

Caracterización de poblaciones de alfalfa por tolerancia a sequía

Silvia Olivo, Valeria Arolfo y Ariel Odorizzi

INTA Manfredi

Introducción

El déficit hídrico (DH) es el estrés abiótico que afecta en mayor medida a la producción vegetal. Este factor se torna de vital importancia frente al cambio climático global que sugiere que el riesgo de sequía crecerá en el futuro (IPCC, 2007). La alfalfa (*Medicago sativa* L.) es la principal especie forrajera del país con una superficie de siembra de alrededor de 3,4 millones de ha, de las cuales el 80% se cultiva bajo condición de secano y el 20% restante, con riego (Odorizzi, 2021). Esta especie ofrece un alto grado de flexibilidad durante DH debido a su capacidad para sobrevivir con éxito a los períodos en los que se manifiesta (Orloff et al., 2015). En los últimos años, como consecuencia de la expansión agrícola, este cultivo ha sido desplazado hacia ambientes de menor potencial productivo o con mayores restricciones climáticas. Por lo tanto, el desarrollo de cultivares más adaptados y con mayor tolerancia al DH puede contribuir a incrementar los rendimientos y sustentabilidad de los sistemas agrícola-ganaderos de la Argentina.

En función de la búsqueda bibliográfica realizada, el mejoramiento genético de la tolerancia al DH en alfalfa ha sido poco estudiado (Annicchiarico, 2007, Erice et al., 2011, 2010). La respuesta más común de las plantas a un déficit hídrico creciente es una reducción en el crecimiento, siendo más afectada la parte aérea que la raíz, lo que conduce a un incremento de la biomasa de raíz en relación a la biomasa aérea (Blum, 1996). Existen numerosos caracteres morfo-fisiológicos tales como reducción de biomasa y área foliar, profundización de raíces, floración temprana, entre otros, que las plantas utilizan para hacer frente al DH (Tuberosa, 2011). Estos estudios son particularmente interesantes en el caso de las leguminosas perennes como la alfalfa, que almacena reservas de carbono y nitrógeno en las raíces para garantizar la persistencia y los rebrotes después de cada defoliación o corte (Avice et al., 2003, Erice et al., 2010). La eficiencia del uso del agua (EUA) es, a nivel de planta, la cantidad de materia seca producida por unidad de agua perdida a través de la evapotranspiración. Este carácter puede resultar clave en la determinación de la productividad de la planta bajo un suministro hídrico limitado. En otras especies, se ha sugerido a la EUA como un carácter de selección para identificar genotipos con tolerancia a DH (Condon et al., 2002, Prieto 2011). Ante el DH, las plantas regulan la pérdida de agua por transpiración cerrando sus estomas, esto conlleva a un aumento de la temperatura foliar.

En Argentina, los estudios sobre variabilidad genotípica de la respuesta de la alfalfa a DH son aún escasos. Por lo tanto, el **objetivo** de este experimento fue caracterizar morfo-fisiológicamente una población obtenida en la EEA Manfredi del INTA (Lat: 31°49'12" S; Long: 63°46'00" O) mediante el policruzamiento de 122 medios hermanos seleccionados luego de 3 años bajo

condiciones de estrés hídrico en el Campo Experimental La María, perteneciente a la EEA Santiago del Estero (Lat. 28°01'00" S // Lon. 64°13'00" O).

Materiales y Métodos

Lugar y sitio Experimental

El experimento se realizó en las instalaciones de la EEA Manfredi desde junio del 2019 hasta octubre del 2020. En junio del 2019 la población a evaluar fue sembrada en invernáculo y en noviembre del 2019 se realizó el trasplante bajo shelter (Figura 1).



Figura 1. Siembra en invernáculo y posterior trasplante en shelters.

Manejo agronómico

Previo al trasplante de las plántulas de alfalfa, con el objetivo de mantener la zona libre de malezas y otorgar uniformidad al perfil de agua en el suelo, en la superficie de los shelters se sembró un cereal de invierno (Triticale) que se cosechó en octubre del 2019 (Figura 2).



Figura 2. Cosecha de triticale

En noviembre de 2019, en cada uno de los tratamientos se trasplantaron 40 plantas separadas en cuadrículas de 20*20 cm. Se utilizaron: la población experimental (LE) seleccionada por tolerancia a la sequía, proveniente del cruzamiento de las plantas seleccionadas en Santiago del Estero, y la variedad Traful PV INTA como testigo. El ensayo se mantuvo regado, libre de plagas y malezas (Figura 3).



Figura 3. Transplante de los cultivares

Los cortes se realizaron en función al tiempo térmico de 450 Grados Días Acumulados (GDA) considerando una temperatura base de crecimiento (T_b) de 5 °C.

Diseño Experimental y tratamientos

El diseño Experimental utilizado fue en bloques completos aleatorizados en arreglo de parcelas divididas con dos repeticiones. A las parcelas principales se le asignaron dos niveles de riego y a las sub-parcelas dos cultivares de alfalfa (Figura 4). El tamaño de las parcelas principales fue de 18 m² y el de las sub-parcelas de 9 m².

