

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Cambios bioquímicos, morfológicos y
ecofisiológicos en plantas del género *Lotus*
bajo estrés salino

Tesis doctoral presentada por:

Ingeniera Agrónoma Julieta Pesqueira

Dirigida por:

Dra. Anna García Ortola

Dr. Oscar Adolfo Ruíz

2008

Dña. Anna Garcia Ortolà, Dra. en Ciencias Biológicas, Profesora Titular de la Universidad Politécnica de Valencia y D. Oscar Adolfo Ruíz, Dr. de la Universidad de Buenos Aires (UBA-Argentina), Profesor de la Universidad Nacional de General San Martín (UNSAM-Argentina) e Investigador Independiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET- Argentina)

CERTIFICAN:

Que la memoria titulada "*Cambios bioquímicos, morfológicos y ecofisiológicos en plantas del género Lotus bajo estrés salino*" presentada por Dña. Julieta Pesqueira para optar al grado de Doctor Ingeniero Agrónomo ha sido realizada bajo su dirección.

Y para que así conste a todos los efectos y a petición de la persona interesada, se expide el presente certificado en Valencia, Noviembre del año dos mil ocho.

Anna Garcia Ortolà



Oscar Adolfo Ruíz

Agradecimientos

A mis Directores de Tesis.

Al Instituto Tecnológico de Chascomús, especialmente a la UB1 y a la UB3.

Al Proyecto Lotassa.

A la Universidad Politécnica de Valencia.

A la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Lomas de Zamora.

A mi Familia.

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS	14
RESUMEN	16
RESUM	18
ABSTRACT	20
INTRODUCCION	
1. Justificación y Objetivos.....	23
1.1. Objetivos Generales.....	24
1.2. Objetivos Específicos.....	24
2. Salinidad edáfica.....	25
2.1. Características químicas de un suelo salino.....	26
2.2. Descripción del ambiente salino de la Pampa Deprimida.....	27
2.3. Introducción del <i>Lotus tenuis</i> como leguminosa forrajera en la Cuenca del Salado.....	28
3. Salinidad en plantas.....	29
3.1. Agua, componente predominante de los organismos.....	30
3.1.1. Movimiento del agua en la planta.....	31
3.1.2. Ajuste osmótico.....	33
3.2. Morfología y Anatomía Radical.....	34
3.2.1. Cambios morfológicos y anatómicos de la raíz inducidos por salinidad.....	36
3.3. Transporte de solutos desde la raíz a la parte aérea.....	37
3.3.1. Transporte de Na ⁺ y Cl ⁻ en la planta.....	38
3.3.1.1. Homeostasis iónica.....	39
3.3.1.2. Regulación de la exclusión de cloruro.....	41
3.3.2. Compartimentalización en la vacuola.....	42
3.4. Síntesis de solutos compatibles.....	43
3.4.1. Prolina.....	44
3.5. Poliaminas.....	45
3.6. Antioxidantes.....	47
3.7. Evidencias de los Efectos Tóxicos de la Sal	47
3.7.1. Fotosíntesis y Respiración: alteración enzimática.....	48

3.7.2. Alteración de las membranas y efecto protector del Ca ²⁺	49
4. Sensores y respuestas del estrés salino a nivel celular.....	50
5. Tolerancia a estrés salino.....	52
5.1. Choque osmótico y Aclimatación.....	53
5.2. Variación genotípica y poblacional en la tolerancia a estrés salino	55
6. Género <i>Lotus</i> y <i>Lotus tenuis</i>	57
6.1. Especies modelo del género <i>Lotus</i>	58
6.2. <i>Lotus creticus</i> , especie nativa de la Costa del Mar Mediterráneo..	59

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material vegetal.....	61
2. Escarificación de las semillas y siembra.....	61
3. Condiciones de cultivo.....	62
3.1. Invernadero.....	62
3.2. Cámara de cultivo.....	63
4. Producción y mantenimiento de las plantas madres.....	63
5. Clonación o “Nodal cuttings”.....	63
6. Diseño experimental.....	64
6.1. Estrés salino en clones de <i>L. tenuis</i>	64
6.1.1. Shock osmótico por elevadas concentraciones de NaCl. Evaluación de la supervivencia.....	64
6.1.2. Respuesta a niveles moderados de NaCl.....	65
6.2. Respuesta a niveles moderados de salinidad en plantas del género <i>Lotus</i>	66
6.3. Respuesta a la aclimatación salina en plantas del género <i>Lotus</i>	66
7. Procesamiento de las muestras.....	68
8. Procedimientos analíticos.....	68
8.1. Parámetros de crecimiento.....	68
8.2. Relaciones hídricas.....	68
8.2.1. Potencial hídrico.....	68
8.2.2. Potencial osmótico.....	69
8.2.3. Presión de turgencia.....	69

8.3. Cationes ($\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Ca}^{2+}$).....	70
8.4. Cloruros.....	70
8.5. Prolina.....	71
8.6. Poliaminas.....	71
8.7. Carbohidratos.....	72
8.7.1. Obtención del extracto.....	72
8.7.2. Determinación de azúcares solubles totales y almidón.....	72
8.7.3. Determinación de sacarosa.....	73
8.8. Clorofilas y Carotenoides.....	74
8.9. Proteínas y perfil proteico.....	74
8.9.1. Extracción y cuantificación proteica.....	74
8.9.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida en SDS.....	75
8.10. Actividad carboxilasa del enzima ribulosa bifosfato.....	76
9. Análisis estadístico.....	77

RESULTADOS

I. EVALUACIÓN DE LA VARIABILIDAD EN LA TOLERANCIA A ESTRÉS SALINO Y LAS RESPUESTAS ASOCIADAS, EN GENOTIPOS DE UNA VARIEDAD COMERCIAL DE *LOTUS TENUIS*

1. Selección de genotipos ante la exposición a 300mM de NaCl.....	79
2. Evaluación de la tolerancia a 150mM de NaCl en los genotipos que resultaron contrastantes.....	80
2.1. Parámetros de crecimiento.....	81
2.2. Parámetros bioquímicos.....	83
2.2.1. Solutos inorgánicos.....	83
2.2.2. Solutos orgánicos.....	85
2.2.2.1. Prolina.....	85
2.2.2.2. Carbohidratos.....	85
2.2.2.3. Poliaminas.....	88
3. Discusión.....	90
4. Conclusión.....	93

II. RESPUESTA A NIVELES MODERADOS DE SALINIDAD EN PLANTAS DEL GÉNERO *LOTUS*

1. Parámetros de crecimiento.....	95
-----------------------------------	----

2. Parámetros hídricos.....	101
3. Parámetros bioquímicos.....	104
3.1. Solutos inorgánicos.....	104
3.2. Solutos orgánicos.....	107
3.2.1. Contenido de carbohidratos.....	107
3.2.2. Contenido de clorofilas y carotenoides.....	109
3.2.3. Contenido de proteínas y perfil proteico.....	111
3.3. Actividad carboxilasa de la enzima Rubisco.....	113
4. Discusión.....	114
5. Conclusión.....	119
III. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA A ESTRÉS SALINO POR	
ACLIMATACIÓN EN DIFERENTES POBLACIONES DE <i>LOTUS</i>	
<i>TENUIS</i> Y EN OTRAS ESPECIES DEL GÉNERO <i>LOTUS</i>	
1. Respuestas al estrés salino por aclimatación de diferentes	
accesiones de <i>L. tenuis</i>	122
1.1. Parámetros morfológicos y de crecimiento.....	122
1.2. Parámetros bioquímicos.....	127
1.2.1. Solutos inorgánicos.....	127
1.2.2. Solutos orgánicos.....	131
2. Respuestas al estrés salino por aclimatación de otras especies del	
género (<i>L. japonicus</i> , <i>L. burtii</i> , <i>L. filicaulis</i> , <i>L. creticus</i> y <i>L.</i>	
<i>corniculatus</i>).....	133
2.1. Parámetros morfológicos y de crecimiento.....	133
2.2. Parámetros bioquímicos.....	137
2.2.1. Solutos inorgánicos.....	137
2.2.2. Solutos orgánicos.....	143
3. Discusión.....	145
4. Conclusión.....	151
CONCLUSIONES GENERALES.....	153
BIBLIOGRAFÍA.....	156

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Cambios en el contenido de Na ⁺ , K ⁺ y Ca ²⁺ de genotipos de una población de <i>L. tenuis</i> , expuestos durante 19 días a 150mM de NaCl.	84
Tabla 2: Pesos frescos (PF) y secos (PS) de la parte aérea (A) y radical (R) de plantas control y plantas expuestas a 150mM NaCl	100
Tabla 3: Porcentaje con respecto al control del peso seco de la parte aérea (PSA) y de la raíz (PSR) de plantas expuestas a 150mM de NaCl durante 15 días. Relación entre los pesos secos de la parte aérea y de la raíz (A/R) de las plantas control y de las plantas tratadas.	100
Tabla 4: Porcentaje de peso seco sobre el peso fresco total de plantas control y de plantas expuestas a 150mM de NaCl.	101
Tabla 5: Cambios en el contenido de Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺ y Cl ⁻ en parte aérea y en la raíz de especies pertenecientes al género <i>Lotus</i> , expuestas durante 15 días a 150mM de NaCl.....	105
Tabla 6: Correlaciones, según Pearson, entre las variables diámetro del tallo principal (DT), tallos y ramificaciones por planta (TR), y área foliar de la cuarta hoja verdadera (AF), y el peso fresco aéreo total (PFAT) de plantas control y tratadas con NaCl, a los 35 días de ensayo.....	125
Tabla 7: Contenido en Cl ⁻ (μmol g ⁻¹ PS), en hojas de plantas control y tratadas con NaCl, a los 35 días de ensayo	131
Tabla 8: Contenido de poliaminas libres (ηmol g ⁻¹ PF) en hojas de plantas control y tratadas con NaCl, de distintas poblaciones de <i>L. tenuis</i> , a los 35 días de ensayo.....	133
Tabla 9: Contenido de Cl ⁻ (μmol g ⁻¹ PS) en hojas de plantas control y tratadas con NaCl a los 35 días de ensayo	140
Tabla 10: Contenido de poliaminas libres (ηmol g ⁻¹ PF) en hojas de plantas control y tratadas con NaCl, de distintas especies del género <i>Lotus</i> , a los 35 días de ensayo	145

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ubicación de las especies forrajeras en la Cuenca del Río Salado según topografía y tipo de suelo.....	28
Figura 2: Corte transversal de una raíz.....	32
Figura 3: Esquema del tejido radical.....	35
Figura 4: Pasos en la señalización de la homeostasis iónica bajo estrés salino en <i>Arabidopsis</i>	51
Figura 5: Modelo bifásico de crecimiento de Munns y Teeremat.....	55
Figura 6: Esquema de clonado de <i>Lotus</i> sp. según la técnica descrita por Mujica y Rumi (1998).....	64
Figura 7: Gráfico de frecuencia de genotipos en función del promedio en días de supervivencia a 300mM de NaCl.....	80
Figura 8: Incremento en peso seco relativo diario ($\text{mg mg}^{-1} \text{ día}^{-1}$) de la parte aérea de diez genotipos bajo condiciones control (A) y expuestos a 150mM de NaCl durante 26 días (B).	81
Figura 9: Evolución del peso seco aéreo de diferentes genotipos de una población de <i>L. tenuis</i> expuesta a 150mM de NaCl durante 26 días.....	83
Figura 10: Contenido de prolina (μmoles por gramo de peso fresco) en la parte aérea de clones de <i>L. tenuis</i> a los 19 días de exposición a 150mM de NaCl.....	85
Figura 11: Cambios en el porcentaje de azúcares solubles totales en la parte aérea y en la raíz de clones de <i>L. tenuis</i> , expuestos durante 19 días a 150mM de NaCl.....	86
Figura 12: Cambios en el porcentaje de sacarosa en la parte aérea (A) y en la raíz (B) de clones de <i>L. tenuis</i> , expuestos durante 19 días a 150mM de NaCl	87
Figura 13: Cambios en el porcentaje de almidón en la parte aérea (A) y en la raíz (B) de clones de <i>L. tenuis</i> , expuestos durante 19 días a 150mM de NaCl	88
Figura 14: Contenido de Poliaminas libres ($\eta\text{moles g}^{-1}$ PF): putrescina, espermidina y espermina en clones correspondientes a cinco genotipos de <i>L. tenuis</i> a los 19 días de exposición a 150mM de	

NaCl.....	89
Figura 15: Longitud del tallo principal (A) y longitud media de entrenudos (B) de plantas del género <i>Lotus</i> expuestas durante 15 días a 150mM de NaCl, comparadas con sus respectivos controles	97
Figura 16: Número de flores por planta en las especies <i>L. burtii</i> y <i>L. japonicus</i> MG20 tras 15 días de exposición a 150mM de NaCl, comparadas con sus respectivos controles	97
Figura 17: Potencial hídrico de plantas del género <i>Lotus</i> expuestas durante 15 días a 150mM NaCl y sus respectivos controles.....	102
Figura 18: Potencial osmótico foliar de plantas del género <i>Lotus</i> , control y tratadas con 150 mM de NaCl	103
Figura 19: Presión de turgencia calculada en la parte aérea de plantas del género <i>Lotus</i> tratadas con 150mM de NaCl, durante 15 días, y en sus respectivos controles	104
Figura 20: Contenido de azúcares solubles (A), almidón (B) y sacarosa (C), expresado como % sobre el peso seco de la parte aérea de plantas del género <i>Lotus</i> tratadas con 150 mM de NaCl	108
Figura 21: Contenido foliar de clorofila <i>a</i> (A), clorofila <i>b</i> (B) y relación clorofila <i>a</i> : clorofila <i>b</i> (C) de plantas del género <i>Lotus</i> tratadas con 150 mM de NaCl	110
Figura 22: Concentración de carotenoides en hojas de diferentes especies del género <i>Lotus</i> expuestas a 150mM de NaCl durante 15 días.....	111
Figura 23: Contenido de proteínas solubles totales (expresado en mg g ⁻¹ PF) en la parte aérea de plantas del género <i>Lotus</i> , expuestas durante 15 días a 150mM de NaCl y sus respectivos controles.....	112
Figura 24: Perfiles proteícos de extractos de la parte aérea de plantas de distintas especies del género <i>Lotus</i> expuestas a condiciones de salinidad, y sus respectivos controles.....	112
Figura 25: Actividad carboxilasa de la enzima Rubisco en plantas del género <i>Lotus</i> expuestas a 150mM de NaCl	113
Figura 26: Diámetro del tallo principal (A), número de tallos y	

ramificaciones por planta (B), y área foliar de la cuarta hoja verdadera (C) de plantas control y tratadas con NaCl a los 35 días del ensayo	124
Figura 27: Peso seco de la parte aérea (PSPA) de plantas de diferentes poblaciones de <i>L. tenuis</i> tratadas durante 35 días con solución salina impuesta por aclimatación, y sus respectivos controles	126
Figura 28: Relación entre el porcentaje de peso seco de la parte aérea de plantas tratadas con NaCl (% del control) y el peso seco en gramos de los controles, en diferentes poblaciones de <i>L. tenuis</i> ...	126
Figura 29: Contenido de Na ⁺ , K ⁺ y Ca ²⁺ , expresado en mg g ⁻¹ PS, en hojas de plantas controles y salinizadas a los 35 días de ensayo.....	128
Figura 30: Relación entre el peso seco aéreo y el contenido de Na ⁺ en hojas de plantas expuestas a estrés salino por aclimatación.....	129
Figura 31: Relación entre el peso seco de la parte aérea de plantas expuestas a salinidad por aclimatación (% del control) y el contenido de Na ⁺ en hojas (mg g ⁻¹ PS).....	129
Figura 32: Relación entre el peso seco de la parte aérea de plantas expuestas a salinidad por aclimatación (% del control) y la relación K ⁺ /Na ⁺ en hojas (mg Na ⁺ g ⁻¹ PS).....	130
Figura 33: Relación entre el peso seco de la parte aérea de plantas expuestas a salinidad por aclimatación (% del control) y el contenido de Ca ²⁺ en hojas (mg g ⁻¹ PS).....	130
Figura 34: Contenido de prolina (μmol g ⁻¹ PF), de plantas controles y tratadas con NaCl durante 35 días	132
Figura 35: Peso seco de la parte aérea de especies del género <i>Lotus</i> al cabo de 35 días de crecimiento bajo condiciones salinas, y sus respectivos controles	134
Figura 36: Peso seco de las hojas y del tallo de especies del género <i>Lotus</i> al cabo de 35 días de tratamiento con solución salina.....	135
Figura 37: Tallos y ramificaciones por planta, Diámetro del tallo principal y Área foliar de la cuarta hoja verdadera de plantas controles y plantas bajo estrés salino a los 35 días de ensayo.....	136

Figura 38: Contenido de Na ⁺ (A), K ⁺ (B) y Ca ²⁺ (C) en hojas de plantas control y tratadas con NaCl, a los 35 días del ensayo	138
Figura 39: Relación entre el peso seco (% del control) de la parte aérea de plantas expuestas a salinidad por aclimatación y las relaciones K ⁺ /Na ⁺ y Ca ²⁺ /Na ⁺ en hojas.....	139
Figura 40: Contenido de Na ⁺ , K ⁺ y Ca ²⁺ en hojas apicales y basales de plantas a los 35 días de tratamiento con NaCl por aclimatación.....	141
Figura 41: Correlación entre el peso seco de la parte aérea de plantas del género <i>Lotus</i> expuestas a salinidad por aclimatación (% del control) y la relación entre K ⁺ /Na ⁺ en hojas apicales.....	142
Figura 42: Contenido de Cl ⁻ en hojas apicales y basales de plantas a los 35 días de tratamiento con NaCl por aclimatación.....	143
Figura 43: Aumento en la concentración de prolina a los 35 días de exposición a estrés salino por aclimatación en distintas especies del género <i>Lotus</i>	144
Figura 44: Contenido de espermidina, expresado como $\eta\text{mol g}^{-1}$ PF, en hojas de plantas tratadas por aclimatación con NaCl durante 35 días.....	145

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Foto 1: Registro de humedad relativa y temperatura en el invernadero de la Universidad de Valencia.....	62
Foto 2: Cámara de cultivo con control de temperatura, humedad relativa, intensidad lumínica y fotoperíodo.....	63
Foto 3: Plántulas de <i>Lotus japonicus</i> ecotipo MG20 con dos hojas verdaderas, momento en el cual se inició la aclimatación salina...	67
Foto 4: Cámara de Scholander utilizada para la determinación del potencial hídrico.....	69
Foto 5: Espectrofotómetro y curva de calibración para la determinación de azúcares totales y de almidón.....	73
Foto 6: Contrastes de caracteres morfológicos entre genotipos de la misma población.....	79
Foto 7: Población ARLG12 a los 35 días de tratamiento salino comparado con su respectivo control.....	122
Foto 8: Cambios en la anatomía foliar de plantas de <i>L. tenuis</i> ARLG12 expuestas a 150mM de NaCl por aclimatación a los 35 días de tratamiento.....	123

ABREVIATURAS

A	parte aérea
ABA	ácido abscísico
ADC	arginina descarboxilasa
ADN	ácido desoxirribonucleico
AF	área foliar de la cuarta hoja verdadera
ANOVA	analysis of variance
AQP	acuaporina
ARN_m	ácido ribonucleico mensajero
ATP	adenosina trifosfato
BSA	albúmina sérica bovina (del inglés <i>bovine seric albumine</i>)
DS	desviación estándar
DT	diámetro del tallo principal
HKT	transportadores de alta afinidad por el K ⁺ (del inglés <i>High affinity K⁺ Transporter</i>)
HPLC	(del inglés <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IPR_{diario}	incremento en peso seco relativo diario
KIR	canales rectificadores de la entrada de K ⁺ (del inglés <i>K⁺ Inward Rectifying channel</i>)
KOR	canales rectificadores de la liberación de K ⁺ (del inglés <i>K⁺ Outward Rectifying channel</i>)
LEA	proteínas abundantes en la embriogénesis tardía (del inglés <i>late embryogenesis abundant proteins</i>)
LSD-test	(del inglés <i>Least Significance Difference test</i>)
MAPK	(del inglés <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
µg	microgramo
mg	miligramo
min	minuto
µL	microlitro
µM	micromolar
mM	milimolar
µmol	micromol

MP	membrana plasmática
MPa	mega Pascal
NaCl	cloruro de sodio
NHX1	Na ⁺ /H ⁺ exchanger
NSC	canales no selectivos de cationes (del inglés <i>Non Selective Channel</i>)
P	presión de turgencia
PCA	ácido perclórico
PEPC	fosfoenolpiruvato carboxilasa
PF	peso fresco
PFAT	peso fresco aéreo total
POPOP	2,2-para-fenilen-bis(5-feniloxazol)
PPO	2,5-difeniloxazol
PS	peso seco
PSAT	peso seco aéreo total
PSPA	peso seco de la parte aérea
PUT	putrescina
QUAC	canales aniónicos de conductancia rápida (del inglés <i>QUick Anion Conductance</i>)
R	raíz
ROS	especies reactivas del oxígeno (del inglés <i>reactive oxygen species</i>)
RubisCO	Ribulosa bifosfato Carboxilasa/Oxigenasa
S	sensible
SDS	(del inglés <i>sodium dodecyl sulfates</i>)
SLAC	canales aniónicos de conductancia lenta (del inglés <i>SLow Anion Conductance</i>)
SOS	(del inglés <i>Salt Overly Sensitive</i>)
SPD	espermidina
SPM	espermina
T	tolerante
TR	tallos y ramificaciones por planta
ψ_a	potencial hídrico
ψ_s	potencial osmótico

RESUMEN

En la Pampa deprimida de la Provincia de Buenos Aires se ubica una de las principales zonas de cría de ganado vacuno, en la cual existen problemas de salinidad y alcalinidad en las partes más bajas. Allí se encuentra *Lotus tenuis* como especie herbácea naturalizada y muy valorada por su aporte a la oferta forrajera de los sistemas ganaderos de la región. Existe la necesidad de incrementar la producción de especies forrajeras adaptadas a condiciones edáficas cada vez más estresantes.

En este sentido, en este trabajo se destacó la búsqueda, caracterización y selección de germoplasma productivo de *Lotus tenuis*, ya adaptado a dichas áreas marginales. Específicamente se evaluó la respuesta a estrés salino impuesto por shock y por aclimatación en dos estadíos de la etapa vegetativa, contemplando los cambios morfo-fisiológicos y bioquímicos resultantes. Se identificaron y seleccionaron individuos de una población con variabilidad en la tolerancia al estrés salino y se incrementó la búsqueda de recursos genéticos, incluyendo en las evaluaciones a distintas especies del género *Lotus* (las especies *L. corniculatus* y *L. creticus*, y especies consideradas modelo: *Lotus japonicus* MG20, *Lotus japonicus* Gifu, *Lotus filicaulis*, *Lotus burtii*), a varias poblaciones naturales de *L. tenuis*, y a tres variedades comerciales de *L. tenuis*, con el fin de ser utilizadas en un futuro en los programas de mejora.

En ninguna de las especies evaluadas y en ninguno de los dos estados fenológicos estudiados, la salinidad provocó la muerte de las plantas. Las mayores disminuciones de peso fresco y de peso seco se detectaron cuando los tratamientos salinos se aplicaron en plantas de temprana edad (dos hojas verdaderas). Los parámetros de crecimiento que explicaron dicha disminución fueron, principalmente la disminución de la cantidad de tallos y ramificaciones por planta, y el diámetro del tallo principal. El área foliar bajo condiciones salinas sólo disminuyó en dos poblaciones de *L. tenuis*, de las 19 evaluadas, y en la especie modelo *L. japonicus* MG20. Las poblaciones control de *L. tenuis* que más crecieron fueron las que mayormente inhibieron su crecimiento en el tratamiento salino.

Tanto en plántulas como en plantas adultas, el tratamiento salino (hasta 150mM de NaCl) provocó incrementos en las concentraciones de Na⁺ y de Cl⁻ de la parte aérea de las plantas. También se observó que las hojas basales acumularon más Na⁺ y Cl⁻ que las apicales; y la relación K⁺/Na⁺ resultante en las hojas apicales se correlacionó positivamente con la acumulación de materia seca bajo condiciones de estrés salino. En general, las poblaciones de *L. tenuis* acumularon más cloruros que las especies consideradas modelo y menos que *L. corniculatus*; mientras que *L. creticus* fue una de las especies que más Na⁺ acumuló en las hojas. El estrés salino indujo la acumulación de prolina en la parte aérea, y junto con la acumulación iónica, se relacionó con una disminución del potencial osmótico de todas las especies. Asimismo, la salinidad alteró el contenido de poliaminas. A pesar de ello, ninguno de estos cambios en los solutos orgánicos cuantificados reflejó claramente una respuesta de tolerancia al estrés salino impuesto.

Los resultados obtenidos en diversos parámetros analizados (potencial hídrico, niveles de pigmentos fotosintéticos, niveles de carbohidratos, niveles de proteínas y actividad carboxilasa del enzima Rubisco) revelaron una variabilidad en la respuesta tanto intra como interespecie en respuesta a la salinidad. Dicha variabilidad permitió seleccionar individuos dentro de la especie *L. tenuis* con buen comportamiento tanto en condiciones óptimas como bajo estrés salino.

RESUM

En la Pampa deprimida de la Província de Buenos Aires se situa una de les principals zones de cria de bestiar boví, en la qual existeixen problemes de salinitat i alcalinitat en les parts més baixes. Allí es troba *Lotus tenuis* com a espècie herbàcia naturalitzada i molt valorada per la seva aportació a l'oferta d'espècies de pastura dels sistemes ramaders de la regió. Existeix la necessitat d'incrementar la producció d'espècies vegetals de pastura adaptades a condicions edàfiques cada vegada més estressants.

En aquest treball ens proposarem la recerca, caracterització i selecció de germoplasma productiu de *Lotus tenuis*, ja adaptat a aquestes àrees marginals. Específicament, es va avaluar la resposta a estrès salí impost per xoc i per aclimatació en dos estadis de l'etapa vegetativa, contemplant els canvis morfofisiològics i bioquímics resultants. Es van identificar i seleccionar individus d'una població amb variabilitat en la tolerància a l'estrès salí i es va incrementar la recerca de recursos genètics, incloent en les avaluacions a diferents espècies del gènere *Lotus* (les espècies *L. corniculatus* i *L. creticus*, i espècies considerades model: *Lotus japonicus* MG20, *Lotus japonicus* Gifu, *Lotus filicaulis*, *Lotus burtilii*), a diverses poblacions naturals de *L. tenuis*, i a tres varietats comercials de *L. tenuis*, amb la finalitat de ser utilitzades en un futur en els programes de millora .

En cap de les espècies avaluades i en cap dels dos estats fenològics estudiats, la salinitat va provocar la mort de les plantes. Les majors disminucions de pes fresc i de pes sec es van detectar quan els tractaments salins es van aplicar en plantes d'edat primerenca (dues fulles veritables). Els paràmetres de creixement que van explicar aquesta disminució van ser, principalment la disminució de la quantitat de tiges i ramificacions per planta, i el diàmetre de la tija principal. L'àrea foliar sota condicions salines només va disminuir en dues poblacions de *L. tenuis*, de les 19 avaluades, i en l'espècie model *L. japonicus* MG20. Les poblacions control de *L. tenuis* que més van créixer van ser les que majorment van inhibir el seu creixement en el tractament salí.

Tant en plàntules com en plantes adultes, el tractament salí (fins a 150 mM de NaCl) va provocar increments en les concentracions de Na^+ i de Cl^- de la part aèria de les plantes. També es va observar que en les fulles basals es van acumular més Na^+ i Cl^- que en les apicals; i la relació K^+/Na^+ resultant en les fulles apicals es va correlacionar positivament amb l'acumulació de matèria seca sota condicions d'estrès salí. En general, les poblacions de *L. tenuis* van acumular més clorurs que les espècies considerades model i menys que *L. corniculatus*; mentre que *L. creticus* va ser una de les espècies que més Na^+ va acumular en les fulles. L'estrès salí va induir l'acumulació de prolina en la part aèria, i juntament amb l'acumulació iònica, es va relacionar amb una disminució del potencial osmòtic en totes les espècies. Així mateix, la salinitat va alterar el contingut de poliamines. A pesar d'això, cap d'aquests canvis quantificats van reflectir clarament una resposta de tolerància a l'estrès salí impost.

Els resultats obtinguts en diversos paràmetres analitzats (potencial hídric, nivells de pigments fotosintètics, nivells de carbohidrats, nivells de proteïnes i activitat carboxilasa de l'enzim Rubisco) van revelar una variabilitat en la resposta tant intra com interespècie en resposta a la salinitat. Aquesta variabilitat va permetre seleccionar individus dintre de l'espècie *L. tenuis* amb bon comportament tant en condicions òptimes com sota estrès salí.

ABSTRACT

Lotus tenuis is an herbaceous legume naturalized in saline - alkaline lowlands in the Salado River Basin, highly valuable because of its contribution to the forage offer in the region systems. Nowadays, it's necessary to increase pastures productivity, specially those which are already adapted to marginal areas with stressful soil conditions.

With this aim we have searched, characterized and selected for productive germplasm of *Lotus tenuis* already adapted to saline conditions. Specifically, we evaluated the response to salt stress, imposed either by shock or by acclimatizing, in two vegetative stages by monitoring morphophysiological and biochemical changes. We also identified and selected for individuals among a population with high variability in the salt stress tolerance. In order to increase the genetic resources, we included different species from the *Lotus* genus (*Lotus corniculatus*, *Lotus creticus* and four model species: *Lotus japonicus* MG20, *Lotus japonicus* Gifu, *Lotus filicaulis*, *Lotus burtii*), natural *L. tenuis* populations, as well as three commercial varieties of the forage legume with the aim of using them in future breeding program.

Salt stress did not result in plant death in any of the different species and vegetative stages evaluated, but decreased both fresh and dry weight, especially in young plants. The growth parameters that account for the reduced weight were the number of stems and branching points per plant, and main stem diameter. Total leaf area under salt stress conditions only diminished in two out of the 19 *L. tenuis* populations under study and in the model species *L. japonicus* MG20. The *L. tenuis* populations with the largest growth under control conditions were the ones that experienced the highest inhibition of growth when exposed to salt stress.

In plantlets, as well as in adult plants, saline treatments (up to 150 mM NaCl) caused increased concentrations of Na⁺ and Cl⁻ in their aerial parts. We also observed that basal leaves accumulated more Na⁺ and Cl⁻ than the apical ones, and that the resultant K⁺/Na⁺ ratio in the apical tissues were positively correlated with dry matter accumulation under salt conditions. In general, *L. tenuis* populations accumulated more Cl⁻ than model species and less than *L. corniculatus*, while *L. creticus* was one of the species with more Na⁺

accumulated in the leaves. Salt stress also induced proline accumulation in the shoots and, together with ion accumulation, was correlated with lower osmotic potentials in all species. Polyamine concentration was also altered when plants were exposed to salt. However, none of these quantitative organic changes have reflected a clear salt tolerance response to salinity.

Nevertheless, the analysis of the different parameters (water potential, photosynthetic pigment levels, carbohydrate and protein levels, Rubisco carboxylase activity) revealed intra and interspecific variability in the response to increased salinity tolerance which allowed for the selection of individuals of the *L. tenuis* species with good performance under both control and high salt conditions.

INTRODUCCION

1. Justificación y Objetivos

En Argentina, la base de alimentación en la producción de carne vacuna es típicamente pastoril. Existen zonas que presentan condiciones para la implantación de pasturas de alta producción, y otras zonas en las que se utiliza el campo natural, gracias a la existencia de especies nativas y naturalizadas de alto valor forrajero.

En la Pampa Deprimida de la Provincia de Buenos Aires se ubica una de las principales zonas de cría de ganado vacuno, en la cual existen problemas de salinidad y alcalinidad en las partes más bajas, conocidas como “bajos salinos-alcalinos”. La creciente expansión agrícola en áreas no tradicionales, ocupadas históricamente por la explotación ganadera, invadió los mejores suelos de esta zona, creando la necesidad de incrementar la producción de especies forrajeras que se adapten a condiciones edáficas cada vez más estresantes.

Algunas especies perennes del género *Lotus* L. (Leguminosae: Papilionoideae: Loteae), entre ellas *Lotus corniculatus* L., *Lotus tenuis* Waldst. y Kit (*Lotus glaber* Mill.), *Lotus uliginosus* Schkuhr., y *Lotus subbiflorus* Lag., constituyen una importante fuente forrajera en los países donde son cultivadas o donde ya están naturalizadas (Kirkbride, 1999, 2006; Stenglein *et al.*, 2003). En estos “bajos salinos-alcalinos” de la Pampa Deprimida se encuentra desde hace más de 50 años *Lotus tenuis*, una especie herbácea, naturalizada y muy valorada por su aporte a la oferta forrajera de los sistemas ganaderos de la región (Montes, 1980; Montes, 1988; Stoffella *et al.*, 1998; Vignolio *et al.*, 1999). Por ser una especie alógama y presentar una importante variabilidad morfo-fisiológica, puede suponerse que, durante este proceso de naturalización, se han generado ecotipos con diferente aptitud frente a las variadas presiones de selección que existen en esta región. La alcalinidad y salinidad edáfica, los pulsos de inundación, las sequías estivales, el pastoreo continuo, los inviernos fríos, las quemadas recurrentes, pueden ser algunos de los factores responsables de la selección natural de los materiales más resistentes.

Se ha comprobado que la mayoría de las poblaciones, de especies nativas o naturalizadas, contienen abundante variabilidad genética. La cantidad

de esa variación depende del tipo y la intensidad de selección que los materiales hayan experimentado previamente (Snaydon, 1984). De esta manera, los factores que afectan la supervivencia de las plantas dentro de los sistemas ganaderos, tienen una marcada influencia sobre los niveles de variabilidad presente dentro de las poblaciones de especies forrajeras. Entre las oportunidades para mejorar la productividad de estas especies en dichos ambientes, se destacan la búsqueda, la caracterización y la selección de germoplasma productivo y ya adaptado a las áreas marginales descritas.

1.1. Objetivos Generales

Los objetivos generales de este trabajo de tesis fueron evaluar la respuesta a estrés salino de *L. tenuis*, contemplando los cambios morfo-fisiológicos y bioquímicos resultantes; la identificación y selección de individuos de una población con variabilidad en la tolerancia al estrés salino; y el incremento en la búsqueda de recursos genéticos y de herramientas de adaptación al estrés salino en distintas especies del género *Lotus*, y en varias poblaciones de *L. tenuis*, para luego ser utilizadas en los programas de mejoramiento de las especies de interés forrajero.

1.2. Objetivos Específicos

Los objetivos específicos de este trabajo, y de cada uno de los ensayos realizados, se agrupan de la siguiente manera:

- Evaluación de la respuesta a estrés salino en más de 100 genotipos pertenecientes a una variedad comercial de *L. tenuis* y en alrededor de 20 accesiones de la especie, provenientes de un banco de germoplasma.

- Evaluación de la respuesta a estrés salino en varias especies del género *Lotus*, algunas de ellas consideradas “modelo”, con el objetivo de ser utilizada en los programas de secuenciamiento del genoma del género.

- Caracterización del comportamiento de las plantas ante la exposición a altas y a moderadas concentraciones salinas, y a estrés salino por aclimatación.

- Análisis de los parámetros de crecimiento y evaluación de los cambios morfológicos y anatómicos inducidos por la salinidad, con el fin de estudiar los mecanismos involucrados en la respuesta.

- Estudio de las relaciones hídricas.

- Cuantificación de los niveles de diferentes carbohidratos.

- Determinación de los contenidos de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Cl^- .

- Evaluación de los niveles de pigmentos clorofílicos en las hojas.

- Cuantificación y separación electroforética de las proteínas solubles presentes, analizando la cantidad de la enzima RubisCO y su actividad carboxilasa.

- Determinación y cuantificación de compuestos orgánicos tales como poliaminas y prolina.

- Ampliación de la base de datos de una colección activa de *L. tenuis* perteneciente al Banco de Germoplasma de la Estación Experimental del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de Pergamino, Buenos Aires, Argentina.

2. Salinidad edáfica

La salinidad en los suelos afecta aproximadamente el 7% de la superficie terrestre total, lo cual equivale a 930 millones de hectáreas (Szabolcs, 1994). Asimismo, el continuo aumento que sufre el área de tierras afectadas por salinización secundaria causada por actividades antrópicas, es aún más preocupante. Estimaciones recientes afirman que más de 70 millones de hectáreas agrícolas se encuentran afectadas por este problema (FAO, 2005).

En varios países la salinidad es un problema grave dentro de la agricultura y puede convertirse en un tema clave para el desarrollo económico de los mismos. Consecuentemente, frenar el avance de la salinización y desarrollar cultivos tolerantes a salinidad, están considerados como objetivos biotecnológicos importantes a nivel mundial (Flowers *et al.*, 1997; Munns, 2002).

2.1. Características químicas de un suelo salino

Los suelos salinos suelen presentar distintas combinaciones de sales, siendo comunes los cloruros y los sulfatos de Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} ; las cuales son consideradas sales neutras, debido a que no alcalinizan el suelo. Por el contrario, la presencia de carbonato y bicarbonato de Na^+ , causa un incremento del valor del pH edáfico. Suelos halomórficos es el término general para referirse a los suelos formados bajo condiciones de exceso de sales neutras o muy alcalinas. La sodicidad o alcalinización se desarrolla cuando en la solución del suelo existe una concentración elevada de sales sódicas capaces de sufrir hidrólisis alcalina, de tipo carbonato y bicarbonato de sodio.

Pueden distinguirse dos situaciones en cuanto a la acumulación de sales y a los efectos que producen:

- a) altas concentraciones de diferentes sales, incrementan la salinidad, y
- b) altas concentraciones de Na^+ , conducen a un incremento de la sodicidad.

Estos dos conceptos están generalmente relacionados, pero en algunas áreas, sales de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , como así también de SO_4^{2-} , contribuyen sustancialmente a la salinidad. Altas concentraciones de Na^+ no sólo afectan a las plantas directamente, sino que también producen un efecto desintegrador de la estructura del suelo, disminuyendo la porosidad y la permeabilidad del agua.

La salinidad de la solución del suelo o del agua de riego, se cuantifica en términos de conductividad eléctrica o de potencial osmótico.

Cuanto más alta es la concentración salina, mayor es la conductividad y menor el potencial osmótico. Se considera entonces que un suelo es salino cuando el contenido de sales supera el 1,5%, o cuando la conductividad eléctrica es mayor o igual a 4 mmhos.cm^{-1} (Etchevehere, 1976). Es generalmente admitido que para que el sodio juegue un importante papel en la evolución del suelo, es decir, para que se produzca la alcalinización, el porcentaje de Na^+ respecto a los demás cationes adsorbidos, que se denomina porcentaje de sodio intercambiable, debe ser mayor a 15 % (Miaczynski, 1995).

2.2. Descripción del ambiente salino de la Pampa Deprimida

La Pampa Deprimida es una vasta subregión de la Provincia de Buenos Aires (Argentina) que abarca 9.500.000 has. Las condiciones de drenaje restringido, la especial posición topográfica de sus suelos, la baja permeabilidad, la napa freática cercana, sumada a la fuerte salinidad y alcalinidad, han determinado que la principal actividad sea la ganadera, abarcando alrededor del 80 % de su superficie. Es predominante la cría de ganado vacuno, lo cual se realiza fundamentalmente sobre campo natural. La heterogeneidad ambiental que caracteriza a esta zona está dada fundamentalmente por un complejo mosaico de tipo de suelos, que junto a sutiles variaciones de la topografía, determinan diferencias en el régimen de drenaje y en el contenido salino del perfil. Los suelos hidromórficos e hidrohalomórficos de distinta intensidad ocupan aproximadamente un 60 % de la superficie de la Pampa Deprimida (Batista *et al.*, 1988; Collantes *et al.*, 1988; Burkart *et al.*, 1990).

Se denomina toposecuencia a la línea imaginaria que cruza un sector del paisaje desde la parte más alta a la parte más baja; en nuestro caso de estudio se definen tres posiciones: loma, media loma y bajo. En la loma hay mayor entrada de agua y el escurrimiento superficial es escaso; en la media loma hay menos entrada de agua y mayor escurrimiento superficial; y el bajo es una zona de acumulación neta de agua. Estas características hacen que los procesos de formación del suelo sean distintos entre sí y den lugar a diferentes tipos de suelo.

Las limitaciones de los suelos presentes en la Pampa Deprimida, por las cuales no tienen aptitud agrícola, son el pobre drenaje y la moderada a fuerte sodicidad y/o salinidad.

La vegetación dominante en esta zona es la estepa gramínea, modificada por la acción antrópica en los suelos de topografía elevada (lomas y medias lomas). En las depresiones inundables se han instalado *Solanum glaucum* (duraznillo blanco), *Lotus tenuis*, *Menta puligeum* y *Elyonurus* spp. (espartilla), entre otras. En los sectores bajos salobres, se conserva la vegetación natural, representada por *Distichlis spicata* y *Salicornia* spp. (Musto y Maddaloni, 2001).

Las especies forrajeras tienen un variado potencial de producción de acuerdo con los requerimientos en las condiciones edáficas, encontramos especies como festuca alta y raigrás anual que se adaptan a un amplio rango de condiciones edáficas (llamadas especies “plásticas” y otras como lotus, melilotus y agropiro que prefieren los pH neutros a alcalinos (Castaño, 2004; Buján y Debelis, 2005) (Figura 1).

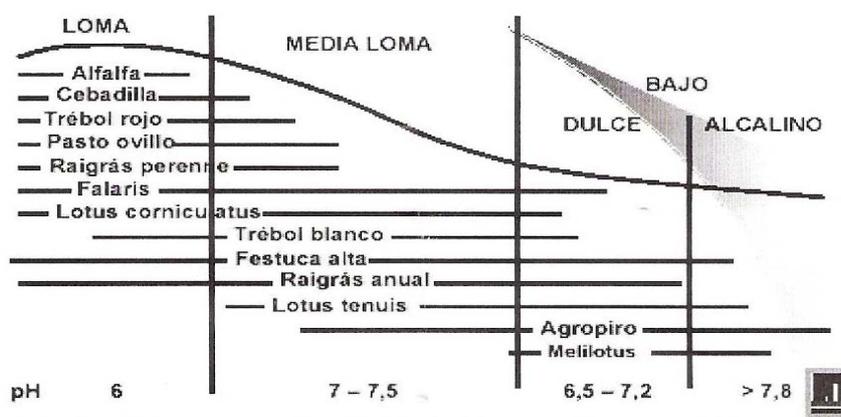


Figura 1: Ubicación de las especies forrajeras en la Cuenca del Río Salado según topografía y tipo de suelo. Fuente: INTA.

2.3. Introducción del *Lotus tenuis* como leguminosa forrajera en la Cuenca del Salado

Hace ya más de 50 años que *Lotus tenuis*, especie originaria de Europa (Williams, 1988), se sembró como forrajera (posiblemente como

impureza en semillas de otra especie del mismo género) en la Depresión del Río Salado. Debido al déficit de leguminosas nativas en los pastizales de esta zona, esta especie representa una alternativa para incrementar la producción y la calidad de las pasturas naturales (León *et al.*, 1979; Miñón *et al.*, 1990). Se difundió espontáneamente, naturalizándose en la región y localizándose con frecuencia en ambientes bajos y anegables. La resistencia al anegamiento que presentan tanto las plantas adultas como las semillas, es una de las posibles causas de su mayor distribución comparada con *Lotus corniculatus*, otra leguminosa forrajera introducida (Vignolio *et al.*, 1994, 1995).

3. Salinidad en plantas

La salinidad es uno de los factores ambientales más importantes que limitan el crecimiento vegetal, ya sea por: a) reducir el potencial hídrico; b) por interferir en la toma de nutrientes, o c) por afectar negativamente la concentración de un ión específico dentro de las células, excediendo su umbral y convirtiéndose en especie tóxica. Generalmente, la respuesta de una planta al estrés salino es una conjunción de estos tres componentes. Cada uno de ellos a su vez, estará condicionado por la especie vegetal, la composición iónica del agua, la luz, la humedad y el estadio de la planta. La tolerancia a salinidad en los vegetales varía entre los sucesivos estados de crecimiento (Bernstein y Hayward, 1958; Pasternak *et al.*, 1995). El primer estadio, durante el cual el cultivo se implanta, se considera particularmente sensible, incluso para cultivos “tolerantes” (Maas y Hoffman, 1977).

La disponibilidad de agua es uno de los factores cruciales que modula el crecimiento de las plantas; el estrés hídrico causado tanto por la sequía como por la salinidad, son factores importantes para la agricultura, ya que impiden que los cultivos desarrollen su potencial genético. El estrés osmótico provocado por el bajo potencial hídrico en el suelo, reduce los rendimientos de una amplia variedad de cultivos en el mundo (Munns, 2002; Willadino y Camara, 2003; Zhu, 2003).

La toxicidad debida a la excesiva absorción de iones cloruro y Na^+ , produce clorosis marginal de la hoja y, con ello, una disminución del área

fotosintética, lo que determina reducciones en la fotosíntesis neta. Otros efectos de la toxicidad de sales son la disminución en la síntesis de proteínas, y con ello se afectan procesos tales como la fotosíntesis y el metabolismo de producción de energía y de lípidos. Esto conduce a un desbalance nutricional que a la vez afecta la absorción y el transporte de otros nutrientes influyendo de esta manera sobre la disponibilidad de los mismos (Hasegawa *et al.*, 2000; Munns, 2002; Parida y Das, 2005).

Las plantas pueden dividirse en dos grandes grupos según su respuesta a altas concentraciones salinas:

a) Halófitas: son aquellas plantas nativas de suelos salinos que son capaces de cumplir todo su ciclo ontogénico en ese ambiente, e incluso tener un mejor desempeño comparado con un control sin contenido de sales;

b) Glicófitas: son aquellas plantas afectadas por la sal e incapaces de resistir determinadas concentraciones salinas como lo hacen las halófitas (Taiz y Zeiger, 1998).

