

Tolerancia a la salinidad: respuestas morfo-fisiológicas en diferentes etapas del desarrollo en dos cultivares de alfalfa

Salinity tolerance: morpho-physiological responses at different developmental stages in two alfalfa cultivars

Giuliano Barbieri¹  Mónica Cornacchione², Fernando Luna^{1,3}, Rodrigo Parola^{1,3}, Marianela Rodríguez^{1,3} 

1. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Unidad de Estudios Agropecuarios (UDEA), Córdoba, Argentina.

2. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Experimental Santiago del Estero, Argentina

3. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP), Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos (IFRGV), Av. 11 de septiembre 4755, X5020ICA, Córdoba, Argentina.

Correspondencia: Marianela S. Rodríguez, E-mail: rodriguez.marianela@inta.gob.ar

Resumen

En el marco del cambio climático, la producción en suelos salinos surge como un desafío global de gran importancia, especialmente en regiones áridas de Argentina. Este estudio se enfoca en la alfalfa (*Medicago sativa*), una forrajera relevante en Argentina, y tiene como objetivo evaluar el comportamiento en distintas etapas del desarrollo ante condiciones salinas en dos cultivares, Monarca (M) y Kumen (Ku). El cultivar Ku aceleró el proceso de germinación y retrasó el efecto negativo de la salinidad sobre el crecimiento durante el período vegetativo con respecto a M. Estas diferencias podrían considerarse como indicadores potenciales de la tolerancia a la salinidad en el cultivar Ku. Asimismo, la evaluación de la sobrevivencia demostró diferencias significativas en condiciones salinas, siendo Ku menos afectado que M (-15%). Se propone que las respuestas en Ku estarían asociadas a su capacidad distintiva para enfrentar el estrés salino, subrayando la complejidad de los mecanismos de adaptación en la alfalfa. Estos hallazgos ofrecen perspectivas de análisis en términos de espacio (distintos órganos) y tiempo (diferentes etapas de desarrollo de la alfalfa) para aportar a la comprensión de la disparidad en las respuestas de cultivares en salinidad, cruciales para la sustentabilidad agrícola-ganadera en suelos salinos de regiones áridas y semiáridas en Argentina.

Palabras claves: Alfalfa, Germinación, Desarrollo vegetativo, Salinidad, Tolerancia al Estrés.

Abstract

In the context of climate change, production in saline soils emerges as a global challenge of great importance, especially in arid regions of Argentina. This study focuses on alfalfa (*Medicago sativa*), a relevant forage crop in Argentina, and aims to evaluate its behavior at different stages of development under saline conditions in two cultivars, Monarca (M) and Kumen (Ku). The Ku cultivar accelerated germination and delayed the negative effect of salinity on growth during the vegetative period compared to M. These differences could be considered potential indicators of salinity tolerance in Ku cultivar. Furthermore, survival assessment showed significant differences in saline conditions, with Ku being less affected than M (-15%). It is proposed that the responses in Ku may be associated with its distinctive ability to cope with

saline stress, highlighting the complexity of adaptation mechanisms in alfalfa. These findings provide analysis insights in terms of space (different organs) and time (different stages of alfalfa development) to contribute to the understanding of the disparity in cultivar responses to salinity, crucial for agricultural-livestock sustainability in saline soils of arid and semi-arid regions in Argentina.

Keywords: Alfalfa, Germination, Vegetative Development, Salinity, Stress Tolerance.

Introducción

La producción en suelos salinos representa un desafío global, especialmente en regiones áridas y semiáridas. Estos suelos tienen menor fertilidad y afectan la calidad de los cultivos. El cambio climático agrava estos problemas, creando escenarios que requieren estrategias de manejo para la sostenibilidad agrícola¹. La alfalfa, principal leguminosa forrajera en Argentina por sus características nutricionales, no solo fija nitrógeno atmosférico, sino que también mejora el suelo y es esencial para la producción sostenible². Dada la naturaleza perenne de este cultivo y las fluctuaciones espaciales de las sales en el suelo, es crucial investigar respuestas al estrés salino en diferentes etapas de su crecimiento. La selección de plantas tolerantes al estrés salino durante la germinación y la emergencia de plántulas favorece el establecimiento en suelos problemáticos³. Algunas de las consecuencias de la salinidad son la reducción de la germinación, longitud de raíces y brotes, y pesos frescos y secos de las plantas⁴. Las respuestas varían según la gravedad y duración del estrés, el órgano evaluado y el momento del desarrollo. La adaptación a corto plazo puede revertirse, pero a largo plazo induce cambios duraderos en el crecimiento de las plantas.