- Parcela principal: Riego 60% cc (R) y Secano 30% cc (S)
- Parcela secundaria: Un control (C): Cultivar Traful PV INTA GRI 9 y Población experimental: (LE)

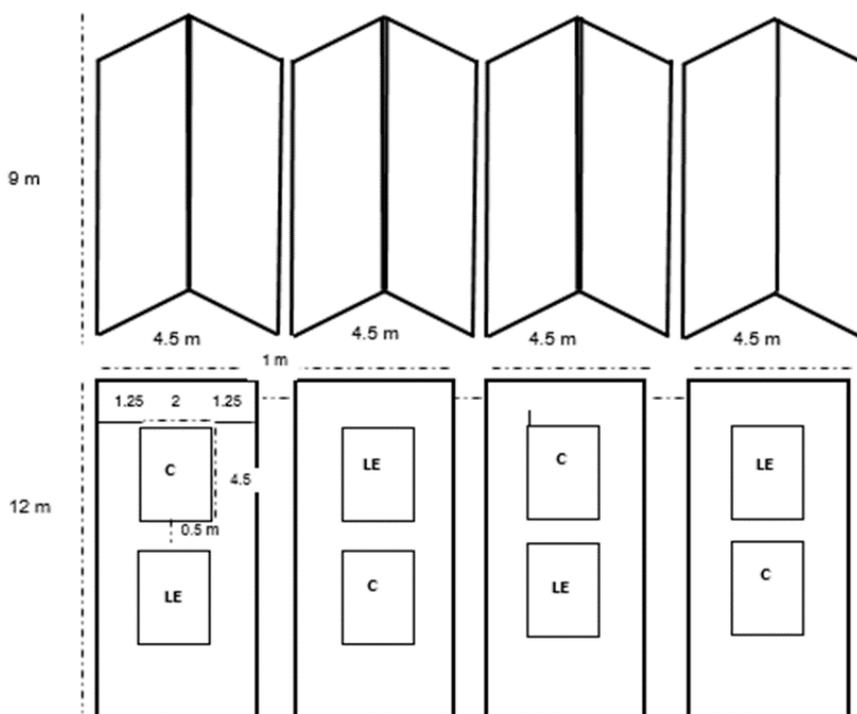


Figura 4. Esquema del diseño experimental

Caracterización del sitio experimental

El suelo sobre el que se realizó el experimento es un Haplustol éntico, serie Oncativo, clasificado por su capacidad de uso como IIIc. (INTA, 1987). En lo que respecta a las temperaturas, la media anual es de 16,8 °C, siendo la temperatura media mínima de 9,5 °C para el mes de julio y máxima de 23,4 °C en enero (Severina et al., 2020). En la Tabla 1 se visualizan las temperaturas en el período de evaluación.

Tabla 1. Temperaturas (°C) durante el período del experimento

Mes	Tmax (°C)	Tmin (°C)	Tmed (°C)
nov-19	29,1	13,4	21,1
dic-19	31,5	16,0	23,5
ene-20	31,2	16,4	23,6
feb-20	28,6	16,1	22,1
mar-20	27,9	13,1	20,3
abr-20	25,4	10,9	17,8
may-20	20,9	7,2	13,8
jun-20	18,7	1,7	9,9
jul-20	18,0	1,0	9,2
ago-20	21,3	2,9	11,8
sep-20	23,3	6,2	14,5
oct-20	25,8	9,9	17,6

Caracterización del contenido de humedad

En la Figura 5 se observa que al momento del primer corte 23/03/2020, en la parcela principal la condición de riego se encontraba en el rango de 50-60% de CC y la condición secano entre un 25-30% de CC. Es decir que el rebrote transcurrió con las condiciones hídricas impuestas. En el segundo corte el comportamiento fue similar. Cabe aclarar que el mayor desarrollo radicular se encontraba en los primeros 50 cm.