Los vegetales en general, han desarrollado adaptaciones anatómicas y fisiológicas que les permiten sobrevivir y, en el caso de las halófitas, promover un mejor crecimiento bajo condiciones salinas. Algunas especies, que son altamente tolerantes a sal, presentan estimulación del crecimiento a concentraciones de Cl^- varias veces mayores que el umbral letal para especies sensibles (Greenway y Munns, 1980).

La comprensión de los mecanismos bioquímicos y fisiológicos involucrados en las respuestas que exhiben las plantas en condiciones de estrés salino, plantea un desafío de gran importancia. Al estudiar la respuesta de las plantas frente a un estrés ambiental, se reconocen diferentes procesos por los cuales las mismas logran adaptarse y soportar los cambios que ocurren en su entorno.

3.1. Agua, componente predominante de los organismos

El agua constituye entre el 80% y el 90% de la biomasa de los tejidos vegetales. Se encuentra presente en varias formas: como constituyente

del protoplasma; como agua de hidratación asociada con iones; disolviendo sustancias orgánicas y macromoléculas; llenando espacios entre estructuras finas del protoplasma y la pared celular; almacenada en las vacuolas y, finalmente, como agua intersticial, que actúa como medio transportador en los espacios intercelulares y en los tejidos de conducción del xilema y el floema (Taiz y Zeiger, 1998).

El agua en los suelos, en las plantas y en la atmósfera se describe en términos de potencial hídrico, el cual a su vez consta de varios componentes importantes: a) potencial osmótico, el cual está determinado por la concentración de sustancias osmóticamente activas; b) potencial mátrico, el cual describe la capacidad de adsorción a alguna estructura; c) potencial de presión, el cual representa las presiones en exceso que actúan sobre un sistema; y d) potencial gravitacional, el cual indica la fuerza ejercida por la gravedad. Si entre dos compartimentos con diferente potencial hídrico se dispone una membrana semipermeable, el agua se moverá desde el compartimento con alto potencial hídrico al de bajo potencial hídrico. Las diferencias en potencial hídrico permiten la ocurrencia de la homeostasis celular por transporte de agua y otras sustancias (iones, carbohidratos, aminoácidos, etc.) entre células, tejidos y órganos, a favor de dicho gradiente (Salisbury y Ross, 1992; Steudle, 2000).

3.1.1. Movimiento del agua en la planta

El agua en el suelo se moviliza predominantemente por flujo masal. Cuando el agua establece contacto directo con la superficie radical, el movimiento se torna un poco más complejo. El ingreso de agua a la planta ocurre a través de tres vías: a) el apoplasto, b) el simplasto y c) la ruta transcelular. Esta última es definida como el transporte de agua a través del plasmalema y tonoplasto de cada célula sin involucrar plasmodesmos (Figura 2). Cabe acotar que experimentalmente, la vía simplástica y la ruta transcelular no pueden separarse (Salisbury y Ross, 1992; Steudle, 2000).

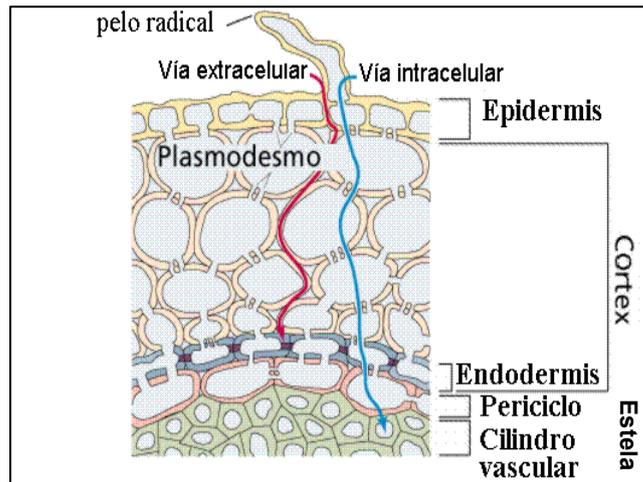


Figura 2: Corte transversal de una raíz.

Fuente: Purves, 1992.

La ósmosis constituye el proceso responsable del transporte de agua por el simplasto de las plantas. A través de una membrana semipermeable como la membrana plasmática y el tonoplasto, el agua difunde a favor de una diferencia de concentración, pero también existen canales que permiten el paso acelerado de agua de un lado a otro de la membrana a favor de un gradiente de presión, y paralelamente, al transporte por difusión.

Las acuaporinas (AQP) son los canales por los que se transporta agua en las células vegetales y juegan un papel dinámico en el mantenimiento de la homeostasis celular bajo condiciones que requieren modificaciones en el flujo de agua. Existen evidencias sobre el papel de las AQP en el mantenimiento de las relaciones hídricas y proveen información sobre su función en la tolerancia a la falta de agua.

Tanto un estrés hídrico como salino requiere cambios en el flujo de agua para permitir a las células y a los tejidos adaptarse a dicha situación. La tasa de flujo del agua dentro y fuera de las células está determinada por el gradiente de potencial hídrico, que actúa como fuerza de conducción para el transporte. Las proteínas AQP facilitan la ósmosis por formación de canales, como alternativa de difusión de agua a través de la membrana celular, incrementando la permeabilidad de ésta. Se ha documentado que existe actividad de estos canales en las células corticales de la raíz, incluyendo la endodermis (Steudle, 2000; Rodríguez-Pérez, 2006).

A consecuencia de un transporte combinado, la conductividad hidráulica de la raíz depende de la fuerza (osmótica y gradiente de presión hidrostática) utilizada para mover el agua a través de las raíces. En presencia de ambas fuerzas, las dos vías (apoplástica y simplástica) serán utilizadas aunque con diferente intensidad. O sea, cuando exista gradiente hidráulico (presión hidrostática), por ejemplo durante la transpiración, el agua circulará por el apoplasto y por el simplasto. En cambio, dominará la vía simplástica cuando lo que predomine sea un gradiente osmótico (Steudle, 2000).

El mecanismo de tensión-cohesión que genera la tensión en el xilema de la raíz, provee la fuerza necesaria para el movimiento de agua a través del cilindro radical y hasta los elementos del xilema, e incluso, hasta la parte aérea. De acuerdo con esta teoría, las plantas que se encuentren transpirando pueden llegar a absorber agua de un suelo casi seco, en presencia de una alta conductividad hidráulica en la raíz, tal cual se explica en el modelo de transporte combinado. Y, por otro lado, cuando la transpiración es limitada o nula, la conductividad hidráulica de la raíz llega a tener valores tan bajos, que impide o limita la pérdida de agua del tejido radical al suelo (Salisbury y Ross, 1992; Steudle, 2000).

3.1.2. Ajuste osmótico

La presencia en exceso de solutos en la solución del suelo produce una disminución del potencial osmótico y, consecuentemente, del potencial hídrico. Por lo tanto, el balance hídrico de la planta en general se encuentra afectado, ya que para mantener un gradiente entre el suelo y las hojas, que permita continuar con la absorción de agua, se debe generar un potencial hídrico mucho más negativo que el de la solución del suelo. Este efecto que generan los solutos disueltos en agua es similar a una falta de agua en el suelo. En ambas situaciones, la respuesta de la mayoría de las plantas es un ajuste osmótico, y de esta manera evitar la pérdida de turgencia, lo cual llevaría a disminuir la extensión celular, que es uno de los componentes del crecimiento tisular (Taiz y Zeiger, 1998).

La osmorregulación, o ajuste osmótico, confiere a las plantas la capacidad de tolerar condiciones de escasez de agua y salinidad elevada, con la expresión de mecanismos adaptativos que evitan la disminución de la fotosíntesis, las alteraciones en la traslocación y la distribución de los fotoasimilados y las pérdidas de rendimiento. Estos hechos tienen trascendencia significativa en el funcionamiento normal de la planta y en la productividad de los cultivos (Rodríguez-Pérez, 2006). El ajuste osmótico es, por definición, aquel mecanismo por el cual la acumulación neta de solutos en respuesta al déficit hídrico le permite a la célula disminuir su potencial osmótico y mantener una relación isotónica entre compartimentos sub-celulares (Zhang *et al.*, 1999).

La presión de turgencia en las plantas es indispensable para el crecimiento celular en expansión y para la apertura estomática. La presencia de sales en el suelo disminuye el potencial hídrico causando un estrés osmótico que lleva a una pérdida de dicha turgencia. Las plantas han desarrollado este mecanismo de ajuste osmótico que les permite mantener la absorción de agua y la presión de turgencia bajo condiciones de estrés. Está basado en la acumulación activa de solutos, utilizando tanto iones tales como Na^+ y K^+ y/o sintetizando solutos orgánicos compatibles, como por ejemplo prolina, betaína, polioles, y azúcares solubles (Blumwald, 2000; Blumwald *et al.*, 2000; Tester y Davenport, 2003; Chinnusamy *et al.*, 2005).

3.2. Morfología y Anatomía Radical

Las plantas, están expuestas a la salinidad a través de la raíz, con lo cual es el órgano que se encuentra en contacto directo con el ambiente salino. El sistema radical constituye la primera barrera al movimiento de agua y solutos dentro de la planta y, como resultado, las concentraciones de iones que llegan al vástago son suficientemente diferentes de aquellas presentes en el medio externo.

Las raíces de la mayoría de las plantas vasculares poseen endodermis, tejido con una estructura impermeable al agua, que se conoce como banda de Caspary, ubicada en las paredes radiales de las células (Figura

3). Hasta el momento sólo se conocen tres especies que no la presentan: *Canarium commune* (*Burseraceae*), *Tinospora crispa* (*Menispermaceae*) y *Nyssa silvatica* (*Cornaceae*) (Mauseth 1988). La suberización y/o lignificación presente en estas células obliga a los iones a ingresar al simplasto. Esto implica procesos de transporte a nivel de la membrana plasmática de las células. A medida que el agua pasa a través de la planta en respuesta a sus gradientes de potencial, las sales son filtradas por membranas biológicas donde son expuestas a una variedad de mecanismos de transporte, tanto activos como pasivos (Shannon *et al.*, 1991).

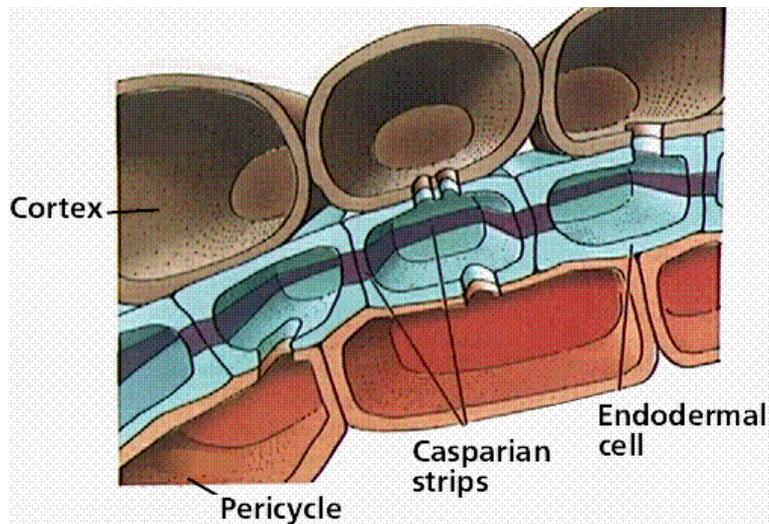


Figura 3: Esquema del tejido radical. Fuente: Purves, 1992.

El agua y los solutos tienen dos formas de moverse desde la solución externa hacia el interior de la raíz. Una es por vía apoplástica (continuación de la solución externa, libre y difusional, cuyas características se ven modificadas por las cargas negativas de la pared celular) y otra es por vía simplástica (intracelular). Durante un estrés, la anatomía del tejido radical cambiará ya que el déficit hídrico induce el desarrollo de barreras apoplásticas para el flujo de agua y nutrientes. Esta formación representa una estrategia adaptativa fundamental de las plantas para sobrevivir en ambientes adversos. Sumado a esto, la conductividad hidráulica de las membranas celulares de la raíz puede reducirse debido al cierre de las acuaporinas presentes en las mismas (Steudle, 2000).

A pesar de que los solutos deben, en principio, pasar a través de células endodérmicas a medida que se mueven desde la corteza radical hacia la estela, hay varias formas en que la integridad de la barrera endodérmica pueda ser violada. Las raíces laterales se desarrollan a partir del periciclo en la estela, y la endodermis se divide permitiendo la elongación de las mismas. El anillo de células en la interfase raíz lateral-endodermis no posee bandas de Caspary, en este lugar el apoplasto de la corteza y de la estela puede ser contínuo. Otra zona permeable puede ser el meristema apical de la raíz donde la diferenciación de varios tipos de células puede no estar completa. Los aspectos cuantitativos de este *continuum* apoplástico no han sido aún establecidos; sin embargo, bajo condiciones salinas, la contribución en la absorción de iones puede ser significativa. Indudablemente, hay procesos adicionales involucrados en la disminución de la concentración iónica en la parte aérea, ya que de otra manera estas imperfecciones en la barrera resultarían en grandes incrementos de Na^+ y Cl^- en las hojas (Shannon *et al.*, 1991; Steudle, 2000).

3.2.1. Cambios morfológicos y anatómicos de la raíz inducidos por salinidad

En las raíces de algunas plantas estresadas con NaCl, la actividad meristemática, particularmente aquella asociada con los tejidos vasculares, puede ser suprimida. Como resultado, el diámetro de la raíz y del cilindro vascular pueden verse reducidos. La inhibición del crecimiento inducida por salinidad puede resultar en un desbalance hormonal. La salinidad estimula el desarrollo de células de la raíz totalmente vacuoladas, tanto en halófitas como en glicófitas. La vacuolación bajo condiciones salinas ocurre cerca del ápice radical. Algunas veces promueve la suberización de la hipodermis y de la endodermis con la formación de una banda de Caspary muy bien desarrollada en una región cercana al ápice radical. Una temprana diferenciación de bandas de Caspary genera una barrera que minimiza el libre influjo de iones a través del apoplasto hacia el xilema radical y finalmente dentro del flujo transpiracional. En raíces de plantas de arveja estresadas con NaCl se observó

que sus células eran más grandes y que las paredes celulares de las mismas eran más gruesas. Estas células contenían cinco veces más cantidad de sustancias de pared celular y dos veces más de proteína que los controles (Shannon *et al.*, 1991).

3.3. Transporte de solutos desde la raíz a la parte aérea

Los efectos iónicos asociados con la salinidad pueden surgir a partir de un aumento en la fuerza iónica del agua del suelo, pero también pueden interferir en los mecanismos normales por los cuales las plantas absorben los nutrientes, cambiando las propiedades físicas de la pared celular y la superficie química cerca de las membranas.

En presencia de bandas de Caspary en la endodermis, los solutos cargados son eficientemente retenidos en la estela, impidiendo la pérdida de los mismos ante un estrés y permitiendo un suficiente suministro al tallo. Por lo tanto, las propiedades de transporte de las raíces están optimizadas, tanto para el agua como para los iones. Las hojas reciben iones del xilema, y la corriente transpiratoria es la responsable de que esto ocurra. El transporte de iones de la raíz al tallo es el producto de la concentración de iones en el xilema y de la tasa transpiratoria (Clarkson *et al.*, 2000; Steudle, 2000; Chen *et al.*, 2002).

Tanto en la parte aérea como en la raíz, el flujo del agua está controlado por los estomas. Estas estructuras foliares representan elementos activos de regulación, dependientes del estado hídrico de la planta y de las señales hormonales enviadas desde la raíz, como por ejemplo el ABA. Cuando los estomas se encuentran cerrados, la cutícula (capa constituida por cutina y ceras) del tallo actuaría como un contenedor de agua o algo similar. En la raíz, la situación es menos clara, ya que no hay estomas y la absorción del agua y de los nutrientes ocurre a través de tejidos no suberizados. Sin embargo, ante una situación de falta de agua, la suberización de los tejidos de la raíz, sumada a una falta de transpiración durante la noche, hacen que se minimice la pérdida de agua. Ante una falta sustancial de agua en el suelo, la absorción ocurriría sólo si la resistencia hidráulica de las raíces fuera muy baja. Sin embargo, bajo estas condiciones, los canales de agua pueden actuar como válvulas

permitiendo incrementar reversiblemente la conductividad hidráulica y así absorber agua en situaciones adversas. Se ha demostrado que las AQP pueden ser activadas por fosforilación, la cual a su vez, está afectada por factores tales como el potencial hídrico, la turgencia, o la concentración de Ca^{2+} en el apoplasto (Johansson *et al.*, 1996; Kjellbom *et al.*, 1999). Cabe destacar que la actividad de estos canales de agua puede ser inhibida por varios factores, entre ellos la salinidad (Clarkson *et al.*, 2000; Steudle, 2000).

3.3.1. Transporte de Na^+ y Cl^- en la planta

La mayor proporción del área radical está representada por los pelos absorbentes, y es a través de la membrana plasmática de dichas células epidérmicas que ocurre la mayor absorción de iones. El catión Na^+ , en particular, presenta dos formas de ingreso a la planta: a) por un sistema de rápida saturación que presenta alta afinidad tanto para el Na^+ como para el K^+ ; y b) por un sistema que no presenta saturación pero que tiene baja afinidad. Debido a la diferencia electronegativa del potencial transmembrana, un aumento en la concentración extracelular de Na^+ establece un gradiente electroquímico a favor del ingreso pasivo del ión al citosol. El Na^+ compite con el K^+ en la absorción a través de co-transportadores $\text{Na}^+ - \text{K}^+$, y puede también bloquear los transportadores específicos de K^+ , resultando en niveles intracelulares tóxicos de Na^+ e insuficientes de K^+ (Apse y Blumwald, 2007).

En la actualidad hay una mayor comprensión de los sistemas de transporte responsables del ingreso de Na^+ en células vegetales; éstos corresponden a los sistemas de transporte de alta y baja afinidad ubicados en la membrana plasmática. Las proteínas integrales de membrana actúan como transportadoras, sufriendo un cambio conformacional durante el transporte del ión. Un tipo de transportador de iones Na^+ y K^+ bastante conocido es el perteneciente a la familia de los HKT (*High affinity K⁺ Transporter*), identificado y evaluado en *Arabidopsis*, arroz y trigo, entre otros. El HKT es un transportador de alta afinidad para K^+ , que funciona también acoplado al Na^+ y contribuye a su ingreso en suelos salinos. En presencia de altas concentraciones de Na, el HKT puede tener más importancia fisiológica en el

transporte de Na^+ que en el de K^+ (Hasegawa *et al.*, 2000; Munns, 2002; Zhu, 2003).

Existen también, múltiples canales que median el transporte de los iones Na^+ y K^+ . A diferencia de los transportadores, los canales conducen rápidamente los iones desde la solución y secretan iones dentro de la corriente xilemática. Los canales monovalentes de cationes se han clasificado en tres grupos, dependiendo de su comportamiento electrofisiológico y de la selectividad iónica: a) los canales rectificadores de la entrada de K^+ (KIR, del inglés: *K⁺ Inward Rectifying Channel*) constituyen la vía para el suministro de K^+ de alta afinidad en las raíces; b) los canales rectificadores de la liberación de K^+ (KOR, del inglés: *K⁺ Outward Rectifying Channel*) son altamente selectivos para la liberación de K^+ en el xilema; y c) los canales no selectivos de cationes (NSC, del inglés: *Non Selective Channel*) son particularmente abundantes en el tonoplasto y tienen baja afinidad selectiva para K^+ y Na^+ , comparada con los otros dos. Estudios recientes han determinado que la entrada de Na^+ a través de los NSC es mucho más alta que por los canales KIR, y sugieren que funcionan como la mejor vía de transporte de Na^+ (Blumwald, 2000; Tester y Davenport, 2003; Apse y Blumwald, 2007).

En general, la absorción de Na^+ es balanceada por el ingreso de Cl^- y la salida de K^+ . La entrada de aniones a través de la membrana plasmática, normalmente requiere un proceso activo de co-transporte con H^+ . Sin embargo, cuando la concentración externa de Cl^- es alta, existen evidencias del ingreso pasivo de Cl^- a las células e incluso al xilema (Tyerman y Skerrett, 1999). En el parénquima xilemático se identificaron dos tipos de canales aniónicos: de conductancia rápida (QUAC, del inglés: *QUick Anion Conductance*) y de conductancia lenta (SLAC, del inglés: *SLow Anion Conductance*) que fueron relacionados con el transporte de Cl^- hacia el xilema (Gilliham y Tester, 2005).

3.3.1.1. Homeostasis iónica

Siempre que en un ambiente salino el ingreso pasivo de Na^+ aumente la concentración del mismo en el citoplasma por encima de un valor crítico, se inicia el proceso homeostático de exclusión de Na^+ del citoplasma.

La homeostasis de las concentraciones iónicas intracelulares es fundamental para el normal desarrollo de las células. Se requiere una correcta regulación del flujo iónico para mantener una baja concentración de iones tóxicos, y una óptima concentración de aquellos que son esenciales. Ante una situación de estrés salino, la regulación de la absorción de K^+ y/o la prevención de entrada de Na^+ , el eflujo de Na^+ de la célula, y la utilización de Na^+ para el ajuste osmótico, son estrategias comunes utilizadas por las plantas, lo cual permite mantener una óptima relación K^+/Na^+ en el citosol. Existen antiportadores Na^+/H^+ en el plasmalemma (e.g. SOS1) y en el tonoplasto (e.g. NHX1, NHX2) que utilizan gradientes de H^+ creados por las H^+ -ATPasas, tanto citoplasmáticas como vacuolares, y por la pirofosfatasa del tonoplasto, los cuales permiten intercambiar H^+ por Na^+ . Esta homeostasis intracelular es importante para la actividad de varias enzimas citosólicas, para mantener el potencial transmembrana y producir un apropiado contenido osmótico con el fin de regular el volumen celular (Serrano y Rodríguez-Navarro, 2001; Zhu, 2003, Parida y Das, 2005; Munns y Tester, 2008).

El Na^+ ingresa a las células de la raíz pasivamente a través de canales y posiblemente a través de transportadores específicos de K^+ (HKT, del inglés: *High affinity K⁺ Transporter*). La restricción al ingreso de Na^+ a las células de la raíz, o bien dentro de la corriente xilemática, es una de las vías para mantener una óptima relación citosólica K^+/Na^+ en plantas expuestas a salinidad. Los niveles óptimos de K^+ dentro de la célula, cuando las plantas se exponen a salinidad, pueden ser mantenidos por activación o expresión de dichos transportadores específicos de K^+ . Si bien éstos transportadores han sido descritos y, mediante la generación de mutantes se ha corroborado su funcionalidad, los pasos de señalización que regulan su actividad deben aún ser entendidos y estudiados con mayor profundidad (Tester y Davenport, 2003; Chinnusamy *et al.*, 2005, Munns y Tester, 2008).

La salida de Na^+ desde las células radicales evita la acumulación de este ión hasta niveles tóxicos y el transporte del mismo hasta la parte aérea. Se identificó el antiportador Na^+/H^+ de la membrana plasmática, SOS1 (del inglés: *Salt Overly Sensitive*), que juega un importante rol en la salida de este catión. La presencia de Na^+ en el ambiente externo, regula los niveles de transcripción

del SOS1, mediante el complejo proteín-kinasa SOS2 y SOS3, a su vez regulado por Ca^{2+} . Es específicamente el SOS3 quien percibe la presencia de Ca^{2+} , ya que constituye una proteína con tres sitios de acople a este catión. La funcionalidad de este transportador es de vital importancia en tejidos meristemáticos, contemplando la imposibilidad de compartimentalizar Na^+ en estas células que aún no tienen la vacuola preparada para tal fin. Sumada a esta vía de regulación, la presencia de ABA en respuesta al estrés osmótico causado por la salinidad, también parece estar regulando la actividad del transportador SOS1 de la membrana plasmática (Blumwald, 2000; Tester y Davenport, 2003; Chinnusamy *et al.*, 2005).

3.3.1.2. Regulación de la exclusión de cloruro

La toxicidad iónica provocada por un estrés salino, comienza cuando las concentraciones de Na^+ y Cl^- dentro de las células radicales sobrepasan los niveles normales y comienzan a translocarse y acumularse en las hojas (Munns, 1993). Mantener bajas concentraciones de Cl^- y Na^+ en la parte aérea, depende principalmente de la capacidad de regular la absorción y el transporte desde las raíces al tallo. Existen reportes que confirman la posibilidad de incrementar la tolerancia a salinidad mediante la selección de genotipos que presenten baja acumulación de Cl^- en los tallos, bajo condiciones estresantes (Rogers *et al.*, 1997).

La combinación de salinidad y anegamiento en el suelo, genera hipoxia en la raíz y, consecuentemente, aumentan las tasas de transporte de Na^+ y Cl^- al tallo, donde se comienzan a acumular hasta alcanzar niveles tóxicos. El exceso de agua en el suelo reduce la disponibilidad de oxígeno en las raíces, lo cual a su vez reduce la producción de ATP. Ante esta falta de ATP, no es posible mantener el gradiente de H^+ a través de la membrana plasmática y el tonoplasto, necesario para el transporte activo de exclusión desde los tallos. Regular la composición de solutos del xilema es importante para determinar las concentraciones iónicas del tallo y por lo tanto la tolerancia a la salinidad. A pesar de la importancia del transporte de iones para la tolerancia a estrés salino, pocos estudios miden la concentración iónica en el

xilema de plantas en actividad. Probablemente, la causa sea la dificultad de realizar esta medición debido a la gran presión negativa que existe en los vasos del xilema (Teakle *et al.*, 2007).

Por lo tanto, a partir de mediciones de voltajes transmembrana y de actividades de Cl^- en los compartimentos celulares, se sugirió que el ingreso de Cl^- a través de la membrana de células radicales está dominado por un transporte activo cuando las concentraciones en el suelo son bajas, y en condiciones de salinidad elevada el ingreso de Cl^- ocurre en forma pasiva. Ambos tipos de transporte también existen en la membrana vacuolar. Estudios electrofisiológicos demostraron la presencia de un transportador electrogénico de tipo simporte en la membrana plasmática de células de la raíz y de canales de Cl^- que median el ingreso y la salida de Cl^- del plasmalema (White y Broadley, 2001).

Recientemente, se ha reportado que la exclusión de Cl^- del xilema es una pieza clave en la tolerancia a salinidad de *Lotus tenuis*, comparada con la respuesta encontrada en *L. corniculatus* (Teakle *et al.*, 2007).

3.3.2. Compartimentalización en la vacuola

Cuando las plantas se encuentran en presencia de sales en el suelo, y la selectividad no es la suficiente, ingresan abundantes cantidades de iones a las células. La síntesis proteica requiere concentraciones citoplasmáticas de K^+ de alrededor de 100 mM y de Na^+ entre 5 y 10 mM. Las plantas tolerantes a salinidad, que exitosamente acumulan estos iones por encima de valores críticos, lo logran gracias a la compartimentalización de los mismos en la vacuola. La acumulación de Na^+ en la vacuola es una estrategia muy importante, y efectiva para el ajuste osmótico en cuanto al costo energético, y también tiene la ventaja de reducir la concentración de Na^+ en el citosol. El secuestro de Na^+ en la vacuola depende de la expresión y actividad del transportador de membrana antiporte Na^+/H^+ , como así también de la H^+ -ATPasa de la vacuola y la H^+ -PPasa. Estas fosfatasa son las responsables del gradiente de protones necesario para la actividad del antiporte Na^+/H^+ (Chinnusamy *et al.*, 2005). La misma presencia de sales, tales como el NaCl,

accionan el mecanismo Na^+/H^+ antiportador del tonoplasto, y así ocurre dicha compartimentalización (Garbarino y DuPont, 1989). El potencial osmótico del citoplasma se mantiene por la acumulación de solutos orgánicos compatibles con la actividad enzimática (Blumwald, 2000; Zhu, 2003).

En plantas de *Arabidopsis* y de arroz, se observó que el gen NHX1 del antiportador vacuolar Na^+/H^+ se induce tanto por salinidad como por incrementos de ABA (Shi y Zhu, 2002; Fukuda *et al.*, 1999). Apse *et al.* (1999) mostraron una mayor tolerancia al estrés salino en plantas transgénicas de *Arabidopsis* sobreexpresando el gen NHX1; y algo similar ocurrió en tomate y en colza (Tester y Davenport, 2003; Chinnusamy *et al.*, 2005; Apse y Blumwald, 2007).

3.4. Síntesis de solutos compatibles

La homeostasis osmótica se genera tanto a partir de la compartimentalización de Na^+ en la vacuola como por la biosíntesis y acumulación de solutos compatibles. Ciertas plantas, a lo largo de la evolución, han adquirido la capacidad de sintetizar y acumular solutos compatibles (no tóxicos), en respuesta a estrés, tanto hídrico como salino. A pesar de que bajo condiciones de estrés osmótico el uso de iones para la osmorregulación puede ser energéticamente más favorable que la biosíntesis de solutos, varias especies acumulan osmolitos orgánicos. Estos solutos compatibles son metabolitos hidrofílicos, entre los que se destacan azúcares solubles (sacarosa y fructosa), aminoácidos (prolina y betaína), glicerol, manitol, y otros metabolitos de bajo peso molecular. Se pueden acumular hasta niveles osmóticamente significativos, sin alterar el metabolismo. Aparte de elevar la presión osmótica evitando así una interrupción en el ingreso de agua a la planta, también tienen funciones tales como estabilizar estructuras subcelulares como membranas y proteínas, rescatar radicales libres, actuar como reservorios de carbono y nitrógeno, y regular el potencial redox de la célula. A estos osmolitos orgánicos se los denomina generalmente osmoprotectores (Bohnert y Jensen, 1996 a y b; Nuccio *et al.*, 1999; Chen y Murata, 2000).

Bajo condiciones altamente salinas, relativamente pocos solutos orgánicos pueden ser acumulados en concentraciones suficientes para ajustar osmóticamente el citoplasma, sin inhibir la actividad enzimática. En glicófitas, las concentraciones de solutos compatibles no son tan altas, se encuentran en el orden de 10 mM, pero si nos referimos exclusivamente al citoplasma pueden generar una significativa presión osmótica y funcionar como osmolito. Existen evidencias de la localización citoplasmática de estos compuestos. A bajas concentraciones, se presume que cumplen roles de osmoprotección (Shannon *et al.*, 1991; Rhodes y Hanson, 1993; Munns y Tester, 2008).

A pesar de que la biosíntesis y la acumulación de solutos compatibles bajo condiciones de estrés osmótico están bien documentadas, poco se sabe acerca de la “cascada de señalización” que regula estos procesos en plantas superiores (Chinnusamy *et al.*, 2005).

3.4.1. Prolina

Existen suficientes referencias como para asegurar que la prolina libre se acumula en un rango bastante amplio de plantas expuestas a situaciones de estrés, tanto biótico como abiótico (Hare y Cress, 1997; Giridara Kumar *et al.*, 2003; Lacerda *et al.*, 2003; Karimi *et al.*, 2005; entre otros).

En los últimos años, se realizaron varios intentos para incrementar los niveles de acumulación de prolina en plantas, mediante la transferencia de genes asociados con los pasos de la biosíntesis. Y en varias de las especies transgénicas con capacidad de elevar la síntesis de prolina, se observó tolerancia a estrés abiótico (Kavi Kishor *et al.*, 2005).

Considerando la controversia que existe en el rol osmoprotector de la prolina como mecanismo de tolerancia, se sugieren funciones que pueden estar mejorando el estado de la planta ante un estrés. Este aminoácido parece estar vinculado a diversos procesos, como por ejemplo: a) es fuente de energía en la regulación de los potenciales redox; b) es protector de las funciones celulares mediante la captura de especies reactivas de oxígeno; c) es estabilizador de proteínas, membranas y estructuras subcelulares; d) actúa

como compuesto de reserva y fuente de nitrógeno, importante para el crecimiento inmediato luego de un estrés; y e) se observó que, bajo un sistema libre *in vitro*, cumple la función de aliviar los efectos del NaCl sobre la actividad enzimática de la RubisCO (Sivakumar *et al.*, 2000; Giridara Kumar *et al.*, 2003; Kavi Kishor *et al.*, 2005; Munns y Tester, 2008).

3.5. Poliaminas

Las poliaminas son moléculas alifáticas de bajo peso molecular, ubicuas y esenciales para el crecimiento y desarrollo de todos los seres vivos. En las plantas, intervienen en un gran número de procesos de crecimiento y desarrollo, tales como la división celular, la ruptura de la dormición de tubérculos y semillas, la estimulación y el desarrollo de primordios florales, la embriogénesis, el crecimiento y la maduración de los frutos, la morfogénesis y además intervienen en respuesta a estreses ambientales (Tassoni *et al.*, 2000).

Estos compuestos se presentan en los tejidos vivos tanto en forma libre como conjugada (Cohen, 1998; Flores y Martin-Tanguy, 1991). A nivel celular están implicadas en la modulación de la actividad de canales iónicos (Williams, 1997), en el empaquetamiento, replicación y transcripción del ácido desoxirribonucleico (ADN), en la traducción del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) (Ruan *et al.*, 1994) y en el mantenimiento de la estabilidad de membranas celulares (Schuber, 1989; Tabor, 1960). Sin embargo, aún no se conocen en su totalidad los mecanismos mediante los cuales las poliaminas intervienen en estos procesos. Se ha determinado que interactúan de alguna forma con todas las hormonas vegetales. Así, las auxinas y las giberelinas inducen la síntesis de poliaminas. También se observó que mutantes con alteraciones en la biosíntesis de ABA muestran un aumento en la síntesis de poliaminas. Además, al igual que las citoquininas, las poliaminas tienen actividad anti-senescente (Kushad y Dumbroff, 1991).

La biosíntesis de poliaminas y su contenido en plantas son sensibles a una diversa gama de variables externas e internas, como el estrés, la luz, las fitohormonas y los procesos ontogenéticos. El impacto del estrés osmótico sobre el metabolismo de poliaminas fue descrito a principios de la

década del '80, usando a la avena como modelo (Flores y Galston, 1982). El estrés osmótico, independientemente del tipo de osmolito utilizado, es usualmente un fuerte inductor de la arginina descarboxilasa (ADC) y la acumulación de putrescina (Soyka y Heyer, 1999; Urano *et al.*, 2003). La relevancia de esta vía metabólica en la respuesta a la desecación está respaldada por reportes que sugieren una mejora de la vitalidad de plantas sometidas a estrés por la aplicación de putrescina y el deterioro de las funciones fisiológicas por su inhibición (Flores, 1991; Bouchereau *et al.*, 1999). Además, mutantes de *A. thaliana* con disfunción en el gen ADC2 son hipersensibles al *shock* salino (Urano *et al.*, 2004), mientras que experimentos con plantas transgénicas de arroz sobre-expresando la ADC mejorarían su rendimiento frente al *shock* salino y el estrés hídrico (Roy y Wu, 2001; Capell *et al.*, 2004). Múltiples trabajos sugieren también un rol de las poliaminas superiores en la respuesta a la desecación. Por ejemplo, la aplicación externa de espermidina y espermina evitan los efectos deletéreos del *shock* salino en arroz (Chattopadhyay *et al.*, 2002), mientras que el contenido de espermidina aumenta en *Vicia faba* sometida a estrés hídrico (Liu *et al.*, 2000). Finalmente, la sobre-expresión de actividades espermidina sintasa y S-adenosilmetionina descarboxilasa en plantas transgénicas que presentan acumulación constitutiva de espermidina y espermina, resulta en mayor tolerancia al estrés osmótico y *shock* salino (Roy y Wu, 2002; Waie y Rajam, 2003; Kasukabe *et al.*, 2004).

El estrés salino parece representar un caso particular en lo que respecta al metabolismo de aminas alifáticas. Si bien la inducción de la ADC y la acumulación de putrescina ocurren bajo condiciones de *shock* osmótico o salino en distintas especies vegetales, lo hacen de manera transitoria o en el corto plazo (Friedman *et al.*, 1989; Basu y Ghosh, 1991; Chattopadhyay *et al.*, 1997; Bouchereau *et al.*, 1999; Santa-Cruz *et al.*, 1999; Lefèvre *et al.*, 2001). Como ha sido descrito anteriormente, una característica de la fisiología del estrés salino es la progresión temporal de la situación estresante, dependiente de la acumulación de iones en la parte aérea de la planta. Sin embargo, no muchos investigadores han encarado el estudio del metabolismo de poliaminas en condiciones de salinidad de larga data. En estas condiciones el contenido de putrescina suele disminuir, mientras que niveles elevados de espermidina

y/o espermina estarían correlacionados con la respuesta al estrés y la tolerancia de plantas o plántulas (Krishnamurthy y Bhagwat, 1989; Santa-Cruz *et al.*, 1997; Zapata *et al.*, 2003; Maiale *et al.*, 2004; Sánchez *et al.*, 2005). Inclusive, se ha reportado que los iones Na^+ ejercen un efecto negativo sobre el contenido de putrescina y espermidina en discos de hojas de tomate (Aziz *et al.*, 1999). Estos datos sugieren la importancia de otras poliaminas y enzimas de este metabolismo, diferentes a la putrescina y a la ADC, en la aclimatación vegetal al estrés salino y la respuesta al efecto tóxico de los iones en exceso. Particularmente, la acumulación de espermina parece ser un fenómeno propio de la respuesta a la salinidad (Maiale *et al.*, 2004).

3.6. Antioxidantes

Los estreses abióticos, incluyendo al estrés salino, inducen la síntesis de especies reactivas de oxígeno (ROS) que causan daño oxidativo a los lípidos de las membranas, proteínas y ácidos nucleicos. Las plantas emplean antioxidantes, tales como ascorbato, glutatión, carotenoides, y enzimas detoxificantes, como por ejemplo superóxido dismutasa, catalasas y enzimas del ciclo del glutatión-ascorbato, con el fin de combatir el estrés oxidativo causado. Diversas señales de estrés abiótico convergen en cascadas de MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) regulando los sistemas de defensa antioxidantes (Apse y Blumwald, 2002; Parida y Das, 2005).

3.7. Evidencias de los Efectos Tóxicos de la Sal

Los efectos iónicos aparecen cuando concentraciones nocivas de iones sodio, cloruro y sulfato se acumulan en las células. Bajo condiciones normales (no salinas), el citosol contiene entre 100 y 200 mM de K^+ y entre 1 y 10 mM de Na^+ , lo cual genera un entorno iónico óptimo para el funcionamiento de muchas enzimas. Dado que el K^+ es un cofactor esencial de muchas enzimas, altas relaciones Na^+/K^+ inhiben la actividad de algunas de ellas, involucradas en importantes rutas metabólicas como la fotosíntesis y la

respiración. Además, incrementos en dicha relación llevan a la inhibición de la síntesis de proteínas.

Algunos síntomas de estrés salino sugieren que la toxicidad es consecuencia del daño de alguna membrana. Por ejemplo, efectos del sistema fotosintético por daño en la membrana cloroplástica o efectos en el sistema respiratorio por daños en la membrana mitocondrial o, como se mencionó anteriormente, lesiones en el plasmalemma que resultan en pérdida de solutos de las células. Las concentraciones, a las cuales el efecto tóxico tiene lugar, difieren con la capacidad genética de la especie, el estado de crecimiento, las interacciones medioambientales y la especie iónica en cuestión (Miteva *et al.*, 1992; Taiz y Zeiger, 1998; Hasegawa *et al.*, 2000).

3.7.1. Fotosíntesis y Respiración: alteración enzimática

Como se mencionó anteriormente, la fotosíntesis se inhibe cuando altas concentraciones de Na^+ y/o de Cl^- se acumulan en los cloroplastos. Sin embargo, se conoce que el transporte de electrones del aparato fotosintético es relativamente insensible a la salinidad, con lo cual se deduce que los mecanismos afectados podrían ser el metabolismo del carbono o la fotofosforilación.

La ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (RubisCO), una enzima bifuncional con la capacidad de utilizar competitivamente CO_2 y O_2 , es la enzima clave responsable de la fijación de CO_2 durante la fotosíntesis. Hay estudios que afirman que la salinidad puede disminuir la actividad de esta enzima, como así también la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC). Plantas sometidas a estrés poseen mayor fotorrespiración, lo cual se considera un proceso de gasto innecesario involucrado en la liberación de CO_2 y NH_3 . Está bien demostrado que la actividad oxigenasa de la RubisCO cataliza el primer paso de la fotorrespiración, y que ésta a su vez consume hidratos de carbono estructurales, llegando en algunos casos a utilizar como sustrato hasta el 50% de los mismos (Taiz y Zeiger, 1998; Sivakumar *et al.*, 2002).

3.7.2. Alteración de las membranas y efecto protector del Ca^{2+}

En condiciones de estrés salino, el NaCl causa una pronunciada pérdida de solutos, y dependiendo de la especie, se manifiesta tanto en células de hojas como de raíces. Estas alteraciones de las membranas, son mayores aún en tejidos en crecimiento. El Ca^{2+} se encuentra uniendo fosfolípidos de la membrana y así cumple su rol de limitar la permeabilidad de la misma. Es bien conocida la capacidad del Na^+ de desplazar iones Ca^{2+} de tales posiciones, debilitando la estructura de unión y provocando una mayor permeabilidad de la membrana. Cuando el Na^+ se encuentra en altas concentraciones puede desplazar al Ca^{2+} de la membrana plasmática, resultando en cambios en la permeabilidad de la membrana, lo cual se detecta por excesiva pérdida de K^+ por las raíces (Cramer *et al.*, 1985; Shannon *et al.*, 1991).

Hay antecedentes de que en presencia de Ca^{2+} , los efectos de la salinidad se atenúan. En *Arabidopsis* se aisló un gen de tolerancia a salinidad (SOS3) que codifica una proteína asociada al Ca^{2+} , sin el cual dicha proteína pierde funcionalidad (Ishitani *et al.*, 2000). Las interacciones del Ca^{2+} en los diferentes procesos pueden ser el mantenimiento de la estabilidad de la estructura de las membranas, el mejor desempeño en la discriminación del Na^+ en los canales iónicos, y la interacción electrostática de Na^+ y Ca^{2+} en la pared celular y en la membrana.

Reid y Smith (2000) reportaron que la presencia de Ca^{2+} atenúa los efectos tóxicos causados por el Na^+ intracelular, pero que no es capaz de vencer el problema osmótico asociado a salinidad. Sin embargo, algunos resultados sugieren que altas concentraciones de NaCl disminuyen el pasaje de agua a través de las membranas celulares de las raíces, por una reducción en la actividad de los canales y proponen que el Ca^{2+} tendría un efecto mejorador relacionado con la funcionalidad de los mismos (Carvajal *et al.*, 2000). A los pocos meses, el mismo grupo postuló que los efectos del Ca^{2+} dependen de los niveles de salinidad. Con bajas concentraciones de NaCl, un incremento en Ca^{2+} redujo la concentración de Na^+ interna (efecto tóxico); y con altas concentraciones de NaCl, un aumento del Ca^{2+} provocó una mejora

en el crecimiento, debida tal vez a efectos sobre las relaciones hídricas y sobre la selectividad K^+/Na^+ (efecto osmótico) (Navarro *et al.*, 2000).

4. Sensores del estrés salino a nivel celular

Entender las bases moleculares de la señalización del estrés salino y la regulación de los mecanismos que determinan la tolerancia, es esencial para el mejoramiento genético de los cultivos. Las plantas perciben el estrés salino a través de señales iónicas (Na^+) y osmóticas. Un exceso de Na^+ puede ser captado en la superficie de la membrana plasmática, por una proteína transmembrana, o dentro de la célula por proteínas de membrana o enzimas sensibles al Na^+ (Zhu, 2003). La entrada de Na^+ a través de los canales iónicos no específicos puede causar despolarización de la membrana que activa canales de Ca^{2+} , y por lo tanto, genera oscilaciones de Ca^{2+} que señalan el estrés salino (Figura 4).

Bajo condiciones hiperosmóticas impuestas por la salinidad, el volumen celular decrece debido a la pérdida de turgencia, y esto puede conducir a una retracción de la membrana plasmática, alejándose de la pared celular, lo cual es probablemente captado por canales y proteínas kinasas de la membrana (Chinnusamy *et al.*, 2005).

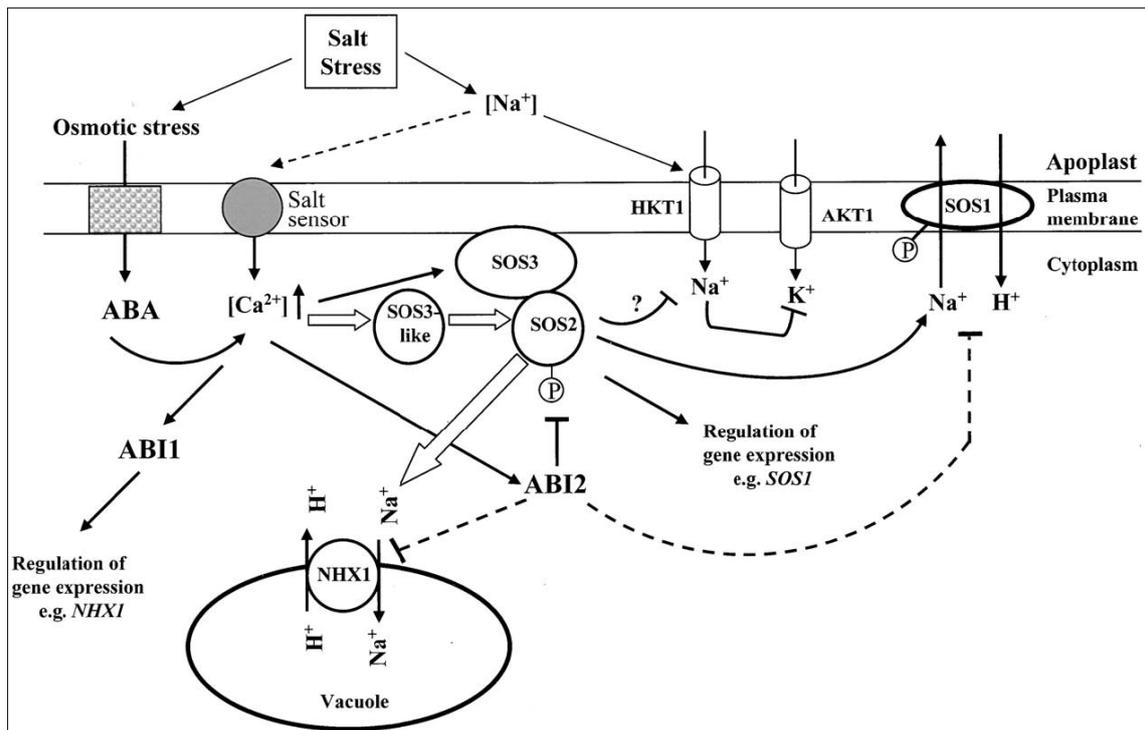


Figura 4: Pasos en la señalización de la homeostasis iónica bajo estrés salino en *Arabidopsis*. El Ca^{2+} que surge como señal de estrés salino es percibido por SOS3, el cual activa la protein quinasa SOS2. SOS2 activada fosforila SOS1 que es un antiportador Na^+/H^+ de la membrana plasmática, el cual transporta Na^+ fuera del citosol. SOS2 también activa el antiportador Na^+/H^+ del tonoplasto que secuestra Na^+ en la vacuola. El ingreso de Na^+ al citosol a través del transportador HKT1 también podría estar restringido por SOS2. ABI1 regula la expresión génica de NHX1, mientras que ABI2 interactúa con SOS2 y regula negativamente la homeostasis iónica. Fuente: Chinnusamy *et al.*, 2005.

