



**UNL • FACULTAD DE
CIENCIAS AGRARIAS**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**

**TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN
MODALIDAD TESINA**

**“Variabilidad genética para tolerancia a estrés hídrico en condiciones de salinidad y
sodicidad en *Lotus tenuis* Waldst. & Kit”.**

AUTOR: Garcia, Ramiro

DIRECTOR: Zabala, Juan Marcelo

22 de febrero de 2024

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, les agradezco a mis padres que siempre me han brindado su apoyo incondicional para poder cumplir todos mis objetivos personales y académicos. Ellos son los que con su cariño me han impulsado siempre a perseguir mis metas y nunca abandonarlas frente a las adversidades. También son los que me han brindado el soporte material y económico para poder concentrarme en los estudios y nunca abandonarlos. Es importante mencionar también, el rol fundamental de mis amigos, donde siempre estuvieron apoyándome.

Son muchos los docentes que han sido parte de mi camino universitario, y a todos ellos les quiero agradecer por transmitirme los conocimientos necesarios para hoy poder estar aquí. Un especial agradecimiento a mi tutor Marcelo por el tiempo y la paciencia dedicada hacia mí, y especialmente a LORENA, por todo el apoyo incondicional y conocimiento brindado desde los primeros instantes que llegué a la cátedra de Mejoramiento Genético Vegetal. Muchas gracias Lore por todo, fuiste una de las personas más referentes en mi formación académica.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	5
PALABRAS CLAVE	5
INTRODUCCIÓN.....	6
MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
RESULTADOS.....	12
DISCUSIÓN	18
BIBLIOGRAFÍA.....	20
ANEXO.....	24

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Análisis de la varianza para la evaluación de 20 FMH con 10 réplicas por FMH y cálculos para estimar los parámetros genéticos en base familiar.	11
Tabla 2: Valores de heredabilidad en sentido estricto (h^2) en base familiar para parámetros morfofisiológicos evaluados en familias de medios hermanos de Lotus tenuis en condiciones de ausencia (control) y presencia de estrés hídrico.	16
Tabla 3: Correlaciones genéticas entre caracteres evaluados en familias de medios hermanos de Lotus tenuis en condiciones óptimas de crecimiento.	17
Tabla 4: Correlaciones genéticas entre caracteres evaluados en familias de medios hermanos de Lotus tenuis en condiciones de estrés hídrico.	17

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: valores de temperatura foliar (barras grises; media + desvío estándar) para familias de medios hermanos de Lotus tenuis y el cultivar Miray (C) en condiciones testigo y valores medidos en condiciones de estrés hídrico relativos al testigo (rombos rojos) registrados a los días a) 21 y c) 28 días de iniciado el estrés.	12
Figura 2: altura de planta (barras grises; media + desvío estándar) para familias de medios hermanos de Lotus tenuis y el cultivar Miray (C) en condiciones testigo y valores medidos en condiciones de estrés hídrico relativos al testigo (rombos rojos) registrado a 30 días de iniciado el estrés.	13

Figura 3: número de ramificaciones (barras grises; media + desvío estándar) para familias de medios hermanos de Lotus tenuis y el cultivar Miray (C) en condiciones testigo y valores medidos en condiciones de estrés hídrico relativos al testigo (rombos rojos) registrado a 30 días de iniciado el estrés. 14

Figura 4: biomasa seca aérea (barras grises; media + desvío estándar) para familias de medios hermanos de Lotus tenuis y el cultivar Miray (C) en condiciones testigo y valores medidos en condiciones de estrés hídrico relativos al testigo (rombos rojos) registrado a 30 días de iniciado el estrés. 14

Figura 5: valores de área foliar (barras grises; media + desvío estándar) para familias de medios hermanos de Lotus tenuis y el cultivar Miray (C) en condiciones testigo y valores medidos en condiciones de estrés hídrico relativos al testigo (rombos rojos) registrado para la parte a) lateral y b) superior, a 30 días de iniciado el estrés. 15

RESUMEN

Lotus tenuis es una valiosa leguminosa forrajera naturalizada en la Pampa Deprimida. Presenta una reconocida tolerancia al anegamiento y a la salinidad, postulándose como una especie clave para la producción ganadera. El objetivo del trabajo fue evaluar la variabilidad genética en caracteres funcionales asociados a la tolerancia a estrés hídrico en un suelo salino-sódico, en familias de medios hermanos (FMH) de una población naturalizada de *Lotus tenuis* de la Provincia de Santa Fe. Los genotipos se evaluaron en condiciones de ausencia y presencia de estrés hídrico en suelo salino-sódico, en una cámara de crecimiento con luz artificial LED y fotoperiodo controlado. Cada FMH fue representada por 10 plantas (una planta/maceta) por tratamiento (n=10), y adicionalmente, se utilizó como testigo para comparar el comportamiento de las FMH, el cultivar comercial Miray® de Forratec. Se registraron datos de números rasgos funcionales para poder detectar la eficacia biológica que tiene cada FMH frente a un determinado factor ambiental. Los parámetros evaluados fueron analizados mediante un Análisis de la Varianza (ANVA, $p < 0.05$), para los factores materiales vegetales (21: 20 FMH + 1 Cv Miray®) y tratamientos de estrés. Posteriormente, se procedió a realizar un ANVA para cada tratamiento y variable, sólo con las FMH (sin el cultivar), para la estimación de la heredabilidad en base familiar (h^2) y los errores asociados. En el presente trabajo se halló suficiente variabilidad para caracteres morfofisiológicos factibles de ser utilizados como herramientas de preselección. Variables asociadas a la respuesta a la sequía, como la temperatura foliar, indirectamente asociada al cierre estomático, producción de tallos y biomasa, fueron las variables que mejor se diferenciaron entre materiales. Estos rasgos presentaron además valores medios a altos de heredabilidad tanto en condiciones control como de estrés hídrico, lo que los convierte en potenciales caracteres a considerar para la preselección de genotipos tolerantes a sequía para zonas cálidas.

PALABRAS CLAVE: Rasgos funcionales, sequía, heredabilidad, preselección, tolerancia.

INTRODUCCIÓN

El estrés salino es uno de los estreses más comunes a los que se enfrentan las plantas. Argentina está en el tercer puesto a nivel mundial en la extensión de suelos salinos (Lavado, 2008) con aproximadamente 30 millones de hectáreas en el área centro norte del país (Gorgas, 2005). El destino principal de estos suelos es la producción ganadera basada en pastizales naturales. En Argentina existen dos áreas afectadas por la salinidad que adquieren importancia por la producción ganadera que sustentan: la Depresión del Salado, en la ecorregión pampeana y los Bajos Submeridionales en la ecorregión chaqueña. En ambas ecorregiones, el número de cultivares de forrajeras disponibles en el mercado es limitado y a menudo su uso implica el reemplazo del pastizal (Pensiero et al., 2021).

