arica-Chile) tolerates salinity stress when high levels of boron are available. *Plant Soil* 267: 73-84.
29. Batista W.B., Taboada M.A., Lavado R.S., Perelman S.B., León J.C., 2005. Asociación entre comunidades vegetales y suelos en el pastizal de la Pampa Deprimida. pp 113-129. En Oesterheld, M; Aguiar, MR; Ghersa, CM; Paruelo, JM, editores. La heterogeneidad de la vegetación de los agroecosistemas. Un homenaje a Rolando León. Editorial Facultad de Agronomía, Buenos Aires.
30. Beaumont V.H., Widholm J.M., 1993. Ploidy variation of pronamide-treated maize calli during long term culture. *Plant Cell Rep.* 12: 648-651.
31. Bergmann W., 1992. *Nutritional Disorders of Plants*. Gustav Fischer Verlag, Jena.
32. Bernard S., Jewell D.C., 1985. Crossing maize with sorghum, *Tripsacum* and millet: the products and their level of development following pollination. *Theor. Appl. Genet.* 70: 474-483.
33. Bernstein N., Silk W.K., Laüchli A., 1993. Growth and development of sorghum leaves under conditions of NaCl stress: spatial and temporal aspects of leaf growth inhibition. *Planta* 191: 433-439
34. Berquist R.R., 1981. Transfer from *Tripsacum dactyloides* to corn of a major gene locus conditioning resistance to *Puccinia sorghi*. *Phytopathology* 7: 518-520.
35. Berthaud J., Savidan Y., 1989. Genetic resources of *Tripsacum* and gene transfer to maize. In A. Mujeeb-Kazi and L.A. Sitch (eds.), *Review of advances in plant biotechnology, 1985-1988*, 121-130. 2d International Symposium on Genetic Manipulation in Crops. Mexico D.F., Mexico and Manila, Philippines: CIMMYT and IRRI.
36. Berthomieu P., Conéjéro G., Nublat A., Brackenbury W. J., Lambert C., Savio C., Uozumi N., Oiki S., Yamada K., Cellier F., Gosti F.,



- Simonneau T., Essah P.A., Tester M., Véry A.-A., Sentenac H., Casse F., 2003. Functional analysis of *AtHKT1* in *Arabidopsis* shows that Na<sup>+</sup> recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *EMBO J.* 22: 2004-2014.
37. Bidlack J.E., Vaughan J.E., Dewald C.L., 1999. Forage quality of 10 Eastern gamagrass [*Tripsacum dactyloides* (L.) L.] genotypes. *J. Range Manage.* 52: 661-665.
38. Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K.V., 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann. Bot.* 91: 179-194.
39. Blumwald E., 2000. Sodium transport and salt tolerance in plants. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12:431-434.
40. Bolu W.H., Polle A., 2004. Growth and stress reactions in roots and shoots of a salt-sensitive poplar species (*Populus x canescens*). *Trop. Ecol.* 45: 161-171.
41. Boyer J.S., James R.A., Munns R., Condon (A.G.) T., Passioura B., 2008. Osmotic adjustment leads to anomalously low estimates of relative water content in wheat and barley. *Funct. Plant Biol.* 35: 1172-1182.
42. Brink D., de Wet J.M., 1983. Supraspecific groups in *Tripsacum* (Gramineae). *Syst. Bot.* 8:243-249.
43. Burns J. C., Fisher D. S., Pond K. R., Timothy D. H., 1993. Diet characteristics, digesta kinetics, and dry matter intake of steers grazing eastern gamagrass. *J. Anim. Sci.* 70: 1251-1261.
44. Burns J.C., Fisher D.S., Pond K.R., 1996. *Postharvest Biol. Tec.* 7: 261-269.
45. Canellas L.P., Lopes Olivares F., Okorokova-Façanha A. L., Façanha A.R., 2002. Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity in maize roots. *Plant Physiol.* 130: 1951-1957.

46. Carballo, C., Tsakoumagkos P., Gras C., Rossi C., Plano J. L., Bramuglia G., 2004. "Articulación de los pequeños productores con el mercado: limitaciones y propuestas para superarlas". Serie Estudios e Investigaciones No.7- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos, Dirección de Desarrollo Agropecuario - Buenos Aires.
47. Çelik H., Katkat A.V., 2008. Effects of bicarbonate and iron-deprivation on growth of different maize varieties. *Am-Euras. J. Agric. & Environ. Sci.* 3: 169-178.
48. Chalak L., Legave J.M., 1996. Oryzalin combined with adventitious regeneration for an efficient chromosome doubling of trihaploid kiwifruit. *Plant Cell Rep.* 16: 97-100.
49. Cha-um S., Kirdmanee C., 2009. Effect of salt stress on proline accumulation, photosynthetic ability and growth characters in two maize cultivars. *Pak. J. Bot.* 41: 87-98.
50. Chaves M.M., Flexas J., Pinheiro C., 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Ann. Bot.* 103: 551–560.
51. Chazen O., Hartung W., Neumann P.M., 1995. The different effects of PEG 6000 and NaCl on leaf development are associated with differential inhibition of root water transport. *Plant Cell Environ.* 18: 727-735.
52. Chu C.C., 1978. The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. En: *Proc. Symp. on Plant Tissue Cult.* May 25-30, 1978, Peking, Science Press.
53. Çiçek N., Çakırlar H., 2002. The effect of salinity on some physiological parameters in two maize cultivars. *Bulg. J. Plant Physiol.* 28: 66-74.
54. Clark R.B., Zeto S.K., 1996. Mineral acquisition by mycorrhizal maize grown on acid and alkaline soil. *Soil. Biol. Biochem.* 28: 1495-1503.

55. Clark R.B., Alberts E.E., Zobel R.W., Sinclair T.R., Miller M.S., Kemper W.D. & Foy C.D., 1998. Eastern gamagrass (*Tripsacum dactyloides*) root penetration into and chemical properties of claypan soils. *Plant Soil* 200: 33-45.
56. Colmer T.D., Epstein E., Dvorak J., 1995. Differential solute regulation in leaf blades of various ages in salt-sensitive wheat and a salt-tolerant wheat x *Lophopyrum elongatum* (Host) A. Löve amphiploid. *Plant Physiol.* 108: 1715-1724.
57. Colmer T.D., Munns R., Flowers T.J. 2005. Improving salt tolerance of wheat and barley: future prospects. *Aust. J. Exp. Agr.* 45: 1425-1443.
58. Colmer T.D., Flowers T.J., Munns R., 2006. Use of wild relatives to improve salt tolerance in wheat. *J. Exp. Bot.* 57: 1059-1078.
59. 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.
60. Cramer G.R., Läuchli A., Polito, V.S., 1985. Displacement of  $\text{Ca}^{2+}$  by  $\text{Na}^+$  from the plasmalemma of root cells. A primary response to salt stress? *Plant Physiol.* 79: 207-211.
61. Cramer G.R., Läuchli A., 1986. Ion activities in solution in relation to  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  interactions at the plasmalemma. *J. Exp. Bot.* 37: 321-330.
62. Cramer G.R., Läuchli A., Epstein E., 1986. Effects of NaCl and  $\text{CaCl}_2$  on ion activities in complex nutrient solutions and root growth of cotton. *Plant Physiol.* 81: 792-797.
63. Cramer G.R., Bowman D.C., 1991a. Kinetics of maize leaf elongation. I. Increased yield threshold limits short-term, steady-state elongation rates after exposure to salinity. *J. Exp. Bot.* 42: 1417-26.
64. Cramer G.R., Bowman D.C., 1991b. Short-term leaf elongation kinetics of maize in response to salinity are independent of the root. *Plant Physiol.* 95: 965-967.

