

27. Agroalimentos

Efecto del estrés salino en el crecimiento vegetativo de familias de medios hermanos de *Lotus tenuis*

Affinito, María Agustina; Decker, Viviana; Andrés, Adriana (orientador); Díaz Paleo, Antonio (orientador)

affinito.agostina@inta.gob.ar

Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales

Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires

Resumen

Lotus tenuis es una leguminosa forrajera considerada tolerante a salinidad, naturalizada en los bajos salino-alcálinos de la Pampa Deprimida Argentina. El objetivo de este trabajo fue detectar y seleccionar familias de medios hermanos (FMH) tolerantes a la salinidad en fase vegetativa juvenil. Se evaluaron 15 FMH, provenientes de poblaciones colectadas en la Depresión del Salado, en un ensayo hidropónico utilizando un diseño en bloques completos al azar (DBCA) con 3 repeticiones y 3 tratamientos: 0mM, 150mM y 300mM NaCl. A los 16 y 29 días de iniciar los tratamientos, se cortaron 5 plantas/FMH y se evaluaron: número de ramificaciones (NR), longitud del tallo principal (LTP) y de entrenudos del tallo principal (ETP), longitud de raíz (LR), peso fresco aéreo (PFA) y peso seco aéreo (PSA), radicular (PSR) y total (PST). El índice de tolerancia a la salinidad (IT) para cada variable se calculó mediante la relación entre el valor de cada planta sometida a NaCl y la media del control. Se calculó la tasa de crecimiento relativo (RGR) para PST. Se realizaron ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples DGC utilizando el programa estadístico InfoStat. Los resultados indicaron interacción significativa ($p < 0,05$) entre FMH y fecha de corte para los IT de todas las variables excepto PSR. También se encontró interacción significativa entre FMH y tratamiento para NR, PFA y PSA *per se*, y diferencias significativas entre FMH para el resto de las variables. RGR evidenció una disminución al incrementarse la concentración salina, con menor caída en las FMH más tolerantes. Todas las FMH mostraron tolerancia elevada a la salinidad, lo cual indica cierta tendencia de adaptación al estrés.

Palabras clave: *Lotus tenuis*, estrés salino, variabilidad fenotípica, Mejoramiento genético.

Introducción

La creciente expansión agrícola en áreas no tradicionales, ocupadas históricamente por la explotación ganadera, crea la necesidad de incrementar la producción de especies forrajeras adaptadas a condiciones edáficas cada vez más estresantes. La salinidad del suelo es uno de los principales factores que afecta a la producción vegetal, limitando el crecimiento, el rendimiento y la calidad de los cultivos (Ashraf, 2009; Yamaguchi & Blumwald, 2005). Desarrollar germoplasma tolerante a la salinidad, es un objetivo central en los programas de mejoramiento genético a nivel mundial (Flowers *et al.*, 1997; Munns, 2002). La comprensión de los mecanismos de tolerancia a estrés salino es esencial para el mejoramiento genético de especies cultivadas de interés.

Entre las especies forrajeras adaptadas a ambientes marginales, se encuentra *Lotus tenuis* Waldst. et Kit (= *Lotus glaber* Mill), una leguminosa perenne, alógama, diploide ($2n=2x=12$), de ciclo productivo primavera-estivo-otoñal (Beuselinck *et al.*, 1986; Falistocco & Piccirilli, 1989; Lambrechtsen *et al.*, 1986; Miñón *et al.*, 1990; Vignolio *et al.*, 2002). Se encuentra naturalizada en los campos bajos salino-alcalinos de la Pampa Deprimida Argentina (León, 1975; León *et al.*, 1979)

y es muy valorada por su aporte a la oferta forrajera de los sistemas ganaderos de la región.

L. tenuis es considerada una especie tolerante al estrés salino (Ayers, 1948; Grattan *et al.*, 2004; Lambrechtsen *et al.*, 1986; Rogers *et al.*, 1997; Schachtman & Kelman, 1991; Vignolio & Fernández., 1999). Si bien la producción de biomasa disminuye con el aumento de la salinidad, los porcentajes de supervivencia y crecimiento de las plantas son mayores que en otras especies relacionadas (Ayers, 1948; Ixtaina & Mújica, 2004; Pesqueira, 2008; Teakle *et al.*, 2010).

