

Estudio comparativo de la tolerancia a la salinidad en 28 genotipos del género

Vitis

Leandro Martín^{1,2}, Hernán Vila²

Instituto Nacional del Agua. Centro Regional Andino (INA-CRA). Belgrano 210, Mendoza.

Estación Experimental Agropecuaria Mendoza, INTA. San Martín 3583, Chacras de Coria, Mendoza.

Email: leanmartinar@yahoo.com.ar

Resumen

El objetivo del trabajo fue evaluar la tolerancia a aguas salinas de 28 genotipos del género *Vitis* para identificar los más y menos tolerantes a salinidad. Se estudiaron 11 híbridos americanos de *Vitis* y 17 variedades de la especie *Vitis vinifera* (10 criollas y 7 europeas). Se hicieron crecer 4 pequeñas plantas de cada genotipo en macetas individuales con un sustrato de perlita y arena y se regaron durante 66 días con una solución 100 mM de cloruro de sodio (ClNa). Las plantas se mantuvieron siempre en capacidad de campo gracias a un sistema de hidroponía en circuito cerrado. Durante los días que duró el ensayo se registró la fecha en que murió cada planta y se determinaron los días de sobrevida. Para clasificar a las variedades de acuerdo a su grado de tolerancia a la salinidad, se calculó el día en que el 25% de la población había muerto (1^{er} cuartil de la muestra). Se consideraron como genotipos sensibles a aquellos en que al menos el 25% de la muestra había muerto antes del día 30 (*e.g.*, 3309, 161-49 Couderc, Fercal, Freedom, 1103 Paulsen, 99 Richter, SO4, Torrontés Sanjuanino), como poco tolerantes cuando al menos el 25% de la muestra murió entre los días 30 y 60 (*e.g.*, Cereza, Colombard, Criolla Blanca, Criolla Ballista, Palomino, 110 Richter, 140 Ruggeri, Syrah, Torrontés Riojano) y como tolerantes cuando al menos el 75% de la población sobrevivió más de 60 días (*e.g.*, 101-14 Millardet-Grasset, 196-17 Castel, Criolla Chica, Criolla Sanjuanina, Moscatel de Alejandría, Pedro Giménez). Dentro de este grupo, se observó un subgrupo de genotipos muy tolerantes, en los que todas sus repeticiones sobrevivieron al finalizar el ensayo (*e.g.*, Criolla Grande, Criolla Centenario Perú, Chardonnay, Grenache y Malbec). Entre estos genotipos más tolerantes, no hubo diferencias en el contenido de clorofila total y clorofila a, ni en la integridad de las membranas plasmáticas cuando crecieron con agua salina.

Palabras claves: vid, salinidad, portainjertos.

Introducción

La salinidad en los suelos y aguas de riego constituye una de las principales amenazas para la sustentabilidad de la agricultura de regadío (Hoffman y Shalhevet, 2007). En el área regadía del río Mendoza, la salinidad se ha incrementado un 59% en los suelos cultivados en el 2002 respecto a 1973 (Morabito *et al.*, 2005). A su vez en el norte y oeste de dicha región, existen problemas de drenaje sub superficiales asociados a incrementos de la salinidad en las aguas freáticas (Ortiz Maldonado *et al.*, 2005). El estrés salino provoca en las plantas efectos de tipo osmótico y tóxico. El primer tipo ocurre cuando las sales disueltas en la solución edáfica disminuyen el potencial hídrico del suelo y las raíces pueden absorber menos agua. La toxicidad ocurre cuando ciertos iones (como el Na^+ y el Cl^-) son absorbidos por las raíces y se acumulan causando daños en las estructuras celulares (Munns, 2002).

En especies como la vid, el agua salina afecta la expresión vegetativa; disminuyendo el área foliar, el crecimiento de los brotes y el número de hojas (Prior *et al.*, 1992b, Fisarakis *et al.*, 2001). A nivel celular se producen daños como la degradación de la clorofila (Sivritepe *et al.*, 2010), la pérdida de integridad de las membranas celulares (Dionisio-Sese y Tobita, 1998) y la muerte de las células por deshidratación o acumulación de iones tóxicos en el citoplasma (Munns, 2002).

En las plantas perennes, la supervivencia dependerá de cuán eficientemente pueden mantenerse distintos mecanismos de tolerancia a lo largo del tiempo. Por ejemplo, las hojas más viejas tienden a acumular más tóxicos que terminan muriendo, y una estrategia de tolerancia puede estar basada en una alta tasa de renovación de hojas (Munns, 2002).