65. Cramer G.R., 1992a. Kinetics of maize leaf elongation. II. Responses of a Na-excluding cultivar and a Na-including cultivar to varying Na/Ca salinities. *J. Exp. Bot.* 43: 857-864.
66. Cramer G.R., 1992b. Kinetics of maize leaf elongation III. Silver thiosulfate increases the yield threshold of salt-stressed plants, but ethylene is not involved. *Plant Physiol.* 100: 1044-1047.
67. Cramer, G.R., Bowman D.C., 1994. Cell elongation control under stress conditions. pp. 303-320. En: "Handbook of plant and crop stress". M. Pessarakli (ed.), Marcel Dekker. New York, USA.
68. Cramer G.R., Alberico G.J., Schmidt C., 1994a. Salt tolerance is not associated with the sodium accumulation of two maize hybrids. *Aust. J. Plant Physiol.* 21: 675-692.
69. Cramer G.R., Alberico G.J., Schmidt C., 1994b. Leaf expansion limits dry matter accumulation of salt stressed maize. *Aust. J. Plant Physiol.* 21: 675-692.
70. Cramer G.R., Krishnan K., Abrams S.R., 1998. Kinetics of maize leaf elongation. IV. Effects of (+)- and (-)-abscisic acid. *J. Exp. Bot.* 49: 191-198.
71. Cramer G.R., 2002. Calcium-sodium interactions under salinity stress. *Environment-Plants-Molecules*. Eds. A. Läuchli and U. Lüttge. Kluwer Academic Publishers.
72. Cramer G.R., Quarrie S.A. 2002. Abscisic acid is correlated with the leaf growth inhibition of four genotypes of maize differing in their response to salinity. *Funct. Plant Biol.* 29: 111-115.
73. Cramer G.R., 2003. Differential effects of salinity on leaf elongation kinetics of three grass species. *Plant Soil* 253: 233–244.
74. Crescimanno G., Iovino M., Provenzano G., 1995. Influence of salinity and sodicity on structural and hydraulic characteristics. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 59: 1701-1708.

75. Cuartero J., Bolarín M.C., Asíns M.J., Moreno V., 2006. Increasing salt tolerance in the tomato. *J. Exp. Bot.* 57: 1045-1058.
76. Cuartero J., Bolarín M.C., Moreno V., Pineda B., 2010. Molecular tools for enhancing salinity tolerance in plants. En "Molecular techniques for crop improvement" Chapter 34 pp 373 – 405. Eds. Jain MS and Brar DS. Kluwer Academic Publishers.
77. DaCosta M., Wang Z., Huang B., 2004. Physiological adaptation of Kentucky bluegrass to localized soil drying. *Crop Sci.* 44: 1307-1314.
78. Dalton F.N., Maggio A., Piccinni G., 1997. Effect of root temperature on plant response functions for tomato: comparison of static and dynamic salinity stress indices. *Plant Soil* 92:307-319.
79. Damario E.A., Pascale A.J., 1988. Caracterización agroclimática de la Region Pampeana. *Rev. Fac. Agr. U.B.A.* 9: 41-54.
80. Dasgan H.Y., Aktas H., Abak K., Cakmak I., 2002. Determination of screening techniques to salinity tolerance in tomatoes and investigation of genotype responses. *Plant. Sci.* 163: 695-703.
81. De Costa, C., Zörb, W., Hartung C., Sven S., 2007. Salt resistance is determined by osmotic adjustment and abscisic acid in newly developed maize hybrids in the first phase of salt stress. *Physiol. Plantarum* 131: 311-321.
82. de Wet J.M.J., Harlan J.R., 1974. *Tripsacum*-maize interaction: a novel cytogenetic system. *Genetics* 78: 493-502.
83. de Wet J.M.J., Gray J.R., Harlan J.R., 1976. Systematics of *Tripsacum*. *Phytologia* 33: 203-227.
84. de Wet J.M.J., 1978. *Tripsacum* introgression and agronomic fitness in maize (*Zea mays* L.). *Proc. Conf. Broadening Genet. Base Crops, Wageningrn*, pp. 203-210.
85. de Wet J.M.J., Timothy D.H., Hilu K.W., Fletcher G.B., 1981. Systematics of South American *Tripsacum* (Gramineae). *Amer. J. Bot.* 68: 269-276.

86. de Wet J.M., Brink D.E., Cohen C.E., 1983. Systematics of *Tripsacum* section Fasciculata (*Gramineae*). Amer. J. Bot. 70: 1139-1146.
87. Degenhardt B., Gimmler H., 2000. Cell wall adaptations to multiple environmental stresses in maize roots. J. Exp. Bot. 51(443): 595-603.
88. Dewald, C.L., Henry J., Bruckerhoff S., Ritchie J., Dabney S., Shepherd D., Douglas J., Wolf D., 1996. Guidelines for establishing warm season grass hedges for erosion control. J. Soil Water Conserv. 51: 16-20.
89. Dong D., Zhang L., Wang H., Liu Z., Zhang Z., Zheng Y., 2009. Differential expression of miRNAs in response to salt stress in maize roots. Ann. Bot. 103: 29-38.
90. Drouet J.L., Pagès L., 2003. GRAAL: a model of GRowth, Architecture and carbon ALlocation during the vegetative phase of the whole maize plant. Model description and parameterisation. Ecol. Model. 165 : 147-173.
91. Drouet J.-L., Pagès L., Serra V., 2005. Dynamics of leaf mass per unit leaf area and root mass per unit root volume of young maize plants: implications for growth models. Eur. J. Agron. 22: 185-193.
92. Duby G., Boutry M., 2009. The plant plasma membrane proton pump ATPase: a highly regulated P-type ATPase with multiple physiological roles. Pflugers Arch – Eur. J. Physiol. 457: 645-655.
93. Eker S., Gömertpay G., Konuşkan Ö., Ülger A.C., Öztürk L., Çakmak I., 2006. Effect of salinity stress on dry matter production and ion accumulation in hybrid maize varieties. Turk. J. Agric. For. 30: 365-373.
94. El-Hendawy S.E., Hu Y., Schmidhalter U., 2005. Growth, ion content, gas exchange, and water relations of wheat genotypes differing in salt tolerances. Aust. J. Agric. Res. 56: 123-134.

95. Engle L.M., De Wet J.M.J., Harlan J.R., 1973. Cytology of backcross offspring derived from a maize-*Tripsacum* hybrid. *Crop Sci.* 13: 690-695.
96. Erdei L., Taleisnik E., 1993. Changes in water relation parameters under osmotic and salt stresses in maize and sorghum. *Physiol. Plantarum* 89: 381-387.
97. Eun J.-S., Fellner V., Burns J. C. and Gumpertz M. L., 2004. Fermentation of eastern gamagrass (*Tripsacum dactyloides* [L.] L.) by mixed cultures of ruminal microorganisms with or without supplemental corn. *J. Anim. Sci.* 82: 170-178.
98. Evert R.E., Russin W.A., Bosabalidis A.M., 1996. Anatomical and ultra-structural changes associated with sink-to-source transition in developing maize leaves. *Int. J. Plant Sci.* 157: 247-261.
99. Faix J.J., Kaiseer C.J., Hinds F.C., 1980. Quality, yield, and survival of asiatic bluestems and an eastern gamagrass in southern Illinois. *J. Range Manage.* 33: 338-390.
100. FAO, 2000. Global Network on Integrated Soil Management for Sustainable Use of Salt-affected Soils. (Food and Agriculture Organisation; Rome). <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush/table1.htm>
101. Flowers T.J., Troke PF, Yeo A.R., 1977. The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annual Review of Plant Physiol.* 28: 89-121.
102. Flowers T. J., 2004. Improving crop salt tolerance. *J. Exp. Bot.* 55: 307-319.
103. Fortmeier R., Schubert S., 1995. Salt tolerance of maize (*Zea mays* L.): the role of sodium exclusion. *Plant Cell Environ* 18: 1041-1047.
104. Foy C.D., 1997. Tolerance of eastern gamagrass to excess Aluminum in acid soil and nutrient solution. *J. Plant Nutr.* 20: 1119-1136.
105. Foy C.D., Sadeghi A.M., Ritchie J.C., Krizek D.T., Davis J.R. y Kemper W.D., 1999. Aluminum toxicity and high bulk density: role in