El uso de especies del género *Lotus* en pasturas se ha incrementado en todo el mundo debido a su plasticidad y productividad en un amplio rango de suelos (Blumenthal y McGraw, 1999). En particular, *Lotus tenuis* Waldst. & Kit, una leguminosa perenne originaria de Europa, fue introducida al país alrededor de 1930 difundiéndose en las pasturas de la Pampa Deprimida en suelos salinos e inundables (Miñon et al., 1990). *Lotus tenuis* es considerada clave para el manejo de los sistemas ganaderos de la región de la Pampa Deprimida de la provincia de Buenos Aires debido a una serie de cualidades: capacidad para incorporar nitrógeno atmosférico al suelo en simbiosis con bacterias fijadoras, interferir en el establecimiento de malezas o especies de pobre valor forrajero, mejorar la calidad y digestibilidad del forraje e incrementar la productividad primaria de los pastizales (Cauhépé, 2004; Vignolio et al., 2010).

Aunque no hay antecedentes publicados de su uso en los Bajos Submeridionales, el contacto con técnicos de la zona que han probado su siembra, indica que la implantación es buena sembrada en otoño, pero en la mayoría de los casos se pierde más del 90% de las plantas en el primer verano. La hipótesis no evaluada aún es que, en los bajos submeridionales, las altas temperaturas de verano, asociadas a altas demandas atmosféricas que producen efectos similares a la de la sequía, condicionan la implantación exitosa en el primer año. Es conocido, que el estado de desarrollo más crítico para la persistencia de las poblaciones de *L. tenuis*, tanto en pastizales como en pasturas, es en el primer año (Vignolio y Fernandez, 1999). Altas temperaturas y sequías ocurren juntas en muchos ambientes subtropicales, sumados a otros estreses como la salinidad, reduciendo el crecimiento forrajero, en particular de las leguminosas (Stoddart et al., 2006).

En viajes de colecta realizados en el marco del Programa de Documentación, Conservación y Valoración de la Flora Nativa se ha identificado una población con un muy buen stand de plantas de *L. tenuis* en un establecimiento ganadero en la localidad de San Cristóbal, Provincia de Santa Fe, la cual ha persistido por varios años y, en la actualidad, gran parte del pastizal se encuentra cubierto con plantas de dicha especie.

En el Banco de Germoplasma “Ing. Agr. José Mario Alonso”, de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Litoral, se ha colectado semillas de estos genotipos. Esta población se originó a partir de un sector donde aparecieron plantas de *L. tenuis* y luego el dueño del establecimiento dispersó las semillas a través del ganado vacuno, por endozoocoria (Marinoni et al., 2017). El manejo realizado consistió en hacer consumir las plantas en estado reproductivo para que las vacas dispersen las semillas a través de sus heces, práctica conocida para la especie, pero poco aplicada (Vignolio et al., 2010). Luego de cinco años, más de la mitad del establecimiento posee una población adaptada a las condiciones de la zona. Existirían dos hipótesis que explican la persistencia de esta población. La primera es que a través del tiempo se han seleccionado genotipos con rasgos funcionales que le permiten soportar las condiciones de la zona o el manejo realizado a través de la dispersión endozoica mejora la persistencia de las plantas en el pastizal.

Los rasgos funcionales son frecuentemente utilizados para detectar y explicar respuestas de los vegetales a diferentes procesos ecosistémicos asociados al ambiente en el que se desarrolla. Estos caracteres que pueden ser anatómicos, morfológicos o fisiológicos, indican la eficacia biológica que tiene un organismo frente a un determinado factor ambiental. En relación a las metodologías de análisis, la evaluación de la biomasa vegetal y la partición a los diferentes órganos junto con la evaluación directa o indirecta de la conductancia estomática, han sido mencionadas como las formas más convenientes de evaluar el efecto del estrés hídrico en plantas, como así también para discriminar diferentes grados de tolerancia en diferentes genotipos (Hatfield, 1990; Irmak et al., 2000). Una medición indirecta del estrés causado por un factor abiótico es la temperatura de hoja medida con termómetro infrarrojo. Adicionalmente, características morfofisiológicas tales como área foliar, área foliar específica, biomasa radical, longitud radical específica, la determinación de especies reactivas de oxígeno, la concentración interna de iones y las mediciones de la fluorescencia de la clorofila, han sido utilizadas para evaluar el efecto del estrés salino en cultivares de

Lotus (Escaray et al., 2019; Uchiya et al., 2019). Además, la medición de la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) puede ser útil para evaluar la inducción del estrés oxidativo como respuesta de la planta a condiciones estresantes (Chanda y Dave 2009; Demidchik 2015). En este sentido, la evaluación de la peroxidación de los lípidos a través del contenido de malondialdehído (MDA) y la respuesta al estrés oxidativo mediante la producción de antioxidantes ha sido ampliamente estudiado (Flowers and Colmer 2015; Luna et al., 2016; Marinoni et al., 2020). Sin embargo, para que un rasgo funcional pueda ser utilizado como criterio de selección es necesario que pueda ser replicado en un número elevado de genotipos y en la medida de lo posible que se pueda medir de manera no destructiva, para poder conservar el genotipo selecto (Zabala et al., 2012; Zabala et al., 2018). Adicionalmente, evaluar parámetros genéticos de los rasgos evaluados, contribuyen a que el proceso de selección sea más eficiente.

Por lo descripto anteriormente, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la variabilidad genética en caracteres funcionales asociados a la tolerancia a estrés hídrico en un suelo salino-sódico, en familias de medios hermanos (FMH) de una población naturalizada de *Lotus tenuis* de la Provincia de Santa Fe. Mientras que las metas específicas trazadas para poder concretar el objetivo general fueron:

- Evaluar la variabilidad para caracteres funcionales en FMH de una población de *Lotus tenuis* asociados a la tolerancia a estrés hídrico en suelo salino-sódico.
- Estimar la heredabilidad en sentido estricto de caracteres funcionales y las correlaciones genéticas entre ellos asociados a la tolerancia a estrés hídrico en suelo salino-sódico en FMH de una población de *Lotus tenuis*.
- Seleccionar genotipos de *Lotus tenuis* tolerantes a estrés hídrico en suelo salino-sódico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Se utilizaron semillas de 20 genotipos de una población de *Lotus tenuis* naturalizada en un establecimiento ganadero de la localidad de San Cristóbal, conservada e identificada con el código de entrada 385 en el Banco de Germoplasma “Ing. Agr. José Mario Alonso” de la FCA-UNL. Las semillas de cada genotipo constituyen familias de medios hermanos (FMH). Adicionalmente, se utilizó como testigo para comparar el comportamiento de las FMH, el cultivar comercial Miray® de Forratec de *L. tenuis*.