5. Tolerancia a estrés salino

El concepto de estrés se encuentra íntimamente relacionado con el de tolerancia al estrés, el cual a su vez significa la fortaleza o capacidad de la planta para lidiar con un medioambiente no favorable. Un medio ambiente estresante para una planta puede no serlo para otra. En el caso de la tolerancia, las plantas utilizan mecanismos para mantener una alta actividad metabólica aun cuando son sometidas a dosis estresantes de importancia, mientras que disminuyen su metabolismo bajo estrés severo. En cambio, los “mecanismos de escape” (*avoidance* en inglés) se basan en la disminución de la actividad metabólica, de manera tal que se ingresa en un estado de latencia que permite sobreponerse al estrés. Si la tolerancia incrementa como resultado

de la exposición a un estrés anterior, se dice que la planta ha sido **aclimatada** (Taiz y Zeiger, 1998).

La tolerancia a la salinidad se define como la habilidad de una planta para crecer y completar su ciclo de vida en un medio que contiene altas concentraciones de sal. Varía entre los sucesivos estados de crecimiento (Bernstein y Hayward, 1958) y el primer estado, durante el cual el cultivo se establece, se considera particularmente difícil, incluso para cultivos tolerantes (Maas y Hoffman, 1977).

En plantas sensibles, la inhibición del crecimiento de la hoja es la primera respuesta a un exceso de sales en la solución del suelo. Entender los mecanismos, involucrados en la conservación de este parámetro en especies forrajeras tolerantes a estrés por salinidad, es de primordial importancia por la fuerte dependencia del rendimiento sobre la producción de hojas y la expansión de las mismas (Sibole *et al.*, 2003b).

Los problemas son bien conocidos, pero las soluciones, en términos de nuevos cultivares, van apareciendo muy lentamente a pesar del esfuerzo invertido en investigación. Tanto la tolerancia a salinidad como a sequía son características complejas. Por ejemplo, la tolerancia muchas veces depende de la habilidad de compartimentalizar iones, la cual a su vez depende de la regulación de la transpiración, del estricto control de la pérdida de iones por el apoplasto de la raíz, de la naturaleza de las membranas de la vacuola, de la síntesis de solutos compatibles y de la habilidad para tolerar bajas relaciones K^+/Na^+ en el citoplasma de las células.

Sin lugar a dudas, el desconocimiento, o el conocimiento inadecuado, de las bases moleculares y fisiológicas del problema, está frenando el avance de la manipulación de la tolerancia al estrés. Con un rápido avance en las técnicas moleculares, específicamente, en la simplificación de las mismas y en la reducción de los costos, los marcadores podrán ser rutina en los programas de mejoramiento genético de plantas, mejorando la eficiencia y proporcionando mayores resultados en los principales cultivos de interés económico.

5.1. Choque osmótico y Aclimatación

El concepto de estrés no debe ser aplicado a los rápidos ajustes de flujos metabólicos en respuesta a cambios medio ambientales “normales” a los que están sometidas cotidianamente las plantas (por ejemplo, el cambio en la tasa fotosintética como consecuencia del sombreado provocado por una nube). El estrés ocurre cuando un agente estresante induce un cambio fisiológico tal que como resultado del mismo se produce una reducción en el crecimiento, una respuesta fisiológica aclimatatoria, adaptación o una combinación de todas ellas. Sin embargo, aún esta definición es inespecífica ya que una situación de estrés leve puede activar el metabolismo e incrementar la actividad fisiológica de una planta sin causar efectos dañinos. En este caso, se dice que la planta sufre *eu-estrés*, el cual se define como una situación activadora y positiva para el desarrollo vegetal, la cual no causa daño aún cuando la misma persista durante largos períodos de tiempo. En contraposición se encuentra el *dis-estrés*, que se define como un estrés “real” y dañino, que tiene un efecto negativo en el desarrollo vegetal (Lichtenthaler, 1996; Lichtenthaler *et al.*, 1997). Por lo tanto el estrés debe ser considerado como un fenómeno “dosis-dependiente”, donde “bajas dosis” de un agente estresante pueden estimular el metabolismo y el crecimiento mientras que “altas dosis”, una vez excedido cierto umbral, pueden tener un efecto inverso y negativo. Es así que un estrés determinado puede contener tanto elementos destructivos como constructivos al mismo tiempo: es un factor de selección así como una fuerza directriz para mejorar la resistencia y la evolución adaptativa. En la mayoría de los casos, el estrés se mide en relación a la supervivencia de la planta, al rendimiento de los cereales, al crecimiento (acumulación de biomasa), o a los procesos de asimilación primaria (asimilación de CO₂ y/o minerales), los cuales se encuentran relacionados al crecimiento en general (Taiz y Zeiger, 1998).

Estas dos respuestas ocurren en forma secuencial, dando origen a un **modelo bifásico de crecimiento (Figura 5)**, expuesto originariamente por Munns y Termaat (Munns y Termaat, 1986; Termaat y Munns, 1986). Básicamente, el modelo propone dos fases de inhibición del crecimiento por la imposición instantánea del estrés salino (Munns, 1993; Munns, 2002). En una primera fase, se observa inhibición del crecimiento atribuida al componente

hiperosmótico, el cual es dependiente de la concentración iónica pero no del tipo de iones involucrados en el estrés. Luego de una exposición prolongada a la condición hipersalina, la acumulación de iones en la parte aérea de la planta, particularmente en las hojas más viejas, desencadena la segunda fase de inhibición del crecimiento, la cual es atribuida a la toxicidad iónica *per se* sobre el metabolismo y la nutrición de la planta. En esta fase, el efecto es dependiente del tipo de iones involucrados, ya que existen sales más tóxicas que otras, y también del genotipo, en virtud de los mecanismos de tolerancia de la especie vegetal en estudio. En efecto, aquellas especies que no puedan evitar la acumulación de iones y/o los compartimentalicen ineficientemente, estarán predispuestas a sufrir daño más rápidamente y, por lo tanto, serán más sensibles a la salinidad. En este aspecto, una cualidad de las halófitas es, justamente, su capacidad para evitar la segunda fase de inhibición, la cual en algunos casos se encuentra asociada a un mecanismo eficiente de extrusión de sales.

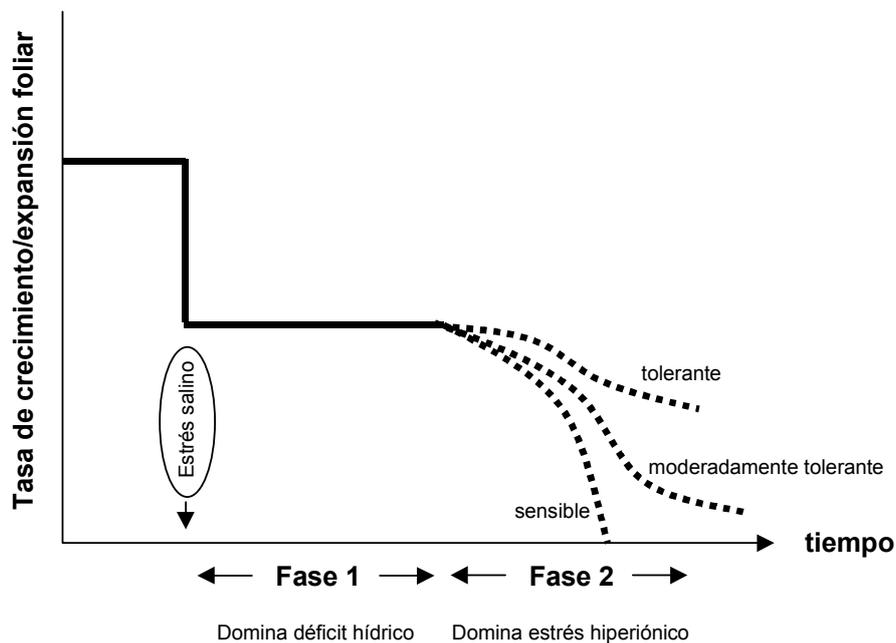


Figura 5: Modelo bifásico de crecimiento de Munns y Teeremat. Ante la imposición instantánea al estrés salino, el crecimiento se reduce inicialmente por el efecto hiperosmótico. En función del tiempo, la acumulación de iones tóxicos desencadena la segunda fase de inhibición del crecimiento (estrés hiperiónico). Variedades sensibles y tolerantes serían igualmente afectadas por el déficit hídrico, evidenciándose la tolerancia diferencial a la salinidad durante la segunda fase. Adaptado de Munns (1993).

Según lo expuesto, se predice que las diferencias en tolerancia entre variedades de glicófitas solo serán evidentes luego de largos periodos de tiempo bajo estrés salino, y que dependerán de la especie y las condiciones de crecimiento. A pesar que este modelo ha sido validado en diversas especies vegetales, existen reportes que sugieren casos donde las diferencias en la tolerancia entre variedades también son dependientes de la fase hiperosmótica de inhibición del crecimiento, particularmente en especies extremadamente sensibles al estrés hídrico (Neumann, 1997).

5.2. Variación genotípica y poblacional en la tolerancia a estrés salino

Las plantas tienen una notable capacidad de ajustar su fisiología, metabolismo y atributos estructurales en la escala de segundos, horas, días o estaciones, dentro del marco de un mismo genotipo. Por lo tanto, la aclimatación constituye una respuesta fenotípica a los cambios ambientales. Cabe distinguir al menos dos mecanismos aclimatatorios:

- aquellos que se dan relativamente rápido en el tiempo, como el cambio en flujos metabólicos o inducción de enzimas desintoxicantes, los cuales permiten ajustar el metabolismo a una condición adecuada, y
- aquellos relacionados con cambios morfológicos o anatómicos, como por ejemplo la diferente distribución y densidad estomática en hojas jóvenes, que ocurren en días, semanas o inclusive meses, dependiendo de la especie vegetal.

No es sorprendente, dada la complejidad de la tolerancia a la salinidad, que las diferentes especies, o aún distintos genotipos dentro de una misma especie, respondan de manera desigual, ya que la tolerancia depende de un considerable número de características, muchas veces, tanto fisiológica como genéticamente desconocidas, y la importancia relativa de una en particular, en un genotipo dado, determinará el efecto total de cualquier cambio en esa característica sobre la tolerancia. Esto sugiere que se requieren

mediciones sobre un gran número de individuos de la población para cuantificar tolerancia.

Finalmente, la **plasticidad fenotípica** es un parámetro que estima la “cantidad” de aclimatación que es potencialmente factible en un carácter particular (por ejemplo la fotosíntesis) en respuesta a un cambio ambiental y dentro de un genotipo (Orcutt y Nilsen, 1996). Se debe distinguir entre la aclimatación y la **adaptación**, refiriéndose esta última generalmente a un nivel de resistencia determinado genéticamente, el cual ha sido adquirido por medio de un proceso de selección a lo largo de múltiples generaciones (Taiz y Zeiger, 1998). Es decir, la adaptación ocurre como consecuencia de mecanismos evolutivos a nivel poblacional: en un ambiente estresante y a través de múltiples generaciones, es razonable suponer que ciertos genotipos son dominantes dentro de la población, ya que presentan una combinación tal de genes que les permiten sobrevivir en ese ambiente. Desafortunadamente, con frecuencia el término “adaptación” se emplea también en la literatura para indicar aclimatación (Orcutt y Nilsen, 2000).

6. Género *Lotus* y *Lotus tenuis*

El género *Lotus*, pertenece a la familia de las leguminosas, y comprende alrededor de 200 especies anuales o perennes, ampliamente distribuidas en todo el mundo. La zona de origen de mayor diversidad específica es la Cuenca del Mar Mediterráneo Europeo (Stenglein *et al.*, 2003). Su localización también se extiende hacia el sur, por el Sahara, y hacia el este, por la zona templada de Asia (Cook *et al.*, 1997).

Como se ha mencionado con anterioridad, algunas especies perennes del género *Lotus*, entre ellas *Lotus corniculatus*, *Lotus tenuis*, *Lotus uliginosus*, y *Lotus subbiflorus*, constituyen una importante fuente forrajera en los países donde son cultivadas o donde ya están naturalizadas (Kirkbride, 1999, 2006; Stenglein *et al.*, 2003).

Al respecto, es un hecho muy conocido que los niveles medios de taninos condensados mejoran el valor nutricional de estas especies y le

confieren características particulares respecto a su calidad forrajera (De Battista, 2001; Escaray *et al.*, 2007).

Lotus tenuis es una leguminosa herbácea ampliamente utilizada como planta forrajera en zona templadas. En Argentina, esta especie colonizó y se naturalizó en los bajos salino-alcálinos de la Pampa Deprimida de la Provincia de Buenos Aires, la cual constituye un caso particular de invasión biológica positiva (León *et al.*, 1979, 1985). Es muy valorada por su aporte a la oferta forrajera de los sistemas ganaderos de la región, debido a su buena adaptación en áreas con predominancia de gramíneas y pobre presencia de leguminosas. Por lo tanto, se la considera la especie más conveniente para mejorar el contenido de nitrógeno y las propiedades de digestibilidad del forraje en aquellas regiones en donde no prosperan ni la alfalfa ni otras leguminosas de interés (Clúa *et al.*, 1997).

La época de crecimiento de *Lotus tenuis* es primavera-verano-otoño (PVO) y florece desde noviembre hasta marzo. Presenta hábito de crecimiento postrado, y ramificaciones desde las yemas axilares, cuya densidad varía de acuerdo al genotipo y a las condiciones ambientales (De Battista, 2001). Es una especie diploide ($2n=2x=12$) y una característica importante es la presencia de una raíz leñosa engrosada llamada corona, a partir de la cual también ocurren brotaciones (Gebrehiwot *et al.*, 2002).

Por ser una especie alógama y presentar una importante variabilidad morfo-fisiológica, puede suponerse, que durante el proceso de naturalización, se han generado genotipos e, incluso, poblaciones con diferentes niveles de tolerancia a las variadas condiciones adversas, típicas de esta región. Actualmente, es objetivo de intensos programas de mejoramiento e investigación (Kirkbride, 2006).

6.1. Especies modelo del género *Lotus*

El género *Lotus* tiene la ventaja de tener especies que han sido seleccionadas como modelo y sobre las cuales se están realizando los mapas genéticos (Cyranoski, 2001). *Lotus japonicus* es considerada especie modelo

de las leguminosas de nodulación del tipo determinada, y existen líneas recombinantes entre dos ecotipos (MG20 y Giffu) y entre otras especies del género, como *Lotus burtii* y *Lotus filicaulis*.

Lotus japonicus surgió como especie modelo de las leguminosas debido a que tiene buenas características que facilitan el análisis del genoma. Algunas de las más importantes: a) la presencia de un genoma de tamaño pequeño, b) ser una verdadera diploide, c) el corto tiempo que tarda en cumplir una generación, d) la autocompatibilidad, e) el tamaño de la flor que permite disectar fácilmente los órganos reproductivos, y f) el gran número de semillas por vaina (Jiang y Gresshoff, 1997; Endo *et al.*, 2000).

Sumado a lo anteriormente descrito, algunas líneas de *L. japonicus*, por ejemplo Gifu, responden muy bien a la regeneración *in vitro*, y además se transforman fácilmente tanto por *Agrobacterium tumefaciens* como por *Agrobacterium rhizogenes*. Y, a diferencia de *Arabidopsis*, proveen información relacionada a los procesos de la planta que gobiernan las interacciones simbióticas durante la nodulación y la fijación de nitrógeno, y la simbiosis con micorrizas (Jiang y Gresshoff, 1997; Márquez *et al.*, 2005).

6.2. *Lotus creticus*, especie nativa de la Costa del Mar Mediterráneo

Lotus creticus sub. *creticus* es una leguminosa perenne, nativa de la costa española del Mar Mediterráneo (Sánchez-Blanco *et al.*, 1998). Se trata de una de las hierbas mejor adaptadas a un medio hostil como el de los arenales marítimos. Con su porte rastrero se extiende sobre la arena y con su densa cubierta de pelos hialinos adquiere un tono plateado, que más allá de darle valor ornamental, juega un importante rol en la absorción foliar de agua (Morales *et al.*, 2000).

El uso de especies nativas para la revegetación puede ser una práctica interesante especialmente en aquellos países con condiciones climáticas semiáridas, donde la salinidad es a menudo un problema temporario debido a la baja calidad del agua de riego durante la estación seca. Las especies nativas, llamadas plantas mediterráneas son usualmente

consideradas más tolerantes y adaptadas a condiciones de sequía y de salinidad edáfica (Sánchez-Blanco *et al.*, 1998; Bañon *et al.*, 2004).

Nos pareció interesante incluir en nuestros estudios de salinidad a una especie perteneciente al género *Lotus*, adaptada a dichas situaciones extremas y con promisorias aplicaciones en proyectos para la revegetación de áreas semi-áridas, donde la salinidad es un problema frecuente, y para la restauración de hábitats dunares.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material vegetal

El estudio se llevó a cabo en especies del género *Lotus*, obtenidas de diversas fuentes:

- *Lotus tenuis* var. Pampa INTA (Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, INTA).

- *Lotus tenuis*, 19 accesiones colectadas en distintos ambientes de la Provincia de Buenos Aires (Banco de Germoplasma de la Estación Experimental Agropecuaria Pergamino, INTA, Argentina).

- *Lotus tenuis* variedades: Esmeralda, Chajá y Aguapé (aportadas por las empresas privadas que las comercializan).

- *Lotus corniculatus* (Banco de Germoplasma de la Estación Experimental Agropecuaria Pergamino, INTA, Argentina).

- *Lotus japonicus* ecotipos MG20 y Gifu, *Lotus burtii* y *Lotus filicaulis* (Banco de Germoplasma de la Estación Experimental “La Estanzuela” INIA Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Colonia, Uruguay).

- *Lotus creticus* (Jardín Botánico de la Universidad de Valencia, España).

2. Escarificación de las semillas y siembra

Un máximo de 200 semillas por tubo se cubrieron con 2 ml de ácido sulfúrico puro. Se agitaron durante 2 minutos, o hasta observar cambio de color del tegumento y, consecuentemente, oscurecimiento del ácido. Se retiró el ácido sulfúrico e inmediatamente se lavó con abundante agua destilada, se agitó y se repitió este enjuague 10 veces.

Las semillas se sembraron en agar-agua al 0,8%, y se dejaron en oscuridad las primeras 24 horas. Posteriormente, se expusieron a la luz en cámara de cultivo. Al cabo de una semana se realizó el transplante a bandejas o macetas. Las semillas se sembraron en sustratos inertes, que dependiendo del experimento consistieron en arena semifina, vermiculita semifina y perlita:vermiculita (1:1, v:v). El riego se realizó por capilaridad, apoyando las

macetas o bandejas de cultivo sobre bateas con solución de riego desde donde se les suministró agua durante los primeros días, y solución nutritiva Hoagland 0,5X (Hoagland y Arnon, 1950), sola o combinada con NaCl, durante el periodo de ensayo.

Las plantas permanecieron en cámara de cultivo o se trasladaron a invernadero.

3. Condiciones de cultivo

3.1. Invernadero

El invernadero se mantuvo a una temperatura promedio de 25° C, una humedad relativa de 60% y una intensidad lumínica media de 20 Klux (Foto 1).

Los riegos de mantenimiento de las plantas se realizaron inicialmente con agua de lluvia recogida en tanques y, posteriormente, con Hoagland 0,5X. Cada 15 días se efectuó un control fitosanitario, intercalando principios activos tanto de productos insecticidas como fungicidas.



Foto 1: Registro de humedad relativa y temperatura en el invernadero de la Universidad de Valencia.

3.2. Cámara de cultivo

Las condiciones de cultivo en cámara se mantuvieron constantes a una temperatura de 25 ± 3 °C, una humedad relativa 45-60 % y un fotoperíodo de 16 h de luz con una intensidad lumínica de 6 Klux. La densidad del flujo fotónico fue de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, provista por lámparas fluorescentes. Cada 15 días se hizo un control fitosanitario, intercalando principios activos tanto de productos fungicidas como insecticidas (Foto 2).



Foto 2: Cámara de cultivo con control de temperatura, humedad relativa, intensidad lumínica y fotoperíodo. Riego por capilaridad desde las bandejas.

4. Producción y mantenimiento de las plantas madres

Se sembraron en maceta semillas de una población comercial de *Lotus tenuis* preservando su identidad. Cada planta se consideró como un genotipo distinto, y se mantuvieron en invernadero con el fin de clonarlas cada vez que fuera necesario.

5. Clonación o “Nodal cuttings”

Se siguió la técnica de clonación descrita por Mujica y Rumi (1998). Para ello, se colectaron tallos de edad intermedia de plantas de entre 2 años de edad. Se descartaron las partes basales y apicales de los mismos, y se cortaron segmentos uninodales, teniendo la precaución de hacer un corte a

bisel en la base para favorecer la producción de raíces. Los mismos se pusieron en arena estéril como sustrato para inducir el enraizamiento. Las estacas produjeron raíces y crecieron en cámara de cultivo (Figura 6).

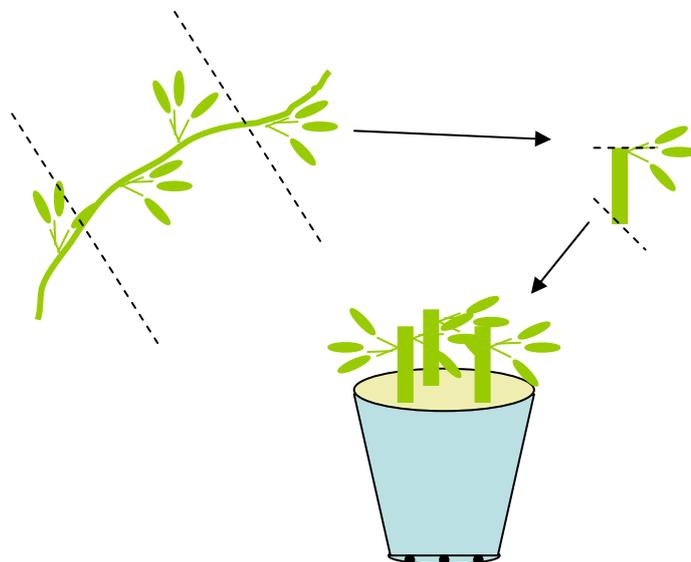


Figura 6: Esquema de clonado de *Lotus* sp. según la técnica descrita por Mujica y Rumi (1998).

6. Diseño experimental

El diseño experimental varió entre experimentos del modo descrito a continuación.

6.1. Estrés salino en clones de *L. tenuis*

6.1.1. Shock osmótico por elevadas concentraciones de NaCl.

Evaluación de la supervivencia

Con el fin de seleccionar genotipos contrastantes en respuesta a un shock osmótico impuesto por 300mM de NaCl, los materiales de interés se clonaron y se expusieron a condiciones controladas de luz, humedad y temperatura en cámara de cultivo. El ensayo se regó por capilaridad, durante los dos primeros días con agua, y luego con solución nutritiva Hoagland 0,5X. Al cabo de 28 días, se eliminaron estacas hasta dejar 6 por recipiente, y un total de 4 recipientes por genotipo. Los recipientes se distribuyeron al azar en

bandejas con solución Hoagland 0,5X + 300mM NaCl. Para evitar alteraciones en la concentración salina, una vez por semana se cambiaron las bandejas y se renovó la solución de riego.

Diariamente, se registraron las plantas muertas de cada recipiente, considerando la pérdida total de la turgencia, llegando al punto de marchitamiento permanente. El ensayo finalizó el día que se registró la muerte de la última planta y entonces se calculó, para cada genotipo, un índice de tolerancia basado en el siguiente sumatorio:

$$\sum (\text{n}^\circ \text{ plantas vivas} \times \text{n}^\circ \text{ día})$$

Este análisis permitió caracterizar y ordenar a la población en función de la supervivencia observada y seleccionar los 10 genotipos más contrastantes en cuanto a su tolerancia. Aquellos genotipos con un índice alto se los consideró más tolerantes, ya que la mayoría de sus individuos logró sobrevivir hasta el final del ensayo, y aquellos genotipos con índice bajo resultaron ser los menos tolerantes.

6.1.2. Respuesta a niveles moderados de NaCl

Con los genotipos contrastantes seleccionados, se diseñó un nuevo ensayo para lo cual se clonaron nuevamente las plantas madres de estos genotipos. Las plantas se mantuvieron en cámara de cultivo. Se regó por capilaridad, los dos primeros días con agua y luego con solución nutritiva Hoagland 0,5X. A los 11 días se eliminaron estacas hasta dejar seis individuos por recipiente y un total de 4 recipientes por genotipo. El 50% de las plantas de cada genotipo, se regaron con solución Hoagland 0,5X más 150mM de NaCl, y el otro 50%, considerado control, se regó con solución nutritiva durante todo el ensayo.

Las plantas se cosecharon a los 9, 19 y 26 días desde el inicio del tratamiento.

Se calculó el incremento en peso seco relativo diario (IPR_{diario}), mediante la fórmula:

$$IPR_{\text{diario}} = (PS_{\text{final}} - PS_{\text{inicial}}) \cdot PS_{\text{inicial}}^{-1} \cdot t^{-1}$$

siendo t el intervalo de tiempo transcurrido entre dos cosechas.

6.2. Respuesta a niveles moderados de salinidad en plantas del género *Lotus*

Se escarificaron y germinaron semillas en cámara de cultivo del modo descrito anteriormente. A los 10 días se transplantaron de a dos, en macetas con una mezcla de vermiculita y perlita (1:1, v:v) como sustrato. Las plantas se regaron con solución Hoagland 0,5X. A los 35 días desde la siembra, cuando las plantas tenían en promedio 10 hojas y en algunos casos brotes y ramificaciones, se trató a la mitad de la población con 150mM de NaCl, aplicado en la solución nutritiva de riego. El resto de las plantas (consideradas controles) se continuaron regando con la solución de Hoagland 0,5X hasta finalizar el ensayo. El tratamiento salino se prolongó durante 15 días, cosechándose las plantas al final del mismo.

El experimento se diseñó en bloques aleatorios con dos repeticiones de 16-18 plantas por población y por bloque.

6.3. Respuesta a la aclimatación salina en plantas del género *Lotus*

El ensayo se llevó a cabo en cámara de cultivo. Las semillas de todos los materiales se escarificaron y se sembraron en bandejas de 25 celdas, con vermiculita como sustrato. El experimento se diseñó en bloques al azar, con lo cual, por cada material evaluado había dos bandejas por tratamiento con 25 repeticiones cada una.

El tratamiento salino se inició cuando el 50% de las plántulas tenía dos hojas verdaderas (Foto 3). A partir de ese momento, y sólo a las bandejas

destinadas al tratamiento salino, se les agregaron concentraciones crecientes de NaCl en la solución de riego. Con intervalos de cuatro días, las concentraciones utilizadas fueron 50mM, 75mM, 100mM, 125mM y 150mM de NaCl. A continuación se muestra el esquema de salinización utilizado:

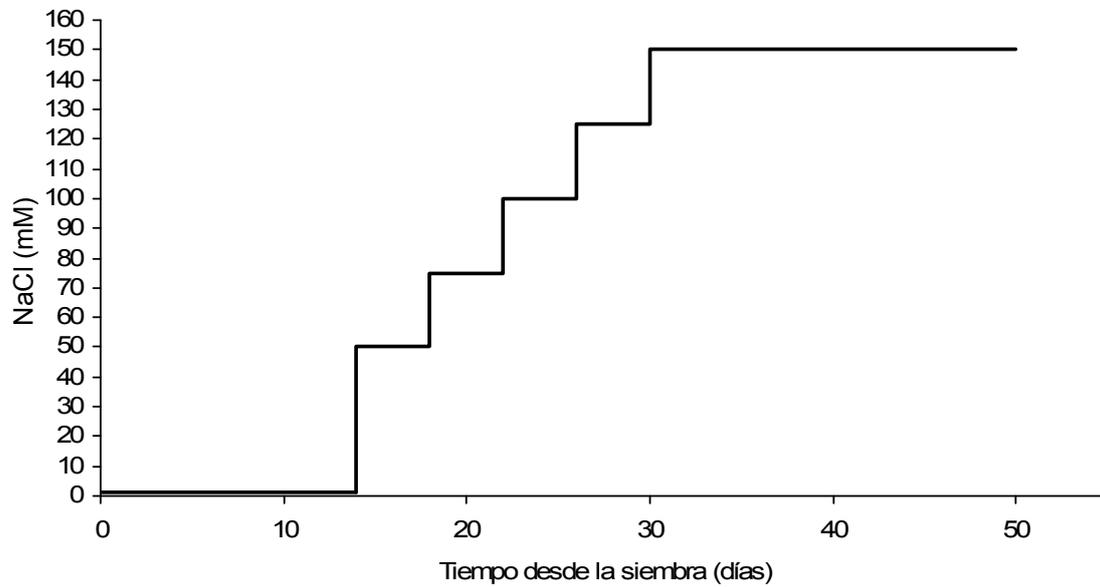


Foto 3: Plántulas de *Lotus japonicus* ecotipo MG20 con dos hojas verdaderas, momento en el cual se inició la aclimatación salina.

Finalizada la aclimatación, se continuó regando con solución nutritiva con 150mM de NaCl durante 20 días más. A los 50 días de la siembra, se cosecharon las plantas del ensayo.

7. Procesamiento de las muestras

Tras la cosecha de los diferentes ensayos, las plantas intactas se sacaron de las macetas, se separaron las raíces de los vástagos y se lavaron con agua destilada para eliminar restos de sustrato. Posteriormente, raíces y vástagos, se secaron a 70°C hasta alcanzar un peso constante. Las muestras secas se molieron en molinillo automático hasta la obtención de un polvo fino, y se almacenaron a temperatura ambiente.

Paralelamente, parte de las muestras frescas se congelaron en el momento del muestreo en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C hasta su utilización en las determinaciones analíticas que así lo requirieron.

8. Procedimientos analíticos

8.1. Parámetros de crecimiento

Al momento de la cosecha se realizaron determinaciones no destructivas. Se midió la longitud y el diámetro del tallo principal y se contaron sus nudos. Se contó el número de flores y frutos de la planta entera y se registraron los brotes de la corona y las ramificaciones que contenían. En algunos casos, se estimó el área foliar de la 4^o hoja verdadera, mediante la utilización de un escáner y del programa Image-Pro. También se determinó el peso fresco y el peso seco del vástago y de las raíces.

8.2. Relaciones hídricas

8.2.1. Potencial hídrico

Previo a la cosecha, se determinó *in situ* el potencial hídrico de la parte aérea de plantas control y de plantas tratadas. Para ello, a primera hora de la mañana se trasladó la cámara de Scholander a la cámara de cultivo y se

cortó una porción del tallo principal de, aproximadamente, 15 cm de largo (Foto 4). Inmediatamente, con el fin de evitar alteraciones en la medición, se introdujo en la cámara el extremo terminal del tallo cortado y se midió su potencial hídrico. Se realizaron tres repeticiones por población y por tratamiento, dentro de cada bloque.



Foto 4: Cámara de Scholander utilizada para la determinación del potencial hídrico.

8.2.2. Potencial osmótico

Se determinó el potencial osmótico del contenido celular con el osmómetro crioscópico OSMOMAT 030. Para ello se estrujó 1 gramo de hojas frescas en una jeringa descartable, permitiendo juntar 50 μ l, que es el volumen necesario para introducir en el aparato de medición. Se realizaron 3 repeticiones biológicas y 3 repeticiones técnicas.

8.2.3. Presión de turgencia

La presión de turgencia se calculó a partir de los valores de potencial hídrico y osmótico, mediante la fórmula (Salisbury y Ross, 1992; Sibole *et al.*, 2005):

$$P = \psi_a - \psi_s$$

Siendo:

P = presión de turgencia,

ψ_a = potencial hídrico,

ψ_s = potencial osmótico.

8.3. Cationes ($\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Ca}^{2+}$)

A 10mg de tejido seco y finamente molido, se le agregó 1 ml de HCl 0,1N. Los tubos se agitaron y se sumergieron en un baño térmico a 60 °C durante 2 horas. Se enfriaron a temperatura ambiente y se centrifugaron 5 minutos a 10.000 rpm. Se recuperó el sobrenadante y se determinaron las concentraciones de sodio, potasio y calcio en un Fotómetro de llama (Marca Zeltec, Modelo ZF 250). Los valores obtenidos se interpolaron en una curva de calibración para los tres elementos a determinar.

8.4. Cloruros

En tubos pirex con rosca se digirieron 25 mg de muestra seca y molida con la mezcla compuesta por 1 ml de peróxido de hidrógeno al 30%, 1 ml de ácido nítrico concentrado y una gota de alcohol isoamílico. Los tubos tapados permanecieron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras la digestión, se aforó la solución resultante a 10ml con agua destilada y se centrifugó 5 minutos a 10.000 rpm. A 320 μl del sobrenadante recuperado se le añadió 1 ml de reactivo de Merk (Spectroquant® 1.14755.0001 Cloruros) compuesto por 15 ml de solución de Tiocianato de mercurio (4,17 g/L metanol), 15 ml de solución de nitrato de hierro (202 g de nitrato de hierro + 21 ml de ácido nítrico concentrado, enrasado a 1 L con H_2O destilada) y 50 μl de Brij® 35 (polyethylene glycol dodecyl ether) al 4%. Tras mezclar bien se leyó la absorbancia a 450 nm y los valores obtenidos se interpolaron en una curva de calibración comprendida entre 0-40mg/L.

8.5. Prolina

Se pesó 50mg de tejido fresco y molido en nitrógeno líquido, y se fraccionó en un microtubo de 1,5 ml conteniendo 0,2 ml H₂O; posteriormente se agitó vigorosamente y se hirvió durante 30min. La mezcla resultante se centrifugó durante 10 minutos a 14.000 rpm. A 100 µl del sobrenadante se le agregaron 0,1 ml de buffer citrato de sodio (0,2 M a pH 4.6) y 0,4 ml de ninhidrina 1% p/v en 60:40 acético:agua (v:v). Se hirvió durante 45 minutos y tras enfriar a temperatura ambiente, se le agregó 0,8 ml tolueno. Tras agitar se recuperó la fase orgánica y se leyó su absorbancia a 515 nm, interpolando los valores obtenidos en una curva de calibración.

8.6. Poliaminas

El contenido de poliaminas libres se determinó según el método de Marcé *et al.* (1995), basado en la dansilación de las mismas y su separación y cuantificación por HPLC con detección de fluorescencia. Para ello, se trabajó con material vegetal congelado y molido con nitrógeno líquido. Muestras de 100mg de dicho material se mezclaron con 1 ml de ácido perclórico (PCA) al 5% (v/v) y se incubaron a 4 °C para favorecer la extracción de las poliaminas. A las 24 horas, los extractos se centrifugaron 10 minutos a 10.000 rpm.

Para obtener los derivados dansilados de las poliaminas, se colectaron alícuotas de 200 µl de las muestras en PCA 5% (v/v), a las cuales se les agregó 10 µl de una solución 0,1 mM de 1,7-diaminoheptano (estándar interno), 200 µl de una solución saturada en Na₂CO₃ y 400 µl de una solución de cloruro de dansilo en acetona (10mg ml⁻¹). La reacción de dansilación se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 15 horas y se detuvo agregando 100 µl de una solución de prolina en agua (100mg ml⁻¹). Las aminas dansiladas se extrajeron con 500 µl de tolueno. La fase orgánica se evaporó al vacío y los productos de la reacción fueron disueltos en 200 µl de acetonitrilo. Las poliaminas dansiladas se analizaron con un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) que constó de una bomba *ISCO 2350*, un programador de gradiente *ISCO 2360*, una columna de fase reversa (*Sephasil C18*, Amersham Pharmacia) y un detector de fluorescencia *Variant fluorichom*. La mezcla de

solventes, a un flujo de $1,5 \text{ ml min}^{-1}$, se desarrollo según el siguiente programa de gradiente:

0 a 4,5 min: 70% acetonitrilo: 30 % agua

4,5 a 9 min: 70% acetonitrilo: 30 % agua a 100% acetonitrilo

9 a 15 min: 100% acetonitrilo

15 a 16 min: 100% acetonitrilo a 70% acetonitrilo: 30 % agua

16 a 22 min: 70% acetonitrilo: 30% agua

Las áreas de los picos correspondientes a cada poliamina se integraron y normalizaron en función del área correspondiente al pico del estándar interno y se interpolaron en una curva de calibración, obtenida con patrones comerciales de cada poliamina.

8.7. Carbohidratos

8.7.1. Obtención del extracto

Se partió de 25 mg de material seco a los que se agregaron 10ml de etanol caliente al 80%. Se hirvieron durante 10 minutos, se centrifugaron a 4°C a 10.000 rpm y se colectó el sobrenadante en un recipiente aparte. El proceso se repitió cuatro veces. El extracto alcohólico obtenido se secó con ayuda de un rotavapor a 50°C , se resuspendió en 25 ml de agua destilada y se filtró en papel Whatman nº 2. El extracto acuoso se almacenó a -20°C para su posterior análisis.

El precipitado, resultante de la extracción etanólica, se utilizó para la determinación de almidón. Para ello se digirió durante 24 h a temperatura ambiente con 5 ml de ácido perclórico 35%. Se llevó a volumen de 25 ml con agua destilada, se filtró y se guardó a 4°C hasta su análisis.

8.7.2. Determinación de azúcares solubles totales y almidón

Para la determinación de los azúcares solubles totales y del almidón se utilizó el método del fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). Para ello a 0,4 ml

de las muestras acuosas se les adicionaron 0,4 ml de fenol al 5%. Rápidamente, se agregaron 2 ml de ácido sulfúrico concentrado, contra la superficie del líquido para que la mezcla desprendiera calor. Se agitó vigorosamente y a los 30 minutos se leyó la absorbancia a 490 nm. Los valores obtenidos se interpolaron en una curva de calibración de glucosa (Foto 5) y los resultados se expresaron en % de peso seco según la fórmula:

$$\% \text{ azúcares totales} = \frac{\mu\text{g glucosa} \times \text{volumen final (ml)} \times 100}{\text{vol. analizado (ml)} \times 1000 \times \text{mg muestra seca}}$$

En el caso del almidón, el resultado obtenido se multiplicó por 0,9 para compensar la molécula adicional de agua que tiene la glucosa.

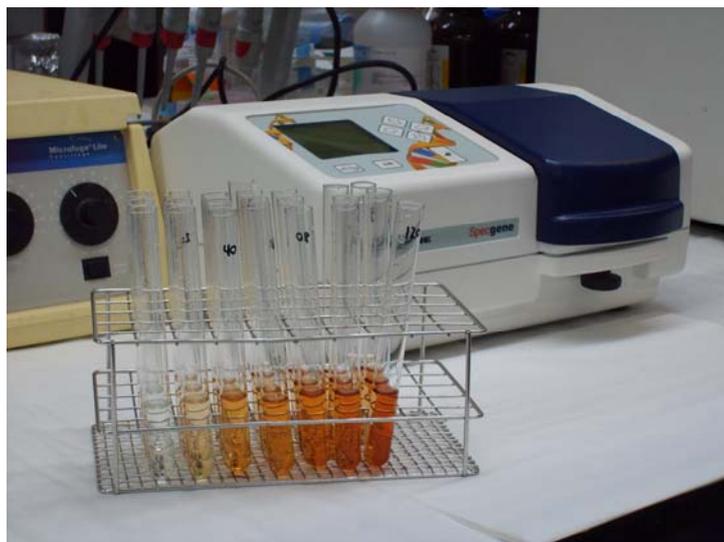


Foto 5: Espectrofotómetro y curva de calibración para la determinación de azúcares totales y de almidón.

8.7.3. Determinación de sacarosa

Para la determinación de sacarosa se siguió el método de la reacción con resorcina. Tres repeticiones de 2,5 ml por muestra se llevaron a estufa de secado (62°C) hasta evaporación total. A cada muestra se le agregó 0,3 ml de NaOH 2N, 1,2 ml de solución de resorcina (1 mg · ml⁻¹ etanol) y 3,6

ml de CIH 30%. Tras 10 minutos de incubación en un baño a 80°C, se enfriaron en hielo y se midió la absorbancia a 490 nm. La curva de calibración se realizó con sacarosa entre 0-120 µg y los datos obtenidos se expresaron como porcentaje de peso seco aplicando la fórmula:

$$\% \text{ sacarosa} = \frac{\mu\text{g sacarosa} \times \text{volumen final (ml)} \times 100}{\text{vol. analizado (ml)} \times 1000 \times \text{mg muestra}}$$

8.8. Clorofilas y Carotenoides

Se utilizó el método descrito por Lichtenthaler (1987). Para ello, 100mg de hojas frescas se trituraron en frío con 1 ml de acetona. El extracto obtenido se centrifugó a 10.000 rpm durante 4 minutos a 4°C. Se midió la absorbancia del sobrenadante a 470, 647 y 663 nm. Para la conversión de los datos de absorbancia a µg de pigmento por ml de extracto, se aplicaron las ecuaciones:

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

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

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

214

8.9. Proteínas y perfil proteico

8.9.1. Extracción y cuantificación proteica

Muestras de 0,5g de hojas frescas congeladas en N₂ líquido y almacenadas a -80°C se trituraron en frío con un homogeneizador Polytron PT 10-35, en presencia de 2 ml del tampón de extracción (TEP) (50mM de Tris-

HCl (pH 7,5), 15mM de MgCl, 100mM de KCl, 0,25mM de sacarosa, 10% de glicerol, 4% de PVPP, 1mM DTT, 1mM PMFS (Sigma P-7626), 2% de β -mercaptoetanol). Los inhibidores DTT, PMFS y β -mercaptoetanol, junto con 20 μ l del kit de inhibidores de proteasas (*Protease Inhibitor cocktail*, Sigma P-9599) se añadieron en el momento de la extracción.

El extracto obtenido se centrifugó a 20.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se recogió el sobrenadante y se volvió a centrifugar a 15.300 rpm durante 5 minutos a 4°C, con el fin de eliminar cualquier partícula no precipitada.

El sobrenadante recuperado se mantuvo en hielo y una alícuota se utilizó inmediatamente para la cuantificación de la actividad carboxilasa del enzima RubisCO (apartado 8.10). El resto se utilizó para la cuantificación de la cantidad de proteínas y para su separación en geles de poliacrilamida en SDS.

La cantidad de proteína soluble se cuantificó por el método de Bradford (1976), utilizando BSA (*bovine serum albumine*) como solución estándar. Se siguió el método reseñado por el fabricante del reactivo (Bio-Rad Protein Assay) en el que un volumen final de 0,1 ml del extracto convenientemente diluido reaccionó con 5 ml del reactivo Coomassie Brilliant Blue G-250, diluido 1:4. Tras 15 minutos para la estabilización del color, se midió la absorbancia a 595 nm, interpolándose los valores en una curva patrón de BSA comprendida entre 20 y 140 μ g de proteína.

8.9.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida en SDS

Las proteínas presentes en el extracto se separaron en geles de poliacrilamida en SDS. Se utilizó el sistema de minigeles de BioRad. Los geles de 1,5 mm de espesor constaron de dos fases. La fase inferior de separación (*running*) formada por el tampón Tris-HCl 0,75 M pH 8,8 + 0,2% SDS, acrilamida/bisacrilamida 10%, TEMED y persulfato amónico 10%, y la fase superior de empaquetamiento (*stacking*) formada por el tampón Tris-HCl 0,25M pH 6,8 + 0,2% SDS, acrilamida/bisacrilamida 3%, TEMED y persulfato amónico 10%. El procedimiento de preparar el gel completo consistió en añadir el gel *running* y colocar agua fría encima para su polimerización (30-60 minutos). Una

vez polimerizado se eliminó el agua y se añadió el gel *stacking* junto con el peine y se dejó polimerizar (30-60 min).

Las muestras se prepararon con el tampón de carga Tris-HCl 0,3 M pH 6,8, 7,5% SDS, 0,1 M DTT, 10mM EDTA, sacarosa 30% y 0,25 mg/mL de azul de bromofenol. Se calentaron a 95°C durante 5 minutos, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se les dio un *spin* de centrifuga antes de cargarlas al gel en volúmenes inferiores a 45 µL. Se cargó como marcadores de peso molecular el kit de proteínas PageRuler^{RT} Prestained Protein Ladder (Fermentas SM0671), conteniendo el rango de PM comprendido entre 170-10kD.

El gel se corrió durante 40-45 minutos a 150 voltios, utilizando como tampón de electrodos glicina 1,92M +1% SDS llevado a pH 8,3 con Tris. Al finalizar la carrera electroforética, el gel se tiñó durante 1 hora, a temperatura ambiente y en agitación constante, en la solución compuesta por 0,05% Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% metanol, 10% ácido acético. Posteriormente, el gel se destiñó en la solución formada por metanol + ácido acético glacial (4:1, v/v) hasta la visualización nítida de las bandas proteicas. Finalmente, se eliminó la solución de desteñido, se añadió agua destilada e inmediatamente los geles se escanearon.