- limiting shoot and root growth of selected Aluminum indicator plants and eastern gamagrass in an acid soil. *J. Plant Nutr.* 22: 1551-1566.
106. Franco-Salazar V.A., Véliz J.A., 2007. Respuestas de la tuna (*Opuntia ficus indica* (L.) Mill.) al NaCl. *Interciencia* 32: 125-130.
107. Fransz P.F., Schell J.H.N., 1987. An ultrastructural study on early callus development from immature embryos of the maize strains A188 and A632. *Acta Bot. Neerl.* 36:247-260.
108. Frensch J, Steudle E., 1989. Axial and radial hydraulic resistance of roots of maize. *Plant Physiol.* 91: 719-726.
109. Frensch J., Hsiao T.C., 1993. Hydraulic propagation of pressure along immature and mature xylem vessels of roots of *Zea mays* measured by pressure probe techniques. *Planta* 190: 263-270
110. Frensch J., Hsiao T.C., 1995. Rapid response of the yield threshold and turgor regulation during adjustment of root growth to water stress in *Zea mays*. *Plant Physiol.* 108: 303-312.
111. Fricke W., Peters W.S., 2002. The biophysics of leaf growth in salt-stressed barley. A study at the cell level. *Plant Physiol.* 129: 374-388.
112. Fricke W., 2004. Rapid and tissue-specific accumulation of solutes in the growth zone of barley leaves in response to salinity. *Planta* 219: 515-25.
113. Fricke W., Akhiyarova G., Veselov D., Kudoyarova G., 2004. Rapid and tissue-specific changes in ABA and in growth rate in response to salinity in barley leaves. *J. Exp. Bot.* 55: 1115-1123.
114. Furini A., Jewell D.C., 1991 Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Tripsacum dactyloides* L. *Euphytica* 55: 111-115.
115. Furini A., Jewell C., 1995. Somatic embryogenesis and plant regeneration of maize/*Tripsacum* hybrids. *Maydica* 40: 205-210.
116. Galinat W.C., 1973. Intergenomic mapping of maize, teosinte and *Tripsacum*. *Evolution* 27: 644-655.



117. García M.D., Molina M.C., Caso, O., 1991a. *In vitro* culture of 0.15-0.25 mm immature embryos. I. Picloram effects. Maize Genet. Coop. Newsletter 65: 76-77.
118. García M.D., Molina M.C., Caso O., 1991b. *In vitro* culture of 0.15-0.25 mm immature embryos. II. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) effects. Maize Genet. Coop. Newsletter 65: 77-79.
119. García M.D., Molina M.C., Caso O.H. 1992. El cultivo de callos organogénicos como fuente de variabilidad genética para el mejoramiento del maíz. Revista del V Congreso Nacional del Maíz-II Reunión Suramericana de Maiceros I: 61-69.
120. García M.D., Molina M.C., 1995. Embryo inviability in crosses of tetraploid ( $2n=40$ ) x diploid ( $2n=20$ ) maize can be overcome by embryo rescue. Maize Genet. Coop. Newsletter 69: 90.
121. García M.D., Molina M.C., 1997. Embriogénesis somática y regeneración de plantas a partir de embriones híbridos de *Zea mays* ssp. *mays* ( $2n = 20$  y  $40$ ) y *Tripsacum dactyloides*. Revista del VI Congreso Nacional de Maíz I: 79-86.
122. García M. D., Molina M.C., 1998. Obtención de plantas de maíz x *Tripsacum dactyloides* por organogénesis o embriogénesis somática a partir de callos mantenidos *in vitro* durante largos períodos. XXII. Reunión Argentina de Fisiología Vegetal, Buenos Aires. Res. Pág. 248-249.
123. García M.D., Molina M.C. y Pesqueira J., 2000. Genotype and embryo age affect plant regeneration from maize/*Tripsacum* hybrids. Maize Genet. Coop. Newsletter 74: 41-42.
124. García M.D., Molina M.C., 2001. Embryo rescue and induction of somatic embryogenesis as a method to overcome seed inviability in *Zea mays* ssp. *mays* x *Zea mays* ssp. *parviglumis* crosses. Biol. Plant. 44: 497-501.

125. Geilfus C.-M., Zörb C., Mühling K. H., 2010. Salt stress differentially affects growth-mediating  $\beta$ -expansins in resistant and sensitive maize (*Zea mays* L.). *Plant Physiol. Bioch.* 48: 993-998.
126. Gibson L.G., Aberle E.Z., Knapp A.D., Moore K.J., and Hintz R., 2005. Release of seed dormancy in field plantings of eastern gamagrass. *Crop Sci.* 45: 494-502.
127. Gilker R.E., Weil R.R., Krizek D.T., Momen B., 2002. Eastern gamagrass root penetration in adverse subsoil conditions. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 66: 931-938.
128. Gilmore, E., Rogers J., 1958. Heat units as a method of measuring maturity in corn. *Agron. J.* 50: 611-615.
129. 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.
130. González Rodríguez H., Roberts J.K.M., Jordan W.R., Drew M.C., 1997. Growth, water relations, and accumulation of organic and inorganic solutes in roots of maize seedlings during salt stress. *Plant Physiol.* 113: 881-893.
131. Gorham J., Hardy C., Wyn Jones R.G., Joppa L.R., Law C.N., 1987. Chromosomal location of a K/Na discrimination character in the D genome of wheat. *Theor. Appl. Genet.* 74: 584-588.
132. Gorham J., Wyn Jones R.G., Bristol A., 1990. Partial characterization of the trait for enhanced  $K^+$ - $Na^+$  discrimination in the D genome of wheat. *Planta* 180: 590-597.
133. Goudarzi M., Pakniyat H., 2008. Comparison between salt tolerance of various cultivars of wheat and maize. *J. Applied Sci.* 8: 2300-2305.
134. Gouia H., Ghorbal M.H., Touraine B., 1994. Effects of NaCl on flows of N and mineral ions and on  $NO_3^-$  reduction rate within whole plants

- of salt-sensitive bean and salt-tolerant cotton. *Plant Physiol.* 105: 1409-1418.
135. Greenway H, Osmond C.B., 1972. Salt responses of enzymes from species differing in salt tolerance. *Plant Physiol.* 49: 256-9.
136. Grimanelli D., Leblanc O., Espinosa E., Perotti E., González de León D., Savidan Y., 1998. Mapping diplosporous apomixis in tetraploid *Tripsacum*: one gene or several genes? *Heredity* 80: 33-39.
137. Gronwald J.W., Suhayda C.G., Tal M., Shannon M.C., 1990. Reduction in plasma membrane ATPase activity of tomato roots by salt stress. *Plant Sci.* 66: 145-153.
138. Gunes A., Inal A., Alpaslan M., Eraslan F., Bagci E.G., Cicek N., 2007. Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) grown under salinity. *J. Plant Physiol.* 164: 728-736.
139. 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.
140. Gurmani A.R., Bano A., Din J., Khan S.U. and Hussain I., 2009. Effect of phytohormones on growth and ion accumulation of wheat under salinity stress. *Afr. J. Biotechnol.* 8: 1887-1894.
141. Gurney A.L., Grimanelli D., Kanampiu F., Hoisington D., Scholes J.D., Press M.C., 2003. Novel sources of resistance to *Striga hermonthica* in *Tripsacum dactyloides*, a wild relative of maize. *New Phytol.* 160: 557-568.
142. Hager A., 2003. Role of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new aspects. *J. Plant Res.* 116: 483–505.

143. Harlan J.R., de Wet J.M.J., 1977. Pathways of genetic transfer from *Tripsacum* to *Zea mays*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 3494-3497.
144. Hatzig S., Hanstein S., Schubert S., 2010. Apoplast acidification is not a necessary determinant for the resistance of maize in the first phase of salt stress. J. Plant Nutr. Soil Sci. 173: 559-562.
145. Heenan D.P., Lewin G., McCaffery D.W. 1988. Salinity tolerance in rice varieties at different growth stages. Aust. J. Exp. Agr. 28: 343-349.
146. Hodges T.K., Kamo K.K., Imbrie C.W., Becwar M.R., 1986. Genotype specificity of somatic embryogenesis and regeneration in maize. Bio-Technol. 4: 219-223.
147. Hsiao T.C., Xu L.K., 2000. Sensitivity of growth of roots versus leaves to water stress: biophysical analysis and relation to water transport. J. Exp. Bot. 51: 1595-1616.
148. Hu Y., Fricke W., Schmidhalter U., 2005. Salinity and the growth of nonhalophytic grass leaves: the role of mineral nutrient distribution. Funct. Plant Biol. 32: 973-85.
149. Hu Y., Schmidhalter U., 2005. Drought and salinity: A comparison of their effects on mineral nutrition of plants. J. Plant Nutr. Soil Sci. 168: 541-549.
150. Hu Y., Burucs Z, von Tucher S, Schmidhalter U., 2007. Short-term effects of drought and salinity on mineral nutrient distribution along growing leaves of maize seedlings. Environ. Exp. Bot. 60: 268-75.
151. Huarte R., Staltari S., Chorzempa S.H., García M.D., 2007. *Tripsacum dactyloides* L. caryopsis water uptake dynamics, and germination responses to gibberellic acid, fluctuating temperatures, pericarp condition, harvest year, and their interactions. Seed Sci. Technol. 35: 255-265.
152. Huarte R., García M.D., 2009. *Tripsacum dactyloides* (L.) L. (Poaceae) caryopsis dormancy and germination responses to