Diseño experimental. Los genotipos se evaluaron en condiciones de ausencia y presencia de estrés hídrico en suelo salino-sódico, en una cámara de crecimiento con luz artificial LED (densidad de flujo de fotones fotosintéticos de $400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) con un fotoperiodo de 16:8 horas de luz:oscuridad y temperatura controlada ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$). Se utilizó como sustrato el horizonte superficial de un suelo salino-sódico correspondiente a un Natracualf Típico de la serie Río Salado (ver análisis de suelo en Anexo) en mezcla con arena en una relación volumétrica de 3:1. Las semillas de cada FMH fueron sembradas en macetas individuales de 270 cm^3 , en una cantidad de 5 semillas por maceta. Luego de emergidas las plántulas se efectuó un raleo para dejar 1 planta por maceta. Cada FMH fue representada por 10 plantas (una planta/maceta) por tratamiento ($n=10$), las que fueron distribuidas aleatoriamente en la cámara de crecimiento. Se procedió de la misma manera con el Cv. Miray®.

El tratamiento de estrés hídrico consistió en mantener las macetas a mitad de capacidad de campo, mientras que para el control se mantuvieron a CC. Para evaluar el contenido hídrico a CC del sustrato utilizado, se regaron a saturación cinco macetas (sólo con sustrato de tierra y arena) y luego de percolado toda el agua se pesaron para obtener el peso húmedo (PH). Luego se llevó a estufa a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ con circulación de aire forzado durante 48 hs y se estimó el peso seco (PS). El contenido hídrico (%) a CC se estimó como: PH-PS/PS , promedio de todas las macetas evaluadas.

Al comienzo del ensayo, durante la siembra y crecimiento inicial, todas las macetas se mantuvieron a CC. A partir de los 45 días de la siembra, la mitad de las plantas se sometieron a estrés hídrico, para lo cual se controló periódicamente por gravimetría para evaluar cuándo llegaban a la mitad de CC. Una vez alcanzado el peso estimado para la mitad de CC, se mantuvieron a dicho nivel con la adición de agua (g) necesaria.

Evaluación de caracteres morfofisiológicos. Desde el inicio hasta el final del estrés, se evaluó la temperatura foliar (TF) con termómetro infrarrojo (Testo 835 ®), promedio de tres hojas por planta, en tres momentos diferentes: a los 7, 21 y 28 días de iniciado el estrés.

Finalizado el ensayo, a los 30 días de iniciado el estrés, se realizaron las siguientes mediciones a cada planta:

- Altura de planta (AP; cm), promedio de 5 tallos;
- Número de ramificaciones (RP);

-Biomasa seca aérea (BS; g); estimado a partir de la biomasa fresca secada en estufa a 50 °C con circulación de aire forzado durante 72 horas;

-Área foliar (AF; cm²); evaluada para la parte superior y lateral de la planta con un equipo de fenotipado “Lab Scanalyser” ubicado en la FCA-UNL;

-Respuesta colorimétrica evaluada a través de la tasa rojo/verde (R/G ratio) de la parte superior y lateral de la planta evaluadas con el equipo “Lab Scanalyser”;

-Contenido hídrico relativo (CHR). Calculado de acuerdo a lo propuesto por (Catsky et al., 1960). Se tomaron cinco hojas jóvenes completamente expandidas ubicadas en la parte superior de los tallos y se pesaron inmediatamente para obtener su peso fresco. Luego, las muestras fueron embebidas durante 12 horas en cajas de Petri cerradas que contenían agua destilada para obtener su peso turgente. Finalmente, las hojas se secaron en estufa a aire forzado a 50°C durante 48 h para obtener su peso seco. El CHR se calculó según la siguiente fórmula (1):

$$(1) \quad CHR = \frac{\text{Peso fresco} - \text{Peso seco}}{(\text{Peso turgente} - \text{Peso seco})} * 100$$

-Contenido de especies reactivas de oxígeno (EROs); se calculó para cada planta el contenido de malondialdehído (MDA) y el contenido de antioxidantes no enzimáticos a través del poder antioxidante reductor férrico (FRAP), los cuales pueden estimarse mediante el mismo extracto (Hodges et al., 1999; Benzie y Strain, 1996).

Análisis estadístico y cálculos genéticos. Los parámetros evaluados fueron analizados mediante un Análisis de la Varianza (ANVA, p<0.05), para los factores materiales vegetales (21: 20 FMH + 1 Cv Miray®) y tratamientos de estrés (2), previo test de homogeneidad y normalidad de varianzas (Shapiro-Wilks modificado). Las diferencias de medias se evaluaron mediante el test de Tukey (p<0,05). Posteriormente, se procedió a realizar un ANVA para cada tratamiento y variable, sólo con las FMH (sin el cultivar), para la estimación de la heredabilidad en base familiar (h_1^2) y los errores asociados (Tabla 1) (Nyquist y Baker, 1991; Vencovsky and Barriga 1992; Holland and Nyquist, 2003) de acuerdo al siguiente modelo lineal (2) propuesto por (Nyquist y Baker, 1991):

$$(2) \quad P_{jkm} = \mu + R_j + F_k + a(jk)$$

Donde P_{jkm} es el valor fenotípico de la j th unidad experimental de la k th FMH, μ es la media general, R_j es el efecto de la j th replica, F_k es el efecto de la k th FMH y $a(jk)$ es el error experimental asociado.

Tabla 1: Análisis de la varianza para la evaluación de 20 FMH con 10 réplicas por FMH y cálculos para estimar los parámetros genéticos en base familiar.

Fuente de variación (FV)	Grados de libertad (GL)	Cuadrados medios (CM)	Esperanza de los CM
Entre familias	19	CM _{familia}	$\sigma_\varepsilon^2 + r \sigma_f^2$
Error	38	CM _{error}	σ_ε^2
Total	57		

Varianza entre FMH (σ_F^2): (CM_{familia} - CM_{error}) / r (número de réplicas)

Varianza ambiental: σ_ε^2

Varianza fenotípica (σ_P^2): $\sigma_f^2 + (\sigma_\varepsilon^2/r)$

$$4\sigma_F^2 = \sigma_A^2 + 1/4\sigma_{AA}^2$$

Donde la heredabilidad en sentido estricto (3) propuesta por Nyquist y Baker (1991) se calcula de la siguiente forma:

$$(3) \quad h_1^2 = \frac{\sigma_F^2}{\sigma_P^2}$$

Las correlaciones genéticas (rg) entre caracteres se estimaron según lo propuesto por (Cruz y Regazzi, 1997) a través de la siguiente fórmula (4):

$$(4) \quad rg = \frac{\text{COVg}(XY)}{\sqrt{(\sigma^2_{ax} * \sigma^2_{ay})}}$$

σ^2_{ax} : varianza aditiva del carácter X.

