

Variabilidad fenotípica y genotípica de poblaciones de *Lotus tenuis* que habitan suelos con distinto pH

Stoffella, S., G. Posse¹, M. Collantes

Centro de Ecofisiología Vegetal, Serrano 669 (1414) Buenos Aires, Argentina. 1 Dirección actual: Instituto de Clima y Agua, INTA (1712) Castelar, Buenos Aires, Argentina

Resumen. *Lotus tenuis* es una leguminosa forrajera exótica que crece en forma espontánea en la Depresión del Río Salado (Prov. De Buenos Aires, Argentina) y presenta una gran amplitud ecológica en relación al pH del suelo. Para evaluar si dicha tolerancia está relacionada con la existencia de distintos ecotipos o con una gran plasticidad fenotípica, se realizó un experimento de trasplantes recíprocos en invernáculo con plantas clonadas. Se eligieron 3 poblaciones de *L. tenuis* que crecían en suelos con pH 6, 7 y 9. Se midieron varios caracteres morfológicos en 4 fechas sucesivas a lo largo de 5 meses. El número de ramificaciones, la longitud de la rama más larga, la relación ancho/largo del folíolo central y el peso seco de la biomasa aérea difirieron entre las poblaciones aun cuando todos los individuos fueron cultivados en un mismo tipo de suelo. Además se encontraron diferencias en la magnitud de la plasticidad entre genotipos de la misma población.

Abstract. *Lotus tenuis* is an exotic legume which has naturally spread throughout the Flooding Pampa. In order to evaluate if its tolerance to a wide range of soil pH is related to phenotypic plasticity or genetic variation, we conducted a greenhouse experiment of reciprocal transplants using clones. Three populations of *L. tenuis* originated from soils with pH 6, 7 and 9 were selected. Several morphological characters were measured on four successive dates during five months. Shoot number, shoot length, the width:length ratio of the central leaflet, and the aboveground biomass were different among populations growing on the same soil type. There were also differences in the magnitude of plasticity among genotypes within the same population.

Introducción

La heterogeneidad ambiental que caracteriza a la Depresión del Río Salado (Prov. de Buenos Aires, Argentina) está dada fundamentalmente por un complejo mosaico de tipos de suelo, que junto a sutiles variaciones de la topografía, determinan diferencias en el régimen de drenaje y en el contenido salino del perfil (Batista et al. 1988; Collantes et al. 1988, Burkart 1990).

Lotus tenuis es una especie originaria de Europa (Williams 1988) que se sembró como forrajera en la Pampa Deprimida. Debido al déficit de leguminosas nativas de los pastizales de la Depresión del Salado (Vervoort 1967, León 1979), esta especie representaba una alternativa para incrementar la producción y la calidad de las pasturas naturales (Miñón et al. 1990). Se difundió espontáneamente, naturalizándose en la región y apareciendo con frecuencia en ambientes anegables (Mazzanti 1988). Su mayor resistencia al anegamiento tanto de las plantas adultas como de las semillas, es una de las posibles causas de su mayor distribución comparada con *Lotus corniculatus*, otra leguminosa forrajera introducida (Vignolio et al. 1994, 1995).

La amplia distribución en un ambiente heterogéneo de una determinada especie puede deberse a una alta plasticidad fenotípica o a una alta variación genética entre sus individuos (Bradshaw 1965). Se ha observado que *L. tenuis* ocupa áreas con suelos que abarcan un amplio rango de pH (Montes 1988, Correa et al. 1995). En el caso del pH, la concentración de hidrogeniones de la solución del suelo ejerce su efecto más importante sobre la disponibilidad de nutrientes y la concentración de iones potencialmente tóxicos. En líneas generales un pH alto está asociado a deficiencias de Fe o P

Tabla 1. Características de los suelos donde crecían las tres poblaciones estudiadas. pH: 1:2.5 agua; C.E.: Conductividad eléctrica en pasta ($\mu\text{S}/\text{cm}$), N total: nitrógeno total (Kjeldahl) (%); P: fósforo asimilable (ppm); C.I.C.: Capacidad de intercambio catiónico (meq/100 g); Ca^{++} , Mg^{++} , Na^+ , K^+ : cationes (C mol/Kg).

