

Rompani, Juan Martín

Efecto del estrés salino en el contenido y la composición de las pectinas y en el contenido de fibra detergente neutro de la pared celular de tallos de Lotus tenuis

**Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria
Facultad de Ciencias Agrarias**

Este documento está disponible en la Biblioteca Digital de la Universidad Católica Argentina, repositorio institucional desarrollado por la Biblioteca Central "San Benito Abad". Su objetivo es difundir y preservar la producción intelectual de la Institución.

La Biblioteca posee la autorización del autor para su divulgación en línea.

Cómo citar el documento:

Rompani, J. M. 2016. Efecto del estrés salino en el contenido y la composición de las pectinas y en el contenido de fibra detergente neutro de la pared celular de tallos de Lotus tenuis [en línea]. Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Católica Argentina. Disponible en: <http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/tesis/efecto-estres-salino-tallos-lotus-tennis.pdf> [Fecha de consulta:.....]



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA ARGENTINA

Facultad de Ciencias Agrarias

Ingeniería en Producción Agropecuaria

“Efecto del estrés salino en el contenido y la composición de las pectinas y en el contenido de fibra detergente neutro de la pared celular de tallos de *Lotus tenuis*”

Trabajo final de graduación para optar por el título de:
Ingeniero en Producción Agropecuaria

Autor: Juan Martín Rompani

Profesor Tutor: Ing. P.A. María Elena Vago MSc

Profesor co-tutor: Dra. Marina Ciancia

Profesor co-tutor: Dr. Jorge Zavala

Modalidad: Experimental

Fecha: 23/11/2016

RESUMEN

En la provincia de Bs As existe una amplia zona de cría de ganado bovino denominada “Cuenca del Salado”. Dentro de las especies forrajeras naturalizadas en los suelos bajos y tendidos de la misma se destaca el *Lotus tenuis*, leguminosa herbácea de ciclo primavera-estivo-otoñal. A diferencia de los animales, las respuestas inmunológicas de las plantas frente a los distintos tipos de estrés se basan en la respuesta de cada célula y señales de los sitios afectados. Gran parte de estas resistencias se deben a sus paredes celulares. El objetivo de este trabajo consistió en caracterizar la composición química de las paredes celulares de tallos de plantas de *Lotus tenuis* clasificadas como resistentes al estrés salino respecto a la composición de sus pectinas extraídas con Ácido Ciclohexileno-dinitrilotetra Acético (CDTA) y a su contenido en Fibra Detergente Neutro (FDN). Para ello se analizó el contenido en azúcares totales y el contenido de ácidos urónicos de los extractos de CDTA y también el porcentaje de FDN en tallos secos y molidos de plantas cultivadas en maceta bajo invernáculo regadas con 0 mM NaCl (Testigos), 75 mM NaCl y 150 mM NaCl. Se observó una disminución en el contenido de azúcares totales y de ácidos urónicos a medida que aumentó la concentración de sal en el agua de riego. Respecto al contenido de FDN se encontró una diferencia significativa entre los tratamientos, disminuyendo el mismo a medida que aumentaba el estrés salino. Debería profundizarse en el estudio de la composición de estas paredes celulares ya que un menor contenido de FDN mejoraría el consumo voluntario, pero un contenido de ácidos urónicos inferior evidenciaría una menor presencia de pectinas; y un menor contenido de azúcares totales podría relacionarse con un aumento en componentes de la pared de menor digestibilidad potencial para vacunos en pastoreo.

AGRADECIMIENTOS

A María Elena, por sus enseñanzas, su tiempo y dedicación

A la Dra. Marina Ciancia y al Dr. Jorge Zavala, por abrir sus puertas

A la facultad, por hacer hincapié en la formación de personas

A mi familia

A Martita, Diana y Tute

A “La Chueca” y amigos

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	5
Características de la especie <i>Lotus tenuis</i>	6
“Estrés” y otros conceptos	8
La salinidad y sus efectos en las plantas	9
La Pared Celular y sus componentes. Implicancias en la alimentación de rumiantes	11
Fibra Detergente Neutro	15
OBJETIVOS	16
Hipótesis	16
MATERIALES Y MÉTODOS	17
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
Azúcares Totales y Ácidos Urónicos	22
Fibra Detergente Neutro	25
CONCLUSIONES	27
BIBLIOGRAFÍA	28
ANEXOS.....	33
Resultados determinación de azúcares totales y ácidos urónicos	33
Análisis Estadístico Fibra Detergente Neutro	33
Preparación de sustrato	35

INTRODUCCIÓN

En la provincia de Buenos Aires existe una zona de marcada importancia para la producción de ganado bovino denominada Cuenca del Salado o Pampa Deprimida, que ocupa gran parte del Centro, Este y Sudeste de esta provincia. La producción ganadera de esta zona en los últimos años está siendo desplazada por la agricultura, que utiliza los mejores suelos de loma, hacia sectores más marginales que presentan restricciones edáficas y riesgos hídricos (Burkart et al. 1990; Casal et al. 2009; Castaño 2001; Criado 2014; Vignolio & Fernandez 2006). Estas tierras se caracterizan por ser suelos bajos, salinos y/o alcalinos, con escasa provisión en general de fósforo disponible, alrededor de 10 partes por millón (ppm) o inferior (Burkart et al. 1990; Casal et al. 2009; Castaño 2001; Criado 2014; Vignolio & Fernandez 2006). Los suelos más comunes son los Natracuales, que forman asociaciones con Natracualfes y Natralboles. Estos tienen típicamente un horizonte arcilloso de baja permeabilidad. Los excesos de lluvia invernales y los déficits estivales, el drenaje lento, y el carácter salino y/o alcalino determinan que sea frecuente la alternancia de anegamiento y sequía (Batista et al. 2005).

A raíz de las limitantes que debe enfrentar para su crecimiento y producción, la vegetación natural resulta pobre en calidad y presenta una menor variabilidad de especies forrajeras posibles de ser cultivadas. Es por eso que estos tipos de potreros son destinados para cría vacuna (Burkart et al. 1990; Casal et al. 2009; Castaño 2001; Criado 2014; Vignolio & Fernandez 2006). En ellos encontramos: pastizales de “bajo dulce”, que se desarrollan con un suelo alcalino no salino, dentro de los cuales podemos mencionar “raigrás” *Lolium sp.*, “festuca alta” *Festuca arundinacea*, “trébol blanco” *Trifolium repens*, “pasto miel” *Paspalum dilatatum*, “flechillas” *Stipa sp.*, “arrocillo” *Leersia hexandra*, “canutillo” *Paspalidium paludivagum*, “cebadilla de agua” *Glyceria multiflora* (Burkart et al. 1990; Casal et al. 2009; Castaño 2001; Criado 2014; Vignolio & Fernandez 2006).

Por otra parte, se encuentran pastizales de “bajo salino” con alta presencia de sales (en algunos casos en porcentajes tóxicos), con altos niveles de sodio intercambiable, con severos problemas de drenaje, y generalmente acompañados de valores de pH de 8 a 9. En estos sectores predomina el “pelo de chancho” *Distichlis sp.*, y en ciertas ocasiones “agropiro alargado” *Thynopirum ponticum* y *Sporobolus pyramidatus* (Burkart et al. 1990; Casal et al. 2009; Castaño 2001; Criado 2014; Vignolio & Fernandez 2006).

Es en estos casos de suelos con restricciones en donde se vuelve indispensable la utilización de plantas de mejor calidad forrajera adaptadas a estas zonas para optimizar su producción y posterior aprovechamiento al ser pastoreadas (Burkart et al. 1990; Casal et al. 2009; Castaño 2001; Criado 2014; Vignolio & Fernandez 2006).

Existe una leguminosa naturalizada en la zona que por sus características y adaptación a los bajos tendidos se destaca: *Lotus tenuis*.

Características de la especie *Lotus tenuis*

El género *Lotus sp.* es originario de Europa y Asia menor, en la Cuenca del Mediterráneo, donde cuenta con alrededor de 200 especies tanto perennes como anuales. Se cree que su introducción en la Argentina se produjo al venir mezclada con otras semillas, o en las heces de animales traídos de Europa, propagándose naturalmente en la Pampa Deprimida debido a su capacidad de establecimiento y resiembra espontánea. Existen antecedentes de siembra desde el año 1930 y ya en 1980 la especie *Lotus tenuis* se establece en la Cuenca del Salado (Criado 2014; Miñón et al. 1990; Vignolio & Fernandez 2006).

La especie, también conocida como *Lotus glaber*, o vulgarmente como “trébol pata de pájaro” o “lotus de hoja angosta”, pertenece a la familia de las leguminosas. Es perenne, de ciclo primavero – estivo – otoñal con latencia invernal. Es herbácea, con reproducción sexual, alógama, sin órganos de propagación/multiplicación vegetativa o asexual, polinizada por insectos, principalmente abejas, *Apis mellifera* (Cambareri et al. 2007; Criado 2014; Escaray 2012; Miñón et al. 1990; Vignolio & Fernandez 2006).

De fotorperíodo corto y hábito de crecimiento prostrado cuando no tiene competencia por luz, y erecto si se encuentra asociada a pastizales altos. Su crecimiento es indeterminado, por lo que durante la etapa reproductiva pueden encontrarse ejes con primordios florales, umbelas de flores o umbelas de vainas en diferentes estados de maduración y dehiscencia (Cambareri et al. 2007; Criado 2014; Escaray 2012; Vignolio & Fernandez 2006).

Presenta raíz pivotante, muy ramificada en los primeros centímetros del suelo. Hojas pentafolioladas, cuyos folíolos son lanceolados, dos en la base del pecíolo y tres en la parte terminal de la hoja (Miñón et al. 1990; Vignolio & Fernandez 2006).

La floración comienza en primavera y culmina hacia fines del verano. Las flores son de color amarillo, pedicelo corto y están dispuestas en umbelas (1 a 6). La mayoría da frutos que producen semillas. Existen dos pulsos de producción, desde diciembre hasta mediados de febrero (70%), y mediados de febrero a fin de marzo (30%). La cantidad de semillas por fruto varía durante el ciclo (3 a 35) dándose los valores máximos al comenzar dicho ciclo y mínimos al finalizar (Cambareri et al. 2007; Criado 2014; Vignolio & Fernandez 2006).

Las semillas son de tamaño pequeño (1,2 – 1,65 mm de longitud y aproximadamente 1 mm de ancho), duras, lisas y de color marrón. El peso de mil semillas oscila entre 0,65 gramos (g.) – 1,5 g. La dispersión de las semillas se realiza principalmente por medio del ganado a través de sus heces, teniendo una alta viabilidad (cercana al 85 %) debido a su plasticidad fenotípica y tolerancia a anegamientos. La dormición física de la semilla, a causa de su dureza, hace que posea bajo poder germinativo (PG), alrededor de un 60 %. El escarificado y/o las bajas temperaturas (5 °C), generan un incremento del PG hasta 90 % aproximadamente, por lo que el mayor pulso de germinación se da hacia la salida del invierno (Cambareri et al. 2007; Criado 2014; Vignolio & Fernandez 2006).

