

## Efectos de la adición de calcio sobre la fisiología de plántulas de vinal (*Prosopis ruscifolia* G.) bajo estrés salino

*Effects of calcium addition on the physiology of vinal (Prosopis ruscifolia G.) seedlings under saline stress*

Meloni, D. A.<sup>1</sup>; D. M. Silva<sup>2</sup> y G. Bolzón<sup>3</sup>

Recibido en febrero de 2014; aceptado en abril de 2015

### RESUMEN

El vinal (*Prosopis ruscifolia* G.) es una especie nativa de la Región Fitogeográfica del Chaco Occidental, altamente tolerante al estrés salino. En este trabajo se puso a prueba la hipótesis de que la adición de  $\text{Ca}^{+2}$  mitiga la inhibición del crecimiento en plántulas de vinal sometidas a estrés salino con NaCl. El objetivo fue determinar el efecto de la adición de  $\text{Ca}^{+2}$  sobre el crecimiento de plántulas de vinal bajo estrés salino con NaCl, y su mecanismo de acción. Las semillas se cultivaron en solución de Hoagland al 25%, con la adición de  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$  de NaCl, y con o sin la suplementación de  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{CaSO}_4$ . Se determinó materia seca, composición mineral, y actividades nitrato reductasa y glutamina sintasa. Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado con 5 repeticiones; los resultados se analizaron con ANOVA y Test de Duncan. Los resultados obtenidos indican que la suplementación con  $\text{Ca}^{+2}$  mitiga la inhibición del crecimiento producida por el estrés salino en plántulas de *Prosopis ruscifolia*. Esta respuesta en parte se debe al incremento en las concentraciones de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$ , y una disminución en la concentración de  $\text{Na}^+$ , tanto en hojas como en raíces. También puede atribuirse a la reversión del efecto inhibitorio del NaCl sobre el metabolismo del N, a través de un incremento en las concentraciones de  $\text{NO}_3^-$ , y en la actividad de las enzimas nitrato reductasa y glutamina sintetasa.

**Palabras clave:** salinidad; nutrición mineral; nitrato reductasa; glutamina sintetasa

### ABSTRACT

Vinal (*Prosopis ruscifolia* G.) is a highly saline stress-tolerant species, native to the Western Chaco Phytogeographic Region. The hypothesis that  $\text{Ca}^{+2}$  addition mitigates growth inhibition of saline stressed vinal seedlings using NaCl was tested in this study. The objective was to determine the effect of such addition on the growth of vinal seedlings under NaCl saline stress as well as its action mechanism. The seedlings were cultivated in a 25% Hoagland water solution, with the addition of  $0.4 \text{ mol L}^{-1}$  of NaCl, supplemented or not with  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  of  $\text{CaSO}_4$ . Dry matter, mineral composition, as well as nitrate reductase and glutamine synthetase activities were determined. An entirely randomized experimental design with five repetitions was utilized and the results were analyzed using ANOVA and Duncan's Test. The results indicate that calcium supplement alleviates growth inhibition caused by saline stress in *Prosopis ruscifolia* seedlings. Such a response is partially due to the increased concentrations of  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  and  $\text{Mg}^{+2}$  and the lowered concentration of  $\text{Na}^+$  in both leaves and roots. It can also be attributed to the reversion of the inhibitory effect of NaCl on the metabolism of N<sub>2</sub> due to an increase in both the  $\text{NO}_3^-$  concentration and the activities of the enzymes nitrate reductase and glutamine synthetase.

**Keywords:** salinity; mineral nutrition; nitrate reductase; glutamine synthetase.

<sup>1</sup> Universidad Nacional de Santiago del Estero. Av. Belgrano (s) 1912. (4200) Santiago del Estero, Argentina.

<sup>2</sup> Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, Brasil.

<sup>3</sup> Universidade Federal do Paraná; Curitiba, PR, Brasil.

## 1. INTRODUCCION

Las superficies con suelos salinos se incrementan significativamente a nivel mundial debido a la actividad antrópica, al ampliar las zonas de regadío. Aproximadamente la quinta parte de las 2.800 millones de hectáreas cultivables del planeta están afectadas por la salinidad, situación que tiende a agravarse (Ben Dkhil y Denden, 2010). Las prácticas de riego inadecuadas contribuyen a la salinización de los suelos. Así, el uso de aguas con alta conductividad eléctrica, sistemas de riego ineficientes o sistemas de distribución defectuosos pueden ocasionar la acumulación de sales en la superficie del suelo. El ascenso de las napas freáticas, debido al riego excesivo puede acelerar el proceso de salinización (Sun *et al.*, 2009; Rodrigues de Souza *et al.*, 2012).