σ^2_{ay} : varianza aditiva del carácter Y.

Para los análisis estadísticos se utilizó el paquete estadístico InfoStat (Di Rienzo et al., 2021).

RESULTADOS

Temperatura foliar (TF). La TF inicial, registrada 7 días después de iniciado el estrés, sólo varió significativamente entre tratamientos, siendo de $23 \pm 0,78$ (desvío estándar) C° y $23,9 \pm 0,75$ C° para el tratamiento control y estrés hídrico, respectivamente.

La segunda y tercera medición, registradas a los 21 y 28 días de iniciado el estrés, respectivamente, reveló interacción significativa entre materiales y tratamientos. Todos los materiales vegetales en condiciones de estrés hídrico presentaron mayor TF respecto al control. No obstante, en algunos, ese aumento de temperatura fue menor respecto al tratamiento testigo. En las Figura 1, se puede observar que los materiales 11, 12, 15, 16, 17, 18, 20 y el cultivar, fueron los que menor variación tuvieron entre ambos tratamientos, dando una noción de la capacidad de tolerancia de los mismos al estrés inducido. Los *P*-valores obtenidos en los ANVAs para todos los caracteres evaluados se detallan en Anexo.

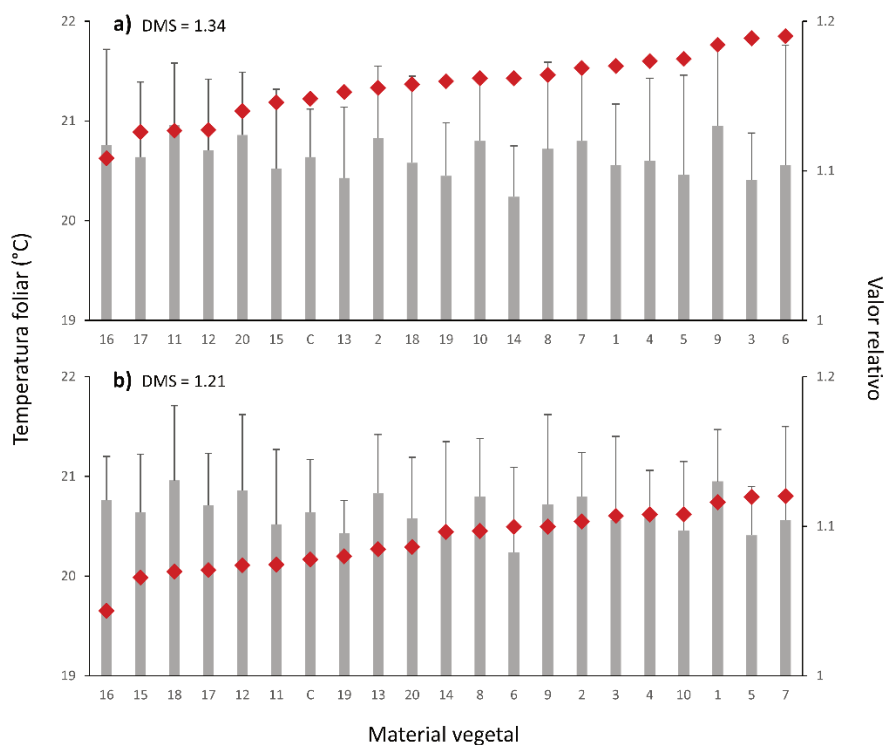


Figura 1: valores de temperatura foliar (barras grises; media + desvío estándar) para familias de medios hermanos de *Lotus tenuis* y el cultivar Miray® (C) en condiciones testigo y valores medidos en condiciones de estrés hídrico relativos al testigo (rombos rojos) registrados a los días a) 21 y c) 28 días de iniciado el estrés.

Altura de planta (AP). Solo se hallaron diferencias significativas entre tratamientos y materiales vegetales. En condiciones de sequía todos los materiales presentaron menor AP. La AP promedio en control fue de $16,85 \pm 7,37$ cm, mientras que en bajo sequia disminuyó a $13,9 \pm 4,48$ cm. La AP de los genotipos 7, 9, 13, 14, 16 y 17 no se vio significativamente modificada (Figura 2).

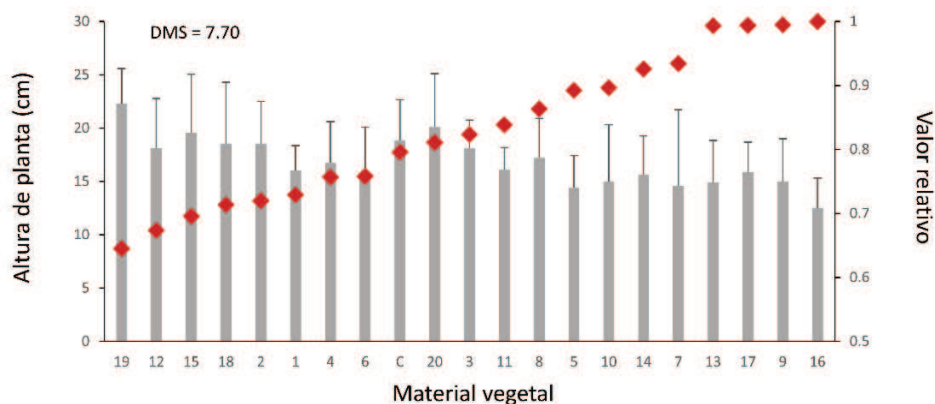


Figura 2: altura de planta (barras grises; media + desvío estándar) para familias de medios hermanos de *Lotus tenuis* y el cultivar Miray® (C) en condiciones testigo y valores medidos en condiciones de estrés hídrico relativos al testigo (rombos rojos) registrado a 30 días de iniciado el estrés.

Número de ramificaciones (NR). Se halló diferencias significativas para todas las fuentes de variación. En todos los materiales, el NR disminuyó bajo estrés hídrico ($5,7 \pm 3$ vs $8,4 \pm 4,2$ en condiciones testigo). No obstante, los materiales 10, 12, 13, 16 y 20 mantuvieron similares NR en ambos tratamientos (Figura 3).

