

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

*Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires.
Área Ciencias Agropecuarias*

Francisco J. Escaray

Ingeniero Agrónomo - Universidad Nacional de Mar del Plata - 2007

Lugar de trabajo:

Instituto de Investigaciones Biológicas – Instituto Tecnológico de Chascomús
CONICET / Universidad Nacional de San Martín



Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



COMITÉ CONSEJERO

.....
Director de tesis
Oscar A. Ruiz
Bioquímico (Universidad Nacional del Nordeste)
Doctor (Universidad de Buenos Aires)

.....
Co-director
Fernando L. Pieckenstain
Licenciado en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)
Doctor (Universidad de Buenos Aires)

.....
Consejero de Estudios
Pedro Insausti
Doctor (Universidad de Buenos Aires)

JURADO DE TESIS

.....
Director de tesis
Oscar A. Ruiz
Bioquímico (Universidad Nacional del Nordeste)
Doctor (Universidad de Buenos Aires)

.....
JURADO
Gustavo G. Striker
Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)
Doctor (Universidad de Buenos Aires)

.....
JURADO
Ricardo A. Wolosiuk
Licenciado en Química (Universidad de Buenos Aires)
Doctor (Universidad de Buenos Aires)

.....
JURADO
Jorge A. Zavala
Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)
Doctor (Friedrich-Schiller-Universität, Jena, Germany)

Fecha de defensa de la tesis: 20 de marzo de 2012

Dedicatoria:

A mis padres

A Ana

Agradecimientos:

A mi familia, en especial a mis padres que fueron un inmenso apoyo en todo momento, a mis sobrinos, Mateo y Genaro, que me hacían reír cuando más lo necesitaba, a mi abuela que se la pasó llevándome a Ezeiza y a Bill y a Sara que me alojaron cuando hice los cursos en Buenos Aires.

A Oscar Ruiz que siempre estuvo predispuesto a las nuevas ideas y se embolsó con mis locuras dentro y fuera del laboratorio, me ayudó con mis primeros pasos en el mundillo científico y me dio las mejores oportunidades para lograr llevar adelante el trabajo de tesis.

A Fernando Pieckenstain, en quien pude confiar para aclarar cualquier duda y mejorar mis experimentos.

A Julia Estrella por su colaboración con los ensayos de nodulación y por enseñarme a trabajar con rizobios.

A Ana Menéndez, María Marina, Andrés Gárriz, Franco Rossi, Matías Romero, Elisa Gonzalez, Agustina Scambato, Analía Sannazzaro, Mariela Echeverría, Nazareno Castagno, Matías Bailleres, Cristian Antonelli, Florencia Babuin, Rubén Rocco, Cesar Bordenave, Santiago Maiale, Rosalía Paz, Eugenia Etchepare, Julieta Pesqueira, Vanina Fracaroli, Alejandro Chaves, Patricia Uchiya y a aquellos integrantes del Intech que de alguna manera han aportado con mi trabajo de tesis.

A Pedro Insausti por su ayuda como consejero de estudios.

A Pedro, Lola, Paco, Toni, Nerea, Nuria, Amparo, Hems, Sergi, Ximo, Marisa, Loreto, Andy y en especial a Ana del laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Valencia por compartir sus conocimientos y hacerme sentir como en casa durante mis estancias por España.

A las personas del Servicio Devesa-Albufera del Ayuntamiento de Valencia, en especial a Francisco Collado y Antonio Vizcaino, por su colaboración en el trabajo realizado en el Parque Natural de la Devesa de la Albufera de Valencia.

A Josep Roselló y Marcela Rosato del Jardín Botánico de Valencia por su apoyo con los análisis citológicos.

A Secundino por su dedicación y aporte con las mediciones de fotosíntesis.

A Francisco Pina y Benito Valdés de la Facultad de Biología de la Universidad de Sevilla por su colaboración en la determinación de las plantas de *L. corniculatus* "charlii".

A los integrantes del Instituto di Genetica Vegetale, Unitá Operativa di Supporto di Perugia, en especial a Francesco Paolucci y Valentina Passeri por transmitirme su conocimiento sobre biología molecular y por su apoyo durante mi estancia en Italia.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI) y al Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) por el apoyo financiero.