Se desarrolla en ambientes templados (Escaray 2012; Vignolio & Fernandez 2006). Tolerante a temperaturas inferiores a 0°C, y el congelamiento de agua en condiciones de anegamiento, presentando un mejor desempeño de crecimiento en comparación con otras leguminosas forrajeras como *Lotus*

corniculatus, *Trifolium sp.* y *Medicago sp.* a bajas temperaturas. Lo mismo ocurre ante altas temperaturas estivales, respecto de *Lotus uliginosus*, *Trifolium fragiferum*, *Trifolium hybridum*, *Trifolium pratense* y *Trifolium repens* (Vignolio & Fernandez 2006).

Es sensible a la falta de luz en los primeros estadios de desarrollo. De pobre vigor y lento crecimiento de plántulas, por lo que su establecimiento es vulnerable ante competencia. Debido a esto presenta baja persistencia en praderas polifíticas (Criado 2014; Escaray 2012; Vignolio & Fernandez 2006).

Puede crecer con suelos de pH 5 a 9, y con valores mínimos de fósforo de hasta 3 ppm (Criado 2014; Stoffella et al. 1998; Vignolio & Fernandez 2006). Tolerancia a salinidad, tanto en germinación como en estadio de plántula y más avanzados, disminuyendo su crecimiento con el incremento de la misma (Vignolio & Fernandez 2006).

Tolerancia a anegamiento, causante de anoxia radical, para lo cual se inducen cambios anatómicos como el incremento de espacios aéreos (aerénquimas) en tallos y raíces, que facilitan el intercambio de gases entre los tejidos anegados y el exterior. La planta es menos afectada al tener mayor biomasa y/o edad. A su vez, si el suceso es invierno-primaveral, el perjuicio es menor que en el caso estival, debido a que en este último, se afecta la etapa reproductiva de la planta, produciéndose atraso de la floración y merma en la producción de frutos y semillas (aborto) (Escaray 2012; Teakle et al. 2006; Vignolio & Fernandez 2006).

Establece interacciones simbióticas para fijación biológica de nitrógeno atmosférico con las bacterias *Rhizobium loti*, *Mesorhizobium loti*, *Mesorhizobium huakuii* y *Bradyrhizobium sp.* Esta fijación es mayor a inferior fotoperíodo, con frecuencia e intensidad de pastoreo más altas; y en las estaciones invierno – primavera respecto de verano – otoño. Es capaz de continuar con la fijación aún en condiciones de anegamiento, pero con una tasa menor debido a un número y tamaño inferior de nódulos en las raíces (Escaray 2012; Vignolio & Fernandez 2006).

También, presenta la característica de asociarse con hongos del género *Glomus sp.* formando micorrizas vesículo – arbusculares (MVA), lo que aumenta la capacidad de absorción de minerales en suelos de baja fertilidad (Díaz et al. 2005; Escaray et al. 2012; Vignolio & Fernandez 2006).

Estas asociaciones las vuelven más competitivas en suelos con deficiencias de nutrientes y es por ello que usualmente se las reconoce como “plantas pioneras” (Escaray 2012). Al mismo tiempo mejoran las condiciones del suelo y el nitrógeno atmosférico fijado puede ser utilizado por otras especies constituyentes de la vegetación (Teakle & Tyerman 2010; Vignolio et al. 2010).

Tiene la capacidad de sintetizar metabolitos secundarios como los taninos condensados. Estos son polifenoles de estructura variable (Barry & McNabb 1999; Díaz et al. 2005; Escaray et al. 2007; Escaray 2012) que participan en la defensa contra bacterias, hongos e insectos (Vignolio & Fernandez 2006). También evitan la formación de espumas y gases en el rumen del ganado (Miñón et al. 1990), debido a su interacción con las proteínas solubles del forraje impidiendo así la ocurrencia de timpanismo (Barry & McNabb 1999; Díaz et al. 2005; Escaray et al. 2007).

En cuanto a características productivas, tiene en general una digestibilidad promedio de 75 % en todo el ciclo vegetativo, con una caída menos acentuada a la

madurez en comparación a especies como *Lotus corniculatus* y *Medicago sativa*, también leguminosas, principalmente explicado por un menor contenido de lignina y de pared celular (Criado 2014; Miñón et al. 1990). Esto permite un manejo más elástico y repercute positivamente en la producción de carne.

El contenido de proteína bruta varía entre 20 y 22 % de la MS. Puede diferirse para uso invernal y muestra gran calidad nutricional y productividad aún bajo condiciones de sequía e inundación (Andrés & Rosso 2007; Criado 2014; Vignolio & Fernandez 2006).

“Estrés” y otros conceptos

En el escenario planteado inicialmente, las plantas están inmersas en un medio con condiciones particulares que claramente incide en qué especies pueden desarrollarse y la manera en que éstas lo hacen. En ciertas ocasiones, puede existir un factor externo que ejerza una influencia desventajosa en la planta. A éste lo denominaremos estrés (Taiz et al. 2002).

Tanto en agricultura como en condiciones naturales, las plantas son expuestas a ambientes desfavorables que resultan en algún grado de estrés. Ciertos factores ambientales, como la temperatura del aire, pueden resultar estresantes en pocos minutos; otros, como el contenido de agua en el suelo, pueden tomar días, y ciertos otros, como el déficit de nutrientes edáfico, meses (Taiz et al. 2002).

Taiz et al. (2002) sugieren que entender los procesos fisiológicos mediante los cuales se producen daños por estrés y los mecanismos de adaptación y aclimatación de las plantas al estrés ambientales, tanto para la agricultura y ganadería, como para el medio ambiente, de vital importancia. En la mayoría de los casos el estrés es cuantificado en torno a la supervivencia de la planta, el rendimiento del cultivo, crecimiento (biomasa acumulada), o procesos de asimilación (CO_2 , nutrientes) relacionados a este último. El déficit hídrico, el estrés calórico y el golpe térmico, el enfriamiento o el congelamiento, la salinidad o el anegamiento, son los principales factores de estrés que restringen a las plantas en lo mencionado anteriormente, expresando solo una fracción de su potencial genético.

La capacidad de las plantas para sobrellevar ambientes desfavorables se conoce como resistencia. La adaptación de las plantas refiere a un nivel de resistencia genéticamente determinado, adquirido mediante un proceso de selección a través de muchas generaciones. La aclimatación, por su parte, implica resistencia como resultado de bajas exposiciones previas al estrés, es decir, se produce un aumento gradual. Estos términos muchas veces son incorrectamente utilizados, aplicando el término aclimatación para hacer referencia a la resistencia determinada genéticamente (Taiz et al. 2002).

La adaptación y aclimatación resultan de eventos integrados en todos los niveles de organización, anatómicos, morfológicos, celulares, bioquímicos y moleculares. La respuesta celular a estreses incluye cambios en el ciclo y la división celular, en el sistema de endomembranas, la vacuolización y en la pared celular, con el objetivo de favorecer la tolerancia de las células. A nivel bioquímico, las plantas lo consiguen alterando el metabolismo de distintas formas, como la osmoregulación mediante la producción de ciertos compuestos. (Taiz et al. 2002)

La mayoría de los factores se encuentran interrelacionados. Por ejemplo, un déficit hídrico puede asociarse a salinidad en la rizósfera y con estrés calórico en hojas. También, encontramos tolerancia cruzada, es decir, a un estrés inducido por la aclimatación a otro. Finalmente, debemos remarcar que un ambiente que es estresante para una planta puede no serlo para otra. Por ejemplo, dos plantas que crecen entre 20-30°C, a medida que la temperatura aumenta, puede suceder que una muestre signos de estrés más tempranamente que la segunda. Así, nos encontramos con dos plantas que si bien crecen en el mismo rango, en este caso de temperatura, tienen distinta tolerancia al calor (Taiz et al. 2002).

En este estudio nos centraremos en el estrés salino resultante de la acumulación de sal en el suelo.

La salinidad y sus efectos en las plantas

La evaporación y transpiración remueven el agua pura del suelo en forma de vapor, dejando sus solutos en el mismo. En el caso en que el agua contenga altas cantidades de solutos y no exista la posibilidad de eliminar la acumulación de estos a un sistema de drenajes, se alcanzarán rápidamente niveles dañinos para ciertas especies. (Taiz et al. 2002)

Según Taiz (2002), hay dos criterios diferentes al hablar de salinidad. El primero es la salinidad “propriadamente dicha”. Este se refiere a altas cantidades de diferentes sales tales, incluyendo distintas combinaciones de aniones e iones como calcio (Ca^{2+}), magnesio (Mg^{2+}), sodio (Na^+), sulfatos (SO_4^{2-}), cloruros (Cl^-) y nitratos (NO_3^{2-}). A este conjunto de sales se las conoce como neutras, es decir que no alcalinizan el suelo (Paz et al. 2012; Rengasamy 2010; Richards et al. 1954). El segundo es la “sodicidad”, altas concentraciones de Na^+ , que otorgan al suelo un pH elevado por hidrólisis alcalina de carbonatos y bicarbonatos (sales que alcalinizan al suelo). Este implica un perjuicio directo para las plantas pero además una degradación del suelo, disminuyendo la porosidad y permeabilidad (Taiz et al. 2002).

La salinidad a campo se mide como conductividad eléctrica. Esta medición se basa en los iones disueltos en agua de suelo. El agua pura es un pobre conductor de electricidad. A medida que se incrementa la concentración de sal en el agua, en otras palabras, aumenta la cantidad de iones disueltos, la conducción de electricidad es más elevada. Por lo tanto, un suelo salino tendrá una mayor conductividad eléctrica respecto de aquel que no es considerado salino. Se considera salino a un suelo cuando presenta una conductividad eléctrica del extracto de saturación mayor o igual a 4 deciSiemen por metro (dS/m) (Munns & Tester 2008; Rengasamy 2010; Richards et al. 1954), lo que equivale a 40 miliMoles (mM) de cloruro de sodio (NaCl) aproximadamente (Munns & Tester 2008).

La salinidad también es analizada como potenciales iónicos. Este representa la disminución de la capacidad de desplazamiento del agua debida a la presencia de solutos. Una masa de agua pura a presión normal (1 atmósfera) tiene un potencial igual a cero. A mayor concentración de soluto, menor será el potencial, es decir que todos los valores negativos. Por lo tanto, con una mayor cantidad de sal el valor de potencial es menor. En caso de que la presión osmótica en el suelo sea menor que la presión osmótica en la planta, se originará una salida

del agua de la planta hacia el suelo, causando deshidratación (Parra Boronat 2012; Pérez García 1994; Taiz et al. 2002).