- scarification, hydrogen peroxide and phytohormones. *Seed Sci. Technol.* 37(3): 544-553.
153. Hussain N., Ali A., Khan A.G., Obaid-ur-Rehman, Tahir M., 2003. Selectivity of ions absorption as mechanism of salt tolerance in rice. *Asian J. Plant Sci.* 2: 445-448.
154. InfoStat, 2008. InfoStat versión, 2008. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
155. Ismail A.M., 2003. Response of maize and sorghum to excess of boron and salinity. *Biol. Plant.* 47: 313-316.
156. James J., 1979. New maize x *Tripsacum* hybrids for maize improvement. *Euphytica* 28: 239-247.
157. James R.A., Rivelli A.R., Munns R., von Caemmerer S., 2002. Factors affecting CO<sub>2</sub> assimilation, leaf injury and growth in salt-stressed durum wheat. *Funct. Plant Biol.* 29: 1393-1403.
158. James R.A., Davenport R.J., Munns R., 2006. Physiological characterization of two genes for Na<sup>+</sup> exclusion in durum wheat, *Nax1* and *Nax2*. *Plant Physiol.* 142: 1537-1547.
159. Jatimliansky J.R., García M.D., Molina M.C., 2004. Response to chilling of *Zea mays*, *Tripsacum dactyloides* and their hybrid. *Biol. Plant.* 48: 561-567.
160. Jia W., Wang Y., Zhang S., Zhang J., 2002. Salt stress-induced ABA accumulation is more sensitively triggered in roots than in shoots. *J. Exp. Bot.* 53: 2201-2206.
161. Kaddah M.T., Ghowail S.I., 1964. Salinity effects on the growth of corn at different stages of development. *Agron. J.* 56: 214-217.
162. Kamo K.K., Hodges T.K., 1986. Establishment and characterization of long-term embryogenic callus and cell suspension cultures. *Plant Sci.* 45: 111-117.

163. Kaspar T.C., Jaynes D.B., Parkin T.B., Moorman T.B., 2007. Rye cover crop and gamagrass strip effects on NO<sub>3</sub> concentration and load in tile drainage. *J. Environ. Qual.* 36: 1503-1511.
164. Katerji N., van Hoorn J.W., Hamdy A., Mastrorilli M., 2000. Salt tolerance classification of crops according to soil salinity and to water stress index. *Agr. Water Manage.* 43: 99-109.
165. Kebede H., Martín B., Nienhuis J., Jung G., 1994. Leaf anatomy of two *Lycopersicon* species with contrasting gas exchange properties. *Crop Sci.* 34: 108-113.
166. Khadri M., Tejera N.A., Lluch C., 2007. Sodium chloride-ABA interaction in two common bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars differing in salinity tolerance. *Environ. Exp. Bot.* 60: 211-218.
167. Khan A.A., Rao S.A., McNeilly T., 2003. Assessment of salinity tolerance based upon seedling root growth response functions in maize (*Zea mays* L.). *Euphytica* 131: 81-89.
168. Khan A.A., McNeilly T., 2005. Triple test cross analysis for salinity tolerance based upon seedling root length in maize (*Zea mays* L.). *Breeding Sci.* 55: 321-325.
169. Kindiger B., 1994. A method to enhance germination of eastern gamagrass. *Maydica* 39: 53-56.
170. Kindiger B., Blakey C.A., Dewald C., 1995. Sex reversal in maize x *Tripsacum* hybrids: allelic non-complementation of *ts2* and *gsf1*. *Maydica* 40: 187-190.
171. Kindiger B., Bai D., Sokolov V., 1996a. Assignment of a gene(s) conferring apomixis in *Tripsacum* to a chromosome arm: cytological and molecular evidence. *Genome* 39: 1133-1141.
172. Kindiger B., Sokolov V., Khatypova I.V., 1996b. Evaluation of apomictic reproduction in a set of 39 chromosome maize-*Tripsacum* backcross hybrids. *Crop Sci.* 36: 1108-1113.

173. Kindiger B., Dewald C.L., 1997. Reproductive versatility of eastern gamagrass, *Tripsacum dactyloides* (L.) L. Crop Sci. 37: 1351-1360.
174. Kolarovič L., Luxová M. Valentovič P., 2006. Effect of osmotic stress in early stages of ontogenesis on root respiration, growth, sugar content, and cell injury in maize seedlings differing in drought sensitivity. J. Integr. Plant Biol. 48: 814-822.
175. Kosegarten H., Koyro H.-W., 2001. Apoplastic accumulation of iron in the epidermis of maize (*Zea mays*) roots grown in calcareous soil. Physiol. Plantarum 113: 515-522.
176. Lacerda C.F., Assis Júnior J.O., Lemos Filho L.C.A., de Oliveira T.S., Guimarães F.V.A., Gomes-Filho E., Prisco J.T., Bezerra M.A., 2006. Morpho-physiological responses of cowpea leaves to salt stress. Braz. J. Plant Physiol. 18: 455-465.
177. Lawlor D.W., 2002. Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: stomata vs. metabolism and the role of ATP. Ann. Bot. 89: 871-885.
178. Leblanc O., Grimanelli D., González-de-León D. 1995a. Detection of the apomictic mode of reproduction in maize-*Tripsacum* hybrids using maize RFLP markers. Theor. Appl. Genet. 90: 1198-1203.
179. Leblanc O., Peel M.D., Carman J.G., Savidan Y., 1995b. Megasporogenesis and megagametogenesis in several *Tripsacum* species (Poaceae). Am. J. Bot. 82: 57-63.
180. Leblanc O., Dueñas M., Hernandez M., Bello S., García V. Berthaud J., Savidan Y., 1995c. Chromosome doubling in *Tripsacum*: the production of artificial, sexual tetraploid plants. Plant Breeding 114: 226-230.
181. Leblanc O., Grimanelli D., Islam-Faridi N., Berthaud J, Savidan Y., 1996. Reproductive behaviour in maize-*Tripsacum* polyhaploid plants; implications for the transfer of apomixis into maize. J. Hered. 87: 108-111.

182. Leblanc O., Grimaneli D., Hernandez-Rodríguez M., Galindo P.A., Soriano-Martinez A.M., Perotti E., 2009. Seed development and inheritance studies in apomictic maize-*Tripsacum* hybrids reveal barriers for the transfer of apomixis into sexual crops. *Int. J. Biol.* 53: 585-596
183. Leidi E.O., Silberbush M., Lips S.H., 1991. Wheat growth as affected by nitrogen type, pH and salinity. II. Photosynthesis and transpiration. *J. Plant Nutr.* 14: 247-256.
184. Leidi E.O., Pardo J., 2002. Tolerancia de los cultivos al estrés salino: qué hay de nuevo. *Revista de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias – Universidad Nacional de Rosario* 2. Disponible en: <http://www.fcagr.unr.edu.ar/Investigacion/revista/rev2/5.htm>
185. Li R., Shi F., Fukuda K., Yang Y. 2010. Effects of salt and alkali stresses on germination, growth, photosynthesis and ion accumulation in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Soil Sci. Plant Nutr.* 56: 725-733.
186. Li Y.G., Dewald C.L., Sims P.L., 1999. Genetic relationships within *Tripsacum* as detected by RAPD variation. *Ann. Bot.* 84: 695-702.
187. Lichtenthaler H.K., 1987. Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* 148: 350-382.
188. Liu X., Huang B., 2000. Heat stress injury in relation to membrane lipid peroxidation in creeping bentgrass. *Crop Sci.* 40: 503-510.
189. Lohaus G., Hussmann M., Pennewiss K., Schneider H., Zhu J.-J., Sattelmacher B., 2000. Solute balance of a maize (*Zea mays* L.) source leaf as affected by salt treatment with special emphasis on phloem retranslocation and ion leaching. *J. Exp. Bot.* 51: 1721-1723.
190. Longstreth D.J., Nobel P.S., 1979. Salinity effects on leaf anatomy. Consequences for photosynthesis. *Plant Physiol.* 63: 700-703.