Este avance desmesurado de la cantidad de nuevas tierras que son afectadas por las sales, restringe la producción vegetal (Díaz- López *et al.*, 2012). Los efectos adversos de la salinidad sobre el crecimiento vegetal, están asociados a la disminución del potencial hídrico del suelo, la toxicidad de los iones, el desbalance nutricional, o una combinación de estos factores (Munns y Tester, 2008). Esta situación exige la selección de especies tolerantes a la salinidad, y el desarrollo de prácticas agronómicas tendientes a incrementar la resistencia de las plantas al estrés salino.

El vinal (*Prosopis ruscifolia* G.) es una especie altamente tolerante al estrés salino, que presenta múltiples aplicaciones: madera, leña, forraje, etc. Por estas características, es apto para la realización de plantaciones en zonas salinas, donde no pueden desarrollarse otras especies de importancia forestal (Velarde *et al.*, 2003). Su elevada tolerancia a la salinidad se basa en la realización de ajuste osmótico, la baja traslocación de  $\text{Na}^+$  a la parte aérea, y un eficiente sistema de enzimas antioxidantes, que detoxifican a los radicales libres producidos como consecuencia del estrés. Sin embargo el crecimiento es inhibido significativamente por  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$  de NaCl, por lo que resulta de interés desarrollar un método simple que permita mitigar el efecto del estrés salino (Meloni *et al.*, 2008).

La adición de  $\text{Ca}^{+2}$  ha mitigado la inhibición del crecimiento producido por el estrés salino en *Linum usitatissimum* (Khan *et al.*, 2010), *Sorghum bicolor* (Lacerda *et al.*, 2004) y *Triticum aestivum* (Zaman *et al.*, 2005), mientras que en otras no tuvo un efecto significativo (Kinraide, 1999; Reid y Smith, 2000). En *Chenopodium quinoa* y *Acacia. occidentalis*, la adición de  $\text{Ca}_2\text{SO}_4$  incrementó el efecto inhibitorio del NaCl sobre la germinación (Abo-Kassem, 2007).

Los mecanismos involucrados en la reversión del efecto inhibitorio del NaCl sobre el crecimiento, mediante la adición de  $\text{Ca}^{2+}$  han sido poco estudiados. En trigo (*Triticum aestivum* L. cv Punjab 85), Zaman *et al.* (2005) observaron que este efecto estuvo asociado a un incremento en las concentraciones foliares de  $\text{K}^+$ , y en el contenido relativo de agua. Por otra parte no existen referencias sobre el rol del  $\text{Ca}^{+2}$  en la absorción de nitrógeno, y su reducción, en plantas sometidas a estrés salino.

En este trabajo se puso a prueba la hipótesis de que la adición de  $\text{Ca}^{+2}$  mitiga la inhibición del crecimiento en plántulas de vinal sometidas a estrés salino con NaCl.

El objetivo fue determinar el efecto de la adición de  $\text{Ca}^{+2}$  sobre el crecimiento de plántulas de vinal bajo estrés salino con NaCl, y su mecanismo de acción.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### *Material vegetal y condiciones de crecimiento.*

Los frutos se cosecharon en un individuo de *P. ruscifolia* en la localidad de Maco (27°51'20" S; 64°13'27" W), Provincia de Santiago del Estero, Argentina. Esta metodología permite disminuir el impacto de la elevada variabilidad genética propia del género *Prosopis* (Meloni, 2014). Las semillas se extrajeron manualmente y escarificaron con ácido sulfúrico durante 10 minutos, luego se enjuagaron con agua corriente durante 30 minutos. La siembra se realizó empleando toallas de papel humedecidas con agua destilada, que se incubaron en cámara de crecimiento por un lapso de 15 días a 25 °C y 12 horas de fotoperíodo (González *et al.*, 2006).

Se seleccionaron 450 plántulas de tamaño homogéneo, y cultivaron hidropónicamente en recipientes de 10 litros, conteniendo solución nutritiva de Hoagland al 25 % (30 plántulas por recipiente). Luego de 7 días de crecimiento en solución nutritiva, se realizaron los siguientes tratamientos: testigo (solución de Hoagland al 25 %), NaCl (solución de Hoagland al 25 % + 0,4 mol L<sup>-1</sup> de NaCl), NaCl + Ca (solución de Hoagland al 25 % + 0,4 mol L<sup>-1</sup> de NaCl + 5 mmol L<sup>-1</sup> de CaSO<sub>4</sub>). En el tratamiento salino, el NaCl se adicionó gradualmente (50 mM cada 24 horas), hasta lograr la concentración final, para evitar un shock osmótico. Las pérdidas por transpiración se compensaron mediante el agregado de agua destilada, manteniendo constante el nivel de solución en los recipientes. El pH se ajustó a 6,5 mediante la adición de 100 mmol L<sup>-1</sup> de KOH ó HCl. El ensayo se realizó en invernáculo, donde la radiación fotosintéticamente activa osciló entre un mínimo de 120 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> durante la puesta de sol, hasta 1600 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> al medio día, la temperatura media del aire fue de 28 °C y la humedad relativa del 52 %.