8.10. Actividad carboxilasa del enzima ribulosa bifosfato

La actividad carboxilasa de la RubisCO se determinó siguiendo esencialmente el método de Lorimer *et al.* (1976) basado en la incorporación del ¹⁴C, introducido en el ensayo como [¹⁴C]-NaHCO₃ (Amersham, 51,7 Ci/mol), en productos estables al tratamiento ácido 3-fosfoglicerato. El ensayo se realizó con el enzima presente en 20 µl del extracto homogeneizado anteriormente con el tampón TEP. La RubisCO se llevó a un volumen final de 200 µl con tampón de preincubación (Tris-HCl 100mM pH 8,2, MgCl₂ 10mM y NaHCO₃ 10mM) y se preincubó en viales de plástico (Biovial, Beckman) durante 10min a 30 °C, con la finalidad de activar el enzima.

La reacción se inició con la adición de 50 μl de Tris-HCl 100mM pH 8,2, MgCl_2 10mM, 55 mM ^{14}C - NaHCO_3 (4×10^8 dpm/mmol) y RubisCO (Sigma) 2,3mM, y se detuvo, después de 1 minuto de incubación a 30°C, mediante la adición de 50 μl de HCl 2M. El ^{14}C - NaHCO_3 no fijado fue eliminado evaporando las muestras a 80°C en una estufa de vacío, realizando esta operación dos veces tras disolver el residuo seco en 200 μl de agua. El residuo final se resuspendió en 200 μl de agua, se añadieron 3 ml de mezcla de centelleo (Cocktail-22 Normascint, Scharlau) y se midió la radiactividad del ^{14}C incorporado mediante un contador de centelleo LKB Rack Beta, realizando el cálculo de la eficiencia del conteo mediante el método del estándar externo.

El cálculo preciso de la radiactividad específica del sustrato marcado, ^{14}C - NaHCO_3 , se realizó contando la marca introducida en cada ensayo. Para ello se añadieron 50 μl de la disolución radiactiva, con la que se inició el ensayo, a 3 ml de mezcla de centelleo alcalina, 0,98 g de PPO (Scharlau) y 0,2 g de POPOP (Merck) en 115 ml de la mezcla tolueno/feniletilamina/agua/metanol (57:50:5:3, v/v) y se procedió a contar la radioactividad. La eficiencia del conteo se determinó por el método de la relación entre canales.

9. Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media de las repeticiones con su respectiva desviación estándar. El número de repeticiones se especifica en las leyendas de las figuras o pies de las tablas; cada tratamiento consistió de al menos tres repeticiones. Las medias de cada tratamiento con el control, y las medias entre sí, se compararon mediante análisis de ANOVA y luego por LSD o Tukey, utilizando el programa Statistix 8.1.

RESULTADOS

I. EVALUACIÓN DE LA VARIABILIDAD EN LA TOLERANCIA A ESTRÉS SALINO Y LAS RESPUESTAS ASOCIADAS, EN GENOTIPOS DE UNA VARIEDAD COMERCIAL DE *LOTUS TENUIS*

En virtud de que existe gran variabilidad fenotípica dentro de una población de *L. tenuis*, quisimos analizar si existía variabilidad en la tolerancia a salinidad entre los genotipos que la componen. Con tal finalidad, se evaluó la respuesta a estrés salino en un número significativo de genotipos pertenecientes a una población de *L. tenuis* denominada Pampa INTA, la cual fue mejorada por su capacidad para tolerar situaciones de estrés salino-alkalino y luego registrada como variedad comercial por el Ing. González García de la E.E.A. Balcarce INTA por Resolución 288/98 del Registro Nacional de Propiedad de cultivares (1998).

1. Selección de genotipos ante la exposición a 300mM de NaCl

A pesar de tratarse de un material obtenido por mejoramiento tradicional, pudimos observar a través de la evaluación de parámetros tales como el porte de planta (erecto y rastrero); el color del follaje (verde claro y verde glauco); el tamaño de los folíolos; entre otros, que se trata de una población fenotípicamente muy heterogénea (Foto 6).



Foto 6: Contrastes de caracteres morfológicos entre genotipos de la misma población.

a. Porte de planta: erecto (izquierda) y rastrero (derecha). **b.** Tamaño de folíolos: pequeños (izquierda) y grandes (derecha). **c.** Color del follaje: verde glauco (izquierda) y verde claro (derecha).

Se realizó un análisis comparativo de la supervivencia a 300mM de NaCl, de 107 individuos clonados de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos. En base al índice de tolerancia, se ordenaron y se seleccionaron aquellos ubicados en los extremos de la curva Gaussiana (Figura 7). Se obtuvieron dos grupos:

- a) aquel que reunía a los genotipos 6, 13, 17, 86 y 95, con menor tolerancia a 300mM de NaCl, considerados “sensibles” y que en promedio llegaron a 15 días de supervivencia y,
- b) en el otro extremo, el grupo de “mayor tolerancia”, con un promedio de 27 días de supervivencia, formado por los genotipos 1, 62, 63, 64 y 80.

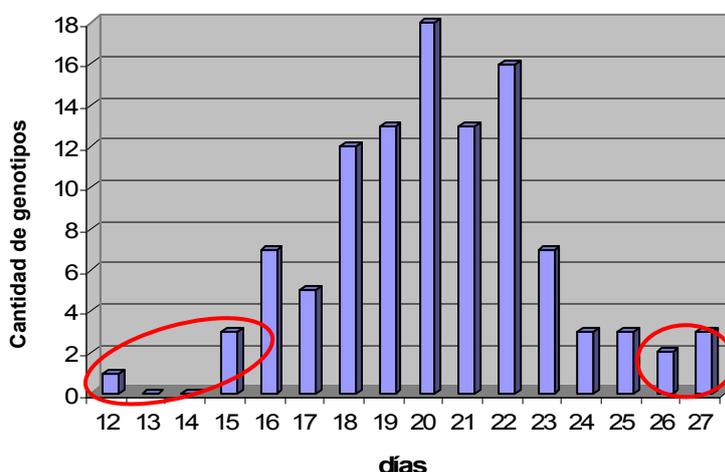


Figura 7: Gráfico de frecuencia de genotipos en función del promedio en días de supervivencia a 300mM de NaCl.

2. Evaluación de la tolerancia a 150mM de NaCl en los genotipos que resultaron contrastantes

Los genotipos seleccionados según su comportamiento a 300mM de NaCl, se clonaron nuevamente en un número significativo y se expusieron a 150mM de NaCl, con el fin de evaluar otros parámetros de tolerancia ante un estrés considerado “menos drástico”.

2.1. Parámetros de crecimiento

En las condiciones ensayadas, ninguno de los genotipos cesó su crecimiento durante los primeros 19 días de riego bajo estrés salino, aunque todos disminuyeron la tasa de crecimiento con respecto a los controles. Esto surge de calcular el incremento en peso seco relativo diario (IPR_{diario}) de tres cosechas a distintos tiempos durante el período de ensayo. Cada dato, a su vez, se corresponde con cuatro repeticiones en el tiempo (Figura 8 A y B).

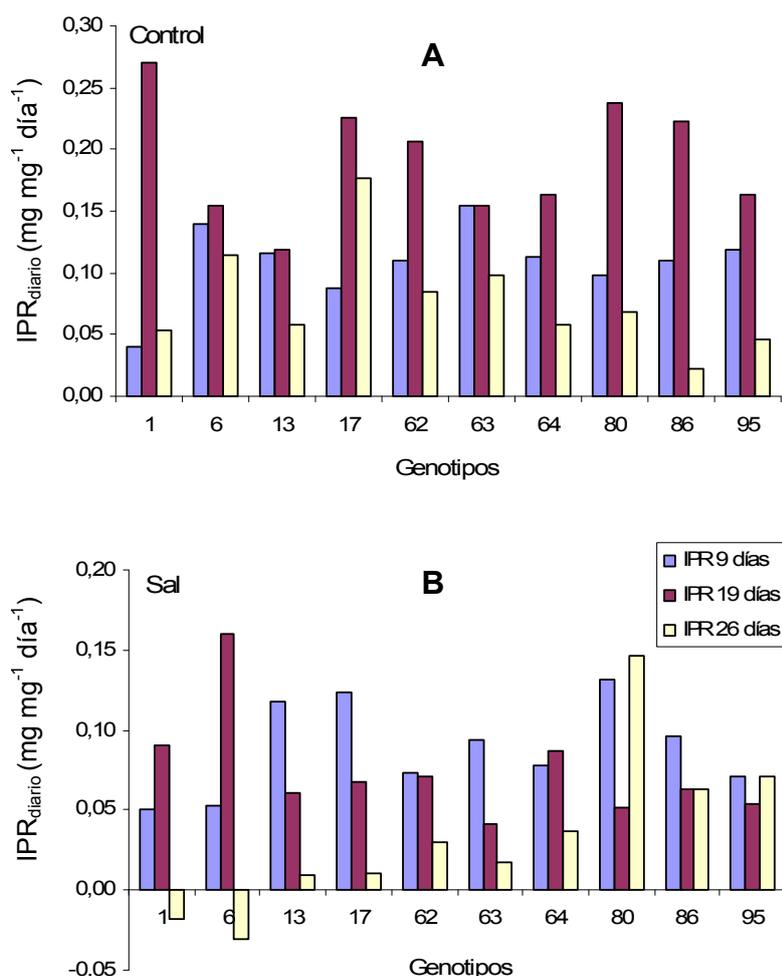


Figura 8: Incremento en peso seco relativo diario ($\text{mg mg}^{-1} \text{ día}^{-1}$) de la parte aérea de diez genotipos bajo condiciones control (A) y expuestos a 150mM de NaCl durante 26 días (B). Se grafican los datos promedio de cuatro muestras (bloqueadas en el tiempo), con seis repeticiones cada una, para las tres cosechas realizadas durante el período de ensayo.

Si consideramos las tasas de crecimiento hacia el final del ensayo (a los 26 días), las respuestas fueron más dispares, existiendo una mayor

diferencia entre plantas tratadas y sus respectivos controles. Cabe destacar algunos casos concretos:

- a) dos genotipos, numerados 1 y 6, los cuales presentaron mayor crecimiento a los 19 días, y valores de IPR_{diario} negativos hacia el final del ensayo. Incrementos negativos indicarían una tasa de crecimiento nula y pérdida de peso seco debida a tejido senescente;
- b) el genotipo 80, el cual presentó el mayor IPR_{diario} a los 26 días, fue uno de los que menos creció al cabo de 19 días de exposición a 150mM de NaCl (Figura 8).

Al considerar los pesos secos promedio para cada genotipo al comienzo de los tratamientos y en cada una de las cosechas, pudimos asumir una relativa homogeneidad en el tamaño inicial de los materiales al comienzo del ensayo. El peso seco promedio fue de 4 g por planta para la gran mayoría de los genotipos. Diferencias significativas fueron observadas para los genotipos 1 y 17, cuyos pesos secos por planta fueron de 5,8g y 2,74g, respectivamente (Tukey, α : 0,05). Sin embargo, a pesar de que los pesos secos de las plantas tratadas fueron menores que los de las plantas controles, ni a los 9 días de comenzada la salinización, ni a los 19 días se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos. Tampoco fue posible observarlos entre los genotipos dentro de un mismo tratamiento (Tukey, α : 0,05). Recién a los 26 días se registraron diferencias significativas en aquellos genotipos cuyos pesos secos en condiciones de estrés llegaron a representar 35 % o menos que el de las plantas control (Figura 9). Se establecieron así dos grupos bien definidos:

- a) aquellos genotipos cuyo porcentaje de peso seco control bajo condiciones de salinidad fue superior al 35 % y,
- b) aquellos cuyo porcentaje de peso se encontraba en dicho límite o por debajo del mismo.

Dentro del primer grupo se encontraban los genotipos 13, 64, 80, 86 y 95, considerados “tolerantes”, y dentro del segundo grupo quedaron agrupados los genotipos 1, 6, 17, 62 y 63, considerados “sensibles”.

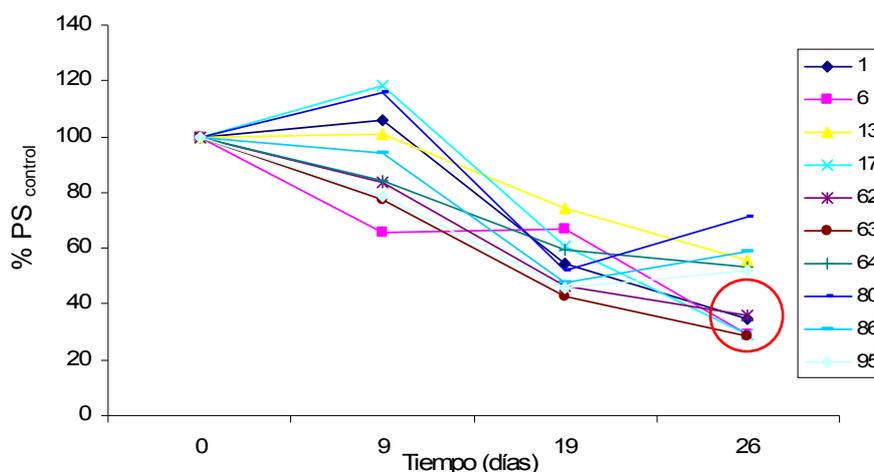


Figura 9: Evolución del peso seco aéreo de diferentes genotipos de una población de *L. tenuis* expuesta a 150mM de NaCl durante 26 días. Los datos representan un promedio de cuatro cosechas con cuatro repeticiones cada una, y se expresan como el porcentaje del peso seco aéreo control. Los datos que encierra el círculo se diferencian significativamente del resto (LSD, α : 0,01).

2.2. Parámetros bioquímicos

En base a los resultados obtenidos en cuanto al crecimiento, se seleccionaron genotipos de cada uno de estos dos nuevos grupos contrastantes, establecidos en base al criterio de tolerancia a la exposición a 150mM de NaCl. Sobre dos genotipos considerados “tolerantes” (13 y 80) y sobre los tres considerados “sensibles” (6, 17 y 63) se realizaron determinaciones bioquímicas tratando de encontrar si existen respuestas diferenciales que se correspondan con el criterio de selección utilizado.

2.2.1. Solutos inorgánicos

Se determinaron los contenidos de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} en la parte aérea y en la raíz de los genotipos en evaluación (Tabla 5).

El contenido de Na^+ en la parte aérea y en la raíz, aumentó significativamente en las plantas expuestas a salinidad con excepción del genotipo 6, en el cual no se encontraron diferencias significativas en la parte aérea. A pesar de tratarse de genotipos de una misma población de *L. tenuis*,

se encontraron diferencias significativas entre los mismos bajo iguales condiciones de crecimiento y de estrés, tanto de la parte aérea como de la raíz.

En el caso del K⁺, se observó una disminución significativa de su contenido en la parte aérea de todos los clones expuestos a NaCl, y también se encontraron diferencias entre genotipos. En la raíz no se detectaron diferencias significativas entre tratamientos, aunque sí entre genotipos.

El análisis de los niveles de Ca²⁺ permitió observar una tendencia a disminuir la concentración sin registrarse diferencias significativas entre tratamientos. Por el contrario, sí pudieron detectarse diferencias significativas entre genotipos, tanto en la parte aérea como en la raíz (Tabla 1).

300mM NaCl	150mM NaCl	Genotipo	Tratamiento	Na ⁺ mg g ⁻¹ PS	K ⁺ mg g ⁻¹ PS	Ca ²⁺ mg g ⁻¹ PS
PARTE AEREA						
S	S	6	Control	12,4 ± 1,75	17,3 ± 2,4	15,7 ± 1,3
			Sal	14,4 ± 4,4 a	9,8 ± 5,1 *a	9,0 ± 3,6 c
S	S	17	Control	6,2 ± 3,6	41,5 ± 21,8	35,5 ± 18,5
			Sal	22,8 ± 10,7 *ab	25,4 ± 5,7 *b	24,5 ± 4,8 a
T	T	80	Control	11,1 ± 1,3	40,6 ± 3,6	33,0 ± 3,0
			Sal	34,8 ± 13,3 *bc	22,6 ± 3,7 *b	22,2 ± 6,0 ab
S	T	13	Control	7,2 ± 2,1	31,6 ± 6,9	22,1 ± 4,9
			Sal	36,0 ± 10,5 *bc	9,7 ± 5,1 *a	14,1 ± 2,4 bc
T	S	63	Control	9,7 ± 1,2	38,6 ± 5,5	34,0 ± 3,4
			Sal	42,5 ± 11,7 *c	21,9 ± 4,7 *b	21,4 ± 7,8 ab
PARTE RADICAL						
S	S	6	Control	8,9 ± 2,6	69,2 ± 20,3	53,1 ± 12,9
			Sal	27,0 ± 4,8 *b	57,3 ± 10,4 a	49,4 ± 9,6 a
S	S	17	Control	3,0 ± 1,0	37,1 ± 10,5	25,4 ± 6,5
			Sal	13,1 ± 5,5 *a	29,6 ± 10,6 b	22,4 ± 9,6 ab
T	T	80	Control	5,3 ± 3,3	70,8 ± 13,2	32,4 ± 6,9
			Sal	29,7 ± 6,8 *b	55,4 ± 14,3 a	29,2 ± 7,5 ab
S	T	13	Control	2,3 ± 1,4	45,0 ± 11,8	21,8 ± 6,5
			Sal	31,9 ± 5,6 *b	58,8 ± 6,9 a	34,2 ± 5,2 ab
T	S	63	Control	4,7 ± ND	47,8 ± 3,9	13,2 ± 4,9
			Sal	13,9 ± 5,6 a	40,5 ± 19,2 ab	16,5 ± 8,6 b

Tabla 1: Cambios en el contenido de Na⁺, K⁺ y Ca²⁺ de genotipos de una población de *L. tenuis*, expuestos durante 19 días a 150mM de NaCl. En las columnas de la izquierda se indica para cada genotipo si resultó tolerante (T) o sensible (S) a 300 y a 150mM de NaCl. Los datos representan el promedio de seis repeticiones independientes con sus respectivas desviaciones estándar. ND: dato no disponible. *Diferencias significativas entre tratamientos, y letras distintas en la columna equivalen a diferencias significativas entre genotipos (Tukey, α: 0,05).

2.2.2. Solutos orgánicos

2.2.2.1. Prolina

En la Figura 10 se grafica el contenido de prolina en la parte aérea de plantas de cinco genotipos de una población de *L. tenuis* cuando se expusieron a 150mM de NaCl. El contenido de prolina en los controles resultó estadísticamente igual en todos los genotipos, con un valor promedio de 0,49 μ moles de prolina por gramo de peso fresco (LSD, α : 0,05). En todos los casos, tanto en los genotipos “sensibles” como “tolerantes”, la prolina aumentó significativamente en las plantas tratadas. Se destacó el genotipo 17, el cual acumuló significativamente más prolina que los otros genotipos, en las plantas expuestas a salinidad.

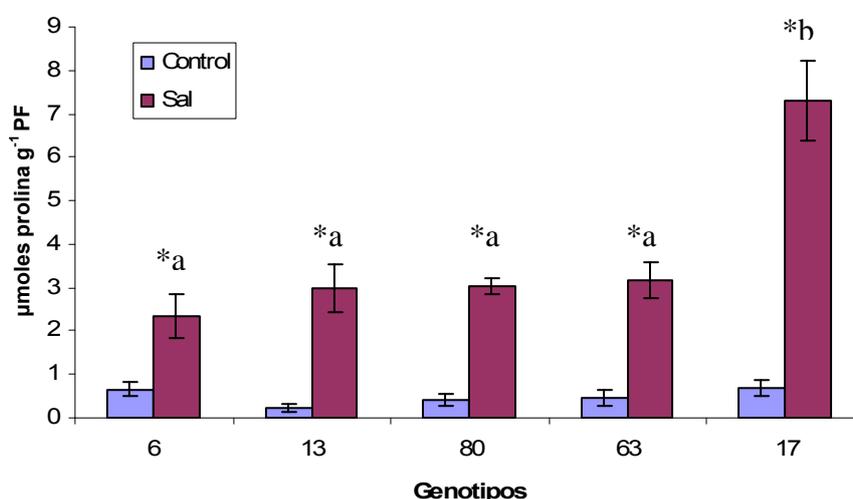


Figura 10: Contenido de prolina (μ moles por gramo de peso fresco) en la parte aérea de clones de *L. tenuis* a los 19 días de exposición a 150mM de NaCl. Los datos son el promedio de cuatro repeticiones con sus respectivos desvíos estándar. *Diferencias significativas entre tratamientos. Letras distintas indican diferencias significativas entre genotipos (LSD, α : 0,05).

2.2.2.2. Carbohidratos

Se determinaron los contenidos de hidratos de carbono en la parte aérea y en la raíz de los materiales seleccionados. Los genotipos 17 y 63 presentaron significativo incremento en el porcentaje de azúcares solubles de la parte aérea, cuando se expusieron las plantas a estrés salino (Figura 11 A). En la raíz se evaluaron tres genotipos, y se encontraron incrementos

significativos en el genotipo 13 y el 80, ambos considerados “tolerantes” (Figura 11 B).

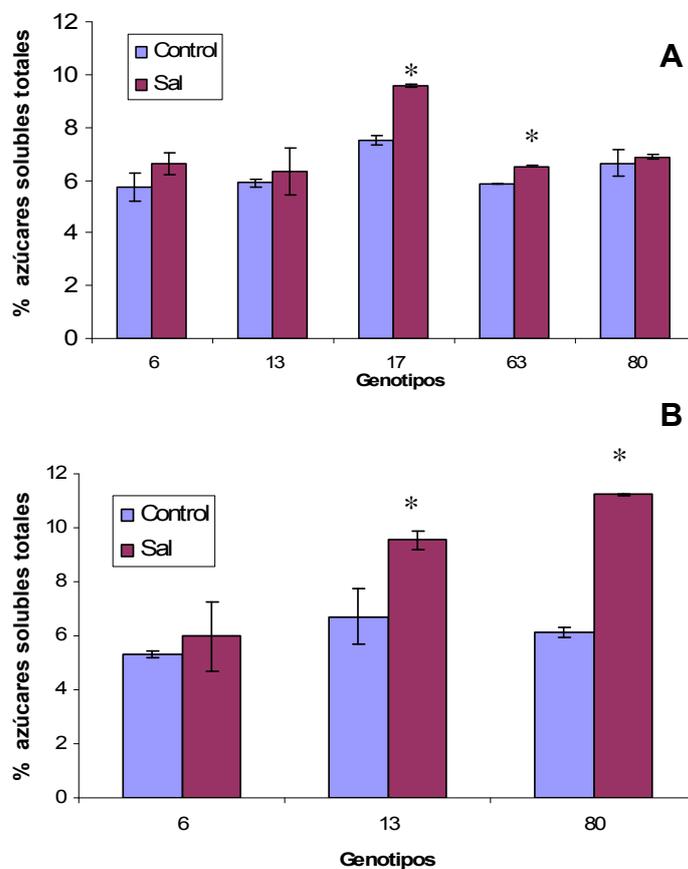


Figura 11: Cambios en el porcentaje de azúcares solubles totales en la parte aérea (A) y en la raíz (B) de clones de *L. tenuis*, expuestos durante 19 días a 150mM de NaCl. Los datos representan el promedio de dos muestras independientes con tres repeticiones técnicas cada una. *Diferencias significativas entre tratamientos (LSD; α : 0,05).

A partir del mismo extracto alcohólico se determinó el contenido de sacarosa (Figura 12). Dicho carbohidrato aumentó significativamente en la parte aérea de todos los clones que se expusieron a salinidad (Figura 12 A). Esta respuesta también se observó en la raíz de los genotipos 6 y 80, cuyos porcentajes de acumulación en las plantas tratadas fueron diferentes sí (LSD; α : 0,05) (Figura 12 B). En la parte aérea de las plantas salinizadas, el contenido de sacarosa fue estadísticamente distinto entre los genotipos. El genotipo 17 (“sensible”) fue el que más sacarosa acumuló, seguido por los genotipos 13 y 63 (“tolerante” y “sensible”, respectivamente), entre los cuales no hubo

diferencias estadísticas entre si, pero si con aquellos que menos sacarosa acumularon (genotipos 6 y 80, “sensible” y “tolerante”, respectivamente) (LSD; α : 0,05).

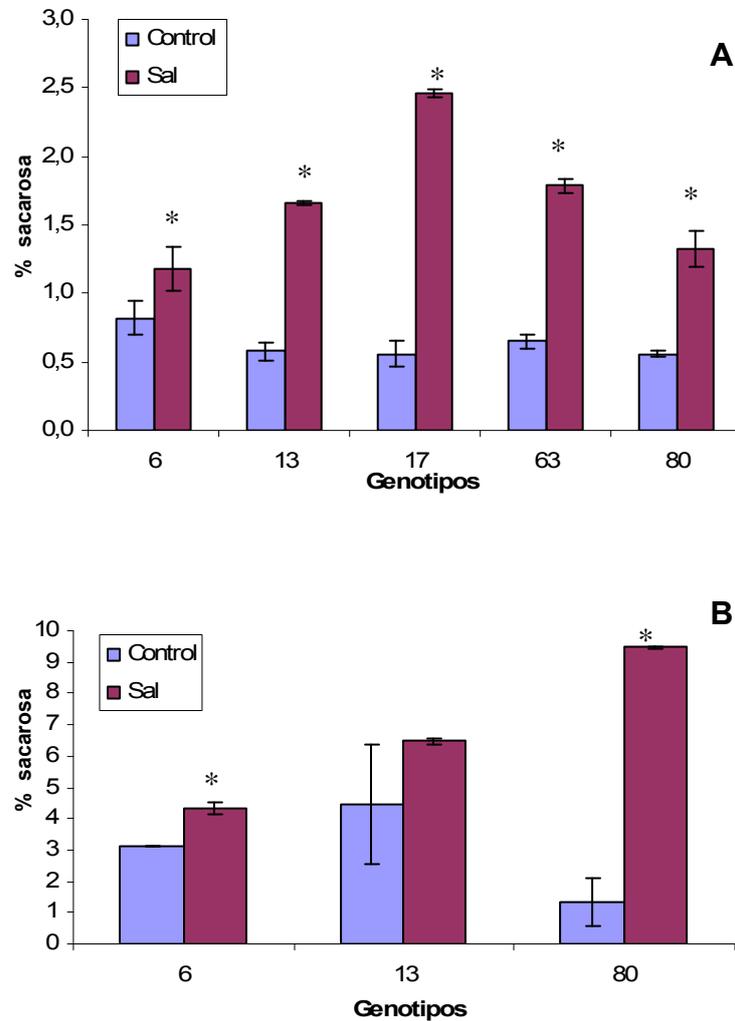


Figura 12: Cambios en el porcentaje de sacarosa en la parte aérea (A) y en la raíz (B) de clones de *L. tenuis*, expuestos durante 19 días a 150mM de NaCl. Los datos representan el promedio de dos muestras independientes con tres repeticiones técnicas cada una. *Diferencias significativas entre tratamientos (LSD; α : 0,05).

También se determinó el porcentaje de almidón en la parte aérea y en la raíz de plantas controles y plantas tratadas (Figura 13). En la parte aérea de plantas expuestas a 150mM de NaCl, el contenido de almidón aumentó significativamente en el genotipo 80 y disminuyó en el 63, mientras que en el resto de los genotipos no se detectaron diferencias significativas (Figura 13 A). Por su parte en la raíz, dicho porcentaje disminuyó significativamente en el

genotipo 6 (“sensible”), y aumentó en los genotipos 13 y 80 (ambos “tolerantes”), sin diferencias significativas entre éstos últimos (Figura 13 B) (LSD; α : 0,05).

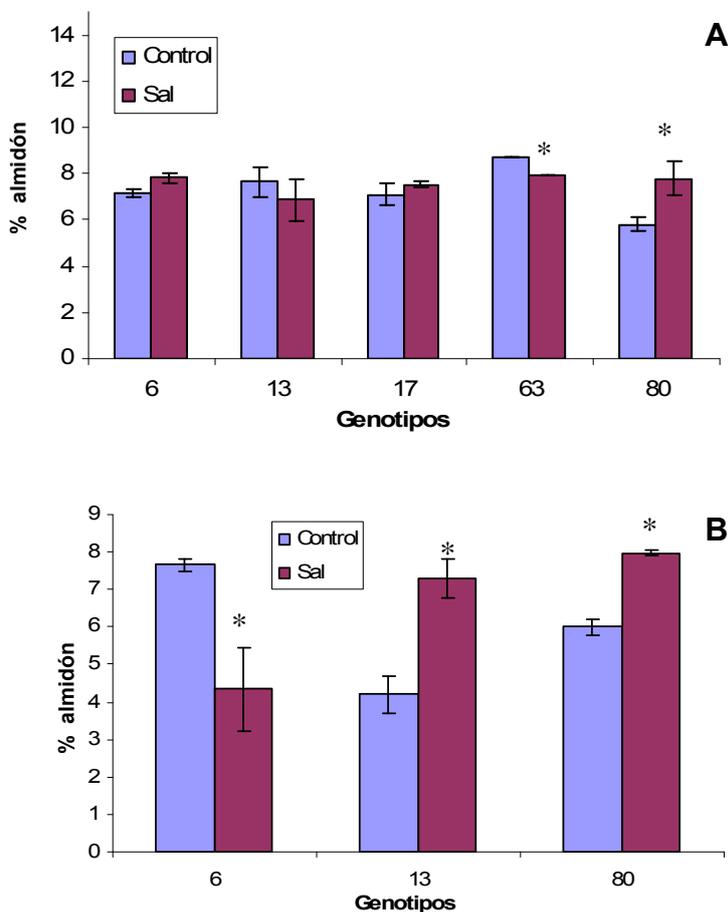


Figura 13: Cambios en el porcentaje de almidón en la parte aérea (A) y en la raíz (B) de clones de *L. tenuis*, expuestos durante 19 días a 150mM de NaCl. Los datos representan el promedio de dos muestras independientes con tres repeticiones técnicas cada una. *Diferencias significativas entre tratamientos (LSD; α : 0,05).

2.2.2.3. Poliaminas

Con respecto a las poliaminas, se determinaron por HPLC los contenidos de putrescina, espermidina y espermina en la parte aérea de plantas de los genotipos evaluados (Figura 14).

El contenido de la diamina de las plantas controles del genotipo 13, fue estadísticamente superior al resto (LSD; α : 0,05). Cuando se comparó cada genotipo tratado con su respectivo control, ni el genotipo 13 ni el 17 tuvieron

diferencias significativas en el contenido de la misma. En los genotipos restantes, la putrescina aumentó con el tratamiento salino, sin diferencias significativas entre los mismos (LSD; α : 0,05) (Figura 14 A).

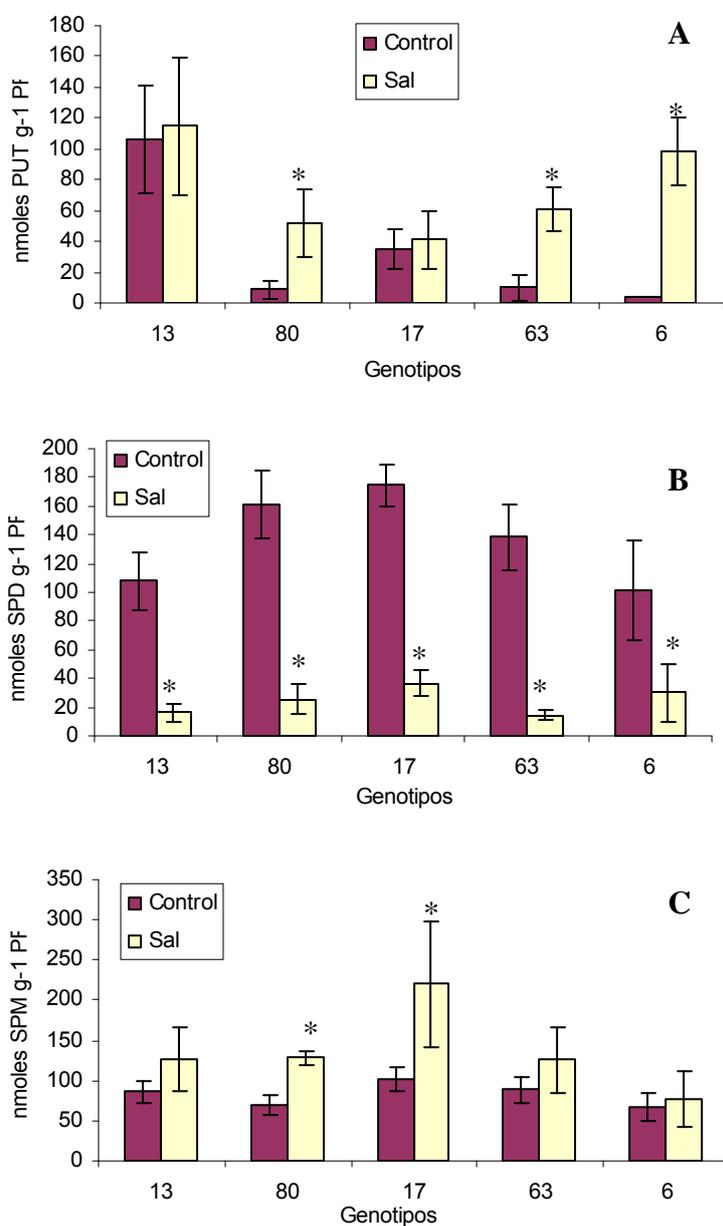


Figura 14: Contenido de Poliaminas libres (nmol g⁻¹ PF): putrescina (A), espermidina (B) y espermina (C) en clones correspondientes a cinco genotipos de *L. tenuis* a los 19 días de exposición a 150mM de NaCl. Los datos son el promedio de seis repeticiones con sus respectivos desvíos estándar. *Diferencias significativas entre tratamientos (LSD, α : 0,05). PUT: putrescina, SPD: espermidina, SPM: espermina.

Por su parte, se encontró una clara e importante disminución de espermidina bajo estrés salino en todos los clones evaluados con respecto a sus controles. En este caso se detectaron diferencias entre genotipos en el contenido de las plantas tratadas (Figura 14 B).

Finalmente, la tendencia del contenido de espermina fue a incrementarse con el tratamiento salino. Sin embargo, sólo se registraron diferencias significativas entre tratamientos, en los genotipos 80 y 17, considerados “tolerante” y “sensible” respectivamente (Figura 14 C).

3. Discusión

Al comienzo de un estrés salino, el componente osmótico es el principal factor que afecta al normal crecimiento de un vegetal, mientras que la toxicidad iónica (debida a la acumulación de Na^+ y Cl^-) y la consecuente deficiencia nutricional, predominan cuando la exposición a salinidad se extiende por un lapso de tiempo (Munns, 1993). En nuestro caso se evaluó el comportamiento de 107 genotipos de *L. tenuis* ante una concentración salina alta (300mM de NaCl) impuesta por shock y extendida durante un lapso de aproximadamente 30 días. En función de lo descrito por Munns (1993) podríamos considerar que los genotipos 6, 13, 17, 86 y 95 presentaron una mayor sensibilidad al estrés hídrico que los genotipos 1, 62, 63, 64 y 80, en los cuales el factor determinante de la muerte de las plantas se asociaría con un efecto tóxico por acumulación de iones.

En un segundo ensayo, con los genotipos que resultaron contrastantes en la respuesta a 300mM de NaCl, se evaluó el comportamiento ante una concentración salina moderada (150mM de NaCl), también impuesta por shock y extendida durante 26 días. En ambas situaciones se encontraron diferencias en la respuesta de los genotipos y esta variabilidad se suma a la previamente reportada en poblaciones de *L. tenuis* en respuesta a diferentes pH del suelo (Stoffella *et al.*, 1998). En nuestro caso, no siempre se pudo correlacionar la tolerancia encontrada a la exposición a 300mM de NaCl, con aquella respuesta de crecimiento observada durante la exposición a 150mM NaCl. Por ejemplo, el genotipo 63 que resultó “tolerante” a 300mM de NaCl no

logró mantener un crecimiento similar al control cuando se lo expuso a 150mM de NaCl. Por el contrario, el genotipo 13, que ante el primer criterio de selección no resultó “tolerante”, al evaluar su comportamiento en condiciones de salinidad menos drásticas, logró un 60% del peso seco control al cabo del ensayo. En este sentido, se destacan los genotipos 64 y 80, los cuales, en ambas situaciones, presentaron un comportamiento de tolerancia. A su vez, el genotipo 80 constituyó aquel que más peso seco acumuló al cabo de 26 días bajo estrés salino, no presentando diferencias significativas con su respectivo control. Estos resultados se asemejan a los descritos por Hartzendorf y Rolletschek (2001) quienes en plantas de *Phragmites Australis* vieron diferencias entre genotipos para la respuesta a diferentes niveles de salinidad.

En correspondencia con el concepto de Munns (1993), a los 19 días de exposición a 150mM de NaCl, el contenido de Na⁺ de plantas estresadas aumentó, y el de K⁺ disminuyó en casi la totalidad de los genotipos evaluados. Sánchez *et al.* (2005) observaron lo mismo, tanto en plántulas como en plantas de un mes de *L. tenuis* expuestas a 25, 50 y 75mM de NaCl en el primer caso, y a 200mM de NaCl en el segundo, durante 15 días. En nuestro ensayo, también detectamos diferencias entre genotipos para la acumulación de Na⁺, siendo dos de los genotipos considerados “tolerantes” (13 y 80) los que más Na⁺ acumularon. Estos datos no se corresponden con los encontrados por Ashraf *et al.* (1986) quienes asociaron la tolerancia a salinidad en tres leguminosas forrajeras (*Medicago sativa*, *Trifolium alexandrinum* y *Trifolium pratense*) con una menor concentración de Na⁺ y una mayor acumulación de Cl⁻ en la parte aérea.

En varios cultivos se ha reportado la existencia de diferencias entre genotipos en la acumulación de prolina durante un estrés salino. En algunos casos, con correlación positiva (Ramanjulu y Sudhakar, 2001; Madan *et al.*, 1995) y en otros negativa (Lutts *et al.*, 1999). En nuestro caso, el genotipo 17 considerado “sensible” por tener bajo estrés salino menos del 35% del peso seco en condiciones control, fue el que estadísticamente acumuló más prolina, duplicando ampliamente el contenido de los otros genotipos evaluados. El incremento de la prolina en plantas de *L. tenuis*, está previamente reportado por Sánchez *et al.* (2005) quienes observaron incrementos de la misma cuando

plantas de un mes se expusieron durante dos semanas a 200mM de NaCl y cuando plántulas de 15 días de edad crecieron en presencia de 50 y 75mM de NaCl. El sentido de la acumulación de prolina con la tolerancia a salinidad no está aún muy claro y existen discrepancias en la posible participación de éste aminoácido como osmolito (Sivakumar *et al.*, 2000; Hartzendorf y Rolletschek, 2001; Lacerda *et al.*, 2003; Kavi Kishor *et al.*, 2005), pudiendo actuar también como estabilizador de proteínas, membranas y estructuras subcelulares; participar en la detoxificación de metales pesados; además de tener efecto sobre la síntesis y actividad enzimática; y de capturar especies reactivas de oxígeno (Maggio *et al.*, 2002; Kavi Kishor *et al.*, 2005; Rodríguez-Pérez, 2006).

La mayoría de los estudios previos sobre respuestas a la salinidad en *Lotus* se focalizaron en el balance iónico y en la acumulación de prolina y poliaminas como solutos compatibles (Sánchez *et al.*, 2005; Teakle *et al.*, 2006 y 2007). Existe escasa bibliografía acerca de la variación en el contenido de carbohidratos ante un estrés salino en *L. tenuis* o en especies relacionadas. Sánchez-Blanco *et al.* (1998), en plantas de *L. creticus* expuestas a 70 y a 140mM de NaCl, no encontraron diferencias significativas con respecto al control en el contenido de azúcares solubles de las hojas. En nuestros materiales las respuestas fueron diferentes entre genotipos; aún así no se pudo encontrar una correlación entre el contenido de carbohidratos y la tolerancia a salinidad. Hartzendorf y Rolletschek (2001) reportaron acerca de la importancia de los carbohidratos como osmoreguladores en plantas de *Phragmites australis* expuestas a salinidad. Por otro lado, en dos genotipos de sorgo forrajero que difieren en la tolerancia a salinidad, el contenido de azúcares solubles aumentó en las hojas de ambos cuando las plántulas se expusieron a 100mM de NaCl durante 8 días (Lacerda *et al.*, 2003).

Existen numerosas evidencias que reportan cambios en los contenidos de poliaminas en respuestas a estreses abióticos en plantas (Bouchereau *et al.*, 1999; Maiale *et al.*, 2004; Sánchez *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2008). Las poliaminas son cationes a pH fisiológico, lo cual implica que pueden jugar un rol importante en la homeostasis iónica. En muchos casos, la acumulación de poliaminas se detectó tempranamente, para luego disminuir a medida que se incrementaba el estrés y su duración (Santa

cruz *et al.*, 1997). En nuestro caso, hemos determinado el contenido de poliaminas en la parte aérea de plantas al finalizar el ensayo, con lo cual no conocemos como fue cambiando el contenido durante el estrés impuesto. La tendencia en los cambios encontrados en los contenidos de espermidina y espermina de los genotipos expuestos a salinidad, concuerdan con lo publicado por Sánchez *et al.* (2005), quienes en 4 líneas de *L. tenuis* expuestas a 75 y a 150mM de NaCl observaron disminución de espermidina e incrementos de espermina a medida que se aumentaba la concentración salina.

4. Conclusión

La variedad comercial de *L. tenuis* Pampa INTA, ha sido seleccionada a partir de varias generaciones desarrolladas sobre suelos de tipo natracuol (salino-alcálico) de la Provincia de Buenos Aires; a pesar de dicho proceso de selección, y a través de dos exhaustivos estudios evaluando la tolerancia a salinidad, pudimos determinar que este material presenta alta heterogeneidad morfofisiológica entre genotipos.

Consideramos a la producción de materia seca como el principal componente de la tolerancia a la salinidad en especies forrajeras. Por lo tanto, bajo condiciones salinas se evaluó el rendimiento con respecto a las plantas control y el IPR_{diario}; en función de ello se seleccionaron genotipos “tolerantes” y “sensibles”. La determinación de parámetros bioquímicos, en general, no permitió llegar a ninguna conclusión acerca de una correlación directa entre alguno de ellos y la tolerancia al estrés impuesto.

En virtud de la variabilidad encontrada entre los genotipos de *L. tenuis* Pampa INTA, concluimos que era necesario ampliar la búsqueda incluyendo material que naturalmente se halla adaptado a las diferentes condiciones edáficas de la Pampa deprimida. También consideramos importante incluir en esa evaluación a otras especies del género, sobre todo a las especies modelo (*L. burtii*, *L. filicaulis*, *L. japonicus*); a la especie nativa de la costa del Mediterráneo (*L. creticus*) por su capacidad de prosperar en ambientes restrictivos y a otra especie forrajera ampliamente utilizada en las praderas de Sudamérica (*L. corniculatus*). Todo esto con el fin de establecer

similitud de respuestas y aportar información a los grupos que están trabajando sobre el mapeo genético de las mismas y sobre la fisiología del estrés del género.

II. RESPUESTA A NIVELES MODERADOS DE SALINIDAD EN PLANTAS DEL GÉNERO *LOTUS*

Como una primera aproximación para estudiar los efectos del estrés salino y las respuestas de adaptación al mismo de plantas del género *Lotus*, expusimos en condiciones estresantes a diferentes variedades comerciales de la especie *Lotus tenuis* (Chajá, Esmeralda y Pampa INTA); a especies consideradas modelo del género *Lotus* (*Lotus burtii*, *Lotus filicaulis* y *Lotus japonicus* MG20) y al *Lotus creticus*, como un ejemplo de especie nativa de la costa española del Mar Mediterráneo.

1. Parámetros de crecimiento

A los 35 días desde la siembra y a los 15 días de tratamiento, las plantas control llegaron a tener longitudes del tallo principal dentro de un rango de 24,6 a 56 cm. Las especies consideradas como modelo presentaron globalmente un mayor desarrollo dentro del grupo de especies estudiadas, siendo *L. filicaulis* y *L. burtii* las especies con un mayor crecimiento. Por el contrario, la especie nativa de la costa mediterránea presentó el menor desarrollo, no superando el 50 % del valor alcanzado para este parámetro por *L. filicaulis*. Esta respuesta en la longitud del tallo de las plantas no fue paralela al crecimiento en longitud de los entrenudos. Aunque, en general, las especies modelo también presentaron los mayores valores de crecimiento en este parámetro, hubo diferencias entre las tres especies. *L. burtii* presentó un mayor crecimiento de los entrenudos, con un valor promedio de 4,6 cm frente a un valor de 3,0 cm que presentaron las plantas de *L. filicaulis*, indicando una mayor densidad foliar en las plantas de esta especie. Un valor intermedio, alrededor de 3,8 cm de longitud, presentaron las plantas de la tercera especie modelo estudiada *L. japonicus* MG20, al igual que la especie mediterránea *L. creticus*, mientras que las distintas variedades comerciales de *L. tenuis* presentaron un crecimiento similar de los entrenudos entre ellas, no superando en ningún caso los 2,5 cm de longitud (Figura 15 A y B).

Cuando las plantas se expusieron a 150mM NaCl, la longitud del tallo principal y la de los entrenudos disminuyeron en promedio 11% y 5% respectivamente; sin embargo, sólo la longitud del tallo principal de *L. tenuis* Chajá disminuyó significativamente.

Durante el período de ensayo, dos de las especies modelos, *L. burtii* y *L. japonicus* MG20, alcanzaron la etapa reproductiva, adelantándose al resto de las especies. La salinidad provocó un incremento significativo de la cantidad de flores por planta de *L. japonicus* MG20 al momento de la cosecha, siendo la proporción de las mismas un 81 % mayor que en las plantas control (Figura 16). Sin embargo, la cantidad de vainas (frutos) por planta no presentó diferencias significativas entre plantas control y tratadas ($4,4 \pm 1,2$ y $4,6 \pm 0,1$; respectivamente). Por su parte, en la especie *L. burtii* no se encontraron diferencias significativas ni en la cantidad de flores (Figura 16) ni de frutos por planta ($4,2 \pm 1,2$ y $4,3 \pm 0,2$; control y tratadas con sal, respectivamente).