Table 1. Soil characteristics where the three populations under study were grown. pH: 1:2.5 water; C.E.: electrical conductivity ($\mu\text{S}/\text{cm}$), P: assimilable phosphorus (ppm); C.I.C.: cation exchange capacity (meq/100 g); Ca^{++} , Mg^{++} , Na^+ , K^+ : cations (C mol/Kg).

Sitio	pH*	C.E.	N total	P	C.I.C.	Ca^{++}	Mg^{++}	Na^+	K^+
B	5.6±0.4	460	0.262	6.1	20.06	9.4	2.3	1.3	1.6
C	6.7±0.3	660	0.257	9.1	20.47	7.3	5.4	7.4	1.5
D	9.4±0.3	450	0.219	9.2	20.61	6.8	3	24.4	1.8

* Los valores de pH son promedio de 3 muestras tomadas en los primeros 5 cm de suelo.

y un pH bajo, a toxicidad (Crawley 1986). Estas diferencias en la disponibilidad de nutrientes podrían tener consecuencias importantes sobre el crecimiento vegetal y es por ello frecuente asumir que la selección produce ecotipos especialmente adaptados a tipos de suelos particulares. Los ejemplos más conocidos lo constituyen los ecotipos adaptados a suelos con alto contenido de metales pesados (Antonovics et al. 1971). Otro ejemplo de diferenciación de poblaciones ocurre en respuesta a suelos extremadamente ácidos versus calcáreos (Snaydon 1970). En ambos casos la tolerancia a un tipo de ambiente particular está asociada a un costo fisiológico en otro ambiente (Sultan y Bazzaz 1993).

La presencia de *L. tenuis* en comunidades asociadas a distintos suelos, cuyas diferencias podrían resumirse en el factor pH, hizo que nos planteáramos como objetivos: 1) describir la variabilidad de caracteres morfológicos y reproductivos en los distintos suelos y 2) determinar si existen poblaciones genéticamente diferenciadas en relación con ese factor.

Materiales y Métodos

Se eligieron 3 poblaciones de *L. tenuis* en tres localidades de la Depresión del Salado cercanas a la ciudad de Chascomús (Pcia Buenos Aires): Estancia La Laguna, Río Samborombón y Ruta 2, y Ruta 2 Km 114. Dichas poblaciones crecían en suelos con pH 6, 7 y 9, respectivamente, cuyas restantes características se presentan en la Tabla 1. Las comunidades vegetales de los dos primeros sitios corresponden respectivamente a las comunidades B y C definidas por León (1975) aunque también podrían constituir dos variantes de la comunidad B. La población de Ruta 2 crecía en la comunidad D (León 1975). De aquí en más nos referiremos a las localidades o sitios y a las poblaciones con el nombre de la comunidad vegetal correspondiente. De cada población se retiraron cinco individuos (genotipos) con su pan de tierra y se mantuvieron en macetas en invernáculo durante tres meses para su aclimatación. A partir de vástagos de estos individuos se hicieron estacas, con dos yemas por lo menos, que se dejaron enraizar durante quince días dentro de una cámara húmeda. El sustrato utilizado estuvo compuesto de 50% tierra fértil y 50% de vermiculita estéril. En cada una de las localidades se tomó además una muestra suficiente de suelo para llenar las macetas del invernáculo donde se hicieron crecer las estacas. De cada genotipo se plantaron cuatro estacas en cuatro macetas de 0.75 dm³ (una estaca por maceta) en el suelo del que provenían y en las dos situaciones extremas de pH 6 y 9. En cada maceta, el suelo se colocó dentro de una bolsa plástica para evitar la pérdida de nutrientes por lixiviación. Todas las macetas se mantuvieron en capacidad de campo regando con agua destilada cada dos o tres días. La temperatura mínima y máxima promedio del invernáculo, para el período del experimento, fue de 20°C (±3) y 34°C (±4) respectivamente. Al finalizar el experimento se tomaron tres muestras de cada tipo de suelo a fin de verificar los posibles cambios de pH tras la experiencia, utilizando el test de Mann Whitney. Las mediciones sobre cada individuo se realizaron en cuatro fechas sucesivas a lo largo de cinco meses (20/9/95; 24/10/95; 27/11/95 y 3/1/96). Los caracteres medidos fueron: número de ramificaciones, longitud de una ramificación marcada (la más larga en el primer muestreo), la longitud del 6°