### *Producción de biomasa, y composición mineral.*

Luego de 30 días de tratamiento, las plantas se extrajeron de la solución nutritiva, lavaron con agua destilada y se llevaron a estufa de ventilación forzada, a 62 °C hasta peso constante. En ese material se determinó la materia seca y composición mineral. La concentración de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> se cuantificó mediante espectrofotometría de llama (Jameel Al-Kahayri, 2002), Ca<sup>+2</sup> y Mg<sup>+2</sup> mediante espectrometría de absorción atómica (Ferreira-Silva *et al.*, 2008) y Cl<sup>-</sup> por titulación con AgNO<sub>3</sub> (Ferreira-Silva *et al.*, 2008).

### *Metabolismo del nitrógeno.*

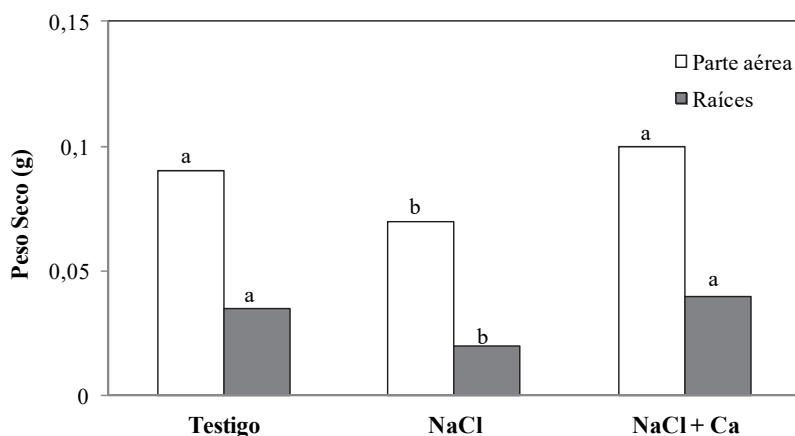
La concentración de nitrato se determinó a través del método de Cataldo *et al.* (1975). La actividad nitrato reductasa fue cuantificada empleando el método de Klepper *et al.* (1971), con algunas modificaciones. Para ello, se tomaron aproximadamente 100 mg hojas y 300 mg de segmentos de raíces de 5 mm de longitud. El material fue infiltrado con 5 mL de una solución de incubación conteniendo buffer fosfato de potasio 0,1 M, pH 7,5; KNO<sub>3</sub> 0,05 M e isopropanol 1 % (v/v). La incubación se realizó durante una hora, a 30 °C, en oscuridad. Para estimar la cantidad de nitrito formado, se adicionó 1 mL de sulfanilamida 1% in HCl 1 N y naphthylethylene diamine dihydrochloride 0.02 %. Por último se leyó la absorbancia a 540 nm. La concentración de proteínas solubles totales fue determinada de acuerdo a Bradford (1976) con albúmina sérica bovina como standard, y la actividad enzimática fue expresada en μmol NO<sub>2</sub><sup>-</sup> mg<sup>-1</sup> proteína h<sup>-1</sup>. La actividad glutamina sintasa se determinó según el método descrito por Berteli *et al.* (1995), con las modificaciones citadas por Silveira *et al.* (2003).

*Diseño experimental y análisis estadístico.*

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con 5 repeticiones; la unidad experimental estuvo representada por un recipiente de 10 L conteniendo 30 plántulas. De cada recipiente se tomó una muestra compuesta de 10 plántulas para determinación peso seco y cuantificación de iones, 10 plántulas para actividad nitrato reductasa, y 10 plántulas para actividad nitrito reductasa. Los resultados se analizaron con ANOVA y test de Duncan.

**3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

La adición de  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$  de NaCl en la solución nutritiva produjo una reducción significativa del 43 y 22 % en el peso seco de hojas y raíces, respectivamente (Figura 1). La suplementación con calcio, revirtió el efecto del estrés salino, alcanzándose valores de biomasa similares al testigo.



**Figura 1.** Peso seco de hojas y raíces de plántulas de vinal, crecidas en solución nutritiva de Hoagland 25 % (Testigo), con adición de  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$  de NaCl (NaCl), y con adición de  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$  de NaCl y  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{CaSO}_4$  (NaCl + Ca). Para cada parte (hojas y raíces), barras seguidas por letras diferentes, difieren estadísticamente por el Test de Duncan al 5 %.

Estos resultados coinciden con los obtenidos en *Licopersicum esculentum* (Levent Tuna et al., 2007) y *Atriplex halimus* (Nedjimi and Daoud, 2009a), especies en las que la adición de  $\text{Ca}^{+2}$  revirtió la inhibición en el crecimiento producido por el estrés salino. Por otra parte difieren con lo reportado por Murillo-Amador et al. (2006), en plantas de *Vigna unguiculata*, quienes observaron que la adición de  $\text{Ca}^{+2}$  no logró revertir la inhibición del crecimiento, ni las alteraciones en la composición mineral. Sin embargo, tales diferencias pueden deberse a las condiciones experimentales, ya que dichos autores utilizaron  $\text{Ca}_2\text{NO}_3$  aplicado como spray sobre las hojas.