191. Loomis, R.S., Connor, D.J., 1992. Cap. 11: Respiration and Partitioning. En "Crop ecology: productivity and management in agricultural systems". Cambridge University Press 538 p.
192. Lukina, L.A., Chistyakova, A.K., 1999. Abnormal behavior of chromosomes in meiosis of reduced maize-*Tripsacum* hybrids. Apomixis Newsletter. vol 11. Disponible en: <http://www.cimmyt.org/abc/researchprojects/apomixis/apomixisnews11/htm/APOMIXISNews11-4.htm>.
193. Luppoto E., Lusardi M.C., 1988. Secondary somatic embryogenesis from regenerating plantlets of the inbred line B79 of maize (*Zea mays* L.) switch from type 1 to type 2 callus and effect on the regenerative potential. Maydica 33: 163-177.
194. Lutts S., Kinet J.M., Bouharmont J., 1995. Changes in plant response to NaCl during development of rice (*Oryza sativa* L.) varieties differing in salinity resistance. J. Exp. Bot. 46: 1843-1852.
195. Lutts S., Kiner J.M., Bouharmont J., 1996. NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. Ann. Bot. 78: 389-398.
196. Lutts, S., Kinet, J.M. and Bouharmont, J., 1999. Improvement of rice callus regeneration in the presence of NaCl. Plant, Cell, Tissue and Organ Culture 57: 3-11.
197. MAA, Prov. de Buenos Aires., 2008. Guía para el uso y manejo de los recursos suelo y vegetación de la depresión del Salado.
198. MAA, Prov. De Buenos Aires., 2010. Programa Provincial Producción Ganadera. Disponible en: [http://www.maa.gba.gov.ar/dir\\_ganaderia/componente/PRODUCCION\\_DE\\_GANADOS\\_Y\\_CARNES.pdf](http://www.maa.gba.gov.ar/dir_ganaderia/componente/PRODUCCION_DE_GANADOS_Y_CARNES.pdf)
199. Maas E.V., Hoffman G.J., 1977. Crop salt tolerance, current assessment. J. Irrig. Drain. Div. ASCE 103: 115-134.

200. Maas E.V., Hoffman G.J., Chaba G.D., Poss J.A., Shanon M.C., 1983. Salt sensitivity of corn at various growth stages. *Irrigation Sci.* 4: 45-57.
201. Maas E.V., Grieve C.M., 1987. Sodium-induced calcium deficiency in salt-stressed corn. *Plant Cell Environ.* 10: 559-564.
202. Maguire M.P., 1961. Divergence in *Tripsacum* and *Zea* chromosomes. *Evolution* 15: 394-400.
203. Maguire M.P., 1962. Common loci in corn and *Tripsacum*. *J. Hered.* 53: 87-88.
204. Maiti R.K., Amaya L.E.D., Cardona S.L., Dimas A.M.O., De La Rosa-Ibarra M., De Leon Castillo H., 1996. Genotypic variability in maize cultivars (*Zea mays* L.) for resistance to drought and salinity. *J. Plant Physiol.* 148:741-744.
205. Major D.J., Rood S.B., Miller F.R., 1990. Temperature and photoperiod effects mediated by the sorghum maturity genes. *Crop Sci.* 30: 305-310.
206. Mangelsdorf P.C., Reeves R.G., 1931. Hybridization of maize, *Tripsacum* and *Euchlaena*. *J. Hered.* 22: 339-343.
207. Mansour M.M.F., 2000. Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. *Biol. Plant.* 43: 491-500.
208. Martinez-Ballesta M.C., Silva C., Lopez-Berenguer C., Cabañero F.J., Carvajal M., 2008. Boric acid and salinity effects on maize roots. Response of aquaporins ZmPIP1 and ZmPIP2, and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase, in relation to water and nutrient uptake. *Plant Biology* 8: 535-546.
209. Matzk F., Oertel C., Altenhofer P., Schubert I., 1997. Manipulation of reproductive systems in Poaceae to increase the efficiency in crop breeding and production. *Trends Agron.* 1: 19-34.

210. Mengel K., Schubert S., 1985. Active extrusion of protons into deionized water by roots of intact maize plants. *Plant Physiol.* 79: 344-348.
211. Miaczynski C., 1995. Los suelos hidromórficos e hidrohalomórficas de la provincia de Buenos Aires. *Rev. Fac. Agr. UBA* 15: 23-36.
212. Mishra, A., Choudhuri, M.A., 1999. Effects of salicylic acid on heavy metal-induced membrane deterioration mediated by lipoxygenase in rice. *Biol. Plant.* 42: 409-415.
213. Misra A.N., Sahu S.M., Meera I., Mohapatra P., Das N., Misra M. 1997. Root growth of a salt susceptible and a salt resistant rice (*Oryza sativa* L.) during seedling establishment under NaCl salinity. *J. Agron. Crop Sci.* 178: 9-14.
214. Molina M.C., García M.D., Chorzempa, S.E, 2006. Meiotic study of *Zea mays* ssp. *mays* (2n = 40) x *Tripsacum dactyloides* (2 n = 72) hybrid and its progeny. *Electron. J. Biotechnol.* 9: 276-280. Disponible en: <http://www.ejbiotechnology.info/index.php/ejbiotechnology/article/viewFile/v9n3-25/297>
215. Mueller J.P., Hall T.S., Spears J.F., Penny B.T., 2000. Winter establishment of eastern gamagrass in the Southern Piedmont. *Agron. J.* 92: 1184-1188.
216. Mühling K.H., Läuchli A., 2002. Effect of salt stress on growth and cation compartmentation in leaves of two plant species differing in salt tolerance. *J. Plant Physiol.* 159: 137-146.
217. Munns R., 1993. Physiological processes limiting plant growth in saline soil: some dogmas and hypotheses. *Plant Cell Environ.* 16: 15-24.
218. Munns R., Greenway H., Kirst G.O., 1983. Halotolerant eukaryotes. En: "Physiological Plant Ecology. II. Responses to the Chemical and Biological Environment". Lange O. L., Nobel P. S., Osmond C. B.,

- Zeigler H. H. (eds.). *Encyclopedia of Plant Physiol., New Series*, Vol. 12C, pp. 59–135. Springer-Verlag, Berlin.
219. Munns R., Schachtman D.P., Condon A.G., 1995. The significance of a two-phase growth response to salinity in wheat and barley. *Aust. J. Plant Physiol.* 22: 561-569.
220. Munns R., Rawson H.M., 1999. Effect of salinity on salt accumulation and reproductive development in the apical meristem of wheat and barley. *Aust. J. Plant Physiol.* 26: 459-464.
221. Munns R., Guo J., Passioura J.B, Cramer G.R., 2000a. Leaf water status controls day-time but not daily rates of leaf expansion in salt-treated barley. *Aust. J. Plant Physiol.* 27: 949-957.
222. Munns R., Hare R.A., James R.A., Rebetzke G.J., 2000b. Genetic variation for improving the salt tolerance of durum wheat. *Aust. J. Agric. Res.* 51: 69-74.
223. Munns R., Passioura J.B., Guo J., Chazen O., Cramer G.R., 2000c. Water relations and leaf expansion: importance of time scale. *J. Exp. Bot.* 51: 1495-1504.
224. Munns R., 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.* 25: 239-250.
225. Munns R., James R.A., 2003. Screening methods for salinity tolerance: a case study with tetraploid wheat. *Plant Soil* 253: 201-218.
226. Munns R., James R.A., Läuchli A., 2006. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *J. Exp. Bot.* 57: 1025-1043.
227. Munns R., Tester M., 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 651-81.
228. Navarro-Alvarez W., Baenziger P.S., Eskridge K.M., Hugo M., Gustafson V.D., 1994. Addition of colchicine to wheat anther culture media to increase doubled haploid plant production. *Plant Breeding* 112: 192-198.