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.

.....

Francisco J. Escaray

Publicaciones derivadas de la tesis:

Escaray, F. J.; Pesqueira, J.; Pieckenstain, F. L.; Carrasco, P. y Ruiz; O. A. 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**: 113-123. ISSN = 1887-956X.

Escaray, F. J.; Rosique, F. J. C.; Scambato, A. A.; Bilenca, D.; Carrasco, P.; Matarredona, A. V.; Ruiz, O. A. and Menéndez, A. B. 2010. Evaluation of a technical revegetation action performed on foredunes at Devesa de la Albufera, Valencia, Spain. *Land Degradation & Development* **21**, 239-247.

Escaray, F. J.; Menendez, A. B.; Gárriz, A.; Pieckenstain, F. L.; Estrella, M. J.; Castagno, L. N.; Carrasco, P.; Sanjuán, J. and Ruiz, O. A. 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**, 121-133.

Sanchez, D. H.; Pieckenstain, F. L.; **Escaray, F. J.;** Erban, A.; Kraemer, U.; Udvardi, M. K. and Kopka, J. 2011. Comparative ionomics and metabolomics in extremophile and glycophytic *Lotus* species under salt stress challenge the metabolic pre-adaptation hypothesis. *Plant, cell & environment* **34**, 605-617.

Escaray, F. J.; Rosato, M.; Pieckenstain, F. L.; Menéndez, A.; Rosselló, J. A.; Carrasco, P. and Ruiz, O. A. 2012. The proanthocyanidins content as a tool to differentiate between *Lotus tenuis* and *L. corniculatus* individuals. *Phytochemistry letters* **5**, 37-40.

INDICE GENERAL

1. Capitulo 1. Introducción general.....	1
1.1. El género <i>Lotus</i> y sus especies.....	1
1.1.1. Taxonomía y distribución geográfica.....	1
1.1.2. Importancia científica de ciertas especies del género <i>Lotus</i>	2
1.1.3. Importancia agronómica.....	2
1.1.4. <i>L. tenuis</i> , especie clave en ambientes con problemas de inundación y salinidad.....	5
1.1.5. Valor nutricional.....	6
1.2. Taninos condensados.....	7
1.2.1. Descripción.....	7
1.2.2. Biosíntesis.....	9
1.2.3. Funciones de los taninos condensados en plantas.....	12
1.2.4. Efectos benéficos de los taninos condensados en el forraje.....	13
1.2.5. Contenido adecuado de taninos condensados en el forraje.....	14
1.3. Antocianinas.....	14
1.4. Objetivo general.....	15
2. Capitulo 2. Contenido de taninos condensados en especies del género <i>Lotus</i>	16
2.1. Introducción.....	16
2.1.1. Contenido de taninos condensados en <i>Lotus</i> spp.....	16
2.1.2. Diferenciación entre <i>L. tenuis</i> y <i>L. corniculatus</i>	17
2.2. Hipótesis.....	18
2.3. Materiales y métodos.....	19
2.3.1. Variación en el contenido de taninos condensados entre las especies del género <i>Lotus</i>	19
2.3.1.1. Material vegetal.....	19
2.3.1.2. Tratamiento de las semillas y cultivo de plantas.....	19
2.3.1.3. Propagación vegetativa.....	20
2.3.1.4. Cuantificación de taninos condensados.....	20
2.3.1.5. Diseño experimental y análisis de datos.....	21
2.3.2. Diferenciación entre <i>L. tenuis</i> y <i>L. corniculatus</i> a través del patrón de tinción de taninos condensados.....	22
2.3.2.1. Material vegetal.....	22
2.3.2.2. Tratamiento de las semillas y cultivo de plantas.....	22
2.3.2.3. Determinación del número cromosómico.....	23
2.3.2.4. Tinción de taninos condensados.....	23
2.3.2.5. Identificación taxonómica.....	23
2.3.2.6. Diseño experimental y análisis de datos.....	24
2.4. Resultados.....	24
2.4.1. Contenido de taninos condensados en <i>L. tenuis</i>	24
2.4.1.1. Variación intra-poblacional.....	24
2.4.1.2. Variación inter-poblacional.....	24
2.4.2. Contenido de taninos condensados en <i>L. corniculatus</i>	25
2.4.2.1. Variación intra-poblacional.....	25
2.4.2.2. Variación inter-poblacional.....	26