El objetivo del trabajo fue evaluar la tolerancia a agua salina por ClNa de 28 genotipos del género *Vitis*, para identificar los más y menos tolerantes a la salinidad, haciéndolos crecer en un ambiente salino y evaluando su capacidad de supervivencia luego de un tiempo dado. Además se planteó comparar las características fisiológicas de los genotipos que podrían sobrevivir hasta el final de la evaluación.

Materiales y métodos

Se realizó un ensayo donde se evaluó la capacidad para sobrevivir al riego con agua salina, de 28 genotipos del género *Vitis* (11 portainjertos híbridos americanos y 17 variedades de *Vitis vinifera*, de los cuales 10 de origen criollo y 7 europeos). Se trabajó con plantas de un año de edad (4 repeticiones por cada genotipo) creciendo en macetas de 4 L con un sustrato de perlita y arena (2:1) a las que se regó durante 66 días con una solución de ClNa 100 mM con un sistema de hidroponía de circuito cerrado para mantener a las plantas en capacidad de campo en forma permanente. El ensayo se instaló en un invernáculo de la EEA Mendoza INTA en Luján de Cuyo, Mendoza, con una temperatura media de 24 °C y una densidad de flujo de fotones fotosintéticos de 880 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las estacas fueron extraídas de la colección ampelográfica de la institución. La solución salina se preparó con agua proveniente del río Mendoza, con una conductividad eléctrica (CE) de 0,8 dS m^{-1} , que se renovó una vez por semana. Durante el lapso que duró el ensayo, se registró el día en el que murió cada planta de cada genotipo.

Medidas de crecimiento vegetativo: la superficie foliar (SF) se calculó a partir de la medición del largo y ancho de todas las hojas y feminas de cada planta. Se usó un modelo de regresión generado para cada genotipo en un lote de plantas diferentes. Los modelos de regresión tuvieron un $r^2 > 0,9$ y fueron muy similares para los distintos genotipos. Por ejemplo $SF (mm^2) = 64,208 [\text{largo (cm)} \times \text{ancho (cm)}] - 1,3841$, $r^2 0,98$, para Criolla Centenario Perú. La longitud del brote principal se midió desde la base hasta el ápice con una cinta métrica en todas las plantas.

Integridad de las membranas celulares: se usó la técnica de Barranco y Ruiz (2005), para esto se extrajeron 8 discos de 1,5 cm de diámetro de las hojas basales de cada genotipo. Se colocaron las muestras en tubos de 50 mL y se agregó 25 mL de agua destilada. Los tubos se agitaron por 24 h a 120 rpm. Luego, se midió en cada uno de ellos la conductividad eléctrica inicial a 25 °C (CEI), con un conductímetro (Hanna HI 9033, USA). Posteriormente los tubos se llevaron a autoclave durante 1 h a 120 °C, con el fin de destruir completamente los tejidos. Después se agitaron por 2 h a 120 rpm y se midió nuevamente la conductividad eléctrica final a 25 °C (CEF). La fórmula utilizada para el cálculo de la integridad de las membranas celulares (IM) fue: $IM = 1 - (CEI/CEF)$.

Contenido de clorofila: se usó la técnica de Poorter y Van Berkel (2012), se extrajeron 3 discos de hojas con un sacabocado de 1,5 cm de diámetro y se conservaron en tubos eppendorf a -80 °C hasta su medición. Posteriormente las muestras fueron molidas en mortero, con el agregado de 10 mL de metanol y ½ cucharadita de arena fina. Una vez obtenida la suspensión homogénea, las muestras se recogieron en tubos y se centrifugaron durante 5 m a 3000 rpm. Luego se pasó el sobrenadante a un matraz de 10 mL y se enrazó con metanol. Se midió la absorbancia a 652, 665 y 750 nm con un espectrofotómetro (Varian, Cary 50, Australia). Para esto se utilizaron cubetas de vidrio de 10 cm de paso óptico. La concentración de los extractos se calcularon como: Clorofila a (mg/L) = $16,29 * (A_{665} - A_{750}) - 8,54 * (A_{652} - A_{750})$; Clorofila total (mg/L) = $22,12 * (A_{652} - A_{750}) + 2,71 * (A_{665} - A_{750})$. Teniendo en cuenta la superficie de los discos de hojas, se calculó el contenido de clorofila en mg/m^2 SF.