229. 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.
230. Neumann P.M., 1993. Rapid and reversible modifications of extension capacity of cell walls in elongating maize leaf tissues responding to root addition and removal of NaCl. *Plant Cell Environ.* 16: 1107-1114.
231. Neves-Piestun B.G., Bernstein N., 2001. Salinity-induced inhibition of leaf elongation in maize is not mediated by changes in cell wall acidification capacity. *Plant Physiol.* 125: 1419-1428.
232. Neves-Piestun B.G., Bernstein N., 2005. Salinity-induced changes in the nutritional status of expanding cells may impact leaf growth inhibition in maize. *Funct. Plant Biol.* 32: 141-52.
233. Newell C.A., de Wet J.M.J., 1974. Morphology of some maize-*Tripsacum* hybrids. *Am. J. Bot.* 61: 45-53.
234. Niinemets Ü., 2010. A review of light interception in plant stands from leaf to canopy in different plant functional types and in species with varying shade tolerance. *Ecol. Res.* 25: 693-714.
235. Niu X., Zhu J.-K., Narasimhan M.L., Bressan R.A., Hasegawa P.M., 1993. Plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase gene expression is regulated by NaCl in cells of the halophyte *Atriplex nummularia* L. *Planta* 190: 433-438.
236. Ober E.S., Sharp R.E., 2003. Electrophysiological responses of maize roots to low water potentials: relationship to growth and ABA accumulation. *J. Exp. Bot.* 54: 813-824.
237. Oh D.-H., Leidi E., Zhang Q., Hwang S.-M., Li Y., Quintero F.J., Jiang X., Paino D'Urzo M., Lee S.Y., Zhao Y., Bahk .D., Bressan R.A., Yun D.-J., Pardo J.M., Bohnert H.J., 2009. Loss of Halophytism by Interference with SOS1 expression. *Plant Physiol.* 151: 210-222.

238. Pardo J.M., Cubero B., Leidi E.O., Quintero F.J. 2006. Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance. *J. Exp. Bot.* 57: 1181-1199.
239. Passioura J.B., Munns R., 2000. Rapid environmental changes that affect leaf water status induce transient surges or pauses in leaf expansion rate. *Aust. J. Plant Physiol.* 27: 941-948.
240. Pastenak D., DeMalach Y., Borovic, I., 1985. Irrigation with brackish water under desert conditions. II. The physiological and yield response of corn (*Zea mays*) to continuous irrigation with brackish water and to alternating brackish-fresh-brackish water irrigation. *Agric. Water Manage.* 10: 47-60.
241. Pesqueira J., García M.D., Molina M.C., 2003. NaCl tolerance in maize (*Zea mays* ssp. *mays* L.) x *Tripsacum dactyloides* L. hybrid calli and regenerated plants. *Span. J. Agr. Res.* 1: 59-63.
242. Pesqueira, J., García M.D., Staltari, S., Molina M.C., 2006. NaCl effects in *Zea mays* L. x *Tripsacum dactyloides* (L.) L. hybrid calli and plants. *Electron J. Biotechnol.* 9: 286-290. Disponible en: <http://www.ejbiotechnology.info/index.php/ejbiotechnology/article/view/File/v9n3-29/301>
243. Petrov D.F., Belousova E.S., Fokina E.S., Yatsenko R.M., Laykova L.I., 1971. Inheritance of elements of apomixis in the hybrids of *Zea mays* with *Tripsacum dactyloides*. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR* 20:961-963. Translation US National Research Council, Washington.
244. Peuke A.D., 2010. Correlations in concentrations, xylem and phloem flows, and partitioning of elements and ions in intact plants. A summary and statistical re-evaluation of modelling experiments in *Ricinus communis*. *J. Exp. Bot.*, 61(3): 635-655.
245. Pinhero R.G., Rao M.V., Paliyath G., Murr D.P., Fletcher R.A., 1997. Changes in activities of antioxidant enzymes and their relationship to

- genetic and paclobutrazol-induced chilling tolerance of maize seedlings. *Plant Physiol.* 114: 695-704.
246. Pitann B., Zörb C., Mühling K.H., 2009. Comparative proteome analysis of maize (*Zea mays* L.) expansins under salinity. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 172: 75-77.
247. Poorter H., Niinemets Ü., Poorter L., Wrigh I.J., Villar R., 2009. Causes and consequences of variation in leaf mass per area (LMA): a meta-analysis. *New Phytol.* 182: 565-588.
248. Pouliquin P., Boyer J.-C., Grouzis J.-P., Gibrat R., 2000. Passive nitrate transport by root plasma membrane vesicles exhibits an acidic optimal pH like the H<sup>+</sup>-ATPase. *Plant Physiol.* 122: 265–273.
249. Poustini, K., Siosemardeh A., 2004. Ion distribution in wheat cultivars in response to salinity stress. *Field Crops Res.* 85: 125-133.
250. Prischmann D.A., Dashiell K.E., Schneider D.J., Eubanks M.W., 2009. Evaluating *Tripsacum*-introgressed maize germplasm after infestation with western corn rootworms (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Appl. Entomol.* 133: 10-20.
251. Queirós F., Fontes N., Silva P., Almeida D., Maeshima M., Gerós H., Fidalgo F. 2009. Activity of tonoplast proton pumps and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in potato cell cultures is modulated by salt. *J. Exp. Bot.* 60: 1363-1374.
252. Ramagopal S., 1986. Protein synthesis in a maize callus exposed to NaCl and mannitol. *Plant Cell Rep.* 5: 430-434.
253. Randolph L.F., 1950. Crossability of maize and *Tripsacum* in relation to theories of the origin of maize. *Proc. VII Int. Bot. Congr., Stockholm*, pp. 179-180.
254. Rankins A. Jr., Shaw D.R., Douglas J., 2005. Response of perennial grasses potentially used as filter strips to selected postemergence herbicides. *Weed Technol.* 19: 73-77.

255. Rao B.G.S., Galinat W.C., 1974. Evolution of American Maydeae. 1. Characteristics of *Tripsacum* chromosomes (tr7 and tr13) that are partial homeologs to maize chromosome 4. *J. Heredity* 65: 335-340.
256. Rawson H.M., Richards R.A., Munns R., 1988. An examination of selection criteria for salt tolerance in wheat, barley and triticale genotypes. *Aust. J. Agric. Res.* 39: 759–772.
257. Ray J.D., Kindiger B., Dewald C.L. y Sinclair T.R., 1998. Preliminary survey of root aerenchyma in *Tripsacum. Maydica* 43: 49-53.
258. Ray J.D., Kindiger B. y Sinclair T.R., 1999. Introgressing root aerenchyma into maize. *Maydica* 44: 113-117.
259. Rechenthin C.A., 1951. Range grasses in the Southwest: eastern gamagrass, Texas cupgrass, Pan American balsomscale and smooth cordgrass. *Cattleman.* 38: 110-112.
260. Rengasamy P., 2006. World salinization with emphasis on Australia. *J. Exp. Bot.* 57: 1017-1023.
261. Ritchie, J.C., Kemper W.D., Englert J.M., and Krizek D.T., 2000. Grass hedges for erosion control. p. 283–289. *In* J.C. Ritchie *et al.* (ed.) Proc. 2nd Eastern Native Grass Symposium, Baltimore, MD, 17–19 Nov. 1999. USDA, Agricultural Research Service and USDA, Natural Resources Conservation Service, Beltsville, MD.
262. Ritchie J. C., Reeves III J. B., Krizek D. T., Foy C. D., Gitz III D.C., 2006. Fiber composition of eastern gamagrass forage grown on a degraded, acid soil. *Field Crops Res.* 97: 176-181.
263. Rodríguez A.A., Córdoba A.R., Ortega L., Taleisnik E., 2004. Decreased reactive oxygen species concentration in the elongation zone contribuyes to the reduction in maize leaf growth Ander salinity. *J. Exp. Bot.* 55: 1383-1390.
264. Rodríguez-Navarro A., Rubio F. 2006. High-affinity potassium and sodium transport systems in plants. *J. Exp. Bot.* 57: 1149-1160.