2.4.3. Comparación del contenido foliar de taninos condensados entre <i>L. tenuis</i> y <i>L. corniculatus</i>	27
2.4.4. Diferenciación entre <i>L. tenuis</i> y <i>L. corniculatus</i> a través del patrón de tinción de taninos condensados.....	27
2.4.5. Contenidos foliares de taninos condensados en otras especies del género <i>Lotus</i>	30
2.5. Discusión.....	31
2.6. Conclusiones.....	34
3. Capítulo 3. La hibridación interespecífica como herramienta para el mejoramiento de la calidad forrajera en el género <i>Lotus</i>	35
3.1. Introducción.....	35
3.1.1. Mejoramiento de la calidad forrajera a través de la optimización del contenido foliar de taninos condensados.....	35
3.1.2. El grupo filogenético <i>Lotus corniculatus</i> y la generación de híbridos interespecíficos.....	36
3.1.3. Tolerancia al estrés salino.....	38
3.2. Hipótesis.....	40
3.3. Materiales y métodos.....	41
3.3.1. Población seleccionada de <i>L. corniculatus</i>	41
3.3.1.1. Determinación morfológica.....	41
3.3.1.2. Tratamiento de semillas y cultivo de plantas.....	41
3.3.1.3. Extracción de ADN.....	41
3.3.1.4. Amplificación y secuenciación de las regiones nrITS.....	42
3.3.1.5. Análisis filogenético.....	42
3.3.1.6. Evaluación de la supervivencia bajo estrés salino.....	42
3.3.1.7. Cuantificación de taninos condensados.....	43
3.3.2. Desarrollo y evaluación de las plantas <i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i>	43
3.3.2.1. Cruzamientos interespecíficos.....	43
3.3.2.2. Tratamiento de semillas y cultivo de plantas.....	44
3.3.2.3. Selección de genotipos.....	44
3.3.2.4. Cuantificación de taninos condensados.....	45
3.3.2.5. Confirmación del estado híbrido de las plantas obtenidas.....	45
3.3.2.6. Parámetros morfológicos.....	45
3.3.2.7. Cuantificación de antocianinas.....	46
3.3.2.8. Análisis de la calidad forrajera y cinética de digestibilidad de proteínas....	46
3.3.2.9. Evaluación de tolerancia a salinidad.....	47
3.3.2.9.1. Material vegetal y protocolo de salinización.....	47
3.3.2.9.2. Actividad del fotosistema II.....	48
3.3.2.9.3. Procedimientos analíticos.....	48
3.3.3. Cruzamientos entre las plantas híbridas.....	49
3.3.4. Retrocruzas con el parental.....	49
3.3.5. Diseño experimental y análisis de datos.....	49
3.4. Resultados.....	51
3.4.1. Evaluación de la población seleccionada de <i>L. corniculatus</i>	51
3.4.1.1. Descripción morfológica y taxonómica.....	51
3.4.1.2. Tolerancia al estrés salino.....	53