Resultados

1. Análisis de supervivencia

De acuerdo al tiempo que tardó en morir el 25 % de la población de plantas (estimado por el primer cuartil de la muestra; Q1) de cada genotipo, estos pudieron clasificarse por su tolerancia a la salinidad. Se establecieron tres clases, sensibles, poco tolerantes y tolerantes. Los genotipos sensibles fueron aquellos en que al menos el 25 % de la población murió dentro de los primeros 30 días (*i.e.*, Freedom, 3309 Couderc, 1103 Paulsen, 99 Richter, SO4, Fercal, 161-49 Couderc y Torrontés Sanjuanino; figura 1). Los genotipos poco tolerantes fueron aquellos en que al menos el 25 % de la población murió entre los días 30 y 60 (*i.e.*, 140 Ruggeri, 110 Richter, Palomino, Colombard, Cereza, Syrah, Criolla Blanca, Criolla Ballista y Torrontés Riojano). Y, los genotipos tolerantes aquellos en que al menos el 75 % de la población sobrevivió más de 60 días (*i.e.*, 101-14 Millardet-Grasset, 196-17 Castel, Moscatel de Alejandría, Criolla Sanjuanina, Criolla Chica y Pedro Giménez). Dentro de este último grupo, se observó un subgrupo de genotipos que se denominó muy tolerantes, en los que todas sus repeticiones sobrevivieron al finalizar el ensayo (*i.e.*, Criolla Grande, Criolla Centenario Perú, Malbec, Grenache y Chardonnay).

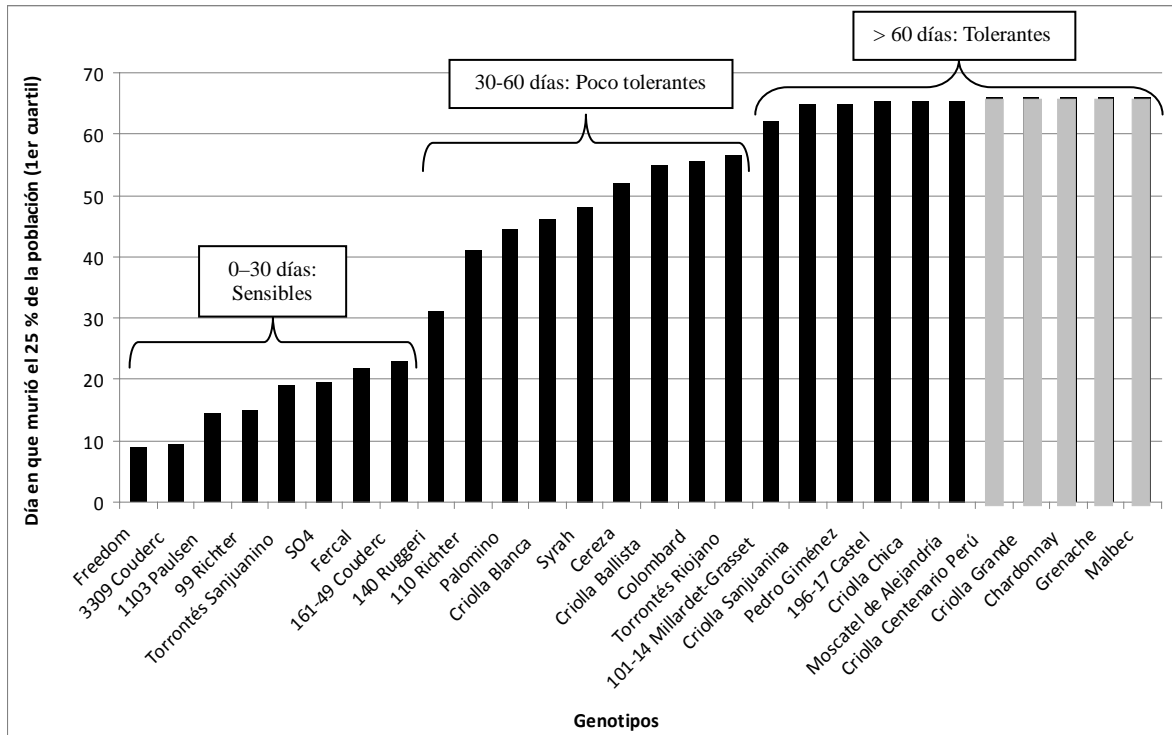


Figura 1: Clasificación de 28 genotipos (portainjertos y variedades) del género *Vitis* ordenados por su tolerancia a la salinidad, representada por el tiempo que tarda en morir el 25 % de un set de plantas (cuartil 1) cuando se riega con una solución 100 mM de ClNa. Las barras de color gris indican las variedades en las que no murió ningún individuo luego de 66 días de riego con agua salina (*i.e.*, Criolla Centenario Perú, Criolla Grande, Chardonnay, Grenache y Malbec).