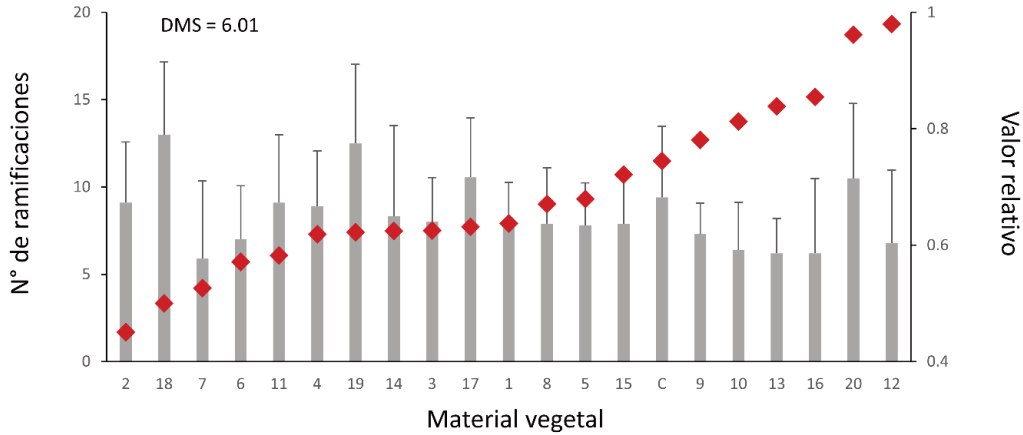


Figura 3: número de ramificaciones (barras grises; media + desvío estándar) para familias de medios hermanos de *Lotus tenuis* y el cultivar Miray® (C) en condiciones testigo y valores medidos en condiciones de estrés hídrico relativos al testigo (rombos rojos) registrado a 30 días de iniciado el estrés.

Biomasa seca aérea (BSA). Se hallaron diferencias significativas para todas las fuentes de variación. Todos los materiales redujeron la BSA en condiciones de sequía, no obstante, aquellos materiales con menor producción de biomasa en condiciones control fueron los que menos reducción mostraron bajo sequía (4, 5, 8, 9, 10, 12, 13 y 16; Figura 4).

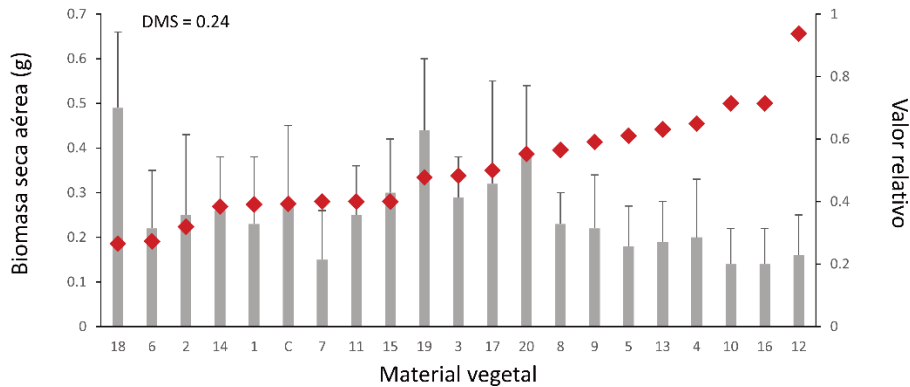


Figura 4: biomasa seca aérea (barras grises; media + desvío estándar) para familias de medios hermanos de *Lotus tenuis* y el cultivar Miray® (C) en condiciones testigo y valores medidos en condiciones de estrés hídrico relativos al testigo (rombos rojos) registrado a 30 días de iniciado el estrés.

Área foliar (AF). Se halló diferencias entre tratamientos y materiales para el AF lateral (AFL) y AF superior (AFS). Dado que los coeficientes de variación del análisis de la varianza resultaron altos, se procedió a transformar los datos por medio de la raíz cuadrada del valor. Como se puede observar en la Figura 5, todos los materiales presentaron menor AF en condiciones de estrés hídrico; los materiales con menor AFS y AFL en condiciones control, fueron los que mantuvieron los mayores valores en términos relativos (7, 18, 19).

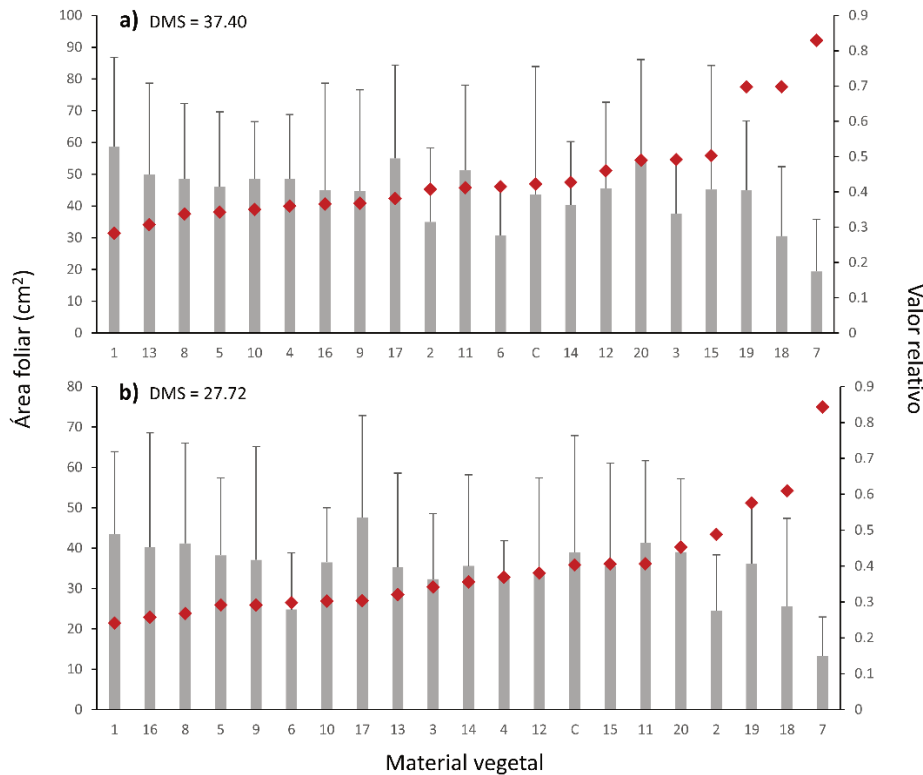


Figura 5: valores de área foliar (barras grises; media + desvío estándar) para familias de medios hermanos de *Lotus tenuis* y el cultivar Miray® (C) en condiciones testigo y valores medidos en condiciones de estrés hídrico relativos al testigo (rombos rojos) registrado para la parte a) lateral y b) superior, a 30 días de iniciado el estrés.

Respuesta colorimétrica (R/G ratio). La relación entre la reflectancia de rojo/verde sólo varió entre tratamientos. El valor de R/G para la parte superior (RGS) fue de 0.87 ± 0.2 y 0.89 ± 0.2 en condiciones testigo y estrés hídrico, respectivamente; mientras que para la parte lateral (RGL) fue de 0.85 ± 0.2 y 0.87 ± 0.2 , respectivamente.

Contenido hídrico relativo (CHR). El CHR se diferenció significativamente sólo entre tratamientos siendo de $74.01 \pm 11.62 \%$ en condiciones testigo y de $61.23 \pm 15.62 \%$ bajo estrés hídrico.