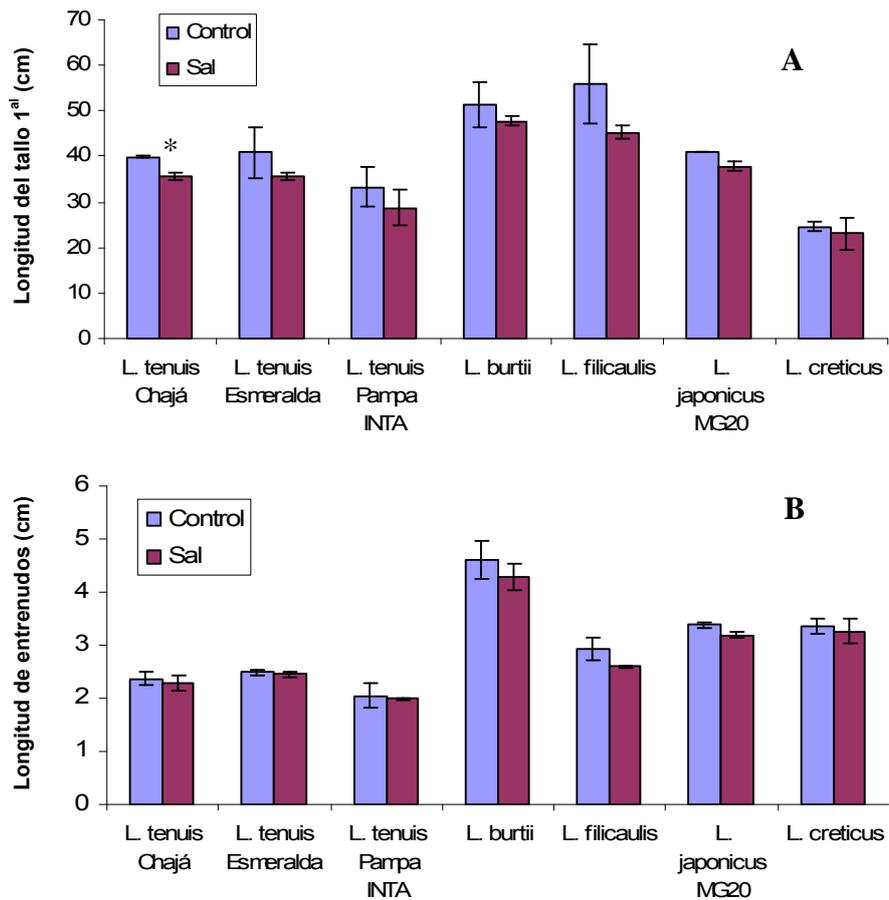


Figura 15: Longitud del tallo principal (A) y longitud media de entrenudos (B) de plantas del género *Lotus* expuestas durante 15 días a 150mM de NaCl, comparadas con sus respectivos controles. Los valores representan un promedio de 2 bandejas con 6 repeticiones cada una, y las barras representan las desviaciones estándar. *Diferencias significativas entre tratamientos (LSD; α : 0,05).

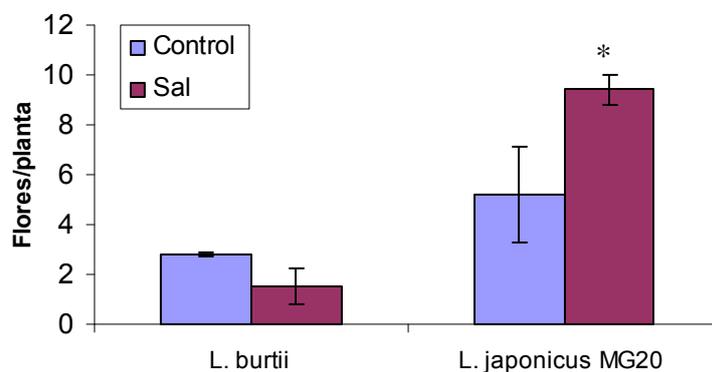


Figura 16: Número de flores por planta en las especies *L. burtii* y *L. japonicus* MG20 tras 15 días de exposición a 150mM de NaCl, comparadas con sus respectivos controles. Los valores representan un promedio de 2 bandejas, con 6 repeticiones cada una, y las barras representan las desviaciones estándar. *Diferencias significativas entre tratamientos (LSD; α : 0,05).

Con respecto a los pesos fresco y seco por planta, en la Tabla 2 se pueden observar los datos obtenidos para todas las especies evaluadas, tanto para la parte aérea como para la raíz. Tres de las especies estudiadas destacan por su comportamiento. *L. tenuis* Pampa INTA (dentro del grupo de las variedades comerciales de *L. tenuis*) y *L. filicaulis* (dentro del grupo de las especies modelo) son las especies que mayor peso por planta alcanzaron con valores de 7,4 g y 7,0 g en peso fresco y de 1,02 y 0,95 g en peso seco, respectivamente. Ello representó incrementos con respecto a las otras especies de su grupo del orden de entre un 35 y un 68% en peso fresco y del 45-50% en peso seco. Es de señalar, sin embargo, que la masa radical de *L. filicaulis* representó sólo el 57% en peso seco de la presentada por las plantas de *L. tenuis* Pampa INTA, siendo su peso comparable al de las otras variedades comerciales de *L. tenuis*, pero duplicando al que presentaron las plantas de las otras dos especies modelo.

La tercera especie a destacar, *L. creticus*, se caracterizó por tener el menor peso fresco y seco por planta de entre todas las especies analizadas. Sus valores no superaron en porcentaje el 15% del peso que presentaron las plantas de *L. tenuis* Pampa INTA y *L. filicaulis*.

Cuando las plantas se regaron con NaCl 150 mM, *L. tenuis* Pampa INTA, *L. filicaulis* y *L. burtii* vieron afectada negativamente su biomasa, aunque los valores obtenidos en esta última especie no alcanzaron la significación estadística debido a la mayor heterogeneidad de su respuesta. *L. tenuis* Pampa INTA redujo un 38% y un 40%, respectivamente, los valores de peso fresco y peso seco alcanzados por las plantas no tratadas. Valores similares se obtuvieron con *L. burtii*, con una reducción del 40% y del 60%, en peso fresco y seco, respectivamente, frente a los valores obtenidos en sus plantas control. La respuesta adversa a la sal fue de mayor intensidad en las plantas de *L. filicaulis*, alcanzando una reducción tanto en peso fresco como seco superior al 60% del peso de las plantas control, aunque a diferencia de las otras dos especies citadas esta reducción se debió a un menor desarrollo de la parte aérea de la planta, no modificando la biomasa radical (Tablas 2 y 3).

Cuando se analizó la relación entre la parte aérea y la radical (Tabla 3), observamos que las plantas control de las variedades comerciales de *L. tenuis* presentaban un índice medio A/R de 6,9 frente al 10,5 que presentaron en promedio las plantas de las especies modelo. Esta diferencia obedeció principalmente a un menor crecimiento radical de las plantas modelo que, globalmente, presentaron una tasa de acumulación de peso seco por planta de 0,05 g frente al 0,1 g que presentaron de promedio las plantas de *L. tenuis*. El peso seco promedio por planta de la parte aérea fue similar para ambos grupos de plantas con un valor de 0,68 g/planta para el grupo de las *L. tenuis* y un valor de 0,65 g/planta para el grupo de las modelo. Mención aparte merece *L. creticus*, que con un índice A/R igual a 11 no se modificó su crecimiento cuando las plantas se regaron con sal (Tabla 2 y 3).

En las plantas regadas con NaCl sólo *L. tenuis* Pampa INTA y *L. filicaulis* redujeron marcadamente el índice A/R, como consecuencia de un menor desarrollo de la parte aérea, sobre todo en la especie modelo, tal y como ya se comentó anteriormente. Las plantas de *L. burtii*, que vieron reducida en mayor medida su biomasa radical, aumentaron su índice A/R al ser tratadas con sal (Tabla 3).

Con respecto al porcentaje del peso seco de la planta entera, en la mayoría de las plantas regadas con sal se produjo un incremento en su peso seco global (Tabla 4), que no se vio reflejado en los parámetros medidos de crecimiento de la parte aérea, ya que ese incremento de dio, principalmente, en el sistema radical (Figura 15, Tabla 2 y 3). En las plantas de *L. tenuis* Pampa INTA y *L. filicaulis* no se encontraron diferencias en el porcentaje de peso seco de la planta control y tratada, mientras que en las plantas de *L. creticus* expuestas a la salinidad, el porcentaje fue mucho menor que el de las plantas control, debido a una mayor acumulación de agua en la parte aérea en las plantas regadas con sal (Tabla 2 y 4).

	PFA		PSA		PFR		PSR		
	(g)	DS	(g)	DS	(g)	DS	(g)	DS	
Control	<i>L. tenuis</i> Chajá	3,8 ± 1,3	bc	0,56 ± 0,22	bc	1,1 ± 0,4	b	0,08 ± 0,03	b
	<i>L. tenuis</i> Esmeralda	3,7 ± 0,2	bc	0,60 ± 0,01	b	1,1 ± 0,03	b	0,08 ± 0,00	b
	<i>L. tenuis</i> Pampa INTA	5,4 ± 0,4	a	0,88 ± 0,09	a	2,0 ± 0,02	a	0,14 ± 0,03	a
	<i>L. burtii</i>	2,4 ± 0,6	c	0,38 ± 0,13	c	0,55 ± 0,15	c	0,04 ± 0,02	c
	<i>L. filicaulis</i>	5,9 ± 0,3	ab	0,87 ± 0,08	a	1,1 ± 0,1	b	0,08 ± 0,01	b
	<i>L. japonicus</i> MG20	3,1 ± 0,7	c	0,51 ± 0,10	bc	0,56 ± 0,07	c	0,04 ± 0,003	c
	<i>L. creticus</i>	0,64 ± 0,2	d	0,11 ± 0,01	d	0,16 ± 0,08	d	0,01 ± 0,01	c
Sal	<i>L. tenuis</i> Chajá	3,1 ± 0,9		0,57 ± 0,19		1,3 ± 0,6		0,11 ± 0,05	
	<i>L. tenuis</i> Esmeralda	3,0 ± 0,2	*	0,60 ± 0,01		1,2 ± 0,2		0,09 ± 0,01	
	<i>L. tenuis</i> Pampa INTA	3,0 ± 0,9	*	0,50 ± 0,21	*	1,6 ± 0,4		0,12 ± 0,04	
	<i>L. burtii</i>	1,4 ± 0,4		0,25 ± 0,09		0,35 ± 0,01		0,02 ± 0,001	
	<i>L. filicaulis</i>	1,9 ± 0,6	*	0,32 ± 0,20	*	0,97 ± 0,52		0,08 ± 0,05	
	<i>L. japonicus</i> MG20	3,9 ± 1,2		0,80 ± 0,30		0,80 ± 0,39		0,06 ± 0,03	
	<i>L. creticus</i>	0,94 ± 0,36		0,11 ± 0,05		0,17 ± 0,12		0,01 ± 0,01	

Tabla 2: Pesos frescos (PF) y secos (PS) de la parte aérea (A) y radical (R) de plantas control y plantas expuestas a 150mM NaCl. Los valores representan un promedio de dos muestras con tres repeticiones cada una. Letras distintas en la columna indican diferencias significativas entre especies (LSD; α : 0,05). *Diferencias significativas entre tratamientos (LSD; α : 0,05).

Material	PSA (% control)	PSR (% control)	Relación A/R	
			Control	Salinidad
<i>L. tenuis</i> Chajá	102	138	6,7	5,2
<i>L. tenuis</i> Esmeralda	100	113	7,6	6,7
<i>L. tenuis</i> Pampa INTA	57	86	6,3	4,2
<i>L. burtii</i>	66	50	9,5	12
<i>L. filicaulis</i>	37	100	10,6	3,7
<i>L. japonicus</i> MG20	143	120	11,4	13
<i>L. creticus</i>	100	100	11	11

Tabla 3: Porcentaje con respecto al control del peso seco de la parte aérea (PSA) y de la raíz (PSR) de plantas expuestas a 150mM de NaCl durante 15 días. Relación entre los pesos secos de la parte aérea y de la raíz (A/R) de las plantas control y de las plantas tratadas.

	% Peso seco	
	Control	Salinidad
<i>L. tenuis</i> Chajá	13,1	15,5
<i>L. tenuis</i> Esmeralda	14,2	16,4
<i>L. tenuis</i> Pampa INTA	13,8	13,5
<i>L. burtii</i>	14,2	15,4
<i>L. filicaulis</i>	13,6	13,9
<i>L. japonicus</i> MG20	15,0	18,3
<i>L. creticus</i>	15,0	10,8

Tabla 4: Porcentaje de peso seco sobre el peso fresco total de plantas control y de plantas expuestas a 150mM de NaCl. Los valores representan el promedio de dos bandejas con tres repeticiones cada una.

2. Parámetros hídricos

Los valores de potencial hídrico medidos en las plantas control fueron bastante homogéneos entre especies, oscilando entre -0,4 y -0,7 MPa, valores que se pueden considerar propios de plantas bien hidratadas. Cuando las plantas se trataron con sal, se produjo un ligero descenso en las especies *L. tenuis* Pampa INTA, *L. japonicus* MG20 y *L. creticus*, aunque no superó el valor de -0,8 MPa (Figura 17).

Sólo en la especie modelo *L. burtii* el descenso del potencial hídrico fue más pronunciado, alcanzando un valor de -1,5 MPa frente al -0,6 MPa de las plantas control, valor que refleja un moderado estrés hídrico en la parte aérea de la planta (Figura 17).

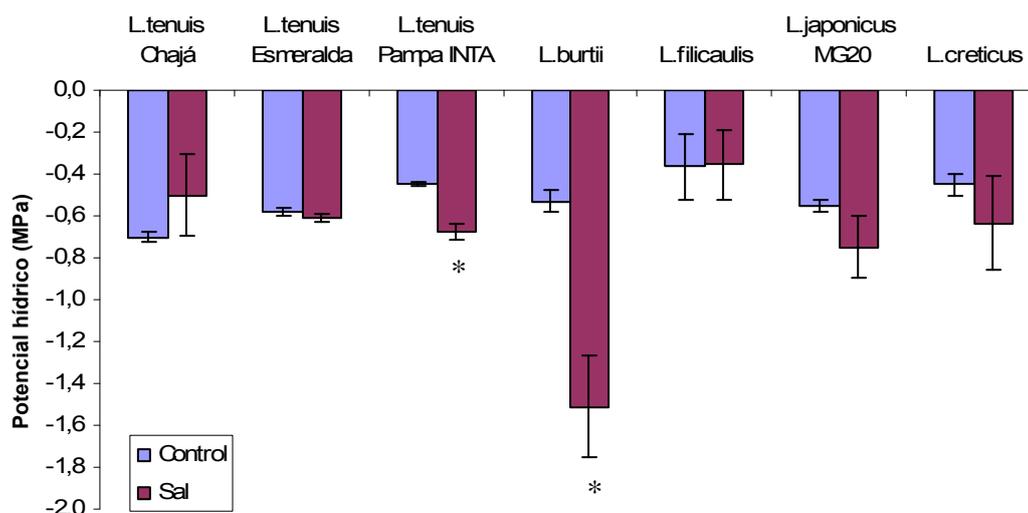


Figura 17: Potencial hídrico de plantas del género *Lotus* expuestas durante 15 días a 150mM de NaCl y de sus respectivos controles. Los valores representan un promedio de dos bandejas con tres repeticiones cada una, y las barras representan las desviaciones estándar. *Diferencia significativa entre tratamientos (LSD; α : 0,05).

En la Figura 18 se muestran los cambios en el potencial osmótico de plantas estresadas comparado con sus respectivos controles. En todos los casos, el potencial osmótico bajo situación de estrés fue significativamente más negativo que las plantas control. Las tres variedades de *L. tenuis* tuvieron una respuesta similar, presentando una disminución en el valor del potencial osmótico un 30% inferior al valor obtenido en las plantas control. En las especies modelo, el potencial osmótico de plantas control osciló entre -1,1 y -1,2 MPa; bajo tratamiento salino, *L. filicaulis* y *L. japonicus* llegaron a valores cercanos a -2 MPa, mientras que en *L. burtii* el potencial disminuyó hasta -1,7 MPa. La especie *L. creticus* fue la que presentó una menor disminución en el valor de potencial osmótico al ser tratada con sal, pasando de -0,9 MPa en las plantas control a -1,2 MPa en las plantas tratadas.

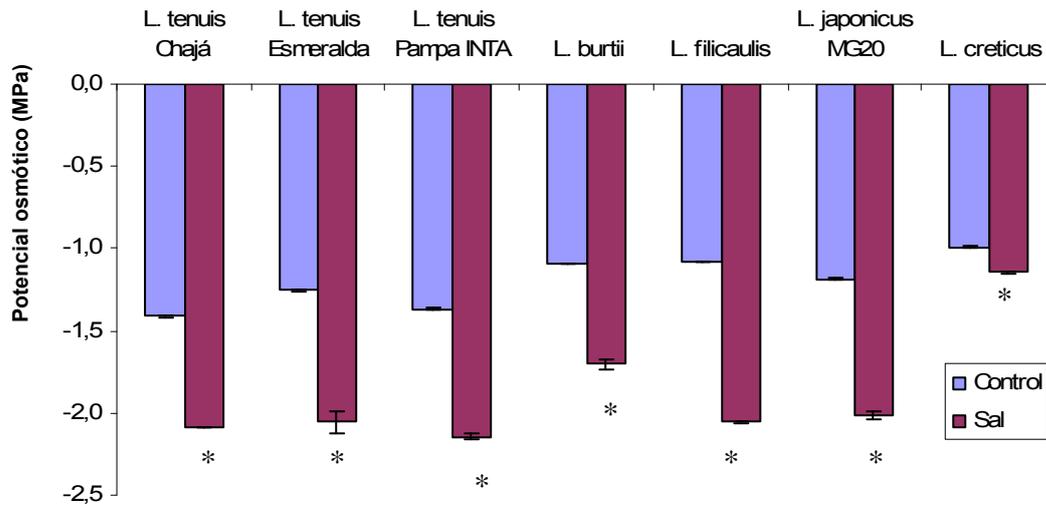


Figura 18: Potencial osmótico foliar de plantas del género *Lotus*, control y tratadas con 150 mM de NaCl. Los valores representan un promedio de dos bandejas con tres repeticiones cada una, y las barras representan las desviaciones estándar. *Diferencia significativa entre tratamientos (LSD; α : 0,05).

Asumiendo que el potencial hídrico es la sumatoria del potencial osmótico y del potencial de presión, se calculó por diferencia la presión de turgencia (ó potencial de presión). Se observó que la misma aumentó en la parte aérea de todas las plantas tratadas con NaCl (Figura 19). En las tres variedades de *L. tenuis*, el potencial de presión se incrementó entre un 20 y un 50%. En las especies modelo, las diferencias entre plantas control y plantas tratadas fueron mayores, obteniéndose incrementos de entre 60 y 100%. En *L. creticus* también se registró un incremento de potencial de presión, aunque fue una de las especies que menos modificó este parámetro (26%).

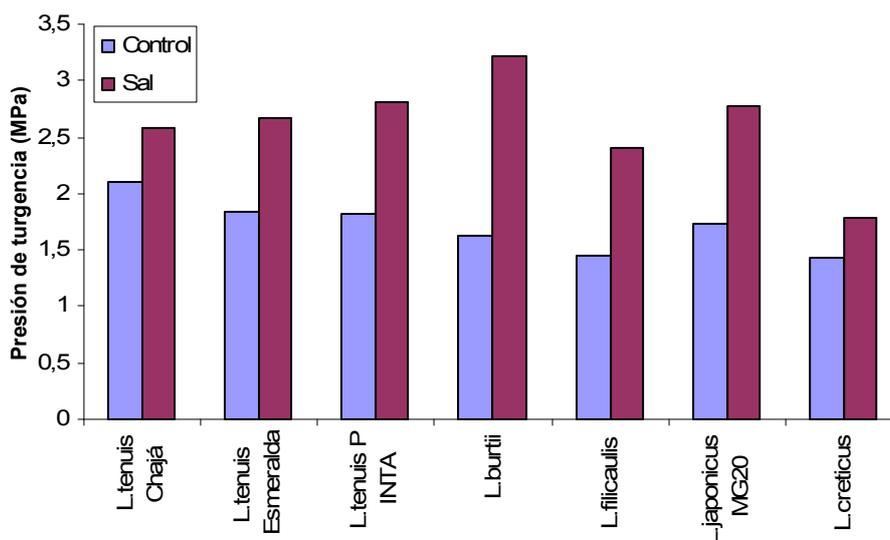


Figura 19: Presión de turgencia calculada en la parte aérea de plantas del género *Lotus* tratadas con 150mM de NaCl, durante 15 días, y en sus respectivos controles.

3. Parámetros bioquímicos

3.1. Solutos inorgánicos

Se cuantificaron los contenidos de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Cl^- , tanto en la parte aérea como en la radical. En las plantas control, el contenido de Na^+ promedio en base a peso seco de la parte aérea de las especies evaluadas, fue de $4,8 \text{ mg g}^{-1}$ en *L. tenuis* y de 5 mg g^{-1} en las modelo, con un máximo de $6,7 \text{ mg g}^{-1}$ en el caso de *L. filicaulis*, y un mínimo de $3,9 \text{ mg g}^{-1}$ en el caso de *L. burtii*. Los contenidos de Na^+ en las variedades de *L. tenuis* fueron ligeramente superiores en las raíces que en los tallos ($7,9 \text{ mg de Na}^+ \text{ g}^{-1}$ PS de raíz) (Tabla 4).

Cuando las plantas se expusieron a 150mM de NaCl, el contenido de Na^+ de la parte aérea aumentó significativamente en todas las especies excepto en *L. japonicus* MG20, que no se modificó. El análisis de la acumulación de Na^+ entre especies, permitió observar diferencias significativas entre las mismas, e incluso entre las variedades de *L. tenuis* evaluadas. *L. tenuis* Chajá y *L. creticus* fueron las especies que más Na^+ acumularon en la parte aérea. Por su parte, el contenido de Na^+ en la raíz de *L. tenuis* Chajá también aumentó aunque no se encontraron diferencias significativas entre

controles y salinizadas. Un comportamiento exactamente opuesto pudo observarse en el ecotipo MG20 de *L. japonicus*, el cual acumuló más Na⁺ en la raíz que en la parte aérea de las plantas tratadas (Tabla 5).

		PARTE AEREA			
		mg Na ⁺ g ⁻¹ PS	mg K ⁺ g ⁻¹ PS	mg Ca ²⁺ g ⁻¹ PS	μmol Cl ⁻ g ⁻¹ PS
<i>Lotus tenuis</i>	Control	5,6±0,6	64,3±2,7	39,9±1,9	54,4±0,8
Chajá	Sal	24,3±0,6 * a	39,9±1,9 * c	24,9±1,4 * d	337,7±32,3 * a
<i>Lotus tenuis</i>	Control	4,8±0,2	57,4±1,1	36,3±1,4	48,2±4,4
Esmeralda	Sal	15,7±0,2 * b	47,7±3,7 * ab	33,5±0,7 ab	316,0±1,6 * ab
<i>Lotus tenuis</i>	Control	4,2±0,3	57,2±1,8	39,5±3,9	64,4±9,5
Pampa INTA	Sal	13,4±0,3 * c	43,7±2,5 * bc	28,6±1,9 * cd	273,9±17,3 * b
<i>Lotus burtii</i>	Control	3,9±0,3	52,0±4,3	31,9±1,2	39,5±8,2
	Sal	8,1±0,6 * d	46,3±0,7 abc	34,7±1,4 ab	201,0±2,2 * c
<i>Lotus filicaulis</i>	Control	6,7±1,5	66,9±2,1	41,2±0,7	28,6±1,0
	Sal	14,0±0,5 * bc	52,7±0,7 * a	36,7±1,2 * a	265,7±23,2 * b
<i>Lotus japonicus</i>	Control	4,5±1,1	51,3±6,1	32,7±4,9	52,5±5,8
MG20	Sal	6,6±1,4 d	43,2±6,7 bc	31,9±4,2 bc	197,0±12,2 * c
<i>Lotus creticus</i>	Control	5,0±0,4	58,2±2,6	ND	5,9±0,7
	Sal	23,8±1,5 * a	29,6±5,2 * d	ND	138,3±11,2 * d

		PARTE RADICAL			
		mg Na ⁺ g ⁻¹ PS	mg K ⁺ g ⁻¹ PS	mg Ca ²⁺ g ⁻¹ PS	μmol Cl ⁻ g ⁻¹ PS
<i>Lotus tenuis</i>	Control	7,5±1,1	66,6±9,2	39,5±2,5	54,2±2,4
Chajá	Sal	11,5±5,3 c	41,4±12,0 a	23,4±10,2 a	553,8±45,0 * a
<i>Lotus tenuis</i>	Control	9,4±1,7	65,9±4,8	44,0±3,2	41,4±3,0
Esmeralda	Sal	19,6±7,7 * bc	59,1±23,0 a	37,3±16,2 a	553,0±29,8 * a
<i>Lotus tenuis</i>	Control	6,8±1,1	68,5±7,2	47,6±4,2	73,2±16,1
Pampa INTA	Sal	27,3±1,7 * ab	71,3±1,1 a	47,6±11,1 a	511,8±4,7 * a
<i>Lotus japonicus</i>	Control	6,0±ND	49,2±ND	29,4±ND	45,9±3,6
MG20	Sal	39,7±0,7 * a	64,4±1,5 a	43,4±0,9 a	543,8±ND * a

Tabla 5: Cambios en el contenido de Na⁺, K⁺, Ca²⁺ y Cl⁻ en parte aérea y en la raíz de especies pertenecientes al género *Lotus*, expuestas durante 15 días a 150mM de NaCl. Los datos representan el promedio de tres repeticiones independientes con sus respectivas desviaciones estándar. ND: dato no disponible. *Diferencias significativas entre tratamientos, letras distintas en la columna equivalen a diferencias significativas entre poblaciones (LSD; α: 0,01).

Con respecto al K⁺ se registró una disminución significativa de su contenido en la parte aérea de todas las plantas tratadas, en especial en *L. tenuis* Chajá y *L. creticus* (Tabla 5). A pesar de que el K⁺ disminuyó y el Na⁺ aumentó como consecuencia del tratamiento, la relación entre ambos iones muestra que lo hacen en diferente proporción. Las variedades de *L. tenuis*, en promedio, triplicaron la concentración de Na⁺ de la parte aérea mientras que la

de K^+ disminuyó en un 30%. En las especies modelo, la concentración de Na^+ aumentó casi dos veces y la de K^+ disminuyó un 20%, mientras que en *L. creticus* la concentración de Na^+ se quintuplicó, mientras que la de K^+ se redujo a la mitad, resultando similar la concentración de ambos iones en la parte aérea.

En la raíz, a pesar de la mayor variabilidad encontrada en los resultados, estos apuntan a que el tratamiento con sal no modificó la concentración de K^+ presente en las raíces (Tabla 5).

El contenido de Ca^{2+} de la parte aérea de plantas tratadas con sal disminuyó ligeramente en algunas de las especies, aunque sólo alcanzó la significación estadística en dos de las variedades comerciales de *L. tenuis* (Pampa INTA y Chajá) y en *L. filicaulis*. En la raíz, no se registraron diferencias significativas del contenido de Ca^{2+} en ninguna de las especies evaluadas (Tabla 5).

La concentración de Cl^- , tanto de la parte aérea como de la raíz de plantas bajo tratamiento salino, aumentó significativamente en todas las poblaciones evaluadas. Aunque la cantidad presente en la parte aérea, tanto en controles como tratadas, fue superior, en promedio, en las variedades de *L. tenuis* frente a las modelo, en ambos grupos el incremento de la concentración de cloruros aumentó en promedio 5,6 veces en presencia de sal. Un aumento más espectacular presentaron las plantas de *L. creticus*, en donde, si bien la concentración de iones cloruro en la parte aérea de los controles fue del orden de entre 5 y 10 veces inferior a la presente en los controles de las poblaciones citadas, el incremento en presencia de sal fue del orden de 23 veces superior a sus controles.

En la raíz, el incremento obtenido en las poblaciones de *L. tenuis* y en las modelos fue mayor, del orden de 10-12 veces superior al presente en las plantas control. No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos de poblaciones (Tabla 5).

3.2. Solutos orgánicos

3.2.1. Contenido de carbohidratos

En la Figura 20 A, B y C, se muestran los contenidos de azúcares solubles, almidón y sacarosa respectivamente, todos ellos expresados como porcentajes del peso seco.

En las plantas control de las variedades de *L. tenuis*, los azúcares solubles representaron en promedio un 7,2% del peso seco de la planta, siendo *L. tenuis* Pampa INTA la población en la que se observó el mayor porcentaje (8,7%) diferenciándose significativamente de las otras dos variedades comerciales de la misma especie (6,4 y 6,5 %, para Chajá y Esmeralda, respectivamente). Las plantas control de las especies modelo tuvieron contenidos de azúcares solubles totales entre 5,5 y 8,5%. *L. creticus* fue la especie en la cual se registró el menor contenido de azúcares solubles (4,5%).

La situación de estrés salino determinó una reducción del contenido de azúcares totales en dos de las variedades de *L. tenuis* (Esmeralda y Pampa INTA). En las especies modelo, la salinidad provocó aumento del porcentaje de azúcares en *L. filicaulis* y disminución en *L. burtii*. En *L. creticus* no se detectaron diferencias entre plantas tratadas y plantas control (Figura 20 A).

El contenido de almidón en la parte aérea de plantas control (también expresado como porcentaje del peso seco), presentó un valor porcentual comprendido entre 6,3 (*L. creticus*) y 9,4% (*L. japonicus* MG20). Al exponer las plantas a estrés salino, tanto en *L. burtii* y como en *L. tenuis* Pampa INTA, el porcentaje de almidón bajó significativamente. Por el contrario, en *L. tenuis* Chajá dicho porcentaje aumentó aproximadamente en un 25%, mientras que en el resto de las especies evaluadas no se detectaron diferencias entre tratamientos (Figura 20 B).

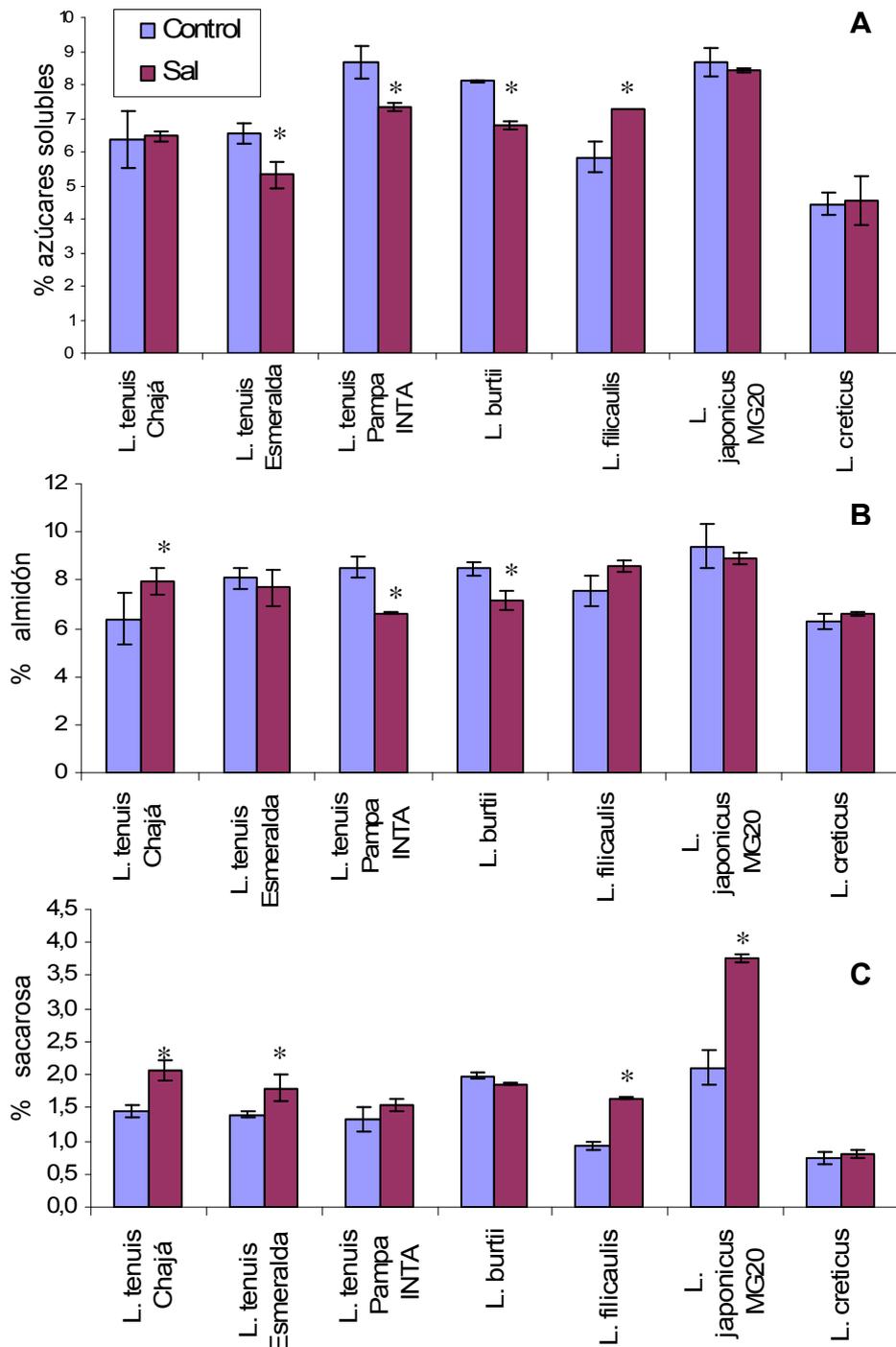


Figura 20: Contenido de azúcares solubles (A), almidón (B) y sacarosa (C), expresados como % sobre el peso seco de la parte aérea de plantas del género *Lotus* tratadas con 150 mM de NaCl. Los valores se expresan como porcentajes del peso seco de la planta. Los datos representan el promedio de 2 muestras independientes con 3 repeticiones cada una. *Diferencias significativas entre tratamientos (LSD; α : 0,05).

El contenido promedio de sacarosa en la parte aérea de las plantas control, se ubicó entre 0,7 y 2% del peso seco. Al exponer las plantas a 150mM de NaCl durante 15 días, en cuatro de las poblaciones estudiadas se registró un aumento significativo del porcentaje de sacarosa en la parte aérea, siendo particularmente importante para *L. filicaulis* y *L. japonicus* MG20, los cuales casi llegaron a duplicar el contenido encontrado en las plantas control (Figura 20 C).

Es de destacar el comportamiento de *L. japonicus* como especie con mayor porcentaje de carbohidratos en las plantas control, y el no efecto de la sal en la concentración de azúcares solubles y de almidón, aunque sí se observó un incremento en la concentración de sacarosa (Figura 20 A, B y C).

3.2.2. Contenido de clorofilas y carotenoides

En las plantas control, el contenido de la clorofila *a* fue bastante homogéneo entre las poblaciones evaluadas, salvo para *L. japonicus* MG20, cuyo contenido, por gramo de peso fresco, fue menor. El contenido de clorofila *b*, en general, fue menor que el de la clorofila *a* en todas las poblaciones.

El análisis de los contenidos de las clorofilas *a* y *b*, en plantas tratadas con NaCl, permitió observar aumentos significativos en las hojas de *L. tenuis* Esmeralda y de *L. japonicus* MG20. En el resto de poblaciones no se encontraron diferencias significativas, aunque los valores obtenidos fueron ligeramente superiores al de los controles (Figuras 21 A y B).

La relación entre la clorofila *a* y la clorofila *b* fue similar entre todas las plantas control analizadas. En las plantas tratadas, dicha relación disminuyó, en general, con respecto al control aunque solamente en *L. japonicus* MG20 y en *L. tenuis* Pampa INTA estas diferencias alcanzaron la significación estadística. Ello reflejaría un ligero aumento de la síntesis de clorofila *b* frente a la clorofila *a* en situación de estrés salino (Figura 21 C).

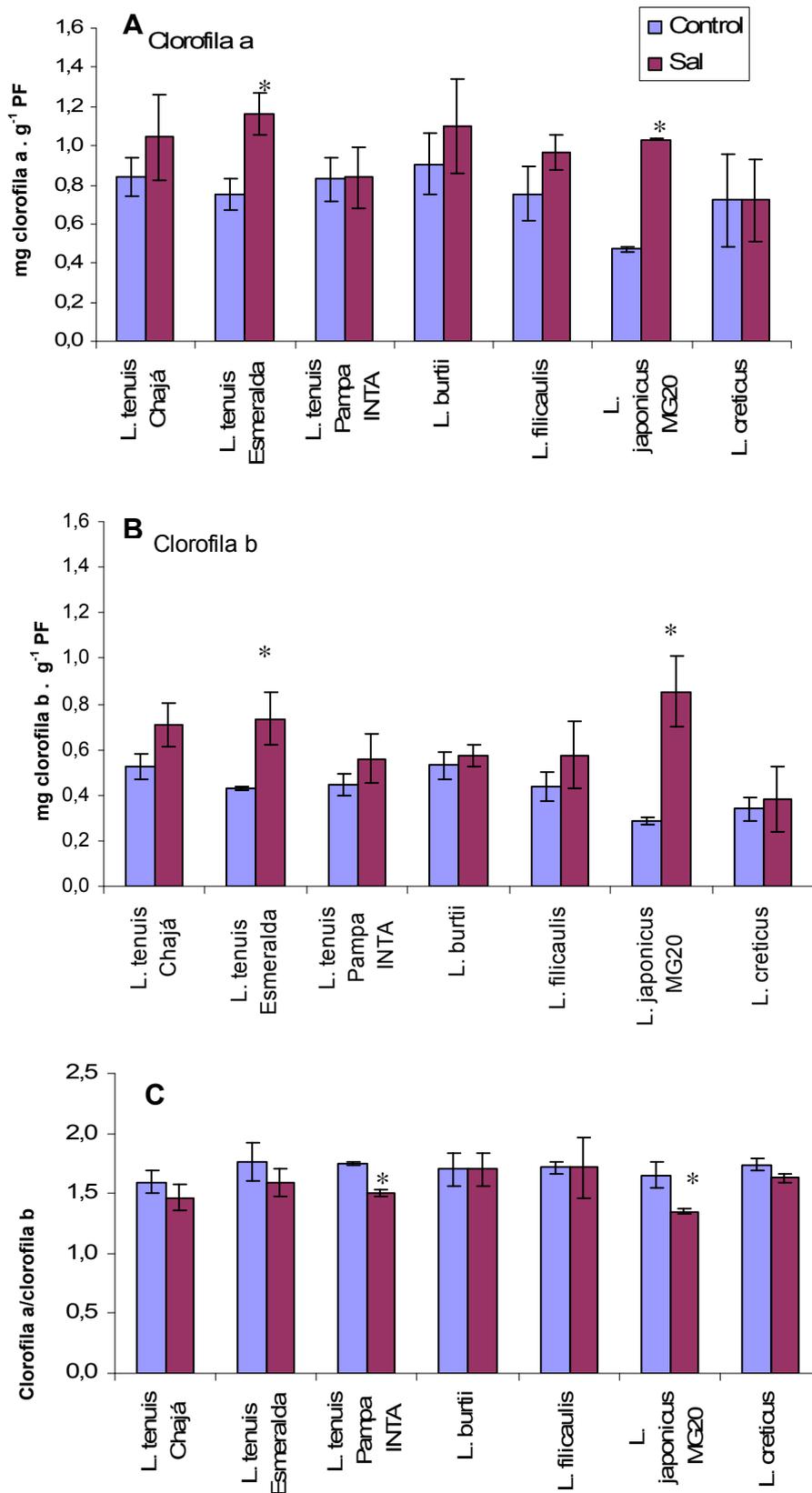


Figura 21: Contenido foliar de clorofila a (A), clorofila b (B) y relación clorofila a: clorofila b (C) de plantas del género *Lotus* tratadas con 150 mM de NaCl. Los datos representan el promedio de tres repeticiones, y las barras representan las desviaciones estándar. *Diferencias significativas entre tratamientos (LSD, α : 0,05).

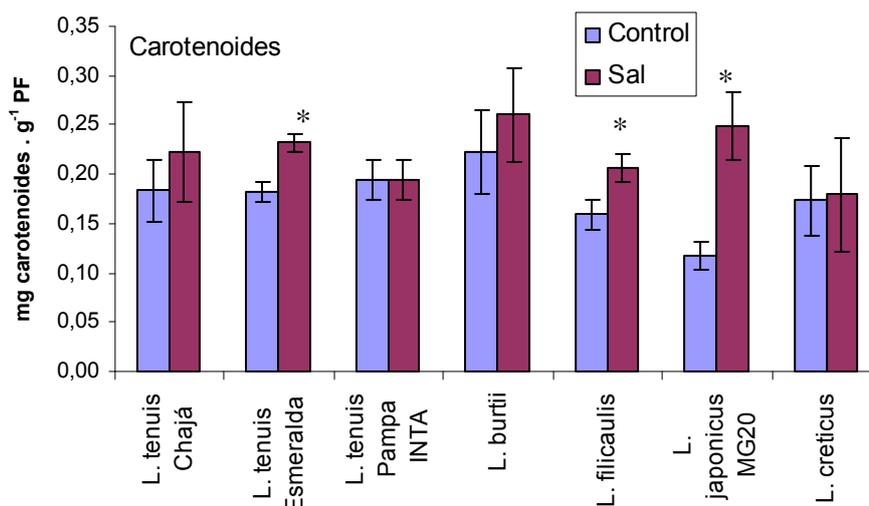


Figura 22: Concentración foliar de carotenoides de diferentes especies del género *Lotus* expuestas a 150mM de NaCl durante 15 días. Los datos representan el promedio de tres repeticiones con sus desviaciones estándar. *Diferencias significativas entre tratamientos (LSD, α : 0,05).

El contenido de carotenoides fue menor aún que el de la clorofila *b* en hojas de plantas controles. En las hojas de las plantas tratadas de *L. filicaulis*, *L. japonicus* MG20 y *L. tenuis* Esmeralda, se observaron incrementos significativos con respecto a los controles. En el caso específico de *L. japonicus* MG20, el contenido de estos pigmentos accesorios duplicó al de las plantas control (Figura 22).

3.2.3. Contenido de proteínas y perfil proteico

El contenido de proteínas en hojas de plantas control de la especie *L. tenuis* difirió entre variedades, siendo Chajá la variedad con mayor contenido ($5,2 \text{ mg g}^{-1} \text{ PF}$) y Esmeralda la de menor ($2 \text{ mg g}^{-1} \text{ PF}$). En las especies modelo destacó *L. filicaulis* con 6 mg de proteínas solubles por gramo de peso fresco, comparado con los contenidos hallados en *L. japonicus* MG20 y *L. burtii* ($2,5$ y $2,8 \text{ mg g}^{-1} \text{ PF}$, respectivamente).

Bajo salinización se observaron diferentes respuestas en el contenido de proteínas con respecto a los controles, sin guardar ninguna relación aparente con la especie o variedad. En algunos casos disminuyó significativamente (*L. tenuis* Chajá y *L. filicaulis*), mientras que en otros

aumentó (*L. tenuis* Esmeralda, *L. japonicus* MG20 y *L. burtii*) o se mantuvo constante (*L. tenuis* Pampa INTA) (Figura 23).

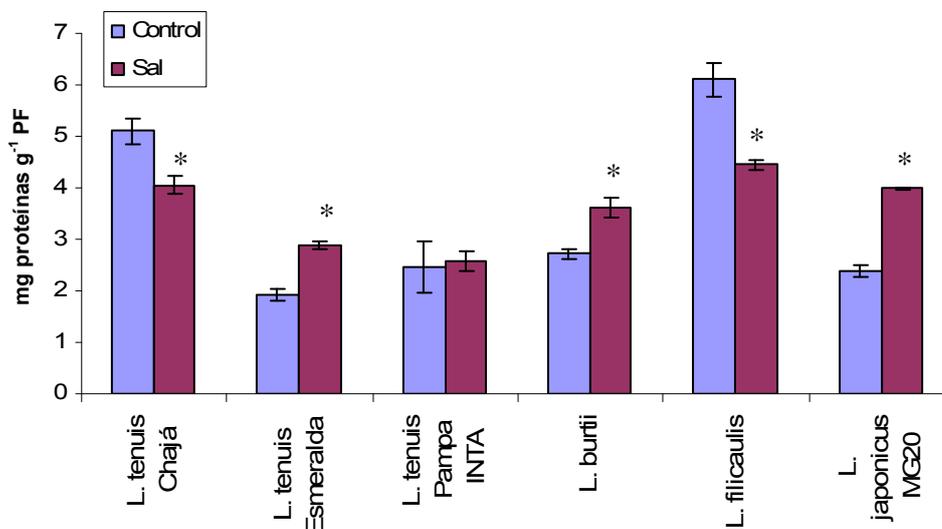


Figura 23: Contenido de proteínas solubles totales (mg g⁻¹ PF) en la parte aérea de plantas del género *Lotus*, expuestas durante 15 días a 150mM de NaCl. Los datos representan el promedio de tres repeticiones independientes con sus respectivas desviaciones estándar. *Diferencias significativas entre tratamientos (LSD; α : 0,05).

En la Figura 24 se observa la separación electroforética de las proteínas solubles de plantas controles y tratadas. La banda de mayor área corresponde a la subunidad L de la enzima Rubisco. En ningún caso, se observaron cambios en el perfil proteico entre plantas tratadas y plantas control.