El programa de mejoramiento genético de la especie de la Unidad Integrada UNNOBA-INTA persigue la obtención de cultivares de elevada producción con tolerancia incrementada a la salinidad.

Objetivo

Detectar y seleccionar familias de medios hermanos (FMH) de *Lotus tenuis* tolerantes a la salinidad en fase vegetativa juvenil.

Materiales y Métodos

Material vegetal

Se evaluaron 15 FMH de *Lotus tenuis* provenientes de poblaciones naturalizadas colectadas en campos bajos de la

Universidad Nacional de Cuyo | Mendoza | Argentina
Provincia de Buenos Aires (Franco, 2014;
Pesqueira, 2008).

Evaluación en invernáculo

Las 15 FMH se evaluaron en invernáculo mediante un sistema hidropónico en un diseño en bloques completos al azar (DBCA) con tres repeticiones y fueron expuestas a tres tratamientos salinos: 0, 150 y 300mM de cloruro de sodio (NaCl). Las semillas se escarificaron y se sembraron en *speedling*, utilizando tierra como sustrato. Cuando las raíces de las plántulas alcanzaron la longitud adecuada, se encastraron en placas perforadas de poliestireno expandido sobre macetas tipo jardinera conteniendo 6 litros de solución nutritiva Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950). Cada FMH estuvo representada por 10 plantas por maceta (unidad experimental). Una vez que las plántulas desarrollaron entre 3 y 4 hojas nuevas en la solución nutritiva, se adicionó NaCl. Las concentraciones finales de sal se alcanzaron de forma gradual para evitar *shock* osmótico. Las macetas correspondientes al tratamiento control (0mM NaCl) se mantuvieron durante todo el ensayo con solución Hoagland sin agregado de NaCl. Las soluciones nutritivas contenidas en las macetas fueron debidamente oxigenadas mediante aireadores marca Precision SR 7500 y se controlaron las condiciones de

17, 18 y 19 de octubre de 2018

evaporación y deposición de verdín, renovando las soluciones cada 7 días.

Se muestrearon 5 plantas por maceta a los 16 y 29 días de iniciados los tratamientos salinos (ddi).

Parámetros morfológicos evaluados

En las dos fechas de corte se evaluaron: número de tallos vegetativos (NTV), longitud de tallo principal (LTP, cm), longitud de entrenudos del tallo principal (ETP, cm), longitud de raíz (LR, cm), peso fresco aéreo (PFA, g), peso seco aéreo (PSA, g) y radicular (PSR, g) y peso seco total (PST, g).

Para cada variable se estimó la tolerancia a la salinidad a partir de la siguiente relación:

$$\text{Índice de tolerancia (IT)} = xi/Xc$$

Donde, xi= valor de cada plántula en solución salina; y Xc= media del control.

Se calculó la tasa de crecimiento relativo (RGR) para PST según lo publicado por Hoffman & Poorter (2002). Para esto, además de los datos obtenidos a 16 y 29 ddi, se evaluó PST en 5 plantas/FMH/repeticion previo al comienzo de los tratamientos salinos (0ddi).

Análisis estadístico

El análisis de los datos obtenidos se realizó utilizando el software InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2011) en su interfaz con R. Se ajustaron modelos para heterogeneidad de variancias mediante el módulo de modelos lineales generales y mixtos (MLM). Se realizó ANOVA y

Universidad Nacional de Cuyo | Mendoza | Argentina

cuando existieron diferencias significativas ($p < 0,05$) se compararon las medias mediante la prueba de comparaciones múltiples DGC. Se realizaron correlaciones fenotípicas entre los caracteres estudiados utilizando el coeficiente de correlación de Pearson. Finalmente, se realizaron análisis de componentes principales (ACP) a partir de las matrices de correlación.

Resultados y Discusión

Los resultados indicaron diferencias significativas entre los tratamientos salinos ($p < 0,05$) y diferencias significativas entre FMH para todas las variables en estudio. Existió interacción significativa entre FMH y tratamiento para número de tallos vegetativos (NTV), peso fresco aéreo (PFA) y peso seco aéreo (PSA) *per se*. También se encontró interacción significativa entre FMH y fecha de corte para los IT de todas las variables excepto ITPSR. La triple interacción (FMH*Fecha*Tratamiento) no resultó significativa en ningún caso.