En el presente trabajo, se analizó el comportamiento morfo-fisiológico de dos cultivares de alfalfa, Monarca (M) (ampliamente difundido, aunque el conocimiento de su respuesta a la salinidad es limitado) y Kumén (Ku) (previamente caracterizado como tolerante a salinidad⁵) frente a la salinidad, a lo largo del desarrollo: germinación y fase vegetativa.

Materiales y métodos

2.1 Material vegetal

Se utilizaron los cultivares de alfalfa (*Medicago sativa*) Monarca-INTA (M) y Kumén-PV-INTA (Ku), sin latencia invernal de grupo 8 y 9, respectivamente. M es ampliamente difundido en

Argentina, siendo la información sobre su tolerancia a la salinidad limitada. Ku fue seleccionado por su tolerancia a la salinidad. Las semillas fueron proporcionadas por el programa de mejoramiento de alfalfa de INTA.

2.2 Evaluación de germinación.

Se aplicó un protocolo del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) utilizando placas de Petri con papel de filtro impregnado (5 ml) con distintas concentraciones de NaCl (50 mM, 100 mM, 200 mM, 250 mM). Luego, se sembraron 20 semillas de cada variedad en cada placa y se mantuvieron en oscuridad durante una semana. Se realizaron conteos diarios para determinar la germinación en cada placa en cuatro experimentos independientes.

2.3 Evaluación en etapa vegetativa: Sistema experimental

Las semillas de ambos cultivares germinaron en soportes de malla con vermiculita húmeda sobre contenedores de 3 litros con medio ByD ½X⁶ y aireación continua. Se llevaron a cabo tres ensayos independientes en condiciones controladas de luz y temperatura en una cámara de cría. El tratamiento de shock salino (+ NaCl 200 mM en medio ByD ½X) se aplicó a los 20 días desde la siembra, el grupo control mantuvo sus condiciones originales (ByD ½X). Se realizaron muestreos en la tercera hoja trifoliada y raíces en doce plantas por tratamiento y cultivar en momentos específicos (0; 1; 7; 14 días post tratamiento; dpt), agrupados en tres conjuntos de cuatro plantas cada uno.

2.4 Parámetros biométricos

En las plantas control y salinizadas, según la descripción, se realizaron las siguientes mediciones: longitud de parte aérea y raíz principal, número de hojas, peso fresco y seco parte aérea y raíces, superficie foliar con el programa ImageJ⁷.

2.5 Análisis de sobrevivencia

Se germinaron 25 semillas de cada cultivar según lo descrito en 2.3 y, luego de 14 días bajo tratamiento con NaCl 200 mM, se realizó el conteo de plantas vivas y total. El porcentaje de sobrevivencia se calculó en relación con el

número total de plantas en cuatro experimentos independientes.

2.6 Análisis de datos

Todos los datos se analizaron por cultivar mediante ANAVA seguida de test de Tukey ($p < 0,05$), en tres experimentos independientes utilizando InfoStat⁸ software estadístico.

Resultados y Discusión

Efectos de Diferentes Concentraciones de NaCl sobre la Germinación de Alfalfa

El proceso de germinación y el crecimiento inicial de plántulas son etapas críticas en el ciclo de vida de las plantas, que inciden directamente sobre el rendimiento. En NaCl 50 mM, a 1 dpt, M mostró un 60% de germinación respecto al control mientras que en Ku fue de un 80%. En condiciones superiores a NaCl 200 mM y a los 7 d, Ku germinó un 40% mientras que M solo un 20% (Figura 1 A y B). Otras investigaciones demuestran que los niveles elevados de salinidad generaron un retraso en la germinación e incluso la inhibieron, dependiendo de la tolerancia de las plantas a la sal⁹. Estas diferencias evidencian que Ku fue menos afectada por la salinidad que M, ya que el proceso de germinación ocurrió hasta 2 días antes que, en M, en elevadas condiciones salinas.