Tabla 2. Comparaciones de a pares entre poblaciones (B, C y D) creciendo sobre suelo de pH 6. Solamente se muestran las variables que presentaron diferencias significativas en alguno de los muestreos.

Table 2. Paired comparisons among populations (B, C, and D) growing on soils with pH 6. Only the variables which showed significant differences ($p < 0.05$) in any sampling date are shown.

Variable	Número de muestreo			
	1	2	3	4
Ancho/largo 4° hoja (cm)	B-C, B-D	B-C, B-D	B-C, B-D	
Longitud del 6° entrenudo (cm)		B-D		
Número de ramificaciones				B-C, B-D
Biomasa vástago (g)				B-C, B-D

Tabla 3. Comparaciones de a pares entre poblaciones (B, C y D) creciendo sobre suelo de pH 9. Solamente se muestran las variables que presentaron diferencias significativas en alguno de los muestreos.

Table 3. Paired comparisons among populations (B, C, and D) growing on soils with pH 9. Only the variables which showed significant differences ($p < 0.05$) in any sampling date are shown.

Variable	Número de muestreo			
	1	2	3	4
Ancho/largo 4° hoja (cm)		B-C, B-D		
Long. ramif. marcada (cm)	B-C, B-D	B-C, B-D	B-C	

entrenudo de la misma rama, contando desde la base, y la relación ancho:largo del folíolo central de la 4° hoja, contando desde la base del tallo. En la última fecha se cosecharon además todas las plantas vivas y se tomó el peso seco de la biomasa subterránea, el peso seco de la parte aérea (sin tener en cuenta las hojas perdidas por senescencia), se contó el número de flores y se calculó la relación biomasa aérea/biomasa subterránea. Durante el experimento las macetas fueron rotadas al azar dos veces por semana.

Las diferencias entre poblaciones se analizaron mediante el test no paramétrico de Kruskal Wallis, con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$, haciendo comparaciones de a pares (Conover 1980). La hipótesis se puso a prueba comparando los valores de las variables seleccionadas al crecer todos los genotipos en el mismo tipo de suelo, en las cuatro fechas de muestreo. Se consideró que si los genotipos provenientes de distintas poblaciones presentaban diferencias en las características medidas, esos valores estaban fijados genéticamente y las diferencias entre las poblaciones no eran puramente debidas a plasticidad fenotípica.

Se graficaron las normas de reacción para los cinco genotipos de cada población, al variar el suelo en que se hicieron crecer las estacas. No fue posible mostrar la respuesta o normas de reacción a las variaciones del ambiente de todas las variables medidas en las distintas poblaciones o genotipos ya que en el último muestreo la única población en dos situaciones distintas de pH del suelo, que no eran extremas, era la C. Por ello se presentan además las normas de reacción para las distintas poblaciones en el muestreo 3, para el que sólo es posible comparar la respuesta de dos variables: número de ramas y longitud de la rama marcada.