265. Saab I.N., Sharp R.E., Pritchard J., and Voetberg G.S., 1990. Increased endogenous abscisic acid maintains primary root growth and inhibits shoot growth of maize seedlings at low water potentials. *Plant Physiol.* 93: 1329-1336.
266. Sairam R.K., Srivastava G.C. 2001. Water stress tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.): variations in hydrogen peroxide accumulation and antioxidant activity in tolerant and susceptible genotypes. *J. Agron. Crop Sci.* 186: 63-70.
267. Sairam R.V., Wilber C., Franklin J., Smith B., Bazil J., Hassel R., Whaling D., Frutiger K., Blakey C.A., Vierling R., Goldman S.L., 2002. High-frequency callus induction and plant regeneration in *Tripsacum dactyloides* (L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 38: 435-440.
268. Salon P.R., Earle E.D., 1998. Chromosome doubling and mode of reproduction of induced tetraploids of eastern gamagrass (*Tripsacum dactyloides* L.). *Plant Cell Rep.* 17: 881-885.
269. Sánchez R.A., Hall A.J., Trapani N., Cohen de Hunau R., 1983. Effects of water stress on the chlorophyll content, nitrogen level and photosynthesis of leaves of two maize genotypes. *Photosynth. Res.* 4: 35-37.
270. Sanders, D., Bethke P., 2000. Membrane transport. En: "Biochemistry and Molecular Biology of Plants", B. Buchanan, W. Gruissem, and R. Jones (eds.). American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD.
271. 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.
272. Saneoka H., Nagasaka C., Hahn D.T., Yang W.-J., Premachandra G.S., Joly R.J., Rhodes D., 1995. Salt tolerance of glycinebetaine-deficient and -containing maize lines. *Plant Physiol.* 107: 631-638.

273. Santi S., Locci G., Pinton R., Cesco S., Varanini Z., 1995. Plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in maize roots Induced for NO<sub>3</sub> uptake. *Plant Physiol.* 109: 1277-1283
274. Sauter A., Dietz K.J., Hartung W., 2002. A possible stress physiological role of abscisic acid conjugates in root-to-shoot signaling. *Plant Cell Environ.* 25: 223-228.
275. Schubert S., Läuchli A., 1986. Na<sup>+</sup> exclusion, H<sup>+</sup> release, and growth of two different maize cultivars under NaCl salinity. *J. Plant Physiol.* 126: 145-154.
276. Schubert S., Läuchli A., 1990. Sodium exclusion mechanisms at the root surface of two maize cultivars. *Plant Soil* 123: 205-209.
277. Schubert S., 2009. Advances in alleviating growth limitations of maize under salt stress. The Proceedings of the International Plant Nutrition Colloquium XVI, Department of Plant Sciences, UC Davis, UC Davis. <http://escholarship.org/uc/item/891457b8>
278. Schubert S., Neubert A., Schierholt A., Sümer A., Zörb C., 2009. Development of salt-resistant maize hybrids: The combination of physiological strategies using conventional breeding methods. *Plant Sci.* 177: 196-202.
279. Shabala S., Shabala L., Van Volkenburgh E., Newman I., 2005. Effect of divalent cations on ion fluxes and leaf photochemistry in salinized barley leaves. *J. Exp. Bot.* 56: 1369-1378.
280. Sharp R.E., Silk W.K., Hsiao T.C., 1988. Growth of the maize primary root at low water potentials. I. Spatial distribution of expansive growth. *Plant Physiol.* 87: 50-57
281. Sharp R.E., 2002. Interaction with ethylene: changing views on the role of ABA in root and shoot growth responses to water stress. *Plant Cell Environ.* 25: 211-222.
282. Sharp R.E., Poroyko V., Hejlek L.G., Spollen W.G, Springer G.K, Bohnert H.J., Nguyen H.T., 2004. Root growth maintenance during

- water deficits: physiology to functional genomics. *J. Exp. Bot.* 55: 2343-2351.
283. Shavrukov Y., Sokolov V., Langridge P., Tester M., 2006. Interspecific hybrid, *Zea mays* L. x *Tripsacum dactyloides* L., a new fodder crop with large silage biomass production under abiotic stresses. Proceedings of the 13th Australian Agronomy Conference, 10-14 September 2006, Perth, Western Australia. Australian Society of Agronomy. Disponible en: [http://www.regional.org.au/au/asa/2006/poster/environment/4578\\_shavrukovy.htm](http://www.regional.org.au/au/asa/2006/poster/environment/4578_shavrukovy.htm)
284. Shi H., Quintero F.J., Pardo J.M., Zhu J.-K., 2002. The putative plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter SOS1 controls long-distance Na<sup>+</sup> transport in plants. *Plant Cell* 14: 465-477.
285. Shi H., Lee B.H., Wu S.J., Zhu J.K., 2003. Overexpression of a plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Biotechnol.* 21: 81-85.
286. Shukla U.C., Mukhi A.K., 1980. Ameliorative role of Zn, K, and gypsum on maize growth under alkali soil conditions. *Agron. J.* 72:85-88.
287. Sinclair T.R., 1986. Water and nitrogen limitations in soybean grain production. I: Model development. *Field Crops Res.* 15: 125-141.
288. 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.
289. Singh R.K., Mishra 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.
290. 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.
291. Sokolov V.A., Dewald C.L., Khatypova I.V., 2000. The genetic programs of nonreduction and parthenogenesis in corn-gamagrass hybrids are inherited and expressed in an independent manner. *Maize Genet. Coop. Newsletter* 74: 55-57.
292. Spickett C.M., Smirnoff N., Ratcliffe R.G., 1993. An in vivo nuclear magnetic resonance investigation of ion transport in maize (*Zea mays*) and *Spartina anglica* roots during exposure to high salt concentrations. *Plant Physiol.* 102: 629-638
293. Springer W.D., Green C.E., Kohn K.A., 1979. A histological examination of tissue culture initiation from immature embryos of maize. *Protoplasma* 101:269-281.
294. Stuart N.W., 1939. Comparative cold hardiness of scion roots from fifty apple varieties. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* 37: 330-334.
295. Sümer A., Zörb C., Yan F., Schubert S., 2004. Evidence of sodium toxicity for the vegetative growth of maize (*Zea mays* L.) during the first phase of salt stress. *J. Appl. Bot.* 78: 135-139.
296. Taiz L., Zeiger E., 2002. *Plant Physiol.* Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, USA.
297. Talbert, L.E., Doebley J., Larson S.R., Chandler A.V.L., 1990. *Tripsacum andersonii* is a natural hybrid involving *Zea* and *Tripsacum*: molecular evidence. *Amer. J. Bot.* 77: 722-726.
298. Taleisnik E., Rodríguez A.A., Bustos D., Erdei L., Ortega L., Senn M.E., 2009. Leaf expansion in grasses under salt stress. *J. Plant Physiol.* 166: 1123-1140.
299. Tester M., Davenport R., 2003. Na<sup>+</sup> tolerance and Na<sup>+</sup> transport in higher plants. *Ann. Bot.* 91: 503-527.

300. Thiagarajah M., Fry S.C., Yeo A.R., 1996. *In vitro* salt tolerance of cell wall enzymes from halophytes and glycophytes. J. Exp. Bot. 47: 1717-1724.
301. Throne J.E., Eubanks M.W., 2002. Resistance of Tripsacorn to *Sitophilus zeamais* and *Oryzaephilus surinamensis*. J. Stored Prod. Res. 38: 239-245.
302. Tomes D.T., Smith O.S., 1985. The effect of parental genotype on initiation of embryonic callus from elite maize (*Zea mays* L). Theor. Appl. Genet. 70: 505-509.
303. Tracy F.E., Gilliham M., Dodd A.N., Webb A.A.R., Tester M., 2008. NaCl-induced changes in cytosolic free  $Ca^{2+}$  in *Arabidopsis thaliana* are heterogeneous and modified by external ionic composition. Plant Cell Environ. 31: 1063-1073.
304. Tricart J., 1973. La geomorfología de la Pampa Deprimida como base para los estudios edafológicos y agronómicos. Plan mapa de suelos de la región Pampeana, INTA. Buenos Aires. XII colección científica. 202 p.
305. Tsoukrianis N., Peña-Valdivia C.B., Trejo L.C., Molina G.J., Sánchez-Urdaneta A.B., 2007. Permeabilidad de las membranas radicales de maíz de alta calidad proteica (QPM) en sustrato deshidratado. Rev. Fav. Agron. (LUZ) 24: 260-264.
306. Tuna A.L., Kaya C., Dikilitas M., Higgs D., 2008. The combined effects of gibberellic acid and salinity on some antioxidant enzyme activities, plant growth parameters and nutritional status in maize plants. Environ. Exp. Bot. 62: 1-9
307. Turan M.A., Elkarim A.H.A., Taban N., Taban S., 2009. Effect of salt stress on growth, stomatal resistance, proline and chlorophyll concentrations on maize plant. Afr. J. Agr. Res. 4: 893-897.
308. USDA-ARS, 2009. United States Salinity Laboratory, Riverside, CA, USA. Disponible en: <http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?>