Las plantas pueden clasificarse de acuerdo a la posibilidad de desarrollo y de su ciclo productivo en relación a la salinidad en plantas halófitas y plantas glicófitas. Las plantas halófitas son nativas de suelos salinos, por ende altamente tolerantes a la sal (Taiz et al. 2002). Tienen la capacidad de poder completar su ciclo de vida en concentraciones que oscilan desde 200 miliMoles (mM) hasta 700 mM de NaCl en los casos más extremos, como por ejemplo *Salicornia sp*, *Suaeda sp*, *Limonium sp*, *Atriplex sp*, *Arthrocnemum sp*, *Hordeum marinum*, *Distichlis palmeri* (Munns & Tester 2008; Parra Boronat 2012). En otras palabras soportan valores superiores 4 dS/m (Lavado 2012).

Las glicófitas son aquellas que no resisten de la misma manera que las anteriores. Son sensibles a la salinidad, presentando un punto de concentración a partir del cual empiezan a tener perjuicios. Los daños por salinidad involucran efectos osmóticos y otros específicos de los iones presentes (Taiz et al. 2002), como son: reducción de la expansión foliar, reducción media de las hojas y el índice de área foliar (Heylar 1994; Manchanda & Garg Neera 2008; Munns 1993), disminución de la fotosíntesis, clorosis y pérdida de materia seca (Taiz et al. 2002). Como consecuencia se deprime el desarrollo, el crecimiento y la supervivencia de las plantas (Arbona et al. 2013; Munns 1993; Munns 2002; Munns & Tester 2008).

El daño por un lado es producto de la reducción del potencial osmótico del agua del suelo debido a los solutos disueltos en él (alta concentración iónica) y por ende en la rizósfera. Se afecta así el balance de agua en la planta, es decir su absorción. Esta debe reducir el potencial agua en hoja por debajo del que se presenta en el suelo, para mantener una diferencia de gradiente que permita el transporte del agua entre el suelo y las hojas. Este efecto es similar a un déficit hídrico, difiriendo con este último en el agua total disponible (Arbona et al. 2013; Munns 2002; Munns & Tester 2008; Parida & Das 2005; Taiz et al. 2002). La concentración de sales, la textura del suelo y el tipo de arcilla, determinarán en gran parte la cantidad de agua que podrán absorber las plantas (Rengasamy 2010).

Por otra parte, se generan efectos de toxicidad debidos a elevadas concentraciones de iones por acumulación en los tejidos, particularmente Cl^- , Na^+ y/o SO_4^{2-} . Se inactivan enzimas en las células y se inhibe la síntesis de proteínas en el caso de altas sales totales y una relación anormal de Na/K. La fotosíntesis es inhibida por altas concentraciones de Na^+ y/o Cl^- acumulados en cloroplastos (Arbona et al. 2013; Munns 2002; Munns & Tester 2008; Parida & Das 2005; Taiz et al. 2002).

Las plantas presentan distintos mecanismos para contrarrestar el efecto de la salinidad. Uno es excluir el exceso de iones de los meristemas de crecimiento y hojas en expansión (Taiz et al. 2002), controlando su absorción tratando que llegue la menor cantidad posible (Plett & Moller 2010). Para ello la planta recurre a obstruir con suberina los haces del xilema de forma tal que la vía de circulación disponible sea la simplástica a través de las membranas celulares, la cual ofrece cierta resistencia al pasaje. El sodio ingresa en las raíces de forma pasiva por lo que las células de la misma deben extraerlo activamente. El cloro en cambio presenta una baja permeabilidad en las membranas celulares (Taiz et al. 2002).

Algunas plantas resistentes no excluyen iones en la raíz sino que tienen glándulas de sal en la superficie de las hojas a donde transportan los iones y allí la sal se cristaliza y deja de ser nociva (Taiz et al. 2002).

Otro mecanismo es el ajuste osmótico. Para bajar el potencial agua lo hacen disminuyendo su potencial de soluto mediante la acumulación de iones en la vacuola, evitando el daño en enzimas sensibles (Taiz et al. 2002).

La exclusión de iones es crítica para la aclimatación y adaptación al estrés y tiene un menor costo energético que otros mecanismos. Hay que tener en cuenta que la compartimentalización de los iones puede llegar a volverse tóxica (Taiz et al. 2002). Los determinantes moleculares de los procesos de exclusión del sodio son reguladas por genes denominados SOS que se expresan induciendo la producción de proteínas encargadas de la labor. Por último, otra respuesta es reducir el área foliar y/o la caída de hojas (Taiz et al. 2002).

Podemos hablar entonces de dos fases de respuesta vegetal frente al estrés salino según Munns y Tester (2008). Primero una rápida llamada Fase Osmótica, durante la cual se inhibe el crecimiento de hojas jóvenes. Es independiente de la tolerancia o susceptibilidad que presenta la especie a la salinidad e inicia una vez que la concentración de sal en la rizósfera supera el umbral de 40 mM NaCl para la generalidad de las plantas. Se produce entonces una reducción de la expansión celular en la punta de las raíces desencadenándose una señal hormonal que frena el crecimiento de brotes y hojas nuevas, reduce la conductancia estomática en hojas maduras y produce el cierre de los estomas.

Segundo, una lenta llamada Fase Iónica, en la que se acelera la senescencia de hojas adultas. Tarda más en evidenciarse y es consecuencia de la acumulación de iones en las hojas maduras, alcanzando niveles tóxicos debido a que se excede su capacidad de almacenamiento en sus vacuolas, causando su senescencia. Se produce así una reducción del área fotosintética. Las plantas tolerantes a salinidad tienen una tasa de transporte de sales menor que las susceptibles y una mayor capacidad de compartimentar electrolitos (Munns & Tester 2008). El problema ocurre cuando la tasa de senescencia foliar iguala a la de expansión, ocasionándose la muerte prematura de la planta (Rengasamy 2010). En otras palabras, si la diferencia de hojas viejas que mueren es mayor que la producción de hojas nuevas, la capacidad fotosintética de la planta no podrá cubrir los requerimientos de hidratos de carbono, lo que hará que frene en gran medida su crecimiento y se produzca posteriormente su muerte (Munns & Tester 2008).

La Pared Celular y sus componentes. Implicancias en la alimentación de rumiantes

Como vemos el efecto que tiene un estrés sobre la planta implica cambios a nivel celular. A diferencia de los animales, las respuestas inmunológicas de las plantas frente a los distintos tipos de estrés se basan en la respuesta de cada célula y señales de los sitios afectados (Dangl & Jones 2001; Jones & Dangl 2006). Gran parte de estas resistencias se deben a sus paredes celulares (Buxton & Casler 1993; Somerville et al. 2004).

La pared celular es una matriz extracelular dinámica con diversas formas, funciones y capacidad de emitir respuestas. Es una mezcla compleja y variable de polisacáridos que son secretados por la célula y se encuentran ensamblados en una

red organizada y conectada tanto por enlaces covalentes como no covalentes. Además, se encuentra formada por lignina, proteínas estructurales y minerales, todo esto inmerso en una fase acuosa. En órganos aéreos las paredes exteriores de las células epidérmicas pueden estar cubiertas con ceras, cutina y suberina (sustancias hidrófobas en superficie que protegen de lesiones mecánicas, pérdida excesiva de agua e invasiones patógenas). La suberina se presenta en la corteza de ciertos árboles y principalmente en tubérculos y raíces. (Barceló Coll et al. 1988; Ramírez Orduña et al. 2002; Taiz et al. 2002).

Los principales polisacáridos componentes de la pared son celulosa, hemicelulosa y pectinas. La celulosa es un polímero lineal, formado por unidades de β -D-glucosa enlazadas por la posición 1-4, es por lo general el componente principal de las paredes celulares. Varias cadenas de estos glucanos, interactúan por puentes de hidrógeno formando microfibrillas rígidas e inextensibles (Cosgrove 1997). Estos enlaces de hidrógeno producen una disposición cristalina regular de la cadena de unidades de glucosa, que controla las características físicas y químicas de la misma (Aman 1993).

El término “hemicelulosa” comprende en realidad una serie de polisacáridos generalmente ramificados, que se extienden de los tejidos vegetales por medio de soluciones alcalinas, actuando como glicanos de entrecruzamiento, ya que su función principal consiste en formar una red tridimensional con las microfibrillas de celulosa unidas por enlaces puente de hidrógeno. Desde el punto de vista químico, las hemicelulosas presentan una gran variedad de estructuras, sin embargo, están compuestas en su mayoría por una cadena lineal de unidades de β -D-glucosa, β -D-xilosa o β -D-manosa unidas por C-4, con diferentes cadenas laterales. La mayor parte de las dicotiledóneas contienen importantes cantidades de xiloglucanos, en cambio en las gramíneas predominan los arabinoxilanos y los β -D-(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 4)-glucanos (Albersheim et al. 2011).

Las pectinas componen la parte más soluble de los polisacáridos de la pared celular. Están constituidas por un grupo heterogéneo de polisacáridos que contienen azúcares ácidos, ricos en ácido galacturónico y azúcares neutros, tales como ramnosa, galactosa y arabinosa. Estos polímeros son muy hidrofílicos, absorben grandes cantidades de agua dando geles (Cosgrove 1997). Encontramos tres grupos principales: *Homogalacturonanos*, formados por cadenas lineales de ácido galacturónico; *Ramnogalacturonanos-I* con cadenas formadas por residuos alternantes de ácido galacturónico y ramnosa (6-desoxi-L-manosa), y cadenas laterales de arabinanos, galactanos, y/o arabinogalactanos; *Rhamnogalacturonanos-II*, contiene once tipos distintos de azúcares y forma dímeros por enlaces entre residuos de apiosa de cadenas diferentes mediados por iones boro (Palin & Geitmann 2012). Los más abundantes son los Homogalacturonanos y los Ramnogalacturonanos-I. Los grupos carboxilo de las cadenas de homogalacturonanos varían en su grado de esterificación con grupos metilo, lo que influye en la habilidad para formar un gel a través de la adición de agentes gelificantes como el ión calcio (Ca^{2+}) (Proseus & Boyer 2007). Aquellas con un bajo grado de esterificación pueden presentar enlaces cruzados con Ca^{2+} resultando en una matriz de mayor rigidez (Palin & Geitmann 2012).

