

## ÍNDICE GENERAL

<b>ABREVIATURAS</b> .....	14
<b>RESUMEN</b> .....	16
<b>RESUM</b> .....	18
<b>ABSTRACT</b> .....	20
<b>INTRODUCCION</b>	
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.....	31
3.1.1. Movimiento del agua en la planta.....	31
3.1.2. Ajuste osmótico.....	33
3.2. Morfología y Anatomía Radicular.....	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 <sup>+</sup> y Cl <sup>-</sup> 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 .....	48
3.7.1. Fotosíntesis y Respiración: alteración enzimática.....	48
3.7.2. Alteración de las membranas y efecto protector del Ca <sup>2+</sup> .....	49

4. Sensores del estrés salino a nivel celular.....	50
5. Tolerancia a estrés salino.....	51
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> .....	56
6.1. Especies modelo del género <i>Lotus</i> .....	57
6.2. <i>Lotus creticus</i> , especie nativa de la Costa del Mar Mediterráneo..	58

## **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
<b>III. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA A ESTRÉS SALINO POR</b>	
<b>ACLIMATACIÓN EN DIFERENTES POBLACIONES DE <i>LOTUS</i></b>	
<b><i>TENUIS</i> Y EN OTRAS ESPECIES DEL GÉNERO <i>LOTUS</i></b>	
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
<b>CONCLUSIONES GENERALES.....</b>	<b>153</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>156</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Cambios en el contenido de Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> y Ca <sup>2+</sup> 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 radicular (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 <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> y Cl <sup>-</sup> 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 <sup>-</sup> (μmol g <sup>-1</sup> 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 <sup>-1</sup> 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 <sup>-</sup> (μmol g <sup>-1</sup> 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 <sup>-1</sup> 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 radicular.....	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.....	54
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 ( $\mu\text{moles}$ 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 <sup>-1</sup> 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 <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> y Ca <sup>2+</sup> , expresado en mg g <sup>-1</sup> 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 <sup>+</sup> 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 <sup>+</sup> en hojas (mg g <sup>-1</sup> 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 <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> en hojas (mg Na <sup>+</sup> g <sup>-1</sup> 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 <sup>2+</sup> en hojas (mg g <sup>-1</sup> PS).....	130
Figura 34: Contenido de prolina (μmol g <sup>-1</sup> 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 <sup>+</sup> (A), K <sup>+</sup> (B) y Ca <sup>2+</sup> (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 $\eta mol g^{-1}$ 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