En coincidencia con los resultados de este trabajo, existen numerosas evidencias que demuestran la existencia de variabilidad fenotípica en el germoplasma de *Lotus tenuis* (Andrés & Rosso, 2007; Ixtaina & Mujica, 2010; Kade *et al.*, 2003; Mendoza *et al.*, 2000, Stoffella *et al.*, 1998) y de variabilidad en la tolerancia a la salinidad en esta especie (Ixtaina & Mujica, 2004;

17, 18 y 19 de octubre de 2018

Pesqueira, 2008; Schachtman & Kelman, 1991; Teakle *et al.*, 2010).

Al evaluar a través de componentes principales las variables *per se* utilizando como criterios de clasificación las FMH y los tratamientos, se observó una disminución del crecimiento a medida que se incrementó la concentración de NaCl (Figura 1).

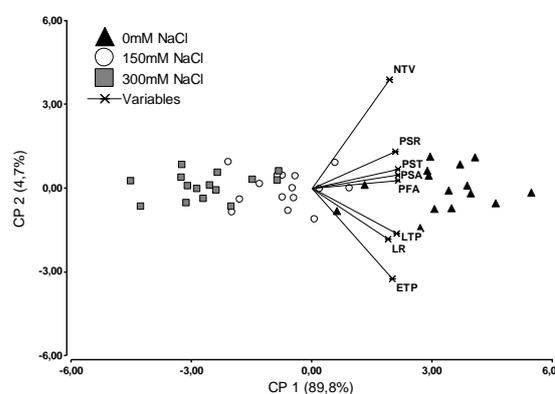


Figura 1: Análisis de componentes principales de las variables *per se* utilizando como criterios de clasificación las FMH y los tratamientos.

Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por otros autores en *L. tenuis*, que indican que a pesar de ser considerada una especie tolerante a la salinidad, este estrés produce una reducción en el crecimiento de las plantas (Ayers, 1948; Rogers *et al.*, 1997; Schachtman & Kelman, 1991).

La reducción de la producción de biomasa como respuesta al incremento del estrés salino resulta uno de los parámetros que mejor discrimina al germoplasma tolerante del susceptible y, para *L. tenuis*, se ha registrado una alta variabilidad en el nivel de reducción (Schachtman y Kelman, 1991; Ixtaina & Mujica, 2004; Pesqueira,

Universidad Nacional de Cuyo | Mendoza | Argentina

17, 18 y 19 de octubre de 2018

2008; Teakle *et al.*, 2006; Teakle *et al.*, 2010). En el presente estudio, se detectaron diferencias significativas en el ITPST con una media de 0,72 que implica una baja reducción en la producción de biomasa y una marcada tolerancia al comparar con trabajos realizados por otros autores (Pesquiera, 2008; Melchiorre *et al.*, 2009).

Por otra parte, la tolerancia de las FMH varió entre las fechas de corte. Al evaluar a través de componentes principales los IT de las variables utilizando como criterios de clasificación las FMH y las fechas de corte, se observa una disminución de la tolerancia a la salinidad con el paso del tiempo para todos los genotipos (Figura 2).

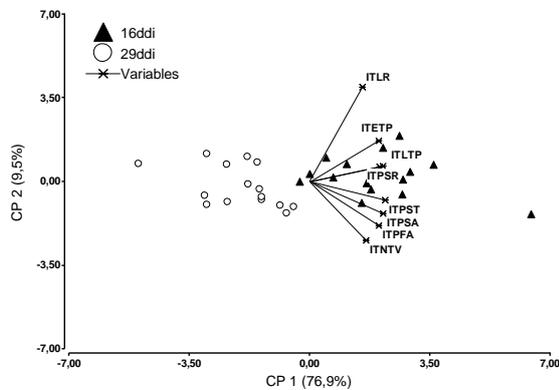


Figura 2: Análisis de componentes principales de los IT de las variables utilizando como criterios de clasificación las FMH y las fechas de corte.