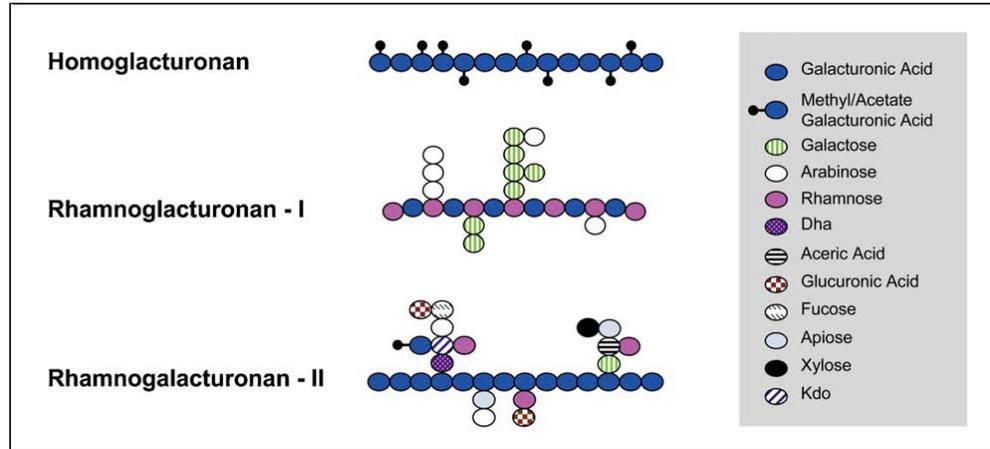


Figura 1: Estructura esquemática de los principales tipos de pectinas: Homogalacturonas, Rhamnogalacturonas-I y Rhamnogalacturonas-II (Palin & Geitmann 2012)

Las moléculas de pectinas son sintetizadas en el aparato de Golgi e insertadas en la matriz extracelular por exocitosis de vesículas transportadoras (Palin & Geitmann 2012). Se localizan en la lámina media de la pared celular primaria y son más abundantes en dicotiledóneas que en monocotiledóneas. Intervienen en el control de la porosidad, la adhesión de células continuas y en el control del ambiente iónico de la pared celular (Somerville et al. 2004). También sirven como moléculas de reconocimiento que señalan el desarrollo de respuesta a organismos simbióticos, patógenos e insectos (McNeil et al. 1984).

Juntas, la hemicelulosa y las pectinas constituyen la matriz en donde las microfibras de celulosa se encuentran embebidas (Harholt et al. 2010). Dependiendo de la composición molecular y la configuración química, las matrices pecticas pueden modificar su comportamiento mecánico, así como también su interacción con otros componentes de la pared celular (Palin & Geitmann 2012).

Para alcanzar su forma funcional e individual, la célula debe elongarse y diferenciarse, lográndose esto a través de alteraciones de la estructura química de los componentes de la pared celular y mecánicas de la forma celular (Ramirez Orduña et al. 2002; Taiz et al. 2002). Las llamadas paredes celulares primarias se modifican durante el crecimiento celular. Cuando las células dejan de crecer y adquieren la forma definitiva, se puede formar entre la pared primaria y la membrana plasmática una pared secundaria, cuya composición varía mucho según la función, pero generalmente tiene una proporción mayor de celulosa y de mayor grado de cristalinidad.

Las funciones principales de la pared celular son:

- Interviene en la regulación del volumen de la célula y la determinación de su forma.
- Fuerte estructura de sostén que permite el crecimiento en altura de la planta.
- Permite el contacto entre células sin fusionarse u una con otra, pudiendo desarrollar altas presiones de turgencia.
- Constituye una barrera para las distintas moléculas que ingresan a la célula, así como también para los patógenos dispuestos a invadirla.

- Posee marcadores de superficie que predicen patrones de desarrollo y marcan posiciones dentro del vegetal, así como componentes de señalamiento y comunicación por la continuidad simplástica mediante los plasmodesmos.
- Mantiene también conexiones y continuación molecular con la membrana plasmática y el citoesqueleto.

Los animales rumiantes, a diferencia de otros animales, poseen la habilidad de alimentarse y satisfacer sus requerimientos de mantenimiento y producción basándose en el consumo de plantas como única fuente de nutrientes, por medio de la capacidad de los microorganismos que alojan en el rumen de degradar los polisacáridos de las paredes celulares. La pared celular de las plantas aporta a los animales en pastoreo entre el 30 al 40 % de la energía digestible consumida. El contenido y las estructuras de las paredes celulares del forraje afecta el consumo voluntario de los animales y la digestibilidad total del material consumido (Ramirez Orduña et al. 2002).

La digestibilidad varía de acuerdo a la relación entre la proporción de pared celular y el contenido celular (hidratos de carbono solubles) en el material ingerido. Un material forrajero con una menor proporción de pared y un mayor contenido celular tendría una digestibilidad superior comparado con aquel donde se presente una relación inversa. La disponibilidad energética aumentaría al disminuir la cantidad de pared celular (Jung & Allen 1995; Ramirez Orduña et al. 2002). A su vez, la composición de la pared celular, es otro factor que incide sobre la digestibilidad (Ramirez Orduña et al. 2002). Por otra parte, existe un efecto sobre el consumo voluntario de los animales. Al disminuir la proporción de pared celular y aumentar el contenido celular se mejoraría la ingesta de forrajes, es decir aumentaría el consumo (Jung & Allen 1995).

La estructura y función de la pared están controladas por la composición y organización de los componentes individuales. La caracterización estructural es fundamental para la determinación de la relación de sus componentes y la digestibilidad. La naturaleza del entrecruzamiento entre estos componentes, la lignina y los taninos condensados son factores implicados en la degradación (Ramirez Orduña et al. 2002).

El aprovechamiento dependerá, como se mencionó de la composición química del material ingerido. Primero, respecto a la disponibilidad de los componentes de la pared celular y del contenido celular, y segundo, debido a la presencia de estructuras orgánicas e inhibidores que impidan o limiten la disponibilidad de estos componentes con los que se encuentran asociados (Van Soest 1994).

Decimos entonces que el grado de lignificación y la formación de complejos lignina – carbohidratos crea un impedimento estérico que limita el acceso de enzimas a los mismos. En otras palabras, la lignina se interpone físicamente entre las enzimas de la hidrólisis y los polisacáridos (Jung & Deetz 1993; Ramirez Orduña et al. 2002).

Las pectinas son componentes de la pared celular que no tienen enlaces covalentes con la lignina y están completamente disponibles a la fermentación en el rumen. Son solubles pero resistentes a las enzimas de los mamíferos y son constituyentes de la fibra soluble (polisacáridos no amiláceos) (Ramirez Orduña et al. 2002).

Fibra Detergente Neutro

Como se mencionó, existe una correlación negativa entre la proporción de pared celular y el consumo voluntario (Van Soest 1994). Esto es explicado por una demora en el paso a través del tracto gastrointestinal a causa del llenado del mismo, producto de la fibra del alimento (Jung & Allen 1995).

Para que se produzca el pasaje de alimento a través del rumen se necesita la reducción del tamaño de partícula. Un alimento con mayor contenido de fibra requiere mayor masticación, rumia y digestión para reducir dicho tamaño. Esto implica mayor tiempo de permanencia en el rumen que produce una disminución del consumo voluntario por llenado físico. Por lo tanto alimentos con menor contenido de fibra tenderían a aumentar el consumo voluntario (Buxton 1996; Jung & Allen 1995; Mertens 1994; Mertens 2003).

La fibra está formada por componentes del forraje de baja solubilidad en un sistema específico de solventes, los cuales son relativamente menos digestibles que el almidón (Jung & Allen 1995). Van Soest (1994) desarrolló un método para evaluar la calidad nutritiva de las especies forrajeras destinadas a alimentación de rumiantes. El mismo consiste en un procedimiento que determina la matriz insoluble que constituye la pared celular y estima sus componentes. Con este método se caracteriza la fracción fibra con gran precisión, diferenciando los constituyentes aprovechables por los animales poligástricos de los que no lo son.

La técnica implica el fraccionamiento de la pared celular y la obtención de un residuo de fibra libre de ciertas sustancias a través de la actividad combinada de detergentes, neutro primero y ácido luego. Los parámetros obtenidos son: Fibra Detergente Neutro (FDN) y Fibra Detergente Ácido (FDA).

Al tratar la muestra con el detergente neutro, basado en soluciones de sulfato lauril sódico y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al punto de ebullición, se solubiliza el contenido celular compuesto por azúcares, ácidos orgánicos, almidones, proteínas solubles, lípidos y nitrógeno no proteico, y también las pectinas de la pared celular extrayéndose un residuo llamado FDN compuesto por hemicelulosa, celulosa, lignina y sílice (Jung & Allen 1995; McDonald et al. 2002; Van Soest 1994).

Al tratar la muestra con el detergente ácido, ácido sulfúrico 0,5 molar (M) y bromuro de cetiltrimetilamonio, se solubiliza la hemicelulosa y se obtiene un residuo constituido por proteína insoluble (Nitrógeno Insoluble en Detergente Ácido - NIDA), celulosa y lignina (Jung & Allen 1995; McDonald et al. 2002; Van Soest 1994).

La pared celular tiene gran incidencia en la alimentación de rumiantes. Si las paredes celulares vegetales se comportan como una matriz dinámica frente a distintos tipos de estrés, esos cambios en sus componentes podrían afectar su digestibilidad al ser consumidas por rumiantes en pastoreo. Debido a esto, surgió el interés en desarrollar el siguiente trabajo, que se centra en el estudio de las paredes celulares de tallo de *Lotus tenuis* respecto a la composición de sus pectinas y el contenido de fibra detergente neutro.

OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo fue caracterizar la composición química de la pared celular de tallos de *Lotus tenuis* al estado vegetativo respecto a pectinas y a su contenido en fibra detergente neutro en un cultivar resistente a salinidad.

Objetivo 1: Caracterizar la composición química de las pectinas de la pared celular de tallos de un cultivar de *Lotus tenuis* resistente al estrés salino en estado vegetativo, por medio del contenido de azúcares totales y de ácidos urónicos.

Objetivo 2: Determinar la variación en el contenido de azúcares totales y de ácidos urónicos de las pectinas obtenidas de las paredes celulares de tallos de un cultivar de *Lotus tenuis* tolerante al estrés salino cultivado con diferentes niveles de cloruro de sodio (NaCl) en el agua de riego.

Objetivo 3: Caracterizar la composición química de la pared celular de tallos de un cultivar de *Lotus tenuis* resistente al estrés salino en estado vegetativo, por medio del contenido en Fibra Detergente Neutro (FDN).

Objetivo 4: Determinar el contenido de Fibra Detergente Neutro (FDN) en tallos de un cultivar de *Lotus tenuis* tolerante al estrés salino cultivado con diferentes niveles de cloruro de sodio (NaCl) en el agua de riego.

Hipótesis

a) El estrés salino podría inducir cambios o modificaciones a nivel de pared celular del tallo de *Lotus tenuis* en estado vegetativo, que podrían verse reflejados en la composición de las pectinas que forman parte de la misma.

b) Ante estrés salino más acentuado podrían observarse diferencias en la composición química de las pectinas de la pared celular de los tallos de *Lotus tenuis* que podrían evidenciarse por una mayor concentración de ácidos urónicos y un mayor contenido de azúcares totales.

c) El estrés salino podría afectar el contenido de Fibra Detergente Neutro en muestras de tallos de *Lotus tenuis* en estado vegetativo que podrían evidenciarse por un mayor contenido de FDN al sufrir un estrés más severo.

MATERIALES Y MÉTODOS

El material utilizado en este proyecto proviene de semillas de *Lotus tenuis* correspondientes a ensayos del Programa de selección recurrente fenotípica de la estación Experimental INTA Pergamino. Las mismas fueron recolectadas entre los años 2004 y 2006 de poblaciones naturalizadas en campos bajos de la Provincia de Buenos Aires, con un rango de latitud de 33°47' S a 37°39' S y de longitud de 59°02' O a 60°52' O, y caracterizadas posteriormente morfo-fisiológicamente (Franco 2011). Seguido de esto, se seleccionaron genotipos tolerantes y susceptibles a la salinidad, los cuales fueron re-cultivados en condiciones de plantas aisladas. En el mes de febrero de 2008, se realizó la cosecha de semillas de cada planta, siendo éstas cosechadas en la unidad de Mejoramiento de forrajeras de INTA - Pergamino. La estación Experimental INTA Pergamino nos suministró gentilmente las semillas de esta familia de medios hermanos caracterizadas como tolerantes a salinidad (FMH 490) (Franco 2012).