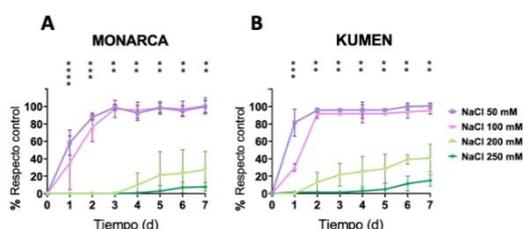


Figura 1. Porcentaje de germinación de semillas de alfalfa germinadas en distintas concentraciones de NaCl (50 mM, 100 mM, 200 mM, 250 mM), respecto a condición control sin NaCl. Cultivares A. Monarca; B. Kumen, crecidos durante una semana. Asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos y sus respectivos controles, Test de Tukey ($p < 0,05$). n:200 por experimento.

Diferencias Biométricas frente al Estrés Salino entre ambos Cultivares

La reducción del crecimiento de alfalfa en condiciones salinas ha sido discutida ampliamente¹⁰. El estrés salino afectó el crecimiento en M a los 7 dpt, evidenciado por la longitud de la parte aérea y el número de hojas, mientras que en Ku ocurrió una semana después (14 dpt). En condiciones control, Ku mostró

mayor número de hojas al final del ensayo. El peso fresco de la parte aérea fue menor en ambos cultivares con salinidad a los 14 dpt (Tabla 1). En otras especies, el estrés salino inhibió el crecimiento debido a cambios en la absorción de nutrientes o a concentraciones tóxicas de Na^+ y Cl^- intracelular¹¹. En M, el estrés salino resultó en una detención anticipada del crecimiento, mientras que Ku mostró una respuesta fenotípica en los mismos parámetros al finalizar el experimento, indicando variabilidad temporal en las respuestas de crecimiento entre los cultivares evaluados en salinidad.

Tabla 1. Parámetros morfo-fisiológicos de plantas de alfalfa control y tratadas con NaCl 200 mM. Cultivares Monarca y Kumen crecidos durante 20 días en medio ByD 1/2X. Asteriscos indican diferencias significativas entre los cultivares tratados y sus respectivos grupos de control en cuatro experimentos independientes, Test de Tukey ($p < 0,05$). n: 192 por tratamiento

Cultivar	Tratamiento	Kumen				Monarca			
		Control	NaCl 200 mM	Control	NaCl 200 mM				
Días post tratamiento	0	1	7	14	0	1	7	14	
	0	1	7	14	0	1	7	14	
Longitud	Parte aérea (cm)	17,44	16,55	22,94	16,68	12,8	10,32	14,41	16,26
	Raíz (cm)	19,60	19,21	22,14	22,23	14,21	14,77	16,21	15,14
Número de hojas	Parte aérea	4,99	5,11	6,34	36,5	5,17	6,09	10,15	4,8
	Raíz	6,9	6,96	6,67	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6
Superficie foliar (cm²)	Parte aérea	5,07	5,07	5,08	4,01	5,08	5,07	5,08	5,08
	Raíz	5,07	5,07	5,08	4,01	5,08	5,07	5,08	5,08
Peso fresco (g)	Parte aérea	0,11	0,1	0,19	0,15	0,11	0,11	0,14	0,14
	Raíz	0,11	0,11	0,17	0,20	0,14	0,14	0,17	0,17
Peso seco (g)	Parte aérea	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
	Raíz	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01

3.3 Análisis de Supervivencia frente a Estrés Salino en Alfalfa

Bajo estrés salino, M experimentó una disminución significativa en el porcentaje de supervivencia en comparación con su control. Estas diferencias no fueron significativas para Ku. A la hora de comparar la supervivencia de ambos cultivares estresados, se observó una diferencia significativa entre ellos (Figura 2).

