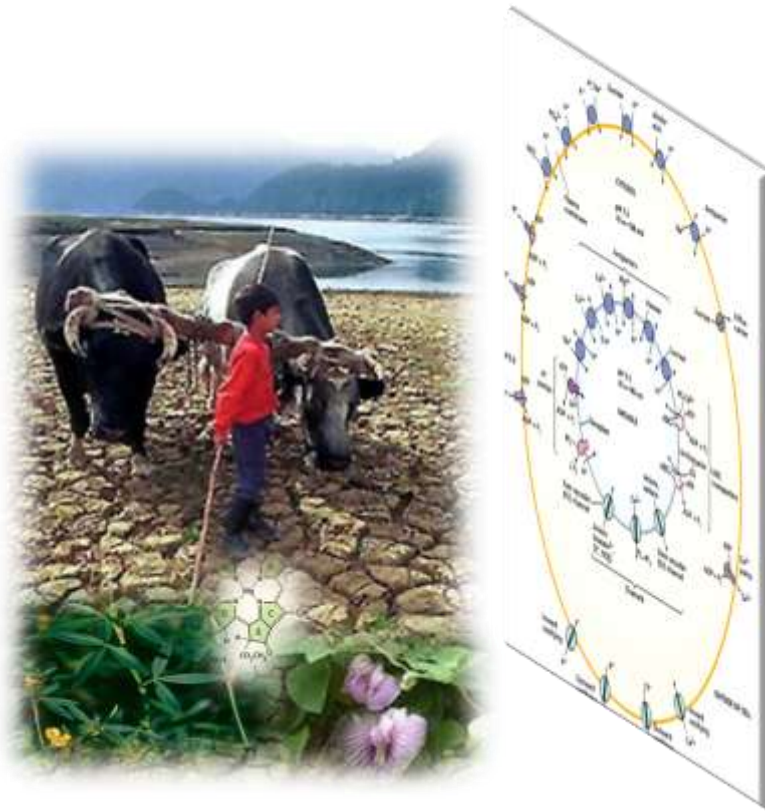




UNIVERSIDAD DE MATANZAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS



**Respuesta a estrés salino de *Stylosanthes guianensis*
(Aubl.) Sw. cv. CIAT-184 y *Centrosema molle* (Mart.)
Benth. cv. CIAT-15160**

Tesis en opción al grado académico de Máster en Ciencias Agrícolas

Aspirante: Lic. Yunel Pérez Hernández
Tutores: Lic. Leticia Fuentes Alfonso, Dr.C.
Lic. Anesio Mesa Sardiñas, Dr.C.

Matanzas, 2016

AGRADECIMIENTOS

Cuando a alguien tiene en sus manos un documento de este tipo, aunque sea por simple curiosidad; por lo general dedica un momento para hojear esta página de agradecimientos. Siempre en espera de ver quiénes aportaron más a la obra o tienen un mayor significado para el autor. En esta ocasión siento decepcionarlos. Ordenar a las personas que han contribuido a mi formación profesional hasta esta etapa es demasiado complejo, pudiera ser injusto y no creo que valga la pena. Los que me conocen (también me conocieron y hoy no están físicamente) y son mis amigos, saben lo que ha significado para mí su apoyo y dedicación en cada momento.

RESUMEN

Stylosanthes guianensis (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184 y *Centrosema molle* cv. CIAT-184, son leguminosas forrajeras promisorias para el desarrollo de la ganadería en Cuba, las cuales han sido utilizadas para la alimentación animal por sus propiedades nutritivas. La búsqueda y la creación de variedades y/o genotipos tolerantes a estrés salino, constituye un tema de actualidad e interés mundial. Sin embargo, para la selección de los mismos se precisa del conocimiento relativo a los mecanismos fisiológicos y bioquímicos antiestrés en las plantas. Esto permite establecer cuáles indicadores pueden ser considerados como eficaces, para la selección de los genotipos o variedades más tolerantes a salinidad. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la respuesta morfológica, fisiológica y bioquímica de *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184 y *Centrosema molle* Mart. ex Benth. en condiciones de estrés salino, durante los primeros estadios de crecimiento y desarrollo vegetativo. Se desarrollaron dos experimentos, uno en la etapa de germinación y otro durante la siguiente fase de elongación. Las semillas y las plántulas se sometieron a diferentes concentraciones de cloruro de sodio y se evaluó la respuesta mediante indicadores morfológicos, fisiológicos, bioquímicos e histológicos. La germinación de las plántulas se logró en los medios suplementados hasta 250 mmol.L⁻¹ de NaCl. No obstante, se observó una disminución del porcentaje de germinación y los índices de vigor, con el aumento de la concentración de la sal en el medio. El índice estomático no mostró variación entre las plantas control y las sometidas a 200 mmol.L⁻¹ de NaCl en ambas especies; sin embargo, hubo una disminución en la densidad estomática en condiciones estresantes en las dos leguminosas, por lo que se sugirió este indicador como criterio de tolerancia. En ambas especies se obtuvieron valores elevados de peso seco en 200 mmol.L⁻¹ de la sal, por lo que se propuso el uso del peso seco como indicador de tolerancia a salinidad en la fase vegetativa. De manera similar, Stylo cv. CIAT-184 mostró una estabilidad clorofílica y un aumento en la relación raíz/brote en condiciones de alta concentración de NaCl, lo cual puede indicar la presencia de mecanismos fisiológicos y bioquímicos de tolerancia a estrés salino en esta especie. Por ello, también se sugirió el empleo de ambos indicadores para la selección de genotipos tolerantes, en programas de mejoramiento genético de *S. guianensis* (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184.

ABSTRACT

Stylosanthes guianensis (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184 and *Centrosema molle* cv. CIAT-184, are promissory forage leguminous species for Cuban stockbreeding development, which have been used for animal feed due to its nutritive properties. The search and development of varieties and/or genotypes tolerant to salt stress, is a current issue of worldwide interest. However, the selection of those tolerant plants requires the relative knowledge of plant anti-stress physiological and biochemical parameters. This allow standing which parameters are affective to select the most salt-tolerant genotypes or varieties. The aim of the present work was to evaluate the morphological, physiological and biochemical response of *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184 and *Centrosema molle* Mart. ex Benth. under salt stress conditions, in the first vegetative growing and development stages. Two experiments were carried out, on the germination period and the subsequent shoot-elongation stage. Seeds and plantlets were allowed to growth under different concentrations of sodium chloride. The response was evaluated by using morphological, physiological, biochemical and histological parameters. Plantlets germination was achieved on media supplemented up to 250 mmol.L⁻¹ of NaCl. Nevertheless, the higher de concentration of NaCl in the medium, the lower the percentage of germination and vigor indexes of the plants. The stomata index showed no variation between control and stressed plantlets (200 mmol.L⁻¹ of NaCl); however, the stomata density decreased in stressed plants, which suggested the use of this parameter as tolerance selection criterion. Both species showed higher values of dry weight at 200 mmol.L⁻¹ of the salt employed. This parameter was also considered for the selection of tolerant genotype on the vegetative stage. Similarly, Stylo cv. CIAT-184 showed a chlorophyll stability and an increased on the root/shoot ratio under high concentration of sodium chloride, which may indicate the presence of physiological and biochemical mechanisms of tolerance to salinity in this specie. This fact also suggest the used of both parameters for selecting tolerant genotype of *S. guianensis* (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184.

ABREVIATURAS

&: simbología de enlace entre dos elementos
µg: microgramo
µL: microlitro
ADN: ácido desoxirribonucleico
ABA: ácido abscísico
ARN: ácido ribonucleico
ARNm: ácido ribonucleico mensajero
miARNs: ácidos ribonucleicos de bajo peso molecular con función regulatoria postranscripcional
°C: grados Celsius
CAT: catalasas
CC: capacidad de campo
EE: error estándar de la media
EROs: especies reactivas del oxígeno
h: horas
ha: hectáreas
L: litros
min.: minutos
mg: miligramos
mL: mililitros
mm: milímetros
mmol: milimole
PAL: fenilalanina amonio liasa
PER: peroxidasas
Pf: peso fresco
Ps: peso seco
p/v: peso / volumen (concentración)
RCP: reacción en cadena de la polimerasa
rpm: revoluciones por minuto
SOD: superóxido dismutasa
Stylo 184: *Stylosanthes guianensis* (Aublet) Sw. cv. CIAT-184
vs: *versus*
v/v: volumen/volumen (concentración)

ÍNDICE

Pág.

1	INTRODUCCIÓN	1
	1.1. Hipótesis.....	4
	1.2. Objetivo general.....	4
	1.3. Objetivos específicos.....	4
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
	2.1. Género <i>Stylosanthes</i> Sw.....	5
	2.1.1. Importancia del género <i>Stylosanthes</i> Sw.....	5
	2.1.2. Descripción botánica de <i>Stylosanthes guianensis</i> (Aubl.) Sw.	6
	2.2. Género <i>Centrosema</i> Benth.....	7
	2.2.1. Importancia del género <i>Centrosema</i> Benth.....	7
	2.2.2. Descripción botánica de <i>Centrosema molle</i> (Mart.) Benth.....	8
	2.3. Efecto de la salinidad en las plantas.....	9
	2.3.1. Concepto de estrés salino.....	9
	2.3.2. Clasificación de las especies según el grado de tolerancia a salinidad.....	9
	2.3.3. Efecto del estrés salino sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas.....	10
	2.3.3.1. El estrés osmótico	10
	2.3.3.2. Desbalance nutricional y toxicidad iónica.....	12
	2.3.3.3. El estrés oxidativo.....	14
	2.4. Mecanismos de respuesta a salinidad en las plantas.....	16
	2.4.1. Ajuste osmótico.....	16
	2.4.2. Control de la homeostasis iónica.....	17
	2.4.3. Eliminación de las EROs	19
	2.4.4. Tolerancia de los tejidos al ión sodio.....	21
	2.5. Regulación de la respuesta al estrés salino.....	21
	2.6. Caracteres diagnósticos para la identificación de tolerancia al estrés salino.....	26
3	MATERIALES Y MÉTODOS	30
	3.1. Material vegetal	30
	3.2. Desinfección y escarificación de material vegetal.....	30
	3.3. Germinación de <i>S. guianensis</i> (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184 y <i>C. molle</i> (Mart.) Benth cv. CIAT-15160 en presencia de NaCl	30
	3.4. Crecimiento temprano de <i>S. guianensis</i> cv. CIAT-184 y <i>C. molle</i> cv. CIAT-15160 en presencia de NaCl.....	32
	3.4.1. Determinación de indicadores morfofisiológicos	33
	3.4.2. Determinación de indicadores bioquímicos.....	33

3.4.2.1. Determinación del contenido de fenoles.....	33
3.4.2.2. Determinación del contenido de clorofila.....	33
3.4.2.3. Determinación del índice de estabilidad clorofílica.....	34
3.5. Estudio de la epidermis en condiciones de salinidad.....	34
3.6. Diseño experimental y análisis estadístico.....	35
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
4.1. Respuesta de <i>S. guianensis</i> (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184 y <i>C. molle</i> (Mart.) Benth cv. CIAT-15160 durante la germinación en condiciones salinas.....	36
4.1.1. Porcentaje y velocidad de germinación.....	36
4.1.2. Efecto del NaCl sobre la longitud de la radícula, el vástago y el vigor de las plántulas.....	39
4.1.3. Distribución de la biomasa.....	43
4.2. Respuesta a salinidad de <i>S. guianensis</i> cv. CIAT-184 y <i>C. molle</i> cv. CIAT- 15160 durante el crecimiento vegetativo temprano.....	46
4.2.1. Caracteres bioquímicos y fisiológicos.....	46
4.2.1.1. Contenido de fenoles.....	46
4.2.1.2. Contenido de clorofilas.....	49
4.2.1.3. Índice de estabilidad clorofílica.....	51
4.2.2. Peso fresco y peso seco.....	52
4.2.2.1. Relación raíz/brote.....	56
4.3. Estudio de la epidermis en condiciones de salinidad.....	58
4.3.1. Caracteres generales de la epidermis.....	58
4.3.2. Efecto del NaCl sobre la epidermis.....	59
5. CONCLUSIONES.....	63
6. RECOMENDACIONES.....	64
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

1. INTRODUCCIÓN

La búsqueda de variedades vegetales tolerantes a estrés salino constituye uno de los tópicos importantes del sector agropecuario, para incrementar los rendimientos de cultivos de interés agrícola y agropecuario en áreas afectadas por salinidad; así como lograr un mayor aprovechamiento de los suelos afectados por este estrés ambiental. Esta situación se hace más agravante por el hecho de que la humanidad se encuentra de una etapa de crisis medio ambiental, donde el peligro del cambio climático puede conllevar a largos períodos de hambruna, ya que se pueden afectar los ecosistemas agroproductivos donde se concentran las producciones agrícolas y pecuarias en el mundo (Flowers y Muscolo, 2015).

En Cuba, la producción ganadera se basa en la utilización de los pastos y forrajes como principal fuente de alimentación (Ruiz *et al.*, 2007). Por lo tanto, numerosos investigadores se han centrado en estudios de tolerancia a estrés salino de numerosas especies de uso en la alimentación animal. Entre estas, las leguminosas forrajeras poseen un alto valor por el contenido proteico presente en los tejidos y además, por la función nitro fijadora que desempeñan en los agroecosistemas destinados a esta actividad.

Entre los géneros investigados se encuentra *Stylosanthes* Swartz, el cual es considerado una de las fuentes más importantes de pastos tropicales naturales. Su explotación se debe a numerosas bondades entre las que se destacan su habilidad para restaurar la fertilidad y mejorar las propiedades físicas de los suelos, proveer una vegetación permanente como cobertura, constituir un forraje nutritivo para los animales, actuar como control biológico de la garrapata y su uso como herbicida natural en plantaciones de arroz (Fernández *et al.*, 2004; Chandra *et al.*, 2006).

Otro género que ha recibido una notable atención es *Centrosema* Benth, sobre el cual se han realizado numerosos estudios en diversos países. Este género comprende aproximadamente unas 35 especies originarias de diversas regiones de América (Clements, 1987). Al igual que *Stylosanthes* posee un alto valor nutricional y se emplea como cobertura vegetal en los pastizales (Williams *et al.*, 1984).

Los estudios de identificación y caracterización de variedades tolerantes a salinidad se han basado en diversos criterios como la productividad, la supervivencia, el vigor, la altura y las velocidades relativas de crecimiento; además de una lista amplia de indicadores fisiológicos y bioquímicos como la concentración de clorofila, el contenido relativo de agua, el contenido de proteína, el contenido de prolina libre y la actividad de enzimas antioxidantes, entre otros (Gama *et al.*, 2007; Bojorquez-Quintal *et al.*, 2015; Garcia de la Garma *et al.*, 2015; Shafi *et al.*, 2015).

El estudio de la respuesta al estrés salino por las plantas constituye uno de los enfoques de mayor actualidad en el campo de la Fisiología Vegetal. A pesar de los avances en áreas importantes como la bioquímica y la biología molecular, todavía faltan muchos aspectos por interpretar de la relación que se establece entre la planta y el medio ambiente.

La salinidad de los suelos representa uno de los problemas fundamentales que afronta la agricultura actual. A nivel mundial, el 20 % de las tierras irrigadas destinadas a esta actividad están afectadas por concentraciones elevadas de sales, con predominio del cloruro de sodio, cuya amplia distribución y elevada solubilidad ocasionan el proceso de la salinización (Munns y Tester, 2008). En Cuba, más de un millón de hectáreas están afectadas por esta condición y se estima que existe un área similar en peligro de salinización, lo que representa en su conjunto un 15 % del área total que se destina a la actividad agrícola (Castaño, 2009). Además, aproximadamente el 42 % de los suelos ganaderos, localizados principalmente en las provincias orientales, están afectados por las sales (Ramírez *et al.* 1999).

El estrés salino constituye uno de los factores abióticos más importantes que limitan la productividad de los cultivos (Mane *et al.*, 2011). Las altas concentraciones de sales en el suelo inducen el estrés osmótico en las plantas y la entrada excesiva de los iones hacia los tejidos vegetales, provoca un desbalance iónico que conlleva a la toxicidad y a trastornos en el metabolismo celular (Wen-Yuan *et al.*, 2012; Mervat y Dawood, 2014).

Los cambios en el potencial osmótico del suelo por la presencia de sales, provocan el aumento de especies reactivas del oxígeno (EROs) en las plantas. Estos compuestos ocasionan daños a macromoléculas importantes como proteínas, ácidos nucleicos y lípidos constituyentes de membranas biológicas, que aumenta la permeabilidad de las mismas y ocasiona trastornos en el funcionamiento de orgánulos importantes como los cloroplastos y las mitocondrias (Heidari y Golpayegani, 2012; Sabra *et al.*, 2012).

Como resultado de estos cambios fisiológicos y bioquímicos se afectan un gran número de procesos biológicos como la germinación, el crecimiento vegetativo, el vigor, la floración y la fructificación (Hassen *et al.*, 2014; El Goumi *et al.*, 2014; Kandil *et al.*, 2016).

Los vegetales presentan numerosos mecanismos que contribuyen a atenuar las consecuencias del estrés salino. En general, las respuestas están enfocadas a contrarrestar el estrés osmótico, la toxicidad debida a la excesiva absorción de iones cloruro y sodio, el restablecimiento de la homeostasis iónica y la reanudación de la división celular (Tester, 2003).

Estudios realizados por numerosos autores mostraron un aumento en la expresión de compuestos osmóticamente activos como aminoácidos, azúcares polialcoholes, aminas, entre otros (Kumari *et al.*, 2014), que contribuyen a mantener la estabilidad de las macromoléculas y restituyen el balance osmótico entre el medio intracelular y extracelular (Nazarbeygi *et al.*, 2011). Otros mecanismos bioquímicos como la exclusión de iones y la acumulación de éstos en orgánulos como la vacuola, contribuyen a mantener un balance iónico adecuado en los tejidos vegetales y reducen la toxicidad que provocan los mismos en los orgánulos y el citoplasma (Sperlinga *et al.*, 2014; Ganehan *et al.*, 2016).

La capacidad que presentan las plantas para eliminar las EROs constituye un elemento importante para tolerar los estreses ambientales (Hu *et al.*, 2012). El sistema antioxidante de los vegetales incluye, entre otros compuestos, enzimas antioxidantes tales como la superóxido dismutasa, la catalasa y las peroxidasas, así como sustancias de naturaleza no proteica como carotenoides, flavonoides y fenoles. La expresión de tales compuestos aumenta, de manera general, en

diferentes condiciones de estrés abiótico (Chookhampaeng, 2011; Haghghi *et al.*, 2014; Santhanakrishnan *et al.*, 2014; Kumar y Chand, 2015).

El conocimiento sobre los mecanismos de tolerancia a salinidad representa una base indispensable en los programas de mejora vegetal, para la creación de nuevas variedades resistentes a salinidad, así como para el aprovechamiento óptimo de los recursos agua, suelo y planta (Almodares *et al.*, 2014; Flowers y Muscolo, 2015). En este sentido, *Stylosanthes* Sw. y *Centrosema* Benth. constituyen un material promisorio para las investigaciones de tolerancia a salinidad, ya que ambos se destacan por su adaptación a diferentes tipos de suelos, clima y su potencial productivo.

De ahí que se propone la **hipótesis** de trabajo siguiente:

“Mediante la evaluación de los procesos de la germinación y el crecimiento vegetativo de *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184 y *Centrosema molle* Mart. ex Benth. Cv. CIAT-15160, en diferentes concentraciones de cloruro de sodio, es posible determinar indicadores de tolerancia a estrés salino”.

Para comprobar esta hipótesis se enunciaron los objetivos siguientes:

Objetivo general

Identificar indicadores morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y anatómicos de tolerancia a estrés salino en *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT-184 y *Centrosema molle* cv. CIAT-15160, durante los primeros estadios de desarrollo vegetativo.

Como **objetivos específicos** se plantearon los siguientes:

1. Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de NaCl durante el proceso de germinación de *S. guianensis* cv. CIAT-184 y *C. molle* cv. CIAT-15160 mediante indicadores morfológicos y fisiológicos.
2. Evaluar la respuesta fisiológica, bioquímica y anatómica de *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184 y *Centrosema molle* Mart. ex Benth. Cv. CIAT-15160 en condiciones de estrés salino durante la fase de elongación posterior a la germinación.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Género *Stylosanthes* Sw.

El género *Stylosanthes* (Leguminosae– Papilionoidae - Aeschynomeneae, Polhill y Raven, 1981), es endémico de América Central, América del Sur, África, antiguo Ceilán y Sureste de la India, con un centro de diversificación biológica en Brasil (Consoli *et al.*, 1996). Se han estimado aproximadamente 40 especies tropicales y subtropicales, las cuales están ubicadas en dos secciones: *Stylosanthes* Sw. y *Styposanthes* J. Vogel (Kirkbridge y de Kirkbridge, 1985). Las opiniones sobre la taxonomía del género han sido muy diversas lo cual ha provocado diferentes criterios de clasificación; por lo que se informa un número variable de subespecies y variedades, en dependencia de una u otra posición taxonómica (William *et al.*, 1984).

2.1.1. Importancia del género *Stylosanthes* Sw.

Existe un consenso generalizado sobre la necesidad de incluir leguminosas forrajeras en las explotaciones ganaderas como parte de la dieta de los animales, por el valor nutricional de las mismas y por la contribución a la mejora en la calidad de los suelos. El género *Stylosanthes*, a pesar de ser pequeño, es considerado una de las fuentes más importantes de pastos tropicales naturales, pues en él se ubican cerca de la tercera parte de todas las variedades comerciales de leguminosas pastables (Williams *et al.*, 1984). *S. humilis* Kunth y *S. guianensis* fueron las primeras especies reconocidas desde comienzos del siglo XX.

La colección y búsqueda de especies de *Stylosanthes* ha permitido descubrir otras especies que poseen características de importancia potencial para los mejoradores vegetales. Esto incluye a *S. scabra* J. Vog. un poliploide que es resistente al fuego y adaptado a suelos ácidos (Edye, 1984), *S. hamata* L. y *S. macrocephala* Sw., los cuales son tolerantes a la antracnosis (Sousa Costa y Ferreira, 1984), la enfermedad que más afecta al cultivo. Los daños causados por ella, han impulsado programas de mejora genética encaminados a lograr una mayor diversidad de genes de resistencia en cultivares de *S. scabra* en Australia y de *S. guianensis* en América del Sur.

En Cuba se han identificado tres especies: *Stylosanthes hamata* L., *Stylosanthes viscosa* Sw. y *Stylosanthes tuberculata* Kunth., las dos primeras muy extendidas por Jamaica y América del Sur y la última crece en Camagüey y Cayo Romano (Machado y Chao, 1980).

2.1.2. Descripción botánica de *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw.

Stylosanthes guianensis (Aubl.) Sw. es una planta decumbente con raicillas en los primeros nodos, tallos esponjosos, pubescente con el envés de color más claro, estípulas soldadas formando un tubo con pelos glandulares, flores con 6 mm en 5 glomérulos apicales, que maduran de una en una. Estandarte amarillo con rayas rojo pardas en el interior, alas con apéndice de 1 mm, estambres monadelfos y vainas de una sola semilla incluida en el cáliz.

La planta típica tiene una forma radial de crecimiento con ramas finas, flexibles y postradas, que parten del eje central profundamente enraizado (Figura 1). De las ramas radiales crecen los brotes que se sostienen erectos hasta una altura de un metro, cayendo sobre sí mismo debido al peso y formándose un entramado de tallos lignificados de la cual crecen nuevos tallos erectos.



Figura 1. Planta de *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. Fuente: <https://www.google.com/cu/imgres?imgurl=http://Stylosanthesguianensis/>.

Las hojas son trifoliadas con folíolos de 15 a 55 mm de longitud y, aunque la raíz principal alcanza hasta un metro en el suelo, alrededor del 80% de las raíces secundarias se mantienen a 20 cm de profundidad. La forma típica de *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. es erecta, aunque existe mucha variación en su forma de crecimiento, que abarca desde esta forma hasta postrado y semitrepador (Machado y Chao, 1980).

Los factores edáficos más influyentes en el patrón de distribución de *S. guianensis* (Aubl.) Sw. son la profundidad y el pH; suelos poco profundos, moderadamente arenosos (18-56% de arena) y pH bajos se combinan en las regiones donde es más abundante, debido probablemente a su poca capacidad competitiva en suelos profundamente fértiles, donde otras especies se desarrollan más vigorosamente. *Stylo* se adapta mejor a bajas altitudes y puede tolerar determinados períodos de inundaciones (Amezquita *et al.*, 1991). El rango de temperatura que permite alcanzar el mayor crecimiento y rendimiento en materia seca, se encuentra entre 23-29°C, y la temperatura óptima para una nodulación eficiente es 27°C (CIAT, 1993).

2.2. Género *Centrosema* Benth.

Centrosema Benth. incluye leguminosas de más de 35 especies ampliamente difundidas en América tropical (Pizarro y Carvalho, 1995). Han sido reconocidas como nativas del centro de Brasil y América Central (Williams y Clements, 1990) y se caracteriza por presentar plantas herbáceas, volubles y rastreras.

Las hojas son trifolioladas, raramente con 5-7 folíolos, folíolos rómbicos, ovados o lanceolados. Pecíolo y raquis acanalado o subacanalado. El género puede presentar o no brácteas. Posee dos brácteolas que cubren al cáliz, adosadas o no al mismo. Las flores son solitarias o se encuentran formando un racimo axilar con pocas flores, las cuales pueden tener coloración blanca, morada, rosada o amarilla (Ramia, 1974). El cáliz es pentalobulado, con lóbulos superiores muy connados; el lóbulo carinal del cáliz (lacinio) puede ser corto o largo, dependiendo de la especie (Figura 2). Los estambres son diadelfos; nueve de ellos están soldados entre sí y uno unido en la base a los anteriores (Rodríguez, 1986). Presenta una vaina subsentada, lineal, plana y delgada, con las suturas engrosadas y el ápice puntiagudo. Presenta semillas numerosas, elípticas, que no maduran uniformemente.