Resultados

La respuesta de las plantas al crecer en un ambiente común fue variable según la característica medida y la fecha del muestreo. Cuando las plantas se desarrollaron sobre el suelo de pH 6 (proveniente del sitio B), la relación ancho/largo del folíolo central de la 4° hoja presentó diferencias entre las poblaciones en los tres primeros muestreos. En los tres casos hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los genotipos B con los C y D, pero no entre los dos últimos. La longitud del entrenudo marcado presentó diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los genotipos B y

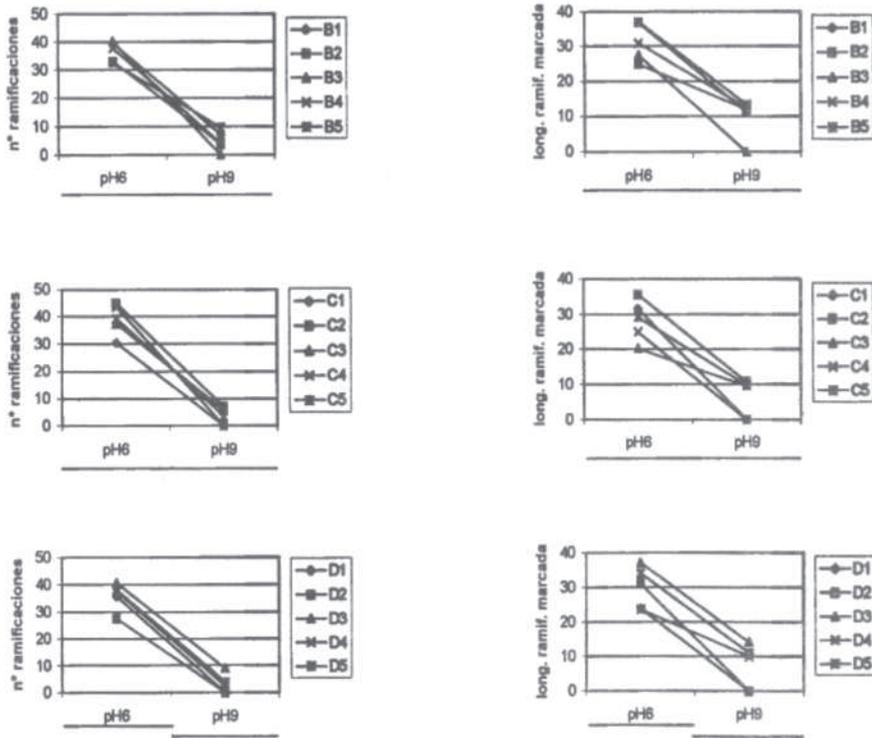


Figura 1. Normas de reacción de los cinco genotipos de las tres poblaciones (B, C y D) en suelos con pH 6 y 9 en el muestreo 3. La línea inferior completa indica que no hubo diferencias significativas entre genotipos. La línea quebrada indica que hubo algún genotipo que mostró diferencias entre los suelos.
Figure 1. Reaction norms for the five genotypes of each of three populations (B, C, and D) growing on soils with pH 6 or 9 for the third sampling date. Straight lines at the bottom of a figure indicate no differences among genotypes. Broken lines indicate differences among any of the genotypes.

D en el segundo muestreo. El número de ramas y el peso seco de la biomasa aérea presentó diferencias significativas ($p < 0.05$) en el último muestreo, entre la población B con las C y D, pero no entre estas dos últimas (Tabla 2).

Cuando las plantas se desarrollaron sobre el suelo de pH 9 (proveniente del sitio D), la relación ancho/largo del folíolo central de la 4^o hoja presentó diferencias significativas ($p < 0.05$) sólo en el segundo muestreo (entre la población B y las C y D pero no entre estas dos últimas) y la longitud de la ramificación marcada presentó diferencias significativas en los tres muestreos. En los dos primeros muestreos se detectaron diferencias significativas entre los genotipos B y los C y D ($p < 0.05$) pero no entre los dos últimos. En el tercer muestreo sólo se detectaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los B y C (Tabla 3). Debemos aclarar que las plantas que se cultivaron sobre el suelo de pH 9 fueron muriendo paulatinamente y en el último muestreo no había ninguna planta viva. Debido a que la mortandad afectó a todas las plantas independientemente del genotipo, incluidas las correspondientes a los genotipos recolectados sobre suelos con pH 9, es probable que la muerte de estas plantas se haya debido a las modificaciones en la estructura de ese tipo de suelo, generadas por el tamizado de las muestras. Visualmente se observó al transcurrir el tiempo que el suelo en esas macetas estaba muy compactado, probablemente debido a su mayor contenido de arcillas. No se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los valores de pH antes y después del experimento.