Especies reactivas de oxígeno (EROs). El contenido de MDA no mostró diferencia significativa para ninguna de las fuentes de variación. El contenido de antioxidantes no enzimáticos sólo varió entre tratamientos siendo mayor en condiciones de estrés hídrico ($3.3 \pm 1.1 \mu\text{mol/gr PF}$ vs $2.6 \pm 1.1 \mu\text{mol/gr PF}$ en condiciones control).

Estimación de parámetros genéticos para los caracteres morfofisiológicos evaluados. El modelo para el cálculo de la h^2 de cada parámetro en ambos tratamientos se ajustó correctamente en algunos casos y en otros no. Los valores más altos de h^2 fueron hallados para BSA tanto en presencia como ausencia de estrés y para TF en condiciones de estrés. El CHR y AF mostraron valores medios para h^2 , mientras que el modelo no se ajustó correctamente para R/G ratio, parámetros asociados al estrés oxidativo, altura en condiciones de sequía y temperatura en condiciones control (Tabla 2).

Tabla 2: Valores de heredabilidad en sentido estricto (h^2) en base familiar para parámetros morfofisiológicos evaluados en familias de medios hermanos de *Lotus tenuis* en condiciones de ausencia (control) y presencia de estrés hídrico.

Parámetro	h^2	
	Control	Estrés hídrico
Temperatura 7 días	0.12	0.41
Temperatura 21 días	-0.63	0.72
Temperatura 28 días	-0.67	0.74
Altura de planta	0.26	-0.18
Número de ramificaciones	0.42	0.65
Biomasa seca aérea	0.67	0.5
Contenido hídrico relativo	0.43	0.21
Área foliar superior	0.26	0.41
Área foliar lateral	0.13	0.32
Respuesta colorimétrica superior	0.56	-0.36
Respuesta colorimétrica lateral	0.26	-0.22
Antioxidantes no enzimáticos	0.22	-0.38
Contenido de malondialdehído	0	-0.56

Adicionalmente, no se observaron fuertes correlaciones entre variables en el tratamiento control, a excepción del AFS con el AFL y RGL con NR (Tabla 3). No obstante, en condiciones de estrés hídrico se encontró una fuerte correlación genética positiva entre las TF medidas en diferentes momentos del ensayo y una relación negativa de éstas con el NR, BSA, CHR y AF. Además, la respuesta colorimétrica estuvo correlacionada para el plano superior y lateral (Tabla 4).

Tabla 3: Correlaciones genéticas entre caracteres evaluados en familias de medios hermanos de *Lotus tenuis* en condiciones óptimas de crecimiento.

TF2	TF3	AP	NR	BSA	CHR	AFS	AFL	RGS	RGL	MDA	FRAP	
-2.80	1.25	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	4.95	4.85	TF1
	0.18	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	TF2
		SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	TF3
			1.08	1.02	0.31	-0.41	-0.30	-0.12	-0.40	-0.30	1.64	AP
				1.11	0.18	0.21	0.10	-0.42	-0.70	-0.16	0.21	NR
					-0.18	-0.18	-0.39	-0.04	-0.02	-0.01	0.45	BSA
						0.28	0.38	-0.05	-0.03	4.95	0.42	CHR
							0.97	-1.56	-2.37	-1.07	0.37	AFS
								-2.09	-3.34	-2.64	0.36	AFL
									1.18	0.11	1.05	RGS
										SD	SD	RGL
											1.37	MDA

SD: Sin datos. Las operaciones matemáticas del modelo son inviables.

Tabla 4: Correlaciones genéticas entre caracteres evaluados en familias de medios hermanos de *Lotus tenuis* en condiciones de estrés hídrico.

TF2	TF3	AP	NR	BSA	CHR	AFS	AFL	RGS	RGL	MDA	FRAP	
0.95	0.86	SD	-0.73	-0.67	-0.48	-1.11	-1.30	SD	SD	SD	SD	TF1
	0.97	SD	-0.55	-0.54	-0.34	-0.64	-0.90	SD	SD	SD	SD	TF2
		SD	-0.35	-0.30	-0.69	-0.46	-0.65	SD	SD	SD	SD	TF3
			SD	SD	SD	SD	SD	-1.71	-1.63	SD	SD	AP
				1.07	-0.07	1.29	1.74	SD	SD	SD	SD	NR
					-0.19	1.56	2.02	SD	SD	SD	SD	BSA
						-0.08	-0.11	SD	SD	SD	SD	CHR

1.08	SD	SD	SD	SD	AFS
	SD	SD	SD	SD	AFL
		-0.91	SD	SD	RGS
			SD	SD	RGL
				-1.39	MDA

SD: Sin datos. Las operaciones matemáticas del modelo son inviables

DISCUSIÓN

Lotus tenuis en una leguminosa forrajera de importante valor nutritivo para zonas templadas y suelos salinos e inundables de nuestro país (Miñon et al., 1990). La presencia de una población naturalizada en una zona más cálida de nuestro país, plantea la posibilidad de seleccionar materiales adaptados a la región con fines de mejoramiento. En el presente trabajo se halló suficiente variabilidad para caracteres morfofisiológicos factibles de ser utilizados como herramientas de preselección.

VARIABLES asociadas a la respuesta a la sequía, como la temperatura foliar, indirectamente asociada al cierre estomático, producción de tallos y biomasa, fueron las variables que mejor se diferenciaron entre materiales. Estos rasgos presentaron además valores medios a altos de heredabilidad tanto en condiciones control como de estrés hídrico, lo que los convierte en potenciales caracteres a considerar para la preselección de genotipos tolerantes a sequía para zonas cálidas. Los rasgos asociados a la producción de forraje han sido históricamente utilizados de forma eficiente en mejoramiento de forrajeras y han demostrado tener mediana a alta heredabilidad en leguminosas forrajeras (Smith y Gorz 1965; Liu et al. 2006; Julier et al. 2007; Zabala et al. 2012; Van Minnebruggen et al. 2014). Adicionalmente, la temperatura foliar, se correlacionó genéticamente y negativamente con muchas variables asociadas a la producción de biomasa, lo que lo convierte en un carácter de potencial uso en condiciones de estrés hídrico por su fácil evaluación y relación con otros caracteres relevantes.

Otros caracteres como el contenido hídrico relativo, especies reactivas de oxígeno e índices asociados a la respuesta colorimétrica, en relación a la senescencia foliar, no fueron capaces de discriminar respuestas diferentes entre materiales vegetales. Otros autores (Luna et al., 2016; Marinoni et al., 2020) tampoco encontraron diferencias entre materiales vegetales evaluados en condiciones de estrés al evaluar EROs y antioxidantes no enzimáticos en gramíneas forrajeras o al evaluar CHR en diferentes genotipos de *Lotus japonicus* (Buraschi et al., 2020).