2.2.1. Importancia del género *Centrosema* Benth.

Las especies de *Centrosema* se destacan por su adaptación a diferentes condiciones de clima y suelo, su alta producción de forraje (Costa y Oliveira,

1993), valor nutritivo y comportamiento variable bajo pastoreo (Lascano *et al.*, 1990).

2.2.2. Descripción botánica de *Centrosema molle* (Mart.) Benth.

Hierba perenne, trepadora y voluble (Figura 2). Hojas con tres folíolos los cuales tienen formas que varían de ovado-elíptico, elíptico a elíptico-oblongo, de 3,5 a 10 cm de largo por 1,5 a 5,5 cm de ancho. El ápice es agudo y los márgenes rectos o convexos que terminan en un ángulo menor de 45°. La base es redondeada con presencia de pelos en forma de gancho en el haz, mientras que en el envés los pelos son delgados de tipo tomentoso-piloso. Se presentan de 5 a 7 pares de nervios primarios. Los peciólulos (soporte de los folíolos) de 2 a 3 mm de largo, con estipelas (par de hojitas en la base del pecíolo) de 2 a 4 mm de largo. Los pecíolos tienen 2,5 a 5 cm de largo y las estipulas de 2 a 3 mm de largo.



Figura 2. A la izquierda: planta de *Centrosema* sp. mostrando las flores y las hojas. A la derecha se observan los detalles de la flor de tipo papilionada. Fuente: <http://www.TopTropicals.com>.

Las inflorescencias son axilares, solitarias, hasta 7 cm de largo y con pocas flores. Los pedúnculos poseen de 1 a 6 cm de largo. Los pedicelos (soporte de una flor) de 6 a 9 mm de largo, mientras que las bractéolas presentan de 6 a 11 mm de largo.

Las flores de 2 a 3,5 cm de largo; el tubo del cáliz de 3 a 5 mm de largo, con pocos pelos. El estandarte posee pelos largos y sedosos, generalmente recostados en la superficie, por fuera es de color blanco a liláceo con nervios purpúreos o amarillento opaco cuando se marchita. Las alas y la quilla presentan entre 20 y 22 mm de largo y el tubo de los estambres de 26 a 29 mm de largo. Los filamentos son libres de 3 a 5 mm de largo, el estambre vexilar está fusionado

basalmente y tiene de 5 a 7 mm de largo. El ovario de 13 a 14 mm de largo y densamente adpreso-pubescente, mientras que el estilo tiene una longitud entre 11 y 14 mm de largo (Fantz, 2001).

El fruto es una legumbre falcada (en forma de hoz) cuando está inmadura. Cuando desarrollan adquieren forma linear, de 10,0 a 13,5 cm de largo por 6 a 7 mm de ancho, casi sin pelos, de color café-purpúreo con apariencia de bandas transversales que tienden a borrarse con la edad, márgenes de las valvas engrosadas y rostro de 5 a 12 mm de largo. Las semillas tienen forma de riñón, de 3,0 a 3,5 mm de largo por 4 mm de ancho, café oscuras con motas negras irregulares (Fantz, 2001, 2004).

2.3. Efecto de la salinidad en las plantas

2.3.1. Concepto de estrés salino

La salinidad de los suelos se mide generalmente en unidades de conductividad eléctrica (CEe) de un extracto de suelo saturado ($\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$). Si la CEe es mayor de $4 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$, el porcentaje de sodio intercambiable es menor del 15 % y el pH menor que 8,5, el suelo puede ser considerado como salino (Szabolcs, 1994).

Las áreas afectadas por sales se clasifican en dos categorías, las sódicas y las salinas. La principal diferencia entre estos dos tipos de suelos se basa en la naturaleza de los aniones y el pH presentes en el suelo. En los sódicos, los iones carbonatos y bicarbonatos son los mayoritarios, mientras que en los salinos dominan los sulfatos y cloruros. El pH en las áreas de alta sodicidad se encuentra por encima de 8,5 y en los terrenos salinos es inferior a este valor.

2.3.2. Clasificación de las especies según el grado de tolerancia a salinidad

Las plantas pueden clasificarse en halófitas y glicófitas en función de la tolerancia a concentraciones elevadas de sales. Las primeras (tolerantes) son nativas de suelos salinos y completan su ciclo de vida en esos ambientes, mientras que las segundas (también no halófitas) no resisten la salinidad en el mismo grado que las primeras. Por lo general existe una concentración umbral

sobre la cual las glicófitas comienzan a mostrar signos de inhibición del crecimiento, clorosis y pérdida del peso seco (Taiz y Zeiger, 2006).

Entre las especies susceptibles se encuentran el maíz (*Zea mays* L.), la cebolla (*Allium cepa* L.), los cítricos (*Citrus* spp.), la lechuga (*Lactuca sativa* L.) y el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), mientras que *Suaeda maritima* (L.) Dum. y *Atriplex nummularia* (L.) son típicas halófitas que crecen y se desarrollan en concentraciones de cloruro de sodio letales para las glicófitas. Entre estos dos grupos se encuentran las medianamente tolerantes como el algodón (*Gossypium hirsutum* L.) y la cebada (*Hordeum vulgare* L.) (Greenway y Munns, 1980).

2.3.3. Efecto del estrés salino sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas

La salinidad afecta negativamente el crecimiento y el desarrollo de la mayoría los cultivos en el mundo, lo cual está relacionado con los factores siguientes: el bajo potencial osmótico que se genera en la solución del suelo (estrés hídrico), el desbalance nutricional, el efecto específico de los iones (estrés salino) y la combinación de estos factores (Wen-Yuan *et al.*, 2012).

El estrés salino afecta de manera negativa prácticamente todos los procesos biológicos que tiene lugar en las plantas como el crecimiento en longitud, el peso fresco y el peso seco del sistema radical y del brote, el área foliar, el número de flores, los procesos de elongación y división celular, así como la fertilidad y el desarrollo de las semillas (Heidari *et al.*, 2011; Hassen *et al.*, 2014; Castroluna *et al.*, 2014). La magnitud de las afectaciones está en dependencia de la concentración de las sales en el medio, el tipo de sal y la especie en cuestión.

2.3.3.1. El estrés osmótico

La concentración elevada de sales en el suelo tiene un efecto osmótico sobre las plantas (estrés primario). La acumulación de iones disueltos reducen el potencial osmótico del medio y en consecuencia el potencial hídrico (Wen-Yuan *et al.*, 2012). Esto afecta negativamente el contenido de agua en los tejidos de la planta, ya que se dificulta la extracción de agua por las raíces y la planta experimenta una sequía fisiológica (Munns, 2002). El estrés osmótico afecta fundamentalmente el crecimiento de raíces y hojas jóvenes, debido a que el agua

es indispensable para que las células desarrollen una determinada turgencia, que permita la expansión de la pared celular y el alargamiento de las células (El Goumi *et al.*, 2014; Jamil *et al.*, 2014).

El efecto del estrés salino en las plantas depende de la concentración de las sales presentes en el medio y de la tolerancia intrínseca que presenta la especie en cuestión. Por ejemplo, Stepien y Klobus (2006) describieron que los síntomas de deshidratación fueron superiores en hojas de *Cucumis sativus* L. tratadas con 100 mmol.L⁻¹ NaCl en comparación con los valores obtenidos a la mitad de esta concentración. De manera similar, varios autores refirieron una disminución variable del peso fresco en condiciones de salinidad en especies como *Catharanthus roseus* L. (Jaleel *et al.*, 2008), *Capsicum annuum* L. (Afzal *et al.*, 2014) y *Medicago sativa* L. (Castroluna *et al.*, 2014).

Las plantas que son sometidas a estrés salino bajo o moderado pueden ajustar el desbalance osmótico y absorber cantidades de agua suficientes para lograr su desarrollo en suelos salinos (Ashraf, 2004).

Un aspecto importante y que todavía se encuentra en discusión es cómo la planta percibe el estrés osmótico, ya que no se ha identificado con total claridad cuáles son las moléculas que funcionan como osmosensores en las plantas.

Entre los sensores candidatos para percibir el estrés iónico se incluyen transportadores, canales iónicos y proteínas de afinidad por iones sobre la membrana plasmática o localizadas en el medio intracelular (Zhu, 2002). Los iones Na⁺ pueden entrar a las células de la raíz y provocar una despolarización de la membrana citoplasmática, lo cual se ha propuesto también como una señal que desencadena la respuesta antiestrés. Esto permite la activación de canales de calcio, que inducen una serie de eventos moleculares relacionados con la expresión diferencial de genes antiestrés (Munns y Tester, 2008).

La pérdida de turgencia celular en condiciones de estrés salino, también puede constituir una señal de estrés. Cuando se produce la plasmólisis, la membrana citoplasmática se repliega de la pared celular; de esta forma, los receptores de quinasa unidos a membrana, los canales proteicos, los transportadores iónicos, las proteínas transmembranas que están en contacto con

la pared celular y las proteínas semejantes a la integrina, pueden actuar como señalizadoras al experimentar cambios conformacionales o un agrupamiento, que activan cascadas de señales bioquímicas a nivel celular (Viswanathan y Zhu, 2003).

2.3.3.2. Desbalance nutricional y toxicidad iónica

Los iones más comunes que están presentes en los suelos afectados por salinidad son: Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} and HCO_3^- ; sin embargo, los iones tóxicos más comunes en los suelos salinos son el sodio, el cloro y el sulfato (Munns y Tester, 2008). Se conoce que el sodio afecta la estructura física del suelo y que tanto este elemento, como el cloro, son tóxicos para la planta (Hasegawa *et al.*, 2000).

En condiciones de salinidad se produce una entrada neta de iones como el sodio y el cloro hacia el interior de la raíz por diferentes vías. Los iones Na^+ pueden entrar de manera pasiva a las raíces a través de canales catiónicos no selectivos y transportadores proteicos de alta afinidad por el K^+ (Laurie *et al.*, 2002). No obstante, la mayor cantidad de sodio entra por transporte activo mediado por cotransportadores (Na^+/H^+) localizados en la membrana plasmática (Tester y Devenport, 2003).

La entrada de sodio provoca una disminución en la relación $\text{K}^+:\text{Na}^+$ que afecta de manera negativa a numerosos procesos fisiológicos de la planta (Munns y Tester, 2008; Koksai *et al.*, 2016). Esto se debe a las diversas funciones de desempeña el K^+ a nivel celular, el cual activa a más de 50 enzimas diferentes, participa en la biosíntesis de proteína, en el mantenimiento de la turgencia celular y en el control del cierre estomático bajo condiciones de estrés (Tester y Davenport, 2003).

En los estudios realizados por Jamil *et al.* (2006) se determinó que la acumulación de Ca^{2+} , K^+ y N disminuyó con el aumento del estrés salino en diferentes especies vegetales. De manera similar, las concentraciones elevadas de Na^+ en los suelos también provocaron una disminución de la disponibilidad de Ca^{2+} en plantas de *Zea mays* L., mientras que en *Atriplex griffithii* (Moq.) se

observó una disminución del crecimiento debido a una baja disponibilidad de este ión y del potasio (Khan *et al.*, 2000).

En trabajos similares con variedades de sorgo (*Sorghum bicolor* L.) se refirió un aumento en la relación K^+/Na^+ en variedades tolerantes en comparación con las susceptibles. A partir de estos resultados, sus autores sugirieron el uso de esta relación como un indicador para la selección de cultivares tolerantes a salinidad (Almodares *et al.*, 2014).

La toxicidad iónica se refiere al efecto negativo que provocan los iones sobre los procesos metabólicos celulares. A este nivel, las concentraciones elevadas de Na^+ en el citosol, pueden variar el ambiente hidrofílico que rodea a las proteínas, lo cual provoca cambios conformacionales en las mismas, acompañado de una pérdida en la actividad biológica. Esto tiene consecuencias drásticas para compuestos como las enzimas que controlan el metabolismo celular y que pueden ser desnaturalizadas, si la planta no es capaz de disminuir la concentración de sales a niveles subletales (Xiong y Zhu, 2002).

El estrés iónico también impacta sobre el crecimiento, aunque mucho después y en menor magnitud que el estrés osmótico, especialmente a concentraciones salinas bajas y moderadas (Munns y Tester, 2008). Estos autores plantean que solamente a magnitudes elevadas de sales o en el caso de las especies sensibles, que no tienen la capacidad para controlar el transporte de Na^+ , el efecto iónico sobrepasa el efecto osmótico.

La acumulación de Na^+ dentro de las plantas provoca daños más severos en las hojas que en las raíces (Munns, 2002). Estudios realizados por Heidari *et al.* (2011) en *Helianthus annuus* L. mostraron que la acumulación de Na^+ provocó una reducción del área foliar y en consecuencia una disminución del crecimiento de la planta. Munns y Tester (2008) refirieron que la primera fase de la respuesta al estrés por salinidad, está relacionada con el efecto de la sal fuera de la planta, la cual provoca una reducción en el crecimiento de la hoja y en menor extensión en el crecimiento de la raíz.

Numerosos autores han referido el efecto tóxico del Na^+ sobre procesos vitales como la fotosíntesis. Estudios realizados en *Zea mays* L. evidenciaron una

disminución del contenido de clorofila en condiciones de estrés salino (Jaleel *et al.*, 2008), lo cual se ha relacionado con el aumento de la actividad degradativa de la enzima clorofilasa (Nazarbeygi *et al.*, 2011) o la desestabilización de los complejos proteicos asociados a membrana, que participan en el proceso de la fotosíntesis (Jamil *et al.*, 2012).

Entre los síntomas comunes que muestran las plantas sometidas a estrés salino se encuentran la necrosis en las puntas, los márgenes y la lámina de las hojas en los primeros estadios de desarrollo, así como la necrosis de estos órganos, cuando la acumulación de sodio excede el nivel de tolerancia de los cultivos (Zhu, 2003).

La disminución en la producción de biomasa de los brotes en las plantas puede estar relacionado con la clorosis y la necrosis de las hojas, que provoca una disminución del área fotosintéticamente activa; así como la deshidratación de los tejidos fotosintéticos (De Herralde *et al.*, 1998). De manera similar, existen evidencias del efecto negativo que tiene el cloruro de sodio sobre el peso seco en brotes de *Catharanthus roseus* L. (Jaleel *et al.*, 2008) y *Jatropha curcas* L. (Elhag y Gafar, 2014).

2.3.3.3. El estrés oxidativo

Las especies reactivas del oxígeno (EROs) son derivados del oxígeno que presentan un electrón desapareado, el cual origina su naturaleza reactiva. Entre las principales EROs se encuentran los radicales superóxido (O_2^-) e hidroxilo ($OH\cdot$). En condiciones normales, estos compuestos reactivos se producen en los cloroplastos, las mitocondrias y los peroxisomas (Szarka *et al.*, 2012), aunque los primeros son los sitios de mayor producción (Figura 3). En condiciones de hiperosmolaridad se incrementa la producción de los mismos y cuando alcanzan concentraciones que superan a los mecanismos de defensa antioxidantes, sobreviene el estrés oxidativo (Mallik *et al.*, 2011).

El peróxido de hidrógeno y el radical superóxido por sí mismos no poseen una elevada reactividad. Sin embargo, el H_2O_2 puede reaccionar con trazas de metales como el Fe^{2+} , en una reacción de oxidación-reducción, que produce Fe^{3+} y el potente radical hidroxilo (Haber y Weiss, 1934). Este compuesto provoca la

oxidación de sustratos orgánicos como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, para formar H₂O y el radical orgánico correspondiente. La reacción de este último con el oxígeno, provoca una reacción en cadena de radicales orgánicos que es más dañina que cualquier otra reacción catalizada por las EROs (Sabra *et al.*, 2012).

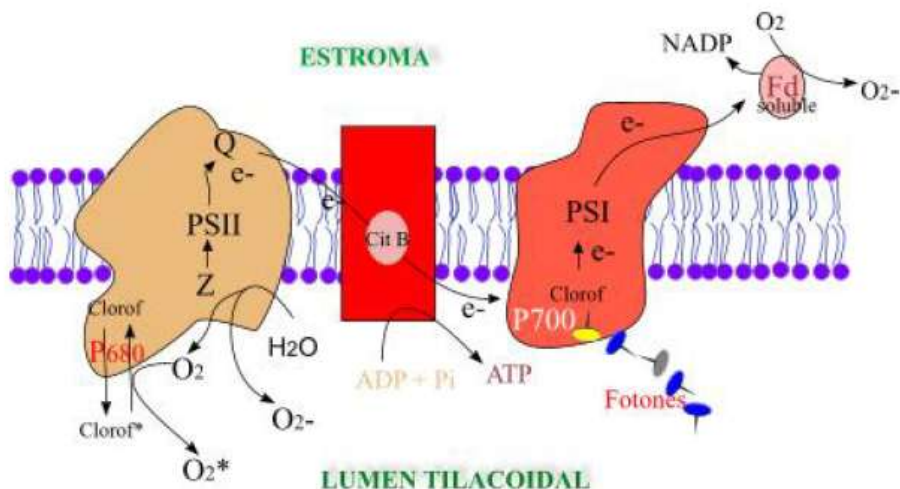


Figura 3. Representación gráfica de la producción de los radicales superóxido (O₂⁻) y oxígeno singlete (O₂^{*}) en los cloroplastos a nivel de los fotosistemas I (FS I) y II (FS II). Fuente: elaboración propia.

En el caso particular de los lípidos de membrana, esta reacción en cadena conduce a la peroxidación lipídica, una transformación en la estructura molecular de los lípidos que aumenta la permeabilidad y la fluidez de las membranas biológicas. Estos cambios afectan procesos significativos que ocurren a nivel de membrana como la fotosíntesis y la respiración celular (Heidari y Golpayegani, 2012). Estudios realizados por Mittal *et al.* (2012) mostraron que elevadas concentraciones de iones inorgánicos inactivan la cadena de transporte de electrones y la fotofosforilación en membranas tilacoideas aisladas.

Varios autores han referido un aumento de la peroxidación lipídica cuando se incrementa la concentración salina en el medio, en especies como *Paulownia* spp. (Ayala-Astorga y Alcaraz-Meléndez, 2010) y *Oryza sativa* L. (Hazman *et al.*, 2015).

El término estrés oxidativo ha sido reevaluado recientemente y se propone en su lugar el de “señales oxidativas”. Entre las razones se consideró que la producción de EROs, además de constituir un proceso potencialmente dañino

para las macromoléculas, los orgánulos y estructuras celulares, también representa un componente en las vías de señalización que utilizan las plantas para su desarrollo y respuesta a los cambios ambientales. Se ha descrito que las EROs tienen una función importante en la regulación de numerosos procesos biológicos tales como el alargamiento celular, la señalización mediante hormonas, la respuesta a estreses bióticos y abióticos, así como en la apoptosis o muerte celular programada (Del Rio *et al.*, 2015).

2.4. Mecanismos de respuesta a salinidad en las plantas

En condiciones de estrés salino los cultivos pueden responder a nivel celular con cascadas de interacciones moleculares, para cambiar el perfil de expresión molecular y efectuar modificaciones postranscripcionales que abarcan un amplio espectro de procesos bioquímicos, celulares y fisiológicos. Por lo tanto, el entendimiento de las bases de la respuesta al estrés salino constituye una estrategia importante para la mejora de cultivos tolerantes a salinidad (Zhuang *et al.*, 2014).

La respuesta de las plantas a la salinidad y a otros estreses ambientales ha sido extensamente estudiada, aunque todavía no se comprende completamente los mecanismos que confieren tolerancia a algunas especies vegetales y sensibilidad a otras; entre otras razones, debido a la complejidad de estos mecanismos (Tujeta, 2007). No obstante, las investigaciones sobre aspectos fisiológicos, bioquímicos y genéticos de la tolerancia a salinidad en plantas modelos como *Arabidopsis thaliana* L. (Heynhh.) y otros cultivos como el arroz, el maíz, el tabaco y la alfalfa, han permitido la identificación de varios mecanismos relacionados con la tolerancia; los cuales, de manera general, pueden ser categorizados en: (1) tolerancia al estrés osmótico, (2) exclusión del Na⁺ y (3) tolerancia del tejido (Munns y Tester, 2008).

2.4.1. Ajuste osmótico

Una respuesta común en las plantas sometidas a estrés salino es el aumento de los niveles de compuestos osmóticamente activos u osmolitos, los cuales tienen un papel importante en el balance del potencial osmótico en las

células (Heidari *et al.*, 2011; Chookhampaeng, 2011; Kumari *et al.*, 2014; Cao *et al.*, 2015).

Existe una lista larga de estos compuestos, entre los que se encuentran aminoácidos (prolina y glicina betaína), proteínas, aminos (putrescina y espermidina), azúcares simples (glucosa y fructosa), azúcares alcoholes (manitol y glicerol), entre otros (Nurul *et al.*, 2014; Kumari *et al.*, 2014; Deepika *et al.*, 2015). Estos compuestos comparten características comunes como su naturaleza polar, alta solubilidad en agua, la presencia de una amplia concha de hidratación y la no interferencia en las funciones de las macromoléculas, incluso a elevadas concentraciones (Sairam y Tyagi, 2004).

Originalmente se consideró que estos compuestos tenían la función de participar solamente en el ajuste osmótico, mediante la disminución del potencial de soluto que facilita la absorción de agua y el restablecimiento de la concentración de sales. Recientemente, varios trabajos han permitido identificar otras funciones de los osmolitos como la estabilización de las macromoléculas y evitar el proceso de desnaturalización (Ruiz-Carrasco *et al.*, 2011). También constituyen una reserva de nitrógeno y participan en la eliminación de las especies reactivas del oxígeno (Chookhampaeng, 2011).

Un grupo interesante de proteínas que ha recibido gran atención, por su acumulación en los tejidos bajo condiciones de estrés osmótico, son las denominadas proteínas LEA (proteínas abundantes en la embriogénesis tardía, por sus siglas en Inglés), las cuales son muy hidrofílicas, ricas en glicina y se mantienen solubles aun cuando son sometidas a temperatura de ebullición (Duan y Cai, 2012).

Estos compuestos de naturaleza proteica se han encontrado en todos los tipos de organismos. La regulación de los mismos por estrés osmótico y ABA, es un indicativo de que estas proteínas tienen una función directa en los procesos de adaptación a salinidad y a sequía (Ma *et al.*, 2015).

2.4.2. Control de la homeostasis iónica

El mantenimiento de la homeostasis iónica en los vegetales es esencial para tolerar un ambiente salino y mantener una relación elevada K^+/Na^+ en el

citósol, que permita el crecimiento y desarrollo de las plantas. Para reestablecer el balance entre estos iones en condiciones de salinidad, las plantas utilizan un transporte activo primario mediante ATPasas- H^+ y un transporte secundario mediado por proteínas que constituyen canales y transportadores de membrana. Cuando se alcanzan niveles excesivos (tóxicos) de Na^+ en el citósol, éste puede ser eliminado por mecanismos activos hacia el espacio intercelular (apoplasto), a través de la membrana citoplasmática, o hacia la vacuola, vía tonoplasto. La expresión de estos transportadores y enzimas tiene una regulación transcripcional y a nivel de biosíntesis de proteínas (Kundan *et al.*, 2013).

Uno de los mecanismos de control de la homeostasis iónica que ha sido extensamente investigado, es el mecanismo SOS (hypersensibilidad a salinidad, de las siglas en inglés). Estudios realizados con mutantes de *Arabidopsis thaliana* L. (Heynh.), susceptibles a salinidad permitieron el descubrimiento de tres *loci* (*SOS1*, *SOS2* y *SOS3*) relacionados con la tolerancia a este estrés. *SOS1* (*HtNHX1*) codifica para un contra-transportador (Na^+/H^+) localizado en la membrana plasmática que transporta Na^+ hacia el apoplasto. Para ello utiliza la energía que proviene del gradiente de pH generado por ATPasas- H^+ que transportan H^+ hacia el exterior celular. La actividad *SOS1* es regulada por la proteína quinasa *SOS2*, la cual es regulada a su vez, por la proteína tipo calmodulina *SOS3* (Chinnuswamy y Zhu, 2003).

De manera similar a *SOS1*, se descubrió otro contra-transportador (Na^+/H^+) en el tonoplasto de raíces de *A. thaliana* L. denominado *AtNHX7*, el cual introduce Na^+ hacia el interior de la vacuola. La energía que utiliza para el transporte proviene del gradiente de pH entre el jugo vacuolar y el citoplasma. La actividad de estos transportadores sódicos (*SOS1* y *AtNHX7*) permite mantener niveles adecuados del ión en el citósol, lo que evita la inactivación de las enzimas en esta fracción. Así mismo, la actividad de los transportadores de sodio en vacuola permite regular el potencial hídrico de las células en condiciones de estrés salino. El mecanismo SOS ha representado una vía para entender las relaciones que se establecen entre los sensores de estrés salino y la expresión de una cascada de genes, los cuales actúan para reestablecer la homeostasia iónica y celular (Hasegawa, 2013).

Los trabajos de sobreexpresión de contra-transportadores Na^+/H^+ en plantas transgénicas han evidenciado la función que tienen estas proteínas en el control de la homeostasia iónica y la tolerancia al estrés salino, en especies como *Medicago sativa* L. (Li *et al.*, 2011), *Nicotiana tabacum* L. (Yue *et al.*, 2012), *Arachis hypogaeae* L. (Banjara *et al.*, 2012) y *A. thaliana* L. (Feki *et al.*, 2013). De manera similar, los estudios moleculares del perfil transcripcional en condiciones de estrés salino en *Aeluropus littoralis* L. y *Aeluropus lagopoides* (L.) trin. mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (RT-PCR, de sus siglas en Inglés), mostraron un aumento en el nivel de transcritos de SOS1, NHX1 (contra-transportador Na^+/H^+ en tonoplasto) con el incremento de la concentración de cloruro de sodio (Rezaei *et al.*, 2014; Sanadhya *et al.*, 2015).