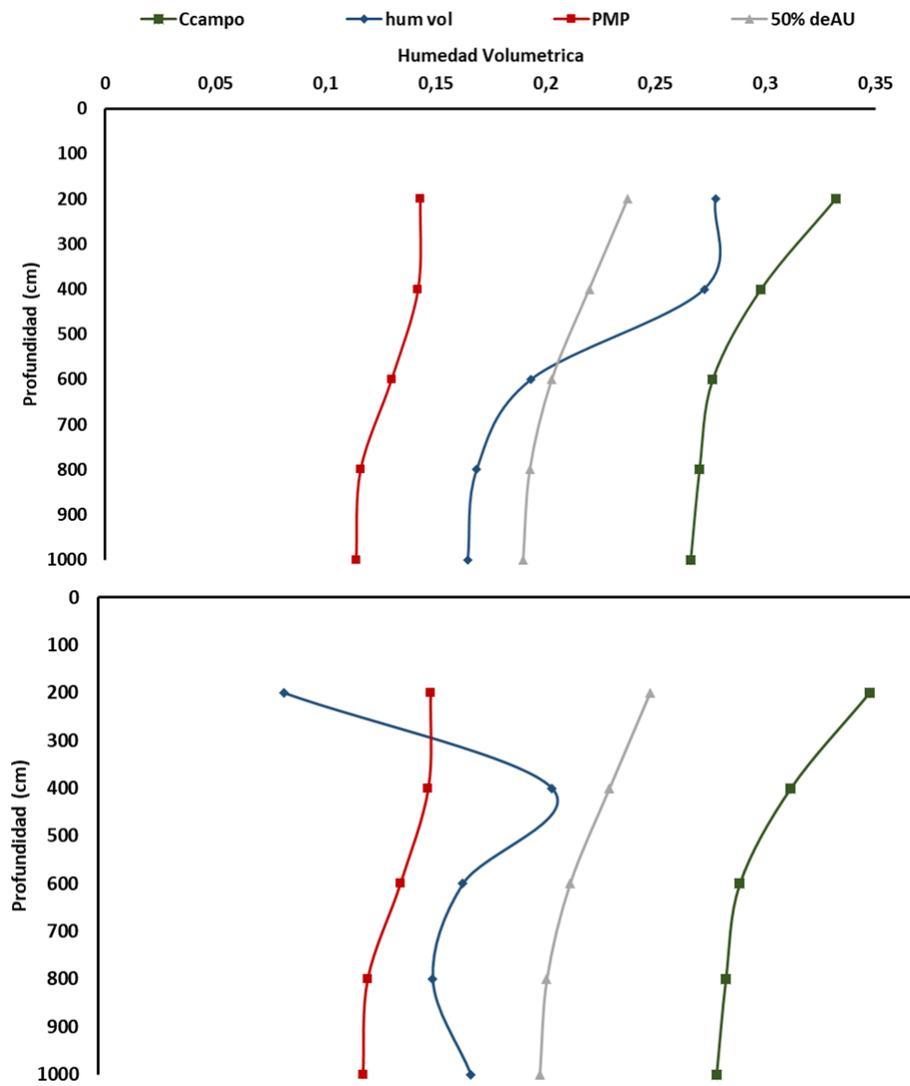


Figura 5. (a) Humedad volumétrica (%) en función a la profundidad (cm) para la condición hídrica 60% CC. **(b)** Humedad volumétrica (%) en función a la profundidad (cm) para la condición hídrica 30% CC. Primer Corte

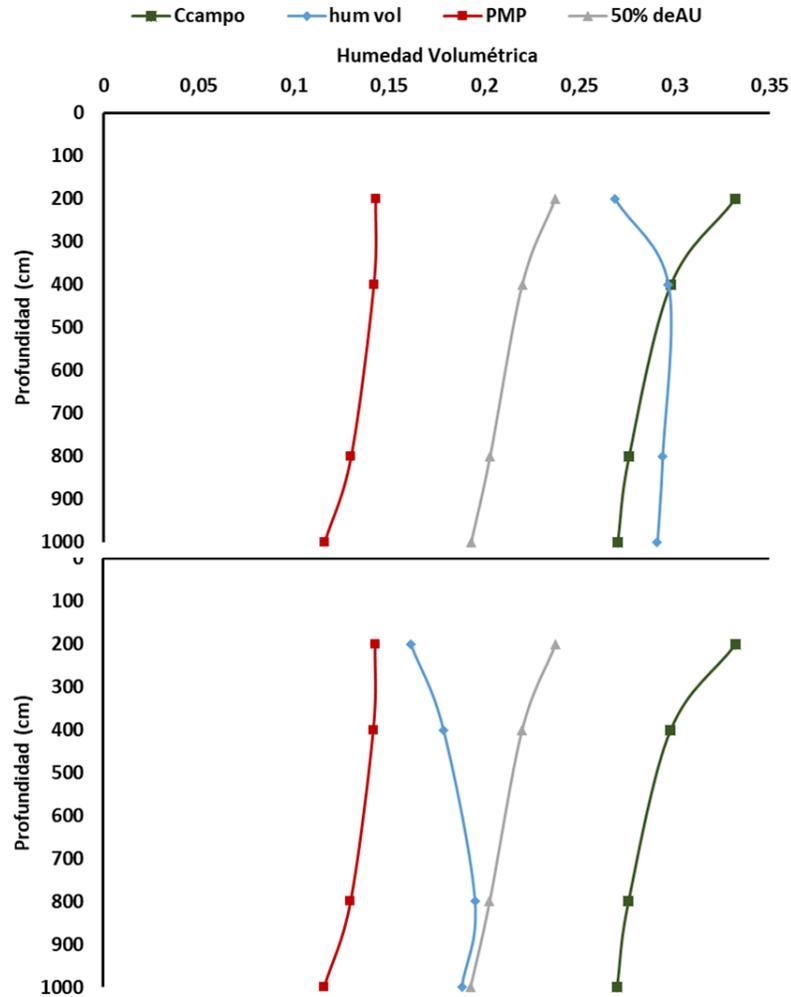


Figura 6. (a) Humedad volumétrica (%) en función a la profundidad (cm) para la condición hídrica 60% CC. **(b)** Humedad volumétrica (%) en función a la profundidad (cm) para la condición hídrica 30% CC. Segundo Corte

Determinaciones morfo-fisiológicas

-Contenido hídrico del suelo: a través de técnicas gravimétricas se determinó el perfil de humedad del suelo (% de agua útil) cada 0,2 m y hasta 1 m de profundidad al iniciar y finalizar cada rebrote (1 por repetición).