En cuanto a las normas de reacción, como puede apreciarse no existe una gran variación en la magnitud de la plasticidad entre los genotipos B y D pero sí existe variación entre los genotipos C ya que uno de ellos presenta diferencias significativas ($p = 0.03$) para los caracteres número de ramificaciones y longitud de la ramificación marcada en suelos con pH 6 y 9 (Figura 1). También se

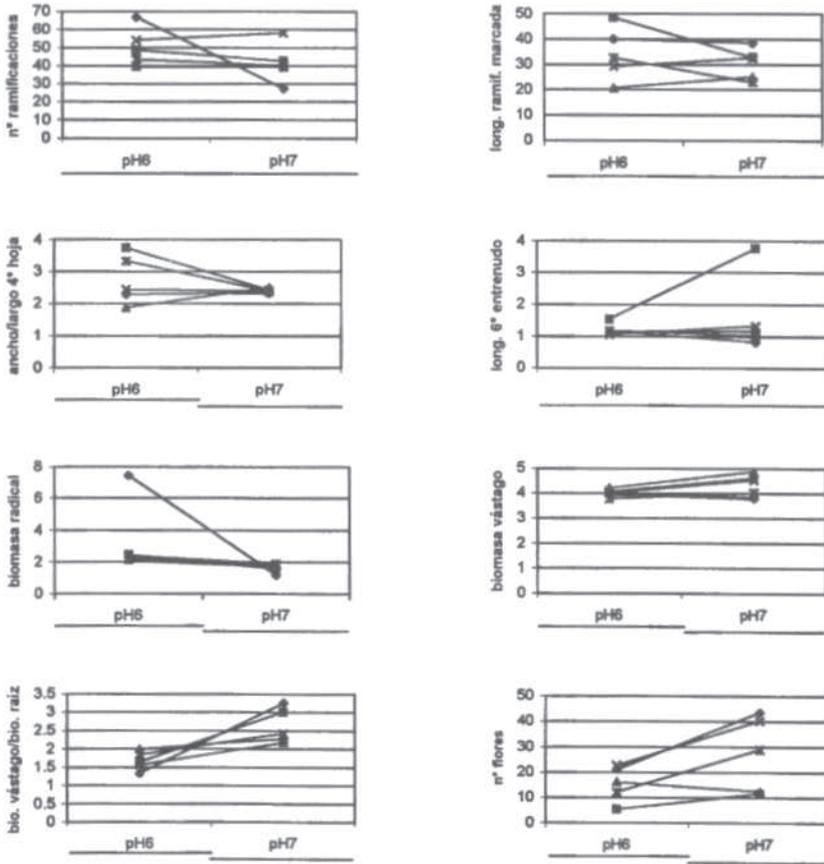


Figura 2. Normas de reacción de los cinco genotipos C en suelos con pH 6 y 7 en el último muestreo. Diferencias significativas indicadas como en la Figura 1.
Figure 2. Reaction norms for the five C genotypes grown on soils with pH 6 and 7. Significant differences indicated as in Figure 1.

observa variabilidad en la respuesta fenotípica de la población C en el ancho/largo de la 4° hoja, el peso seco de la raíz, el peso seco del vástago, la relación vástago/raíz y el número de flores (Figura 2). El/los genotipos que presentaron respuestas significativamente distintas no fueron siempre los mismos.

Discusión

En un ambiente heterogéneo las especies pueden persistir si los individuos son fenotípicamente plásticos o existe diferenciación ecotípica (Lovett Doust 1981, Scheiner y Goodnight 1984). Cuando se introduce una especie, como es el caso de *Lotus tenuis*, la población fundadora suele presentar escasa variabilidad genética. No obstante, si se produce la expansión de la población en un ambiente heterogéneo, es probable que se produzcan diferenciaciones genéticas entre las mismas (Williams et al. 1995). La dispersión de una especie es más factible cuando la misma presenta una gran plasticidad fenotípica (Rice y Mack 1991). De acuerdo a bibliografía previa, una de las causas de la

gran distribución de *Lotus tenuis* en la Pampa Deprimida parece ser su gran tolerancia a la inundación (Mazzanti et al. 1988, Vignolio et al. 1994).