3.4.1.3. Contenido de taninos condensados.....	54
3.4.2. Desarrollo del híbrido interespecífico <i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i>	55
3.4.2.1. Obtención y viabilidad de semillas.....	55
3.4.2.2. Confirmación molecular del estado híbrido de las plantas obtenidas.....	55
3.4.2.3. Morfología de las plantas obtenidas.....	57
3.4.2.4. Contenido de taninos condensados.....	61
3.4.2.5. Contenido de antocianinas.....	64
3.4.2.6. Calidad forrajera y cinética de digestibilidad de proteínas.....	64
3.4.2.7. Evaluación bajo estrés salino.....	65
3.4.2.7.1. Parámetros de crecimiento.....	65
3.4.2.7.2. Contenido de iones.....	66
3.4.2.7.3. Actividad del fotosistema II.....	68
3.4.2.7.4. Niveles de taninos condensados y antocianinas.....	70
3.4.3. Cruzamientos entre híbridos.....	74
3.4.4. Retrocruzamientos.....	75
3.5. Discusión.....	76
3.6. Conclusiones.....	84
4. Capítulo 4. Regulación genética de la biosíntesis de taninos condensados en <i>Lotus</i> spp.....	85
4.1. Introducción.....	85
4.1.1. Especies utilizadas para el estudio de la regulación de la biosíntesis de taninos condensados.....	85
4.1.2. Regulación genética de la biosíntesis de taninos condensados.....	86
4.2. Hipótesis.....	88
4.3. Materiales y métodos.....	88
4.3.1. Material vegetal.....	88
4.3.2. Propagación y cultivo de plantas.....	89
4.3.3. Extracción de ARN y síntesis de ADNc.....	89
4.3.4. Clonación de genes.....	90
4.3.4.1. Diseño de cebadores y amplificación específica de los genes.....	90
4.3.4.2. Preparación de células competentes y transformación bacteriana.....	90
4.3.4.3. Secuenciación y diseño de cebadores específicos.....	91
4.3.4. Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real.....	92
4.3.5. Cuantificación de taninos condensados.....	93
4.3.6. Diseño experimental y análisis de datos.....	93
4.4. Resultados.....	93
4.4.1. Clonación de genes y control de la especificidad de los cebadores.....	93
4.4.2. Cuantificación relativa de la expresión génica.....	96
4.4.3. Correlación entre la expresión de los genes y los niveles de taninos condensados.....	98
4.5. Discusión.....	100
4.6. Conclusiones.....	103
5. Capítulo 5. Rol de los taninos condensados en la simbiosis mutualista entre <i>Lotus</i> spp. y rizobios.....	104
5.1. Introducción.....	104

5.1.1. Fijación biológica de nitrógeno.....	104
5.1.2. Especificidad de la simbiosis entre rizobios y las especies de <i>Lotus</i>	104
5.2. Hipótesis.....	106
5.3. Materiales y métodos.....	106
5.3.1. Material vegetal.....	106
5.3.2. Cepas utilizadas para la inoculación de <i>Lotus</i> spp.....	107
5.3.3. Inoculación y cultivo de plantas.....	107
5.3.4. Análisis de taninos condensados.....	108
5.3.5. Determinación de nitrógeno.....	109
5.3.6. Diseño experimental y análisis estadístico.....	109
5.4. Resultados.....	110
5.4.1. Ensayos realizados con las plantas transgénicas de <i>L. corniculatus</i>	110
5.4.2. Ensayos realizados con diferentes especies de <i>Lotus</i>	113
5.4.2.1. Contenido foliar de nitrógeno.....	114
5.4.2.2. Parámetros de crecimiento.....	115
5.4.2.3. Nódulos.....	116
5.4.2.4. Contenido de taninos condensados.....	117
5.4.2.5. Diferencias cualitativas de los taninos condensados.....	119
5.5. Discusión.....	121
5.6. Conclusiones.....	123
6. Consideraciones finales.....	124
Referencias bibliográficas.....	131
Apéndices.....	149
Apéndice 1.....	149
Apéndice 2.....	154
Apéndice 3.....	156

INDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Contenido de TC en hojas de plantas previamente seleccionadas de la accesión “INTA Pampa” de <i>L. tenuis</i> . Valores expresados en mg TC/g MS.....	24
Tabla 2.2. Contenido foliar de TC de distintas accesiones de <i>L. tenuis</i> . Valores expresados en mg TC/g MS.....	25
Tabla 2.3. Contenido de TC en hojas de plantas de <i>L. corniculatus</i> “San Gabriel” previamente seleccionadas. El símbolo * indica diferencia significativa dentro de cada columna (Prueba T para muestras independientes, $p < 0,0001$).....	26
Tabla 2.4. Contenido foliar de TC en diferentes accesiones de <i>L. corniculatus</i> , los valores están expresados en mg TC/g MS. Prueba de Kruskal-Wallis, comparación de a pares. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).....	26
Tabla 2.5. Contenido foliar de TC en <i>L. tenuis</i> y <i>L. corniculatus</i> , valores expresados en mg TC/g MS. Prueba de Kruskal-Wallis, el símbolo * significa diferencia significativa dentro de cada columna ($p < 0,01$).....	27
Tabla 2.6. Contenido foliar de TC en <i>L. corniculatus</i> y <i>L. uliginosus</i> , valores expresados en mg TC/g MS. Prueba de Kruskal-Wallis, el símbolo * indica diferencias significativas dentro de cada columna ($p < 0,01$).....	30
Tabla 2.7. Contenido foliar de TC en especies de <i>Lotus</i> utilizadas como modelo científico. Prueba de Duncan, medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).....	30
Tabla 3.1. Densidad de tricomas y relación largo/ancho de hojas de <i>Lotus</i> spp. Prueba de Kruskal-Wallis. Comparación de a pares. Dentro de cada bloque de color gris rangos con una letra en común no son diferentes significativamente ($p < 0,05$).....	58
Tabla 3.2. Área foliar de los distintos genotipos de <i>Lotus</i> spp. Valores expresados en cm^2 . Test de Duncan, dentro de cada bloque gris medias con letras en común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).....	59
Tabla 3.3. Peso seco de hoja, tallo y vástago (valores expresados en gramos) y la relación hoja/tallo de plantas de <i>Lotus</i> spp. Test de Tukey, dentro de cada bloque gris medias con letras en común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).....	61
Tabla 3.4. Contenidos de TC en los genotipos de <i>Lotus</i> spp. evaluados. Lc: <i>L. corniculatus</i> “charlii”, Lt: <i>L. tenuis</i> y LH: <i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 1, 2, 3 y 4. Prueba de Kruskal-Wallis. Comparación de a pares, dentro de cada bloque gris, rangos con letras en común no son significativamente diferentes.....	63

- Tabla 3.5.** Contenido de TC en raíz de *Lotus* spp. expresados en mg TC/g MS. Prueba de Duncan, dentro de cada bloque gris medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).....63
- Tabla 3.6.** Contenido de antocianinas en tallo de *Lotus* spp. Prueba de Duncan, medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).....64
- Tabla 3.7.** Peso seco de hoja, tallo y raíz de los diferentes genotipos de *Lotus* spp. bajo tratamiento control y salino. Prueba de Duncan, dentro de cada bloque gris medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).....66
- Tabla 3.8.** Contenido de K^+ y Na^+ en “hojas viejas” y “hojas nuevas” de *Lotus* spp. Prueba de Duncan, dentro de cada bloque gris medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).....67
- Tabla 3.9.** Contenido de Cl^- en “hojas viejas” y “hojas nuevas” de *Lotus* spp. Prueba de Duncan, dentro de cada bloque gris medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).....68
- Tabla 3.10.** Coeficiente de atenuación fotoquímico (qP) y coeficiente de atenuación no fotoquímico (qN) en plantas de *Lotus* spp. bajo tratamiento control y salino. Valores promedio de las últimas 4 mediciones.....69
- Tabla 3.11.** Contenido de TC en hojas de *Lotus* spp. Prueba de Duncan, dentro de cada bloque gris medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).....71
- Tabla 3.12.** Contenido de TC en tallos de *Lotus* spp. Prueba de Duncan, dentro de cada bloque gris medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).....72
- Tabla 3.13.** Contenido de TC en raíces de *Lotus* spp. Prueba de Duncan, dentro de cada bloque gris medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).....73
- Tabla 3.14.** Contenidos de antocianinas en tallo de *Lotus* spp. Valores expresados en milimoles de cianidina/g PF. Prueba de Duncan, dentro de cada bloque gris medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).....73
- Tabla 3.15.** Contenido foliar de TC en plantas previamente seleccionadas obtenidas del cruzamiento entre híbridos *L. tenuis* x *L. corniculatus*. Valores expresados en mg TC/g MS. Prueba de Duncan, dentro de cada bloque gris medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).....75
- Tabla 3.16.** Contenido foliar de TC en plantas previamente seleccionadas. El símbolo * indica diferencias significativas comparando entre los dos grupos de plantas ($p < 0,001$).....75