El análisis de componentes principales y el ITPST de las FMH en cada fecha (Tabla 1) indican que a los 16ddi, la FMH 447 fue la de mayor tolerancia, y las FMH 325, 691, 690, 2248 y 2241 las de menor. Este comportamiento difiere a los 29ddi siendo las FMH 1894, 490, 2291, 2241y 447 las

de mayor tolerancia y la FMH 2248 la de menor.

Tabla 1: Efecto del NaCl sobre el peso seco total para cada una de las 15 FMH evaluadas a los 16ddi y a los 29ddi. Los valores representan el IT de PST.

FMH	ITPST	
	16ddi	29ddi
447	1,25 A	0,64 C
1195	0,91 B	0,57 C
1894	0,90 B	0,69 C
1897	0,89 B	0,59 C
2243	0,87 B	0,60 C
2297	0,87 B	0,67 C
685	0,85 B	0,60 C
1193	0,84 B	0,64 C
1146	0,84 B	0,50 C
490	0,83 B	0,67 C
2241	0,77 C	0,66 C
2248	0,77 C	0,44 D
690	0,73 C	0,57 C
691	0,73 C	0,54 C
325	0,68 C	0,62 C

Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) según el test DGC.

Para la mayoría de las FMH, RGR del PST evidenció una disminución al incrementarse la concentración salina, con menor caída en las FMH más tolerantes. Se grafican los RGR a 16ddi de las FMH 447 (más tolerante), 325 (menos tolerante) y 1193 (intermedia) (Figura 3) y los RGR a 29ddi de las FMH 1894 (más tolerante), 2248 (menos tolerante) y 1193 (intermedia) (Figura 4).

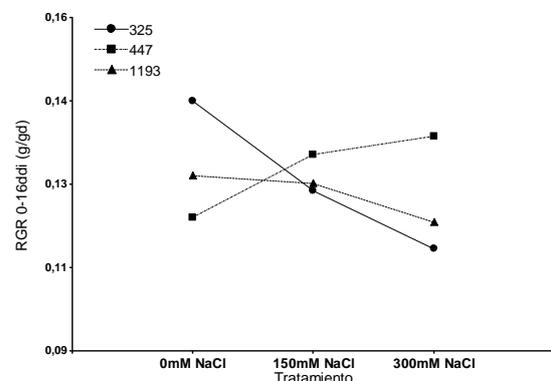


Figura 3: Tasa de crecimiento relativa (RGR) del PST de algunas de las FMH evaluadas a los 16ddi.

Universidad Nacional de Cuyo | Mendoza | Argentina

17, 18 y 19 de octubre de 2018

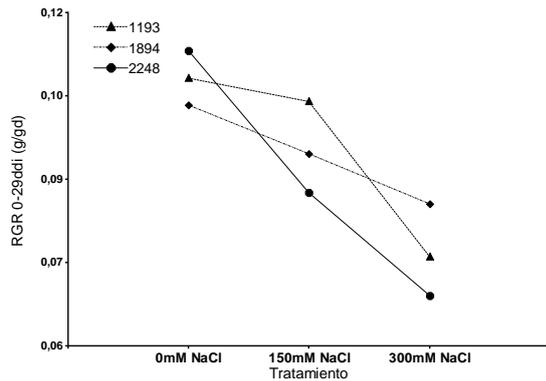


Figura 4: Tasa de crecimiento relativa (RGR) del PST de algunas de las FMH evaluadas a los 29ddi.

A 16ddi la FMH 447 presenta RGR mayores en los tratamientos salinos que en el control, pero sin diferencias significativas, que sí existen para la FMH 325. Cabe destacar que si bien no existió interacción entre FMH y Tratamiento para ITPSR, la familia 1193 tuvo un muy buen comportamiento a 150mM de NaCl pero tuvo una baja tolerancia a 300mM.

Las correlaciones fenotípicas entre caracteres fueron significativas ($p < 0,05$) y positivas (Tabla 2).

	NTV	LTP	ETP	LR	PFA	PSA	PSR
LTP	0,63						
ETP	0,50	0,89					
LR	0,37	0,49	0,46				
PFA	0,75	0,84	0,72	0,48			
PSA	0,76	0,84	0,70	0,42	0,98		
PSR	0,72	0,74	0,62	0,47	0,88	0,89	
PST	0,76	0,83	0,70	0,44	0,98	0,99	0,93

Tabla 2: Coeficiente de correlación de Pearson entre los caracteres analizados. En gris se observan las correlaciones mayores a 0,80.