-Producción de biomasa: los cortes se realizaron cuando el cultivo alcanzó los 450-500 GDA, considerando una $T_b = 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ y dejando un remanente de 5 cm sobre el nivel del suelo. Se realizó el corte total de la unidad experimental (9 m^2). La biomasa se pesó en verde y luego se colocó en estufa a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48h.

-Componentes estructurales de las plantas: en cada evaluación, de cada tratamiento se extrajeron tres plantas y se determinó:

- Jerarquía de tallos por altura y peso por tallos: se analizó la jerarquía de los tallos por altura clasificando en función al tallo más largo como dominante ($>2/3$ de altura máxima), intermedio (entre $1/3$ y $2/3$ de la altura máxima) y suprimido ($< 1/3$ de la altura máxima) (Teixeira, 2007).
- Relación hoja/tallo: se estimó como indicador de la calidad del forraje.
- Número de nudos por tallo: en el momento del corte se determinó el número de nudos por tallo, sobre una muestra de 20 tallos por unidad experimental; para ello, se contaron la cantidad de nudos desde la base del tallo hasta el extremo superior del mismo.
- Biomasa de raíces: de las plantas a muestrear se tomaron los primeros 30 cm de raíces y junto a la corona se determinó la biomasa radicular.
- Relación biomasa aérea/biomasa de raíces: se utilizó para medir el grado de partición.
- Área foliar específica (AFE), calculada como la relación entre el área foliar de la planta (cm^2) y el peso seco de la hoja (g).

Análisis estadístico

A los datos obtenidos del experimento se les realizó el análisis de varianza (ANAVA). Las diferencias entre medias de cultivares y nivel hídrico se analizaron con el Test de Tukey ($p < 0.05$) (InfoStat, Di Rienzo et al., 2010).

Resultados

Para asegurar el éxito del trasplante y posterior desarrollo de los cultivares, desde 21 de noviembre de 2019 hasta el 18 de febrero del 2020 los tratamientos se mantuvieron regados a capacidad de campo y no se realizaron cortes.

Se realizaron dos cortes:

- 23/03/2020: Solo se registró producción de biomasa (ASPO COVID-19)
- 5/10/2020: Se determinó biomasa, características morfo-fisiológicas

Los cortes se realizaron entre 450-500 GDA, con $tb=5$ o su equivalente al 10% de floración

Luego de este periodo, todas las plantas fueron sacadas y trasplantadas en otro sitio para su cruzamiento.

Biomasa aérea total

No se detectó interacción condición hídrica*cultivares ($p>0,05$) sobre la biomasa aérea total (Figura 7). Tampoco se encontró efecto sobre la condición hídrica y los cultivares. Sin embargo, en condición secano LE la producción mostraría una tendencia a ser mayor.

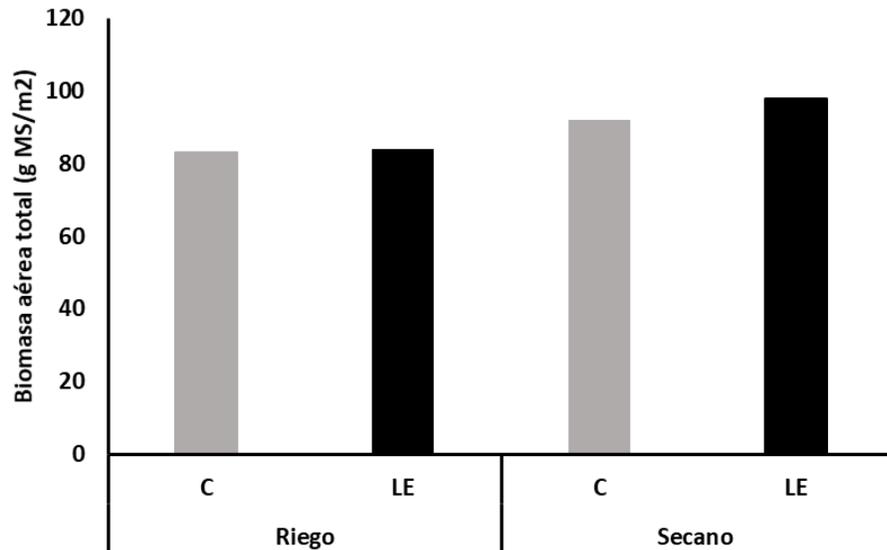


Figura 7. Biomasa aérea total (gMS/m²) de cultivares de alfalfa, para dos condiciones hídricas: Riego, Secano y dos cultivares de alfalfa, Control (C) y Línea Experimental (LE)

Cuando se analiza cada corte por separado este comportamiento se mantiene (Figura 8). La diferencia en producción observada entre cortes se debería principalmente a que en el primer corte el cultivo se encontraba en periodo de implantación.