Durante la segunda mitad del año 2012 se llevó adelante el cultivo del genotipo de *Lotus tenuis* obtenido por el INTA, en condiciones de invernáculo en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Católica Argentina (FCA–UCA), de acuerdo al hábito de crecimiento de esta especie. El proceso implicó el escarificado de las semillas, la siembra en cajas de Petri y la utilización de estufas de cultivo para la obtención de plántulas. Éstas luego se trasplantaron en bandejas de germinación sobre un sustrato de tierra mejorada y perlita (ver Anexo). Una vez obtenido un buen desarrollo radicular, las plantas fueron llevadas a macetas definitivas de 20 cm de diámetro, que se encontraban distribuidas en bandejas, en un planteo de cinco macetas por bandeja. Dentro de cada maceta, en un sustrato con las mismas características que el utilizado en las bandejas de germinación, se colocaron 5 plantas. Las plantas fueron divididas en tres grupos. Uno denominado “testigo – control”, sin aplicación de cloruro de sodio en el riego. Un grupo llamado “dosis 1” que fue regado con una solución 75 mM NaCl y un grupo llamado “dosis 2” que fue regado con una solución 150 mM NaCl.

T ratamientos:

- Testigo – Control (sin NaCl): 20 macetas (cinco plantas cada una) en cuatro bandejas.
- Dosis 1 (75 mM NaCl): 45 macetas (cinco plantas cada una) en nueve bandejas.
- Dosis 2 (150 mM NaCl): 45 macetas (cinco plantas cada una) en nueve bandejas.

Las plantas fueron cosechadas al momento de la aparición de la primera flor. Se separó biomasa de tallo y hoja por un lado, y biomasa de corona y raíz por otro. Además, se dividieron tallos y hojas ya que se trabajaron por separado. Para los testigos se utilizaron tres bandejas, siendo la unidad experimental cada bandeja

(3 réplicas). Respecto a dosis 1, utilizando las nueve bandejas se realizó una separación aleatoria (Excel fxaleat) para el armado de tres pooles (3 réplicas), de la misma manera se procedió con las muestras correspondientes a la dosis 2. Los tallos obtenidos fueron secados a 65°C hasta peso constante en estufa a aire forzado, y molidos en molinos tipo Willey a 2 mm.

Sobre los tallos secos y molidos se realizó por una parte, las extracciones secuenciales con solventes y agua caliente del material correspondiente a pared celular para el estudio de las pectinas en el Laboratorio de Química de Biomoléculas, de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires (FAUBA). Esto implicó dos extracciones con etanol, dos extracciones con acetona, una extracción con éter etílico y por último dos extracciones con agua destilada caliente. Sobre este último material obtenido, y armando pooles con las tres réplicas de cada tratamiento, se realizaron dos extracciones con Ácido Ciclohexileno dinitrilotetra Acético (CDTA), a razón de 20 gr. muestra/litro de solución CDTA (0.05M CDTA con Acetato de Sodio 0.05M neutralizada). El material obtenido fue dializado, congelado y liofilizado separadamente, por un lado los extractos (sobrenadantes) de cada extracción, y por otro los residuos.

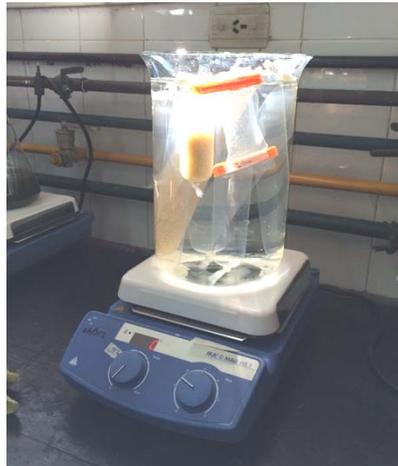


Imagen 1: Preparado de material para diálisis.



Imagen 2: Equipo liofilizador.



Imagen 3: Extractos de CDTA en desecador, listos para ser utilizados en las correspondientes determinaciones.

Sobre los extractos (sobrenadantes), se determinó el contenido de azúcares totales por espectrofotometría UV por el método de fenol - ácido sulfúrico (Ahmed & Labavitch 1978; Dubois et al. 1956).



Imagen 4: Pesada en balanza de precisión de extractos de CDTA (sobrenadantes) para determinación de azúcares totales.

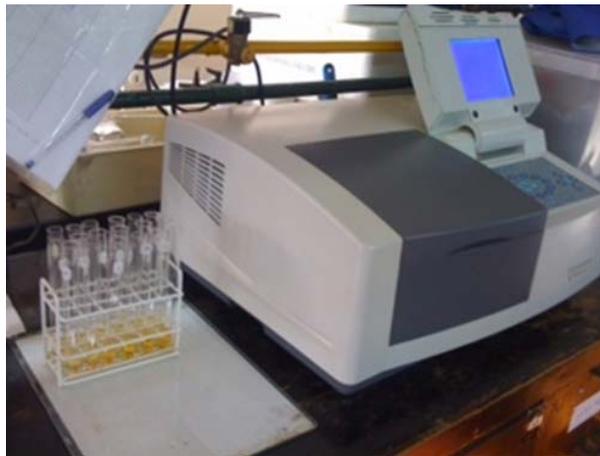


Imagen 5: Determinación de azúcares totales por espectrofotometría UV.

Y también el contenido de ácidos urónicos (Filisetti-Cozzi & Carpita 1991).



Imagen 6: Enfriado con baño de hielo.



Imagen 7: Muestras a baño maría durante el preparado para posterior lectura en espectrofotómetro.



Imagen 8: Confección de curva de comparación.



Imagen 9: Determinación de ácidos urónicos por espectrofotometría UV.

Por otra parte, sobre los tallos secos y molidos sin tratar se realizó la determinación de Fibra Detergente Neutra (FDN) mediante la metodología Ankom 200 (Ankom Filter Bag Technique) en el Laboratorio de Evaluación de Alimentos para uso animal (LEAA), FCA – UCA.

Los resultados para el contenido de Fibra Detergente Neutra (% FDN) fueron analizados mediante análisis de la varianza en un diseño completamente aleatorizado (DCA) de 3 réplicas. El factor fue dosis de concentración salina en la solución del agua de riego con 3 niveles: Testigo – Control (sin NaCl); Dosis 1 (75 mM NaCl); Dosis 2 (150 mM NaCl).

Para hacer los distintos análisis estadísticos se comprobaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad, tanto en forma analítica como gráfica (ver Anexos). Las comparaciones entre tratamientos se efectuaron utilizando la prueba de Tukey siguiendo el siguiente modelo estadístico:

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \epsilon_{ijk}$$

Donde:

- y_{ijk} es la variable estudiada (FDN) de cada bandeja;
- μ es la media general;
- α_i es el efecto del factor dosis de concentración salina en la solución del agua de riego;
- ϵ_{ijk} es el error aleatorio dentro cada bandeja.

Se consideraron significativas aquellas pruebas con $p < 0,05$ (nivel de significación). Todos los análisis estadísticos fueron efectuados utilizando el programa estadístico “Infostat”, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Córdoba.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Azúcares Totales y Ácidos Urónicos

En función de los resultados obtenidos de los análisis por espectrofotometría UV se observó que a medida que aumentaba el contenido de sal en el agua de riego disminuyó el contenido de azúcares totales (%) para las fracciones extraídas con CDTA 1 y 2 (Ver Gráfico 1 y Anexo).

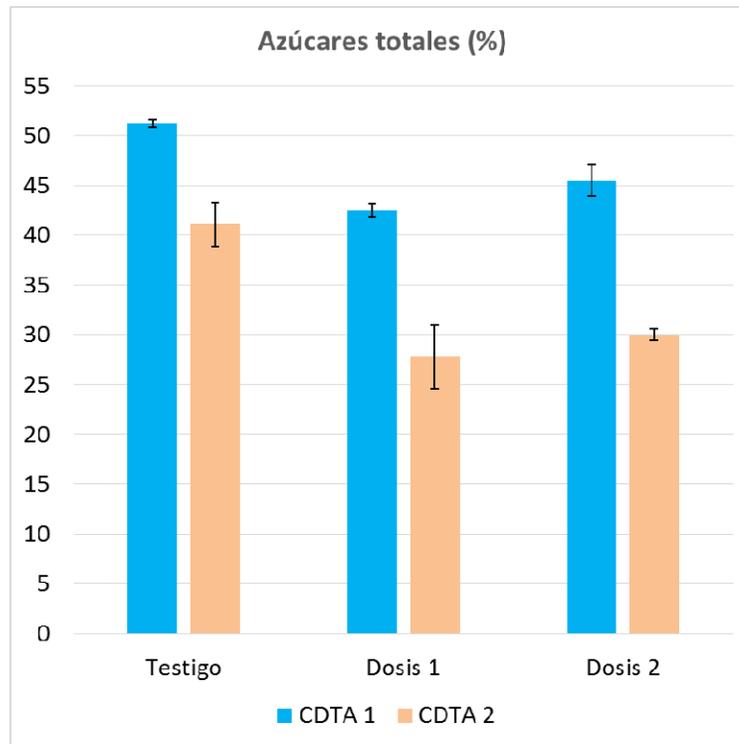


Gráfico 1: Contenido de azúcares totales (%) de tallos de *Lotus tenuis* resistente a salinidad en función de la dosis de sal en el agua de riego.

Por otra parte, se observó que el contenido total de ácidos urónicos (%) disminuyó a medida que se incrementaba la cantidad de sal en el agua de riego para ambas fracciones extraídas con CDTA (1 y 2) (Ver Gráfico 2 y Anexo).