La suplementación con  $\text{Ca}^{+2}$  también generó un aumento en la relación biomasa de raíces/biomasa de hojas, que presenta una gran importancia ecofisiológica, bajo ciertas condiciones ambientales, ya que dota a la planta una mayor superficie para la absorción de agua y nutrientes. Esta respuesta, puede justificar en parte, el rol benéfico de la adición del calcio, sobre el crecimiento de las plántulas sometidas a estrés con NaCl.

El estrés salino afectó la concentración de iones, tanto en hojas como en raíces (Tabla 1).

**Tabla 1.** Composición mineral en hojas y raíces de plántulas de vinal, crecidas en solución nutritiva de Hoagland 25 % (Testigo), con adición de 0,4 mol L<sup>-1</sup> de NaCl (NaCl), y con adición de 0,4 mol L<sup>-1</sup> de NaCl y 5 mmol L<sup>-1</sup> de CaSO<sub>4</sub> (NaCl + Ca).

Tratamiento	Na <sup>+</sup>	Ca <sup>+2</sup>	Solutos (mol kg <sup>-1</sup> PS)		
			Cl <sup>-</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>+2</sup>
<b>Hojas</b>					
Testigo	0,019 a	0,701 a	0,031 a	0,829 a	0,067 a
NaCl	0,493 b	0,397 b	0,113 b	0,598 b	0,048 b
NaCl + Ca	0,184 c	0,612 c	0,063 b	0,701 c	0,059 c
<b>Raíces</b>					
Testigo	0,232 a	0,201 a	0,029 a	0,795 a	0,057 a
NaCl	0,621 b	0,112 b	0,332 b	0,524 b	0,026 b
NaCl + Ca	0,399 c	0,175 c	0,341 b	0,723 c	0,049 c

Para cada parte (hojas ó raíces), letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas al 5 % por el test de Duncan

La suplementación con 5 mmol L<sup>-1</sup> de Ca<sup>+2</sup> disminuyó la concentración de Na<sup>+</sup> en raíces y hojas de plantas crecidas en 0,4 mol L<sup>-1</sup> de NaCl, y no modificó los niveles de Cl<sup>-</sup>. El efecto fue más notorio en hojas, donde la adición de calcio disminuyó en 63 % la concentración de Na<sup>+</sup>, en comparación con el tratamiento salino no suplementado. En raíces la disminución en la concentración de Na<sup>+</sup> fue solamente del 36 %.

Estos resultados demuestran que el Ca<sup>+2</sup> incrementa la exclusión del Na<sup>+</sup> de la parte aérea, protegiendo a las hojas del efecto tóxico de este catión. Esta observación coincide con los resultados reportados por Tattini y Traversi (2009) en olivo, quienes concluyeron que el Ca<sup>+2</sup> disminuye las concentraciones foliares de Na<sup>+</sup>, incrementando la tasa fotosintética, y el desempeño fotoquímico de la especie.

Una respuesta característica de las plantas sometidas a estrés salino es la disminución de la concentración de K<sup>+</sup>, y la sustitución de este catión por el Na<sup>+</sup>, que puede conducir al desbalance de iones. Dichos nutrientes pueden competir por su absorción en las células de las raíces, con un efecto adverso sobre el crecimiento y desarrollo. De este modo el mantenimiento de altas relaciones K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> es importante para la tolerancia a altas concentraciones salinas (Wu y Wang, 2012).

La salinidad disminuyó significativamente las relaciones K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> tanto en raíces como en hojas de vinal; sin embargo la adición de Ca<sup>+2</sup> triplicó la relación K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> en hojas, con respecto al tratamiento de 0,4 mol L<sup>-1</sup> de NaCl. En las raíces el efecto fue menos marcado, pasando de 0,8 en el tratamiento salino a 1,8 en el tratamiento con NaCl y suplementación con Ca<sup>+2</sup>. En coincidencia con este resultado (Nedjimi and Daoud, 2009a) demostraron que en *Atriplex halimus* la adición de Ca<sup>+2</sup> al ambiente radicular de plantas sometidas a estrés salino, mantiene o mejora la absorción selectiva de potasio a altas concentraciones de sodio, lo que previene el efecto deletéreo de un exceso de Na<sup>+</sup>.

Bajo condiciones de elevada salinidad, disminuye la relación Ca<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> en el suelo, lo que puede alterar las propiedades de la pared celular y la membrana plasmática, ya que el Na<sup>+</sup> desplaza al Ca<sup>+2</sup> asociado a las mismas (Guimarães, 2011). Como consecuencia de ello se incrementan de las concentraciones de Na<sup>+</sup> dentro de las células, que puede inhibir la actividad de algunas enzimas, produciendo alteraciones en el metabolismo, en la absorción de K<sup>+</sup>, y su participación en la planta, afectando la apertura estomática (Siddiqui *et al.*, 2012). En conjunto, estos cambios inhiben el crecimiento vegetal.