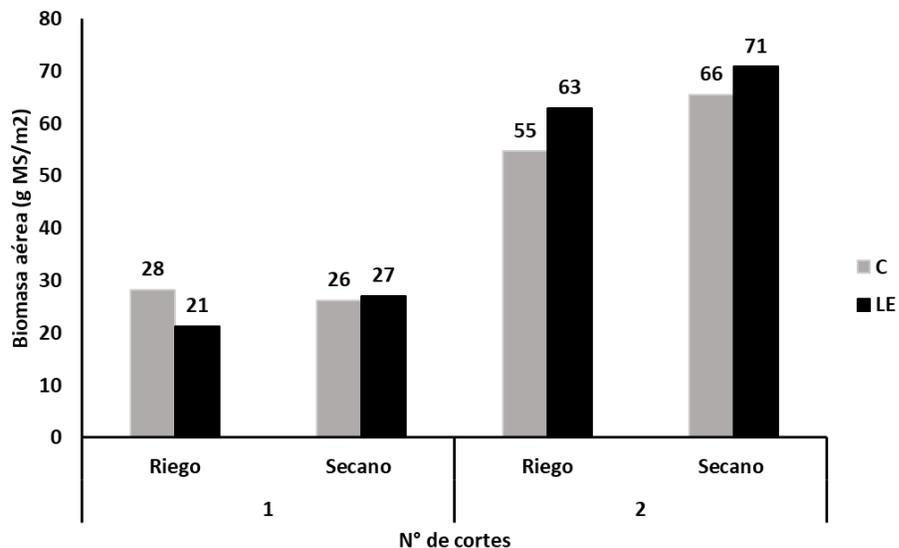


Figura 8. Biomasa aérea total (gMS/m²) de cultivares de alfalfa en dos momentos de corte, para dos condiciones hídricas: Riego, Secano y dos cultivares de alfalfa, Control (C) y Línea Experimental (LE).

Biomasa área y radicular por planta

De cada uno de tratamientos se seleccionaron al azar tres plantas. Para cada una de ellas se cuantificó la biomasa aérea, radicular y su relación. Como se observa en la Figura 9 no se detectó interacción condición hídrica*cultivares ($p>0,05$) y los valores de biomasa aérea y radicular fueron similares entre condición hídrica y cultivares.

Además, en el grafico se puede observar que, en líneas generales, de la biomasa total (área + raíz) existe una mayor proporción de biomasa radicular que de biomasa aérea, así en promedio el 57% corresponde a biomasa radicular y el 43% a biomasa aérea. Estos valores son similares a los hallados en el cultivo durante el periodo de implantación, fisiológicamente, el cultivo priorizará implantarse. Por su parte, la relación biomasa radicular/biomasa aérea fue en promedio de 0,55.

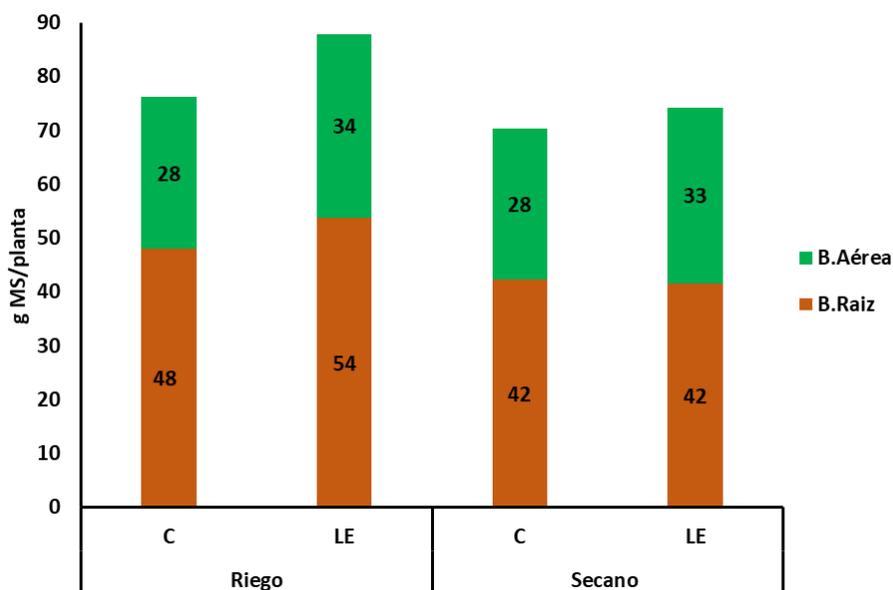


Figura 9. Gramos de MS por planta (g MS/por planta) de cultivares de alfalfa, para dos condiciones: Riego, Secano y dos cultivares de alfalfa, Control (C) y Línea Experimental (LE). Leyenda marrón: biomasa de raíz (g MS); Leyenda verde: biomasa aérea (g MS). Para cada tratamiento la altura total de cada barra representa la biomasa total (g MS).