En trabajos multidisciplinarios recientes mediante el uso de técnicas proteómicas, transcriptómicas, subcelulares y fisiológicas, se observó que el proceso de compartimentalización de los iones sodio dentro de las vacuolas, puede estar mediado también por el transporte a través vesículas transgénicas de *Nicotiana tabacum* L. (García de la Garma *et al.*, 2015).

2.4.3. Eliminación de las EROs

La capacidad para eliminar las especies reactivas del oxígeno y reducir los daños ocasionados a las macromoléculas, como proteínas y ADN, se considera un carácter importante de tolerancia a estrés salino (Santhanakrishnan *et al.*, 2014).

Existen dos mecanismos fundamentales para la eliminación de las especies reactivas del oxígeno, la vía no enzimática y la enzimática. En la primera participan un grupo de compuestos como los carotenoides (α -tocoferol, β -caroteno), los flavonoides, el ácido ascórbico, el glutatión reducido, los fenoles, etc. (Mervat y Dawood, 2014). En el segundo grupo participan numerosas enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), las catalasas y las peroxidasas, entre otras (Haghighi *et al.*, 2014; Behrouzi *et al.*, 2015).

La superóxido dismutasa convierte el anión superóxido en peróxido de hidrógeno y agua, mientras que la catalasa y las peroxidasas transforman el H_2O_2 en H_2O y O_2 (Meloni *et al.*, 2003).

Las catalasas se localiza en orgánulos como el peroxisoma y el glicoxisoma donde se genera cantidades considerables de H₂O₂, mediante la fotorespiración y la β-oxidación de los ácidos grasos, respectivamente (Xiong y Zhu, 2002). Los genes para las isoformas de catalasa en plantas son inducidas por estreses abióticos y por el ácido abscísico (Guan *et al.*, 2000).

Las enzimas peroxidasa están distribuidas ampliamente dentro de las plantas superiores y participan en varios procesos como la lignificación, el metabolismo de las auxinas y la tolerancia al estrés salino y a los metales pesados (Haghighi *et al.*, 2014).

Estudios realizados por Kumar y Chand (2015) y Kala (2015) mostraron que la salinidad incrementó las actividades superóxido dismutasa, peroxidasa y catalasa en *Excoecaria agallocha* L. y *Plantago ovate* Forsk., respectivamente, lo cual se propuso como uno de los mecanismos relacionados con la tolerancia de estas especies a salinidad.

Dentro de las enzimas antioxidantes, la catalasa parece tener un comportamiento más variable (Veraplakorn *et al.*, 2013). La actividad de esta enzima varía según la especie, el desarrollo fisiológico, el estado metabólico de la planta, así como la duración y la intensidad del estrés (Chaparzadeh *et al.*, 2004). Estudios realizados por varios investigadores mostraron que la actividad de esta enzima tuvo un comportamiento variable en *Triticum aestivum* L. (Sairam *et al.*, 2002) y *Sesamum indicum* L. (Koca *et al.*, 2007) en presencia de estrés salino.

Entre los antioxidantes no enzimáticos, los compuestos fenólicos constituyen un grupo químicamente heterogéneo, los cuales han sido estudiados en experimentos de tolerancia a salinidad. Varios autores han referido un aumento de estas sustancias en plantas sometidas a estrés salino (Santhanakrishnan *et al.*, 2014; Kumar y Chand, 2015). Estos compuestos han sido descritos como fuertes antioxidantes que pueden reducir la mayoría de las moléculas oxidadas entre las cuales se encuentran el oxígeno singlete, el radical superóxido, el tóxico radical hidroxilo, el peróxido de hidrógeno, así como radicales orgánicos (Jafari y Bourouni, 2009).

El aumento de las concentraciones de los polifenoles se ha relacionado con el incremento en los niveles de la enzima PAL (fenilalanina amonioliasa, de las siglas en inglés), la cual participa directamente en la síntesis de los mismos y es reconocida como un marcador de estreses ambientales en los tejidos vegetales (Safari y Bourouni, 2009). Estudios realizados por Ke y Saltveit (1989) mostraron una correlación positiva entre la actividad de la PAL y el contenido total de fenoles en *Lactuca sativa* L.

2.4.4. Tolerancia de los tejidos al ión sodio

A nivel celular, la concentración elevada de Na⁺ y Cl⁻ puede ser tolerada mediante adaptaciones anatómicas y su compartimentalización en orgánulos celulares (Munns y Tester, 2008; Sperlinga *et al.*, 2014). Las halófitas dicotiledóneas muestran dos tipos de adaptaciones anatómicas; la succulencia, por un aumento del volumen celular o la excreción de los iones Na⁺ y Cl⁻. En este último proceso pueden participar glándulas salinas (tricomas modificados) o estructuras en forma de “ampollas” que constituyen células epiteliales transformadas (Flowers *et al.*, 1986).

En las monocotiledóneas es poco frecuente la presencia de succulencia, mientras que las glándulas salinas aparecen en un 15 % de las que son halófitas (Munns y Tester, 2008).

2.5. Regulación de la respuesta al estrés salino

Las plantas reaccionan a estímulos externos como el estrés salino, a través de una cascada de señales que activan la expresión de numerosos genes antiestrés. Se han identificado varios componentes de las vías de transducción, aunque aún no se conoce en su totalidad, cómo interactúan las diferentes moléculas y qué lugar ocupan en la compleja red de señales bioquímicas (Munns y Tester, 2008). Estas vías de señalización comprenden una red de reacciones proteína-proteína y moléculas señalizadoras como por ejemplo, el Ca²⁺, el H₂O₂ y el ácido abscísico.

2.5.1. Regulación mediada por el ácido abscísico (ABA)

El ácido abscísico (ABA) posee una función central en la respuesta a estreses abióticos como el déficit hídrico y la salinidad. Numerosos autores han referido un aumento en las concentraciones de este compuesto en condiciones de estrés salino. La acción de esta fitohormona puede contrarrestar la acción inhibitoria que tienen estos estreses abióticos sobre procesos como la fotosíntesis, el crecimiento y la translocación de asimilados (Kundan *et al.*, 2013).

El efecto que tiene la acumulación de esta fitohormona en la tolerancia a estrés salino, ha sido atribuido parcialmente al aumento de las concentraciones de K^+ , Ca^{2+} y compuestos osmóticamente activos en las vacuolas de las raíces. Esto permite atenuar las consecuencias nocivas que tiene la entrada de Na^+ y Cl^- a las células (Gurmani *et al.*, 2011). Por otra parte, un aumento en la concentración de ABA estimula el cierre de los estomas, lo cual evita la pérdida de agua en condiciones de estrés osmótico (Taiz y Zeiger, 2006).

La función regulatoria del ácido abscísico en la respuesta a estreses abióticos se basa en dos vías fundamentales: la dependiente y la independiente de ABA.

2.5.1.1. Vía dependiente de ABA

El estrés osmótico inducido por altas concentraciones de sales en el medio provoca un aumento en la biosíntesis del ácido abscísico a partir de compuestos terpenoides (Yue *et al.*, 2012). Esta fitohormona, a su vez, activa otro grupo de señales como son:

- Proteínas quinasas dependientes de calcio (CDPK, por sus siglas en inglés). Estas enzimas estimulan la expresión de un grupo de proteínas como las LEA (del inglés, Late Embryogenesis Abundant) que participan en la estabilización de las membranas biológicas y en la protección estructural y funcional en condiciones de estrés osmótico. La expresión de una proteína quinasa dependiente de calcio (OsCPK21) en plantas transgénicas de arroz (*Oryza sativa* L.), mostró una mayor tolerancia a estrés hídrico en comparación con plantas normales, así como un aumento en la expresión de los genes *OsNAC6* y *Rab21* que codifican para factores de transcripción (Asano *et al.*, 2011).

- Factores de transcripción dependientes de ABA que estimulan genes antiestrés y microARNs, estos últimos poseen regulación negativa sobre otros genes (Kundan *et al.*, 2013).
- La cascada MAP quinasa (familia MAP quinasas, del inglés mitogen-activated protein) constituye una ruta importante antiestrés dependiente de ABA en especies como *Oryza sativa* L. (Kundan *et al.*, 2013; Schmidt *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014). Esta familia comprende varias proteínas quinasas, que en una cadena de reacciones específicas de fosforilación, activan la expresión de factores de transcripción. Estos, a su vez, inducen la expresión de otros genes de respuesta a estreses abióticos. Entre estos factores se encuentran los que codifican para enzimas antioxidantes y enzimas que participan en la ruta biosintética de osmolitos (Kundan *et al.*, 2013). Aunque se han identificado varias proteínas MAP quinasas en plantas modelo como *Oryza sativa* L., el vínculo de las mismas con una cascada de fosforilación y los genes dianas, todavía no se ha determinado con claridad (Singh y Jwa, 2013).

En estudios realizados por Hao *et al.* (2015) con plantas transgénicas de *Nicotiana tabacum* L., se evaluó la función de la proteína TaMPK4, en la tolerancia a salinidad y al déficit de fósforo inorgánico (Pi) y de nitrógeno. Esta investigación reveló la función de esta quinasa en la regulación transcripcional positiva de los genes *NtPIN3* y *NtPIN9*, asociados al transporte de auxina. Las plantas transgénicas que tenían el gen *TamPK4* silenciado mostraron una reducción notable en el desarrollo de las raíces, en condiciones de estrés salino. De manera similar, aquellas que sobreexpresaban la proteína mostraron niveles elevados de enzimas antioxidantes peroxidasas, superóxido dismutasa y catalasa, en comparación con las plantas control (silenciadas); así como concentraciones superiores de K⁺ y compuestos osmóticamente activos. Estos resultados evidencian la función reguladora de las proteínas de la familia MAK quinasa, en la respuesta a estreses abióticos a través de la modificación de varios procesos biológicos.

2.5.1.2. Vía independiente de ABA

La vía regulatoria independiente de ABA comprende la inducción de la expresión de factores de transcripción como DREB1 y DREB2 (de las siglas en inglés, Drought Response Element Binding), así como otros genes relacionados con la respuesta antiestrés.

Estudios realizados por Gamboa *et al.* (2013) en plantas de *Eucalyptus globulus* (Labill.), mediante el uso de la técnica RCP en tiempo real, confirmaron la función de la pirofosfatasa vacuolar (EVP1) en la respuesta a estrés hídrico y salino a través de una vía independiente de ABA.

2.5.2. Funciones del calcio en la regulación de la respuesta antiestrés

El Ca^{2+} desempeña una función central como mensajero secundario en el acoplamiento de un rango amplio de estímulos extracelulares con respuestas intracelulares (Choi *et al.*, 2014). En la actualidad se han identificado y caracterizado tres clases fundamentales de sensores de Ca^{2+} . Las calmodulinas, las proteínas quinasas dependientes de calcio y las proteínas semejantes a calcineurina tipo B (Turan *et al.*, 2012).

Las concentraciones elevadas de sales provocan un aumento rápido y transiente del calcio citosólico. Este catión inicia varias vías de señales de transducción, que culminan con la expresión de genes que determinan respuestas celulares diversas, y que permiten la adaptación de las plantas al estrés salino. Entre estas vías de respuesta a estrés salino se encuentra el mecanismo “SOS” cuya activación depende de la unión del Ca^{2+} a la proteína tipo calmodulina SOS3 (Zhuang *et al.*, 2014).

Estudios recientes en *A. thaliana* L. mostraron que las plantas también poseen un sistema rápido de señalización de estrés, el cual está basado en “olas” de Ca^{2+} que son propagadas a través de la planta a velocidades aproximada de 400 micrómetros por segundo. Dicha propagación en las raíces ocurre mediante canales proteicos de membrana en las células de la corteza y de la capa endodérmica. Este proceso depende de los canales iónicos específicos localizados en vacuola (Choi *et al.*, 2014).

2.5.3. Regulación mediante las EROs

El peróxido de hidrógeno ha sido propuesto como una hormona “maestra”, ya que controla una amplia variedad de respuestas y ajustes fisiológicos. Esta molécula tiene funciones importantes en los cambios de compactación de la pared celular y en la transmisión de señales entre células, mediante el transporte de membrana a través de las acuaporinas. En condiciones de estrés salino pueden incrementarse los niveles de H₂O₂ por acción de la enzima NADPH oxidasa cuya actividad puede ser regulada por este estrés abiótico (Jang *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013).

El peróxido de hidrógeno puede ser detectado por un receptor específico a nivel de membrana, el cual activa cascadas de proteínas quinasas (familia MAP quinasas) que a su vez, activan factores de transcripción que inducen la expresión de enzimas antioxidantes y compuestos osmóticamente activos. La presencia de H₂O₂ puede estimular la apertura de canales de Ca²⁺ a nivel de membrana, lo que permite incrementar los niveles transientes de calcio citosólico e inducir vías metabólicas como el mecanismo SOS o la formación del complejos calcio/calmodulina que conducen al cierre estomático (Turan *et al.*, 2012; Zagorchev *et al.*, 2014).

2.5.4. Regulación mediante el inositol 1,4,5 trifosfato

El inositol 1,4,5 trifosfato (IP3) constituye otro compuesto que participa en la red metabólica como transductor de las señales de estrés salino en las plantas (Kundan *et al.*, 2013). Estudios realizados por Takahashi *et al.* (2001) y De Wald *et al.* (2001), mostraron que en condiciones de hiperosmotividad se induce una elevación transiente de los niveles de IP3, debido a la activación de la enzima fosfolipasa C. El IP3 libera Ca²⁺ de las cisternas intracelulares, el cual inicia una cascada de eventos relacionados con la fosforilación de proteínas, proceso que desempeñan una función regulatoria en la expresión de genes antiestrés (Mori y Schroeder, 2004).

2.5.5. Regulación mediante ácidos ribonucleicos de cadena corta (microARNs y siARNs)

La expresión diferencial de genes, así como la regulación de los procesos de transcripción y traducción, constituyen un área de investigación esencial para la comprensión de las respuestas a los estreses abióticos (Zhuang *et al.*, 2014). Recientemente, se ha descubierto en plantas, la presencia de numerosas moléculas de ARN de bajo peso molecular denominados microARNs y siARNs (ARN de interferencia, por sus siglas en inglés), que no codifican para polipéptidos y que son reguladores de la expresión de numerosos genes en los organismos eucariotas (Jones-Rhoades *et al.*, 2006). Estas moléculas tienen función regulatoria negativa a nivel postranscripcional, ya que inhiben el proceso de traducción o provocan la degradación de ARNm “dianas” mediante el apareamiento complementario de bases entre ambas moléculas (Voinnet, 2009).

Varios investigadores han indicado que los microARNs en las plantas están relacionados con procesos fisiológicos importantes, tales como la germinación y el desarrollo de la raíz (Gutierrez *et al.*, 2009). Además, se han incrementado las evidencias de la función que tienen tales moléculas en la respuesta de las plantas a estreses bióticos como la infección por virus (Yang *et al.*, 2013) y abióticos como las altas y bajas temperaturas (Tang *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2012), la sequía (Barrera-Figueroa *et al.*, 2011), la salinidad (Covarrubias y Reyes, 2010) y los metales (Chen *et al.*, 2012).

2.6. Caracteres diagnósticos para la identificación de tolerancia al estrés salino

La salinidad afecta el rendimiento de los cultivos tanto cualitativa como cuantitativamente. De esta manera, los caracteres que indican rendimiento deben tenerse en consideración cuando se estudia la tolerancia de las plantas al estrés salino. Sin embargo, no solo son importantes los componentes del rendimiento; debido a que la salinidad afecta casi en su totalidad cada aspecto de la fisiología de las plantas. Para el estudio de la tolerancia a dicho estrés se hace necesario un análisis integral de muchos caracteres fisiológicos y bioquímicos y, no

simplemente aquellos que influyen directamente en la productividad (Cuartero y Fernández-Muñoz, 1999).

Numerosos investigadores han utilizado diferentes indicadores fisiológicos y bioquímicos para evaluar tolerancia a salinidad en diferentes cultivos (Tabla 1). Muchos de estos estudios han sido desarrollados a partir de plantas transgénicas que sobreexpresan un determinado factor que confiere tolerancia.

Estudios realizados por Koca *et al.* (2007) con cultivares de *Sesamum indicum* L., mostraron correlaciones positivas entre los niveles de prolina libre y la tolerancia a estrés salino en la variedad tolerante Cumhuriyet. De manera similar, refirieron una menor concentración de malonildialdehído (MDA) en el cultivar tolerante en comparación con el susceptible (Orhangazi). La presencia de niveles altos de este compuesto en esta última variedad indicó un mayor daño a las membranas biológicas debido al fenómeno de peroxidación lipídica.

Las actividades de enzimas antioxidantes como la Superóxido dismutasa, la catalasa y las peroxidasas también han sido referidas como indicadores de tolerancia a estrés salino. En trabajos realizados por Suraj (2015) con diferentes variedades de *Plantago ovata* Forsk., se observó un aumento en la actividad de dichas enzimas en variedades tolerantes a dicho estrés, en comparación con las susceptibles. El aumento en la actividad de estas enzimas se relacionó con una mayor capacidad para eliminar las especies reactivas del oxígeno.

El aumento en la concentración de clorofilas en condiciones de salinidad, también se ha propuesto como un indicador bioquímico potencial de tolerancia a dicho estrés, en cultivos como *Pisum sativum* L. (Noreen *et al.*, 2010), *Heliantus annuus* (Akram y Ashraf, 2011), *Medicago sativum* L. (Monirifar y Barghi, 2009). A pesar de estas evidencias, la acumulación de clorofilas en plantas sometidas a estrés salino, no siempre ha sido asociada con un carácter de tolerancia. Por ejemplo, Juan *et al.* (2005) encontraron una relación débil entre los niveles de Na⁺ y los pigmentos fotosintéticos, en las hojas de cultivares de tomate (*Solanum lycopersicon* Mill.) con diferente tolerancia a salinidad.

Tabla 1. Indicadores bioquímicos y fisiológicos de tolerancia a salinidad en plantas.

Indicador de tolerancia a estrés salino	Especie	Autores
Contenido de clorofilas	<i>Catharanthus roseus</i> L.	Jaleel <i>et al.</i> (2008)
	<i>Hordeum vulgare</i> L.	Demiral <i>et al.</i> (2005)
Contenido de carbohidratos	<i>Triticum aestivum</i> L.	Kafiet <i>et al.</i> (2008)
Tasa de asimilación neta de CO ₂	<i>Brassica napus</i> L.	Ulfat <i>et al.</i> (2007)
Longitud de radícula y plúmula	<i>Sesamum indicum</i> L.	Bahrami y Razmjoo, (2012)
Contenido de prolina libre	<i>Sesuvium portulacastrum</i> L.	Kannan <i>et al.</i> (2013)
	<i>Sesamum indicum</i> L.	Koca <i>et al.</i> (2007)
	<i>Nicotiana tabacum</i> L.	Garcia de la Garma <i>et al.</i> (2015)
	<i>Capsicum chinense</i> Jacq.	Bojorquez-Quintal <i>et al.</i> (2015)
Contenido de glicina betaína	<i>Sesuvium portulacastrum</i> L.	Kannan <i>et al.</i> (2013)
Contenido de Na ⁺ en raíz	<i>Eleusine coracana</i> L. Gaertn.	Krishnamurthy <i>et al.</i> (2014)
Contenido de K ⁺ en raíz	<i>Capsicum chinense</i> Jacq. variety Rex	Bojorquez-Quintal <i>et al.</i> (2015)
Relación Ca ²⁺ /Na ⁺ en brote	<i>Triticum aestivum</i> L.	El-Hendawy <i>et al.</i> (2009)
Relación K ⁺ /Na ⁺ en brote	<i>Sorghum bicolor</i> L.	Almodares <i>et al.</i> (2013)
Contenido de Cl ⁻ en brote	<i>Triticum aestivum</i> L.	Salam <i>et al.</i> (1999)
Superóxido dismutasa	<i>Potentilla atrosanguinea</i> L.	Shafi <i>et al.</i> (2015)
Glutación transferasa/glutación peroxidasa	<i>Nicotiana tabacum</i> L.	Roxas <i>et al.</i> (2000)
Actividad peroxidasa en hoja	<i>Hordeum vulgare</i> L.	Demiral <i>et al.</i> (2005)
	<i>Sesamum indicum</i> L.	Koca <i>et al.</i> (2007)
Aumento de polifenoles, antocianinas y flavonoides	<i>Origanum majorana</i> L. y <i>Solanum tuberosum</i> L.	Baatour <i>et al.</i> (2013) Cheng <i>et al.</i> (2013)

La influencia de la salinidad sobre el metabolismo de los polifenoles ha sido poco referenciada. Se ha observado una acumulación de polifenoles en condiciones de estrés salino en hojas de *Bruguiera parviflora* Roxb. (Parida *et al.*, 2002), *Solanum lycopersicon* Mill. (Mohamed *et al.*, 2015) y *Pistacia vera* L. (Lotfi *et al.*, 2015). Estos resultados indican que la inducción del metabolismo secundario es uno de los mecanismos de defensa para la adaptación de las plantas frente al estrés salino (Mane *et al.*, 2010).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó en el Centro de Estudios Biotecnológicos, de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, de la Universidad de Matanzas.

3.1. Material vegetal

Se utilizaron semillas de *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184 y *Centrosema molle* (Mart.) Benth cv. CIAT-15160, las cuales fueron suministradas por el banco de germoplasma de la Estación Experimental “Indio Hatuey”, ubicada en el municipio Perico, provincia de Matanzas.

3.2. Desinfección y escarificación de material vegetal

Las semillas de Stylo cv. CIAT-184 y *C. molle* cv. CIAT-15160 fueron previamente seleccionadas y lavadas con solución detergente (1 g.L^{-1}), posteriormente se desinfectaron por inmersión secuencial en etanol al 70% durante un minuto, hipoclorito de sodio (Kinsol, marca comercial) al 5 y 1% durante 15 y 20 minutos, respectivamente, seguidos cada uno por enjuagues sucesivos con agua destilada y estéril.

Para la ruptura de la dormancia de las semillas de *S. guianensis* (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184, se utilizó como método de escarificación el descrito por Skerman *et al.* (1991), el cual comprendió la inmersión de las semillas en agua destilada estéril a 80°C , durante dos minutos. Este proceso coincidió con el último paso de la desinfección en los ensayos de germinación.

3.3. Germinación de *S. guianensis* (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184 y *C. molle* (Mart.) Benth cv. CIAT-15160 en presencia de NaCl

Las semillas de Stylo cv. CIAT-184 y *C. molle* cv. CIAT-15160 previamente desinfectadas, fueron germinadas en placas Petri plásticas de \varnothing 29 cm. Las mismas contenían papel de filtro estéril humedecido con 7 mL de solución de cloruro de sodio (Aldrich) en concentraciones de 0, 20, 100, 150, 200, 250, 300 mmol.L^{-1} (Figura 4). Se utilizaron tres placas por cada tratamiento con 10 semillas cada una. Se efectuaron tres repeticiones del ensayo.



Figura 4. Semillas de *S. guianensis* (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184 en cámara húmeda con solución de NaCl.

El ensayo de germinación se desarrolló en un cuarto de crecimiento a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, con un fotoperíodo de 16 h ($35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Se evaluaron los indicadores siguientes:

- ✓ Porcentaje de germinación durante ocho días.
- ✓ Velocidad de germinación (V_{50}): se determinó según el método descrito por Soltani *et al.* (2001) a partir de la fórmula:

$V_{50} = 1/D_{50}$, donde D_{50} representa la estimación del tiempo necesario para alcanzar el 50% del máximo de germinación en los diferentes tratamientos, el cual se obtuvo por interpolación de la curva de progresión de la germinación contra el tiempo.

- ✓ Índice de vigor I y II (Vashisth y Nagarajan, 2010). El cálculo se determinó utilizando las fórmulas siguientes:

Índice de vigor I (IV-1) = $(\text{PG} \times \text{LP}) \times (\text{LR} + \text{LT})$.

Índice de vigor II (IV-2) = $(\text{PG} \times \text{PS}) \times (\text{LR} + \text{LT})$, donde:

PG: porcentaje de germinación.

LP: longitud de la plántula (cm).

LR: longitud de la raíz (cm).

LT: longitud del tallo (cm).

PS: peso seco de la plántula (g).

- ✓ Distribución de biomasa: se determinó mediante la representación del porcentaje de peso seco promedio de los órganos raíz, hipocótilo, epicótilo, hojas verdaderas, hojas cotiledonales de las plántulas de cada tratamiento, en relación al peso total promedio de las plántulas por tratamiento. El peso seco se determinó mediante la deshidratación de las muestras en una estufa a 70°C hasta obtener un peso constante (Veli *et al.*, 1994).

3.4. Crecimiento temprano de *S. guianensis* cv. CIAT-184 y *C. molle* cv. CIAT-15160 en presencia de NaCl

Las semillas de *S. guianensis* (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184 y *C. molle* (Mart.) Benth cv. CIAT-15160 fueron desinfectadas como se describió en el acápite 3.2. Posteriormente se sembraron en vasos plásticos de 400 mL de volumen que contenían tierra vegetal como sustrato (Figura 5). Previo a la siembra se determinó la capacidad de campo (CC) por gravimetría.

Las plantas fueron mantenidas en casa de cultivo con un fotoperíodo de 13 horas luz y una temperatura promedio diaria de 24°C ± 2, con aplicación de riego al 90 % de la CC hasta que desarrollaron las primeras hojas trifoliadas. Posteriormente se mantuvo un riego diario al 70% de la CC con soluciones de NaCl (0, 50, 100 y 200 mmol.L⁻¹) durante 10 días, fecha en que comenzaron a aparecer los primeros síntomas de marchitez y clorosis en las hojas.



Figura 5. Plántulas de *S. guianensis* (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184 (izquierda) y *C. molle* (Mart.) Benth cv. CIAT-15160 (derecha) germinadas en suelo vegetal.