Tabla 4.1. Cebadores específicos utilizados para la cuantificación relativa a tiempo real de la expresión de genes que regulan la biosíntesis de TC en <i>Lotus</i> sp.....	92
Tabla 4.2. Genes clonados en las plantas Lt: <i>L. tenuis</i> “Pampa INTA” y Lc: <i>L. corniculatus</i> “charlii” y su identidad con secuencias depositadas en el banco de genes (NCBI). Referencias: 1. (Paolucci <i>et al.</i> , 2005); 3. (Bavage <i>et al.</i> , 1997); 5. Allison G.G. y Robbins, M.P., sin publicar; 6. Hughes, J.W. y Robbins, M.P., sin publicar; 7. (Paolucci <i>et al.</i> , 2007) y 8. (Yoshida <i>et al.</i> , 2010).....	94
Tabla 4.3. Correlación entre la expresión de los genes que regulan la biosíntesis de TC y el contenido de TC. Correlación de Pearson.....	99
Tabla 4.4. Correlación entre la expresión relativa de los factores de transcripción y los genes evaluados. Correlación de Pearson.....	99
Tabla 4.5. Expresión relativa de genes relacionados a la biosíntesis de TC y niveles de TC foliares en plantas obtenidas del cruzamiento entre los cuatro genotipos <i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> seleccionados. nd: no determinado.....	100
Tabla 5.1. Cepas utilizadas para la inoculación de plantas de <i>Lotus</i> spp. El símbolo + significa que la formación de nódulos; el símbolo ± significa la formación de pseudonódulos; la letra E significa fijación de nitrógeno eficiente mientras que la I significa fijación de nitrógeno ineficiente.....	107
Tabla 5.2. Altura y peso seco del vástago de los diferentes genotipos transgénicos de <i>L. corniculatus</i> . Prueba de Duncan, dentro de cada bloque gris medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).....	111
Tabla 5.3. Número de nódulos formados en raíces de los diferentes genotipos transgénicos de <i>L. corniculatus</i> . Prueba de Duncan, dentro de cada bloque gris medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).....	112
Tabla 5.4. Contenido de TC en raíces de los diferentes genotipos de <i>L. corniculatus</i> . Prueba de Duncan, dentro de cada bloque gris medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).....	112
Tabla 5.5. Peso seco de vástago de los diferentes materiales de <i>Lotus</i> evaluados. Valores expresados en gramos. Prueba de Duncan, dentro de cada bloque gris medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).....	116
Tabla 5.6. Número de nódulos en <i>Lotus</i> spp. inoculados con dos tipos de cepas (NZP2309 y NZP2213). Prueba de Duncan, dentro de cada bloque gris medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).....	117
Tabla 5.7. Contenido de TC totales en raíces de <i>Lotus</i> spp. evaluados bajo tratamiento control, inoculado con NZP2309 e inoculado con NZP2213. Prueba de Duncan, dentro de	

cada bloque gris medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).....	118
Tabla 5.8. Contenido de TC en nódulos de los diferentes materiales de <i>Lotus</i> spp. inoculados con las cepas NZP2213 y NZP2039. Prueba de Duncan, dentro de cada bloque gris medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).....	118
Tabla 5.9. Contenido de TC en vástago de los diferentes materiales de <i>Lotus</i> spp. evaluados bajo tratamiento control, inoculados con la cepa NZP2309 e inoculados con la cepa NZP2213. Prueba de Duncan, dentro de cada bloque gris medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).....	119
Tabla 6.1. Comparación de las características relevantes entre las especies y poblaciones de <i>L. tenuis</i> y <i>L. corniculatus</i>	127
Tabla A1. Valores de pH y conductividad eléctrica (CE) a diferentes profundidades de suelo (0 a 10, 10 a 15 y 10 a 20 cm) de cinco malladas de la Albufera de Valencia (Ramírez De Arellano, 2007).....	42
Tabla A2. Especies acompañantes de las poblaciones de <i>L. corniculatus</i> en los diferentes tipos de malladas.....	56