Jerarquía y peso de tallos por altura

De cada una de las plantas se evaluó la jerarquía de tallos por altura clasificando en función al tallo más largo como dominante ($>2/3$ de altura máxima), intermedio (entre $1/3$ y $2/3$ de la altura máxima) y suprimido ($< 1/3$ de la altura máxima) (Teixeira, 2007). Para cada uno de los tratamientos evaluados en promedio la altura máxima fue de 50 cm (Tabla 2). El número de nudos por tallo fue en promedio de 10.

Tabla 2. Altura Máxima (cm) y su correspondiente Atura en función a tallos Dominante, Intermedios y Suprimidos (g MS/por planta) de cultivares de alfalfa, para dos condiciones: Riego, Secano y dos cultivares de alfalfa, Control (C) y Línea Experimental (LE).

Condición Hídrica	Cultivar	Altura Máxima (cm)	Altura (cm)	
			Dominantes	Intermedios
Riego	C	55	>36	36-18
	LE	47	>31	31-15
Secano	C	45	>30	30-15
	LE	53	>35	35-17

El rango promedio del número total de tallos por planta estuvo comprendido entre 40 y 50 tallos/planta (Figura 10) donde proporcionalmente la mayor cantidad correspondieron a tallos dominantes (Figura 11).

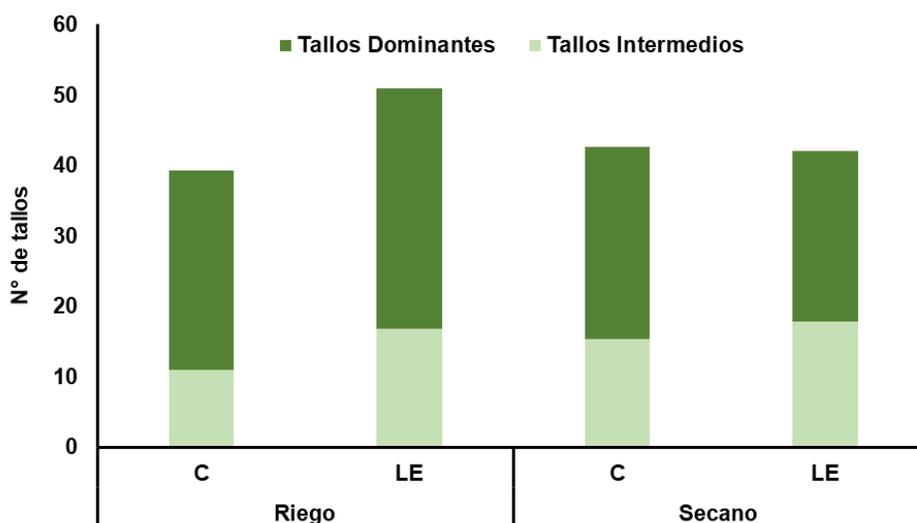


Figura 10. N° de tallos por planta de cultivares de alfalfa, para dos condiciones: Riego, Secano y dos cultivares de alfalfa, Control (C) y Línea Experimental (LE). Leyenda verde oscura: Tallos Dominantes; Leyenda verde clara: Tallos Intermedios Para cada tratamiento la altura total de cada barra representa el N° total de Tallos.

En la Figura 11 se observa que secano LE mostró similar proporción de tallos dominantes e intermedios mostrando una jerarquía homogénea y sería parámetro interesante relacionado a estructura de la canopia. Sin embargo, cuando se analiza el peso promedio por tallo se observa que, en relación al resto de los tratamientos, el tratamiento secano LE presentan mayor peso por tallo (Figura 11). Por lo tanto, la tendencia observada en mayor producción de biomasa aérea (Figura 8) se debería principalmente a un aumento del peso de cada tallo (Figura 11) más que en un incremento en el número de los mismos (Figura 10). Esto podría correlacionar de manera negativa con la calidad nutricional de secano LE.

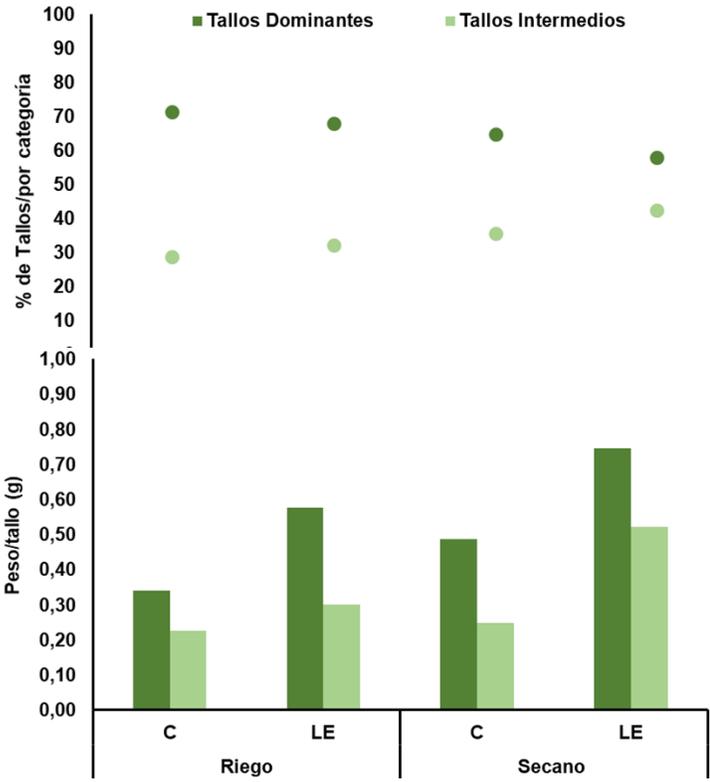


Figura 11. (a) % de Tallos por Categoría **(b)** Peso/tallo (g) de cultivares de alfalfa, para dos condiciones: Riego, Secano y dos cultivares de alfalfa, Control (C) y Línea Experimental (LE). Leyenda verde oscura: Tallos Dominantes; Leyenda verde clara: Tallos Intermedios