El NaCl produjo una importante disminución en las concentraciones de Ca<sup>+2</sup> en hojas y raíces de vinal, y esa respuesta fue parcialmente revertida por la adición de 5 mmol L<sup>-1</sup> de CaSO<sub>4</sub>. Un efecto similar se observó con las concentraciones de Mg<sup>+2</sup>.

El incremento en las concentraciones de  $\text{Ca}^{+2}$  en hojas y raíces de plántulas estresadas presenta una gran importancia metabólica, ya que está involucrado en la transducción de señales (Kader y Lindberg, 2010). La unión del  $\text{Ca}^{+2}$  a sensores de  $\text{Ca}^{+2}$ , tales como la calmodulina, induce respuestas fisiológicas apropiadas, vía la modulación de las funciones de proteínas target, (por ejemplo las quinasas), involucradas en el transporte de iones, metabolismo, modificaciones postranscripcionales de proteínas, y expresión de genes (Kim *et al.*, 2009). Además el  $\text{Ca}^{+2}$  puede activar la ruta SOS3-SOS2 quinasa proteica, que conduce al incremento de la expresión del transportador de la salida de  $\text{Na}^{+}$  (SOS1) del plasmalema, y probablemente restringe el ingreso de  $\text{Na}^{+}$  a través del transportador con alta afinidad para el  $\text{K}^{+}$  (HKT1), lo que permite mantener la homeostasis intracelular  $\text{K}^{+}/\text{Na}^{+}$  (Türkan y Demiral, 2009).

Tanto el estrés salino, como la adición de calcio a la solución nutritiva, afectaron el metabolismo del nitrógeno en las plántulas de vinal. El NaCl redujo en 56 y 67 % la concentración de  $\text{NO}_3^-$ , en hojas y raíces respectivamente; en tanto que en plantas sometidas a estrés salino y suplementadas con  $\text{Ca}^{+2}$ , la reducción fue sólo de 36 y 19 %, respectivamente (Figura 2 A).

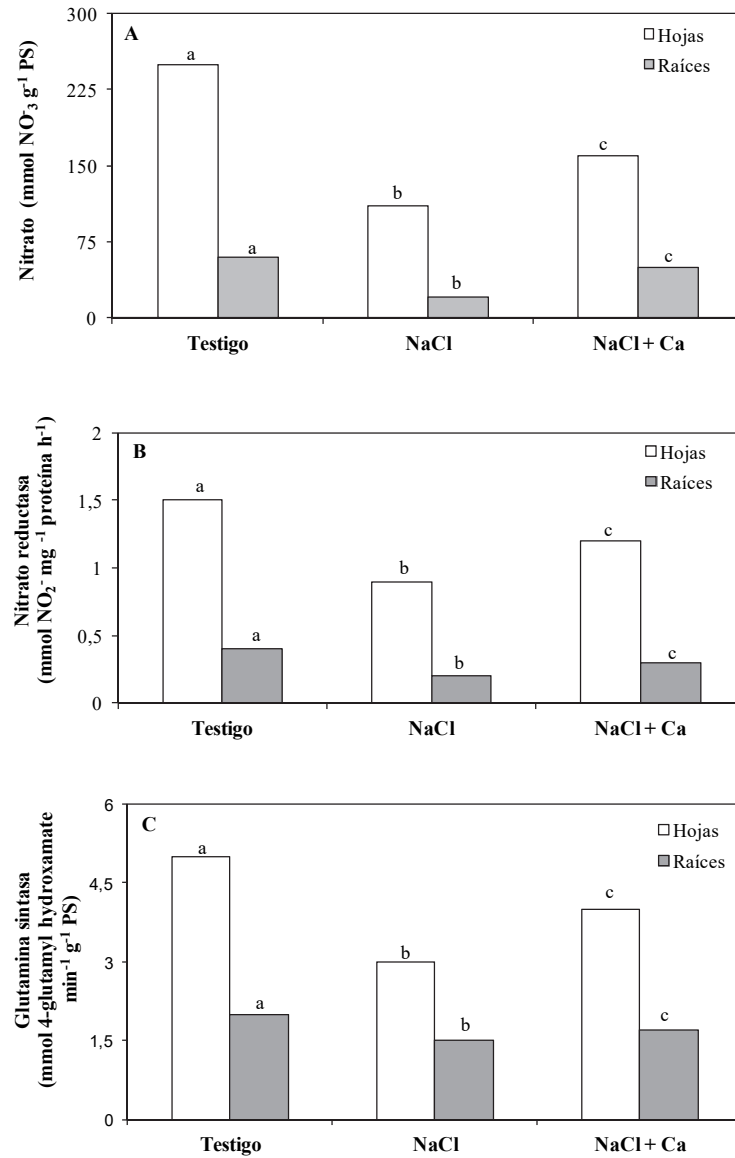
La actividad nitrato reductasa *in vivo* (NR) fue considerablemente mayor en hojas que en raíces (Figura 2 B). El estrés salino redujo la actividad NR tanto en hojas como en raíces, en 40 y 50 % respectivamente; en el caso de plántulas suplementadas con  $\text{Ca}^{+2}$ , la inhibición fue menos marcada, alcanzando valores 20 y 25 % inferiores al testigo no tratado, en hojas y raíces. Un efecto similar se observó en la actividad glutamina sintasa (Figura 2 C).