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.1.** Especies de *Lotus* creciendo en diversos ambientes. **A.** *L. creticus* en el primer cordón dunar de la costa mediterránea (Valencia, España). **B.** *L. tenuis* en bajos inundados de la Pampa deprimida (Buenos Aires, Argentina). **C.** *L. uliginosus* en ambientes contaminados con metales pesados (Estarreja, Portugal). **D.** *L. corniculatus* en ambientes salino-alcálicos (Valencia, España).....3
- Figura 1.2.** *L. tenuis* bajo pastoreo directo. Primavera del 2010, Chacra Experimental Integrada Chascomús.....4
- Figura 1.3.** Unidad estructural común (difenilpirano) de los flavonoides. Constituye las unidades formadoras de los TC y antocianinas.....7
- Figura 1.4.** Estructura de los compuestos flavan-3-oles más comunes.....8
- Figura 1.5.** Modelo de la estructura de los TC. Si R = H u OH la estructura representa procianidinas o prodelfinidinas respectivamente.....8
- Figura 1.6.** Biosíntesis de TC y antocianinas, mostrando las enzimas e intermediarios implicados. *4CL*: 4-cumarato CoA ligasa, *ANR*: antocianidina reductasa, *ANS*: antocianina sintasa, *C4H*: cinamato 4-hidroxilasa, *CHI*: chalcona isomerasa, *CHS*: chalcona sintasa, *DFR*: dihidroflavanol reductasa, *F3H*: flavanona-3-hidroxilasa, *F3'H*: flavonoide 3'-hidroxilasa, *F3'5'H*: flavonoide 3'-5'-hidroxilasa, *FLS*: flavonol sintasa, *GST*: glutatión S-transferasa, *GT*: glicosiltransferasas, *LAR*: leucoantocianidina reductasa, *MATE*: familia de extrusión de multifármacos y tóxicos (del inglés “multidrug and toxic compound extrusion”), *PAL*: fenilalanina amonio-liasa. El signo de pregunta indica la actividad putativa de la proteína codificada por *LAR2*.....10
- Figura 1.7.** Esquema simplificado de las vías de hidroxilación que pueden tomar los precursores de las unidades de flavan 3-ol que forman los TC.....12
- Figura 1.8.** Estructura general y nomenclatura de las principales antocianidinas.....15
- Figura 2.1.** Vista de la cámara de cultivo donde se realizaron los ensayos con *Lotus* sp...20
- Figura 2.2.** Plantas de *Lotus* spp. en estadio de dos hojas desarrolladas, dos semanas luego de la siembra.....22
- Figura 2.3.** Tinción de TC en hojas de *Lotus* spp. Las fotos A, B y C corresponden a hojas de *L. tenuis*; las fotos D, E y F a *L. corniculatus*. A. “INTA Pampa”, B. “Pool A”, C. “Esmeralda”, D. “San Gabriel”, E. “charlii”, F. “Gladiador”.....28
- Figura 2.4.** Células mitóticas de *Lotus* spp. teñidas con solución Felguen y hematoxilina propiónica (1000 X). Las fotos i, ii y iii corresponden a *L. tenuis* y las fotos iv, v y vi a *L.*

corniculatus; i. “Delta del Ebro”, ii. “INTA Pampa”, iii. “Pool A”, iv. “Charlii”, v. “Gladiador” y vi. “San Gabriel”. La barra equivale a 5 μ m.....28

Figura 2.5. Patrón de tinción de TC en hojas de diferentes plantas de la especie *L. corniculatus*.....29

Figura 2.6. Patrón de tinción de TC en cotiledones y primera hoja desarrollada de plantas de *L. tenuis* y *L. corniculatus*.....29

Figura 2.7. Tinción de TC en hojas de *L. japonicus*. **A.** ecotipo Gifu. **B.** ecotipo MG20.....31

Figura 3.1. Árbol filogenético de las especies pertenecientes al grupo *Lotus corniculatus*, basada en la secuencia nucleotídica de la región nrITS. Adaptado de Escaray *et al.* (2011).....36

Figura 3.2. Esquema de la respuesta bifásica causada por el estrés salino en plantas.....39

Figura 3.3. Proceso de emasculación de las flores de *Lotus*. **A.** Flor con los 5 pétalos. **B.** Flor en donde se han quitado los dos pétalos denominados “alas”. **C.** Flor en donde se han quitado todos los pétalos menos el “estandarte”. **D.** Flor emasculada lista para ser polinizada.....44