Nuestros resultados señalan que existen diferencias genéticas en algunas variables morfológicas entre las poblaciones consideradas. Este es el caso de el número de ramas, la longitud de la rama más larga y la cantidad de biomasa aérea. La relación ancho /largo de un folíolo determinado y el largo del entrenudo sólo presentan diferencias significativas en algunos muestreo intermedios, probablemente a causa de una diferenciación ontogénica debido a la juventud de los individuos (Bradshaw 1965, Evans y Turkington 1988). Así en las primeras fechas de muestreo los individuos no estarían respondiendo al ambiente sino a cambios internos. A fin de evitar esta interferencia entre fenotipos y ontogenia, parece aconsejable analizar los efectos de los trasplantes en la última fecha. Si así lo hicieramos, cuando los genotipos crecen en condiciones uniformes de pH 6 en el último muestreo los genotipos B presentan más ramificaciones y menor peso del vástago que los de las otras dos poblaciones. En condiciones uniformes de pH 9 el último muestreo es el 3 y los genotipos B presentan mayor longitud de la rama marcada que los C. Según los resultados de este ensayo queda claro la importancia de realizar las comparaciones entre genotipos en dos ambientes comunes, ya que la respuesta al ambiente no es la misma para todas las variables. Además, como resultado del análisis de las normas de reacción de las distintas poblaciones se observan variaciones en la magnitud de la respuesta de ciertas variables, especialmente en el caso de los genotipos C. Estas diferencias agregan un componente plástico a los ecotipos que pudimos detectar en la condiciones estudiadas (Scheiner y Goodnight 1984, Marshall et al. 1986).

La existencia de diferentes ecotipos y la plasticidad dentro de cada población podría haber favorecido la amplia extensión que ha tenido esta especie. Algo similar a lo que encontró Chrtkova-Zertova en otra especie del mismo género (en Grime 1988), que identificó 14 ecotipos de *Lotus corniculatus* en Europa..

Bibliografía

- Antonovics J., A.D. Bradshaw y R.G. Turner. 1971. Heavy metal tolerance in plants. *Advances in Ecological Research* 7: 1-85.
- Batista W.B., R.J.C. León y S. Perelman. 1988. Las comunidades vegetales de un pastizal natural de la región de Laprida, Prov. de Buenos Aires, Argentina. *Phytocoenologia* 16: 465-480.
- Bradshaw A.D. 1965. Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. *Advances in Genetics* 13: 115-155.
- Burkart S.E., R.J.C. León y C. P. Movia. 1990. Inventario fitosociológico del pastizal de la Depresión del Salado (Pcia Buenos Aires) en un área representativa de sus principales ambientes. *Darwiniana* 30: 27-69.
- Collantes M.B., M. Kade, C. Miaczynski y O. Santanatoglia. 1988. Distribución de especies en función de factores edáficos en un pastizal natural de la Depresión del Rio Salado (Provincia de Buenos Aires, Argentina). *Studia Oecologica* 5: 77-93.
- Conover, W.J. 1980. *Practican Nonparametric Statistics*. John Wiley and sons, New York. 494 pp.
- Correa O.S., A. Aranda y A.J. Barneix. 1995. Effect of pH on the growth of *Medicago sativa* and *Lotus tenuis*. *Lotus Newsletter* 26: 12-13.
- Crawley M. 1986. *Plant Ecology*. Blackwell Scientific Publications, London. 496 pp.
- Evans, R.C. y R. Turkington. 1988. Maintenance of morphological variation in biotically patchy environment. *New Phytology* 109:369-376.
- Grime J.P., J.G. Hodgson y R. Hunt. 1988. Comparative plant ecology. A functional approach to common British species. *Lotus corniculatus*. Unwin Hyman Ltd, London. 742 pp.
- León R.J.C. 1975. Las comunidades herbáceas de la región Castelli-Pila. En *Productividad Primaria Neta de sistemas Herbáceos*. Monografías 5: 75-107. C.I.C. La Plata.
- León R.J.C., S. Burkart y C.P. Movia. 1979. Relevamiento fitosociológico del pastizal del Norte de la Depresión del Salado. *Serie Fitogeográfica* 17: 90 pp. I.N.T.A. Buenos Aires.
- Lovett Doust L. 1981. Population dynamics and local specialization in a clonal perennial (*Ranunculus repens*) II. The dynamics of leaves, and a reciprocal transplant-replant experiment. *Journal of Ecology* 69: 757-768.
- Marshall, D.L., D.A. Levin, y N.L. Fowler. 1986. Plasticity of yield components in response to stress in *Sesbania macrocarpa* and *Sesbania versicaria* (Leguminosae). *American Naturalist* 127:508-521.
- Mazzanti A., L. Montes, D. Miñón y C. Cheppi. 1988. Utilización de *Lotus tenuis* en establecimientos ganaderos de la Pampa Deprimida: Resultados de una encuesta. *Rev. Arg. Prod. Animal* 8: 301-305.