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que las plántulas de vinal expuestas a estrés salino presentaron una disminución en las concentraciones de  $\text{NO}_3^-$ , efecto que fue parcialmente revertido mediante la adición de calcio en la solución nutritiva (Figura 2 A). En este sentido, la salinidad puede inhibir la absorción de N, y su utilización, interfiriendo con la reducción del  $\text{NO}_3^-$ , y la síntesis proteica (Siddiqui *et al.*, 2008). Su interferencia con la absorción de nitrógeno puede darse en dos niveles: competencia entre iones  $\text{Cl}^-$  y  $\text{NO}_3^-$ , y alteraciones en la integridad de las membranas celulares (Nedjimi and Daoud, 2009b). Estos resultados coinciden con los reportados por Silveira *et al.* (2001) en *Vigna unguiculata*, donde la adición de 100 mM de NaCl produjo una reducción de 35 a 70 % en las concentraciones de  $\text{NO}_3^-$  de plantas aclimatadas y no aclimatadas, respectivamente.

La actividad nitrato reductasa *in vivo* (NR) fue considerablemente mayor en hojas que en raíces (Figura 2 B), lo que también fue observado en plántulas de *Prosopis alba* (Meloni *et al.*, 2003). El estrés salino redujo la actividad NR en hojas y raíces y la suplementación con calcio aumentó su actividad, aunque no se alcanzaron los valores observados en el testigo.

La actividad NR, es altamente dependiente del flujo de  $\text{NO}_3^-$  y es inhibida por el estrés salino (Ebrahimian and Bybordi, 2011). Carrillo *et al.* (2005) estudiaron la actividad y expresión de la NR en plantas de trigo sometidas a estrés salino con NaCl, bajo distintas concentraciones de  $\text{NO}_3^-$ . Estos autores observaron que a bajas concentraciones de  $\text{NO}_3^-$ , el NaCl incrementó la actividad NR, lo que sugiere que el  $\text{Cl}^-$  puede imitar al  $\text{NO}_3^-$  como molécula señal, para inducir la transcripción en hojas y raíces. Sin embargo, determinaron que los niveles de proteína NR decrecieron como consecuencia del estrés salino, indicando un efecto inhibitorio de la sal sobre la traslación del NR mRNA, o un aumento en la degradación proteica.

Resultados similares se obtuvieron con la actividad de la enzima glutamina sintasa (GS), en la cual el  $\text{Ca}^{+2}$  mitigó el efecto inhibitorio del NaCl. En algunas especies, como *Anacardium occidentale*, el NaCl incrementó la actividad GS, (Silveira *et al.*, 2003), la cual estuvo asociada a un aumento en la síntesis de prolina, un soluto osmocompatible que permite la realización de ajuste osmótico, con la concomitante absorción de agua en suelos salinos. Coincidiendo con este resultado Meloni *et al.* (2011), observaron un incremento significativo en la concentración de dicho soluto en plántulas de vinal sometidas a estrés salino, y suplementadas con calcio.



**Figura 2.** Concentración de nitrato (A), y actividades nitrato reductasa (B), y glutamina sintasa (C) en hojas y raíces de plántulas de vinal, crecidas en solución nutritiva de Hoagland 25 % (Testigo), con adición de 0,4 mol L<sup>-1</sup> de NaCl (NaCl), y con adición de 0,4 mol L<sup>-1</sup> de NaCl y 5 mmol L<sup>-1</sup> de CaSO<sub>4</sub> (NaCl + Ca). Para cada parte (hojas y raíces), barras seguidas por letras diferentes, difieren estadísticamente por el Test de Duncan al 5 %.

#### 4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la suplementación con Ca<sup>+2</sup> mitiga la inhibición del crecimiento producida por el estrés salino en plántulas de *Prosopis ruscifolia*. Esta respuesta en parte se debe al incremento en las concentraciones de K<sup>+</sup>, Ca<sup>+2</sup> y Mg<sup>+2</sup>, y una disminución en la concentración de Na<sup>+</sup>, tanto en hojas como en raíces. También puede

atribuirse a la reversión del efecto inhibitorio del NaCl sobre el metabolismo del N, a través de un incremento en las concentraciones de  $\text{NO}_3^-$ , y en la actividad de las enzimas nitrato reductasa y glutamina sintasa.

### Agradecimientos

Los autores agradecen al Ing. Ramón Ledesma, de la Facultad de Ciencias Forestales de la UNSE, por la traducción del resumen al inglés.