Porcentaje de hoja y Relación Hoja –Tallo

El porcentaje de hoja promedio por categoría de tallos estuvo en el rango del 30-40%. Sin embargo, los tratamientos Riego y Secano C presentaron mayor proporción de hojas que Riego y Secano LE (Figura 12a). Del mismo modo, la variable hoja/tallo presentó un comportamiento similar (Figura 12b).

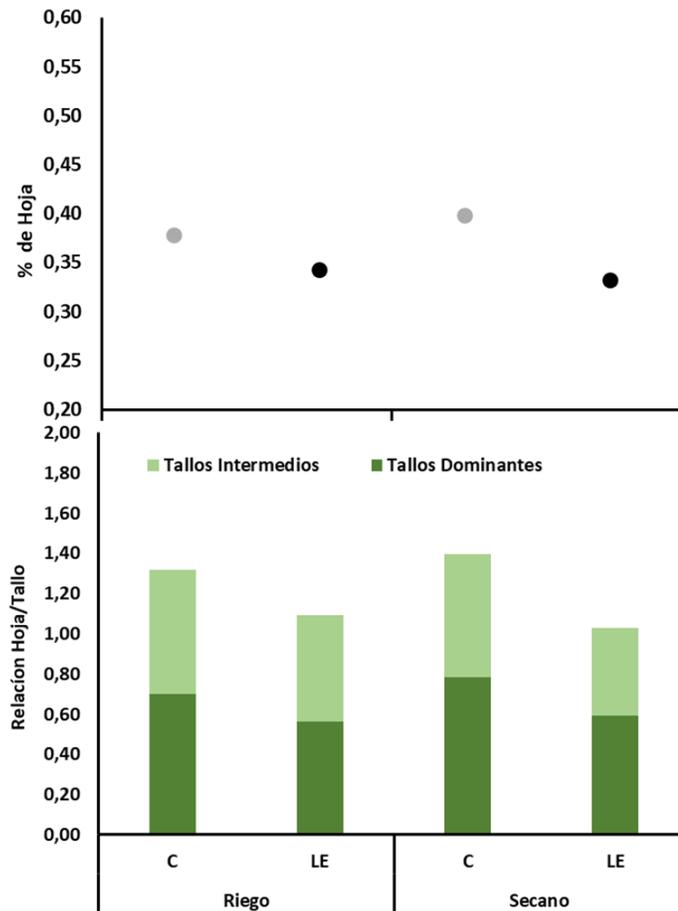


Figura 12. (a) Relación Hoja/Tallo **(b)** % de hoja de cultivares de alfalfa, para dos condiciones: Riego, Secano y dos cultivares de alfalfa, Control (C) y Línea Experimental (LE). Leyenda verde oscura: Tallos Dominantes; Leyenda verde clara: Tallos Intermedios. Para cada tratamiento la altura total de cada barra representa la relación Hoja/Tallo total.

Área Foliar Específica

El área foliar específica (AFE) es la relación entre el área de hojas (cm^2) sobre el peso de las mismas (g). En la Figura 13 se observa que secano LE mostró mayor AFE que el resto de los tratamientos, mostrando esto que ante un periodo de estrés LE no vería reducida la capacidad para capturar luz, pero si el peso de la hoja (o fuente fotosintética).