El 64 % de los híbridos americanos estudiados estaban dentro del grupo de los genotipos sensibles, y sólo el 18 % eran tolerantes. Los híbridos Freedom y 3309 Couderc fueron los genotipos más sensibles a la salinidad de todos los estudiados, ya que registraron los valores más bajos del Q1 (9 y 9,5 días respectivamente). Los híbridos americanos que integraron la clase poco tolerante, tuvieron los valores de Q1 más bajos dentro del grupo (31 días para 140 Ruggeri y 41 días para 110 Richter). Por último, los únicos portainjertos americanos que se comportaron como tolerantes fueron 101-14 Millardet-Grasset y 196-17 Castel (Q1 de 62 y 65,5 días respectivamente). Respecto al comportamiento general de las variedades europeas, éstas fueron clasificadas como poco tolerantes y tolerantes (43% y 57% respectivamente), sin observarse a ninguna de ellas como sensible a la salinidad. Dentro de las poco tolerantes, la variedad Palomino fue la que tuvo el valor más bajo de Q1 (44,5 días). Las variedades criollas estudiadas tuvieron un comportamiento similar a las europeas, ya que el 90 % de las mismas estuvieron dentro de los grupos de genotipos poco tolerantes y tolerantes. El Torrontés Sanjuanino fue la única variedad criolla sensible a la salinidad (Q1 de 19 días). En el grupo de los poco tolerantes hubieron cuatro genotipos criollos (Criolla Blanca, Cereza, Criolla Ballista y Torrontés Riojano). Dentro de los genotipos tolerantes Criolla Sanjuanina, Pedro Giménez y Criolla Chica tuvieron valores similares de Q1 (65, 65 y 65,5 días respectivamente). El subgrupo de muy tolerantes estuvo integrado tanto por variedades europeas (*i.e.*, Chardonnay, Grenache y Malbec), como criollas (*i.e.*, Criolla Grande y Criolla Centenario Perú).

2. Comparación entre los genotipos muy tolerantes

Los contenidos de clorofila a y total, y la integridad de las membranas celulares en las hojas de las variedades muy tolerantes (Criolla Grande, Criolla Centenario Perú, Chardonnay, Grenache y Malbec) no fueron diferentes entre sí cuando se regaron con agua salina (tabla 1).

Tabla 1: Contenidos de clorofila a y total, e integridad de membranas en hojas de plantas de variedades de *Vitis vinifera*, clasificadas como muy tolerantes a la salinidad, luego de 66 días de riego con una solución 100 mM de ClNa.

Variedad	Clorofila total (mg/m ² SF)*	Clorofila a (mg/m ² SF)*	Integridad de membranas
Criolla Grande	215 a	173 a	0,69 a
Criolla Centenario Perú	186 a	147 a	(sin datos)
Chardonnay	174 a	139 a	0,66 a
Grenache	191 a	153 a	(sin datos)
Malbec	222 a	179 a	0,72 a
Valor p	ns	ns	ns

Letras diferentes indican diferencias para una $p < 0,05$ en las pruebas de Tukey o de Kruskal-Wallis (*).

En este grupo de muy tolerantes, el riego con agua salina produjo la detención del crecimiento del brote principal, sin diferencias entre los genotipos ($p > 0,05$). A su vez cuando finalizó el ensayo (fin del riego salino), la cantidad de hojas se había reducido significativamente (23 %) para todas las variedades por igual con respecto a la situación antes del riego salino.

Discusión

La clasificación propuesta en este estudio, basada en la supervivencia de las plantas sometidas a salinidad, no explica a qué se debió la muerte de los genotipos. Puede suponerse que ésta ocurrió por una menor exclusión de iones en raíces y por una posterior acumulación a niveles tóxicos en el mesófilo de las hojas. En términos de su utilidad como portainjertos, la exclusión salina tiene una mayor importancia. Por tal motivo sería necesario en el futuro identificar si las plantas mueren por efecto osmótico o tóxico.