## 5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abo-Kassem, E. 2007. "Effects of salinity: calcium interaction on growth and nucleic acid metabolism in five species of *Chenopodiaceae*". Turkish Journal of Botany 31:125-134.
- Ben Dkhil, B. and M. Denden. 2010. "Biochemical and mineral responses of okra seeds (*Abelmoschus esculentus* L. variety Marsaouia) to salt and thermal stresses". Journal of Agronomy 9: 29-37.
- Berteli F.; E. Corrales; C. Guerrero; M. J. Ariza; F. Pilego y V. Valpuesta. 1995. "Salt stress increases ferredoxin-dependent glutamate synthase activity and protein level in the leaves of tomato. *Physiologia Plantarum* 93:259-264.
- Bradford, N. M. 1976. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Carrillo, P.; G. Mastrolonardo; F. Nacca y A. Fuggi. 2005. "Nitrate reductase in durum wheat seedlings as affected by nitrate nutrition and salinity". *Functional Plant Biology* 32:209-219.
- Cataldo, D. A.; M. Haroon; L. E. Schrader y V. L. Youngs, 1975. "Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid". *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 6:71-80.
- Díaz-López, L.; V. Gimeno; V. Lidón; I. Simón; V. Martínez y F. García Sánchez. 2012. "The tolerance of *Jatropha curcas* seedlings to NaCl: an ecophysiological analysis". *Plant Physiology and Biochemistry* 54:34-42.
- Ebrahimian, E. y A. Bybordi. 2011. "Influence of different ratios of nitrate and ammonium and silicon on growth, nitrate reductase activity and fatty acid composition of sunflower under salt stress". *Journal of Food, Agriculture and Environment* 9:438-443.
- Ferreira-Silva, S. L.; J. A. V. Silveira; E. L. Voigt; L. S. Soares y R. A. Viégas. 2008. "Changes in physiological indicators associated with salt tolerance in two contrasting cashew rootstocks". *Brazilian Journal of Plant Physiology* 20:51-59.
- González, D.; M. Pece; M. Acosta; M. Abdala y D. Meloni. 2006. "Germinación de vinal (*Prosopis ruscifolia* G.) en soluciones isoosmóticas de NaCl y  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ". III Congreso Iberoamericano de Ambiente y Calidad de Vida. Catamarca, Argentina.
- Guimarães, F. V. A.; C. Feitosa de Lacerda; E. C. Marques; M. R. Alcântara de Miranda; C. E. Braga de Abreu; J. T. Prisco y E. Gomes-Filho. 2011. "Calcium can moderate changes on membrane structure and lipid composition in cowpea plants under salt stress". *Plant Growth Regulation* 65: 55-63.
- Jameel Al-Kahayri, M. 2002. "Growth, proline accumulation, and ion content in sodium chloride-stressed callus of date palm". *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 38: 79-82.
- Kader, M. A. y S. Lindberg. 2010. "Cytosolic calcium and pH signaling in plants under salinity stress". *Plant Signal Behavior* 5: 233-238.