Se determinaron los indicadores morfofisiológicos y bioquímicos siguientes:

- ✓ Contenido de materia fresca y seca.
- ✓ Relación raíz/tallo en base al peso seco.
- ✓ Fenoles solubles, ligados a pared y totales.
- ✓ Contenido de clorofilas a, b y totales.
- ✓ Índice de estabilidad clorofílica (IEC).

El estudio se desarrolló siguiendo un diseño completamente aleatorizado con 10 unidades experimentales para cada tratamiento y tres repeticiones.

3.4.1. Determinación de indicadores morfofisiológicos

Se midieron las longitudes de los hipocótilos, los epicótilos y las raíces de las plántulas de *S. guianensis* (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184 y *C. molle* (Mart.) Benth cv. CIAT-15160 con un papel milimetrado. Las masas frescas de raíces, tallos y hojas se determinaron en una balanza digital Sartorius. Para evaluar el contenido de materia seca, los órganos de las plántulas fueron deshidratados previamente, en una estufa a 70°C hasta obtener valores constantes de peso seco.

3.4.2. Determinación de indicadores bioquímicos

3.4.2.1. Determinación del contenido de fenoles

Las muestras de raíces y de hojas se maceraron en nitrógeno líquido con el empleo de un mortero de porcelana. La extracción de los fenoles solubles se realizó en 10 volúmenes de metanol. Las muestras se homogenizaron y centrifugaron a 27 200 g. Para la extracción de los fenoles ligados a la pared celular, el precipitado se resuspendió en NaOH 2 mol.L⁻¹, y posteriormente se neutralizó con igual volumen de HCl 2 mol.L⁻¹ (Gurr *et al.*, 1992). Para determinar la concentración de fenoles se utilizó el ácido clorogénico (0,05 mol.L⁻¹) como patrón y los valores de absorbancia fueron determinados a 760 nm. A partir de los valores obtenidos de concentración de fenoles solubles y ligados a la pared celular, se calcularon las concentraciones de fenoles totales.

3.4.2.2. Determinación del contenido de clorofila

Las hojas se maceraron en un mortero de porcelana, con 5 mL de solución acuosa de etanol (Sigma) al 96 %, como solvente para la extracción de los

pigmentos. Se midió la absorbancia de los extractos a 665 nm y 644 nm de longitudes de onda en un espectrofotómetro Ultrospect 2000.

Para la determinación del contenido de las clorofilas *a* y *b* se emplearon las ecuaciones propuestas por Wintermans y de Mots (1965):

$$Ca \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = 13.95 (A_{665}) - 6.68 (A_{644})$$

$$Cb \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = 24.96 (A_{644}) - 7.32 (A_{665})$$

Ca = concentración de clorofila *a*

Cb = concentración de clorofila *b*

$$\text{Clorofila total: } Ca+b \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = (20.2 A_{649}) + (8.02 A_{665}).$$

3.4.2.3. Determinación del Índice de Estabilidad Clorofílica

El Índice de Estabilidad Clorofílica (IEC %) fue calculado con los valores del contenido total de clorofila antes y después de estresadas las plántulas, a partir la ecuación propuesta por Kumari *et al.* (2004).

$$\text{IEC (\%)} = [(\text{contenido de clorofilas antes del estrés} - \text{contenido de clorofila después del estrés}) / \text{contenido de clorofila después del estrés}] * 100.$$

3.5. Estudio de la epidermis en condiciones de salinidad

Para el estudio anatómico de la epidermis se obtuvieron improntas de las hojas utilizando la técnica descrita por Rodés y Collazo (2006). Se seleccionaron cinco plantas diferentes de cada tratamiento (0 y 200 mmol.L⁻¹ de NaCl) y se tomaron muestras del foliolo central de cada una de éstas.

El índice estomático (IE) se determinó utilizando la fórmula de Salisbury sugerida por Wilkinson (1979):

$$\text{IE} = \frac{\text{NE}}{\text{NCE} + \text{NE}} \times 100$$

En la cual, NE es el número de estomas por campo de observación y NCE es el número de células epidérmicas típicas en el campo de observación.

La densidad estomática se determinó según la fórmula:

DE (μm^2) = NE / Área de observación, donde:

NE = Número de estomas

$$\text{Área de observación} = \frac{(\text{Número de divisiones} * 10)^2 * \pi}{4}$$

3.6. Diseño experimental y análisis estadístico

Los ensayos se desarrollaron según un diseño completamente aleatorizado con 10 unidades muestrales, para los ensayos de germinación y de crecimiento vegetativo en condiciones de salinidad. Para los análisis histológicos y bioquímicos se tomaron cinco muestras por tratamientos, mientras que para la evaluación de parámetros morfológicos y fisiológicos se analizaron 10.

Los datos fueron procesados según paquete Statgraphic plus 5.1 sobre WINDOW. Se determinó el ajuste a una Distribución Normal mediante la prueba de Bondad de Ajuste Kolmogorov-Smirnov y la Homogeneidad de Varianza mediante las Pruebas de Bartlett (Sigarroa, 1985). En los casos en que los datos cumplieron los requisitos exigidos se procesaron mediante ANOVA de clasificación simple o multifactorial y la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan. Los datos que no cumplieron con estas premisas fueron comparados mediante la Prueba de Kruskal-Wallis y la Prueba de Rangos Múltiples de Student-Newman-Kwels (SNK).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Respuesta de *S. guianensis* (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184 y *C. molle* (Mart.) Benth cv. CIAT-15160 durante la germinación en condiciones salinas

4.1.1. Porcentaje y velocidad de germinación

Las Figuras 6 y 7 muestran los resultados obtenidos en el proceso de germinación de *S. guianensis* (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184 y *C. molle* (Mart.) Benth cv. CIAT-15160 durante ocho días de ensayo, en diferentes concentraciones de NaCl. En ambas especies se observó que en los tratamientos con mayores niveles de la sal, el porcentaje fue menor. En los casos con concentraciones de NaCl igual a 50 mmol.L⁻¹ no se observaron afectaciones en el proceso de germinación. En concentraciones superiores y hasta 200 mmol.L⁻¹ de la sal se observó un retardo en el inicio de la germinación. Los tratamientos con 250 mmol.L⁻¹ mostraron emergencias radicales muy pobres, las cuales fueron inhibidas completamente en 300 mmol.L⁻¹ de NaCl.

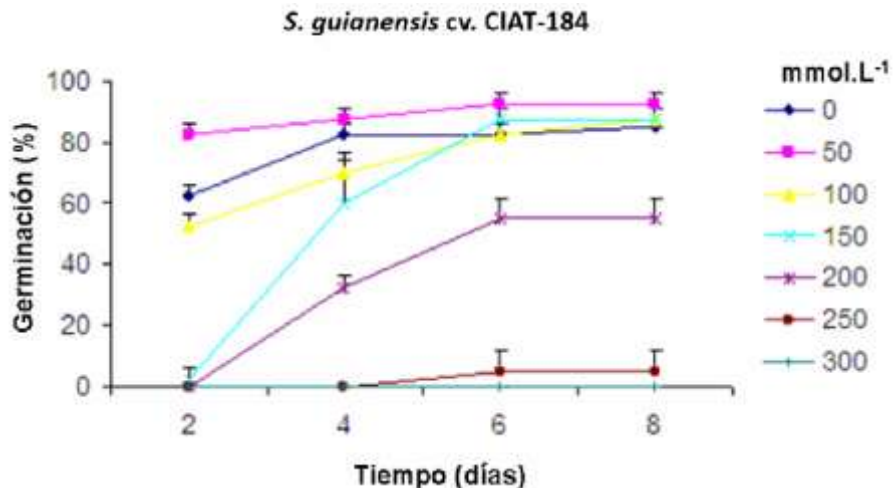


Figura 6. Porcentaje de germinación de semillas frescas de *S. guianensis* (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184 en diferentes concentraciones de cloruro de sodio. Se expresan las medias \pm desviación estándar (n=9). Leyenda: se indican las concentraciones de NaCl en mmol.L⁻¹.

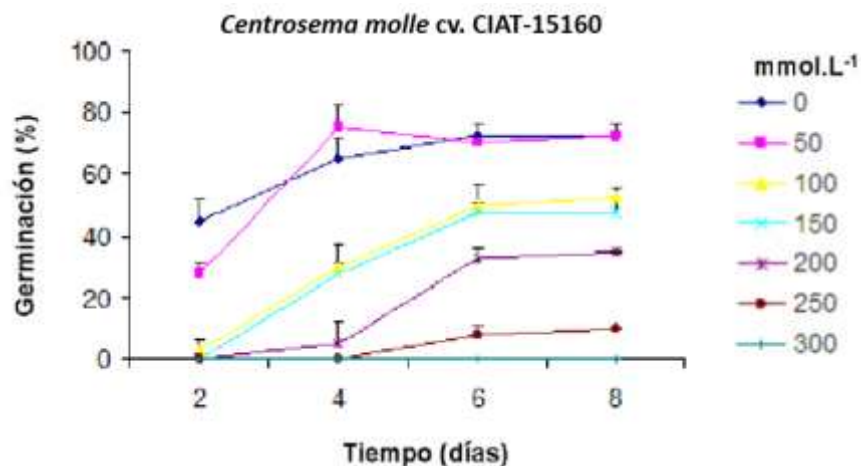


Figura 7. Porcentaje de germinación de *C. molle* (Mart.) Benth cv. CIAT-15160 en diferentes concentraciones de NaCl. Se expresan las medias \pm desviación estándar (n=9). Leyenda: se indican las concentraciones de NaCl en mmol.L⁻¹.

La Tabla 2 muestra el efecto del cloruro de sodio sobre la velocidad de germinación (V_{50}) para ambas especies. Como se puede observar, los valores obtenidos para este indicador en ambas especies fueron menores en concentración superiores de cloruro de sodio.

Tabla 2. Efecto del cloruro de sodio sobre la velocidad de germinación (V_{50}) en función del inverso del tiempo que demoraron las semillas en alcanzar el 50% del máximo de germinación. Medias con letras distintas muestran diferencias significativas entre los tratamientos dentro de la especie, según prueba de Kruskal-Wallis y SNK, *: $p \leq 0,05$. \pm : EE de la media.

NaCl (mmol.L ⁻¹)	Velocidad de germinación (V_{50})	
	<i>S. guianensis</i> cv. CIAT-184	<i>C. molle</i> (Mart.)
0	0,41 \pm 0,046 (b)	0,34 \pm 0,025 (a)
50	0,52 \pm 0,055 (a)	0,33 \pm 0,021 (a)
100	0,38 \pm 0,027 (b)	0,22 \pm 0,017 (b)
150	0,31 \pm 0,031 (c)	0,21 \pm 0,019 (b)
200	0,22 \pm 0,019 (d)	0,15 \pm 0,013 (c)
250	0,03 \pm 0,005 (e)	0,05 \pm 0,007 (d)

En el caso de Stylo cv. CIAT-184 se observó un mayor valor de la velocidad de germinación en 50 mmol.L⁻¹ de cloruro de sodio. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Panuccio *et al.*, (2014) en *Chenopodium quinoa* Willd., los cuales refirieron un incremento en la velocidad de germinación en semillas expuestas a bajas concentraciones de NaCl, CaCl₂, KCl y MgCl₂; aunque no se afectó el porcentaje de germinación al final de experimento. De manera similar, Kumari *et al.* (2014) observaron un efecto estimulador del porcentaje y la velocidad de germinación en *Tephrosia purpurea* L. a dicha concentración, en comparación con el control.

Resultados similares fueron obtenidos en otras leguminosas como *Vicia faba* L. (Abd El-Samad y Shadadd, 2013) y *Phaseolus vulgaris* L. (Mena *et al.*, 2015). El efecto negativo del cloruro de sodio sobre el proceso de germinación también ha sido observado por numerosos investigadores en especies como *Sesamum indicum* L. (Bahrami y Razmjoo, 2012), *Carthamus tinctorius* L. y *Helianthus annuus* L. (Jabeen y Ahmad, 2013), *Capsicum annum* L. (Hassen *et al.*, 2014), *Hordeum vulgare* L. (El Goumi *et al.*, 2014), *Tephrosia purpurea* L. (Kumari *et al.*, 2014) y *Vigna unguiculata* L. (Abdel-Haleem y El-Shaieny, 2015). Las diferencias encontradas entre las especies fue relacionada con las variaciones genéticas presentes en las mismas (Asmare y Ambo, 2013).

Los resultados obtenidos pudieron estar asociados a una disminución del potencial osmótico del medio por la presencia de sales, lo que en consecuencia provoca una reducción del potencial hídrico y con ello se afecta el proceso de imbibición de la semilla (Taiz y Zeiger, 2006). Por otra parte, el cloruro de sodio pudo tener un efecto tóxico sobre el embrión. Los iones en altas concentraciones pueden provocar la inhibición de enzimas importantes que participan en el metabolismo celular, la acidificación del espacio apoplástico necesaria para la activación de enzimas que ablandan la pared celular y permite la elongación celular por acción de la presión de turgencia (Munns, 2002; Taiz y Zeiger, 2006).

4.1.2. Efecto del NaCl sobre la longitud de la radícula, el vástago y el vigor de las plántulas

La longitud de las radículas y del vástago fueron menores en los tratamientos con mayores concentraciones de cloruro de sodio en la etapa germinativa de *S. guianensis* (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184 y *C. molle* (Mart.) Benth cv. CIAT-15160 (Figura 8).

En *Stylo* cv. CIAT-184 se evidenció un crecimiento normal y homogéneo de la raíz hasta 50 mmol.L⁻¹; mientras que *C. molle* cv. CIAT-15160 mostró una mayor sensibilidad al NaCl, con una reducción significativa en la longitud de este órgano a la misma concentración. En *C. molle* cv. CIAT-15160 se observó el desarrollo de epicótilo en el control y 50 mmol.L⁻¹, mientras que en *Stylo* cv. CIAT-184 no hubo un desarrollo de esta estructura.

En concentraciones de 200 mmol.L⁻¹ de NaCl tanto la raíz como el vástago mostraron un crecimiento pobre, mientras que en 300 mmol.L⁻¹ de la sal se observó una inhibición del crecimiento en ambas estructuras (Figuras 9 y 10).

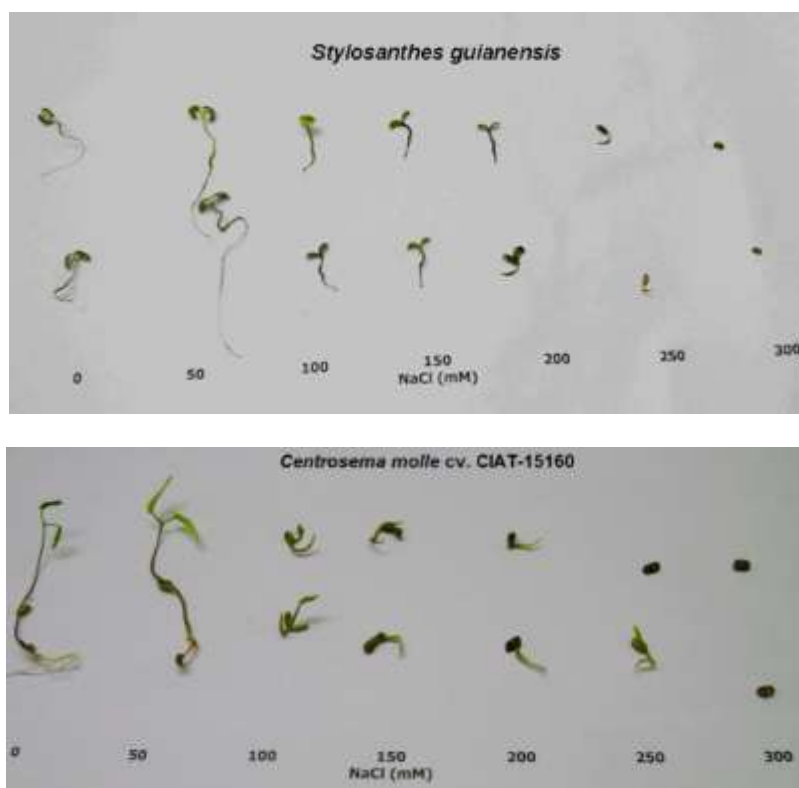


Figura 8. Plántulas de *S. guianensis* (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184 y *C. molle* (Mart.) Benth cv. CIAT-15160 germinadas en diferentes concentraciones de NaCl.

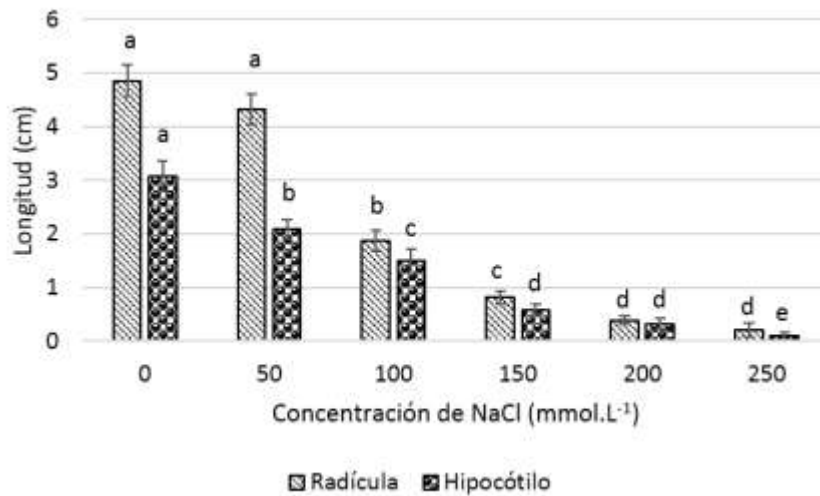


Figura 9. Crecimiento de raíz y tallo de *S. guianensis* (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184 durante el proceso de germinación en diferentes condiciones de salinidad. Medias con letras distintas muestran diferencias significativas entre los tratamientos para un mismo órgano, según prueba de Kruskal-Wallis y SNK, *: $p \leq 0,05$.

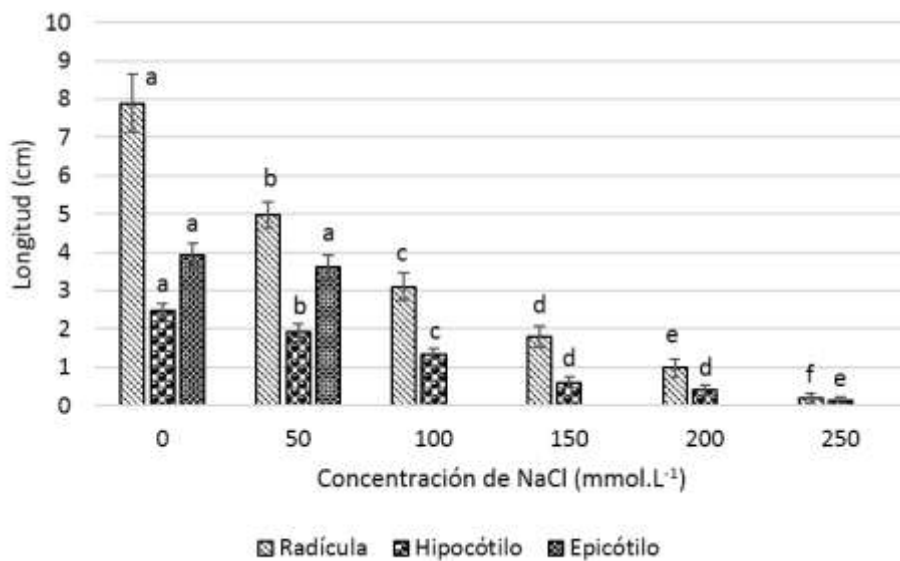


Figura 10. Crecimiento de *C. molle* (Mart.) Benth cv. CIAT-15160 en diferentes concentraciones de NaCl. Medias con letras distintas muestran diferencias significativas entre los tratamientos para un mismo órgano, según prueba de Kruskal-Wallis y SNK, *: $p \leq 0,05$.

El crecimiento del vástago en *S. guianensis* (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184 fue menor en los tratamientos con presencia de cloruro de sodio. A partir de 150 mmol.L⁻¹ no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. En el caso de *C. molle* cv. CIAT-15160, el crecimiento del hipocótilo mostró poco

desarrollo a partir de 50 mmol.L⁻¹, mientras que el epicótilo mostró una disminución drástica a partir de esta concentración, inhibiéndose completamente el crecimiento.

Numerosos autores han referido el efecto negativo que tiene el cloruro de sodio en el crecimiento de los órganos vegetativos en las plántulas (Bahrami y Razmjoo, 2012; Mosavian y Eshraghi-Nejad, 2013). Trabajos realizados sobre germinación en condiciones salinas evidenciaron un retardo en el crecimiento radicular en leguminosas como *Glycine max* L. (Merr.), *Phaseolus aureus* L. (Roxb.), *Trifolium resupinatum* L. var. Majus Boiss, *Phaseolus vulgaris* L. (Ates y Tekeli, 2007), *Medicago sativa* L. (Younesi *et al.*, 2013) y en otras especies como *Capsicum annuum* L. (Hassen *et al.*, 2014) y *Shorgum bicolor* L. (Bafeel, 2014) en concentraciones superiores a 100 mmol.L⁻¹.

Los resultados observados en las plántulas de *S. guianensis* (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184 y *Centrosema molle* cv. CIAT-15160 se pudieran asociar a los posibles cambios hormonales que se desencadenan en los tejidos vegetales sometidos a estrés salino. En los estudios realizados en otras especies como *Pisum sativum* L., *Arabidopsis thaliana* L. (Heynh.), *Triticum aestivum* L., *Zea mays* L., y *Solanum lycopersicon* Mill. se determinó la relación directa entre la presencia del ión Na⁺ en la región adyacente a la raíz y la activación de la síntesis del ácido abscísico (ABA) (Barceló *et al.*, 2002).

El ABA puede inhibir la acción de otros reguladores del crecimiento vegetal como las giberelinas (GA), las citoquininas y las auxinas. Como consecuencia, se pueden afectar varios procesos metabólicos como la activación de las enzimas hidrolíticas a nivel de los cotiledones y el crecimiento de la plántula (Taiz y Zeiger, 2006). En especies como *Arabidopsis thaliana* L. (Heynh.) y *Oryza sativa* L. la reducción en el crecimiento de los tallos se puede manifestar en un medio con 40 mmol.L⁻¹ (Munns y Tester, 2008).

Las Figuras 11 y 12 muestran el efecto negativo de las altas concentraciones de cloruro de sodio sobre el vigor de las plántulas en función de los porcentajes de germinación y las longitudes de los órganos vegetativos (Índice de Vigor I), así como de estos valores y el peso seco de la plántula (Índice de Vigor II) luego de ocho días de germinación (Figuras 11 y 12).

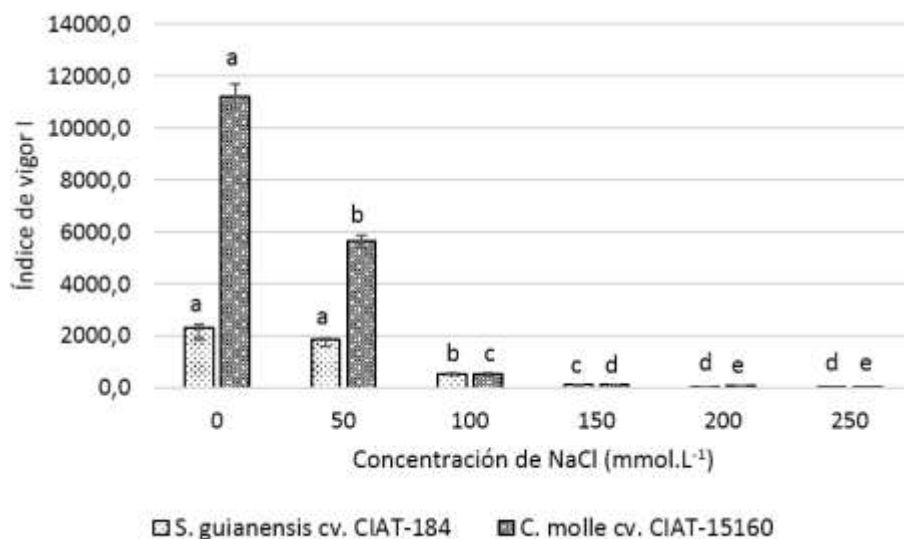


Figura 11. Índice de vigor I en plántulas de *C. molle* cv. CIAT-15160 y *S. guianensis* cv. CIAT-184 sometidas a diferentes concentraciones de NaCl. Medias con letras distintas muestran diferencias significativas entre los tratamientos dentro de la especie, según prueba de Kruskal-Wallis y SNK, *: $p \leq 0,05$.

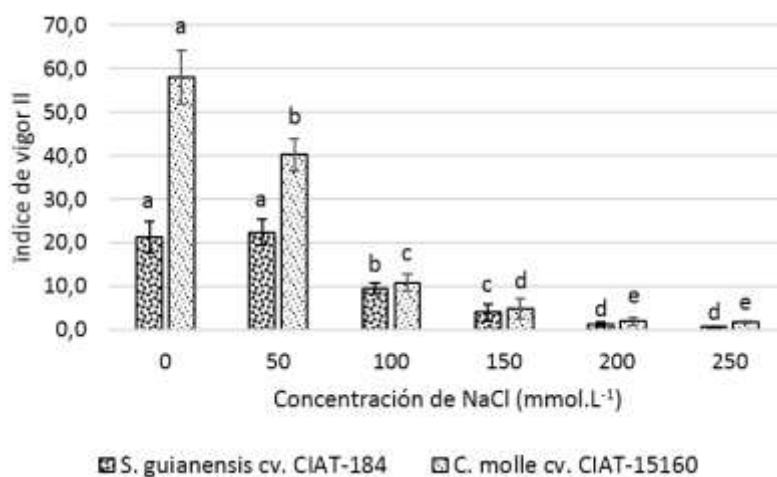


Figura 12. Índice de vigor II en plántulas de *C. molle* cv. CIAT-15160 y *S. guianensis* cv. CIAT-184 sometidas a diferentes concentraciones de NaCl. Medias con letras distintas muestran diferencias significativas entre los tratamientos dentro de la especie, según prueba de Kruskal-Wallis y SNK, *: $p \leq 0,05$.