El proceso de fitomejoramiento podría mejorar con éxito siempre que exista variación genética dentro del germoplasma evaluado y la selección pueda centrarse en los rasgos correctos medidos en los entornos adecuados (Cooper et al., 2014). En este sentido, en el presente trabajo se ha encontrado variabilidad genética en caracteres funcionales asociados a la tolerancia a sequía en genotipos de *L. tenuis*, lo que permitirá llevar a cabo un proceso de selección eficiente. A futuro, se utilizarán los genotipos 12, 13, 16, 17, 18 y 20, que han presentado un buen comportamiento para más de un rasgo evaluado, para generar una variedad sintética tolerante a la salinidad y a la sequía estival producto de la alta demanda atmosférica de las zonas templado-cálidas del país, y seguir los estudios pertinentes para el proceso de mejora y adaptación de la especie en cuestión.

BIBLIOGRAFÍA

- Benzie IF, Strain JJ. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of ‘‘antioxidant power’’: the FRAP assay. *Anal Biochem* 239(1):70–76.
- Blumenthal, M J. & McGraw, R.L. (1999). Lotus adaptation, use, and management. *Trefoil: The Science and Technology of the Lotus* 28: 97-119.
- Buraschi, F. B., Mollard, F. P., Grimoldi, A. A., & Striker, G. G. (2020). Eco-physiological traits related to recovery from complete submergence in the model legume *Lotus japonicus*. *Plants*, 9(4), 538.
- Catský, J. Determination of water deficit in disks cut out from leaf blades. *Biol. Plant.* (1960). 2, 76.
- Cauhépe, M.A. (2004). Does *Lotus glaber* improve beef production at the Flooding Pampas? *Lotus Newsletter* 34: 30-35.
- Chanda S, Dave R. (2009). In vitro models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: an overview. *Afr J Microbiol Res* 3(13):981–996.
- Cooper, M., Messina, C.D., Podlich, D., Totir, L.R., Baumgarten, A., Hausmann, N.J., Wright, D., Graham, G. (2014). Predicting the future of plant breeding: complementing empirical evaluation with genetic prediction. *Crop Pasture Sci.* 65, 311.
- Cruz, C. D., & Regazzi, A. J. (1997). *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético* (Vol. 2). Ed. UFV.
- Demidchik V. (2015). Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. *Environ Exp Bot* 109:212–228.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M. & Robledo, C.W. (2021). *InfoStat versión 2021*. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Escaray, F.J., Antonelli, C.J., Carrasco, P. & Ruiz, O.A. (2019). Interspecific hybridization improves the performance of *Lotus* spp. under saline stress. *Plant Science*, 283, 202-210.
- Flowers TJ, Flowers SA. (2005). Why does salinity pose such a difficult problem for plant breeders? *Agric Water Manage* 78:15–24.
- Gorgas, J. (2005). Cartografía de suelos salino-sódicos en Argentina. Metodología. Taller: La salinización de suelos en la Argentina: su impacto en la producción agropecuaria y

propuestas para la incorporación de áreas afectadas por la salinidad a la cadena productiva. 2 y 3 de marzo, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Católica de Córdoba.

- Hatfield, J.L. (1990). Measuring plant stress with an infrared thermometer. *Hort Science* 25(12): 1535-1538.
- Hodges DM, DeLong JM, Forney CF, Prange RK. (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207(4):604–611.
- Holland, J. B., Nyquist, W. E., & Cervantes-Martínez, C. T. (2003). Estimating and interpreting heritability for plant breeding: An update. *Plant breeding reviews*, 22, 9-112.
- Irmak, S., Haman, D.Z. & Bastug, R. (2000). Determination of crop water stress index for irrigation timing and yield estimation of corn. *Agronomy Journal* 92(6): 1221-1227.
- Julier B, Huguet T, Chardon F, Ayadi R, Pierre J, Prosperi JM et al. (2007). Identification of quantitative trait loci influencing aerial morphogenesis in the model legume *Medicago truncatula*. *Theor Appl Genet* 114:1391–1406
- Lavado, R. (2008). Visión sintética de la distribución y magnitud de los suelos afectados por salinidad en la Argentina. En E. Taleisnik, K. Grunberg, & G. Santa María (Eds.), *La salinización de suelos en la Argentina: Su impacto en la producción agropecuaria* (pp. 11–15). Córdoba, Argentina: EDUCC.
- Liu W, Hou A, Peffley EB, Auld DL, Powell RJ. (2006). The inheritance of a basal branching type in guar. *Euphytica* 151:303–309.
- Luna DF, Aguirre A, Pittaro G, Bustos D, Ciacci B, Taleisnik E. (2016). Nutrient deficiency and hypoxia as constraints to *Panicum coloratum* growth in alkaline soils. *Grass Forage Sci* 72(4):640–653.
- Marinoni, L. D. R., Richard, G. A., Bustos, D., Taleisnik, E. L., Pensiero, J. F., & Zabala, J. M. (2020). Differential response of *Trichloris* ecotypes from different habitats to drought and salt stress. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 32, 213-229.
- Marinoni, L., Zabala, J. M., Patiño, J., & Pensiero, J. F. (2017). Efecto de la temperatura y salinidad en la germinación y crecimiento inicial de un material naturalizado de *Lotus tenuis* Waldst. & Kit. *Revista FAVE sección Cs. Agrarias* 16(2): 47-59.

- Miñon, D.P., Sevilla, G.H., Montes, L. & Fernandez, O. (1990). Lotus tenuis, leguminosa forrajera para la Pampa Deprimida. EEA Balcarce INTA – Argentina, Boletín técnico N° 98.
- Nyquist WE, Baker RJ (1991) Estimation of heritability and prediction of selection response in plant populations. *CRC Cr Rev Plant Sci* 10:235-322.
- Pensiero, J.F., J.M. Zabala, L. Marinoni & G. Richard. (2021). Chapter 4. Native and Naturalized Forage Plant Genetic Resources for Saline Environments of the Southernmost Portion of the American Chaco. In: Taleisnik, E. & R Lavado (Eds.), *Saline and Alkaline Soils in Latin America. Natural Resources, Management and Productive Alternatives*. Springer International Publishing, Switzerland. ISBN 978-3-030-52592-7. 290 p.
- Smith WK, Gorz HL. (1965). Sweet clover improvement. *Adv Agron* 17:163–231.
- Stoddard, F.L., Balko, C., Erskine, W., Khan, H.R., Link, W. & Sarker, A. (2006). Screening techniques and sources of resistance to abiotic stresses in cool-season food legumes. *Euphytica* 147(1-2): 167-186.
- Uchiya, P., Escaray, F. J., Bilenca, D., Pieckenstain, F., Ruiz, O. A., & Menéndez, A. B. (2016). Salt effects on functional traits in model and in economically important Lotus species. *Plant Biology*, 18(4), 703-709.
- Van Minnebruggen A, Cnops G, Saracutu O, Goormachtig S, Van Bockstaele E, Roldan-Ruiz I et al. (2014). Processes underlying branching differences in fodder crops. *Euphytica* 195:301–313.
- Vencovsky R. and P. Barriga. (1992). *Genética Biométrica no Fitomelhoramento*. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirao Preto, 496 pp.
- Vignolio, O.R. & Fernandez, O.N. (1999). Germination and emergence of populations of Lotus tenuis (Waldt) under saline conditions and in different soil. *Journal of Applied Seed Production* 17: 55-60.
- Vignolio, O.R., Cambareri, G.S. & Maceira, N.O. (2010). Lotus tenuis (Fabaceae). Productividad y manejo agronómico. *Revista Argentina de Producción Animal* 30: 97-116.