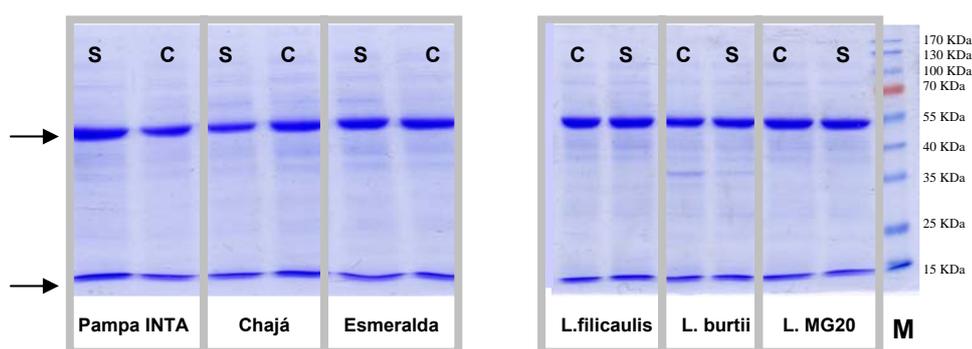


Figura 24: Perfiles proteicos de extractos de la parte aérea de plantas de distintas especies del género *Lotus*. Proteínas separadas por SDS-PAGE y teñidas con Coomassie Brilliant Blue R-250. El gel se cargó con 25 μ g de proteínas obtenidas de tres variedades comerciales de *L. tenuis* (izquierda) y tres especies modelo del género *Lotus* (derecha), expuestas a 150mM de NaCl durante 15 días (S) y sus respectivos controles (C). Las flechas indican las subunidades L (51-58 KDa) y S (12-18 KDa) de la Rubisco.

3.3. Actividad carboxilasa de la enzima Rubisco

La cuantificación de la actividad carboxilasa de la Rubisco en las plantas control permitió diferenciar estadísticamente dos grupos de respuesta. En uno de estos grupos se ubicaron *L. filicaulis* y *L. tenuis* Chajá con actividades registradas por encima de los 600 nmoles CO₂ mg⁻¹ PF min⁻¹, y con menos del 50% de la actividad antes mencionada, se agruparon las actividades cuantificadas para el resto de las especies (Figura 25).

Cuando las plantas se trataron con NaCl el perfil de respuesta fue similar al obtenido con los niveles de proteína. La actividad carboxilasa de la Rubisco aumento significativamente en tres de las especies analizadas (*L. tenuis* Esmeralda, *L. burtii* y *L. japonicus* MG20), con incrementos de entre el 40% y el 64%. En *L. filicaulis* y *L. tenuis* Chajá, la fijación de carbono marcado disminuyó un 21% y un 57%, respectivamente, aunque sólo en este último caso alcanzó la significación estadística. En *L. tenuis* Pampa INTA la salinidad no afectó la actividad carboxilasa de la Rubisco (Figura 25).

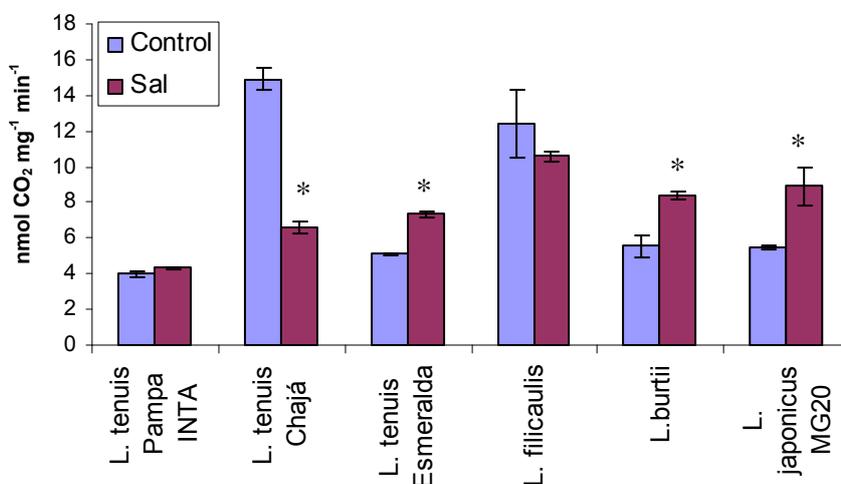


Figura 25: Actividad carboxilasa de la enzima Rubisco en plantas del género *Lotus* expuestas a 150mM de NaCl durante 15 días. Los datos representan el promedio de 3 repeticiones. *Diferencias significativas entre tratamientos (LSD; α : 0,05).

4. Discusión

Tanto la sequía como el estrés salino, han sido identificados dentro de las principales causas que afectan la tasa de crecimiento y la producción de materia seca en especies de *Lotus* utilizadas como forrajeras en pasturas de regiones templadas (Márquez *et al.*, 2005). Para evaluar los efectos del estrés impuesto, el estudio se ha basado principalmente en parámetros de crecimiento y morfología, ya que por tratarse de especies con fines forrajeros, el porte de planta y la producción de materia seca, son las características que interesa preservar.

Las condiciones de salinidad bajo las cuales se expusieron las especies del género *Lotus* evaluadas en nuestro ensayo, sólo afectó el normal crecimiento de la especie *L. filicaulis* y de la variedad Pampa INTA de *L. tenuis*. No obstante, debe tenerse presente que el estado ontogénico de las plantas al momento de comenzar los tratamientos era avanzado, lo cual generalmente es acompañado por un incremento en la tolerancia al estrés (Maas y Hoffman, 1977; Pasternak *et al.*, 1995).

La reducción significativa del peso seco aéreo observada tanto en *L. filicaulis* como en *L. tenuis* Pampa INTA no podría deberse a la disminución de la altura del tallo principal ni al largo de los entrenudos, ya que los mismos no se modificaron significativamente, lo que deja entrever que la diferenciación de nuevas hojas no fue afectada. La disminución del peso seco se justificaría por la disminución del número de ramificaciones y brotes de la corona y/o por la disminución del área foliar. Sin embargo, el área foliar se afectaría, básicamente, por una disminución en la turgencia celular y éste no fue el caso de *L. filicaulis* ni de *L. tenuis* Pampa INTA, en las cuales se observó un aumento de la presión de turgencia bajo condiciones de estrés. Restarían evaluar las otras dos variables mencionadas, las cuales fueron incluidas en los estudios realizados con posterioridad (Capítulo III).

En concordancia con nuestros resultados, en *Melilotus segetalis* expuesta a salinidad, Romero *et al.* (1996) observaron que las plantas eran más pequeñas y que, al desglosar los componentes de la biomasa total, las hojas tenían proporcionalmente más biomasa que los tallos y que las raíces.

Esto coincidiría con la idea de que el área foliar de *L. filicaulis* y de *L. tenuis* Pampa INTA no fue el parámetro de crecimiento afectado por la salinidad. Por otra parte, uno de los componentes del peso que no fue evaluado en este ensayo y que podría tener incidencia en la reducción del peso seco por planta observado, fue la cantidad de ramificaciones. En este sentido debemos mencionar la observación realizada en poblaciones de *L. tenuis* ante un estrés alcalino, descrito por Stoffella *et al.* (1998), ellos detectaron diferencias genéticas en algunas variables morfológicas, tales como el número de ramas.

También fue interesante observar la disminución del 65% en la relación entre la parte aérea y la raíz de *L. filicaulis*, cuando las plantas se expusieron a estrés. Esto concuerda con lo publicado en la revisión de Parida y Das (2005), quienes reportan sobre la disminución de dicha relación como respuesta a incrementos en la concentración salina. Sin embargo, en la mayoría de los casos, los pesos secos tanto de la parte aérea como de la raíz, disminuyeron cuando las plantas se expusieron a condiciones de estrés, y la diferencia entre las tasas de crecimiento del vástago y de la raíz, determinaron variaciones en la relación entre ambos. En nuestro caso, no existieron diferencias entre el peso seco de la raíz de plantas controles y de plantas tratadas, con lo cual, queda en evidencia que la disminución en la relación vástago/raíz estaría netamente fundamentada por la disminución del peso seco de la parte aérea. Meloni *et al.* (2001), en plantas de algodón expuestas a NaCl, encontraron disminución del crecimiento tanto de la raíz, como del tallo y de las hojas, sin embargo, la relación raíz/vástago se incrementó, indicando que el vástago disminuyó más que la raíz.

El aumento en el contenido de Na⁺ y la disminución de K⁺ en la parte aérea de plantas del género *Lotus* expuestas a salinidad, fue previamente documentado por Sanchez *et al.* (2005). En nuestras condiciones experimentales todas las especies ensayadas presentaron un comportamiento similar, diferenciándose la especie modelo *L. japonicus* MG20, en la cual no se detectaron diferencias significativas. Al analizar comparativamente los datos de contenido iónico encontrados en la raíz, se destacaron dos especies (*L. tenuis* Pampa INTA y *L. japonicus* MG20) los cuales fueron los que más Na⁺ acumularon en la raíz y los que menos acumularon en la parte aérea. Esto

indicaría una eficiente selectividad para el movimiento de Na^+ a nivel de las células corticales. Es allí donde mediante la deposición de láminas de suberina (bandas de Caspary), se limitaría el paso hacia la estela radical, evitando la acumulación de Na^+ en la parte aérea de la planta, tal cual lo demostrado en *Arabidopsis thaliana* (Apse y Blumwald, 2007). La contribución de una barrera física para restringir el transporte radial de Na^+ , se hizo evidente en *Populus euphratica*, otorgándole mayor tolerancia a la salinidad (Chen *et al.*, 2003).

En correspondencia con los resultados de Teakle *et al.* (2007), todas las especies evaluadas incrementaron la concentración de Cl^- en la parte aérea; sin embargo el contenido de este anión en *L. japonicus* MG20, fue comparativamente menor que el observado en los otros materiales, lo que constituiría una estrategia adicional a la de limitar la translocación de Na^+ a la parte aérea, permitiendo no alterar su crecimiento ni su desarrollo reproductivo.

La significativa reducción del contenido de Ca^{2+} observada en la parte aérea de *L. filicaulis*, y de *L. tenuis* (Pampa INTA y Chajá), no ha sido previamente reportada en el género, aunque sí en especies leguminosas expuestas a salinidad (Sibole *et al.*, 2003a).

En todos los casos, el potencial osmótico disminuyó con el agregado de sal indicando acumulación de osmolitos, ya sea por compartimentalización de Na^+ en la vacuola (Apse y Blumwald, 2007; Teakle *et al.*, 2007), así como por síntesis de solutos compatibles (Chinnusamy *et al.*, 2005; Parida y Das, 2005; Sanchez *et al.*, 2005).

Los carbohidratos tales como azúcares (glucosa, fructosa, sacarosa) y almidón se acumulan bajo condición de estrés (Parida *et al.*, 2002); sin embargo, también hay antecedentes de especies en las cuales los carbohidratos disminuyen o se mantienen constantes cuando las plantas se exponen a salinidad (Parida y Das, 2005). En nuestro caso, las respuestas encontradas fueron diferentes entre especies, destacándose el aumento de sacarosa y azúcares solubles de *L. filicaulis*, y la disminución de azúcares solubles y almidón de *L. burtii*, lo que sugiere la existencia de algún mecanismo alternativo que le permite osmorregular bajo condiciones de estrés.

En la bibliografía está demostrado que la salinidad causa una disminución significativa en los niveles de proteínas solubles, especialmente de la Rubisco (Miteva *et al.*, 1992; Sibole *et al.*, 2003b). Con el objetivo de evaluar la respuesta del estrés salino sobre la fijación del dióxido de carbono, se determinó la actividad carboxilasa de la RuBP en hojas frescas de plantas expuestas a condiciones de estrés y a sus respectivos controles. Como antecedente, podemos mencionar a Sibole *et al.* (2003b) quienes evaluaron la variación en la capacidad fotosintética de dos leguminosas arbóreas del género *Medicago*, contrastantes en la tolerancia a salinidad impuesta por aclimatación. En dichos estudios, el tratamiento salino (200 mM de NaCl) provocó un incremento del contenido de clorofilas y de proteínas en la especie *Medicago citrina*, considerada tolerante, y simultáneamente, observaron una mayor capacidad fotosintética. Todo lo contrario ocurrió con *Medicago arborea*, (considerada sensible por los autores) la cual presentó una reducción del crecimiento a causa de un desbalance iónico y una menor asimilación de CO₂. En nuestras condiciones de ensayo, aquellas especies (*L. burtii*, *L. japonicus* MG20 y *L. tenuis* Esmeralda) que resultaron tener mayor contenido proteico bajo condiciones salinas, también tuvieron mayor actividad carboxilasa de la enzima Rubisco, y los contenidos de clorofila *a* y *b* aumentaron significativamente en *L. japonicus* MG20 y *L. tenuis* Esmeralda. Por otro lado, en *L. filicaulis* y en *L. tenuis* Chajá, el contenido de proteínas disminuyó cuando las plantas se expusieron a salinidad, y en concordancia a lo reportado por Sibole *et al.* (2003b), se observó una tendencia a disminuir la fijación de CO₂.

Debido a la fuerte correlación existente entre el contenido de proteínas solubles de la hoja y la relación Na⁺/Cl⁻, Sibole *et al.* (2003b) sugirieron que el efecto tóxico de la sal estaría afectando la síntesis de proteínas. En nuestro caso, *L. tenuis* Chajá fue la especie en la cual se detectaron diferencias significativas, tanto en la disminución de proteínas totales como en la menor actividad carboxilasa de la enzima Rubisco de las plantas expuestas a estrés, lo que presentaría coincidencia con lo observado por los autores antes mencionados. A pesar de ello, en la especie *L. tenuis* Chajá no se detectaron diferencias significativas en el peso de las plantas, aunque sí una reducción en la longitud del tallo principal.

Ante un estrés salino, la disminución del contenido de proteínas totales no siempre se correlaciona con una baja actividad enzimática. En este sentido, bajo nuestras condiciones de ensayo, el contenido de proteínas totales de *L. filicaulis* fue significativamente menor; sin embargo no se detectaron diferencias significativas en la actividad de la enzima Rubisco. En concordancia con esto, Miteva *et al.* (1992) en un trabajo con plantas de cebada expuestas a 100mM NaCl, concluyeron que la inhibición en la síntesis de proteínas no fue la única razón por la cual disminuyó la actividad de la Rubisco, lo cual deja entrever una regulación más compleja que la simple relación entre inhibición de la síntesis proteica y la actividad enzimática. En un trabajo reciente, Flexas *et al.* (2006) en la leguminosa *Glycine max* relacionaron la disminución de la actividad de la enzima Rubisco durante un estrés hídrico, con una menor conductancia estomática y con una menor concentración de CO₂ en el cloroplasto.

Por su parte, Sivakumar *et al.* (2002) demostraron que en un sistema abierto *in vitro*, azúcares compatibles disminuyeron la actividad oxigenasa de la enzima Rubisco, previamente incrementada por la presencia de NaCl. La enzima aislada de plantas de dos años de *Sesbania sesban* (fabaceae) expuestas a NaCl, manifestó una disminución de la actividad oxigenasa ante un incremento de la concentración de sacarosa, sin modificar la actividad carboxilasa de la misma. En nuestro caso, y a nivel de planta entera, *L. filicaulis* fue la única especie que acumuló significativamente una mayor cantidad de azúcares solubles en situación de estrés, mientras que en el resto de las especies evaluadas, el contenido de azúcares solubles se mantuvo sin diferencias o disminuyeron con respecto al control. Y dentro de los azúcares solubles, la sacarosa también aumentó significativamente en la parte aérea de plantas de *L. filicaulis* expuestas a salinidad; aunque no fue en la única, también aumentó en *L. tenuis* Chajá, *L. tenuis* Esmeralda y *L. japonicus* MG20. En estas dos últimas especies, los aumentos de sacarosa en plantas expuestas a estrés, correlacionaron con incrementos en la actividad de la RubP carboxilasa. En contraposición a lo descrito por Sivakumar *et al.* (2002), en *L. tenuis* Chajá y *L. filicaulis*, a pesar de que no fue significativa, la actividad carboxilasa de la enzima Rubisco tuvo tendencia a disminuir en las plantas

tratadas. En función de todo lo descrito, esta disminución de la actividad carboxilasa podría estar más relacionada a una falta de CO₂ en las hojas, consecuencia de una disminución de la conductividad estomática, que a la disminución de la síntesis de proteínas (Sibole *et al.*, 2003b).

A pesar de no haber podido hacer todas las determinaciones sobre *L. creticus* por tratarse de una planta mucho más pequeña que el resto de los materiales evaluados, es importante tener en cuenta que fue la única especie que mantuvo todos los parámetros morfológicos y el estado hídrico sin diferencias significativas entre controles y plantas expuestas a 150mM de NaCl durante 15 días. Con respecto a los parámetros bioquímicos, el único que presentó incremento significativo en situación de estrés en esta especie nativa del Mediterráneo fue el contenido de cloruros. A pesar de ello, también es importante tener en cuenta que fue la especie que presentó la menor concentración relativa del anión en comparación a la acumulación de las demás especies de *Lotus* evaluadas. En este sentido, Teakle *et al.* (2006, 2007) consideran a la exclusión de Cl⁻ de la parte aérea como un mecanismo clave en la mayor tolerancia a salinidad observada en *L. tenuis* comparada con la de *L. corniculatus*. Por su parte, a pesar de la elevada relación Na⁺/K⁺ en la parte aérea de plantas estresadas del *L. creticus*, ello no se tradujo en modificaciones significativas a nivel de carbohidratos y de clorofilas. Al respecto, es importante tener en cuenta lo reportado por Sánchez-Blanco *et al.* (1998) quienes demostraron que la capacidad de ajuste osmótico que permitió a *L. creticus* mantener el ritmo de crecimiento en presencia de 140mM de NaCl, se debía a la acumulación de Na⁺ y Cl⁻, ya que no detectaron diferencias en los contenidos de carbohidratos ni en los de aminoácidos.

5. Conclusión

En nuestras condiciones de ensayo pudimos observar diferencias en los portes de planta de las especies evaluadas bajo condiciones control; *L. burtii* fue la de mayor longitud del tallo principal y de los entrenudos; *L. creticus* fue la especie más pequeña tanto en peso como en longitud y *L. tenuis* (3 variedades comerciales) se caracterizó por tener las menores relaciones entre la parte aérea y la raíz.

Al cabo de 15 días bajo condiciones salinas (150mM NaCl), *L. filicaulis* y *L. tenuis* Pampa INTA fueron las especies más afectada, tanto en el peso seco como en la morfología de la planta (parte aérea /raíz).

Las variedades comerciales de *L. tenuis* tuvieron respuestas muy distintas entre sí, y a pesar de que en un sólo caso el estrés afectó el crecimiento de manera significativa, la síntesis de proteínas, los contenidos iónicos y la actividad enzimática de la Rubisco, fueron diferentes entre las mismas.

En cuanto al contenido hídrico, podemos concluir que el género *Lotus* presenta especies que bajo estrés salino acumulan agua (*L. creticus*) y otras que no (*L. japonicus* MG20 y *L. tenuis* Esmeralda). Dentro de las especies que no presentaron cambios en el contenido de agua, se destacan *L. burtii* y *L. tenuis* Pampa INTA por disminuir significativamente los potenciales hídricos bajo estrés (185% y 51%, respectivamente). El tratamiento salino provocó disminución del potencial osmótico en todas las especies, e incremento de la presión de turgencia.

En todos los casos el tratamiento con NaCl provocó incrementos en las concentraciones de Na^+ y de Cl^- de la parte aérea de las plantas; sin embargo, en ninguna de las especies evaluadas la acumulación de estos elementos minerales provocó la muerte de plantas. La relación entre las concentraciones de la parte aérea y de la raíz permitieron observar que *L. japonicus* MG20 restringió el transporte de Na^+ y Cl^- hacia la parte aérea bajo condiciones salinas; por el contrario *L. tenuis* Chajá para ambos iones tuvo los mayores valores de relación entre la parte aérea y la raíz, indicando mayor transporte hacia el vástago. Coincidentemente, en las dos especies (*L. burtii* y *L. japonicus* MG20) que alcanzaron la etapa reproductiva, los contenidos de K^+ y de Ca^{2+} de la parte aérea no variaron.

A partir de las observaciones realizadas surgió la necesidad de evaluar las respuestas a un estrés impuesto por aclimatación (con el fin de permitir la expresión de mecanismos de adaptación), de evaluar el contenido iónico separadamente en hojas y tallos, discriminando a su vez, hojas en expansión (nuevas) de hojas totalmente expandidas (maduras). Asimismo, se

consideró imprescindible realizar determinaciones de otros solutos compatibles y evaluar la situación de estrés en etapas tempranas del ciclo ontogénico.

III. Evaluación de la respuesta a estrés salino por aclimatación en diferentes poblaciones de *Lotus tenuis* y en otras especies del género *Lotus*

Hace aproximadamente 50 años que *L. tenuis* se naturalizó en una vasta zona de la provincia de Buenos Aires. Por ser una especie alógama estricta y presentar una importante variabilidad morfo-fisiológica, tomamos como hipótesis que, durante el proceso de naturalización, se generaron poblaciones con diferentes niveles de tolerancia a las variadas condiciones edáficas adversas que caracterizan a esta región.

En nuestro caso nos interesó evaluar la tolerancia a salinidad impuesta por aclimatación en poblaciones de *L. tenuis*, y compararla posteriormente con la respuesta, bajo idénticas condiciones experimentales, de otras especies de interés dentro del género *Lotus*.

1. Respuestas al estrés salino por aclimatación de diferentes accesiones de *L. tenuis*

1.1. Parámetros morfológicos y de crecimiento

Resultó evidente la existencia de una gran variabilidad entre las accesiones de *L. tenuis* en relación con la disminución del crecimiento provocada por la salinidad; sin embargo, en ningún caso se registró mortandad de plantas bajo las condiciones de estrés seleccionadas (Foto 7).



Foto 7: Población ARLG12 a los 35 días de tratamiento salino comparado con su respectivo control.

Previo a la cosecha del material vegetal, se registraron importantes cambios morfológicos y anatómicos entre las plantas control y las plantas que fueron expuestas a salinidad bajo nuestras condiciones de ensayo. En general, los cambios registrados fueron la disminución del diámetro del tallo principal (Figura 26 A); la reducción del número de tallos y ramificaciones por planta (Figura 26 B); el engrosamiento de los folíolos y la reducción del tamaño celular (Foto 8); y variaciones en el área foliar (Figura 26C).

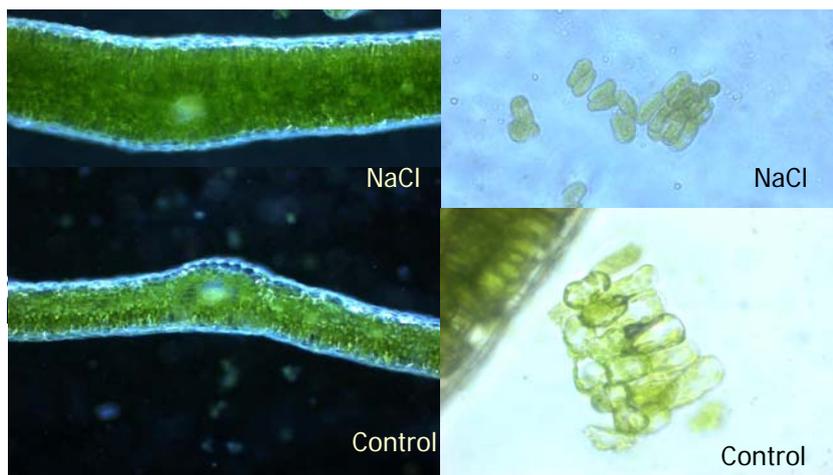


Foto 8: Cambios en la anatomía foliar de plantas de *L. tenuis* ARLG12 expuestas a 150mM de NaCl por aclimatación a los 35 días de tratamiento. La fotografía fue cedida por la Dra. Ana B. Menéndez.

El diámetro promedio del tallo principal (medido a la mitad de la longitud del mismo) de las plantas que estuvieron bajo condiciones control, varió entre 1,5 y 2,3mm. En las plantas expuestas a salinidad, el diámetro disminuyó y en todos los casos fue menor a 2mm, con un promedio de 1,4 mm. Estadísticamente, no se detectaron diferencias para este parámetro en las accesiones identificadas como ARLG08, ARLG28, ARLG03, Ruta63 y C.Uruguay (Figura 26 A).

Por otra parte, el número de tallos y ramificaciones por planta también disminuyó en la mayoría de los casos cuando fueron tratadas con NaCl por aclimatación y sólo no se observaron modificaciones significativas en los materiales identificados como ARLG02, ARLG08, ARLG28, Esmeralda, Ruta63 y Chajá (Figura 26 B).

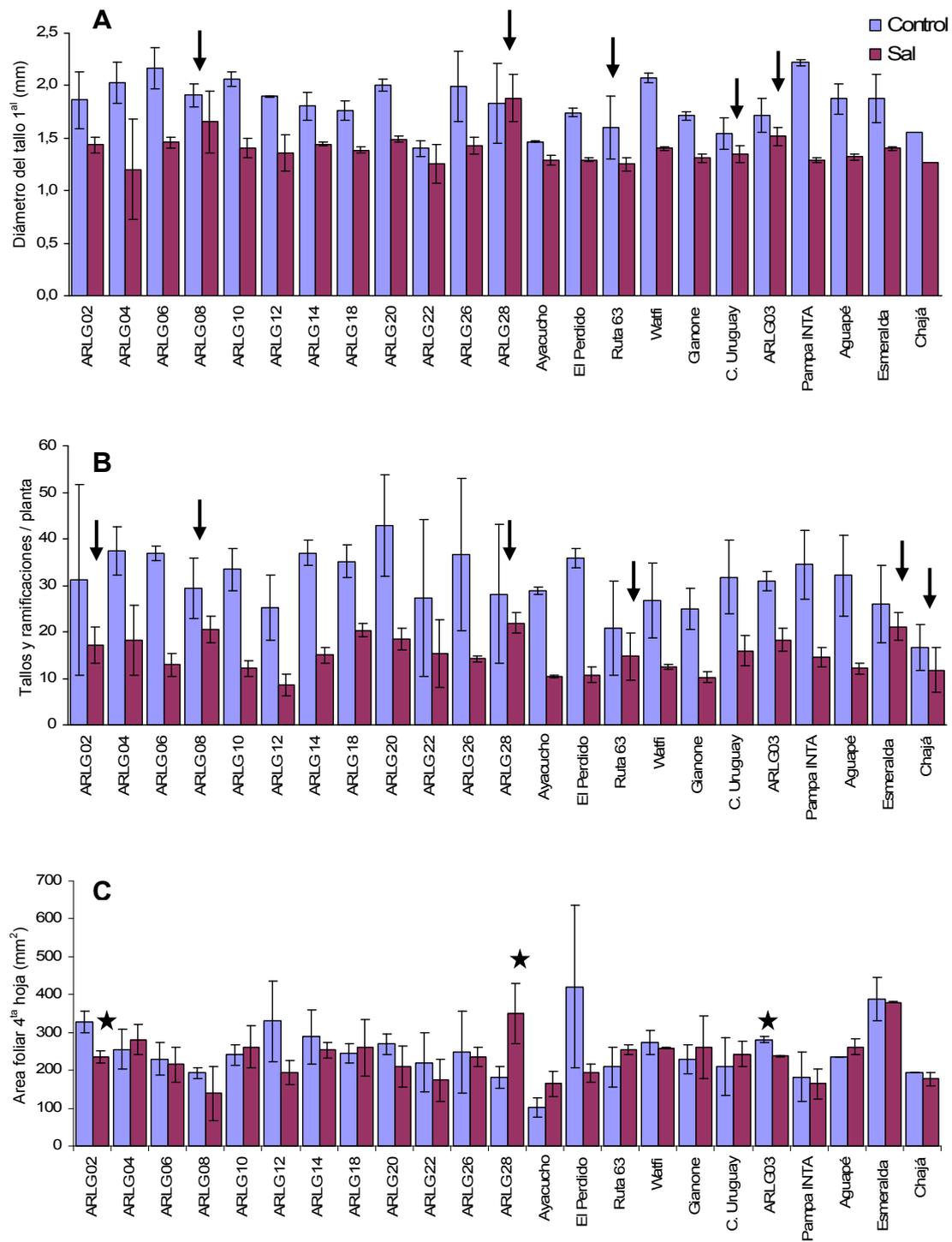


Figura 26: Diámetro del tallo principal (A), número de tallos y ramificaciones por planta (B), y área foliar de la cuarta hoja verdadera (C) de plantas control y tratadas con NaCl a los 35 días del ensayo. Los datos corresponden al promedio de dos muestras, con 6 repeticiones cada una en A y B, y con 4 repeticiones en C, y sus respectivas desviaciones estándar. Las flechas en A y B indican los materiales en los cuales no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, y la estrella en C indica los materiales en los cuales se registraron diferencias significativas (LSD; α : 0,05).

Por su parte, el área foliar de la 4^{ta} hoja en general, no presentó diferencias significativas entre las plantas control y las plantas tratadas. Sólo para el caso de las poblaciones ARLG02 y ARLG03, el valor de área foliar promedio fue estadísticamente menor en las plantas expuestas a salinidad y en la población ARLG28 fue mayor bajo condiciones salinas que la observada en las plantas control (Figura 26 C).

Posteriormente, se calcularon correlaciones fenotípicas entre las siguientes variables:

- a) peso fresco aéreo total (PFAT),
- b) diámetro del tallo (DT),
- c) número de tallos y ramificaciones por planta (TR),
- d) área foliar de la 4^{ta} hoja verdadera (AF).

El diámetro del tallo principal y el número de tallos y ramificaciones por planta fueron las variables que correlacionaron significativamente con el peso fresco aéreo (Tabla 6).

	PFAT		
	Control (g)	Salinidad (g)	Salinidad (% control)
DT	0,58 p: 0,004	0,56 p: 0,005	0,69 p: 0,000
TR	0,48 p: 0,019	0,63 p: 0,001	0,56 p: 0,005
AF	0,28 p: 0,203	0,35 p: 0,097	0,45 p: 0,031

Tabla 6: Correlaciones, según Pearson, entre las variables diámetro del tallo principal (DT), tallos y ramificaciones por planta (TR), y área foliar de la cuarta hoja verdadera (AF), y el peso fresco aéreo total (PFAT) de plantas control y tratadas con NaCl, a los 35 días de ensayo. En negrita se destacan las correlaciones significativas ($p \leq 0,01$).

Asimismo se determinó el peso seco de la parte aérea de todas las plantas y se desglosó en los dos componentes principales, que son los tallos y las hojas. Al ordenar de menor a mayor los pesos secos de la parte aérea total de todos los materiales que crecieron bajo condiciones control, se observó una

tendencia en la cual se evidenció que aquellas poblaciones con alta producción de materia seca, fueron las que mayor disminución de peso presentaron al exponerlas a salinidad (Figura 27).

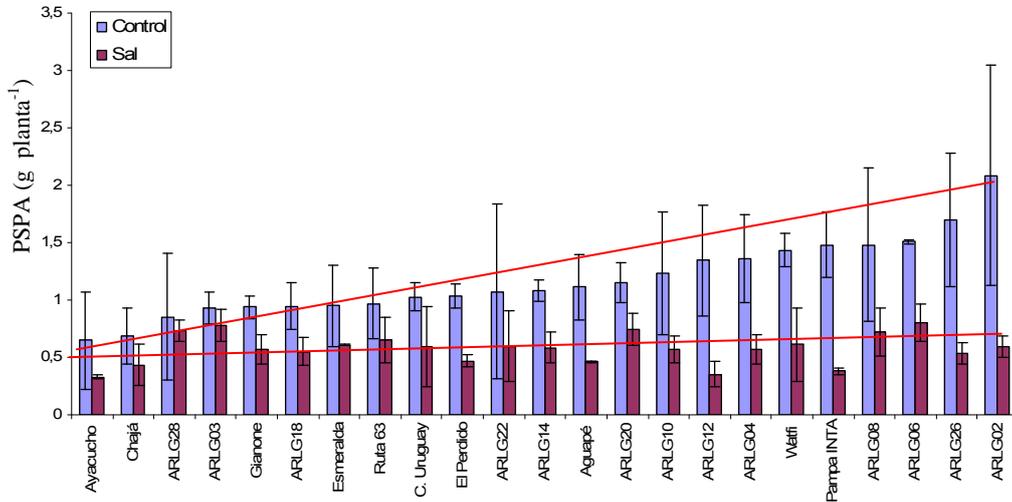


Figura 27: Peso seco de la parte aérea (PSPA) de plantas de diferentes poblaciones de *L. tenuis* tratadas durante 35 días con solución salina impuesta por aclimatación, y sus respectivos controles. Los materiales evaluados corresponden a diferentes poblaciones de *L. tenuis* colectadas en la Provincia de Buenos Aires.

En virtud de lo observado, nos pareció interesante calcular qué porcentaje del peso seco control representaba el peso seco en condiciones de salinidad. En la Figura 28 se grafican dichos porcentajes.

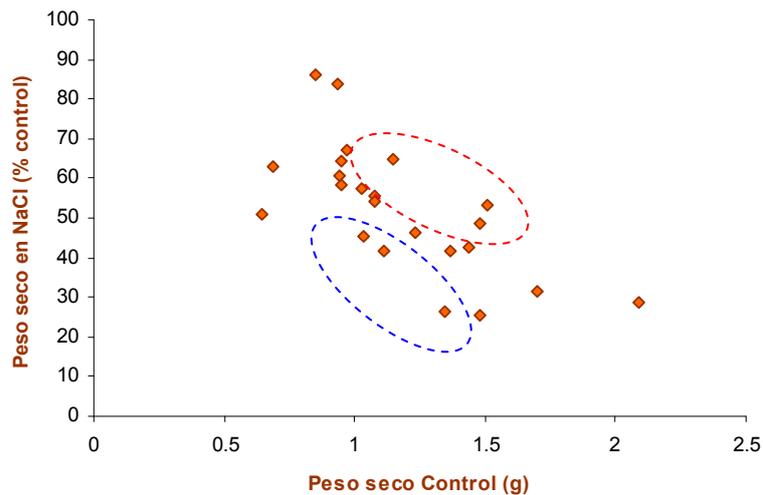


Figura 28: Relación entre el porcentaje de peso seco de la parte aérea de plantas tratadas con NaCl (% del control) y el peso seco en gramos de los controles, en diferentes poblaciones de *L. tenuis*. En el círculo rojo se encuentran las poblaciones seleccionadas como “tolerantes” y en el círculo azul las “sensibles”.

La información graficada de esta manera nos permitió identificar y seleccionar poblaciones con respuesta contrastante al estrés salino. El criterio de selección utilizado fue considerar “tolerantes” a todas aquellas accesiones que presentaron buen crecimiento en ambas situaciones (control y salinidad), y “sensibles” a todas aquellas accesiones que en situación control, tuvieron similar peso seco que las “tolerantes” y, bajo condiciones estresantes, el crecimiento fue significativamente menor. De esta manera, los materiales contrastantes seleccionados fueron: ARLG06, ARL08 y ARLG20, considerados “tolerantes” y ARLG12, El Perdido y Agupapé, considerados “sensibles”.

1.2. Parámetros bioquímicos

1.2.1 Solutos inorgánicos

Se determinaron los contenidos de iones sodio, potasio, calcio y cloro en las hojas de plantas controles y plantas expuestas a estrés salino (150mM NaCl) por aclimatación. El contenido de Na⁺ en las hojas de las poblaciones de *L. tenuis* en condiciones control fue en promedio de 6,1 mg g⁻¹ PS. En la Figura 29 A, se puede observar que en todas las accesiones, el tratamiento salino provocó un aumento significativo de los niveles de Na⁺ en las hojas, con un promedio de 34,8 mg g⁻¹ PS (LSD, α : 0,05). Por otra parte, en todas las poblaciones evaluadas, tanto la concentración de K⁺ como la de Ca²⁺ disminuyeron cuando las plantas se expusieron a salinidad (Figura 29 B y C). Al igual que lo observado para el ión sodio, para estos dos cationes las diferencias entre tratamientos también fueron significativas (LSD, α : 0,05).

Como se pudo apreciar en la Figura 27, el peso seco aéreo de todas las poblaciones se redujo entre un 20-75% cuando las plantas se expusieron a salinidad, y el contenido de Na⁺ aumentó seis veces en promedio con respecto a sus controles (Figura 29 A). El análisis comparativo entre los pesos secos de la parte aérea y los contenidos de Na⁺ nos permitió observar una correlación positiva en este sentido, la cual indicaría que las poblaciones que más Na⁺ acumularon en la parte aérea, fueron aquellas que mayor porcentaje en peso seco con respecto al control alcanzaron al cabo de 35 días bajo estrés salino (Figura 30 y 31).

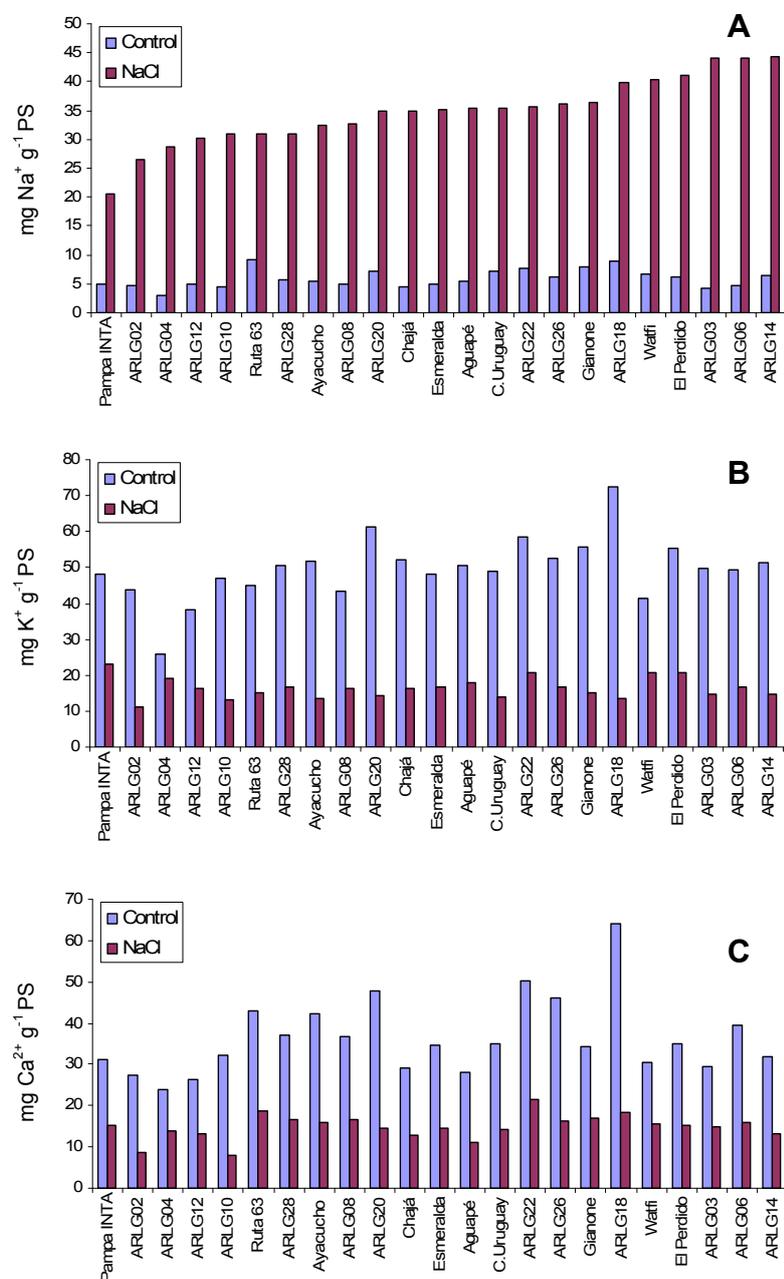


Figura 29: Contenido de Na⁺ (A), K⁺ (B) y Ca²⁺ (C), expresado en mg g⁻¹ PS, en hojas de plantas controles y salinizadas a los 35 días de ensayo. Los datos corresponden al promedio de dos muestras, con 6 repeticiones cada una. En todos los casos se encontraron diferencias significativas entre tratamientos (LSD, α : 0,05).

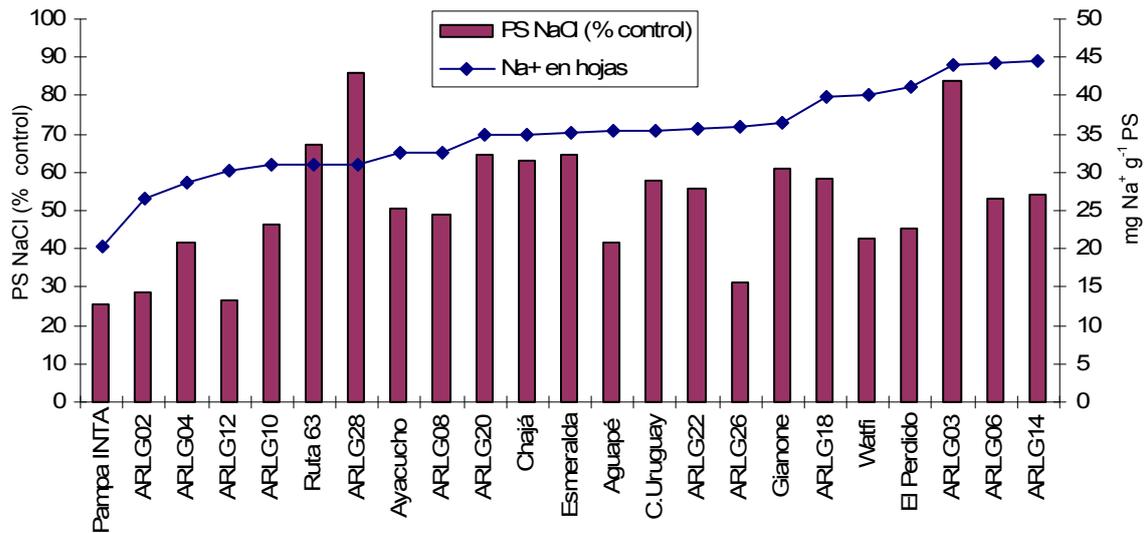


Figura 30: Relación entre el peso seco aéreo y el contenido de Na⁺ en hojas de plantas expuestas a estrés salino por aclimatación. Sobre el eje izquierdo se grafica el peso seco de la parte aérea en NaCl (% control). En el eje derecho, se grafica el contenido de Na⁺ en hojas (mg g⁻¹ PS). Los datos representan el promedio de dos muestras con 6 repeticiones cada una.

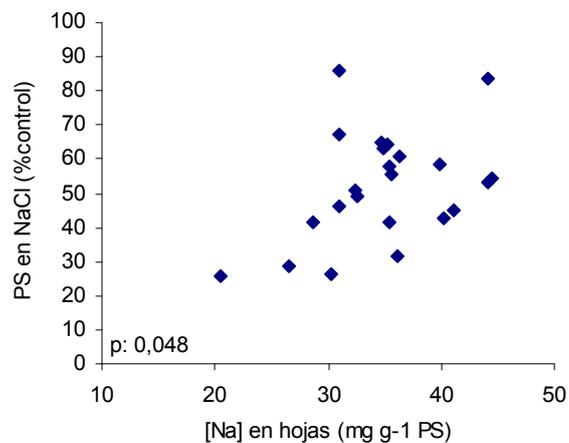


Figura 31: Relación entre el peso seco de la parte aérea de plantas expuestas a salinidad por aclimatación (% del control) y el contenido de Na⁺ en hojas (mg g⁻¹ PS). (Coef. Correl.: 0,416, p: 0,048).

Por el contrario, la relación K⁺/Na⁺ en hojas no permitió observar una tendencia clara cuando se lo comparó con el peso seco (% control) en condiciones de salinidad. Asimismo, tampoco permitió observar diferencias significativas entre las poblaciones evaluadas. La excepción fue la población

Pampa INTA, la cual bajo condiciones de estrés salino acumuló menos Na^+ y más K^+ que el resto de los materiales, con lo cual la relación K^+/Na^+ para esta especie resultó ser la máxima en valores absolutos y, estadísticamente diferente del resto (Figura 32; LSD, α : 0,05).

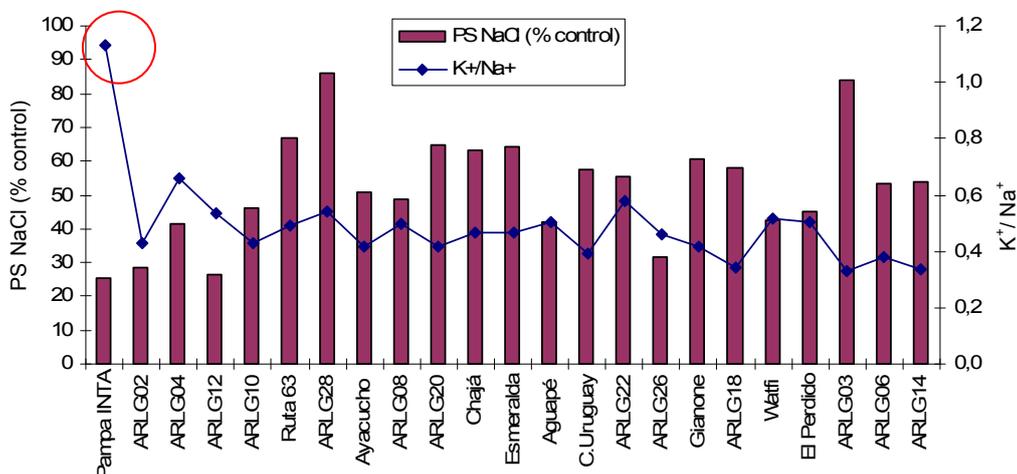


Figura 32: Relación entre el peso seco de la parte aérea de plantas expuestas a salinidad por aclimatación (% del control) y la relación K^+/Na^+ en hojas ($\text{mg Na}^+ \text{g}^{-1} \text{PS}$). El círculo rojo encierra al valor que se diferenció estadísticamente del resto (LSD, α : 0,05)

Resulta una hipótesis de trabajo interesante detectar que plantas que logran tener altas concentraciones de Ca^{2+} en hojas bajo estrés salino, toleran mejor el mismo. En la Figura 33, se observa una correlación positiva al relacionar el peso seco (% control) en condiciones de estrés salino y el contenido de Ca^{2+} en hojas.