Los índices de vigor I y II en ambas especies fueron menores con el aumento de la concentración de cloruro de sodio. En el caso de *S. guianensis* cv. CIAT-184 este indicador no se afectó en 50 mmol.L⁻¹ de NaCl, mientras que concentraciones superiores de esta sal manifestaron índices inferiores. Con

relación a *C. molle* cv. CIAT-15160 las plántulas sometidas a 50 mmol.L⁻¹ evidenciaron una disminución en ambos índices con relación al control.

La reducción en los índices de vigor observados con el aumento de sal en el medio, puede estar relacionada con la disminución del crecimiento de los órganos vegetativos y el peso seco de éstos (índice de vigor II). La reducción marcada en el peso seco a concentraciones superiores a 100 mmol.L⁻¹ puede estar asociada con una disminución en la biosíntesis de proteínas (Munns y Tester, 2008).

La salinidad también pudo provocar otros estreses al órgano vegetal como la toxicidad iónica debido a la entrada excesiva de iones, que unido a la disminución de K⁺ con respecto al Na⁺ (desbalance nutricional), constituyen factores importantes que provocan la detención del crecimiento de las plantas. La interferencia en la absorción de iones K⁺ puede provocar profundos cambios metabólicos en los tejidos, debido a la diversidad de funciones que presenta este elemento en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Adams y Shin, 2014).

La disminución en el crecimiento puede estar relacionada también con la acumulación de sales en los espacios intercelulares, lo cual provoca un balance del potencial hídrico entre el medio intra y extracelular y la salida de agua hacia el apoplasto. La disminución del potencial hídrico afecta negativamente al potencial de turgencia de las células que conlleva a una disminución en los procesos de elongación y división celular (Taiz y Zeiger, 2006).

Xiong y Zhu (2002) refirieron que el estrés salino reduce la eficiencia en la traslocación y la asimilación de los materiales almacenados en las semillas, lo que provoca una disminución del crecimiento del brote en las plantas estresadas.

4.1.3. Distribución de la biomasa

El efecto de la salinidad provocó cambios significativos en la distribución de la biomasa en los distintos órganos de las plántulas tanto en *S. guianensis* (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184 (Figura 13) como en *C. molle* (Mart.) Benth cv. CIAT-15160 (Figura 14).

Como se observa en el primer caso, las plántulas no mostraron variación en los porcentajes de masa fresca de raíz, tallo y hoja hasta 100 mmol.L⁻¹ de NaCl. Los mayores porcentajes se obtuvieron en hojas y tallos con aproximadamente un 55 y un 40 % del total, respectivamente. Sin embargo, a concentraciones superiores hubo un aumento en las proporciones de las hojas con relación al total y una disminución del porcentaje de raíces y tallos. En 200 mmol.L⁻¹, los porcentajes fueron reportados solo para hojas y tallos, debido a una inhibición total del desarrollo de las raíces.

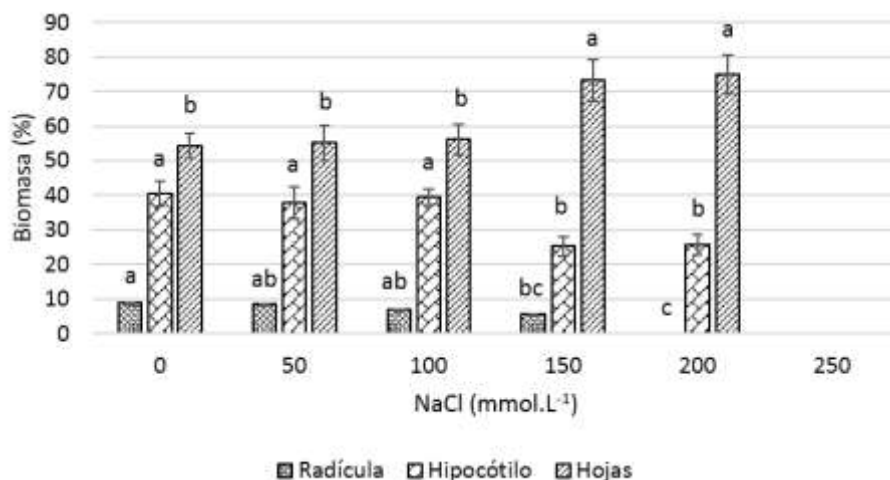


Figura 13. Distribución de la biomasa en plántulas de *S. guianensis* cv. CIAT-184 sometidas a diferentes concentraciones de cloruro de sodio durante ocho días de germinación. Medias con letras distintas muestran diferencias significativas entre los tratamientos dentro de un mismo órgano, según prueba de Kruskal-Wallis y SNK, *: $p \leq 0,05$.

De manera similar, *C. molle* cv. CIAT-15160 mostró cambios en los porcentajes de peso fresco con respecto al total (Figura 14). En concentraciones superiores a 50 mmol.L⁻¹ los mayores valores fueron observados en hojas (cotiledonales), hipocótilo y epicótilo, en orden decreciente. En 100 mmol.L⁻¹ se inhibió el desarrollo de epicótilos y hojas verdaderas, con un aumento significativo del porcentaje en las hojas cotiledonales con respecto al control y hubo una disminución en la biomasa de los hipocótilos. Por otra parte, no se apreciaron cambios significativos en la biomasa de las raíces entre los distintos tratamientos.

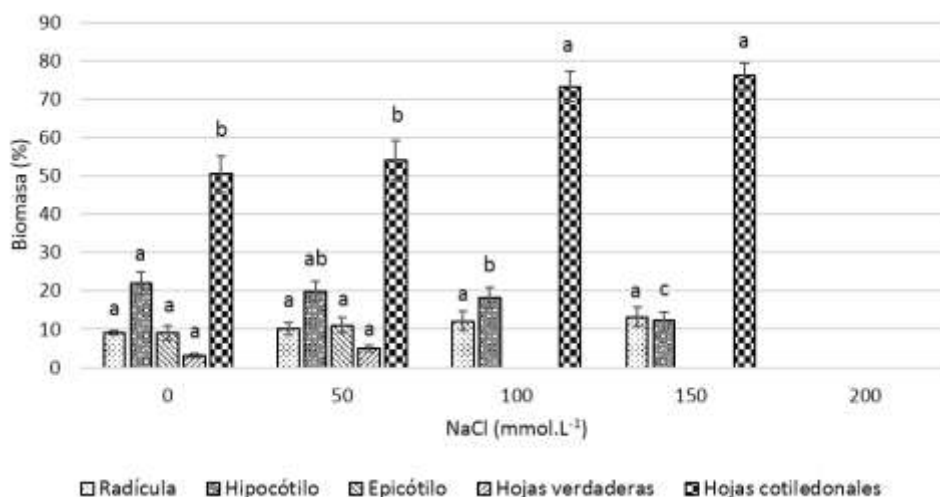


Figura 14. Distribución de la biomasa en plántulas de *C. molle* cv. CIAT- 15160 sometidas a diferentes concentraciones de cloruro de sodio durante ocho días de germinación. Medias con letras distintas muestran diferencias significativas entre los tratamientos dentro de un mismo órgano, según prueba de Kruskal-Wallis y SNK, *: $p \leq 0,05$.

Estos resultados evidencian el efecto tóxico del cloruro de sodio en el crecimiento y el desarrollo de las plántulas. En el caso de *C. molle* cv. CIAT-15160 se evidencia una mayor afectación en comparación con *S. guianensis* cv. CIAT-184, ya que en concentraciones superiores a 150 mmol.L⁻¹, los porcentajes de biomasa estuvieron principalmente en función de las hojas cotiledonales con un pobre o nulo desarrollo de las restantes estructuras. Este resultado sugiere una interrupción del metabolismo de los carbohidratos, probablemente por inhibición de la α -amilasa que hidroliza las reservas de almidón en los cotiledones.

Los resultados obtenidos coinciden con los referidos por otros autores en un rango similar de concentraciones de NaCl, en especies como *Brassica napus* L. (Jamil *et al.*, 2006), *Catharanthus roseus* L. (Jaleel *et al.*, 2008), *Triticum aestivum* L. (Maghsoudi y Maghsoudi *et al.*, 2008), *Sesamum indicum* L. (Bahrami y Razmjoo, 2012) y *Hordeum vulgare* L. (El Goumi *et al.*, 2014).

Estudios recientes de estrés salino en *Tagetes erecta* L. mostraron una disminución en la biomasa, la altura, la longitud de la raíz, el número de hojas por plantas y el peso fresco y seco en plantas cuando la concentración de NaCl fue superior a 150 mmol.L⁻¹ (Sayyed *et al.*, 2015).

4.2. Respuesta a salinidad de *S. guianensis* cv. CIAT-184 y *C. molle* cv. CIAT-15160 durante el crecimiento vegetativo temprano

4.2.1. Caracteres bioquímicos y fisiológicos

4.2.1.1. Contenido de fenoles

Las Figuras 15 y 16 muestran los niveles de fenoles solubles, ligados a la pared celular y totales, en raíz y en hoja de *S. guianensis* (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184 a diferentes concentraciones de NaCl, respectivamente. La exposición de las plántulas de *Stylo* cv. CIAT-184 al NaCl, provocó cambios en las concentraciones de fenoles totales en las raíces, con un valor máximo a 100 mmol.L⁻¹. Las concentraciones de los fenoles solubles y los ligados a la pared celular en este órgano fueron mayores con el incremento de la concentración de NaCl. No obstante, a 200 mmol.L⁻¹ se observó una disminución lo cual puede estar determinado por una disminución del metabolismo de los fenoles a elevadas concentraciones de esta sal.

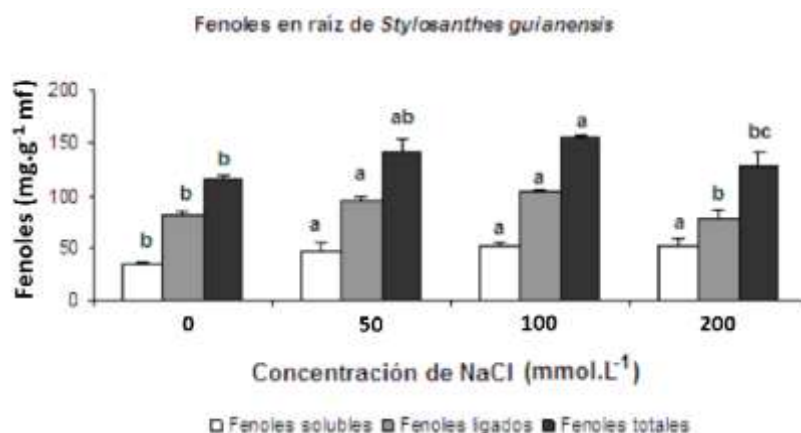


Figura 15. Contenido de fenoles totales en raíces de plantas de *S. guianensis* cv. CIAT-184 desarrolladas en diferentes concentraciones de NaCl. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos de una misma variante fenólica, $p < 0,05$ según Test de Duncan.

En las hojas de *S. guianensis* cv. CIAT-184 (Figura 16) no se observaron cambios en las concentraciones de los fenoles ligados a la pared celular y de los totales entre las diferentes concentraciones de NaCl. Por el contrario, las concentraciones de fenoles solubles fueron superiores a partir de 100 mmol.L⁻¹ con respecto al control. Esto pudo estar asociado con una translocación de los

compuestos fenólicos desde la raíces hasta las hojas, donde se apreciaron aumentos significativos en la concentración de los mismos.

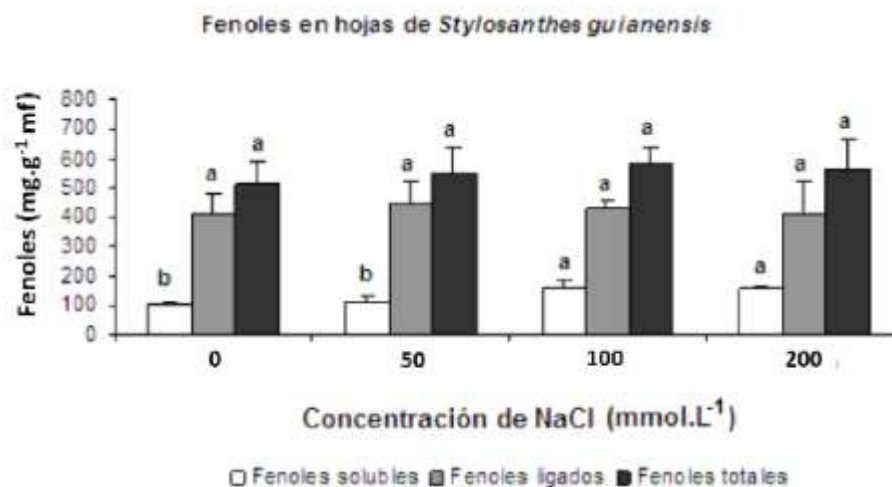


Figura 16. Fenoles totales en hojas de plantas de *S. guianensis* (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184 desarrolladas en diferentes concentraciones de NaCl. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos de una misma variante fenólica, $p < 0,05$ según Test de Duncan.

Resultados similares fueron referidos en plántulas de *Salicornia brachiata* Roxb. (Santhanakrishnan *et al.*, 2014), *Aeluropus littoralis* Willd. (Haghighi *et al.*, 2014), *Solanum lycopersicon* Mill. (Mohamed *et al.*, 2015) y *Pistacia vera* L. (Lotfi *et al.*, 2015), las cuales fueron desarrolladas en condiciones estresantes de cloruro de sodio. Estos autores encontraron incrementos significativos de fenoles en las raíces y las hojas de estas especies con el aumento de la concentración de esta sal.

C. molle cv. CIAT-15160 mostró incrementos significativos de fenoles totales en las raíces con el aumento de la concentración de NaCl en el medio, lo cual estuvo relacionado con el aumento de los fenoles solubles (Figura 17). Los fenoles ligados, por el contrario, no mostraron cambio entre los tratamientos.

En las hojas de *C. molle* cv. CIAT-15160 (Figura 18), por el contrario, no se apreciaron diferencias en las concentraciones de fenoles solubles entre los distintos tratamientos, mientras que las concentraciones de los fenoles ligados a la pared celular fueron superiores con el incremento de la concentración de NaCl, lo que influyó en el incremento de los fenoles totales. El hecho de que no se hayan

encontrado incrementos en los valores de fenoles solubles, puede estar asociado a la capacidad de esta especie para trasladar dichos compuestos a las partes aéreas de la planta.

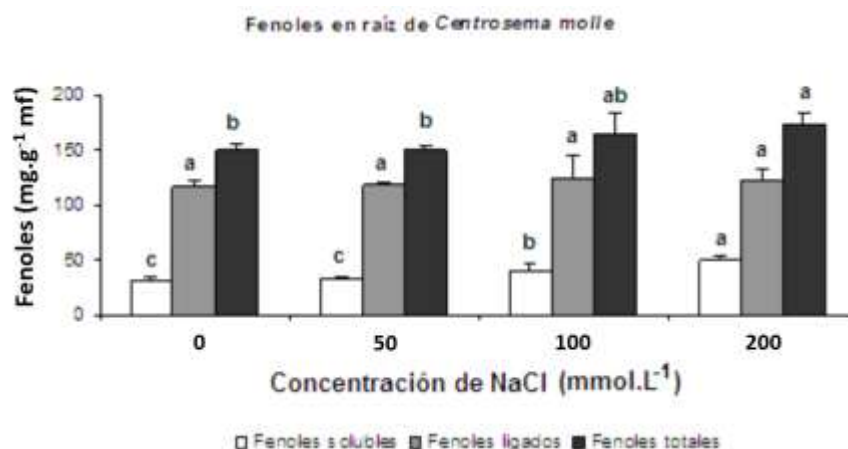


Figura 17. Contenido de fenoles en raíces de plantas de *C. molle* (Mart.) Benth cv. CIAT-15160 desarrolladas en diferentes concentraciones de NaCl. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos de una misma variante fenólica, $p < 0,05$ según Test de Duncan.

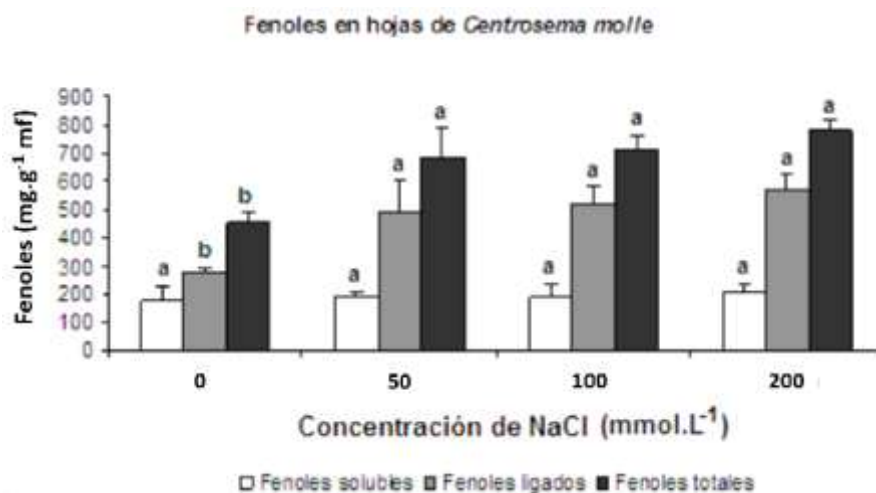


Figura 18. Contenido de fenoles en hojas de plantas de *C. molle* (Mart.) Benth cv. CIAT-15160 desarrolladas en diferentes concentraciones de NaCl. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos de una misma variante fenólica, $p < 0,05$ según Test de Duncan.

El incremento en los niveles de fenoles luego de la aplicación de sales en el medio ha sido referido como un mecanismo de defensa antioxidante. Estos compuestos tiene la capacidad de reducir las concentraciones de las especies reactivas del oxígeno, que afectan drásticamente el metabolismo celular y

protegen las membranas biológicas del daño oxidativo ocasionado por las EROs (Chernane *et al.*, 2015).

El aumento en el contenido de fenoles totales puede estar relacionado con la sobreexpresión de factores de transcripción que inducen la síntesis de enzimas que participan en la producción de los compuestos fenólicos. Entre estas se encuentra la Fenilalanina amonio liasa, la cual constituye la principal enzima en la ruta metabólica de los compuestos polifenólicos (Baatour, *et al.*, 2013; Cheng *et al.*, 2013).

4.2.1.2. Contenido de clorofilas

La cuantificación del contenido de clorofilas (a, b y totales) para *S. guianensis* (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184 y *C. molle* (Mart.) Benth cv. CIAT-15160 se muestran en las Figuras 19 y 20, respectivamente. En el caso de *Stylo* cv. CIAT-184 no se observaron cambios significativos en el contenido de ambos pigmentos en presencia de cloruro de sodio (Figura 19). Los valores obtenidos en *C. molle* cv. CIAT-15160 no mostraron una variación con el aumento en los niveles de NaCl para la clorofila b; sin embargo, la concentración de clorofila a fue significativamente menor en 200 mmol.L⁻¹ de esta sal, lo que debió estar relacionado con valores también inferiores de pigmentos totales observados a dicha concentración de cloruro de sodio (Figura 20).

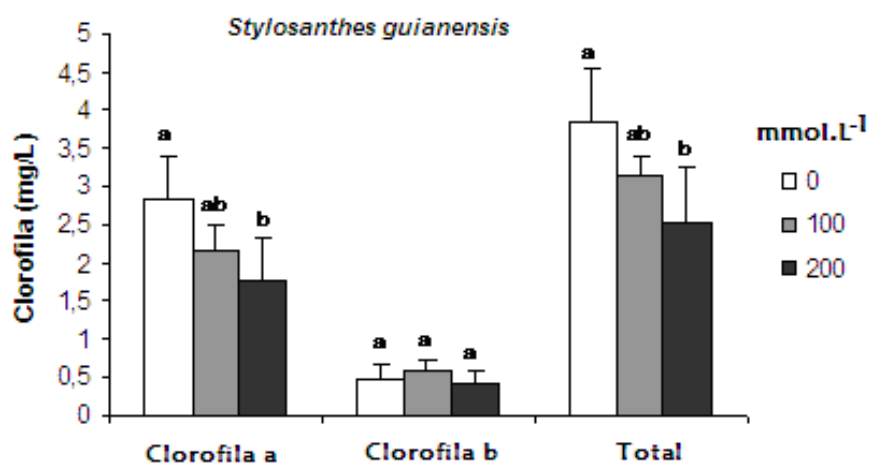


Figura 19. Concentración de clorofila a, b y a+b en hojas de *S. guianensis* (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos de una misma variante clorofílica, $p < 0,05$ según Test de Duncan.

Los resultados obtenidos en *C. molle* cv. CIAT-184 concuerdan con los obtenidos por otros autores, los cuales han referido una disminución en los niveles de clorofilas en diferentes especies sometidas a estrés salino como *Oryza sativa* L. (Jamil *et al.*, 2012), *Triticum aestivum* L. (Bahrani *et al.*, 2013a; Barakat *et al.*, 2013), *Vicia faba* L. (Hassanein *et al.*, 2012), *Capsicum annum* L. (Azfal *et al.*, 2014), *Linum usitatissimum* L. (Mervat y Dawood, 2014), *Triticum durum* L. (Chernane *et al.*, 2015) y *Tagetes erecta* L. (Sayyed *et al.*, 2015). Sin embargo, estudios realizados en *Morus alba* L. (Vijayan *et al.*, 2008) y *Brassica* spp. mostraron un aumento en el contenido de los pigmentos fotosintéticos en condiciones salinas, lo cual fue relacionado con una tolerancia de estas especies a la salinidad (Jamil *et al.*, 2014).

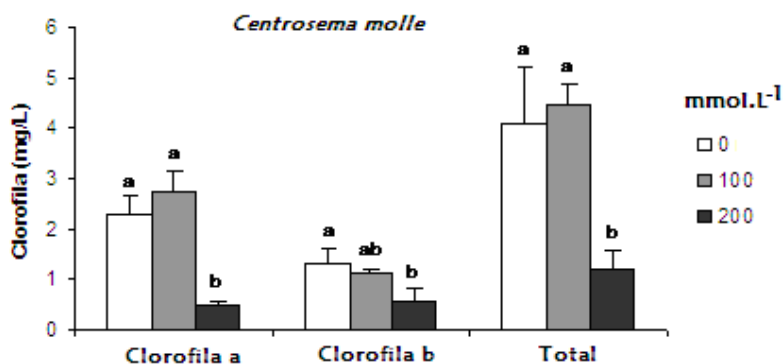


Figura 20. Concentración de clorofila a, b y a+b en hojas de *C. molle* (Mart.) Benth cv. CIAT-15160. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos de una misma variante clorofílica, $p < 0,05$ según Test de Duncan.

De manera similar, en estudios realizados por Ganehan *et al.* (2016) con líneas de arroz (*Oryza sativa* L.) tolerantes y susceptibles a NaCl, se observó una disminución en los niveles de clorofilas en las líneas susceptibles a concentraciones elevadas de la sal, en comparación con las tolerantes.

La reducción en el contenido de clorofila en condiciones de estrés salino pudo estar relacionada con la destrucción de pigmentos clorofílicos por acción de las EROs, la enzima clorofilasa que separan el fitol del anillo tetrapirrólico de la clorofila (Benedetti y Arruda, 2002), a la inestabilidad de los complejos proteína-pigmentos (Jamil *et al.*, 2012); así como a la interferencia de los iones Na⁺ en la síntesis de *nov*o de proteínas y componentes estructurales de la clorofila (Jaleel *et*

al., 2007). Estos aspectos dependen de la concentración de sales en el medio, del tiempo de exposición y la especie en cuestión (Šiler *et al.*, 2007).

Estudios realizados con callos y plantas de girasol (*Helianthus annuus* L.) en condiciones de estrés salino, demostraron una disminución en el contenido de precursores importantes de las clorofilas como el glutamato y el ácido 5-aminolevulínico. Estos resultados indicaron que la disminución en las concentraciones de estos pigmentos en condiciones de estrés salino se debe más al efecto negativo sobre la biosíntesis que a los procesos degradativos (Akram y Ashraf, 2011; Ashraf y Harris, 2013).

4.2.1.3. Índice de estabilidad clorofílica

La Figura 21 muestra los valores del Índice de Estabilidad Clorofílica para ambas especies en 100 y 200 mmol.L⁻¹ de NaCl. Como se puede observar, *S. guianensis* (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184 mostró una mayor estabilidad en el contenido de clorofilas en comparación con *C. molle* cv. CIAT-15160, donde se observó una variación notable de este indicador en 200 mmol.L⁻¹ de la sal.

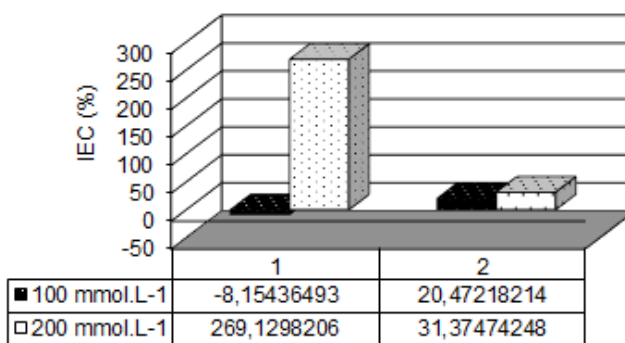


Figura 21. Índice de Estabilidad Clorofílica (IEC) en *C. molle* (Mart.) Benth cv. CIAT-15160 (1) y *S. guianensis* (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184 (2).

La resistencia del sistema fotosintético a la salinidad ha sido asociada con la capacidad de las especies vegetales para compartimentalizar efectivamente los iones en las vacuolas, el citoplasma y los cloroplastos (Mane *et al.*, 2011). Por otra parte, este resultado pudiera estar asociado al incremento en el contenido de fenoles que actúan a nivel celular, en procesos de detoxificación de las especies

reactivas del oxígeno y por tanto, protegen el aparato fotosintético de la acción dañina de estos radicales tóxicos (Sabra *et al.*, 2012).