Conclusiones

Este trabajo permitió detectar variabilidad fenotípica para caracteres morfológicos en germoplasma de *Lotus tenuis* bajo estrés

salino, lo cual resulta altamente auspicioso para su aplicación en el programa de mejoramiento de la especie. El ensayo realizado permitió detectar comportamiento diferencial entre las 15 FMH evaluadas en fase vegetativa juvenil. Todas las FMH mostraron tolerancia elevada a la salinidad en relación al control sin adición de sal, lo cual indica cierta tendencia de adaptación de las mismas al estrés.

La FMH 1193 mostró buena producción de biomasa bajo una concentración de 150mM de NaCl, en coincidencia con trabajos previos (Affinito, 2014; Franco, 2014) por lo que resulta promisorio para el programa de mejoramiento de la especie.

Bibliografía

- Affinito, M. A. (2014). Caracterización de la variabilidad genética a nivel morfo-fisiológico y molecular de familias de medios hermanos de *Lotus tenuis* tolerantes a salinidad. Trabajo Final de Grado. Ingeniería Agronómica. UNNOBA.
- Andrés, A., & Rosso, B. 2007. Characterization of *Lotus glaber* germplasm from Buenos Aires province – Argentina. *Lotus Newsletter*, 37 (1), 24.
- Ashraf, M. (2009). Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotechnology Advances*, 27, 84–93.

Universidad Nacional de Cuyo | Mendoza | Argentina

17, 18 y 19 de octubre de 2018

- Ayers, A. (1948). Salt tolerance of birdsfoot trefoil. *Journal of the American Society of Agronomy*, 4: 331-334.
- Beuselinck, P., Ben Younes, M., & McGraw, R. (1986). Taxonomic investigation of an accession of *Lotus* spp. *Crop Science*, (26), 661-664.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., González, L., Tablada, M., & Robledo, Y. C. (2011). InfoStat versión 2011. *Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina*. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Falisticco, E., & Piccirilli, M. (1989). The basic karyotype of *Lotus tenuis* C-banding and Feulgen studies. *Annals of botany*, 63(4), 401-404.
- Flowers, T., Garcia, A., Koyama, M., & Yeo, A. (1997). Breeding for salt tolerance in crop plants — the role of molecular biology. *Acta Physiologiae Plantarum*, 19(4), 427–433.
- Franco, M. (2014). Estudio de la variabilidad genética en familias de medios hermanos de *Lotus tenuis* sometido a estrés salino. *Tesis de Maestría en Genética Vegetal. UNR*.
- Grattan, S., Grieve, C., Poss, J., & Robinson, P. (2004). Evaluation of salt-tolerant forages for sequential water reuse systems: III. Potential implications for ruminant mineral nutrition. *Agricultural Water Management*, 70, 109-120.
- Hoagland, D. R., & Arnon, D. I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular*, 347(347), 1–32.
- Hoffmann, W. A., & Poorter, H. (2002). Avoiding Bias in Calculations of Relative Growth Rate. *Annals of Botany*, 90(1), 37–42.
- Ixtaina, V., & Mújica, M. (2004). Variability in the salt tolerance in *Lotus glaber* Mill. genotypes selected in situ in a saline basin of the Flooding Pampas (Province of Buenos Aires, Argentina). *Pastos*, 34(1), 79-91
- Ixtaina, V., & Mujica, M. (2010). Variabilidad en los componentes del vigor de plántulas de *Lotus tenuis* según las épocas y densidades de siembra. *Phyton*, 79(1), 95-100.
- Kade, M., Pagani, E. A., & Mendoza, R. E. (2003). Phosphorus utilization efficiency in populations of narrow-leaf birdsfoot trefoil. *Communications in soil science and plant analysis*, 34(1-2), 271-284.
- Lambrechtsen, N. C., Wills, B. J., & Douglas, G. B. (1986). Management and uses of *Lotus tenuis* (Narrow-leaved birdsfoot trefoil). *Plant Material Handbook for Soil Conservation*, 271-274.
- León, R. (1975). *Las comunidades herbáceas de la región de Castelli-Pila. Monografía Comisión de Investigaciones Científicas de la provincia de Buenos Aires*. La Plata: CIC.