- Miñón D, G.H. Sevilla, L. Montes y O.N. Fernández. 1990. *Lotus tenuis*: Leguminosa forrajera para la Pampa Deprimida. Boletín Técnico N° 98. Fac. Cs. Agrarias-INTA Balcarce, 16 pp.
- Montes L. 1988. *Lotus tenuis*. Revisión Bibliográfica. Rev. Arg. Prod. Animal 8: 367-376.
- Reynolds, H.L. y C. D'Antonio. 1996. The ecological significance of plasticity in root weight ratio in response to nitrogen: opinion. Plant and Soil 185:75-97.
- Rice, K.J. y R.N. Mack.. 1991. Ecological genetics of *Bromus tectorum*. III. The demography of reciprocally sown populations. Oecologia 88: 91-101.
- Scheiner, S. y C.J. Goodnight. 1984. The comparison of phenotypic plasticity and genetic variation in populations of the grass *Danthonia spicata*. Evolution 38: 845-855.
- Snaydon R.W. 1970. Rapid population differentiation in a mosaic environment. 1. The response of *Anthoxanthum odoratum* populations to soils. Evolution 254: 257-269.
- Sultan S.E. y F.A. Bazzaz. 1993. Phenotypic plasticity in *Polygonum persicaria*. 3. The evolution of ecological breadth for nutrient environment. Evolution 47: 1050-1071.
- Vervoorst, F.B. 1967. Las comunidades vegetales de la Depresión del Salado (Prov. de Buenos Aires). Serie Fitogeográfica 7: 262 pp. INTA Buenos Aires.
- Vignolio O.R., N. O. Maceira y O.N. Fernández. 1994. Efectos del anegamiento en invierno y verano sobre el crecimiento y la supervivencia de *Lotus tenuis* y *Lotus corniculatus*. Ecología Austral 4: 19-28.
- Vignolio O.R., N.O. Maceira y O.N. Fernández. 1995. Efectos del anegamiento sobre el poder germinativo de las semillas de *Lotus tenuis* y *Lotus corniculatus*. Implicancias para su propagación diferencial en la Depresión del Salado (Buenos Aires, Argentina). Ecología Austral 5: 157-163.
- Williams G.H. 1988. L'intérêt des lotiers: un possible renouveau (revue bibliographique). Fourrages 116: 329-324.
- Williams D.G., R.N. Mack y R.A. Black. 1995. Ecophysiology of introduced *Pennisetum setaceum* on Hawaii: the role of phenotypic plasticity. Ecology 76: 1569-1580.

Recibido: Enero 23, 1998

Aceptado: Agosto 7, 1998