- Khan, N. M.; M. M. Siddiqui; F. Mohammad; M. Naeem y M. M. A. Khan. 2010. "Calcium chloride and gibberellic acid protect linseed (*Linum usitatissimum* L.) from NaCl stress by inducing antioxidative defence system and osmoprotectant accumulation". *Acta Physiologia Plantarum* 32: 121-132.
- Kim, M. C.; W. S. Chung; D. J. Yun y M. J. Cho. 2009. "Calcium and calmodulin-mediated regulation of gene expression in plants". *Molecular Plant* 2:13-21.
- Kinraide, T. B. 1999. "Interactions among  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Na}^{+}$  and  $\text{K}^{+}$  in salinity toxicity: quantitative resolution of multiple toxic and ameliorative effects". *Journal of Experimental Botany* 50:1495-1505.
- Klepper, L.; D. Flesher y R. H. Hageman. 1971. "Generation of reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide for nitrate reduction in green leaves". *Plant Physiology* 20: 580-590.
- Lacerda, C. F.; J. Cambraia; M. A. Oliva y C. A. Ruiz. 2004. "Influência do cálcio sobre o crescimento e solutos em plântulas de sorgo estressadas com cloreto de sódio". *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 25: 289-295.
- Levent Tuna, A.; C. Kaya; M. Ashraf; H. Altunlu; I. Yokas y B. Yagmur. 2007. "The effects of calcium sulphate on growth, membrane stability and nutrient uptake of tomato plants grown under salt stress". *Environmental and Experimental Botany* 59: 173-178.
- Meloni, D. A.; M. R. Gulotta y E. Bravo. 2003. "Growth and nitrate reduction in algarrobo seedlings (*Prosopis alba* G.) as affected by salinity". *Brazilian Journal of Plant. Physiology (supl.)* 15: 415-415.
- Meloni, D. A.; M. R. Gulotta; R. Ledesma y D. M. Silva. 2011. "Nitrogen metabolism in vinal (*Prosopis ruscifolia* G.) plants supplemented with calcium under saline stress". *Brazilian Journal of Plant Physiology* 23: 119-120.
- Meloni, D. A.; M. R. Gulotta y C. A. Martínez. 2008. "*Prosopis ruscifolia* Griseb. (vinal) tolerates saline concentrations as high as sea water and excludes toxic ions from its aerial part". *Quebracho* 16:32-40.
- Meloni, D. A. 2014. "Respuestas fisiológicas de *Prosopis alba* sometido a estrés salino. Tesis para acceder al Título de Doctor en Ciencias Forestales. Universidad Nacional de Santiago del Estero. 96 p.
- Munns, R. y M. Tester. 2008. "Mechanisms of salinity tolerance". *Annual Review of Plant Biology* 58: 651-681.
- Murillo-Amador B.; H. G. Jones; C. Kaya; R. L. Aguilar; J. L. García-Hernández; E. Troyo-Diéguez; N. Y. Ávila-Serrano y E. Rueda-Puente. 2006. "Effects of foliar application of calcium nitrate on growth and physiological attributes of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) grown under salt stress". *Environmental and Experimental Botany* 58: 188-196.
- Nedjimi, B. y Y. Daoud. 2009 a. "Ameliorative effect of  $\text{CaCl}_2$  on growth, membrane permeability and nutrient uptake in *Atriplex halimus* subsp. *Scheinfurthii* grown at high (NaCl) salinity". *Desalination* 249: 163-166.
- Nedjimi, B. y Y. Daoud. 2009 b. "Effects of calcium chloride on growth, membrane permeability and root hydraulic conductivity in two *Atriplex* species grown at high (sodium chloride) salinity". *Journal of Plant Nutrition* 32: 1818-1830.
- Reid, R. J. y A. Smith. 2000. "The limits of sodium/calcium interactions in plant growth". *Australian Journal of Plant Physiology* 27:709-715.
- Rodrigues de Souza, E.; M. B. Galvão dos Santos Freire; K. P. Vieira da Cunha; C. W. Araújo do Nascimento; H. A. Ruiz y C. M. Teixeira Lins. 2012. "Biomass, anatomical changes and osmotic potential in *Atriplex nummularia* Lindl. cultivated in sodic saline soil under water stress". *Environmental and Experimental Botany* 82: 20-27.
- Siddiqui, M. H.; M. N. Khan; F. Mohammad; y M. M. A. Khan. 2008. "Role of nitrogen and gibberellin (GA3) in the regulation of enzyme activities and in osmoprotectant accumulation in *Brassica juncea* L. under salt stress". *Journal Agronomy Crop Science* 194: 214-224.

- Siddiqui, M. H.; F. Mohammad; M. N. Khan y M. H. Al- Whaibi. 2012. "Cumulative effect of nitrogen and sulphur on *Brassica juncea* L. genotypes under NaCl stress". *Protoplasma* 249: 139-153.
- Silveira, J. A. G.; A. R. B. Melo; R. Viégas y J. T. A. Oliveira. 2001. "Salinity-induced effects on nitrogen assimilation related to growth in cowpea plants". *Environmental and Experimental Botany* 46: 171-179.
- Silveira, J. A. G.; R. Viçegas; I. M. Almeida da Rocha; A. C. M. Moreira y J. T. A. Oliveira. 2003. "Proline accumulation and glutamine synthetase activity are increased by salt-induced proteolysis in cashew leaves". *Journal of Plant Nutrition* 160: 115-123.
- Sun, J.; S. Chen; S. Dai; R. Wang; N. Li y X. Shen. 2009. "NaCl-induced alternations of cellular and tissue ion fluxes in roots of salt-resistant and salt-sensitive poplar species". *Plant Physiology*, 149: 1141-1153.
- Tattini, M. y M. Traversi. 2009. "On the mechanism of salt tolerance in olive (*Olea europea* L.) under low-or high-  $\text{Ca}^{+2}$  supply". *Environmental and Experimental Botany*, 65: 72-81.
- Türkan, I. y T. Demiral. 2009. "Recent developments in understanding salinity tolerance". *Environmental and Experimental Botany*, 67: 2-9.
- Velarde, M.; P. Felker y C. Degano. 2003. "Evaluation of Argentine and Peruvian *Prosopis* germplasm for growth at seawater salinities". *Journal of Arid Environments*, 55: 515-531.
- Wu, G. Q. y S. M. Wang. 2012. "Calcium regulates  $\text{K}^{+}/\text{Na}^{+}$  in rice (*Oryza sativa* L.) under saline conditions". *Plant Soil Environment*, 58: 121-127.
- Zaman, B.; B. H. Niazi; M. Athar y M. Ahmad. 2005. "Response of wheat plants to sodium and calcium ion interaction under saline environment". *International Journal of Environment Science and Technology*, 2: 7-12.