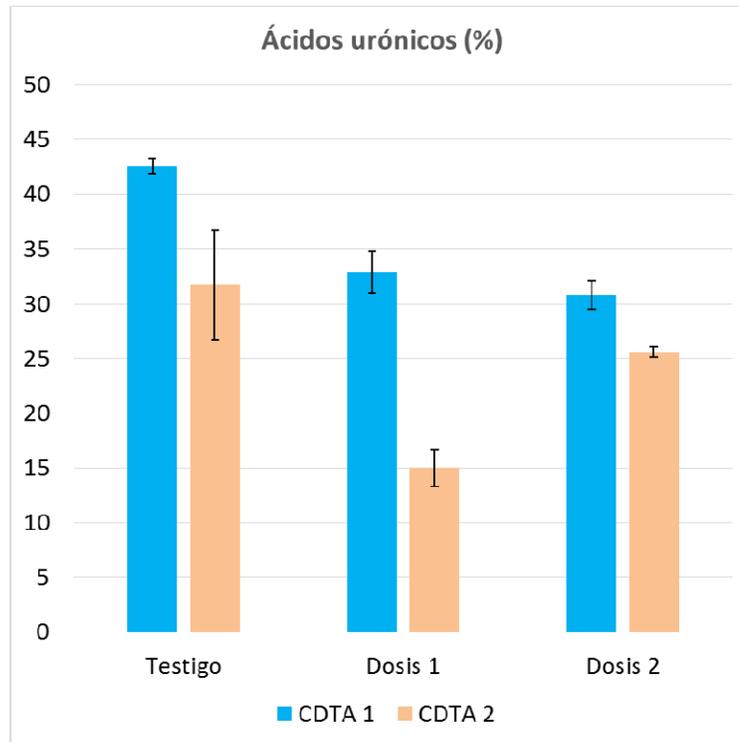


Gráfico 2: Contenido de ácidos urónicos (%) de tallos de *Lotus tenuis* resistente a salinidad en función de la dosis de sal en el agua de riego.

Las paredes celulares primarias de las plantas se componen principalmente de pectinas, hemicelulosa y celulosa (Reiter 2002). La pectina abarca una gama de polisacáridos ricos en ácido galacturónico (Willats et al. 2001). Por lo tanto, el contenido de ácidos urónicos y azúcares totales en la fracción de pectina puede indicar la composición funcional de la misma.

En base a los resultados obtenidos se observó que el estrés salino indujo cambios o modificaciones a nivel de la pared celular en tallos de *Lotus tenuis* caracterizado como resistente a la salinidad en estado vegetativo. Estos se vieron reflejados en la composición de las pectinas que forman parte de la misma. Ante distintos niveles de cloruro de sodio (NaCl) en el agua de riego la composición varió, en concordancia con la hipótesis “A”.

Barbosa de Lima et al. (2014) realizaron un estudio en hojas de plantas de *Coffea arabica* “café” sometidas a estrés salino e indicaron también haber observado alteración en la composición de las pectinas de la pared celular.

El contenido total de azúcares y de ácidos urónicos de las pectinas de la pared celular de los segmentos 0-5 mm (de punta de la raíz) y 5-10 mm de la raíz de plantas de “soja” *Glycine max*, susceptibles a salinidad, también presentaron variaciones en función de la concentración de sal en la solución del agua de riego (An et al. 2014).

Por otra parte, los resultados indicaron que el contenido de azúcares totales disminuyó a medida que aumentó la concentración de sales en agua de riego, así como también sucedió con el contenido de ácidos urónicos. La disminución de ambos parámetros indicó un menor contenido de pectinas solubles en CDTA de la

pared celular de tallos de *Lotus tenuis* ante estrés salino, en contraposición a la hipótesis “B” planteada en este trabajo.

Barbosa de Lima et al. (2014) por el contrario, en su estudio de hojas de plantas de *Coffea arabica* “café”, se observó que la cantidad de ácidos urónicos aumentó en plantas sometidas a estrés salino, indicando un aumento en el contenido de pectinas de la pared celular. Por otra parte, determinaron que el estrés en general, no alteró significativamente la cantidad de azúcares observados a diferencia de los resultados de este ensayo donde se observó una disminución del contenido de azúcares totales.

Carillo et al. (2011) propusieron que la presencia de polisacáridos sulfatados podría aumentar el potencial de Donnan en la célula debido a la gran carga negativa asociada con estos polímeros. Esto aumentaría la densidad de iones en la vecindad de la pared celular de la planta, facilitando de esta manera el transporte de iones a altas concentraciones de sal. Según estos autores, un mecanismo similar puede explicar la función de las pectinas en las paredes celulares de las plantas expuestas a condiciones de alta salinidad. Por otro lado, también es posible que el aumento de los polisacáridos cargados negativamente contribuya a reducir la velocidad del movimiento de Na^+ hacia las células. En otras palabras, ante estrés salino las pectinas juegan un papel fundamental en mecanismos de defensa por lo que su concentración tendería a aumentar (Carillo et al. 2011).

En otro estudio, An et al (2014) trabajaron con dos genotipos de plantas de *Glycine max* expuestas a estrés salino, uno sensible y uno tolerante, en concentraciones de hasta 80 mM de sal en solución de agua de riego. Evaluaron el contenido total de azúcares y de ácidos urónicos de las pectinas de la pared celular de los segmentos 0-5 mm (de punta de la raíz) y 5-10 mm de la raíz, obteniendo disminuciones considerables para ambos parámetros a medida que aumentaba la salinidad. El genotipo tolerante se mostró más estable obteniéndose solamente una ligera disminución. Las conclusiones del estudio indicaron que las pectinas regulan el crecimiento celular, ya que disminuyeron considerablemente en cantidad en las zonas de elongación celular de aquellas plantas susceptibles, que redujeron y detuvieron su crecimiento de raíces ante estrés salino. Lo contrario ocurrió en plantas tolerantes donde los contenidos de azúcares totales y ácidos urónicos se mantuvieron relativamente estables en comparación al tratamiento testigo, es decir que se mantuvo el nivel de pectinas, y las raíces continuaron con su crecimiento. Esto puede deberse a que las pectinas, polisacáridos que presentan uniones con radicales carboxilo libres, tienen un potencial considerable para la interacción con iones y compuestos de bajo peso molecular (Willats et al. 2001). Los radicales carboxilo de las pectinas de la pared celular podrían evitar que ingrese Na^+ (principal ion tóxico para las plantas bajo la salinidad) en el citoplasma celular, manteniendo así un metabolismo y crecimiento normales (Popper & Fry 2003; Proseus & Boyer 2006b; Proseus & Boyer 2006a).

Palin y Geitmann (2012) afirmaron también que las pectinas de la pared celular son uno de los componentes implicados en el proceso de expansión celular. Al modificarse la composición de las mismas se alteran sus propiedades y funciones. Por otra parte, se ha sugerido que los cambios en la composición de la pared celular ante estrés salino, en particular la de los polisacáridos pectínicos,

pueden deberse a una deficiencia de Ca^{2+} inducida por la salinidad (Bernstein & Kafkafi 1996).

Fibra Detergente Neutro

En función de los resultados obtenidos de los análisis químicos realizados, se observó que existen diferencias significativas entre los tratamientos respecto al contenido de Fibra Neutro Detergente (%FDN) ($p=0,0002$). A mayor dosis de sal en el agua de riego el contenido de FDN de tallos de *Lotus tenuis* caracterizado como resistente a salinidad al estado vegetativo disminuyó (Ver Gráfico 3). Este resultado contradice a la hipótesis “C” planteada inicialmente que propone un aumento en el parámetro en cuestión.

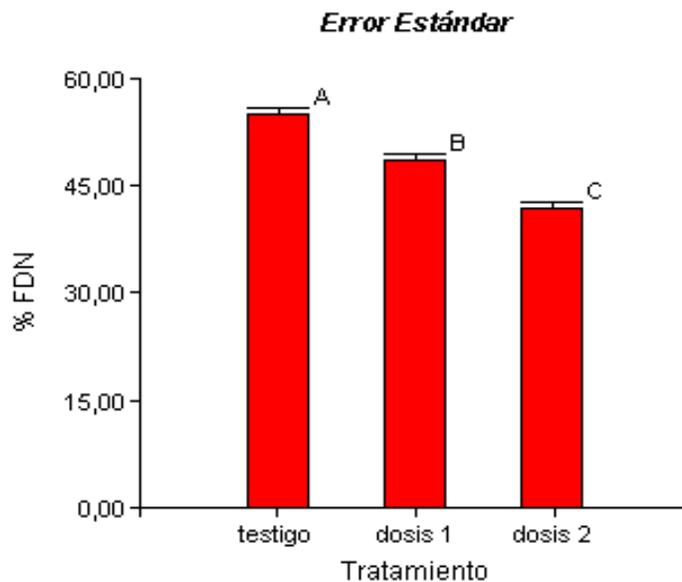


Gráfico 3: Contenido de Fibra Neutro Detergente (%FDN) en función del tratamiento de dosis de concentración salina en la solución del agua de riego. Letras iguales no presentan diferencias significativas entre sí ($p > 0,05$).

Un aumento de la fracción insoluble lignocelulósica de la pared celular en hojas de “café” *Coffea arabica* fue observado ante estrés salino (Barbosa de Lima et al. 2014), debido a asociaciones más fuertes entre los polímeros, en genotipos tolerantes a salinidad. El estrés indujo cambios en la organización de los polímeros. El contenido de hemicelulosa de la pared celular de plantas susceptibles disminuyó o en ciertos casos (menor estrés) se mantuvo. Lo contrario ocurrió en plantas tolerantes a la salinidad donde continuó estable o aumentó ante el estrés. A su vez la determinación del contenido de celulosa indicó estabilidad o disminución para el genotipo susceptible y aumento en el tolerante. Esto sugiere que, ante estrés salino, aquellas plantas con capacidad de tolerar el mismo tienden a incrementar sus contenidos de hemicelulosa, celulosa y lignina por lo que debería observarse un valor de FDN superior respecto de plantas que no son expuestas al estrés.

El contenido total de azúcar en la pared celular puede reflejar la cantidad de pared celular. En plantas sensibles, el tratamiento con sal disminuyó el contenido total de azúcares de la pared celular de manera significativa pero no se encontró ningún cambio en el genotipo tolerante (An et al. 2014).

Cosgrove (2005) determinó la cantidad de hemicelulosa en la pared celular a partir del contenido total de azúcares en esta fracción. Informó que la hemicelulosa puede unirse a la celulosa mediante enlaces hidrógeno y también a las pectinas por unión covalente. La composición y la estructura de la hemicelulosa se relacionan con los mecanismos de extensión de la pared y la elongación celular. En consecuencia, la hemicelulosa cumple un rol esencial en el crecimiento de la célula y el mantenimiento de la pared celular. Se cree también que genera moléculas de señal que controlan la expansión mencionada, regulada por auxina de crecimiento (Zabackis et al. 1996). Por lo tanto, una disminución en el contenido de hemicelulosa origina inestabilidad en la pared celular y la pérdida de moléculas de señal, inhibiéndose el crecimiento celular. Por ende, ante estrés salino, el crecimiento disminuye en plantas susceptibles debido a que se reduce el contenido de hemicelulosa de la pared celular.

Al crecer, el tamaño de las células de la planta es determinado por sus paredes que se extienden típicamente 10 ~ 100 veces (Roberts 1994). Las células vegetales deben depositar nuevos sustratos de pared que se integran perfectamente en la vieja pared para evitar que se vuelva más delgada y débil (Cosgrove 2005; Proseus & Boyer 2006b; Proseus & Boyer 2006a). An et al. 2014 indicaron una reducción de los componentes de la pared celular, principalmente hemicelulosa y celulosa, por efecto del estrés salino en plantas sensibles, y afirmaron que podría estar asociado con los efectos inhibidores de la salinidad sobre el crecimiento de la raíz. Además, el mantenimiento de estos componentes podría contribuir al crecimiento de la misma bajo estrés en plantas tolerantes y a que se sostienen cantidades integrales de matriz evitando el adelgazamiento de la pared celular.