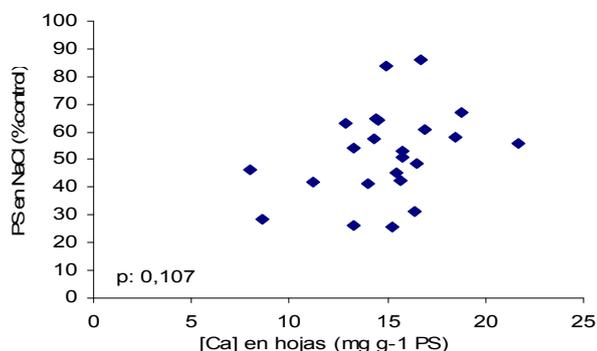


Figura 33: Relación entre el peso seco de la parte aérea de plantas expuestas a salinidad por aclimatación (% del control) y el contenido de Ca^{2+} en hojas ($\text{mg g}^{-1} \text{PS}$). (Coef. Correl.: 0,345, p: 0,107).

Por otra parte, el tratamiento salino provocó un aumento significativo en el contenido de Cl⁻ en hojas de todos los materiales evaluados (Tabla 7).

		$\mu\text{mol Cl}^- \text{ g}^{-1} \text{ PS de hojas}$	
	Accesiones	Control	Sal
	Pampa INTA	116 \pm 3,8	1048 \pm 180,1 * a
T	ARLG20	136 \pm 17,5	1244 \pm 218,1 * ab
S	ARLG12	181 \pm 50,8	1318 \pm 220,7 * ab
T	ARLG08	146 \pm 20,5	1375 \pm 281,0 * abc
S	El Perdido	192 \pm 22,4	1592 \pm 207,8 * bcd
T	ARLG06	152 \pm 10,3	1885 \pm 22,3 * d
S	Aguapé	251 \pm 26,0	2665 \pm 286,1 * e

Tabla 7: Contenido en Cl⁻ ($\mu\text{mol g}^{-1}$ PS), en hojas de plantas control y tratadas con NaCl, a los 35 días de ensayo. En la columna de la izquierda se indica para cada población si resultó tolerante (**T**) o sensible (**S**) según el análisis de la Figura 35, Los datos corresponden al promedio de dos muestras, con 6 repeticiones cada una (LSD, α : 0,05).

En este caso, sólo se presentan los datos obtenidos para las poblaciones que se seleccionaron como contrastantes en cuanto a su crecimiento (Figura 28), y además se incluyó a la población Pampa INTA la cual, vale recordar, presentó una relación K⁺/Na⁺ superior al resto bajo condiciones de estrés (Figura 32). Sorprendentemente, dicho material fue el que menos Cl⁻ acumuló en hojas, diferenciándose estadísticamente de las poblaciones “sensibles” El Perdido y Aguapé, y de la población ARLG06, considerada “tolerante” (LSD, α : 0,05). En definitiva, no se encontró ningún tipo de correlación definida entre el contenido de Cl⁻ foliar y la mayor o menor tolerancia a la salinidad (Tabla 7).

1.2.2. Solutos orgánicos

Se determinó el contenido de prolina bajo condiciones controles y bajo estrés salino, para las diferentes poblaciones, observándose aumentos significativos de la concentración de la misma en todos los casos (LSD, α : 0,05)

e incluso, diferencias significativas entre poblaciones (Figura 34). Sin embargo, no se encontró correlación entre este parámetro y la acumulación de materia seca.

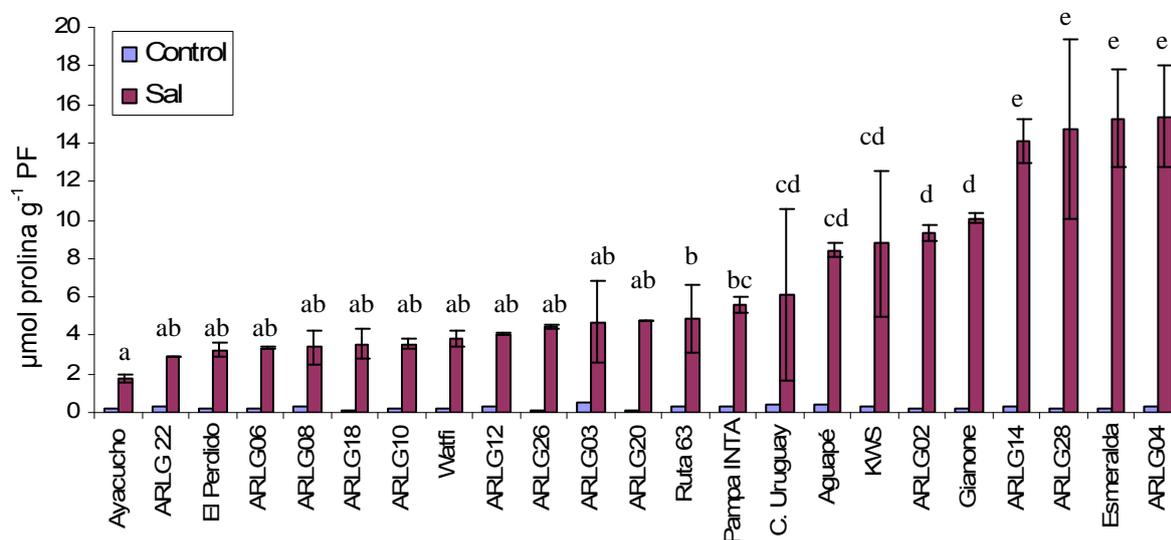


Figura 34: Contenido de prolina ($\mu\text{mol g}^{-1}$ PF), de plantas controles y tratadas con NaCl durante 35 días. Los datos corresponden al promedio de dos muestras, con 3 repeticiones cada una. Letras distintas indican diferencias significativas entre poblaciones (LSD, α : 0,05).

Otros solutos orgánicos de interés ante una situación de estrés son las poliaminas libres. Entre ellas, la putrescina, la espermidina y la espermina, son las más abundantes en vegetales y fueron las que se analizaron en este ensayo. En la Tabla 8 se presentan los datos de poliaminas obtenidos para las poblaciones que resultaron contrastantes y a los fines comparativos los obtenidos en la población Pampa INTA (Figura 32 y Tabla 7). En reglas generales, se observó una tendencia a disminuir el contenido de la espermidina y aumentar el contenido de la espermina en las plantas expuestas a estrés. La disminución de la espermidina fue significativa en todos los casos. Por su parte, el incremento en la concentración de espermina bajo condiciones de salinidad, sólo fue significativa para la población Aguapé, considerada “sensible”. Con respecto al contenido de putrescina, no se observó una tendencia concreta; sólo en un caso (Pampa INTA) se observó duplicación de la concentración cuando las plantas se expusieron a NaCl.

	CONTROL			SAL		
	PUT	SPD	SPM	PUT	SPD	SPM
ARLG06	69,8 ± 40,9	509,1 ± 164,5	361,8 ± 128,9	58,0 ± 36,0	104,3 ± 5,4 *	396,1 ± 77,9
ARLG08	46,1 ± 12,2	593,9 ± 70,4	229,7 ± 29,2	35,7 ± 21,3	248,5 ± 85,0 *	388,5 ± 52,8
ARLG12	81,5 ± 1,7	388,3 ± 59,1	222,6 ± 54,2	49,6 ± 39,8	255,9 ± 37,6 *	213,4 ± 31,8
ARLG20	43,7 ± 12,3	704,1 ± 244,2	383,2 ± 55,5	61,2 ± 21,6	267,6 ± 11,0 *	518,8 ± 73,1
El Perdido	45,0 ± 14,8	373,4 ± 123,2	292,8 ± 38,4	22,8 ± ND	92,6 ± 3,5 *	300,0 ± 18,9
Pampa INTA	45,5 ± 16,7	401,8 ± 112,5	450,1 ± 118,0	97,2 ± 11,2 *	166,4 ± 10,4 *	665,2 ± 142,8
Aguapé	85,0 ± 13,4	556,3 ± 94,5	262,6 ± 0,2	70,4 ± 11,0	261,5 ± 43,4 *	467,9 ± 63,9 *

Tabla 8: Contenido de poliaminas libres ($\eta\text{mol g}^{-1}$ PF) en hojas de plantas control y tratadas con NaCl, de distintas poblaciones de *L. tenuis*, a los 35 días de ensayo. Los datos corresponden al promedio de dos muestras, con 3 repeticiones cada una, y sus respectivas desviaciones estándar. *Diferencias significativas entre tratamientos (LSD, α : 0,05). PUT: Putrescina, SPD: Espermidina y SPM: Espermina.

2. Respuestas al estrés salino por aclimatación de otras especies del género (*L. japonicus*, *L. burtii*, *L. filicaulis*, *L. creticus* y *L. corniculatus*)

2.1. Parámetros morfológicos y de crecimiento

Bajo condiciones control y al cabo de 35 días, las especies evaluadas en este ensayo llegaron a tener pesos secos que variaron entre 0,4 y 1,7 gramos por planta. Al compararlos con los pesos resultantes de la exposición a estrés por aclimatación con NaCl, se observó una evidente inhibición del crecimiento en las mismas. Por su parte, *L. corniculatus* fue la especie con una mayor producción de materia seca en condiciones control y la más afectada por el tratamiento salino (78%). Por el contrario, *L. japonicus* Gifu fue la especie que menos redujo el peso seco de la parte aérea (47%) bajo las condiciones de estrés impuestas (Figura 35).

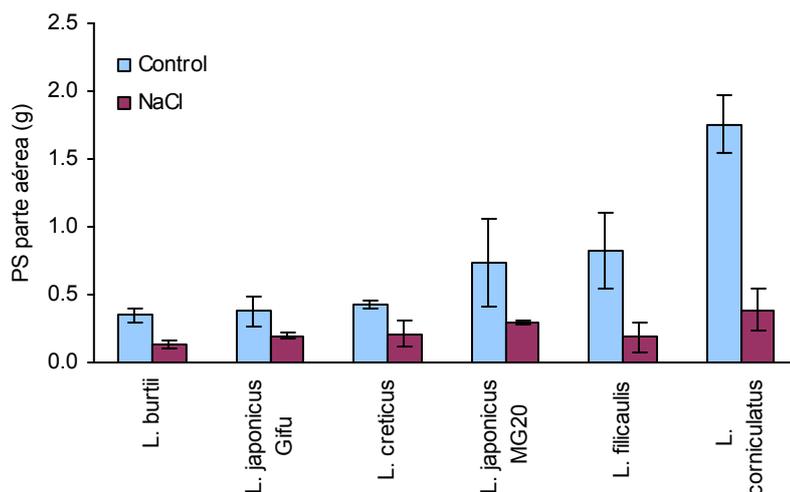


Figura 35: Peso seco de la parte aérea de especies del género *Lotus* al cabo de 35 días de crecimiento bajo condiciones salinas, y sus respectivos controles. Los datos representan un promedio de dos muestras con seis repeticiones cada una, y las barras las desviaciones estándar.

En la Figura 36 se grafican los pesos secos aéreos desglosados en tallos (A) y en hojas (B). Si tenemos en cuenta el promedio general de reducción del peso seco aéreo total (63%), se puede observar que el tallo es la componente que se reduce en mayor medida (71%), mientras que el peso seco de las hojas se reduce en un 53%.

Resultó interesante observar que las plantas de *L. filicaulis*, a pesar de tener una menor producción de materia seca en condiciones de crecimiento control, presentaron similares porcentajes de reducción del peso seco que *L. corniculatus* bajo condiciones de estrés salino. Coincidentemente, estas dos especies fueron las más afectadas en la reducción de tallos y ramificaciones por planta y del diámetro del tallo (Figura 37 A y B).

Con respecto al área foliar de la 4ª hoja verdadera se observó que la especie más afectada por el tratamiento salino fue *L. japonicus* MG20, la cual presentó un 34% menos de área foliar que las plantas creciendo bajo condiciones control. En los otros casos no se observaron diferencias significativas entre plantas controles y plantas salinizadas (Figura 37 C).

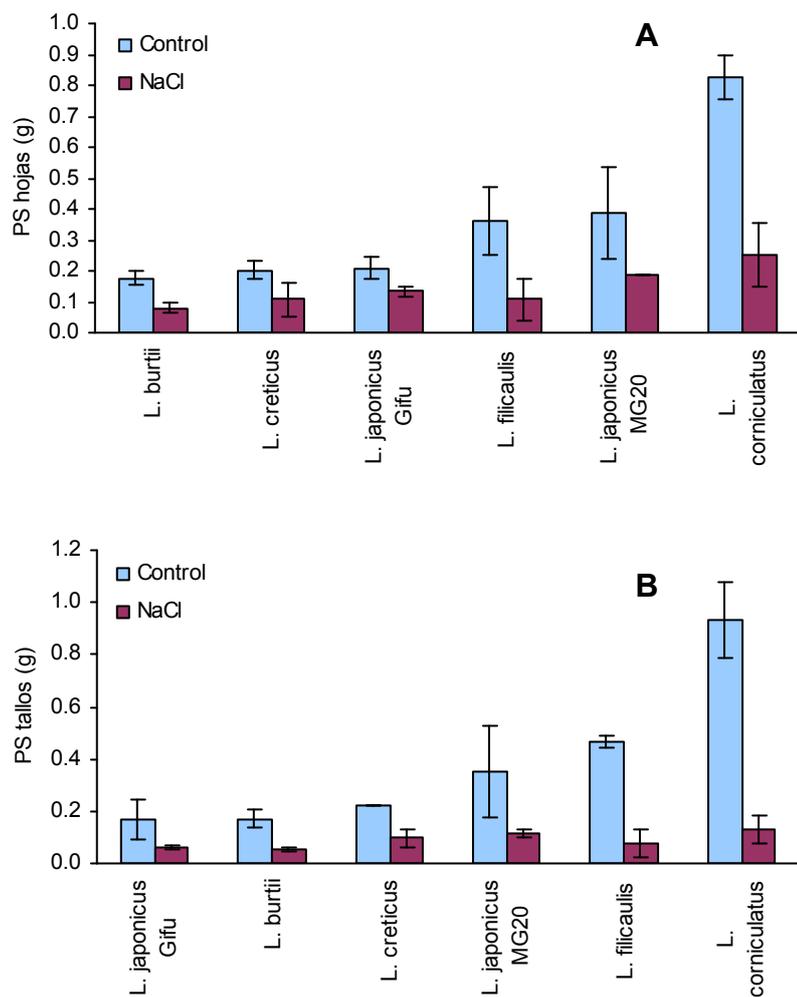


Figura 36: Peso seco de las hojas (A) y del tallo (B) de especies del género *Lotus* al cabo de 35 días de tratamiento con solución salina. Los datos representan un promedio de dos muestras con seis repeticiones cada una, y las barras las desviaciones estándar.

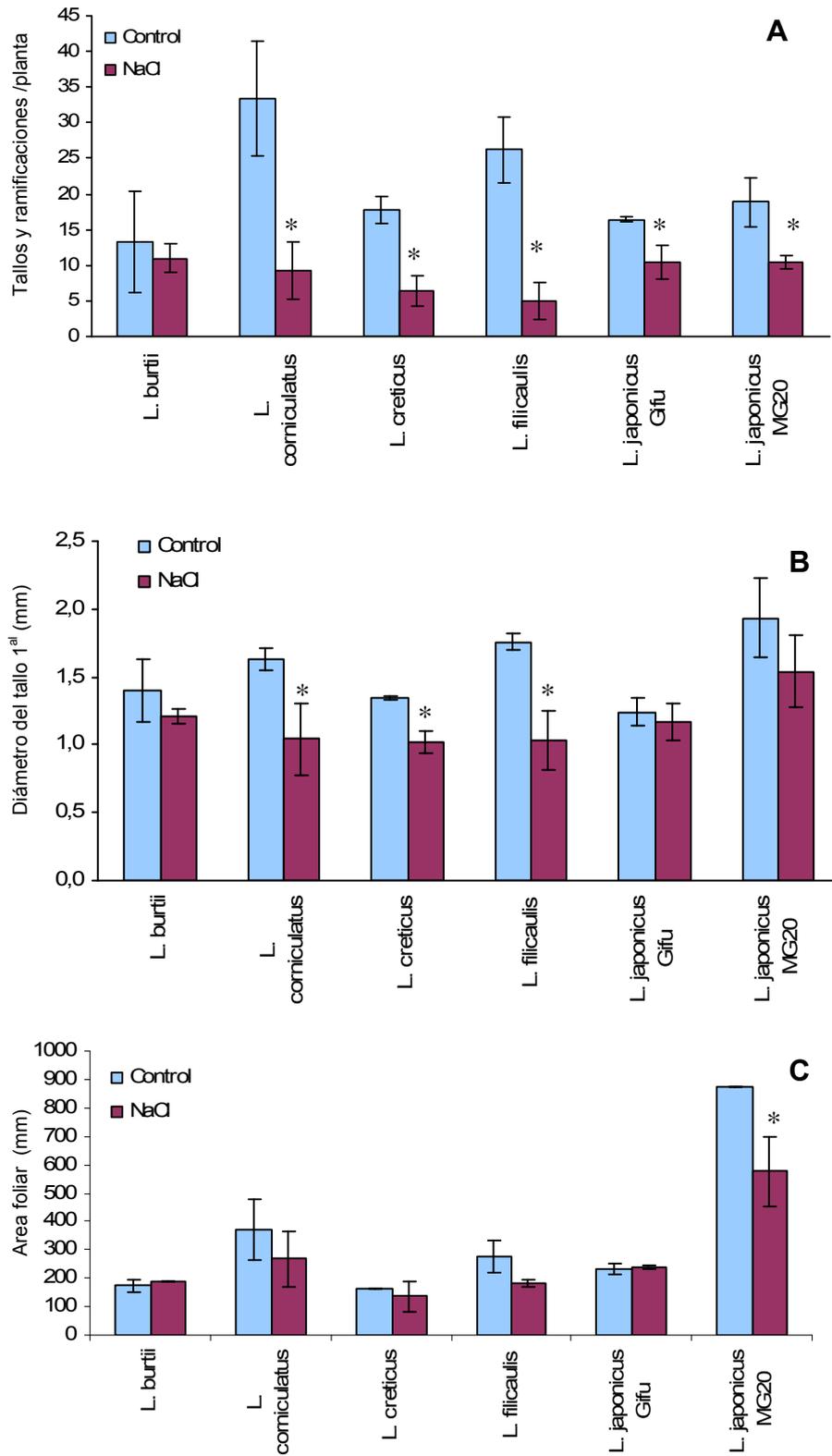


Figura 37: Tallos y ramificaciones por planta (A), Diámetro del tallo principal (B) y Área foliar de la cuarta hoja verdadera (C) de plantas controles y plantas bajo estrés salino a los 35 días de ensayo. Los datos corresponden al promedio de dos muestras, con 6 repeticiones cada una en A y B, y con 4 repeticiones en C, y las barras representan las desviaciones estándar. *Diferencias significativas entre tratamientos (LSD, α : 0,05).

2.2. Parámetros bioquímicos

2.2.1. Solutos inorgánicos

Al evaluar el contenido de iones en hojas, se observó un aumento generalizado de Na^+ cuando las plantas se expusieron a estrés salino, encontrando diferencias significativas entre especies (Figura 38 A). En función de la concentración de Na^+ determinada, se establecieron tres grupos estadísticamente distintos; con una acumulación de alrededor de 10mg de Na^+ por gramo de peso seco se agruparon los ecotipos MG20 y Gifu de *L. japonicus* y *L. burtii*; duplicando dicha concentración, *L. filicaulis* y *L. creticus* formaron otro grupo estadísticamente diferente y por último, con 44 mg de Na^+ por gramo de peso seco se ubicó *L. corniculatus* (mayor valor de acumulación).

Por su parte, el contenido de K^+ y de Ca^{2+} en las hojas disminuyó significativamente en todas las especies al exponer las plantas a salinidad. En estos casos no se observaron diferencias entre especies tal como ocurrió con el Na^+ (Figura 38 B y C).

En la Figura 39 se grafica el peso seco aéreo de plantas estresadas, expresado como porcentaje del peso en condiciones control, y las relaciones K^+/Na^+ (A) y $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ (B), para todas las especies evaluadas en este ensayo. En general, y para ambas relaciones, pudo observarse que cuanto mayor resultó la relación, mayor fue el peso seco de la parte aérea; la única excepción fue *L. creticus* que a pesar de haber acumulado mucho Na^+ y, consecuentemente, tener las menores relaciones entre iones, fue una de las especies que tuvo mayor porcentaje de peso con respecto al control.

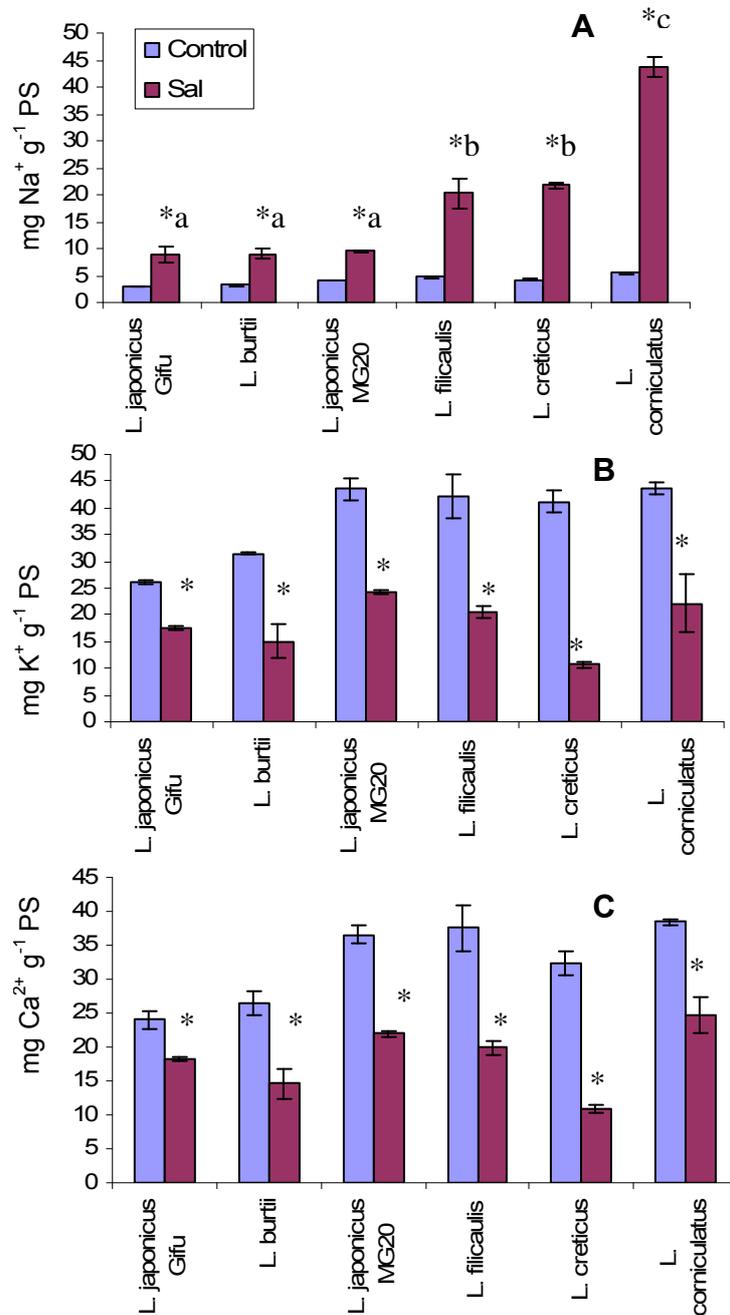


Figura 38: Contenido de Na⁺ (A), K⁺ (B) y Ca²⁺ (C), (mg g⁻¹ PS), en hojas de plantas controles y tratadas con NaCl, a los 35 días del ensayo. Los datos corresponden al promedio de dos muestras, con 6 repeticiones cada una. *Diferencias significativas entre tratamientos, y letras distintas indican diferencias significativas entre especies (LSD, α : 0,05).

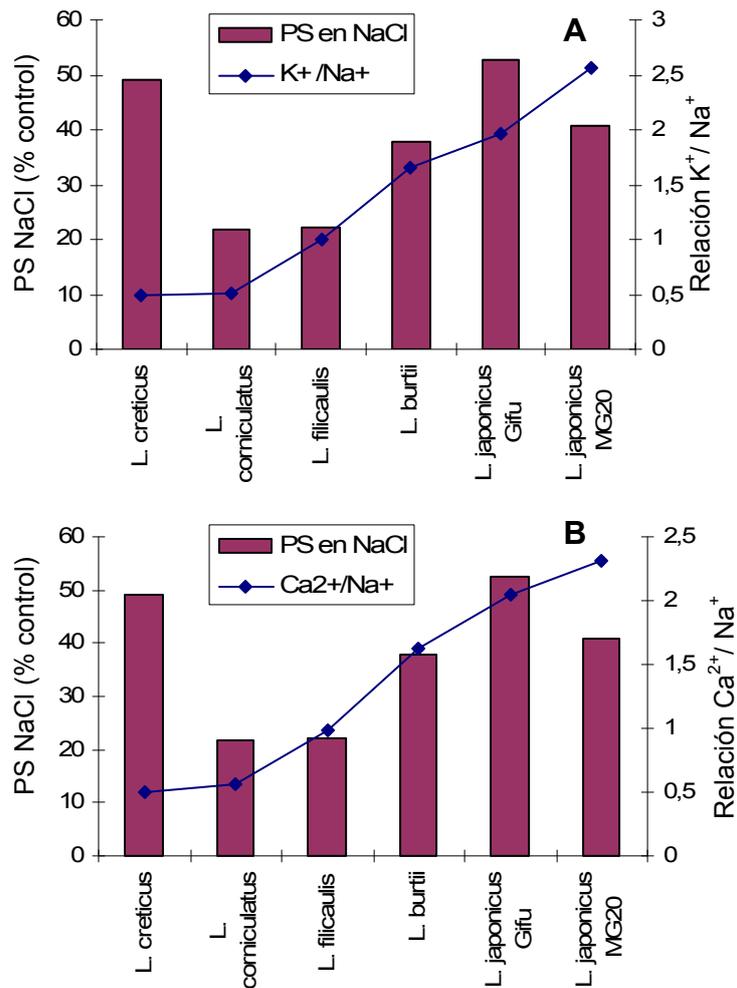


Figura 39: Relación entre el peso seco (% del control) de la parte aérea de plantas expuestas a salinidad por aclimatación y las relaciones K⁺/Na⁺ (A) y Ca²⁺/Na⁺ (B) en hojas.

El tratamiento salino provocó un aumento de las concentraciones de Cl⁻ en hojas hasta valores cercanos a los 2 mmoles por gramo de peso seco (Tabla 9). Por su parte, *L. corniculatus* fue la especie que más Cl⁻ acumuló y al cabo de 35 días de ensayo presentó una concentración 17 veces superior. Simultáneamente, y bajo idénticas condiciones experimentales, el incremento observado en *L. burtii* fue sólo 4 veces superior al control.

$\mu\text{mol Cl}^- \text{ g}^{-1} \text{ PS de hojas}$		
Especies	Control	Sal
<i>Lotus burtii</i>	108,5 \pm 13,3	476,0 \pm 19,1 * ab
<i>Lotus filicaulis</i>	98,4 \pm 1,5	604,5 \pm 73,4 * bc
<i>Lotus japonicus</i> MG20	108,1 \pm 6,9	797,9 \pm 45,7 * bc
<i>Lotus japonicus</i> Gifu	67,8 \pm 5,8	1035,2 \pm 114,6 * cd
<i>Lotus creticus</i>	87,7 \pm 19,2	1206,9 \pm 361,2 * d
<i>Lotus corniculatus</i>	110,4 \pm 21,0	1919,5 \pm 285,4 * e

Tabla 9: Contenido de Cl^- ($\mu\text{mol g}^{-1}$ PS) en hojas de plantas control y tratadas con NaCl a los 35 días de ensayo. Los datos corresponden al promedio de dos muestras, con 6 repeticiones cada una. *Diferencias significativas entre tratamientos y letras distintas indican diferencias significativas entre especies (LSD, α : 0,05).

En vista de los resultados experimentales obtenidos nos pareció interesante determinar si existieron diferencias entre las concentraciones iónicas de las hojas basales y de las apicales. En la Figura 40 se presentan estos resultados con los contenidos de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} . En la mayoría de las especies evaluadas, se observó mayor contenido de Na^+ en las hojas basales que en las apicales, salvo en el caso de *L. burtii* que no presentó diferencias significativas entre ambos tipos de hojas (LSD, α : 0,01). En este sentido *L. tenuis* Pampa INTA acumuló cantidades iguales de Na^+ que los dos ecotipos de *L. japonicus* y que *L. filicaulis*, tanto en hojas apicales como basales. Por el contrario, las concentraciones de Na^+ encontradas en hojas basales y apicales de *L. corniculatus* fueron estadísticamente superiores que aquellas encontradas en igual localización para *L. tenuis* Pampa INTA (LSD, α : 0,05).

Por su parte, el análisis de los niveles de K^+ en ambos tipos de hojas permitió diferenciar a *L. corniculatus*, *L. burtii* y *L. japonicus* Gifu, en las cuales la concentración de este catión fue estadísticamente superior en las hojas apicales. Simultáneamente, el contenido de Ca^{2+} en hojas apicales sólo fue superior en *L. burtii* y *L. japonicus* Gifu, mientras que en el resto de las especies evaluadas no se registraron diferencias significativas (LSD, α : 0,01).

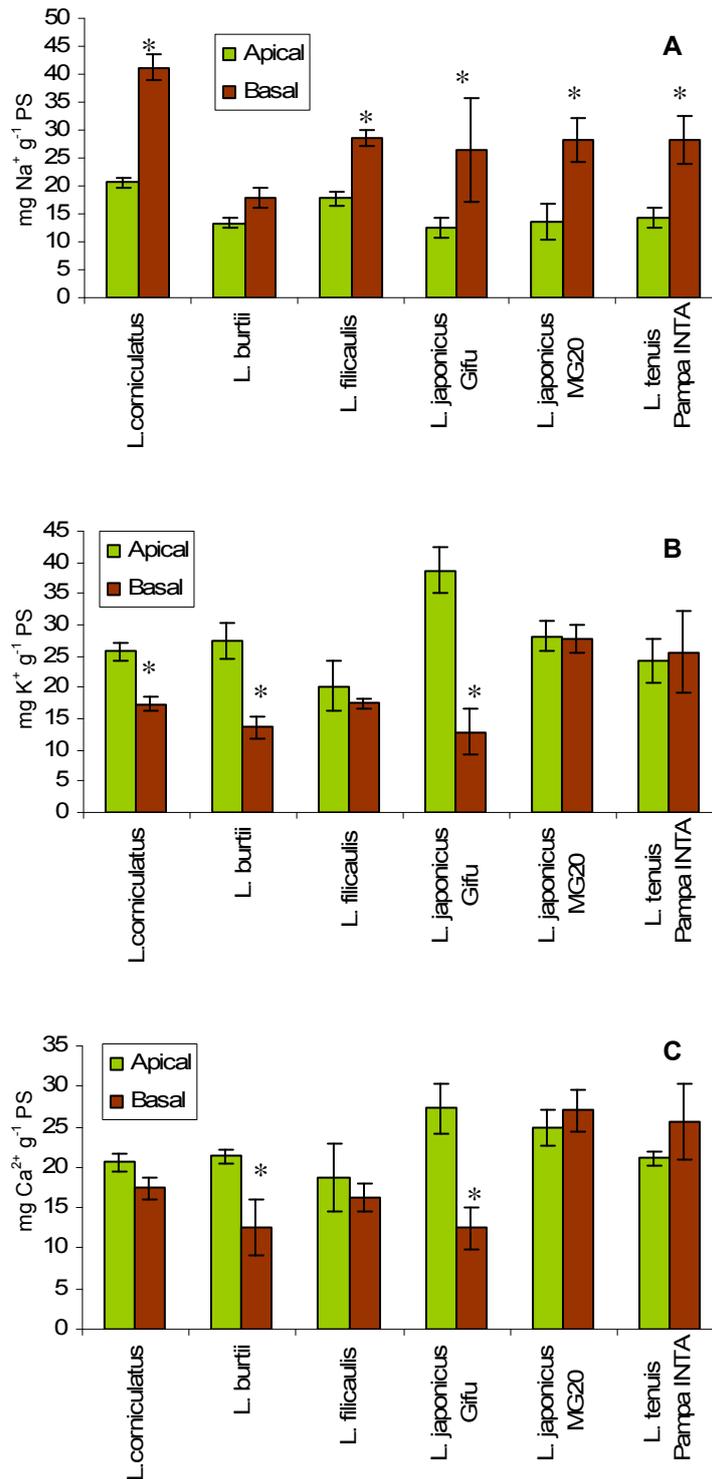


Figura 40: Contenido de Na⁺ (A), K⁺ (B) y Ca²⁺ (C) en hojas apicales y basales de plantas a los 35 días de tratamiento con NaCl por aclimatación. Los datos corresponden al promedio de cuatro repeticiones y se expresan en mg g⁻¹PS. *Diferencias significativas entre hojas basales y apicales (LSD, α : 0,05).

Posteriormente, se analizó la posible correlación de estos resultados con la disminución del peso seco observado bajo condiciones de estrés, resultando una de las más interesantes aquella que relaciona el peso seco de la parte aérea (% del control) con el índice K^+/Na^+ en las hojas apicales (Figura 41).

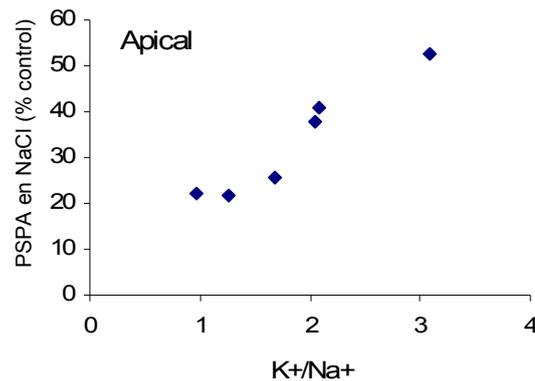


Figura 41: Correlación entre el peso seco de la parte aérea de plantas del género *Lotus* expuestas a salinidad por aclimatación (% del control) y la relación entre K^+/Na^+ en hojas apicales (Coef. Correl.: 0,961, p: 0,002).

Asimismo, también se analizó el contenido de Cl^- desglosado en hojas apicales y basales. Para *L. burtii* y *L. filicaulis* no se detectaron diferencias significativas entre las concentraciones de ambos tipos de hojas; por el contrario, en las otras especies el contenido de Cl^- fue superior en las hojas basales (LSD, α : 0,05). En este sentido, también se destacó la diferencia encontrada entre *L. corniculatus* y *L. tenuis*, en cuyas hojas tanto basales como apicales la concentración de Cl^- fue estadísticamente superior en la especie *L. corniculatus* (LSD, α : 0,05). Entre *L. tenuis* y *L. japonicus* no se registraron diferencias para el contenido de Cl^- entre las hojas basales; sin embargo, el análisis de las concentraciones en las hojas apicales separó estadísticamente a *L. japonicus* Gifu, el cual presentó un contenido levemente superior al del ecotipo MG20 y al de *L. tenuis* (Figura 42; LSD, α : 0,05).

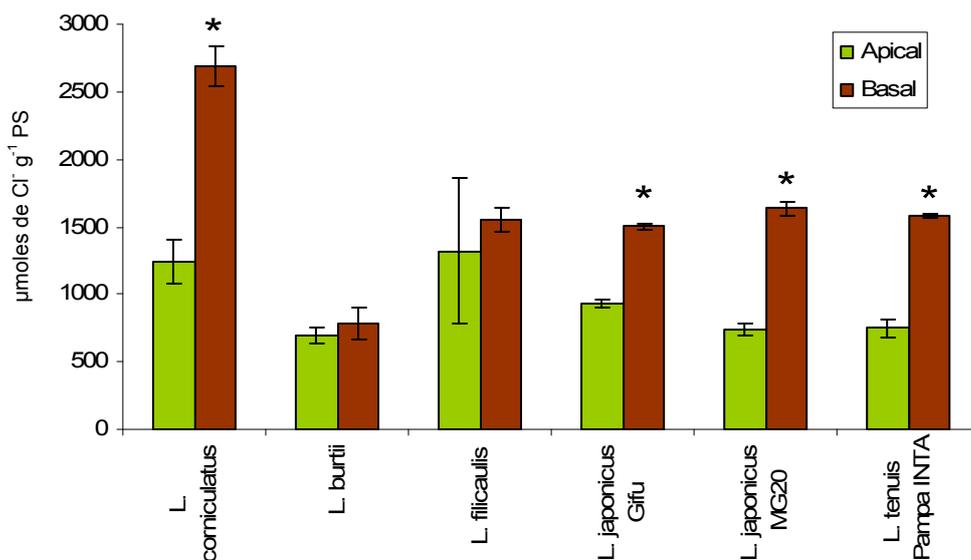


Figura 42: Contenido de Cl⁻ en hojas apicales y basales de plantas a los 35 días de tratamiento con NaCl por aclimatación. Los datos corresponden al promedio de cuatro repeticiones y se expresan en μmoles g⁻¹ PS. *Diferencias significativas entre hojas basales y apicales (LSD, α: 0,05).

2.2.2. Solutos orgánicos

En tejidos frescos de los materiales evaluados, se determinaron los contenidos de prolina y poliaminas. En la Figura 43 puede observarse que en todos los casos la concentración de prolina en hojas aumentó significativamente en las plantas expuestas a estrés salino.

Al respecto, *L. japonicus* Gifu y *L. corniculatus* resultaron ser las dos especies que más acumularon diferenciándose del resto. En este sentido, se destaca lo observado para la especie modelo *L. japonicus*, que presentó un comportamiento diferente entre un ecotipo y otro. El ecotipo denominado Gifu acumuló casi 5 veces más prolina que el similar MG20 bajo idénticas condiciones de estrés salino (Figura 43).

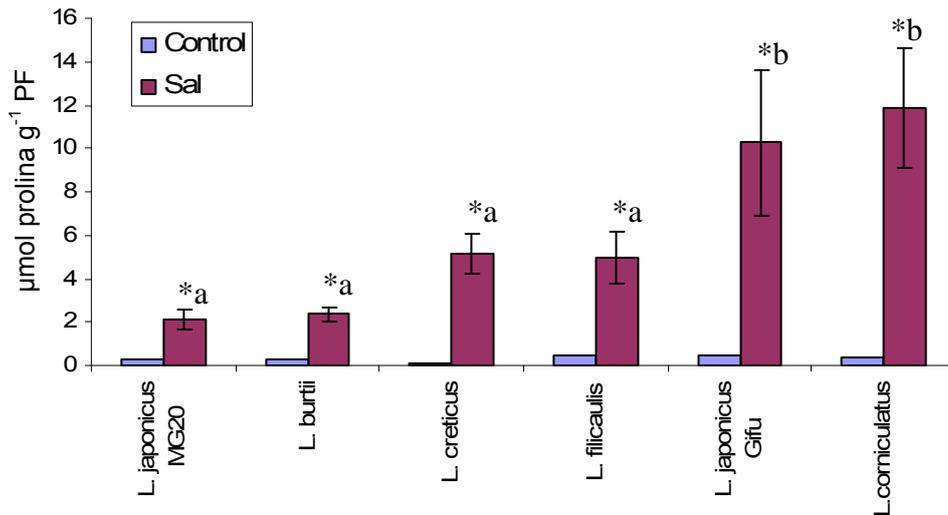


Figura 43: Aumento en la concentración de prolina a los 35 días de exposición a estrés salino por aclimatación en distintas especies del género *Lotus*. Los datos corresponden al promedio de dos muestras, con 3 repeticiones cada una. *Diferencias significativas entre tratamientos y letras distintas indican diferencias significativas entre especies (LSD, α : 0,05).

Por su parte, en la tabla 10 se detallan los contenidos de putrescina, espermidina y espermina en hojas a los 35 días de ensayo. El contenido de putrescina no fue estadísticamente diferente entre plantas control y plantas expuestas a estrés salino en ninguna de las especies evaluadas. Los contenidos de espermidina en plantas estresadas disminuyeron significativamente en casi todos los casos evaluados. La excepción fue *L. japonicus* MG20, en la cual no se detectaron diferencias entre tratamientos para esta poliamina, pero sí en los niveles de espermina. Asimismo, *L. japonicus* MG20 fue la única especie que incrementó significativamente el contenido de espermina en plantas estresadas.

Asimismo, se detectaron diferencias significativas entre especies para el contenido de SPD de plantas salinizadas, destacándose *L. japonicus* ecotipo MG20 el cual presentó una concentración 2,5 veces mayor que el ecotipo Gifu (Figura 44).

	CONTROL			SALINIDAD		
	PUT	SPD	SPM	PUT	SPD	SPM
L. corniculatus	60 ± 9,3	387 ± 37,4	313 ± 70,9	79 ± 67,3	177 ± 40,1 *	491 ± 132,5
L. japonicus Gifu	67 ± 30,5	670 ± 140,5	379 ± 157,7	74 ± 41,3	244 ± 71,0 *	528 ± 22,1
L. japonicus MG20	203 ± 95,1	791 ± 153,6	482 ± 5,4	178 ± 41,1	605 ± 127,0	721 ± 129,3 *
L. filicaulis	151 ± 75,5	899 ± 54,6	350 ± 29,4	133 ± 15,0	467 ± 169,6*	456 ± 30,4
L. buriti	280 ± 51,1	981 ± 192,4	513 ± 97,8	154 ± 32,9	313 ± 4,7 *	439 ± 11,5
L. creticus	293 ± 193,3	518 ± 173,1	371 ± 111,4	170 ± 4,4	127 ± 31,2 *	249 ± 15,1

Tabla 10: Contenido de poliaminas libres ($\eta\text{mol g}^{-1}$ PF) en hojas de plantas control y tratadas con NaCl, de distintas especies del género *Lotus*, a los 35 días de ensayo. Los datos corresponden al promedio de dos muestras con 3 repeticiones cada una y sus respectivas desviaciones estándar. *Diferencias significativas entre tratamientos (LSD, α : 0,05).

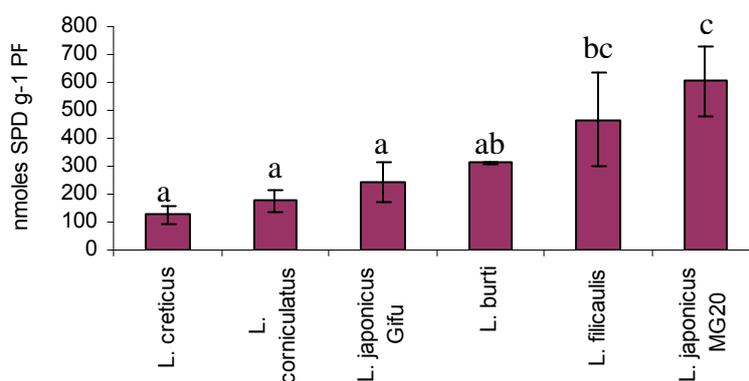


Figura 44: Contenido de espermidina, expresado como $\eta\text{mol g}^{-1}$ PF, en hojas de plantas tratadas por aclimatación con NaCl durante 35 días. Los datos corresponden al promedio de dos muestras, con 3 repeticiones cada una, y sus respectivas desviaciones estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre especies (LSD, α : 0,05).

3. Discusión

La inhibición de la producción y de la expansión foliar es la primer respuesta a un exceso de sales en plantas sensibles (Greenway y Munns, 1980; Hasegawa *et al.*, 2000; Munns, 2002). Por lo tanto, entender los mecanismos involucrados en mantener estos parámetros sin cambios en

especies forrajeras tolerantes a salinidad, es de especial importancia por la fuerte dependencia con el rendimiento de los mismos. Por ello, nos pareció importante determinar parámetros de crecimiento tales como el área foliar, el diámetro y la cantidad de tallos y ramificaciones por planta.

Existen evidencias de que un factor clave en la disminución de la productividad de *L. tenuis*, es la reducción en el número de tallos por unidad de superficie (Miñón y Refi, 1993; Acuña y Cuevas, 1999). En nuestro caso, en 17 poblaciones de *L. tenuis* el número de tallos y ramificaciones por planta disminuyó bajo tratamiento salino, y en *L. filicaulis* y *L. corniculatus*, éste fue el factor que mayor incidencia tuvo en la disminución del peso seco observada.

En otras especies de la familia leguminosas, por ejemplo en *Medicago citrina* (considerada tolerante a la salinidad) las estructuras más afectadas ante incrementos en la concentración salina fueron el tallo y el pecíolo, en los cuales una concentración de 50mM produjo una disminución significativa de la tasa de crecimiento relativa (Sibole *et al.*, 2003a). Bajo nuestras condiciones de ensayo, y al desglosar el peso seco aéreo total en tallos y hojas, pudimos observar que en plantas del género *Lotus* disminuyó tanto el peso seco de las hojas como de los tallos, siendo éste último el que afectó al peso seco total en mayor proporción. Teniendo en cuenta que en general el área foliar no varió, la disminución del peso seco de las hojas podría explicarse por la senescencia y abscisión de las mismas a causa del estrés impuesto, en correspondencia con lo descrito por Teakle *et al.* (2006). El área foliar de plantas expuestas a salinidad sólo disminuyó en dos poblaciones de *L. tenuis* y en *L. japonicus* MG20. Estos resultados presentan cierta similitud con lo observado en *M. citrina* donde el área foliar sólo disminuyó con concentraciones salinas elevadas (200mM de NaCl) (Sibole *et al.*, 2003b).

Las correlaciones encontradas en las poblaciones de *L. tenuis* en cuanto al contenido de Na⁺ en hojas, podría estar sugiriendo una eficiente acumulación del mismo en la vacuola, lo cual constituiría un mecanismo de osmorregulación, evitando una drástica disminución del contenido hídrico (Zhu, 2003; Apse y Blumwald, 2007).