La relación clorofila a / clorofila b para *S. guianensis* cv. CIAT-184 y *C. molle* cv. CIAT-15160 se observa en la Figura 22. Los valores obtenidos en el primer caso no mostraron cambios significativos entre el control y las concentraciones de 100 y 200 mmol.L⁻¹ de cloruro de sodio. En el caso de *C. molle* cv. CIAT-15160 no se observaron diferencias entre el control y 100 mmol.L⁻¹ de esta sal; sin embargo, a 200 mmol.L⁻¹ se evidenciaron valores menores con relación a los otros tratamientos. Šiler *et al.* (2007) plantearon que la variación en el valor clorofila a/b puede estar asociado a cambios entre el contenido de ambos tipos de clorofilas en los fotosistemas I y II bajo condiciones de estrés salino.

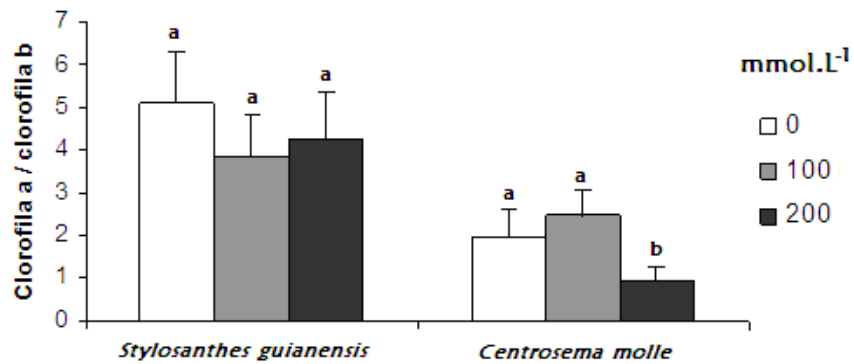


Figura 22. Relación Clorofila a / Clorofila b en plántulas de *S. guianensis* (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184 y *C. molle* (Mart.) Benth cv. CIAT-15160 en diferentes concentraciones de cloruro de sodio. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos para una misma especie, $p < 0,05$ según Test de Duncan.

Estos resultados sugieren que *Stylo* cv. CIAT-184 pudiera presentar mecanismos bioquímicos que evitan una descompensación entre los niveles de clorofila a y b; a diferencia de *C. molle* cv. CIAT-15160, cuya disminución en la relación clorofila a / b, pudiera inferir una mayor susceptibilidad del sistema fotosintético al cloruro de sodio.

4.2.2. Peso fresco y peso seco

La adición de concentraciones elevadas de NaCl al sustrato provocó, de manera general, valores menores de masa fresca en raíz, tallo y hojas de ambas especies en comparación con el control (Figura 23). Sin embargo, hubo diferencias en la respuesta entre los órganos vegetativos y entre las especies. En

Stylo. cv. CIAT-184 las raíces fueron las más sensibles, con una disminución significativa del peso fresco a partir de 50 mmol.L⁻¹, mientras que en los tallos y las hojas los cambios fueron observados a partir de 100 mmol.L⁻¹ y 200 mmol.L⁻¹, respectivamente.

En el caso de *C. molle* cv. CIAT-15160 los cambios en el peso fresco fueron significativos en 200 mmol.L⁻¹ en los diferentes órganos. Los valores obtenidos para la raíz y la hoja fueron inferiores a los obtenidos a dicha concentración en iguales órganos de *S. guianensis* (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184.

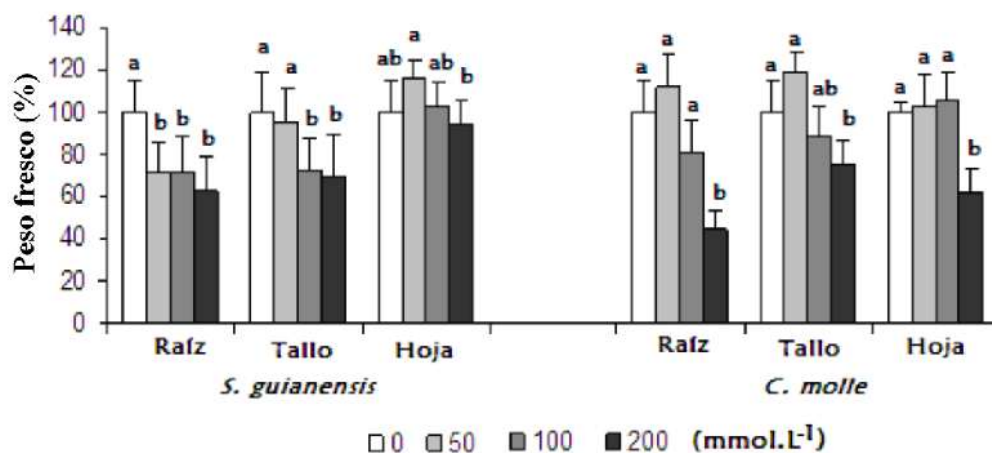


Figura 23. Peso fresco de la raíz, el tallo y las hojas de *S. guianensis* (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184 y de *C. molle* (Mart.) Benth cv. CIAT-15160 sometidas a estrés con diferentes concentraciones de NaCl. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos para un mismo órgano, p<0,05 según Test de Duncan.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otras especies como *Solanum lycopersicon* Mill. (Lolaei, 2012), *Capsicum annum* L. (Hassen *et al.*, 2014), *Thymus kotschyanus* L. (Mousavi *et al.*, 2014) y *Tagetes erecta* L. (Koksal *et al.*, 2016). El peso fresco que puede retener una planta en condiciones de salinidad está relacionado con los mecanismos bioquímicos y fisiológicos que presenta la misma, para enfrentar el estrés osmótico que impone el medio. Las plantas bajo estas condiciones pueden contrarrestar la pérdida de agua en los tejidos, con un aumento de la concentración de ácido abscísico que provoca el cierre estomático (Zhu, 2002) y/o con un incremento de los niveles de osmolitos, los cuales aumentan la presión osmótica de las células y evitan la pérdida de agua (Sairam y Tyagi, 2004).

Un evento bioquímico que puede estar relacionado con la pérdida de agua en los tejidos vegetales es la expresión de acuaporinas en las membranas citoplasmáticas. Se ha referido en la literatura la expresión de estos genes inducidos por deshidratación y estrés salino, que pueden incrementar la permeabilidad al agua y facilitar su flujo (Sarda *et al.*, 1999). Por el contrario, también existen ejemplos de una regulación negativa de las acuaporinas por salinidad y estrés hídrico, lo que genera una disminución del flujo de agua a través de las membranas que permite la conservación de la misma en los tejidos (Johansson *et al.*, 1998).

El peso seco determinado para *S. guianensis* (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184 fue menor a 50 mmol.L⁻¹ para raíz (Figura 24). En los tallos y en las hojas el cambio se observó a partir de 100 mmol.L⁻¹. En el caso de *C. molle* cv. CIAT-15160, no se encontraron variaciones en tallo y hoja entre los distintos tratamientos y el control, mientras que en raíz el peso seco disminuyó en 200 mmol.L⁻¹ de la sal. En general, la reducción en este indicador con relación al control osciló entre un 10 y un 20 % luego de 10 días de exposición al NaCl.

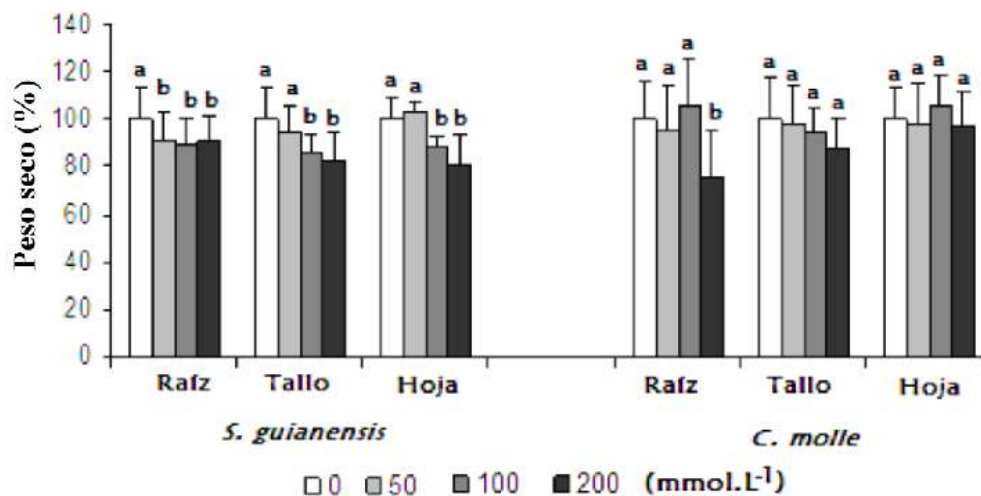


Figura 24. Peso seco de la raíz, el tallo y las hojas de *S. guianensis* (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184 y de *C. molle* (Mart.) Benth cv. CIAT-15160 sometidas a estrés con diferentes concentraciones de NaCl. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos para un mismo órgano, $p < 0,05$ según Test de Duncan.

Las raíces, en ambas especies, mostraron los valores más bajos de peso fresco y peso seco, en comparación con el resto de los órganos vegetativos. Esto puede estar asociado a que este órgano se encuentra expuesto directamente al

estrés salino, por lo cual, el efecto desestabilizador del cloruro de sodio en el ambiente intra y extracelular es mayor en la raíz que en los órganos aéreos.

Varios autores han referido el efecto negativo del cloruro de sodio en el contenido de peso seco en especies como *Vicia faba* L. (Khalafallah *et al.*, 2008), *Zea mays* L. (Hatzig *et al.*, 2010), *Cucurbita* spp., *Brassica* spp. (Bahrani, 2013b; Jamil, *et al.*, 2014); *Capsicum annuum* L. (Afzal *et al.*, 2014) y *Jatropha curcas* L. (Elhag y Gafar, 2014).

Las diferencias observadas entre especies pueden estar determinadas por las características genéticas de cada una en particular. La presencia de diversos mecanismos de respuesta fisiológica frente al estrés salino permite reestablecer la homeostasis iónica y osmótica, lo cual contribuye a un funcionamiento fisiológico adecuado de las células, los tejidos y los órganos afectados.

La disminución del peso seco en el vástago y la raíz, en condiciones de estrés salino, puede estar asociado a una reducción de la actividad fotosintética. La afectación en este proceso limita no solo la producción de azúcares necesarios para la producción de energía metabólica durante la respiración celular, sino también la fuente primaria de estructuras carbonadas para la síntesis de diferentes estructuras celulares, que en su conjunto, determinan el peso seco del vegetal (Mervat y Dawood, 2014). Por otra parte, esto puede estar relacionado con una afectación en el metabolismo del nitrógeno en la raíz al disminuir la absorción de nitrato, lo cual, en consecuencia, afecta la síntesis proteica.

Estudios realizados por diversos investigadores evidenciaron el efecto negativo del NaCl sobre el proceso fotosintético (Abbasi-Shahmersi *et al.*, 2012), donde inciden diversos factores como la destrucción de la clorofila luego de la separación de las mismas de las membranas tilacoidales; aumento de la resistencia estomática mediada por un aumento de la concentración del ABA, lo cual limita la entrada de CO₂ a los tejidos fotosintéticos, disminución de la eficiencia de la Ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa y el proceso de regeneración de la ribulosa 1,5-bifosfato que tiene lugar durante el ciclo de Calvin (Jamil *et al.*, 2012).

A pesar del efecto negativo del cloruro de sodio sobre la producción de masa seca observada en el presente trabajo, los valores obtenidos para ambos cultivares reflejan las potencialidades genéticas que poseen ambas especies para tolerar altas concentraciones de esta sal. Según Munns (2002), las especies tolerantes a salinidad como *Brassica napus* L. luego de algún tiempo de exposición a 200 mmol.L⁻¹ de NaCl, pueden tener una reducción de aproximadamente el 20 % del peso seco, las especies moderadamente tolerantes como el algodón (*Gossypium hirsutum* L.) hasta un 60 %, mientras que las sensibles como la soya (*Glycine max* L.) pueden morir a causa del estrés osmótico y la toxicidad iónica que impone esta concentración de NaCl. Este resultado sugiere el uso del peso seco como indicador de tolerancia a salinidad en ambas especies.

4.2.2.1. Relación raíz/brote

Los resultados obtenidos en *S. guianensis* cv. CIAT-184 mostraron que no hubo variaciones en este indicador para concentraciones de cloruro de sodio entre 0 y 100 mmol.L⁻¹. Sin embargo, se observó un aumento en la relación raíz/brote a 200 mmol.L⁻¹ de esta sal. En *C. molle* cv. CIAT-15160 no se observaron variaciones en este indicador para las diferentes concentraciones evaluadas (Figura 25).

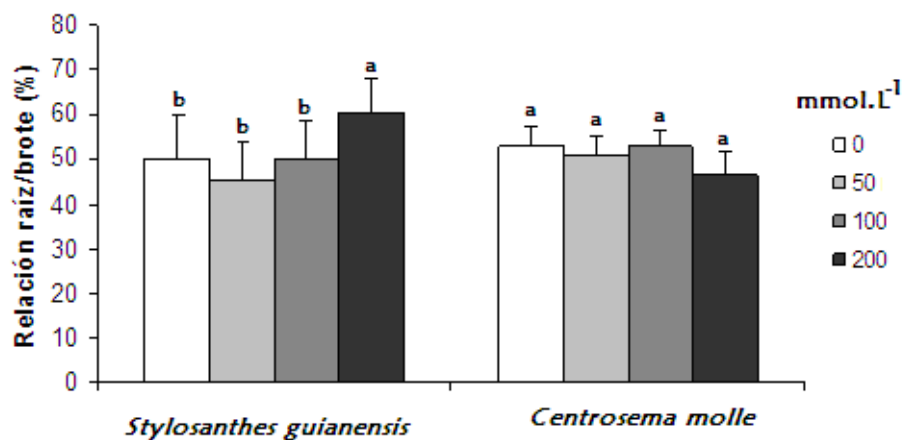


Figura 25. Relación raíz/brote en plántulas de *S. guianensis* (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184 y *C. molle* (Mart.) Benth cv. CIAT-15160 sometidas a diferentes concentraciones de NaCl. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos para una misma especie, p<0,05 según Test de Duncan.

Desde el punto de vista fisiológico, el resultado observado en Stylo cv. CIAT-184 puede estar asociado con un incremento en el flujo de compuestos osmóticamente activos como proteínas y aminoácidos hacia las raíces. Este fenómeno puede constituir un mecanismo antiestrés que permite reducir la diferencia del potencial de agua que se genera entre el medio hiperosmótico y los tejidos internos de la raíz. Resultados similares han sido descritos por otros autores en plantas sometidas a estrés salino como *Callistemon citrinus* (Curtis) Skeels (Alvarez y Sanchez-Blanco, 2014) y en *Triticum aestivum* L. (Byrt *et al.*, 2014). La relación raíz/brote ha sido referida como un indicador de tolerancia a estrés salino en *Myrtus communis* L. por Acosta-Motos *et al.* (2015).

Investigaciones recientes sugieren la presencia de mecanismos moleculares que intervienen en el alargamiento de la raíz como respuesta al estrés osmótico. Estudios realizados por Zhuang *et al.* (2014) en *Solanum linnaeanum* (Heeper & Jaeger) en condiciones de salinidad detectaron la expresión de 10 micro-ARNs de bajo peso molecular con función reguladora antiestrés. Estos autores relacionaron el microARN “sli-miR397” con un efecto regulador sobre el gen de la lacasa (fenol oxidasa), la cual ha sido asociada con cambios notables en el crecimiento de la raíz en condiciones de deshidratación (Cai *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos pueden inferir la presencia de microARNs con funciones reguladoras en el crecimiento de las raíces en Stylo cv. CIAT-184 en condiciones de estrés salino.

En contraste con los resultados obtenidos con Stylo cv. CIAT-184, no se encontraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos para *C. molle* cv. CIAT-15160, lo cual pudiera sugerir la carencia de factores genéticos intrínsecos en la especie, que propicien la síntesis y redistribución de compuestos osmóticamente activos hacia las zonas más afectadas por salinidad.

Resultados diferentes fueron obtenidos por Sneha *et al.* (2013) en *Pennisetum glaucum* L., quienes observaron una disminución en la relación raíz/brote con el aumento de la concentración de cloruro de sodio en el medio.

Rogers *et al.* (1996) plantearon que la relación raíz/brote constituye un valor que depende de la distribución de los compuestos fotosintetizados por la planta, y

se encuentra bajo la influencia de numerosos factores. La relación raíz/brote depende de la capacidad que presente la especie o variedad de modificar la distribución de masa seca, en función de elevar la tolerancia frente a condiciones estresantes.

4.3. Estudio de la epidermis en condiciones de salinidad

4.3.1. Caracteres generales de la epidermis

La epidermis de *Centrosema molle* (Mart.) Benth cv. CIAT-15160 y *S. guianensis* (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184, mostraron aparatos estomáticos en ambas caras de las hojas, por lo que se pueden clasificar como anfiestomáticas según la secuencia de aparición de los estomas en la lámina foliar (Figura 26).

Coincidentemente, en todos los casos los estomas son de tipo Paracítico, donde cada célula estomática se encuentra acompañada por una o más células subsidiarias, cuyos ejes longitudinales son paralelos a los de las células estomáticas y a la apertura del estoma (González, 2008).

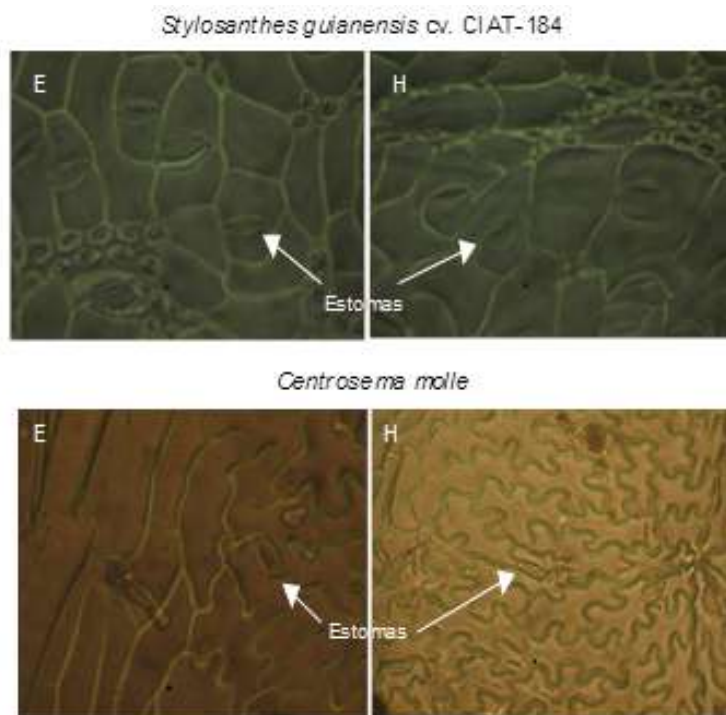


Figura 26. Improntas epidérmicas de las caras abaxial (E) y adaxial (H) de hojas primordiales de *S. guianensis* (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184 (superior) y *C. molle* (Mart.) Benth cv. CIAT-15160 (inferior), con estomas de tipo Paracítico. CS: Células subsidiarias, PG: pelo glandular tector unicelular. Aumento 400X.

C. molle (Mart.) Benth cv. CIAT-15160 posee células epidérmicas con paredes celulares onduladas tanto por la cara adaxial como abaxial, lo cual coincide con otros géneros de leguminosas como *Phaseolus* (Kaymakanova y Stoeva, 2008). Sin embargo, en *S. guianensis* (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184 las células epidérmicas tienen paredes celulares casi rectas, que determinan las formas poliédricas de sus células.

En las improntas epidérmicas de *S. guianensis* cv. CIAT-184 se pueden apreciar, muy próximo a los estomas, unas estructuras redondeadas que sugieren acumulaciones de cristales. Asimismo, se observó en esta especie la presencia de agrupamientos estomáticos a manera de clúster.

Los pelos o tricomas observados en la epidermis de *C. molle* (Mart.) Benth cv. CIAT-15160 son del tipo tector unicelular con más o menos seis células poligonales en la base (Figura 27).

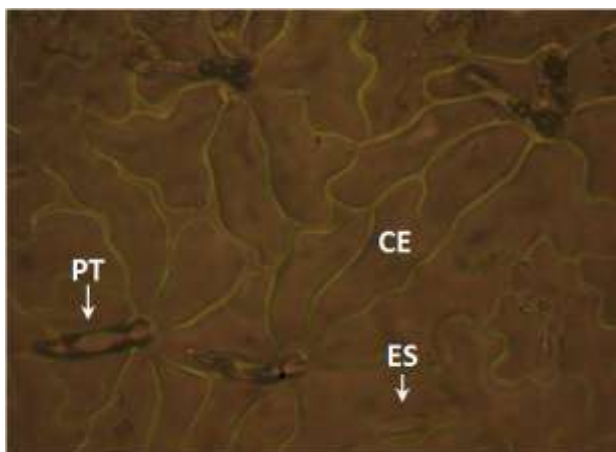


Figura 27. Pelos o Tricomas de tipo tector unicelular en impronta epidérmica de cara abaxial de *Centrosema molle* (Mart.) Benth cv. CIAT-15160. 400 X. PT: pelo tector unicelular, ES: estoma, CE: célula epidérmica.

4.3.2. Efecto del NaCl sobre la epidermis

Entre los cambios que pueden detectarse en la morfología de la planta, como respuesta a cualquier alteración ambiental, están las modificaciones que ocurren en el tejido epidérmico.

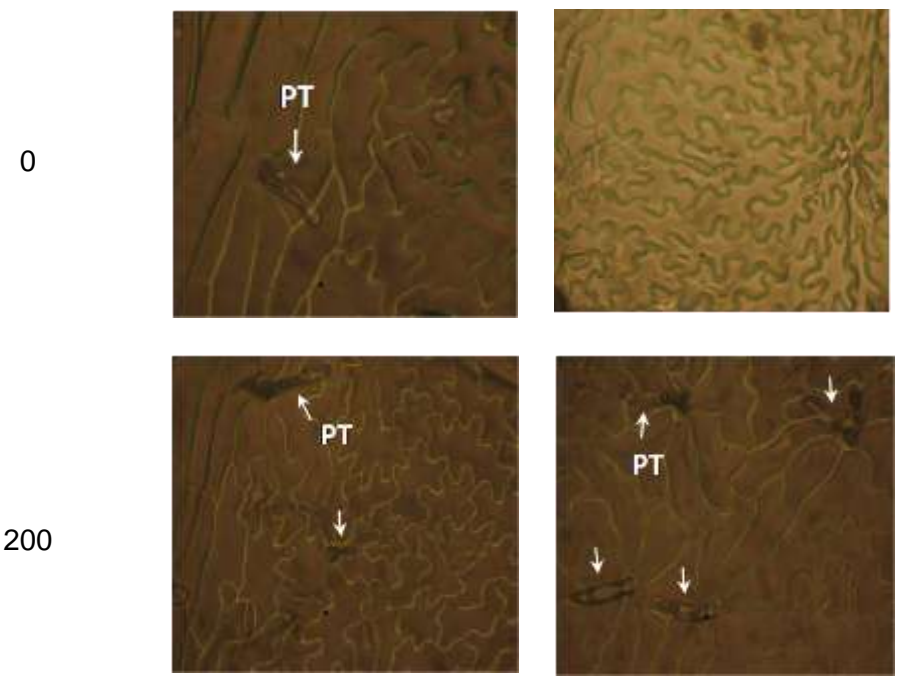
Los principales cambios detectados en la epidermis de *C. molle* (Mart.) Benth cv. CIAT-15160 en presencia de altas concentraciones de cloruro de sodio,

estuvieron relacionados con el incremento del número de pelos o tricomas en ambas caras de las hojas (Tabla 3).

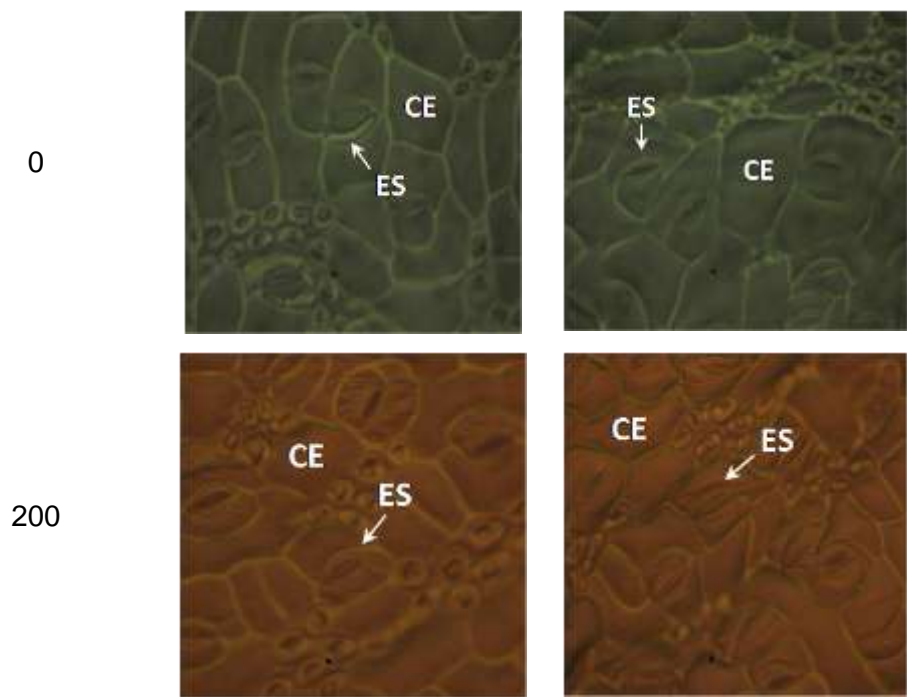
Tabla 3. Improntas epidérmicas de *C. molle* (Mart.) Benth cv. CIAT-15160 y *S. guianensis* (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184.