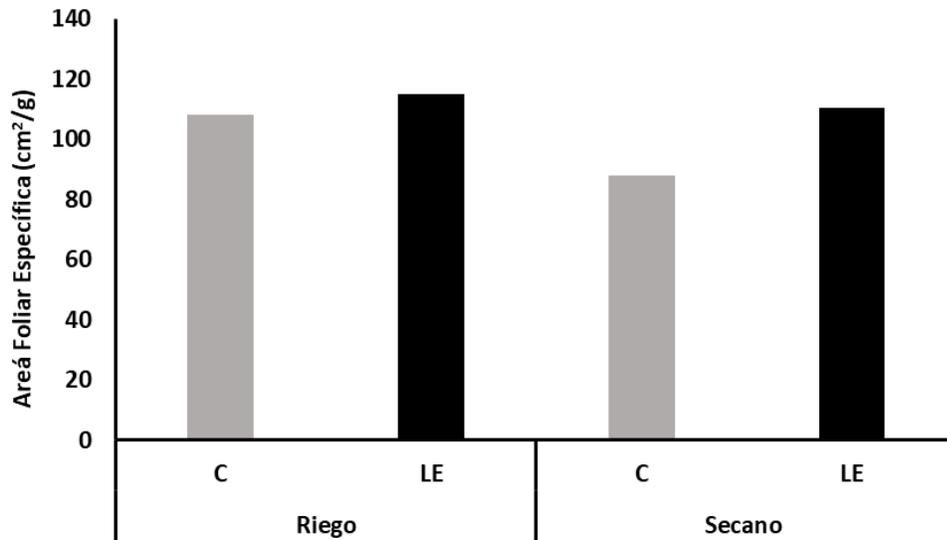


Figura 13. Área Foliar Específica (cm²/g) de cultivares de alfalfa, para dos condiciones hídricas: Riego, Secano y dos cultivares de alfalfa, Control (C) y Línea Experimental (LE).

Consideraciones finales:

Las condiciones experimentales propuestas para llevar a cabo el ensayo fueron adecuadamente alcanzadas, sin embargo, en un cultivo perenne como la alfalfa sería necesario mayor tiempo de evaluación (mínimo 2 años) y con mayores restricciones hídricas

Sería interesante poder sembrar directamente a campo, de este modo se podría obtener un desarrollo radicular típico de este cultivo; además de hacerlo en canopia densa, debido a que la competencia intraespecífica entre plantas podría mostrar otro comportamiento en lo que a jerarquía de tallos y a peso de los mismo refiere.

Por último, se recomienda realizar mediciones de calidad nutricional de tallos y hojas.

Referencias

- Annicchiarico, P. (2007). Lucerne shoot and root traits associated with adaptation to favourable or drought-stress environments and to contrasting soil types. *Field Crops Research* 102: 51–59.
- Alvarez, C.; Severina, I. 2012 Lluvias. Información meteorológica de la E.E.A Manfredi, Manfredi. Disponible en: <https://inta.gob.ar/documentos/temperaturas-promedio.-informacion-meteorologica-mensual-de-la-e.e.a.-manfredi>
- Avice, J.C., Le Dily, F., Goulas E., Noquet, C., Meuriot, F., Volenec, J.J., et al. (2003) Vegetative storage proteins in overwintering storage organs of forage legumes: roles and regulation. *Can J Bot.* 81:1198–212.
- Blum, A. (1996). Crop response to drought and the interpretation of adaptation. *Plant Growth Regul.* 20:135–48.
- Condon, A.G., Richards, R.A., Rebetzke, G.J. y Farquhar, G.D. (2002). Improving intrinsic water-use efficiency and crop yield. *Crop Sci* 42: 122-131.
- Di Rienzo, J.A.; Casanoves, F.; Balzarini, M.G.; Gonzalez, L.; Tablada, M.; Robledo, C.W. (2010). InfoStat. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Erice, G., Louahlia, S., Irigoyen, J.J., Sanchez-Diaz, M., Avice, J.-C. (2010). Biomass partitioning, morphology and water status of four alfalfa genotypes submitted to progressive drought and subsequent recovery. *J. Plant Physiol.* 167, 114–120.
- Erice, G., Louahlia, S., Irigoyen, J.J., Sanchez-Diaz, M. (2011). Water use efficiency, transpiration and net CO₂ exchange of four alfalfa genotypes submitted to progressive drought and subsequent recovery. *Environmental and Experimental Botany.* 72: 123–130.
- INTA-Secretaría de Agricultura y Ganadería de la Nación. 1987. Carta de Suelos de la República Argentina. Hoja 3163–32 Oncativo. Córdoba.
- IPCC. (2014) Intergovernmental Panel on Climate Change. Disponible en https://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar5/wg2/ar5_wgII_spm_es.pdf.
- Li, L., Zhang, Q., Huang, D. (2014). A review of imaging techniques for plant phenotyping. *Sensors.* 14: 20078-20111.
- Odorizzi, A. 2021. Desafíos, perspectivas y oportunidades de la cadena de la alfalfa en Argentina - Informe noviembre 2020. <https://inta.gob.ar/documentos/desafios-perspectivas-y-oportunidades-de-la-cadena-de-la-alfalfa-en-argentina-informe-noviembre-2020>

Orloff, S., Putnam, D., Bali, K (2015). Drought Tip: Drought Strategies for Alfalfa. ANR Publication 8522. UC Agriculture & Natural Resources.

Prieto, S. (2011) Eficiencia transpiratoria como atributo de tolerancia al déficit hídrico en soja (*Glycine max* (L.) Merrill): variabilidad intraespecífica y su asociación con la estabilidad del rendimiento (Tesis de Maestría). Facultad de Agronomía - Universidad de Buenos Aires.

Teixeira, E.I.; Moot, D.J.; Brown, H.E.; Fletcher, A.L. 2007. The dynamics of Lucerne (*Medicago sativa* L.) yield components in response to defoliation frequency. *European Journal of Agronomy* **26**, 394–400.

Tuberosa, R. (2011). Phenotyping drought stressed crops: key concepts, issues and approaches. *Drought phenotyping in crops: from theory to practice*. 3-35.