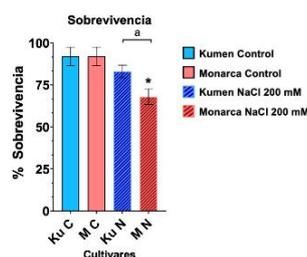


Figura 2. Porcentaje de supervivencia en plantas de alfalfa. Cultivares Monarca (M) y Kumen (Ku) crecidos durante 20 días en medio ByD 1/2X, tratados con NaCl 200 mM durante 14 días. Asterisco indica diferencias significativas entre la condición salina y su respectivo control, Letras indican diferencias significativas entre cultivares, Test de Tukey ($p < 0,05$).

La presencia de altos niveles de sales limitó la producción de biomasa en la alfalfa, provocando

una disminución del rendimiento de hasta un 35% en algunos cultivares¹². Si estos niveles persisten, pueden ocasionar la muerte de la planta. Las respuestas frente a la salinidad, durante la germinación y el desarrollo vegetativo, podrían ser indicadores que expliquen el comportamiento diferencial en la sobrevivencia de ambos cultivares, siendo notablemente menor en M en comparación con Ku.

En resumen, estos datos demuestran que M es menos tolerante a la salinidad en comparación con Ku, lo que podría indicar diferencias en los mecanismos de respuesta a este estrés entre ambos cultivares.

Bibliografía

1. Malhi GS, Kaur M, Kaushik P. Impacto del cambio climático en la agricultura y sus estrategias de mitigación. *Sostenibilidad* 2021;13(3): 1318. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/su13031318>
2. Basigalup, D. H. Investigación, producción e industrialización de la alfalfa en Argentina. Ediciones INTA, Buenos Aires, Argentina, 2022. 783p. ISBN 978-987-679- 348-3 (digital)
3. Keshavarizi B, Mohammed H. Estudio de los efectos de diferentes niveles de salinidad causados por NaCl en la germinación temprana de plántulas de *Lactuca sativa* L. (2012) *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*. 2012; 8:203–208.
4. Jamil M. Efecto del estrés salino en la germinación y el crecimiento temprano de plántulas de cuatro especies de hortalizas. *Journal of Central European Agriculture*. 2006. 7(2): 273-282. Disponible en: <https://jcea.agr.hr/en/issues/article/358>
5. Cornacchione M, Suarez DL. Evaluación de la respuesta de poblaciones de alfalfa (*Medicago sativa* L.) al estrés por salinidad. *Crop Science* [Internet]. 1 de enero de 2017;57(1):137-50. Disponible en: <https://doi.org/10.2135/cropsci2016.05.0371>
6. Broughton WJ, Dilworth MJ. Control de la síntesis de leghemoglobina en frijolesculebra. *Biochemical Journal* (1971)125(4):1075-80. Disponible en: <https://doi.org/10.1042/bj1251075>
7. Rasband, W.S., ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.net/ij/>, 1997-2018.
8. InfoStat (2008). InfoStat versión 2008. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
9. Uçarlı C. Capítulo 11. Efectos de la salinidad en la germinación de semillas y en la etapa inicial de plántulas. En: Fahad S, Saud S, Chen Y, Wu C, Wang D (Eds). *Estrés Abiótico en Plantas*. 2021. Disponible en: <https://doi.org/10.5772/intechopen.93647>.
10. Bhattarai S, Biswas D, Fu Y, Biligetu B. Respuestas morfológicas, fisiológicas y genéticas al estrés salino en alfalfa: una revisión. *Agronomía* (2020)10(4):577. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/agronomy10040577>
11. Yang Y, Guo Y. Descifrando la señalización del estrés salino en las plantas. *Journal of Integrative Plant Biology* [Internet]. 15 de julio de 2018;60(9):796-804. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/jipb.12689>
12. Al-Farsi SM, Nadaf SK, Al-Sadi AM, Ullah A, Farooq M. Evaluación de las variedades autóctonas de alfalfa de Omán para morfología y rendimiento forrajero bajo diferentes niveles de estrés salino. *Fisiología y Biología Molecular de Plantas* [Internet]. 1 de agosto de 2020;26(9):1763-72. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s12298-020- 00856-5>.