En relación con los resultados de este ensayo, las afirmaciones mencionadas sugieren que el material evaluado de tallos de *Lotus tenuis*, que sufrió modificaciones negativas en los componentes de la pared celular a causa del estrés salino, es decir que ante tratamientos con mayores niveles de cloruro de sodio (NaCl) en agua de riego mostraron disminuciones significativas en el contenido de Fibra Neutra Detergente (%FND), parámetro que contempla el contenido de hemicelulosa, celulosa y lignina de la pared celular, actuó como un genotipo sensible a la salinidad y no respondió como se esperaba inicialmente.

CONCLUSIONES

De acuerdo a las determinaciones químicas realizadas se observó que las plantas generaron una respuesta ante el estrés salino evidenciada en la modificación de la composición de sus pectinas exteóidas con CDTA. La disminución observada en los valores de ácidos urónicos y azúcar es totales encontrados entre los testigos y las dosis 1 y 2 mencionados, muestran una reducción en el contenido de pectinas solubles en CDTA de la pared celular. Por otra parte, el análisis químico de Fibra Detergente Neutro indicó una disminución en el % FDN en las plantas estudiadas. Esta disminución en el contenido de FDN podría deberse a una disminución en el contenido de hemicelulosa, celulosa y/o lignina o a un incremento en las fracciones solubles que corresponden al contenido celular o a pectinas.

Debería profundizarse en el estudio de la composición de estas paredes celulares ya que un menor contenido de FDN mejoraría el consumo voluntario, pero un contenido de ácidos urónicos inferior evidenciaría una menor presencia de pectinas; y un menor contenido de azúcares totales podría relacionarse con un aumento en componentes de la pared de menor digestibilidad potencial para vacunos en pastoreo. Sería interesante realizar otras determinaciones químicas como el % de Fibra Detergente Ácido y de lignina para saber si varía el contenido de hemicelulosa, celulosa y/o lignina. Por otra parte, una profundización en las extracciones realizadas sobre la pared utilizando carbonato de sodio, permitiría extraer las pectinas unidas por enlaces covalentes (no iónicos) que podrían explicar esta variación si esta fracción fuera significativa.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, E.L.R. & Labavitch, J.M., 1978. A simplified method for accurate determination of cell wall uronide content. *Journal of Food Biochemistry*, 1, pp.361–365.
- Albersheim, P. et al., 2011. Biochemistry of cell wall molecules. In *Plant Cell Walls. From Chemistry to Biology*. New York, USA: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, pp. 67–118.
- Aman, P., 1993. Composition and structure of cell wall polysaccharides in forages. *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*, pp.183–199.
- An, P. et al., 2014. Effects of NaCl on Root Growth and Cell Wall Composition of Two Soya bean Cultivars with Contrasting Salt Tolerance. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 200(3), pp.212–218.
- Andrés, A. & Rosso, B., 2007. Characterization of Lotus glaber germplasm from Buenos Aires Province – Argentina. *Lotus Newsletter*, 37(1), p.24.
- Arbona, V. et al., 2013. Metabolomics as a tool to investigate abiotic stress tolerance in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), pp.4885–4911.
- Barbosa de Lima, R. et al., 2014. Salt stress alters the cell wall polysaccharides and anatomy of coffee (*Coffea arabica* L.) leaf cells. *Carbohydrate polymers*, 112, pp.686–694.
- Barceló Coll, J. et al., 1988. *Fisiología Vegetal* 5° ed., Madrid: EDICIONES PIRAMIDE, S.A.
- Barry, T.N. & McNabb, W.C., 1999. The implications of condensed tannins on the nutritive value of temperate forages fed to ruminants. *British Journal of Nutrition*, 81(1999), pp.263–272.
- Batista, W.B. et al., 2005. Asociación entre comunidades vegetales y suelos de pastizal de la Pampa Deprimida. *Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires*, pp.113–129. Available at: <http://por.agro.uba.ar/users/batista/science/pdf/batistaetal05.pdf>.
- Bernstein, N. & Kafkafi, U., 1996. Root growth under salinity stress. In Y. Waisel, A. Eshel, & U. Kafkafi, eds. *Plant roots: The hidden half*. New York: Marcel Dekker Inc., pp. 1194–1221.
- Burkart, S., León, R.J.C. & Movia, C., 1990. Inventario fitosociológico del pastizal de la Depresión del Salado (Prov. Bs. As.) en un área representativa de sus principales ambientes. *Darwiniana*, 30(1-4), pp.27–69.
- Buxton, D.R., 1996. Quality-related characteristics of forages as influenced by plant environment and agronomic factors. *Animal Feed Science and Technology*, 59(1-3), pp.37–49. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0377840195008853> [Accessed May 26, 2016].
- Buxton, D.R. & Casler, M.D., 1993. Environmental and Genetic Effects on Cell Wall Composition and Digestibility. In H. G. Jung et al., eds. *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. Madison, WI, USA: ASA, CSSA, SSSA, pp. 685–714.
- Cambareri, G. et al., 2007. Crecimiento, dinámica reproductiva, y rendimiento de semilla cosechable de *Lotus tenuis* en respuesta a tres densidades de plantas. Resultados preliminares. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*.

- Available at: http://produccion-animal.com.ar/produccion_y_manejo_pasturas/pasturas_artificiales/99-Cambareri_Lotus.pdf.
- Carillo, P. et al., 2011. Salinity Stress and Salt Tolerance. In A. K. Shanker & B. Venkateswarlu, eds. *Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations*. Rijeka, Croacia: InTech, pp. 21–38. Available at: www.intechopen.com.
- Casal, A., Coria, D. & Pettinari, J., 2009. El pastizal natural. Calidad nutricional del pasto. *INTA*. Available at: http://inta.gob.ar/documentos/el-pastizal-natural.-calidad-nutricional-del-pasto/at_multi_download/file/INTA - Calidad nutricional del pasto.pdf.
- Castaño, J., 2001. Pasturas y mezclas más adecuadas para la Cuenca del Salado. Available at: http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_y_manejo_pasturas/pasturas_artificiales/43-pasturas_cuenca_del_salado.pdf.
- Cosgrove, D.J., 1997. Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 13, pp.171–201.
- Cosgrove, D.J., 2005. Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6, pp.850–861.
- Criado, C.A., 2014. LOTUS “ PAMPA ” INTA Una herramienta de trabajo para los suelos bajos inundables. *EEA INTA Cuenca del Salado*. Available at: http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_-_lotus_pampa.pdf.
- Dangl, J.L. & Jones, J.D.G., 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 411(6839), pp.826–833.
- Díaz, P., Borsani, O. & Monza, J., 2005. Lotus japonicus related species and their agronomic importance. *ResearchGate*. Available at: https://www.researchgate.net/publication/226307745_Lotus-related_species_and_their_agronomic_importance.
- Dubois, M. et al., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, pp.350–356.
- Escaray, F.J. et al., 2012. Ecological and agronomic importance of the plant genus Lotus. Its application in grassland sustainability and the amelioration of constrained and contaminated soils. *Plant Science*, 182, pp.121–133. Available at: <http://www.iib.unsam.edu.ar/php/papiros/pdf/Escaray2012-ReviewLotus.pdf>.
- Escaray, F.J., 2012. *Taninos condensados en leguminosas del género Lotus : Estudio de sus funciones biológicas y evaluación de su utilidad en el mejoramiento de la calidad forrajera de especies de importancia agronómica*. Universidad de Buenos Aires. Available at: <http://ri.agro.uba.ar/files/download/tesis/doctorado/2012escarayfrancisco.pdf>.
- Escaray, F.J. et al., 2007. Taninos condensados y antocianinas en el género Lotus: su relación con el estrés salino en especies forrajeras para zonas marginales. *Innovación y tecnología Agroalimentaria*, 2, pp.113–123.
- Filisetti-Cozzi, T.M.C.C. & Carpita, N.C., 1991. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry*, 197, pp.157–162.
- Franco, M.E., 2011. *Estudio de la variabilidad genética en familias de medios hermanos de Lotus tenuis sometido a estrés salino*. Universidad Nacional de Rosario - INTA Pergamino.

- Franco, M.E., 2012. *Estudio de la variabilidad genética en familias de medios hermanos de Lotus tenuis sometido a estrés salino*. Universidad Nacional de Rosario - INTA Pergamino.
- Harholt, J., Suttangkakul, A. & Vibe Scheller, H., 2010. Biosynthesis of Pectin. *Plant Physiology*, 153(2), pp.384–395. Available at: <http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.110.156588>.
- Heylar, K.R., 1994. Edaphic constraints to perennial grasses: change the plant to suit the soil or vice versa? *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 37(May), pp.391–397.
- Jones, J.D.G. & Dangl, J.L., 2006. The plant immune system. *Nature*, 444(7117), pp.323–9.
- Jung, H.-J.G. & Allen, M.S., 1995. Characteristics of Plant Cell Walls Affecting Intake and Digestibility of Forages by Ruminants. *Journal of Animal Science*, 73, pp.2774–2790.
- Jung, H.-J.G. & Deetz, D.A., 1993. Cell Wall Lignification and Degradability. In *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. Madison, WI 53711, USA: ASA-CSSA-SSSA, p. 667S.
- Lavado, R.S., 2012. Salinidad y alcalinidad: propiedades, efectos sobre los cultivos y manejo. In R. Alvarez et al., eds. *Fertilidad de suelos: caracterización y manejo en la Región Pampeana*. Buenos Aires: Editorial Facultad de Agronomía, pp. 35–40.
- Manchanda, G. & Garg Neera, 2008. Salinity and its effects on the functional biology of legumes. *Acta Physiol Plant*, 30, pp.595–618.
- McDonald, P. et al., 2002. *Animal Nutrition* 6th ed. P. McDonald et al., eds., Zaragoza (España): Editorial Acribia SA.
- McNeil, M. et al., 1984. Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annual Reviews Biochemistry*, 53, pp.625–663.
- Mertens, D.R., 2003. Challenges in measuring insoluble dietary fiber. *Journal of Animal Science*, 81, pp.3233–3249.
- Mertens, D.R., 1994. Regulation of Forage Intake. In USDA-Agricultural Research Service, ed. *Forage quality, evaluation, and utilization*. Madison, WI 53706: US Dairy Forage Research Center, p. 450.
- Miñón, D.P. et al., 1990. Lotus tenuis: Leguminosa Forrajera para la Pampa Deprimida. *Boletín técnico EEA INTA Balcarce*, 98, p.15.
- Munns, R., 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell & Environment*, 25(2), pp.239–250. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11841667>.
- Munns, R., 1993. Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. *Plant, Cell & Environment*, 16(1), pp.15–24. Available at: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3040.1993.tb00840.x>.
- Munns, R. & Tester, M., 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59, pp.651–81.
- Palin, R. & Geitmann, A., 2012. The role of pectin in plant morphogenesis. *BioSystems*, 109(3), pp.397–402.
- Parida, A.K. & Das, A.B., 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60, pp.324–349.
- Parra Boronat, L., 2012. *Universidad politecnica de valencia*. Universidad Politécnica de Valencia.