Zabala J.M., Schrauf G., Baudracco J., Giavedoni J., Quaino O. and Rush P. (2012). Selection for late-flowering and greater number of basal branches increases the leaf dry matter yield in *Melilotus albus* Desr. *Crop and Pasture Science* 63: 370-376.

Zabala J.M.; Marinoni L.; Giavedoni J. y Schrauf G. (2018). Breeding strategies in *Melilotus albus* Desr., a salt-tolerant forage legume. *Euphytica* 214: 22.
<https://doi.org/10.1007/s10681-017-2031-0>.

ANEXO

Análisis de suelo de la tierra utilizada como sustrato en el presente trabajo.



Análisis Químico del Suelo

Laboratorio adherido a:
A.A.C.S. - Asoc. Argentina de la Ciencia del Suelo | S.A.M.L.A. (SAGyP de la Nación)
PROINSA (Programa Nacional de Control Interlaboratorios)
lqlaboratorio@sanjustosf.com.ar - Francisco Angeloni 3199 - 3040 SAN JUSTO SF - Tel.: 03498-428040
ANÁLISIS de: Suelos - Semillas - Raciones - Aguas | TRAZADO de: Desagües y Curvas de nivel

Solicitante:	LORENA MARINONI	Fecha:	28/3/2023
Ubicación:	ESPERANZA - SF		
Establecimiento:	SUSTRATO SODICO	Profundidad (cm):	0-20
Lote:	S/D		

Fertilidad	Resultado	TENOR	Unidad	Bajo	Medio	Alto
Materia Orgánica	0,99	BAJO	gr %	<2,70	2,80 - 3,40	>3,50
Carbono	0,57	BAJO	gr %	<1,55	1,60 - 1,90	>2,00
Nitrógeno Total	0,054	BAJO	gr %	<0,150	0,160 - 0,180	>0,190
Nitrógeno - Nitratos			NNO3 - ppm	<14	15 - 17	> 18
Fósforo (Bray 1)			P - ppm	<20	22 - 28	> 30
Azúfre			SO4 - ppm	<9,0	10 a 11	> 12
pH	9,05	ALCALINO	1:2,5 - agua	<6,5:ácido	7:neutro	>7,5:alcalino
Salinidad (Cond. Electr.)	2,56	MEDIO	mS/cm	<1,00	1,5 - 3,5	>4,00

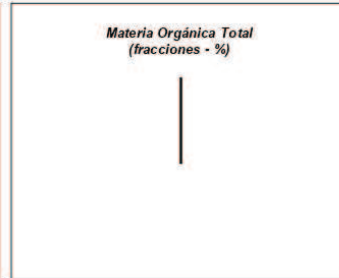
Micronutrientes	Resultado	TENOR	Unidad	Bajo	Medio	Alto
Zinc (Abs. Atómica)	-		ppm Zn	< 0,80	1	>1,20
Boro (HCL)	-		ppm B	< 0,80	1	> 1,20

Intercambio Catiónico	Resultado	TENOR	Unidad	Bajo	Medio	Alto	% del CIC	EQUILIBRIO
Calcio	5,94	BAJO	meq %	<8,0	10,0	>12,0	65,7%	50 / 65%
Magnesio	1,23	BAJO	meq %	<1,60	2,00	>2,40	13,6%	10 / 20%
Potasio	0,36	BAJO	meq %	<0,50	0,75	>1,00	4,0%	3 / 5%
Sodio	1,09	MEDIO	meq %	<0,50	0,85	>1,20	12,1%	0 / 2 %
Cap. Interc. Catiónico	9,04	BAJO	meq %	<12,0	14-16	>18,0		
Saturación de Bases	95,35%	ALTO		<70,00	80,0	>90,00		

Dosis de Fertilización	kg/ha
Cultivo / Rinde buscado-q/ha	S/D
Fósforo (P2O5-kg)	
Nitrógeno (N elemento-kg)	
Azúfre (S elemento-kg)	

Coloración de los Tenores:
AZUL : nivel bueno / óptimo
AMARILLO : nivel a considerar
ROJO : nivel de alta consideración

Oferta de Nitrógeno (kg/ha)	N-NO3 ppm
0-20 cm	-
20-40 cm	-
40-60 cm	-
Total Nitrógeno (kg/ha) :	-



Fracciones de Mat. Orgánica	%
MO Total	-
MO Madura / Humificada	-
MO Joven / Particulada	-
MO Grosera	-

* Nota: es responsabilidad del interesado la correcta extracción, conservación, representatividad e interpretación de los resultados de la muestra remitida para su análisis.

Tabla anexa: *P*-valores derivados del Análisis de la Varianza para caracteres funcionales evaluados en familias de medios hermanos de *Lotus tenuis*, comparados con el cv. Miray, en condiciones de estrés hídrico en suelo salino-sódico.

Parámetro	Tratamiento (T)	Material vegetal (MV)	T*MV
Temperatura 7 días	<0.0001	0.0565	0.2923
Temperatura 21 días	<0.0001	0.002	0.0302
Temperatura 28 días	<0.0001	0.0005	0.0023
Altura de planta	<0.0001	0.0041	0.0659
Número de ramificaciones	<0.0001	<0.0001	0.3278
Biomasa seca aérea	<0.0001	<0.0001	0.0472
Contenido hídrico relativo	<0.0001	0.0568	0.2473
Área foliar superior	<0.0001	0.061	0.3166
Área foliar lateral	<0.0001	0.0968	0.5683
Respuesta colorimétrica superior	<0.0001	0.4224	0.2854
Respuesta colorimétrica lateral	<0.0001	0.8729	0.2167
Antioxidantes no enzimáticos	<0.0001	0.5992	0.528
Contenido de malondialdehído	0.5026	0.5995	0.7027