A su vez, también se encontró una correlación positiva entre el contenido de Ca^{2+} en hojas y el peso seco de la parte aérea bajo condiciones de estrés. En este sentido, hay varios roles que este catión podría estar desempeñando; por un lado, el Ca^{2+} podría contribuir a mantener la estabilidad funcional de las membranas, limitando la permeabilidad de la misma y regulando el ingreso y el transporte de iones, y por otro lado, como segundo mensajero en las vías de señalización. Existe evidencia experimental que sugiere que bajo condiciones de estrés salino prolongado, los aumentos en la absorción de Ca^{2+} están asociados con incrementos de ABA. También hay reportes que indican que en presencia de altas concentraciones salinas, se incrementa el contenido de Ca^{2+} citosólico proveniente del apoplasto y de los compartimentos intracelulares (Parida y Das, 2005). En nuestro caso, a pesar de que en todas las poblaciones el contenido del ión calcio en hojas disminuyó con el tratamiento salino y el Na^+ se incrementó, podríamos suponer que aquellos materiales que lograron mayores relaciones $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$, han tenido una ventaja adaptativa ante la situación restrictiva impuesta. Para el caso particular de la población ARLG28, se registraron altas relaciones $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ y K^+/Na^+ en hojas de plantas expuestas a estrés; coincidentemente con ello, en este material no se registraron diferencias entre tratamientos para ninguno de los parámetros de crecimiento medidos, salvo para el área foliar que, sorprendentemente, fue superior al control. Como se mencionó anteriormente, en la especie *M. citrina* expuesta a 50, 100 y 200mM de NaCl no se registraron diferencias en el área foliar, y esta respuesta se asoció con aumentos en los contenidos de pigmentos fotosintéticos y de proteínas en las hojas, sin encontrar relación con la tasa de fijación de CO_2 ni con la transpiración (Sibole *et al.*, 2003b). Estas observaciones dejarían en duda una posible correlación con incrementos de ABA como se había sugerido.

Para las poblaciones consideradas “tolerantes” y “sensibles” según nuestro criterio de selección, no encontramos una relación directa entre las concentraciones de cationes en hojas y el crecimiento observado bajo condiciones de estrés. A pesar de ello, seguimos considerando que la producción de materia seca, tanto bajo condiciones control como bajo

condiciones restrictivas, es el mejor parámetro de selección de germoplasma tolerante en especies forrajeras.

Con excepción de las poblaciones de *L. tenuis*, para las demás especies del género *Lotus* estudiadas pudo establecerse una asociación que sugiere que aquella especie que menos inhibe su crecimiento en condiciones de salinidad, constituye aquella que presenta una mayor relación K^+/Na^+ en hojas en expansión. El equilibrio intracelular de Na^+ y K^+ es importante para las actividades de muchas enzimas citosólicas y para mantener el potencial de membrana, y por lo tanto para la homeostasis eficiente de iones (Serrano y Rodríguez-Navarro, 2001; Zhu, 2003; Rodríguez-Pérez, 2006). La excepción en este aspecto fue *L. creticus*, el cual a pesar de tener una baja relación K^+/Na^+ , fue una de las especies que menos inhibió su crecimiento en peso seco bajo condiciones salinas. A pesar de ello, debido a los resultados obtenidos, nosotros sugerimos que no constituye una especie halófila.

Se ha publicado recientemente que las poliaminas mejorarían la homeostasis celular bajo condiciones de estrés, restringiendo el ingreso de Na^+ y la salida de K^+ en las células de la raíz (Zhao *et al.*, 2007). Este grupo describió que en plántulas de cebada, aplicaciones exógenas de espermidina incrementaron la relación K^+/Na^+ en la parte aérea. Coincidentemente, en nuestro ensayo *L. japonicus* MG20 fue la única especie que no presentó diferencias significativas para el contenido de espermidina entre tratamientos (en todas las demás se observó una disminución del contenido de la misma), lo que se correlacionó con el mayor valor de la relación K^+/Na^+ en hojas. La posible asociación entre elevados valores de espermidina y una elevada relación K^+/Na^+ no sería válida para las distintas poblaciones de *L. tenuis*, ya que Pampa INTA presentó una relación K^+/Na^+ equivalente al doble del promedio del resto de las poblaciones, y sin embargo su contenido de espermidina disminuyó significativamente. En general, bajo estrés salino las respuestas encontradas en todas las especies del género *Lotus* evaluadas se correlacionaron con lo previamente descrito en tomate (Santa-Cruz *et al.*, 1997), en arroz (Maiale *et al.*, 2004) y en *L. tenuis* (Sánchez *et al.*, 2005), y que consiste en una tendencia a la acumulación de espermina, tetramina que ha

sido definida como esencial en los mecanismos de tolerancia a salinidad en *Arabidopsis thaliana* (Yamaguchi *et al.*, 2006).

A los fines de poder evaluar la importancia relativa del contenido de cloruros en la tolerancia al estrés salino, en el estudio se incluyó además de las poblaciones contrastantes a la población Pampa INTA debido a que fue aquella que acumuló menos Na^+ en las hojas, además de destacarse por su elevada relación K^+/Na^+ (1,1 vs. 0,5 que es el promedio del resto de las poblaciones). A pesar de no haberse encontrado una relación entre el contenido de Cl^- y la tolerancia de las poblaciones contrastantes, si fue interesante observar que en la población Pampa INTA se registró el menor valor de acumulación de este anión en hojas de plantas tratadas. Teakle *et al.* (2006) asociaron la tolerancia a salinidad con una menor acumulación en la parte aérea de Na^+ y Cl^- , cuando compararon las respuestas de *L. tenuis* con *L. corniculatus*. En coincidencia con ellos, bajo nuestras condiciones de ensayo la acumulación promedio de Cl^- de las poblaciones de *L. tenuis* analizadas, fue en promedio 8 veces superior al control, mientras que en *L. corniculatus* dicha diferencia fue de 17 veces.

Se ha reportado que en general en especies no halófitas (incluidas varias leguminosas) la concentración de Cl^- en las hojas basales en presencia de NaCl es mayor que en los tejidos jóvenes. Resultados similares se observaron en cuanto al contenido de Na^+ (Greenway y Munns, 1980; Sibole *et al.*, 2003b; Teakle *et al.*, 2007). De acuerdo con ello, hemos encontrado mayor acumulación de Na^+ y Cl^- en las hojas basales de todas las especies evaluada bajo estrés salino, lo que contrasta con lo observado simultáneamente para *L. burtii* y *L. filicaulis*, especies en las cuales no se detectaron diferencias entre hojas apicales y basales en los contenidos de Na^+ y Cl^- en el primer caso y de Cl^- en el segundo caso. Nuestros resultados en *L. corniculatus* y *L. tenuis* coinciden con los descritos por Teakle *et al.* (2006), en cuanto a que las hojas basales de ambas especies acumularon más Na^+ y Cl^- que las apicales y que el contenido de Cl^- fue estadísticamente mayor en *L. corniculatus*. Sin embargo, bajo nuestras condiciones de ensayo, el contenido de Na^+ también fue mayor en *L. corniculatus* que en *L. tenuis* Pampa INTA para ambos tipos de hojas, lo cual difiere con lo observado por el grupo australiano.

Por su parte, la prolina aumentó en todos los casos bajo tratamiento salino, encontrándose diferencias entre poblaciones y entre especies en la cantidad acumulada. Por ejemplo, en dos poblaciones de *L. tenuis* (ARLG28 y Esmeralda), se registraron los mayores valores de acumulación y en ninguna se observaron cambios en el peso seco de la parte aérea; por el contrario, en otras dos poblaciones (ARLG04 y ARLG14) que presentaron los mismos valores de acumulación del aminoácido bajo estrés salino, el peso seco de la parte aérea fue estadísticamente inferior a los controles. Algo similar ocurrió entre *L. corniculatus* y *L. japonicus* Gifu los cuales duplicaron bajo estrés salino la concentración de las otras especies, lo cual sin embargo no se correlacionó con un incremento en los parámetros de crecimiento. Estos resultados estarían en correspondencia con la bibliografía, no existiendo una relación clara entre la habilidad de acumular prolina y la tolerancia a salinidad (Maggio *et al.*, 2002). Tampoco está claro el rol que podría estar cumpliendo en aquellos materiales donde se observó una relación directa entre la acumulación del aminoácido y el crecimiento bajo condiciones de estrés (Kavi Kishor *et al.*, 2005).

En función de las respuestas encontradas y de las tendencias observadas en *L. creticus*, se consideró de gran interés volver a incluir a esta especie en futuros ensayos, con la idea de hacer un estudio mas detallado de los mecanismos que le confieren tolerancia.

A pesar de que *L. filicaulis* y *L. creticus* fueron las especies que mayor concentración de Na^+ foliar presentaron, la disminución en el crecimiento experimentado por la primera fue significativamente mayor. Estas observaciones se justificarían con lo reportado por Sánchez-Blanco *et al.* (1998) quienes demostraron que la capacidad de ajuste osmótico del *L. creticus* bajo condiciones de estrés salino se debe a la acumulación de Na^+ y Cl^- y no al incremento de solutos orgánicos, ya que bajo nuestras condiciones de ensayo esta especie presentó el menor nivel de prolina. Asimismo estas observaciones también estarían en correspondencia con lo establecido por Zhao *et al.* (2007) en relación a la homeostasis iónica, ya que *L. creticus* presentó la menor relación K^+/Na^+ . En conjunto estos resultados estarían indicando que el umbral de toxicidad de Na^+ en células de *L. creticus* sería

mucho mayor que para las otras especies del género estudiadas, incluyendo las poblaciones de *L. tenuis*.

4. Conclusión

El estrés salino por aclimatación impuesto sobre los materiales evaluados en este ensayo produjo disminución de los pesos fresco y seco de la parte aérea. Los parámetros de crecimiento que explicaron dicha disminución fueron, principalmente la disminución de la cantidad de tallos y ramificaciones por planta, y el diámetro del tallo principal. El área foliar bajo condiciones salinas sólo disminuyó en dos poblaciones de *L. tenuis* y en *L. japonicus* MG20. Un hecho interesante de destacar fue que aquellas poblaciones de *L. tenuis* que más crecieron bajo condiciones control fueron las que mayormente inhibieron su crecimiento en el tratamiento salino. Y fue en base a esta apreciación que seleccionamos a las poblaciones de *L. tenuis* “tolerantes” y “sensibles”; tomando como criterio que presenten buena producción de peso seco tanto en situación control como bajo estrés salino.

Todas las poblaciones de *L. tenuis* acumularon Na^+ en la parte aérea cuando las plantas se expusieron a salinidad; y las que más Na^+ acumularon fueron las que mejor respuesta en crecimiento presentaron. Para las especies de *Lotus* consideradas modelo y para *L. corniculatus*, no se encontró tal correlación, por el contrario, altas relaciones K^+/Na^+ y $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ coincidieron con mejores porcentajes de peso seco con respecto al control en situación salina. Con lo cual se concluye, por un lado, que la concentración de Na^+ impuesta a todos estos materiales no resultó ser letal en ningún caso, y por otro lado, que en *L. tenuis* la acumulación de Na^+ pareciera jugar un rol importante en la osmorregulación, lo cual le permitió seguir acumulando peso seco. Al analizar la distribución de los iones en las hojas basales y apicales, a pesar de que no se hizo en todas las poblaciones de *L. tenuis*, pudimos observar que la mayor acumulación de Na^+ , e incluso de Cl^- , se dió en las hojas basales, permitiendo lograr una correlación positiva entre la relación K^+/Na^+ de las hojas apicales y el porcentaje de peso seco de la parte aérea con respecto al control. En general, las poblaciones de *L. tenuis* acumularon más cloruros

que las especies consideradas modelo y menos que *L. corniculatus*. Sólo la población Aguapé, considerada “sensible” según nuestro criterio de selección, superó a *L. corniculatus*.

Con respecto a los solutos orgánicos, podemos concluir que ni la acumulación de prolina ni las variaciones en los contenidos de poliaminas de los materiales evaluados, son parámetros que reflejen claramente una respuesta de tolerancia al estrés salino impuesto.

CONCLUSIONES GENERALES

Cuando plantas del género *Lotus* de un mes de edad se expusieron ante un estrés salino de 150mM de NaCl, sólo en dos casos se observaron disminuciones de peso seco al finalizar el ensayo. En cambio, cuando el estrés se impuso por aclimatación y en plantas en un estado vegetativo temprano (12-15 días), en el 56% de los casos evaluados se observó que el peso seco de la parte aérea fue menor que en el control. En ningún caso, la salinidad (hasta 150mM de NaCl) provocó muerte de plantas, bajo ninguno de los dos estados fenológicos estudiados. El estrés salino indujo acumulación en la parte aérea de Na^+ , de Cl^- y de prolina, ello se correlacionó con una disminución del potencial osmótico de todos los materiales. También se detectaron cambios morfo-anatómicos interesantes, que serán objetivo de estudio en un futuro inmediato.

Con respecto a las especies modelo, *L. filicaulis* fue la más afectada por la salinidad, ya sea en estado vegetativo avanzado como en plantas de 15 días de edad, independientemente del protocolo de salinización utilizado (shock o aclimatación). En plantas de *L. japonicus* MG20 se observó una tendencia a restringir la translocación de Na^+ y de Cl^- a la parte aérea, quedando dichos iones acumulados en la raíz. Un efecto similar se observó en las hojas basales con respecto a las apicales, cuando el estrés se impuso por aclimatación. Por último, entre las especies consideradas modelo se encontraron diferencias significativas en la relación K^+/Na^+ e interesantemente esto se correlacionó positivamente con la acumulación de peso seco.

Por su parte, *L. creticus* tuvo un comportamiento diferente al resto en varios aspectos; por un lado fue la única especie que acumuló agua ante condiciones de estrés, y por otro lado, fue uno de los materiales que más Na^+ acumuló en la parte aérea. En este sentido, la relación K^+/Na^+ en la parte aérea, para cualquiera de los protocolos de salinización utilizados, fue la más baja. A pesar de ello, bajo condiciones de estrés no se observaron diferencias significativas de peso seco, ni en la parte aérea ni en la raíz.

Con respecto a las variedades comerciales de *L. tenuis* (alógamas) utilizadas actualmente como forrajeras, cabe destacar la variabilidad

encontrada en las respuestas a estrés salino entre las mismas, e incluso entre genotipos de una de las poblaciones evaluadas (var. Pampa INTA). A partir de nuestros resultados se sugiere la necesidad de que en los programas de mejoramiento se contemple tanto la productividad bajo condiciones control como bajo condiciones de estrés. Al mismo tiempo, los datos obtenidos dejan en evidencia la necesidad de trabajar con un número significativo de individuos (genotipos) que sean representativos de la heterogeneidad de la población.

BIBLIOGRAFÍA

- **Acuña H. y Cuevas G., 1999.** Efecto de la altura y frecuencia de la defoliación, bajo corte y pastoreo, en el crecimiento y productividad de tres especies del genero *Lotus* en suelos arcillosos. *Agricultura Técnica* 59 (4): 296-308.
- **Apse M.P. y Blumwald E., 2002.** Engineering salt tolerance in plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 13:146–150.
- **Apse M.P. y Blumwald E., 2007.** Na⁺ transport in plants. *FEBS Letters* 581 (12): 2247 – 2254.
- **Apse M.P., Aharon G.S., Snedden W.A. y Blumwald E., 1999.** Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. *Science* 285: 1256-1258.
- **Ashraf M., McNeilly T. y Bradshaw A.D., 1986.** The Response to NaCl and Ionic Content of Selected Salt-Tolerant and Normal Lines of Three Legume Forage Species in Sand Culture. *New Phytologist* 104 (3): 463-471.
- **Aziz A., Martin-Tanguy J. y Larher F., 1999.** Salt stress-induced accumulation and changes in tyramine and polyamine levels are linked to ionic adjustment in tomato leaf discs. *Plant Sci.* 145: 83-91.
- **Bañon S., Fernandez J.A., Franco J.A., Torrecillas A., Alarcón J.J. y Sánchez-Blanco M.J., 2004.** Effects of water stress and night temperature preconditioning on water relations and morphological and anatomical changes of *Lotus creticus* plants. *Scientia Horticulturae* 101: 333-342.
- **Basu R. y Ghosh B., 1991.** Polyamines in various rice (*Oryza sativa*) genotypes with respect to sodium chloride salinity. *Physiol. Plant* 82: 575-581.
- **Batista W. B., León R.J.C. y Perelman S., 1988.** Las comunidades vegetales de un pastizal natural de la región de Laprida, Prov. De Buenos Aires, Argentina. *Phytocoenologia* 16: 465-480.
- **Bernstein L. y Hayward H.E., 1958.** Physiology of Salt Tolerance. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 9: 25-46.

- **Blumwald E., 2000.** Sodium transport and salt tolerance in plants. *Current Opinion in cell biology* 12: 431-434.
- **Blumwald E., Aharon G.S. y Apse M.P., 2000.** Sodium transport in plant cells. *Biochem. Biophys. Acta* 1465: 140-151.
- **Bohnert H.J. y Jensen R.G., 1996a.** Metabolic engineering for increased salt tolerance-the next step. *Australian Journal of Plant Physiology* 23: 661-667.
- **Bohnert H.J. y Jensen R.G., 1996b.** Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. *Trends Biotechnol.* 14: 89-97.
- **Bouchereau A., Aziz A., Larher F. y Martin-Tanguy J., 1999.** Polyamines and environmental challenges: recent developments. *Plant Sci.* 140: 103-125.
- **Bradford M.M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- **Bujan A. y Debelis S., 2005.** Los suelos de la Pampa Deprimida y su aptitud para la producción forrajera. *Seminario Técnico Forrajes*, 17-35.
- **Burkart S.E., León R.J.C. y Movia C.P., 1990.** Inventario fitosociológico del pastizal de la Depresión del Salado (Pcia. Buenos Aires) en un área representativa de sus principales ambientes. *Darwiniana* 30: 27-69.
- **Capell T., Bassie L. y Christou P., 2004.** Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 9909-9914.
- **Carvajal M., Cerda A., Martínez V., 2000.** Does calcium ameliorate the negative effect of NaCl on melon root water transport by regulating aquaporin activity? *New Phytologist* 145 (3): 439-447.
- **Castaño J., 2004.** Adaptación y manejo de especies forrajeras y técnicas para optimizar su producción. Grupo Pasturas. Área de Producción Animal. EEA INTA Balcarce.

- **Chattopadhyay M.K., Tiwari B.S., Chattopadhyay G., Bose A., Sengupta D.N. y Ghosh B., 2002.** Protective role of exogenous polyamines on salinity-stressed rice (*Oryza sativa*) plants. *Physiol. Plant* 116: 192-199.
- **Chattopadhyay M.K., Gupta S., Sengupta N.S. y Ghosh B., 1997.** Expression of Arginine decarboxylase in seedlings of indica rice (*Oryza sativa* L.) cultivars as affected by salinity stress. *Plant Mol Biol*, 34: 477-483.
- **Chen S., Li J., Fritz E., Wang S. y Huttermann A., 2002.** Sodium and chloride distribution in roots and transport in three poplar genotypes under increasing NaCl stress. *Forest Ecology and Management* 168: 217-230.
- **Chen S., Li J., Wang S., Fritz E., Huttermann A. y Altman A., 2003.** Effects of NaCl on shoot growth, transpiration, ion compartmentation, and transport in regenerated plants of *Populus euphratica* and *Populus tomentosa*. *Can. J. For. Res.* 33: 967-975.
- **Chen T.H.H. y Murata N., 2000.** Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 250–257.
- **Chinnusamy V., Jagendorf A. y Zhu J.K., 2005.** Understanding and Improving Salt Tolerance in Plants. *Crop Sci.* 45: 437-448.
- **Clarkson D.T., Carvajal M., Henzler T., Waterhouse R.N., Smyth A.J., Cooke D.T. y Steudle E., 2000.** Root hydraulic conductance: diurnal aquaporin expression and the effects of nutrient stress. *Journal of Experimental Botany* 51: 61-70.
- **Clúa A.A., Giménez D.O., y Fernández L., 1997.** Increase in forage yield in narrowleaf birdsfoot (*Lotus tenuis* Waldst y Kit ex Willd) in a permanent pasture with foliar applied gibberellic acid (GA3), and phosphorus. *Plant Growth Regulation* 21: 223-228.
- **Cohen S.S., 1998.** A guide to polyamines. Oxford University Press, New York, Oxford.
- **Collantes M.B., Kade M., Miaczynski C., Santanatoglia O., 1988.** Distribución de especies en función de factores edáficos en un pastizal natural

de la Depresión del Río Salado (Provincia de Buenos Aires, Argentina). *Studia Oecologica* 5: 77-93.

- **Cook D.R., VandenBosch K., de Bruijn F.J., Huguet T., 1997.** Model Legumes Get the Nod. <http://bio-www.tamu.edu/medicago/modelleg.htm>, Meeting Report, *The Plant Cell* 275-281.
- **Cramer G.R., Lauchli A. y Polito V.S., 1985.** Displacement of Ca^{2+} by Na^+ from the plasmalemma of roots cells. A primary response to salt stress? *Plant Physiol.* 79: 207-211.
- **Cyranoski D., 2001.** Japanese legume project may help to fix nitrogen problem. *Nature* 409: 272.
- **De Battista J., 2001.** Trébol de cuernitos. Trébol de cuernitos de hoja angosta. En: Forrajeras y Pasturas del ecosistema Templado húmedo de la Argentina. Maddaloni J. y Ferrari L. (Ed.), UNLZ-INTA, Buenos Aires, 79-92.
- **Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. y Smith, F., 1956.** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356.
- **Endo M., Kokubun T., Takahata Y., Higashitani A., Tabata S. y Watanabe M., 2000.** Analysis of expressed Sequence Tags of Flower Buds in *Lotus japonicus*. *DNA Research* 7: 213-216.
- **Escaray F., Pesqueira J., Pieckenstain F.L., Carrasco P. y Ruiz O.A., 2007.** Taninos condensados y antocianinas en el género *Lotus*: su relación con el estrés salino en especies forrajeras para zonas marginales. *Innovación tecnológica y Agroalimentaria*, ITA España, 2:113-123.
- **Etchevehere P.H., 1976.** Normas de Reconocimiento de suelos. 2da. Edición actualizada INTA, CIRN, Dept. de Suelos de Castelar, Colección Suelos Nro. 52.
- **FAO 2005.** Global network on integrated soil management for sustainable use of salt-affected soils. FAO Land and Plant Nutrition Management Services, Rome, Italy. <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush>.

- **Flexas J., Ribas-Carbó M., Bota J., Galmés J., Henkle M., Martínez-Cañellas S. y Medrano H., 2006.** Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO₂ concentration. *New Phytologist* 172: 73-82.
- **Flores H.E. y Galston A.W., 1982.** Polyamine and plant stress: activation of putrescine biosynthesis by osmotic shock. *Science* 217: 1259.
- **Flores H.E. y Martin-Tanguy J., 1991.** Polyamines and plant secondary metabolites. En: Slocum R.D. y Flores H.E. (eds.) *Biochemistry and physiology of polyamines in plants*. CRS Press, Boca Raton.
- **Flores H.E., 1991.** Changes in polyamine metabolism in response to abiotic stress. En: Slocum R.D. y Flores H.E. (eds.), *Biochemistry and physiology of polyamines in plants*. CRS Press, Boca Raton.
- **Flowers T.J., García A., Koyama M. y Yeo A.R., 1997.** Breeding for salt tolerance in crop plants - the role of molecular biology. *Acta Physiologiae Plantarum* 19 (4): 427-433.
- **Friedman R., Altman A. y Levin N., 1989.** The effect of salt stress on polyamine biosynthesis and content in mung bean and in halophytes. *Physiol. Plant* 76: 295-302.
- **Fukuda A., Nakamura A. y Tanaka Y., 1999.** Molecular cloning and expression of the Na⁺/H⁺ exchanger gene in *Oryza sativa*. *Biochem. Biophys. Acta* 1446:149–155.
- **Garbarino J. y DuPont F.M., 1989.** Rapid induction of Na⁺/H⁺ exchange activity in barley roots tonoplast. *Plant Physiology* 89: 1-4.
- **Gebrehiwot L., Beuselinck P.R. y Roberts C.A., 2002.** Seasonal Variations in condensed tannin concentration of three Lotus species. *Agron. J.* 94: 1059-1065.
- **Gilliham M. y Tester M., 2005.** The regulation of anion loading to the root xylem. *Plant Physiol.* 137: 819-828.

- **Giridara Kumar S., Matta Reddy A. y Sudhakar C., 2003.** NaCl effects on proline metabolism in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) with contrasting salt tolerance. *Plant Science* 165: 1245-1251.
- **Greenway H. y Munns R., 1980.** Mechanism of salt tolerance in nonhalophytes. *Annu Rev Plant Physiol* 31: 149-190.
- **Hare P.D. y Cress W.A., 1997.** Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation* 21: 79-102.
- **Hartzendorf T. y Rolletschek H., 2001.** Effects of NaCl-salinity on amino acid and carbohydrate contents of *Phragmites australis*. *Aquatic Botany* 69: 195–208.
- **Hasegawa P.M., Bressan R.A., Zhu J.K. y Bohnert H.J., 2000.** Plant Cellular and Molecular Responses to High Salinity. *Annual Reviews*, 463-483.
- **Hoagland D.R. y Arnon D.I., 1950.** The water-culture for growing plants without soil. *Calif. Agric. Exp. Stn. Circ.* 347 (Rev.).
- **Ishitani M., Liu J.P., Halfter U., Kim C., Shi W.M. y Zhu J., 2000.** SOS3 function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding. *Plant Cell* 12 (9):1667-1678.
- **Jiang Q. y Gresshoff P., 1997.** Classical and Molecular Genetics of the Model Legume *Lotus japonicus*. *MPMI* 10 (1): 59-68.
- **Johansson I., Larsson C., Ek B. y Kjellbom P., 1996.** The major integral proteins of spinach leaf plasma membranes are putative aquaporins and are phosphorylated in response to Ca²⁺ and apoplastic water potential. *Plant Cell* 8: 1181-1191.
- **Karimi G., Ghorbanli M., Heidari H., Khavari Nejad R.A. y Assareh M.H., 2005.** The effects of NaCl on growth, water relations, osmolytes and ion content in *Kochia prostrata*. *Biologia Plantarum* 49 (2): 301-304.
- **Kasukabe Y., He L., Nada K., Misawa S., Ihara I. y Tachibana S., 2004.** Overexpression of spermidine synthase enhances tolerance to multiple environmental stresses and up-regulate the expression of various stress-

regulated genes in transgenic *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol. 45: 712-722.

- **Kavi Kishor P.B., Sangam S., Amrutha R.N., Sri Laxmi P., Naidu K.R., Rao K.R.S.S., Sreenath R., Reddy K.J., Theriappan P. y Sreenivasulu N., 2005.** Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. Current Science 88 (3): 424-438.
- **Kirkbride J.H., 1999.** *Lotus* systematics and distribution. In: Beuselinck PR, ed. Trefoil: The Science and Technology of *Lotus*. CSSA Special Publication nº28. American Society of Agronomy, pp. 1–20.
- **Kirkbride J.H., 2006.** The Scientific Name of Narrow-Leaf Trefoil. Crop Sci. 46: 2169-2170.
- **Kjellbom P., Larsson C., Johansson I., Karlsson M. y Johanson U., 1999.** Aquaporins and water homeostasis in plants. Trends in Plant Science 4: 308-314.
- **Krishnamurthy R. y Bhagwat K.A., 1989.** Polyamines as modulators of salt tolerance in rice cultivars. Plant Physiol. 91: 500-504.
- **Kushad M.M. y Dumbroff E.B., 1991.** Metabolic and physiological relationships between the polyamine and ethylene biosynthetic pathways. Biochemistry and physiology of polyamines in plants. R. D. Slocum y H. E. Flores, eds. CRS Press, Boca Ratón.
- **Lacerda C.F., Cambraia J., Oliva M.A., Ruiz H.A. y Prisco J.T., 2003.** Solute accumulation and distribution during shoot and leaf development in two sorghum genotypes under salt stress. Environmental and Experimental Botany 49: 107-120.
- **Lefevre I., Gratia E. y Lutts S., 2001.** Discrimination between the ionic and osmotic components of salt stress in relation to free polyamine level in rice (*Oryza sativa*). Plant Sci. 161: 943-952.
- **León R.J.C., Agnusdei M.G, Burkart S., Fernández Grecco R., Movia C., Oosterheld M., Perelman S. y Rusch G., 1985.** Las comunidades

vegetales del pastizal del sur de la Depresión del Salado. Resúmenes XII Reunión Argentina de Ecología. Misiones. Argentina.

- **León R.J.C., Burkart S. y Movia C.P., 1979.** Relevamiento fitosociológico del pastizal del norte de la Depresión del Salado. Serie Fitogeográfica 17: 90 pp. INTA Buenos Aires.
- **Lichtenthaler H.K., 1987.** Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* 148: 350-382.
- **Lichtenthaler H.K., 1996.** Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *J. Plant Physiol.* 148: 4-14.
- **Lichtenthaler H.K., Rohmer, M. y Schewender, J., 1997.** Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Physiol. Plant* 101: 643-652.
- **Liu J.H., Inoue H. y Moriguchi T., 2008.** Salt stress-mediated changes in free polyamine titers and expression of genes responsible for polyamine biosynthesis of apple *in vitro* shoots. *Environmental and Experimental Botany* 62: 28-35.
- **Liu K., Fu H., Bei Q. y Luan S., 2000.** Inward potassium channel in guard cells as a target for polyamine regulation of stomatal movements. *Plant Physiol.* 124: 1315-1326.
- **Lorimer GH, Badger MR, Andrews TJ. 1976.** The activation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by carbon dioxide and magnesium ions. Equilibria, kinetics, a suggested mechanism and physiological implications. *Biochemistry* 15, 529–536.
- **Lutts S., Kinet J.M. y Bouharmont J., 1999.** Improvement of rice callus regeneration in the presence of NaCl. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture* 57: 3-11.
- **Maas E.V. y Hoffman G.S., 1977.** Crop salt tolerance: current assessment. *J. Irrig. Drainage Div., ASCE* 103 (IR2): 115-134.

- **Madan S., Nainawate H.S., Jain R.K., Cowdhury J.B., 1995.** Proline and proline metabolising enzymes in *in vitro* selected NaCl-tolerant *Brassica juncea* L. under salt stress. Ann. Bot. 76: 51-55.
- **Maggio A., Miyazaki S., Veronese P., Fujita T., Ibeas J.I., Damsz B., Narasimhan M.L., Hasegawa P.M., Joly R. y Bressan R.A., 2002.** Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction? The Plant Journal 31 (6): 699-712.
- **Maiale S., Sánchez D.H., Guirado A., Vidal A. y Ruiz O.A., 2004.** Spermine accumulation under salt stress. J. Plant Physiol. 161: 35-42.
- **Marcé M., Brown D.S., Capell T., Figueras X. y Tiburcio A.F., 1995.** Rapid high-performance liquid chromatographic method for the quantitation of polyamines as their dansyl derivatives: application to plant and animal tissues. J. Chromatogr. B. Biomed. Appl. 666: 329-35.
- **Márquez A.J., Betti M., García-Calderón M., Palóve-Balang P., Díaz P. y Monza J., 2005.** Nitrate assimilation in *Lotus japonicus*. Journal of Experimental Botany 56 (417): 1741-1749.
- **Mauseth, J.D., 1988.** Plant Anatomy. The Benjamin Cummings Publishing Company, Inc. pp. 3-47, 415-437.
- **Meloni D.A., Oliva M.A., Ruiz H.A. y Martínez C.A., 2001.** Contribution of proline and inorganic solutes to osmotic adjustment in cotton under salt stress. J. Plant Nutr. 24, 599–612.
- **Miaczynski C.R.O., 1995.** Los suelos hidromórficos e hidrohalomórficos de la Provincia de Buenos Aires. Rev. Facultad de Agronomía, 15(1):23-36.
- **Miñón D., Sevilla G. H., Montes L. y Fernández O. N., 1990.** *Lotus tenuis*: Leguminosa forrajera para la Pampa Deprimida. Boletín Técnico n° 98. Fac. Cs. Agrarias-INTA Balcarce, 16 pp.
- **Miñón D.P. y Refi R.O., 1993.** Persistencia de pasturas de Festuca arundinacea, Trifolium repens y Lotus tenuis bajo pastoreo continuo. In: Dialogo XXXVIII: Evaluación de Pastura: 95-112. IICA-BID-PROCISUR.

- **Miteva T.S., Zhelev N.Z. y Popova L.P., 1992.** Effect of salinity on the synthesis of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in barley leaves. *Journal of Plant Physiology* 140: 46-51.
- **Montes L., 1980.** Narrowleaf trefoil naturalized in low-land fields in Buenos Aires Province (Argentina). *Lotus Newsletter* 11: 9-10.
- **Montes L., 1988.** *Lotus tenuis*. Revisión Bibliográfica. *Rev. Arg. Prod. Animal* 8: 367-376.
- **Morales M.A., Alarcón J.J., Torrecillas A. y Sánchez-Blanco M.J., 2000.** Growth and water relations of *Lotus creticus creticus* plants as affected by salinity. *Biol. Plant.* 43: 413-417.
- **Mujica M.M. y Rumi C.P., 1998.** A technique of vegetative propagation by stem cuttings was fitted to *Lotus tenuis*. *Lotus Newsletter* 29.
- **Munns R. y Termaat A., 1986.** Whole plant response to salinity. *Aust. J. Plant Physiol.* 13: 143-160
- **Munns R., 1993.** Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. *Plant Cell Environ.* 16: 15-24.
- **Munns R., 2002.** Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.* 20: 239-250.
- **Munns R. y Tester M., 2008.** Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 651-681.
- **Musto J. C. y Maddaloni J., 2001.** Características y descripción de las principales áreas del ecosistema Templado Húmedo. En: *Forrajeras y Pasturas del Ecosistema Templado Húmedo de la Argentina*. Maddaloni J. y Ferrari L. (Ed.), UNLZ-INTA, Buenos Aires, 24-36.
- **Navarro J.M., Botella M.A., Cerda A. y Martinez V., 2000.** Effect of salinity X calcium interaction on cation balance in melon plants grown under two regimes of orthophosphate. *Journal of Plant Nutrition* 23: 7, 991-1006.
- **Neumann P., 1997.** Salinity resistance and plant growth revisited. *Plant Cell Environ* 20: 1193-1198.

- **Nuccio M.L., Rhodes D., Mc Neil S. y Hanson A.D., 1999.** Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 128-134.
- **Orcutt D.M. y Nilsen E.T., 1996.** The physiology of plants under stress, abiotic factors. John Wiley y Sons Inc., New York.
- **Orcutt D.M., y Nilsen E.T., 2000.** The physiology of plants under stress, soil and biotic factors. John Wiley y Sons Inc., New York. ISBN 0-471-17008-17009.
- **Parida A., Das A.B. y Das P., 2002.** NaCl stress causes changes in photosynthetic pigments, proteins and other metabolic components in the leaves of a true mangrove, *Bruguiera parviflora*, in hydroponic cultures. *J. Plant Biol.* 45: 28–36.
- **Parida A.K. y Das A.B., 2005.** Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60: 324-349.
- **Pasternak D., Sagih N., DeMalach Y., Keren Y. y Shaffer A., 1995.** Irrigation with brackish water under desert conditions XI. Salt tolerance in sweet-corn cultivars. *Agricultural water management* 28: 325-334.
- **Purves W.K., Orians G.H., Heller H.C., 1992.** Life: The Science of Biology, 3rd edition. Sinauer Associates, Inc., W. H. Freeman and Company, Sunderland, Mass.
- **Ramanjulu S. y Sudhakar C., 2001.** Alleviation of NaCl salinity stress by calcium is partly related to the increased proline accumulation in mulberry (*Morus alba* L.) callus. *J. Plant Biol.* 28: 203-206.
- **Reid R.J. y Smith F.A., 2000.** The limits of sodium/calcium interactions in plant growth. *Australian Journal of Plant Physiology* 27 (7): 709-715.
- **Rhodes D. y Hanson A. D., 1993.** Quaternary ammonium and tertiary sulphonium compounds in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 44: 357-384.
- **Rodríguez-Pérez L., 2006.** Implicaciones fisiológicas de la osmorregulación en plantas. *Agronomía Colombiana* 24(1): 28-37.

- **Rogers M.E., Noble C.L., Halloran G.M. y Nicolas M.E., 1997.** Selecting for salt tolerance in white clover (*Trifolium repens*): chloride ion exclusion and its heritability. *New Phytol.* 135: 645-654.
- **Romero J. M. y Maranon T., 1996.** Allocation of Biomass and Mineral Elements in *Melilotus segetalis* (Annual Sweetclover): Effects of NaCl Salinity and Plant Age. *New Phytologist* 132 (4): 565-573.
- **Roy M. y Wu R., 2001.** Arginine decarboxylase transgene expression and analysis of environmental stress tolerance in transgenic rice. *Plant Sci.* 160: 869-875.
- **Roy M. y Wu R., 2002.** Overexpression of S-adenosylmethionine decarboxylase gene in rice increases polyamine level and enhances sodium chloride-stress tolerance. *Plant Sci.* 163: 978-992.
- **Ruan H., Hill J.R., Fatemie-Nainie S. y Morris D.R., 1994.** Cell-specific translational regulation of Sadenosylmethionine decarboxylase mRNA. Influence of the structure of the 5' transcript leader on regulation by the upstream open reading frame. *J. Biol. Chem.* 269: 17905-17910.
- **Salisbury F.B. y Ross C.W., 1992.** *Plant Physiology*. Fourth edition. Wadsworth Publishing, California.
- **Sánchez D.H., Cuevas J.C., Chiesa M.A. y Ruiz O.A., 2005.** Free spermidine and spermine content in *Lotus glaber* under long-term salt stress. *Plant Sci.* 168 (2): 541–546.
- **Sánchez-Blanco M.J., Morales M.A., Torrecillas A. y Alarcón J.J., 1998.** Diurnal and Seasonal osmótica potencial changes in *Lotus creticus* creticus plants Brown under saline stress. *Plant Sci.* 136: 1-10.
- **Santa-Cruz A., Acosta M., Pérez-Alfocea F. y Bolarin M.C., 1997.** Changes in free polyamine levels induced by salt stress in leaves of cultivated and wild tomato species. *Physiol. Plant* 101: 341-346.
- **Santa-Cruz A., Acosta M., Rus A. y Bolarin M.C., 1999.** Short-term salt tolerance mechanisms in differentially salt tolerant tomato species. *Plant Physiol. Biochem.* 37: 65-71.

- **Schuber F., 1989.** Influence of polyamines on membrane functions. *Biochem. J.* 260: 1-10.
- **Serrano R. y Rodríguez-Navarro A., 2001.** Ion homeostasis during salt stress in plants. *Current Opinion in Cell Biology*, 13: 399-404.
- **Shannon M.C., Grieve C.M. y Francois L.E., 1991.** Whole plant response to salinity. In: *Plant-Environment Interactions*. Ed. R.E. Wilkinson. Cap.7: 199-228.
- **Shi H. y Zhu J.K., 2002.** Regulation of expression of the vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene *AtNHX1* by salt stress and abscisic acid. *Plant Mol. Biol.* 50: 543-550.
- **Sibole J.V., Cabot C., Poschenrieder Ch. y Barcelo J., 2003a.** Ion allocation in two different salt-tolerant Mediterranean *Medicago* species. *J. Plant Physiol.* 160:1361–1365.
- **Sibole J.V., Cabot C., Poschenrieder Ch. y Barcelo J., 2003b.** Efficient leaf ion partitioning, an overriding condition for abscisic acid controlled stomatal and leaf growth responses to NaCl salinisation in two legumes. *J. Exp. Bot.* 54:2111–2119.
- **Sibole J.V., Cabot C., Michalke W., Poschenrieder Ch. y Barcelo J., 2005.** Relationship between expression of the PM H⁺-ATPase, growth and ion partitioning in the leaves of salt-treated *Medicago* species. *Planta* 221: 557-566.
- **Sivakumar P., Sharmila P. y Pardha Saradhi P., 2000.** Proline alleviates salt-stress-induced enhancement in ribulose-1,5-bisphosphate oxygenase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 279: 512-515.
- **Sivakumar P., Sharmila P., Vikas J. y Pardha Saradhi P., 2002.** Sugars have potential to curtail oxygenase activity of Rubisco. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 298: 247–250.
- **Snaydon R., 1984.** In: *Systematics Association Special Volume N° 25, "Current Concepts in Plant Taxonomy"*. V. Hey Wood and D. Moore (eds.). Academic Press, London and Orlando, pp. 203-217.

- **Soyka S. y Heyer A.G., 1999.** *Arabidopsis* knockout mutation of ADC2 gene reveals inducibility by osmotic stress. FEBS Lett 458: 219-223.
- **Stenglein S.A., Colares M.N., Arambarri A.M., Novoa M.C., Vizcaíno C.E., y Katinas L., 2003.** Leaf epidermal microcharacters of the Old World species of *Lotus* (Leguminosae : Loteae) and their systematic significance. Australian Journal of Botany 51: 459-469.
- **Steudle E., 2000.** Water uptake by roots: effects of water deficit. Journal of Experimental Botany 51: 1531-1542.
- **Stoffella S., Posse G. y Collantes M., 1998.** Variabilidad fenotípica y genotípica de poblaciones de *Lotus tenuis* que habitan suelos con distinto pH. Ecología Austral 8: 57-63.
- **Szabolcs I., 1994.** Salt affected soils as the ecosystem for halophytes. In: V.R. Squires, *et al.* (Editors): Halophytes as a resource for livestock and for rehabilitation of degraded lands. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp. 19-24.
- **Tabor H., 1960.** Stabilization of bacteriophage T5 by spermine and related polyamines. Biochem. Biophys. Res. Commun. 3: 382-385.
- **Taiz L. y Zeiger E., 1998.** Plant Physiology. 2º edición. Sinauer Associates Inc. USA.
- **Tassoni A., van Buuren M., Franceschetti M., Formalè S. y Bagni N., 2000.** Polyamine content and metabolismo in *Arabidopsis thaliana* and effect of spermidine on plant development. Plant Physiol. Biochem. 38: 383-393.
- **Teakle N.L., Flowers T.J., Real D. y Colmer T.D., 2007.** *Lotus tenuis* tolerates the interactive effects of salinity and waterlogging by “excluding” Na⁺ and Cl⁻ from the xylem. Journal of Experimental Botany 58 (8): 2169-2180.
- **Teakle N.L., Real D. y 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 Soil, 289: 369-383.

- **Termaat A. y Munns R., 1986.** Use of concentrated macronutrient solutions to separate osmotic from NaCl specific effects on plant growth. *Aust. J. Plant Physiol.* 13: 509-522.
- **Tester M. y Davenport R., 2003.** Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in plants. *Ann. Bot.* 91: 503-527.
- **Tyerman S.D. y Skerrett I.M., 1999.** Root ion channels and salinity. *Scientia Horticulturae* 78: 175-235.
- **Urano K., Yoshiba Y., Nanjo T., Igarashi T., Seki M., Sekiguchi F., Yamaguchi-Shinozaki K. y Shinozaki K., 2003.** Characterization of *Arabidopsis* genes involved in biosynthesis of polyamines in abiotic stress responses and developmental stages. *Plant Cell Environ.* 26: 1917-1926.
- **Urano K., Yoshiba Y., Nanjo T., Ito T., Yamaguchi-Shinozaki K. y Shinozaki K., 2004.** *Arabidopsis* stress inducible gene for arginine decarboxylase AtADC2 is required for accumulation of putrescine in salt tolerance. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 313: 369-375.
- **Verslues P. y Sharp R.E., 1999.** Proline accumulation in maize (*Zea mays* L.) primary roots at low water potentials. II. Metabolic source of increased proline deposition in the elongation zone. *Plant Physiology* 119: 1349-1360.
- **Vignolio O.R., Fernández O.N y Maceira N.O., 1999.** Flooding tolerance in five populations of *Lotus glaber* Mill. (Syn. *Lotus tenuis* Waldst.et Kit.). *Aust. J. Agric. Res.* 50: 555-559.
- **Vignolio O.R., Maceira N.O. y Fernández O.N., 1995.** Efectos del anegamiento sobre el poder germinativo de las semillas de *Lotus tenuis* y *Lotus corniculatus*. *Ecología Austral* 5:157-163.
- **Vignolio O.R., Maceira N.O. y Fernández O.N., 1994.** Efectos del anegamiento en invierno y verano sobre el crecimiento y la supervivencia de *Lotus tenuis* y *L. corniculatus*. *Ecología Austral* 4: 19-28.
- **Waie B. y Rajam M.V., 2003.** Effect of increased polyamines biosynthesis on stress responses in transgenic tobacco by introduction of human S-adenosylmethionine gene. *Plant Sci.* 164: 727-734.

- **White P.J. y Broadley M.R., 2001.** Chloride in soils and its uptake and movement within the plant: a review. *Annals of Botany* 88: 967-988.
- **Willadino L. y Camara T., 2003.** "Origen y naturaleza de los ambientes salinos" En: *La ecofisiología Vegetal: Una Ciencia de Síntesis*" Reigosa, M.J., Pedrol, N. i Sánchez-Moreiras, A. (eds.). pp. 318-327. Ed. Paraninfo. Madrid.
- **Williams G.H., 1988.** L'intérêt des loiters: un possible renouveau (revue bibliographique). *Fourrages* 116: 324-329.
- **Williams K., 1997.** Interactions of polyamines with ion channels. *Biochem. J.* 325 (2): 289-297.
- **Yamaguchi K., Takahashi Y., Berberich T., Imai A., Miyazaki A., Takahashi T., Michael A. y Kusano T., 2006.** The polyamine spermine protects against high salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 580(30): 6783-6788.
- **Zapata P.J., Serrano M., Pretel M.T., Amoros A., Botella M.A., 2003.** Changes in ethylene evolution and polyamines profile of seedlings of nine cultivars of *Lactuca sativa* L. in response to salt stress during germination. *Plant Sci.* 164: 557-563.
- **Zhang J., Nguyen H.T. y Blum A., 1999.** Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. *J Exp Bot* 50: 291-302
- **Zhao F., Song C.P., He J. y Zhu H., 2007.** Polyamines improve K⁺/Na⁺ homeostasis in barley seedlings by regulating root ion channel activities. *Plant Physiology* 145: 1061-1072.
- **Zhu J.K., 2003.** Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 6: 441-445.