NaCl (mmol.L⁻¹) Superficie adaxial (envés) Superficie abaxial (Haz)

***Centrosema molle* cv. CIAT-15160**



***Stylosanthes guianensis* cv. CIAT-184**



En el caso de *S. guianensis* (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184 se pudo observar la presencia de plegamientos en las células subsidiarias, lo cual pudo estar asociado a la pérdida de turgencia por una disminución del potencial osmótico en el medio. Con relación a los conglomerados estomáticos, no se observaron diferencias entre plantas control y tratadas con 200 mmol.L⁻¹ de la sal. En plántulas de *Vicia faba* L. sometidas a 0,5 y 1% (p/v) de NaCl se observaron incrementos en la formación de estos conglomerados estomáticos y sus autores lo asociaron a las alteraciones que pueden tener los meristemoides de los cuales se forman los estomas (Gan *et al.*, 2010).

Los índices estomáticos determinados en plantas estresadas y controles (0 mmol.L⁻¹ de la sal), no mostraron diferencias estadísticas tanto en *S. guianensis* cv. CIAT-184 como en *C. molle* cv. CIAT-15160 (Tabla 4). Sin embargo, la densidad estomática disminuyó significativamente en 200 mmol.L⁻¹ de NaCl, en comparación con el control en ambas especies.

Tabla 4. Índice estomático y densidad estomática en plántulas de *S. guianensis* cv. CIAT-184 y *Centrosema molle* cv. CIAT-15160 control y sometidas a 200 mmol.L⁻¹ de NaCl. IE: índice estomático, DE: densidad estomática, EE: error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de los tratamientos para cada indicador en una misma especie, p<0,05 según Test de Duncan.

Tratamientos	<i>Stylosanthes guianensis</i> cv. CIAT-184			
	IE	± EE	DE (mm ²)	± EE
Control	8,9 a	0,70	214 a	12,72
200 mmol.L ⁻¹	9,6 a	0,81	167 b	12,57
	<i>Centrosema molle</i> cv. CIAT-15160			
	IE	± EE	DE (mm ²)	± EE
Control	7,3 a	0,52	186 a	11,24
200 mmol.L ⁻¹	6,9 a	0,74	142 b	10,53

Resultados similares fueron obtenidos por Romero-Aranda *et al.* (2001) en cultivares sensibles de tomate (*Solanum lycopersicon* Mill.), los cuales refirieron una disminución significativa de la densidad estomática en plantas sometidas a 35 mmol.L⁻¹ de NaCl.

Los cambios anatómicos observados en las plántulas pueden estar relacionados con respuestas morfogenéticas, en función de contrarrestar los efectos negativos del cloruro de sodio en altas concentraciones. Estos cambios pueden ser importantes para incrementar la eficiencia en el uso del agua por la planta, al disminuir el área de transpiración, e incrementar la tolerancia al estrés salino (Paréz *et al.*, 2008).

5. CONCLUSIONES

- Las semillas de *S. guianensis* (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184 y *Centrosema molle* (Mart.) Benth cv. CIAT-15160 germinaron en cámaras húmedas en diferentes concentraciones de NaCl (0-250 mmol.L⁻¹). Contenidos superiores a 100 mmol.L⁻¹ mostraron valores inferiores en la velocidad de germinación, el vigor y cambios en la distribución de la biomasa entre las diferentes estructuras de las plántulas.
- La evaluación de indicadores bioquímicos en presencia de NaCl mostró un aumento del contenido de fenoles en ambas especies tanto en raíz como en hojas. El contenido de clorofilas totales disminuyó con el aumento de la concentración de cloruro de sodio en *C. molle* cv. CIAT-184, mientras que *S. guianensis* (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184 mostró una mayor estabilidad clorofílica y una relación clorofila a/b que pudieran ser utilizados como indicadores de tolerancia a salinidad en esta última especie.
- Los valores obtenidos de peso seco en 200 mmol.L⁻¹ de NaCl indican que tanto *S. guianensis* (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184 como *C. molle* cv. CIAT-15160, son capaces de mantener un nivel de metabolismo en concentraciones que son muy tóxicas para otras especies, por lo que este indicador puede ser sugerido para estudios de tolerancia en las primeras etapas de crecimiento vegetativo.
- *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184 mostró un incremento significativo en la relación raíz/brote en 200 mmol.L⁻¹ de NaCl, lo que sugiere un mecanismo para la redistribución de los fotoasimilados y un indicador fisiológico de tolerancia a estrés salino.
- Los valores de densidad estomática observados en 200 mmol.L⁻¹ de NaCl fueron inferiores a los respectivos controles, tanto en *S. guianensis* cv. CIAT-184 y como en *C. molle* cv. CIAT-15160, lo cual puede ser considerado como un indicador anatómico de referencia para la identificación de genotipos tolerantes a salinidad en ambas especies.

6. RECOMENDACIONES

- Evaluar otros procesos fisiológicos y bioquímicos como la expresión de osmolitos y enzimas antioxidantes, que permitan la identificación de otros indicadores de tolerancia a estrés salino en *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184 y *Centrosema molle* (Mart.) Benth cv. CIAT-15160.
- Evaluar la respuesta a salinidad de *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184 y *Centrosema molle* (Mart.) Benth cv. CIAT-15160 en la fase reproductiva.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbasi-Shahmersi, F., Ebadi, A., Aghighi, M., Kandi, S. and Sanayei, S. 2012. The mineral nitrogen fertilizer effects on photosynthetic index of alfalfa (*Medicago sativa*) under salinity stress condition. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*, 3 (8): 1641-1645.
2. Abd El-Samad, H.M. and Shadadd, M.A.K. 2013. The Response Strategy of Maize, Pea and Broad Bean Plants to Different Osmotic Potential Stress. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 9 (3): 240-250.
3. Abdel-Haleem, A. and El-Shaieny, H. 2015. Seed germination percentage and early seedling establishment of five *Vigna unguiculata* L. (Walp.) genotypes under salt stress. *European Journal of Experimental Biological*, 5 (2): 22-32.
4. Acosta-Motos, J.R., Diaz-Vivancos, P., Alvarez, S., Fernandez-Garcia, N., Sanchez-Blanco, M.J. and Hernandez, J.A. 2015. "NaCl-induced physiological and biochemical adaptative mechanisms in the ornamental *Myrtus communis* L. plants." *J Plant Physiol.*, 183: 41-51.
5. Adams, E. and Shin, R. 2014. "Transport, signaling, and homeostasis of potassium and sodium in plants." *J Integr Plant Biol.*, 56 (3): 231-249.
6. Afzal, M., Ahmad, A., Alderfasi, A.A., Ghoneim, A. and Saqib, M. 2014. Physiological tolerance and cation accumulation of different genotypes of *Capsicum annuum* under varying salinity stress. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, 4 (1): 39-49.
7. Akram, M.S. and Ashraf, M. 2011. Exogenous application of potassium dihydrogen phosphate can alleviate the adverse effects of salt stress on sunflower (*Helianthus annuus* L.). *J. Plant Nutr.*, 34: 1041-1057.
8. Almodares, A., Hadi, M.R., Kholdebarin, B., Samedani, B. and Kharazian, Z.A. 2014. The response of sweet sorghum cultivars to salt stress and accumulation of Na⁺, Cl⁻ and K⁺ ions in relation to salinity. *J Environ Biol.*, 35 (4): 733-739.
9. Alvarez, S. and Sanchez-Blanco, M.J. 2014. Long-term effect of salinity on plant quality, water relations, photosynthetic parameters and ion distribution in *Callistemon citrinus*. *Plant Biol (Stuttg)*, 16 (4): 757-764.
10. Amezcuita, M.C., Toledo, J.M. and Keller-Grein, G. 1991. Agronomic performance of *Stylosanthes guianensis* cv. Pucallpa in the American tropical rain forest ecosystem. *Tropical Grassland (A.C.T)*, 25 (3): 262-267.
11. Asano, T., Hakata, M., Nakamura, H., Aoki, N., Komatsu, S., Ichikawa, H., Hirochika, H. and Ohsugi, R. 2011. Functional characterisation of OsCPK21, a calcium-dependent protein kinase that confers salt tolerance in rice. *Plant Mol Biol.*, 75: 179-191.

12. Ashraf, M. and Harris, P.J.C. 2004. Potential Biochemical Indicators of Salinity Tolerance in Plants. *Plant Sci.*, 166: 31-46.
13. Ashraf, M. and Harris, P.J.C. 2013. Photosynthesis under stressful environments: An overview. *Photosynthetica*, 51 (2):163-190.
14. Asmare, H.A. and Ambo, E. 2013. Impact of Salinity on Tolerance, Vigor, and Seedling Relative Water Content of Haricot Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Cultivars. *Journal of Plant Sciences*, 1 (3): 22–27.
15. Ates, E. and Tekeli, A. S. 2007. Salinity tolerance of Persian clover (*Trifolium resupinatum* L. var. majus Boiss.) lines at germination and seedling stages. *World J. Agric. Sc.*, 3 (1): 71-79.
16. Ayala-Astorga, G.I. and Alcaraz-Meléndez, L. 2010. Salinity effects on protein content, lipid peroxidation, pigments, and proline in Paulownia imperialis (Siebold & Zuccarini) and Paulownia fortunei (Seemann & Hemsley) grown *in vitro*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13 (5) : 1-15.
17. Baatour, O., Mahmoudi, H., Tarchoun, I., Nasri, N., Trabelsi, N., Kaddour, R., Zaghdoudi, M., Hamdawi, G., Ksouri, R., Lachaal, M. and Marzouk, B. 2013. Salt effect on phenolics and antioxidant activities of Tunisian and Canadian sweet marjoram (*Origanum majorana* L.) shoots. *J Sci Food Agric.*, 93 (1): 134-141.
18. Bafeel, S.O. 2014. Physiological parameters of salt tolerance during germination and seedling growth of Sorghum bicolor cultivars of the same subtropical origin. *Saudi J Biol Sci.*, 21 (4): 300-304.
19. Bahrani, A., Pirdashti, H. and Yaghubi, M. 2013a. The effects of amino acid fertilizers spraying on photosynthetic pigments and antioxidant enzymes of wheat (*Triticum aestivum* L.) under salinity stress. *International Journal of Agronomy and Plant Production*, 4 (4) : 787-793.
20. Bahrani, H. and Razmjoo, J. 2012. Effect of salinity stress (NaCl) on germination and early seedling growth of ten sesame cultivars (*Sesamum indicum* L.). *International Journal of AgriScience*, 2 (6) : 529-537.
21. Bahrani, A. 2013b. Effect of Salinity on Growth, Ions Distribution, Accumulation and Chlorophyll Concentrations in Two Canola (*Brassica napus* L.) Cultivars. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 13 (5): 683-689.
22. Banjara, M., Zhu, L., Shen, G., Payton, P. and Zhang, H. 2012. Expression of an Arabidopsis sodium/proton antiporter gene (*AtNHX1*) in peanut to improve salt tolerance. *Plant Biotechnol. Rep.*, 6: 59-67.
23. Barakat, N., Laudadio, V., Cazzato, E. and Tufarelli, V. 2013. Antioxidant potential and oxidative stress markers in wheat (*Triticum aestivum*) treated with phytohormones under salt-stress condition. *Int. J. Agric. Biol.*, 15: 843–849.
24. Barceló, J., Nicolás, G., Sabater, B. and Sánchez, R. 2002. *Fisiología Vegetal*. Vol. I. Editorial Félix Varela, La Habana, Cuba, pp. 35-56.

25. Barrera-Figueroa, B.E., Gao, L., Diop, N.N., Wu, Z., Ehlers, J.D., Roberts, P.A., Close, T.J., Zhu, J.K., and Liu, R. 2011. Identification and comparative analysis of drought-associated microRNAs in two cowpea genotypes. *BMC Plant Biol.*, 11: 127-135.
26. Behrouzi, M., Valizadeh, M., Moghaddam, M.V. 2015. Changes in activity profile of superoxide dismutase in barley cultivars seedling under salt stress. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*, 7 (1): 350-357.
27. Benedetti, C.E. and Arruda, P. 2002. Altering the expression of the chlorophyllase gene *ATHCOR1* in transgenic *Arabidopsis* caused changes in the chlorophyll-to-chlorophyllide ratio. *Plant Physiol.*, 128: 1255–1263.
28. Bojorquez-Quintal, E., Velarde-Buendia, A., Ku-Gonzalez, A., Carillo-Pech, M., Ortega-Camacho, D., Echevarria-Machado, I., Pottosin, I. and Martinez-Estevez, M. 2014. "Mechanisms of salt tolerance in habanero pepper plants (*Capsicum chinense* Jacq.): Proline accumulation, ions dynamics and sodium root-shoot partition and compartmentation." *Front Plant Sci.*, 5: 605-613.
29. Byrt, C.S., Xu, B., Krishnan, M., Lightfoot, D.J., Athman, A., Jacobs, A.K., Watson-Haigh, N.S., Plett, D., Munns, R., Tester, M., Gilliam, M. 2014. The Na (+) transporter, TaHKT1;5-D, limits shoot Na(+) accumulation in bread wheat. *Plant Journal*. 80 (3): 516-526.
30. Cai, X., Davis, E.J., Ballif, J., Liang, M., Bushman, E., Haroldsen, V., Torabinejad, J. and Wu, Y. 2006. Mutant identification and characterization of the laccase gene family in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.*, 57: 2563–2569.
31. Cao, J., Yun Lu, X., Chen, L., Xing, J.J. and Lan, H.Y. 2015. Effects of salinity on the growth, physiology and relevant gene expression of an annual halophyte grown from heteromorphic seeds. *AoB Plants Advance Access*. Disponible on line: <http://aoppla.oxfordjournals.org/>. Visita: febrero de 2016.
32. Castaño, R. 2009. Variedades de arroz para suelos salinos. *Granma* 16 (106). Disponible on line: <http://www.granma.cubaweb.cu/ciencia279.html> Consulta: abril de 2015.
33. Castroluna, A., Ruiz, O.M., Quiroga, A.M. y Pedranzani, H.E. 2014. Efectos de la salinidad y sequía sobre la germinación, biomasa y crecimiento en tres variedades de *Medicago sativa* L. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 18 (1): 39-50.
34. Chandra, A., Pathak, P.S. and Bhatt, R.K. 2006. Stylo research in India: prospects and challenges ahead. *Curr. Sci.*, 90: 915–921.
35. Chaparzadeh, N., Amico, M.L., Nejad, R.K., Izzo, R., Izzo, F.N. 2004: "Plant Physiology Biochemistry", 42, pp 695701.
36. Chen, L., Wang, T., Zhao, M., Tian, Q. and Zhang, W.H. 2012. Identification of aluminum-responsive microRNAs in *Medicago truncatula* by genome-wide high-throughput sequencing. *Planta*, 235: 375–386.
37. Cheng, Y.J., Kim, M.D., Deng, X.P., Kwak, S.S. and Chen, W. 2013. "Enhanced salt stress tolerance in transgenic potato plants expressing

- IbMYB1, a sweet potato transcription factor." *J Microbiol Biotechnol.*, 23 (12): 1737-1746.
38. Chernane, H., Latique, S., Monsori, M. and El Kaoua, M. 2015. Salt stress tolerance and antioxidative mechanisms in wheat plant (*Triticum durum* L.) by seaweed extracts application. *Journal of Agriculture and Veterinary Science*, 8 (3): 36-44.
 39. Chinnuswamy, V., Zhu, J.K. 2003. Plant salt tolerance. In. Plant response to abiotic stress, Eds. H. Hert, K. Shinosaki. *Topics in current genetics*, 4: 241-270.
 40. Choi, W.G., Toyota, M., Kim, S.H., Hilleary, R., Gilroy, S. 2014. "Salt stress-induced Ca²⁺ waves are associated with rapid, long-distance root-to-shoot signaling in plants." *Proc Natl Acad Sci USA.*, 111 (17): 6497-6502.
 41. Chookhampaeng, S. 2011. The effect of salt stress on growth, chlorophyll content proline content and antioxidative enzymes of pepper (*Capsicum annuum* L.) seedling. *Eur. J. Sci. Res.*, 49: 103-109.
 42. Clements, R.J. 1987. El mejoramiento en pastos requiere objetivos claramente definidos. *Pasturas Tropicales. Boletín*, 9 (1): 35-37.
 43. Consoli, L., Vieira, M.L.C., Lopes de Souza, C.Jr. and Garcia, A.A.F. 1996. Tissue culture effects on quantitative traits in *Stylosanthes guianensis* (Leguminosae). *Brazilian Journal of Genetics*, 19 (3): 469-474.
 44. Costa, N. de y Oliveira, J.R. da C. 1993. Avaliação agrônômica de accesos de *Centrosema* em Rondônia, Brasil. *Posturas Trop.*, 15 (2): 17-21.
 45. Covarrubias, A.A. and Reyes, J.L. 2010. Post-transcriptional gene regulation of salinity and drought responses by plant microRNAs. *Plant Cell Environ.*, 33: 481-489.
 46. Cuartero, J., Fernández-Muñoz, R. 1999. Tomato and salinity. *Scientia Horticulturae*, 78: 83-125.
 47. De Herralde, F., Biel, C., Save, R., Morales, M.A., Torrecillas, A., Alarcon, J.J. and Sanchez Blanco, M.J. 1998. "*Plant Science*", 139, pp 917.
 48. Deepika, U.K.V., Manogya, P.S. and Preeti, S.S. 2015. Influence of salinity on morpho-physiological characters of german chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(10): 762-775.
 49. Del Rio, L.A. 2015. "ROS and RNS in plant physiology: an overview." *J Exp Bot.*, 66 (10): 2827-2837.
 50. Demiral, T. and Turkan, I. 2005. Comperative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Env. Exp. Bot.*, 53: 247-257.
 51. Duan, J. and Cai, W. 2012. OsLEA3-2, an abiotic stress induced gene of rice plays a key role in salt and drought tolerance. *PLoS One*. 79: 110-117.

52. Edye, L.A. 1984. . Agronomic variation and potential utilization of *Stylosanthes*. In: Stace, H. M. and Edye, L. A., (eds). The Biology and agronomy of *Stylosanthes*. Sydney: Academic Press, 547-570.
53. Elhag, A.Z. and Gafar, M.O. 2014. Effect of Sodium Chloride on Growth of *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.) Young Transplants. *Universal Journal of Plant Science*, 2 (1): 19-22.
54. El Goumi, Y., Fakiri, M., Lamsaouri, O. and Benchekroun, M. 2014. Salt stress effect on seed germination and some physiological traits in three Moroccan barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars. *J. Mater. Environ. Sci.*, 5 (2): 625-632.
55. El-Hendawy, S.E., Ruan, Y., Hu, Y. and Schmidhalter, U. 2009. A Comparison of Screening Criteria for Salt Tolerance in Wheat under Field and Controlled Environmental Conditions. *J. Agronomy & Crop Science*, 195: 356-367.
56. Fantz, P.F. 2004. Distribution of *Centrosema* (DC.) Benth. (Leguminosae: Phaseoleae: Clitoriinae) for the Flora Mesoamericana project. *Vulpia*. 3: 99-139.
57. Fantz, P.R. 2001. *Centrosema*. En: Stevens, W. D., C. Ulloa-U., A. Pool y O. M. Montiel (eds.). Flora de Nicaragua. Monographs in Systematic Botany Vol. 85. Missouri Botanical Garden, San Luis, Missouri.
58. Feki, K., Quintero, F.J., Khoudi, H., Leidi, E.O., Masmoudi, K., Pardo, J.M. and Brini, F. 2013. A constitutively active form of a durum wheat Na⁺/H⁺ antiporter SOS1 confers high salt tolerance to transgenic *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep.*, 5: 1-12.
59. Fernández, M., Preciado, J. F., García, Z., Cruz, C. and Saltijeral, J. 2004. Seasonal assessment of *Bophylus microplus* larvae recovery in four forage legumes in experimental infested plots. *Tec. Pecu. Mex.*, 42 (1): 97-104.
60. Flowers, T.J. and Muscolo, A. 2015. "Introduction to the Special Issue: Halophytes in a changing world." *AoB Plants*. 7: 1-12.
61. Flowers, T.J., Hajibagheri, M.A. and Clipson, N.J.W. 1986. Halophytes. *Q. Rev. Biol.*, 61: 313–37.
62. Gama, P.B., Inanaga, S., Tanaka, K. and Nakazawa, R. 2007. Physiological response of common bean (*Phaseolus vulgaris*. L.) seedlings to salinity stress. *African Journal of Biotechnology*. 6 (2): 79-88.
63. Gamboa, M.C., Baltierra, G., Leon, G. and Krauskopf, E. 2013. Drought and salt tolerance enhancement of transgenic *Arabidopsis* by overexpression of the vacuolar pyrophosphatase 1 (EVP1) gene from *Eucalyptus globulus*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 73: 99-105.
64. Gan, Y., Zhou, L., Shen, Z.J. Shen, Z.X., Zhang, Y.Q. and Wang, G.X. 2010. Stomatal clustering, a new marker for environmental perception and adaptation in terrestrial plants. *Botanical Studies*, 51: 325-336.

65. Ganehan, P., Jain, A., Parmar, B., Rao, A.R., Sreenu, K., Mishra, P., Mesopogu, S., Subrahmanyam, D., Ram, T., Sarla, N. and Rai, V. 2016. Identification of salt tolerant rice lines among interespecific BILs development by crossing *Oryza sativa* x *O. rufigopon* and *O. sativa* x *O. nivara*. *Australian Journal of Crop Science*, 10 (2): 220-228.
66. Garcia de la Garma, J., Fernandez-Garcia, N., Bardisi, E., Pallol, B., Asensio-Rubio, J. S., Bru, R. and Olmos, E. 2015. New insights into plant salt acclimation: the roles of vesicle trafficking and reactive oxygen species signalling in mitochondria and the endomembrane system. *New Phytol.*, 205 (1): 216-239.
67. Greenway, H. and Munns, R. 1980. Mechanisms of salt tolerance in non-halophyte. *Ann Rev Plant Physiol.*, 31: 149-190.
68. Guan, L.M., Zhao, J. and Scandalios, J.G. 2000. Cis-elements and trans-factors that regulate expression of the maize Cat1 antioxidant gene in response to ABA and osmotic stress: H₂O₂ is the likely intermediary signaling molecule for the response. *Plant Journal*. 22: 87–95.
69. Gurmani, A.R., Bano, A., Khan, S.U., Din, J. and Zhang, J.L. 2011. Alliviation of salt stress by seed treatment with abscisic acid (ABA), 6-benzylaminopurine (BA) and chlormequat chloride (CCC) optimizes ion and organic matter accumulation and increases yield of rice (*Oryza sativa* L.). *Australian Journal of Crop Science*. 5 (10): 1278-1285.
70. Gurr, S.I., Mc Pherson, M.I. and Bowles, D.J. 1992. Lignin and associated phenolic acids in cell walls. *Molecular Plant Pathology and Practical Approach*. 3: 62-69.
71. Gutierrez, L.; Bussell, J.D.; Pacurar, D.I.; Schwambach, J.; Pacurar, M. and Bellini, C. 2009. Phenotypic plasticity of adventitious rooting in *Arabidopsis* is controlled by complex regulation of auxin response factor transcripts and microRNA abundance. *Plant Cell*. 21: 3119–3132.
72. Haber, F. and Weiss, J. 1934. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc. R. Soc. London Ser. A.*, 147: 332–334.
73. Haghghi, L., Majd, A., Nematzadeh, G., Shokri, M., Kelij, S., Irian, S. 2014. Salt-induced changes in cell wall peroxidase (CWPRX) and phenolic content of *Aeluropus littoralis* (Willd) Parl. *AJCS*. 8 (2): 296-300.
74. Hao, L., Wen, Y., Zhao, Y., Lu, W., Xiao, K. 2015. "Wheat mitogen-activated protein kinase gene TaMPK4 improves plant tolerance to multiple stresses through modifying root growth, ROS metabolism, and nutrient acquisitions." *Plant Cell Rep.*, 34 (12): 2081-2097.
75. Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K. and Bohnert, H.J. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 51: 463-499.
76. Hasegawa, P.M. 2013. Sodium (Na⁺) homeostasis and salt tolerance of plants. *Environ Exp Bot.*, 92: 19-31.