- Paz, R.C. et al., 2012. Comparative Study of Alkaline, Saline, and Mixed Saline-Alkaline Stresses with Regard to Their Effects on Growth, Nutrient Accumulation, and Root Morphology of *Lotus tenuis*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 31, pp.448–459.
- Pérez García, F., 1994. El agua y las plantas. In S. A. Mundi-Prensa Libros, ed. *Introducción a la Fisiología Vegetal*. pp. 29–31.
- Plett, D.C. & Moller, I.S., 2010. Na⁺ transport in glycophytic plants: what we know and would like to know. *Plant, Cell and Environment*, 33, pp.612–626. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3040.2009.02086.x/epdf>.
- Popper, Z.A. & Fry, S.C., 2003. Primary cell wall composition of bryophytes and charophytes. *Annals of Botany*, 91(1), pp.1–12.
- Proseus, T.E. & Boyer, J.S., 2006a. Identifying cytoplasmic input to the cell wall of growing *Chara corallina*. *Journal of Experimental Botany*, 57(12), pp.3231–3242.
- Proseus, T.E. & Boyer, J.S., 2006b. Periplasm turgor pressure controls wall deposition and assembly in growing *Chara corallina* cells. *Annals of Botany*, 98(1), pp.93–105.
- Proseus, T.E. & Boyer, J.S., 2007. Tension required for pectate chemistry to control growth in *Chara corallina*. *Journal of Experimental Botany*, 58(15-16), pp.4283–4292.
- Ramirez Orduña, R., Ramirez Lozano, R.G. & Lopez Gutierrez, F., 2002. Factores estructurales de la pared celular del forraje que afectan su digestibilidad. *Ciencia UANL*, V(2), pp.180–189.
- Reiter, W.D., 2002. Biosynthesis and properties of the plant cell wall. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(6), pp.536–542.
- Rengasamy, P., 2010. Soil processes affecting crop production in salt-affected soils. *Functional Plant Biology*, 37, pp.613–620.
- Richards, L.A. et al., 1954. *Diagnosis and Improvement of Saline and Alkali Soils* L. A. Richards, ed.,
- Roberts, K., 1994. The plant extracellular matrix: in a new expansive mood. *Current Opinion in Cell Biology*, 6(5), pp.688–694.
- Van Soest, P.J., 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant* 2nd ed. C. University, ed., Ithaca, New York 14850: Cornell University Press.
- Somerville, C. et al., 2004. Toward a Systems Approach to Understanding Plant Cell Walls. *Science*, 306(5705), pp.2206–2211. Available at: <http://www.sciencemag.org/cgi/content/abstract/306/5705/2206> \n <http://ezaccess.libraries.psu.edu/login?url=http://search.proquest.com/docview/288999562?accountid=13158>.
- Stoffella, S., Posse, G. & Collantes, M., 1998. Variabilidad fenotípica y genotípica de poblaciones de *Lotus tenuis* que habitan suelos con distinto pH. *Ecología Austral*, 8(1), pp.57–63.
- Taiz, L. et al., 2002. *Plant Physiology* 3^o ed., Sunderland: Sinauer Associates, Inc.
- Teakle, N.L., Real, D. & Colmer, T.D., 2006. Growth and ion relations in response to combined salinity and waterlogging in the perennial forage legumes *Lotus corniculatus* and *Lotus tenuis*. *Plant and Soil*, 289(1-2), pp.369–383.
- Teakle, N.L. & Tyerman, S.D., 2010. Mechanisms of Cl⁻ transport contributing to

- salt tolerance. *Plant, Cell and Environment*, 33(4), pp.566–589. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3040.2009.02060.x/epdf>.
- Vignolio, O.R., Cambareri, G.S. & Maceira, N.O., 2010. Lotus tenuis (Fabaceae). Productividad y manejo agronómico. *Revista Argentina de Produccion Animal*, 30(1), pp.97–116.
- Vignolio, O.R. & Fernandez, O.N., 2006. Bioecología de Lotus glaber Mill. (Fabaceae) en la Pampa Deprimida (provincia de Buenos Aires, Argentina). *Revista Argentina de Produccion Animal*, 26(2), pp.113–130. Available at: <http://ppct.caicyt.gov.ar/index.php/rapa/article/view/4244/3913>.
- Willats, W.G.T. et al., 2001. Modulation of the degree and pattern of Methyl-esterification of Pectic Homogalacturonan in Plant Cell Walls. *Journal of Biological Chemistry*, 276(22), pp.19404–19413.
- Zablackis, E. et al., 1996. Substitution of L-Fucose by L-Galactose in Cell Walls of Arabidopsis mur1. *Science*, 272.

ANEXOS

Resultados determinación de azúcares totales y ácidos urónicos

Tallos de <i>Lotus tenuis</i> tolerante a salinidad	% Azúcares totales	% Ácidos Urónicos
CDTA S1-TT	51,2 ± 0,37	42,6 ± 0,69
CDTA S1-D1	42,5 ± 0,68	32,9 ± 1,92
CDTA S1-D2	45,5 ± 1,59	30,8 ± 1,32
CDTA S2-TT	41,1 ± 2,19	31,7 ± 4,98
CDTA S2-D1	27,8 ± 3,18	15,0 ± 1,68
CDTA S2-D2	30,0 ± 0,57	25,6 ± 0,47

Tabla 1: Contenido de azúcares totales (%) y de ácidos urónicos (%) de tallos de *Lotus tenuis* resistente a salinidad.

Análisis Estadístico Fibra Detergente Neutro

Medidas resumen

Tratamiento	Variable	n	Media	D.E.	CV	Mín	Máx
dosis 1	% FDN	3	48,51	0,83	1,72	47,77	49,41
dosis 2	% FDN	3	41,95	1,76	4,19	40,66	43,95
testigo	% FDN	3	55,03	1,89	3,43	53,13	56,90

Tabla 2: Medidas resumen

Gráfico de caja (Box plot)

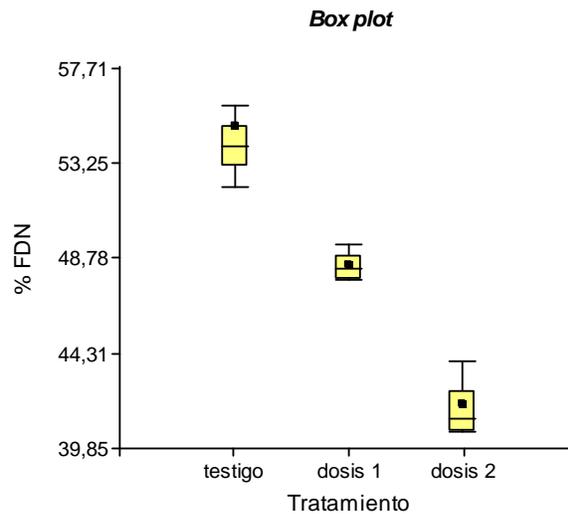


Gráfico 4: Box plot

Supuestos

A) Normalidad

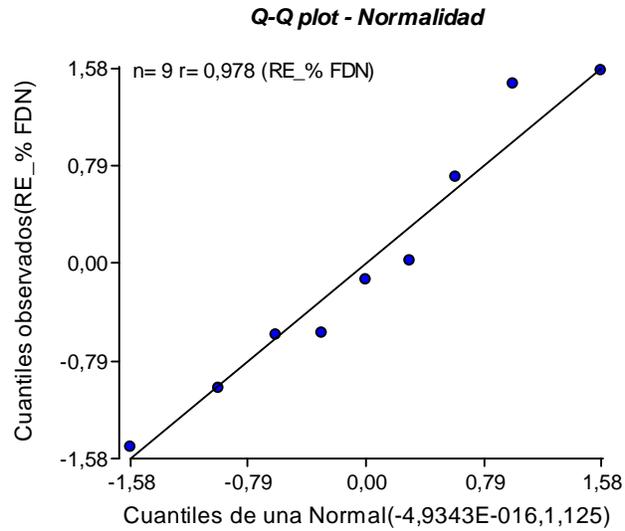


Gráfico 5: Análisis de la Normalidad (Q-Q plot).

Shapiro-Wilks

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RE_% FDN	9	0,00	1,06	0,92	0,4931

Tabla 3: Estudio analítico de la Normalidad (test de Shapiro-Wilks).

B) Homocedasticidad

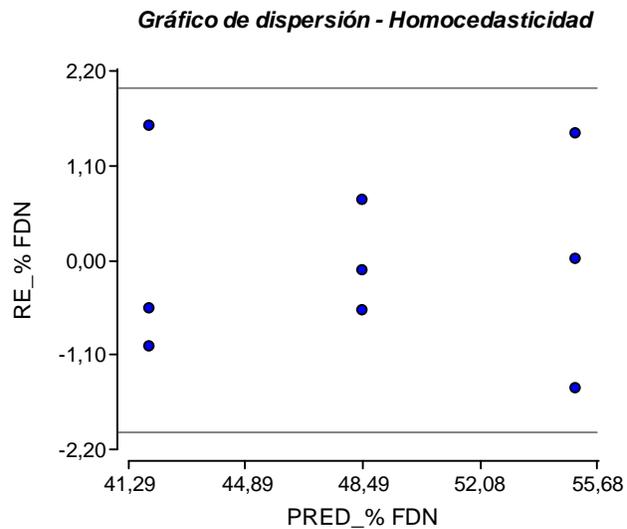


Gráfico 6: Análisis de la Homocedasticidad (gráfico de Dispersión).

*Prueba de Levene***Análisis de la varianza**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS_% FDN	9	0,22	0,00	70,94

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,98	2	0,49	0,86	0,4710
Tratamiento	0,98	2	0,49	0,86	0,4710
Error	3,44	6	0,57		
Total	4,42	8			

Tabla 4: Estudio analítico de la Homocedasticidad (Prueba de Levene).**ANOVA****Análisis de la varianza**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
% FDN	9	0,95	0,93	3,23

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	256,63	2	128,32	52,46	0,0002
Tratamiento	256,63	2	128,32	52,46	0,0002
Error	14,68	6	2,45		
Total	271,31	8			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=3,91814*Error: 2,4460 gl: 6*

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
testigo	55,03	3	0,90	A
dosis 1	48,51	3	0,90	B
dosis 2	41,95	3	0,90	C

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)}**Tabla 5:* Estudio analítico de la varianza entre tratamientos (test de Tukey).**Preparación de sustrato**

La mezcla de tierra se preparó con 2 macetas llenas de perlita (2,56 litros cada maceta) y una bolsa de 25dm³ del compost orgánico (Bertinat, Bella Vista, Buenos Aires, Argentina). El compost presenta las siguientes características:

- Materia Orgánica: 20-25%
- Ph: 5-5,5
- Relación C/N: 19,8
- Cenizas: 20-25%
- Humedad: 45-50%