docid=8908

309. Valentovič P., Luxová M., Kolarovič L., Gašparíková O., 2006. Effect of osmotic stress on compatible solutes content, membrane stability and water relations in two maize cultivars. *Plant Soil Environ.* 52: 186-191.
310. Van Esbroeck G.A., Hussey M.A., Sanderson M.A., 1997. Leaf appearance rate and final leaf number of switchgrass cultivars. *Crop Sci.* 37: 864-870.
311. Van Lammeren, A.A.M., 1988. Observations on the structural development of immature maize embryos (*Zea mays* L.) during in vitro culture in presence or absence of 2,4-D. *Acta Bot. Neerl.* 37:49-61.
312. Vázquez P., Costa J.L., Monterubbiansi G., Godz P., 2001. Predicción de la productividad primaria de pastizales naturales de la pampa deprimida utilizando propiedades del Horizonte A. *Cienc. suelo* 19: 136-143.
313. Vázquez P., Rojas M.C., 2006. Zonificación agro- ecológica del área de Influencia de la EEA Cuenca del Salado. Disponible en: <http://www.inta.gov.ar/cuenca/info/documentos/sig-eledet/zonificacion.pdf>
314. Vázquez P., Masuelli S., Platzeck G., 2006. Determinación de patrones espectrales para distintos usos del suelo en ambientes heterogéneos. INTA, EEA Cuenca del Salado. <http://www.inta.gov.ar/cuenca/info/documentos/sig-teledet/patrones.pdf>
315. Veselov D.S., Sharipova G.V., Veselov S.U., Kudoyarova G.R., 2008. The effects of NaCl treatment on water relations, growth, and ABA content in barley cultivars differing in drought tolerance. *J. Plant Growth Regul.* 27: 380-386.
316. Veselov D.S., Sharipova G.V., Akhiyarova G.R., Kudoyarova G.R., 2009. Fast growth responses of barley and durum wheat plants to

- NaCl- and PEG-treatment: resolving the relative contributions of water deficiency and ion toxicity. *Plant Growth Regul.* 58: 125-129.
317. Waditee R., Tanaka Y., Takabe T. 2006. Cap 11.  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporters in plants and cyanobacteria. En: "Abiotic Stress Tolerance in Plants" Rai A. K., Takabe T. (eds.), 163-175. Springer, the Netherlands.
318. Wan X.C., 2010. Osmotic effects of NaCl on cell hydraulic conductivity of corn roots. *Acta Bioch. Bioph. Sin.* 42: 351-357.
319. Wan Y., Petolino J.F., Widholm J.M., 1989. Efficient production of doubled haploid plants through colchicine treatment of anther-derived maize callus. *Acta Bot. Neerl.* 37: 49-61.
320. Wang D., Wilson C., Shannon M.C., 2002. Interpretation of salinity and irrigation effects on soybean canopy reflectance in visible and near-infrared spectrum domain. *Int. J. Remote Sens.* 23: 811-824.
321. 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.
322. Wang Z., Huang B., 2004. Physiological recovery of Kentucky bluegrass from simultaneous drought and heat stress. *Crop Sci.* 44: 1729-1736.
323. Warrington, I.J., E.T. Kanemasu., 1983. Corn growth response to temperature and photoperiod. I. Seeding emergence, tassel initiation, and anthesis. *Agron. J.* 75: 749-754.
324. Weatherley P.E., 1950. Studies in the water relations of the cotton plant. I. The field measurement of water deficits in leaves. *New Phytol.* 49: 81-97.
325. Westgate M.E.; Boyer J.S., 1985. Osmotic adjustment and the inhibition of leaf, root, stem and silk growth at low water potentials in maize. *Planta* 164: 540-549.

326. Whitlow T.H., Bassuk N.L., Ranney T.G., Reichert D.L., 1992. An improved method for using electrolyte leakage to assess membrane competence in plant tissues. *Plant Physiol.* 98: 198-205.
327. Wilkes H.G., 1979. Mexico and Central America as a center for the origin of agriculture and the evolution of maize. *Crop. Improv.* 6: 1-18.
328. Wolf O., Munns R., Tonnet M.L., Jeschke W.D., 1990. Concentrations and transport of solutes in xylem and phloem along the leaf axis of NaCl-treated *Hordeum vulgare*. *J. Exp. Bot.* 41: 1133-1141.
329. Wright L.S., Taliaferro C.M., Horn F.P., 1983. Variability of morphological and agronomic traits in eastern gamagrass accessions. *Crop Sci.* 23: 135-138.
330. Yamaguchi T., Blumwald E., 2005. Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. *Trends Plant Sci.* 10: 615-620.
331. Yang C., Guo W., Shi D., 2010. Physiological roles of organic acids in alkali-tolerance of the alkali-tolerant halophyte *Chloris virgata*. *Agron. J.* 102: 1081-1089.
332. Yeo A.R., Flowers T.J., 1983. Varietal differences in the toxicity of sodium ions in rice leaves. *Physiol. Plantarum* 59: 189-195.
333. Yeo A.R., Lee, K.-S., Izard P., Boursier P.J., Flowers T.J., 1991. Short- and long-term effects of salinity on leaf growth in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Exp. Bot.* 42: 881-889.
334. Zhang J., Jia W., Yang J., Ismail A.M. 2006. Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. *Field Crops Res.* 97: 111-119.
335. Zhao K.F., Song J., Fan H., Zhou S., Zhao M. 2010. Growth response to ionic and osmotic stress of NaCl in salt-tolerant and salt-sensitive maize. *J. Integr. Plant Biol.* 52: 468-475.
336. Zhu C., Schraut D., Hartung W., Scha A.R., 2005. Differential responses of maize MIP genes to salt stress and ABA. *J. Exp. Bot.* 56: 2971-2981.



337. Zhu G.Y., Kinet J.-M., Lutts S., 2004. Characterisation of rice (*Oryza sativa*) F3 populations selected for salt resistance. 2. Relationship between yield-related parameters and physiological properties. Aust. J. Exp. Agr. 44: 333-342.
338. Zhu J.-K., 2001. Plant salt tolerance. Trends in Plant Sci. 6: 66-71.
339. Zidan I., Azaizeh H., Neumann P.M., 1990. Does salinity reduce growth in maize root epidermal cells by inhibiting their capacity for cell wall acidification? Plant Physiol. 93: 7-11.
340. Zidan I., Jacoby B., Ravina I., and Neumann P.M., 1991. Sodium does not compete with calcium in saturating plasma membrane sites regulating  $^{22}\text{Na}$  influx in salinized maize roots. Plant Physiol. 96: 331-334.
341. Zörb C., Schmitt S., Neeb A., Karla S., Linder M., Schubert S., 2004. The biochemical reaction of maize (*Zea mays* L.) to salt stress is characterized by a mitigation of symptoms and not by a specific adaptation. Plant Sci. 167: 91-100.
342. Zörb C., Stracke B., Tramnitz B., Denter D., Sümer, A., Mühling K.-H., Yan F., Schubert S., 2005a. Does  $\text{H}^+$  pumping by plasmalemma ATPase limit leaf growth of maize (*Zea mays* L.) during the first phase of salt stress? J. Plant Nutr. Soil Sc. 168: 550-557.
343. Zörb C., Noll A., Karl S., Leib K., Yan F., Schubert S. 2005b. Molecular characterization of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporters (ZmNHX) of maize (*Zea mays* L.) and their expression under salt stress. J. of Plant Physiol. 162: 55-66.