- Universidad Nacional de Cuyo | Mendoza | Argentina
- León, R. J., Burkart, S., & Movia, C. P. (1979). *Relevamiento fitosociológico del Pastizal del Norte de la Depresión del Salado: la vegetación de la República Argentina. Serie Fitogeográfica N° 17*. Buenos Aires: INTA.
- Melchiorre, M., Quero, G. E., Parola, R., Racca, R., Trippi, V. S., & Lascano, R. (2009). Physiological characterization of four model *Lotus* diploid genotypes: *L. japonicus* (MG20 and Gifu), *L. filicaulis*, and *L. burtii* under salt stress. *Plant science*, 177(6), 618-628.
- Mendoza, R. E., Pagani, E., & Pomar, M. C. (2000). Variabilidad poblacional de *Lotus glaber* en relación con la absorción de fósforo del suelo. *Ecología Austral*, 10(3), 14.
- Miñón, D. P., Sevilla, G. H., Montes, L., & Fernández, O. N. (1990). *Lotus tenuis: leguminosa forrajera para la Pampa Deprimida. Boletín Técnico 98*. Balcarce: INTA.
- Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell & Environment*, 25(2), 239–250.
- Pesqueira, J. (2008). Cambios bioquímicos, morfológicos y ecofisiológicos en plantas del género *Lotus* bajo estrés salino. *Tesis Doctoral*. Universidad Politécnica de Valencia.
- Rogers, M., Noble, C., & Pederick, R. (1997). Identifying suitable temperate forage legume species for saline areas. *Australian Journal of Experimental*. 37, 639-645.
- Schachtman, D., & Kelman, W. (1991). Potential of *Lotus* germplasm for the development of salt, aluminium and manganese tolerant pasture plants. *Australian Journal of Agricultural Research*, 42(1), 139 - 149
- Stoffella, S., Posse, G., & Collantes, M. (1998). Variabilidad fenotípica y genotípica de poblaciones de *Lotus tenuis* que habitan suelos con distinto pH. *Ecología Austral*, 8, 57-63.
- Teakle, N. L., Real, D., & Colmer, T. D. (2006). Growth and ion relations in response to combined salinity and waterlogging in the perennial forage legumes *Lotus corniculatus* and *Lotus tenuis*. *Plant and Soil*, 289(1-2), 369–383.
- Teakle, N. L., Snell, A., Real, D., Barrett-Lennard, E. G., & Colmer, T. D. (2010). Variation in salinity tolerance, early shoot mass and shoot ion concentrations within *Lotus tenuis*: Towards a perennial pasture legume for saline land. *Crop and Pasture Science*, 61(5), 379–388.
- Vignolio, O. R., & Fernández, O. N. (1999). Germination and emergence of populations of *Lotus tenuis* (Waldst) under saline conditions and in different soil. *Journal of Applied Seed Production*, (17), 55-60.
- Vignolio, O. R., Fernández, O. N., & Maceira, N. O. (2002). Biomass

Universidad Nacional de Cuyo | Mendoza | Argentina
allocation to vegetative and reproductive
organs in *Lotus glaber* and *L.*
corniculatus (Fabaceae). *Australian*
Journal of Botany, 50(1), 75–82.

17, 18 y 19 de octubre de 2018

Yamaguchi, T., & Blumwald, E. (2005).
Developing salt-tolerant crop plants:
challenges and opportunities. *Trends in*
plant science, 10(12), 615-620.

Financiamiento

Este trabajo contó con financiamiento a través de los siguientes proyectos de investigación: “Expresión del antiporter vacuolar LtNHX1 en plantas de *Lotus tenuis* en presencia de concentraciones crecientes de sodio” (SIB, UNNOBA); “Bases fisiológicas y genéticas de la tolerancia a estrés abiótico en cultivos agrícolas de importancia en el noroeste bonaerense” (PIO, CONICET–UNNOBA); “Desarrollo de germoplasma de especies forrajeras para ambientes ganaderos de la Prov. de Bs. As.” (PIT-AP-BA, CIC); “Desarrollo de cultivares superiores de especies forrajeras para sistemas ganaderos y agrícola-ganaderos de la Argentina” (PNPA, INTA).