Si bien *Vitis vinifera* ha sido calificada como una especie poco tolerante a salinidad, con escasa adaptación para sobrevivir en altas concentraciones salinas por un largo período de tiempo (Maas y Hoffman, 1977), en este estudio muchos genotipos de esta especie mostraron los más altos niveles de tolerancia dentro del género *Vitis*.

La mayor supervivencia registrada en los genotipos de *Vitis vinifera* comparada con la de los híbridos americanos observada en este estudio en macetas, no parece del todo consistente con lo que indica la bibliografía. Por ejemplo en un ensayo a campo en Australia se observó que 1103 Paulsen era un mejor excluidor de iones (menor contenido de Cl⁻ en hojas) respecto a Sultanina sin injertar (Walker *et al.*, 2004). Pero, Fisarakis *et al.*

(2001) mostró en Grecia que Sultanina a pie franco regada con agua salina tuvo mayor área foliar que injertada sobre 1103 Paulsen, 110 Richter y 140 Ruggeri. Esto indicaría que las condiciones en que se realizan los ensayos influyen en las respuestas de los genotipos a la salinidad.

Con respecto a los genotipos más tolerantes (*i.e.*, en los que todos los individuos sobrevivieron más de 66 días), resultó importante el hecho de que no se observaran diferencias entre ellos en el contenido de clorofila a y total, o en la integridad de membranas. Siendo este un grupo formado por genotipos de *Vitis vinifera*, indicaría una escasa variabilidad intraespecífica en los tipos más tolerantes dentro de *Vitis vinifera*.

Bibliografía

Barranco D. y N. Ruiz (2005). Frost tolerance of eight olive cultivars. *HortScience* 40: 558-560.

Dionisio-Sese M.L. y S. Tobita (1998). Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Science* 135: 1-9.

Fisarakis, I., K. Chartzoulakis, y D. Stavrakas (2001). Response of Sultana vines (*V. vinifera* L.) on six rootstocks to NaCl salinity exposure and recovery. *Agricultural Water Management* 51: 13-27.

Hoffman G.J. y J. Shalhevet (2007). Controlling salinity. En: Design and Operation of Farm Irrigation Systems 2nd edition. Eds.: G.J. Hoffman, R.G. Evans, M.E. Jensen, D.L. Martin y R.L. Elliot. American Society of Agricultural and Biological Engineers, 150-170.

Maas, E.V. y G.J. Hoffman (1977). Crop salt-tolerance – current assessment. *Journal of the Irrigation and Drainage Division of the American Society of Civil Engineers* 103: 115-134.

Munns R. (2002). Comparative Physiology of Salt and Water Stress. *Plant, Cell and Environment* 25: 239-250.

Morábito J., C. Mirábile, M. Manzanera, O. Cappe, D. Tozzi y L. Mastrantonio (2005). Evolución de la salinidad de suelos regadíos e incultos en el área del río Mendoza. Actas del XX Congreso Nacional del agua – II Simposio de recursos hídricos del Cono sur, Mendoza. CONAGUA. Departamento General de Irrigación. Mendoza, 1-10.

Prior L.D., A.M. Grieve y B.R. Cullis (1992b). Sodium chloride and soil texture interactions in irrigated field grown sultana grapevines. II Plant mineral content, growth and physiology. *Australian Journal of Agricultural Research* 43: 1067-1083.

Ortíz Maldonado G., J. Morábito, E. Rearte y L. Mastrantonio (2005). Salinidad del agua freática en el área regadía del Río Mendoza. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias, UNCuyo*. Mendoza. Argentina, 37: 51-64.

Poorter H. y J. Van Berkel (2012). Chlorophyll extraction and determination. Prometheus Wiki. Consulta en internet en el sitio: <http://prometheuswiki.publish.csiro.au/tikipagehistory.php?page=Chlorophyll%20extraction%20and%20determination&preview=11>

Sivritepe N., H. Ö. Sivritepe, H. Çelik y A. V. Katkat (2010). Salinity Responses of Grafted Grapevines: Effects of Scion and Rootstock Genotypes. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanic Cluj* 38: 193-201.

Walker, R.R., D.H. Blackmore, P.R. Clingeffer y R.L. Correll. (2004). Rootstock effects on salt tolerance of irrigated field-grown grapevines (*Vitis vinifera* L. cv. Sultana), 2. Ion concentrations in leaves and juice. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 10: 90-99.