77. Hassanein, R.A., Hashem, H.A. and Khalil, R.R. 2012. Stigmasterol treatment increases salt stress tolerance of faba bean plants by enhancing antioxidant systems. *Plant Osmics Journal*, 5 (5):476-485.
78. Hassen, A., Maher, S. and Cherif, H. 2014. Effect of Salt Stress (NaCl) on Germination and Early Seedling Parameters of Three Pepper Cultivars (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 10 (1): 14-25.
79. Hatzig, S., Kumar, A., Neubert, A. and Schubert, S. 2010. PEP-Carboxylase Activity: A Comparison of its Role in a C4 and a C3 Species Under Salt Stress. *J. Agronomy & Crop Science*, 196: 185–192.
80. Hazman, M., Hause, B., Eiche, E., Nick, P. and Riemann, M. 2015. Increased tolerance to salt stress in OPDA-deficient rice *Allene oxide cyclase* mutants is linked to an increased ROS-scavenging activity. *Journal of Experimental Botany*, 66 (11): 3339-3352.
81. Heidari, A. Toorchi, M., Bandehagh, A. and Shakiba, M.R. 2011. Effect of NaCl Stress on Growth, Water Relations, Organic and Inorganic Osmolytes Accumulation in Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Lines. *Universal Journal of Environmental Research and Technology*, 1 (3): 351-362.
82. Heidari, M. and Golpayegani, A. 2012. Effects of water stress and inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on antioxidant status and photosynthetic pigments in basil (*Ocimum basilicum* L.). *J Saudi Society Agricult Sci.*, 11 (1): 57-61.
83. Hu, L., Li, H., Pang, H. and Fu, J. 2012. Responses of antioxidant gene, protein and enzymes to salinity stress in two genotypes of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) differing in salt tolerance. *J Plant Physiol.*, 169 (2): 146-156.
84. Jabeen, N. and Ahmad, R. 2013. "The activity of antioxidant enzymes in response to salt stress in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) and sunflower (*Helianthus annuus* L.) seedlings raised from seed treated with chitosan." *J Sci Food Agric.*, 93 (7): 1699-1705.
85. Jafari, M. and Bourouni, A. 2009. Amelioration of Some Secondary Metabolites in Onion Bulbs Grown under Sea Water Stress by Using Alpha-tocopherol. *Research Journal of Cell and Molecular Biology*, 3 (1): 49-55.
86. Jaleel, A.C., Sankar, B., Sridharan, R. and Panneerselvan, R. 2008. Soil salinity alters growth, chlorophyll content, and secondary metabolite accumulation in *Catharanthus roseus*. *Turk J Biol.*, 32: 79-83.
87. Jaleel, C.A., Manivannan, P. and Lakshmanan, G.M.A. 2007. NaCl as physiological modulator of proline metabolism and antioxidant potential in *Phyllanthus amarus*. *C R Biologies*, 330: 806-813.
88. Jamil, M., Bashir, S., Anwar, S., Bibi, S., Bangash, A., Ullah, F. and Shikrha, E. 2012. Effect of salinity on physiological and biochemical characteristics of different varieties of rice. *Pakistan Journal of Botany*, 44: 7-13.

89. Jamil, M., Deog Bae, L., Kwang Yong, J., Ashraf, M., Sheong Chun, L. and Eui Shik, R. 2006. Effect Of Salt (NaCl) Stress On Germination And Early Seedling Growth Of Four Vegetables Species. *Central European of Agriculture*, 7 (2): 273-282.
90. Jamil, M., Rehman, S. and Rha, E.S. 2014. Response of Growth, PSII Photochemistry and Chlorophyll Content to Salt Stress in Four *Brassica* Species. *Life Science Journal*, 1 (3): 139-145.
91. Jang, J.Y., Rhee, J.Y., Chung, G.C. and Kang, H. 2012. Aquaporin as a membrane transporter of hydrogen peroxide in plant response to stresses. *Plant Signaling and Behavior*, 7 (9): 1180-1181.
92. Johansson, I., Karlsson, M., Shukla, V.K., Chrispeels, M.J., Larsson, C., and Kjellbom, P. 1998. Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation. *Plant Cell*, 25: 451–460.
93. Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P. and Bartel, B. 2006. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57: 19–53.
94. Juan, M., Rivero, R.M., Romero, L., Ruiz, J.M. 2005. Evaluation of some nutritional and biochemical indicators in selecting salt resistant tomato cultivars. *Environ. Exp. Bot.*, 54: 193-201.
95. Kafiet, M., Stewart, W.S. and Borland, A.M. 2008. Carbohydrate and proline contents in leaves, roots and apices of salt tolerant and salt-sensitive wheat cultivars. *Russian J Plant Physiol.*, 50: 155-162.
96. Kala, S. 2015. Effect of NaCl salt stress on antioxidant enzymes of Isabgol (*Plantago ovate* Forsk.) genotypes. *International Journal of Scientific and Technology Research*, 4 (2): 40-43.
97. Kandil, A.A., Sharief, A.E. and Sharief, S.A. 2016. Effect of salinity stress on seedlings parameters of some canola. *International Journal of Agronomy and Agricultural Research*, 8 (2): 10-18.
98. Kannan, P.R., Deepa, S., Kanth, S.V. and Rengasamy, R. 2013. "Growth, osmolyte concentration and antioxidant enzymes in the leaves of *Sesuvium portulacastrum* L. under salinity stress." *Appl Biochem Biotechnol*, 171 (8): 1925-1932.
99. Ke, D. and Saltveit, M.E.R. 1989. Phenolic metabolism and IAA oxidase by low oxygen in iceberg lettuce. *Journal of the American Society of Horticultural Science*, 114: 638-642.
100. Khalafallah, A.A, Tawfik, K.M., Zinab, A. and El-Gawad, A. 2008. Tolerance of Seven Faba Bean Varieties to Droughth and Salt Stresses. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 4 (2):175-186.
101. Khan, M.A., Ungar, I.A. and Allan, M.S. 2000. The effect of salinity on the growth, water status, and ion content of a leaf succulent perennial halophyte, *Suaeda fruticosa* (L.) Forssk. *Journal of Arid Environments*, 45: 73-84.
102. Kirkbridge, J.H. and de Kirkbridge, C.G. 1985. Typification of *Stylosanthes* (Leguminosae) and its sections. *Taxon.*, 36: 455-458.

103. Koca, H., Bor, M., Ozdemir, F. and Turkan, Y. 2007. The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars. *Environmental Experimental Botany*, 60: 344-351.
104. Koksal, N., Alkan-Torun, A., Kulahlioglu, I., Ertargin, E. and Karalar, E. 2016. Ion uptake of marigold under saline growth conditions. *SpringerPlus*. 5 (139):2-12.
105. Krishnamurthy, L., Upadhyaya, H.D., Purushothaman, R., Gowda, C.L., Kashiwagi, J., Dwivedi, S.L., Singh, S. and Vadez, V. 2014. The extent of variation in salinity tolerance of the minicore collection of finger millet (*Eleusine coracana* L. Gaertn.) germplasm. *Plant Sci.*, 227: 51-59.
106. Kumar, P.M. and Chand, U.B. 2015. Influence of salt stress on enzymatic and non-enzymatic antioxidant activity during hardening of a vegetatively propagated mangrove species *Excoecaria agallocha* L. *Asian Journal of Plant Science and Research*. 5 (8): 4-10.
107. Kumari, S., Malvika, S. and Parveen, A. 2014. Response of *Tephrosia purpurea* L. to salinity stress in relation to germination, carotenoid and proline content. *An International Quaterly Journal of Biology and Life Sciences*, 2 (1): 276-281.
108. Kumari, M., Sam, M.D., Vilama, Y. and Pawan, A. 2004. Physiological parameters governing drought in maize. *Indian J. Plant Physiol.*, 9 (2): 203-15.
109. Kundan, K., Manu, K., Seong-Ryong, K., Hijin, R. and Yong-Gu, Ch. 2013. Insights into genomics of salt stress response in rice. *Rice*, 6 (27): 2-15.
110. Lascano, C.E., Teitzel, J.K. and Kong, E.P. 1990. Nutritive value of *Centrosema* and animal production. En: Schultze-Kraft, R. y Clements, R.J. (eds.) *Centrosema: Biology, agronomy and utilization*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia, p. 293-319.
111. Li, W., Wang, D., Jin, T., Chang, Q., Yin, D., Xu, S., Liu, B. and Liu, L. 2011. The vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene *SsNHX1* from the halophyte *Salsola soda* confers salt tolerance in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Mol Biol Rep.*, 29: 278-290.
112. Lotfi, A., Jahanbakhshian, Z., Fang, J., Faghihi, F. and Seyedi, M.S. 2015. The effect of salinity stress on survival percentage and physiological characteristics in three varieties of pistachio (*Pistacia vera* L.). *International Journal of Biosciences*, 6 (5):79-93.
113. Lolaei, A. 2012. Effect of calcium chloride on growth and yield of tomato under sodium chloride stress. *J Ornament Horticult Plants*, 2 (3): 155–160.
114. Ma, C., Wang, H., Macnish, A.J., Estrada-Melo, A.C., Lin, J., Chang, Y., Reid, M.S., Jiang, C.Z. 2015. "Transcriptomic analysis reveals numerous diverse protein kinases and transcription factors involved in desiccation tolerance in the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolia*." *Hortic Res.* 2: 15034.
115. Machado, H. y Chao, L.1980. *Stylosanthes*. *Pastos y Forrajes*, 3 (3): 321-333.

116. Maghsoudi, M.A. and Maghsoudi, K. 2008. Salt stress effects on respiration and growth of germinated seeds of different wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *World J Agric Sci.*, 4 (3): 351-358.
117. Mallik, S., Nayak, M., Sahu, B.B., Panigrahi, A.K and Shaw, B.P. 2011. Response of antioxidant enzymes to high NaCl concentration in different salt-tolerant plants. *Biol. Plant.*, 55: 191–195.
118. Mane, A.V., Deshpande, T.V., Wagh, V.B., Karadge, B.A., Samant, J.S. 2011. A critical review on physiological changes associated with reference to salinity. *International Journal of Environmental Sciences*, 1 (6): 1192-1216.
119. Mane, A.V., Karadge B.A. and Samant, J.S. 2010. Salinity induced changes in photosynthetic pigments and polyphenols of *Cymbopogon nardus* (L.). *Rendle. J. Chem. Pharm. Res.*, 2: 338-347.
120. Meloni, D.A., Oliva, M.A., Martinez, C.A. and Cambraia, J. 2003. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. *Environ. Exp. Bot.*, 49: 69-76.
121. Mena, E., Leiva-Mora, M., Jayawardana, E.K.D., García, L., Veitía, N., Bermúdez-Carabaloso, I., Collado, R. y Cárdenas, R. 2015. Efecto del estrés salino en la germinación y el crecimiento temprano de *Phaseolus vulgaris* L. *Cultivos Tropicales*. 36 (3): 71-74.
122. Mervat Sh., S. and Dawood, M.G. 2014. Role of ascorbic acid and α tocopherol in alleviating salinity stress on flax plant (*Linum usitatissimum* L.). *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 10 (1): 93-111.
123. MINAGRI. 1985. Estudio nacional de salinidad y/o sodicidad en base al mapa de suelo escala 1:50 000 (2da. versión). Ministerio de la Agricultura. Centro Nacional de Suelos y Fertilizantes. Dpto. de Evaluación y Conservación de los Suelos. LaHabana, Cuba. 67 p. (Mimeo).
124. Mittal, S., Kumari, N. and Sharma, V. 2012. Differential response of salt stress on *Brassica juncea*: Photosynthetic performance, pigment, proline, D1 and antioxidant enzymes. *Plant Physiol. Biochem.*, 54: 17-26.
125. Mohamed, H.E., Hemeida, A.E. and Mohamed, A.G. 2015. Role of hydrogen peroxide pretreatment on developing antioxidant capacity in the leaves of tomato plant (*Lycopersicon esculentum*) grown under saline stress. *International Journal of Advanced Research*, 3 (2): 878-889.
126. Monirifar, H. and Barghi, M. 2009. Identification and selection for salt tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* L.) ecotypes via physiological traits. *Notulae Sci. Biol.*, 1: 63-66.
127. Mori, I.C. and Schroeder, J.I. 2004. Reactive Oxygen Species Activation of Plant Ca^{2+} Channels. A Signaling Mechanism in Polar Growth, Hormone Transduction, Stress Signaling, and Hypothetically Mechanotransduction. *Plant Physiology*, 135: 702–708.

128. Mousavi, S.R., Ardakani, M.R., Mirza, M., Vazan, S. and Paknejad, F. 2014. Nutrient uptake and physiological parameters in early growth stages of *Thymus kotschyanus* L. under saline conditions. *International Journal of Biosciences*, 5 (5): 153-161.
129. Munns, R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment*, 25: 239–250.
130. Munns, R. and Tester, M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59: 651-681.
131. Nazarbeygi, E., Yazdi, H.L., Naseri, R. and Soleimani, R. 2011. The effects of different levels of salinity on proline and A-, B- chlorophylls in canola. *Amer-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.*, 10 (1): 70-74.
132. Noreen, Z., Ashraf, M. and Akram, N.A. 2010. Salt-induced modulation in some key gas exchange characteristics and ionic relations in pea (*Pisum sativum* L.) and their use as selection criteria. *Crop Pasture Sci.*, 61: 369-378.
133. Nurul, A.M.Z., Mohd, R.I., Maziah, M., Adam, P. and Mohd, H.I. 2014. Alleviation of Water Stress Effects on MR220 Rice by Application of Periodical Water Stress and Potassium Fertilization. *Molecules*, 19: 1795-1819.
134. Panuccio, M.R., Jacobsen, S.E., Akhtar, S.S. and Muscolo, A. 2014. "Effect of saline water on seed germination and early seedling growth of the halophyte quinoa." *AoB Plants*. (6): 1-14.
135. Paréz, J., Arizaleta, M., Sanabria, M.E., García, G. 2008. Efecto de los niveles de salinidad sobre la densidad estomática, índice estomático y grosor foliar en plantas de *Carica papaya* L. *Acta Botánica. Venezuela*. 31 (1):1-13.
136. Parida, A., Das, A.B. and Das, P. 2002. NaCl stress causes changes in photosynthetic pigments, proteins and other metabolic components in the leaves of a true mangrove, *Bruguiera parviflora*, in hydroponic cultures. *Journal of Plant Biology*, 45: 28-36.
137. Pizarro, E.A. y Carvalho, M.A. 1995. Introducción y evaluación de leguminosas forrajeras en el Cerrado brasileño: *Centrosema* ssp. y *Desmodium* ssp. *Posturas Tropicales*, 18 (2): 14-18.
138. Polhill, R.M. and Raven, R.H. (eds.). 1981. *Advances in Legume Systematics*. Royal Botanic Gardens, Kew. 425 p.
139. Ramia, M. 1974. *Plantas de las sabanas llaneras*. Monte Avila Editores, C. A. Caracas, Venezuela.
140. Ramírez, R., González, L. M. y López, R. 1999. Afectaciones por salinidad en plántulas de *Centrosema pubescens* y *Stylosanthes guianensis*. *Pastos y Forrajes*, 22: 115-123.
141. Rezaei, M.M., Nematzadeh, G.A., Askari, H., Mozaffari Nejad, A.S., Pakdin, A. 2014. "Quantitative gene expression analysis of some sodium ion transporters under salinity stress in *Aeluropus littoralis*." *Saudi J Biol Sci.*, 21 (5): 394-399.

142. Rodés, G., Rosa y Collazo, O. y Margarita, O. 2006. Manual de Prácticas de Fotosíntesis, p.7.1era ed. Universidad Autónoma de México ISBN: 970-32-3313-9.
143. Rodríguez, E. 1986. Leguminosas, Descripción. En: Las leguminosas en la alimentación animal. Rev. Fac. Agr. UCV. *Alcance*. 35: 39-48.
144. Rogers, H.H., Prior, S.A., Runion, G.B. y Mitchell, R.J. 1996. Root to shoot ratio of crops as influenced by CO₂. *Plant Soil*. 187 (82): 229-248.
145. Romero-Aranda, R., Soria, T. and Cuartero, J. 2001. Tomato plant-water uptake and plant-water relationships under saline growth conditions. *Plant Science*. 160: 265-272.
146. Roxas, V.P., Sundus, A.L., Garrett, D.K., Mahan, J.R. and Allen, R.D. 2000. Stress tolerance in transgenic tobacco seedlings that over express glutathione-S-transferase/glutathione peroxidase. *Plant Cell Physiol.*, 41: 1229–1234.
147. Ruiz-Carrasco, K., Antognoni, F., Coulibaly, A.K., Lizardi, S., Covarrubias, A., Martínez, E.A., Molina-Montenegro, M.A., Biondi, S. and Zurita-Silva, A. 2011. Variation in salinity tolerance of four lowland genotypes of quinoa (*Chenopodium quino*) as assessed by growth, physiological traits, and sodium transporter gene expression. *Plant Physiol Biochem.*, 49 (11): 1333-1341.
148. Sabra, A., Daayf, F. and Renault, S. 2012. Differential physiological and biochemical responses of three Echinacea species to salinity stress. *Scientia Hort.*, 135 (24): 23-31.
149. Sairam, R.K. and Tyagi, A. 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Current Science*. 86: 407-721.
150. Sairam, R.K., Rao, K.V. and Srivastava, G.C. 2002: "Plant Science", 163, pp 10371046.
151. Salam, A., Hollington, P.A., Gorham, J., Wyn Jones, R.G. and Gliddon, C. 1999. Physiological genetics of salt tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.): performance of wheat varieties, inbred lines and reciprocal F1 hybrids under saline conditions. *J. Agron. Crop Sci.*, 183: 145–156.
152. Sanadhya, P., Agarwal, P. and Agarwal, P.K. 2015. "Ion homeostasis in a salt-secreting halophytic grass." *AoB Plants*. 7: 45-54.
153. Santhanakrishnan, D., Kannan, R.P. and Chandrasekaran, B. 2014. Effect of tannery soaking water on antioxidant enzymes of *Salicornia brachiata*. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 3 (2): 359-367.
154. Sarda, X., Tusch, D., Ferrare, K., Cellier, F., Alcon, C., Dupuis, J. M., Casse, F., and Lamaze, T. 1999. Characterization of closely related delta-TIP genes encoding aquaporins which are differentially expressed in sunflower roots upon water deprivation through exposure to air. *Plant Mol. Biol.*, 25: 179–191.

155. Sayyed, A., Gul, H., Hamayun, M., Nangyal, H. and Fazal, I. 2014. Influence of sodium chloride on growth and chemical composition of *Tagetes erecta*. *South Asian Journal of Life Sciences*. 2 (2): 29-32.
156. Schmidt, R., Mieulet, D., Hubberten, H.M. 2013. "Salt-responsive ERF1 regulates reactive oxygen species dependent signaling during the initial response to salt stress in rice". *The Plant Cell*. 25 (6): 2115-2131.
157. Shafi, A., Gill, T., Sreenivasulu, Y., Kumar, S., Ahuja, P.S. and Singh, A.K. 2015. "Improved callus induction, shoot regeneration, and salt stress tolerance in *Arabidopsis* overexpressing superoxide dismutase from *Potentilla atrosanguinea*." *Protoplasma*. 252 (1): 41-51.
158. Sigarroa, A. 1985. *Biometría y Diseño Experimental*. La Habana. Editorial Pueblo y Educación. 743 p.
159. Šiler, B., Mišić, D., Filipović, B., Popović, Z., Cvetić, T., and Mijović, A. 2007. Effects of salinity on *in vitro* growth and photosynthesis of common centaury (*Centaurea erythraea* RAFN.). *Arch. Biol. Sci. Belgrade*. 59 (2): 129-132.
160. Singh, R. and Jwa, N.S. 2013. The rice MAPKK-MAPK interactome: the biological significance of MAPK components in hormone signal transduction. *Plant Cell Rep.*, 32: 923-931.
161. Sneha, S., Rishi, A., Dadhich, A. and Chandra, S. 2013. "Effect of salinity on seed germination, accumulation of proline and free amino acid in *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br." *Pak J Biol Sci.*, 16 (17): 877-881.
162. Skerman, P.J., Cameron, D. F. and Riveros, D.G. 1991. Leguminosas forrajeras tropicales. Colección FAO: Producción y protección vegetal. No 2. Impreso en Italia. 707 p.
163. Soltani, A., Zeinali, E., Galeshi, S. and Latifi, N. 2001. Genetic variation for and interrelationships among seed vigor traits in wheat from the Caspian Sea coast of Iran. *Seed Science and Technology*. 29: 653-662.
164. Stepien, P. and Klobus, G. 2006. Water relations and photosynthesis in *Cucumis sativus* L. leaves under salt stress. *Biologia Plantarum*. 50 (4): 610-616.
165. Sperlinga, O., Lazarovitcha, N., Schwartzb, A. and Aspira, O. 2014. Effects of high salinity irrigation on growth, gas-exchange, and photoprotection in date palms (*Phoenix dactylifera* L., cv. Medjool). *Environmental and Experimental Botany*. 99: 100– 109.
166. Suraj, K. 2015. Effect of NaCl salt stress on antioxidant enzymes of Isabgol (*Plantago ovata* Forsk.) Genotypes. *International Journal of Scientific and Technology Research*. 4(2):40-43.
167. Szabolcs, I. 1994. Soil salinization. In: Pessarakli, M. (Ed.), *Handbook of Plant Crop Stress*. Marcel Dekker, New York, pp. 3–11.
168. Szarka, A., Tomasskovics, B. y Gabor, B. 2012. The ascorbate-glutathione- α -tocopherol triad in abiotic stress response. *Int. J. Mol. Sci.*, 13: 4458-4483.

169. Taiz, L. and Zeiger, E. 2006. *Plant Physiology*, 4th Ed. Sinauer, Sunderland, M. A. 660 p.
170. Tang, Z., Zhang, L., Xu, C., Yuan, S., Zhang, F., Zheng, Y. and Zhao, C. 2012. Uncovering small RNA-mediated responses to cold stress in a wheat thermosensitive genic male-sterile line by deep sequencing. *Plant Physiol.*, 159: 721–738.
171. Tester, M. and Davenport, R. 2003. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Ann. Bot.*, 91: 503–527.
172. Turan, S., Cornish, K. and Kumar, S. 2012. Salinity tolerance in plants: Breeding and genetic engineering. *Australian Journal of Crop Science*. 6 (9): 1337-1348.
173. Ulfat, M., Athar, H., Ashraf, M., Akram N.A. and Jamil. A. 2007. Appraisal of physiological and biochemical selection criteria for evaluation of salt tolerance in canola (*Brassica napus* L.) *Pak. J. Bot.*, 39 (5): 1593-1608.
174. Vashisth, A. and Nagarajan, S. 2010. Effect on germination and early growth characteristics in sunflower (*Helianthus annuus*) seeds exposed to static magnetic field. *Journal Plant Physiology*. 67: 149-156.
175. Veli, S., Kyrtoke, Y., Zenli, S.D. and Kel. S.T. 1994. Evaluation of salinity stress on germination characteristics and seedling growth of 3 bread wheats (*T. aestivum* L.). *Tarla Bitkileri Kong., Agro. Bildirileri, Cilt. 1*: 57-61.
176. Veraplakorn, V., Nanakorn, M., Bennett, I.J., Kaveeta, L. and Suwanwong, S. 2013. Antioxidant Enzyme Activity in Salt Tolerant Selected Clones of Stylo 184 (*Stylosanthes guianensis* CIAT 184), an Important Forage Legume. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 47: 516 – 527.
177. Vijayan, K., Chakraborti, S.P., Ercisli, S. and Ghosh, P.D. 2008. NaCl-induced morpho-biochemical and anatomical changes in mulberry (*Morus* spp.). *Plant Growth Regulation*. 56: 61-69.
178. Viswanathan, C. and Zhu, J.K. 2003. Plant Sal Tolerance. *Topics in Current Genetics*, Vol. 4. *Plant Response to Abiotic Stress*.
179. Voinnet, O. 2009. Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell*. 136: 669–687.
180. Wang, F., Jing, W. and Zhang, W. 2014. "The mitogen-activated protein kinase cascade MKK1-MPK4 mediates salt signaling in rice." *Plant Sci.*, 227: 181-189.
181. Wang, X., Hou, C., Liu, J. 2013. Hydrogen peroxide is involved in the regulation of rice (*Oryza sativa* L.) tolerance to salt stress. *Acta Physiologiae Plantarum*. 35 (3): 891-900.
182. Wen-Yuan, W., Xiao-Fe, Y. Ying, J., Bo, Q. and Yu-Feng, Xu. 2012. Effects of Salt Stress on Water Content and Photosynthetic Characteristics in *Iris lactea* Var. *Chinensis* Seedlings. *Middle-East Journal of Scientific Research*. 12 (1): 70-74.

183. Wilkinson, H. 1979. The plant surface (mainly leaf) In: Anatomy of dicotyledons (Metcalfe, C.R. & L. Chalk, eds.). Second edition. Vol. 1. Oxford Clarendon Press. London.
184. Williams, R.J., Reid, R.J., Schultze- Kraft, R., Costa, N.M.S. and Tomas, B.D. 1984. Natural distribution of *Stylosanthes*. In: Stace, H. M. and Edey, L.A., (eds). The Biology and agronomy of *Stylosanthes*. Sydney: Academic Press, 73-101.
185. Wintermans, J.F., and de Mots, A. 1965. Spectrophotometric characteristics of chlorophylls a and b and their pheophytins in ethanol. *Biochim. Biophys. Acta*. 109: 448–453.
186. Xiong, L. and Zhu, J.K. 2002. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant, Cell and Environment*. 25: 131–139.
187. Yang, L., Jue, D., Li, W., Zhang, R., Chen, M. and Yang, Q. 2013. Identification of MiRNA from eggplant (*Solanum melongena* L.) by small RNA deep sequencing and their response to *Verticillium dahlia* infection. *PLoS One*. 8, e72840.
188. Younesi, O., Baghbani, A. and Namdari, A. 2013. ‘The effects of *Pseudomonas fluorescens* and *Rhizobium meliloti* co-inoculation on nodulation and mineral nutrient contents in alfalfa (*Medicago sativa*) under salinity stress. *International Journal of Agriculture and Crop Science*. 5 (14): 1500–1507.
189. Yu, X., Wang, H., Lu, Y., de Ruiter, M., Cariaso, M., Prins, M., van Tunen, A. and He, Y. 2012. Identification of conserved and novel microRNAs that are responsive to heat stress in *Brassica rapa*. *J. Exp. Bot.*, 63: 1025–1038.
190. Yue Y., Zhang, M., Zhang, J., Duan, L. and Li, Z. 2012. SOS1 gene overexpression increased salt tolerance in transgenic tobacco by maintaining a higher K⁺/H⁺ ratio. *Journal Plant Physiology*. 169: 255-261.
191. Zagorchev, L., Plamena, K. and Odjakova, M. 2014. The role of plant cell wall proteins in response to salt stress. *The Scientific World Journal*. ID 764089.
192. Zhu, J.K. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol.*, 53: 247-273.
193. Zhu, J.K. 2003. Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biology*. 6: 441–445.
194. Zhuang, Y., Xiao-Hui, Z. and Jun, L. 2014. Conserved miRNAs and Their Response to Salt Stress in Wild Eggplant *Solanum linnaeanum* Roots. *Int. J. Mol. Sci.*, 15: 839-849.