Figura 3.4. **A.** Maceta con dos plantas de *L. tenuis* x *L. corniculatus* 1. **B.** Ensayo realizado en primavera-verano del 2009.....46

Figura 3.5. **A.** Esquema de la aplicación del tratamiento salino utilizado en el ensayo. **B.** Planta de *Lotus* sp., con recuadros blancos se marcan aquellas hojas que fueron incluidas en la fracción de “hojas nuevas”, el resto de hojas que no se encuentran recuadradas se incluyeron dentro de la fracción de las “hojas viejas”.....47

Figura 3.6. Foto de plantas de la población de *L. corniculatus* de la Devesa, donde se pueden observar los rizomas.....51

Figura 3.7. Filogenia de las especies de *Lotus* basada en los polimorfismos de la secuencia nucleotídica de la región nrITS. El árbol fue construido a partir de la secuencia de nucleótidos usando el algoritmo UPGMA y las distancias filogenéticas fueron calculadas usando el método de p-distancia. Las líneas horizontales son proporcionales a diferencias en los nucleótidos e indican la p-distancia. Las especies seguidas con un código alfa numérico son aquellas cuya secuencia fue obtenida a partir de la base de datos *GenBank*. La secuencia de *L. corniculatus* “charlii” y *L. tenuis* “Pampa INTA” se encuentran subrayadas.....52

Figura 3.8. Síntomas causados por el estrés salino en plantas de *Lotus* spp. **A.** *L. corniculatus* “San Gabriel”. **B.** *L. tenuis*. **C.** *L. creticus*. **D.** *L. corniculatus* “charlii”.....53

- Figura 3.9.** Supervivencia de plantas de *Lotus* spp. bajo estrés salino. Prueba de Kruskal-Wallis, comparación de a pares ($p < 0,05$), medias con una letra en común no son diferentes significativamente.....54
- Figura 3.10.** Tinción de TC en hojas de *L. corniculatus* que se encontraban en las malladas de la Devesa de la Albufera de Valencia.....54
- Figura 3.11.** Vainas que produjeron las flores de *L. tenuis* fertilizadas con polen de *L. corniculatus* “charlii”.....55
- Figura 3.12.** Fragmentos de la secuencia de nucleótidos de la región nrITS de *Lotus* spp.; LH1.1, 2, 3, 4, 5 y 6: secuencias correspondientes a diferentes colonias de bacterias transformadas con el vector plasmídico clonado con el producto de amplificación de la región nrITS proveniente de la planta *L. tenuis* x *L. corniculatus* 1; LH3.1, 2 y 3 secuencias correspondientes a diferentes colonias de bacterias transformadas con el vector plasmídico clonado con el producto de amplificación de la región nrITS proveniente de la planta *L. tenuis* x *L. corniculatus* 3.....56
- Figura 3.13.** Árbol filogenético construido a partir de la secuencia de nucleótidos de la región nrITS de *Lotus* spp. LH: *L. tenuis* x *L. corniculatus* 1 y 3.....56
- Figura 3.14.** Plantas de *Lotus* spp. de 30 días de edad cultivadas en las mismas condiciones. **A.** *L. tenuis* “Pampa INTA”. **B.** *L. corniculatus* “charlii”. **C.** *L. tenuis* x *L. corniculatus*...57
- Figura 3.15.** Morfología de las plantas de *Lotus* spp. luego de 30 días de cultivo. **A.** Número de tallos por planta. **B.** Largo del tallo principal. Lc: *L. corniculatus* “charlii”, Lt: *L. tenuis* y LH: *L. tenuis* x *L. corniculatus* 1, 2, 3 y 4. Prueba de Duncan, dentro de cada gráfico medias con letras en común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).....57
- Figura 3.16.** Foliolos de diferentes genotipos de *Lotus* aumentados 10 veces. **A.** *L. tenuis* “Pampa INTA”. **B.** *L. tenuis* x *L. corniculatus* 2. **C.** *L. corniculatus* “charlii”.....58
- Figura 3.17.** Hojas de *Lotus* spp. Las tres primeras hojas son normales. En las restantes, puede observarse el foliolo adicional señalado con una flecha azul. Lc: *L. corniculatus* “charlii”, Lt: *L. tenuis* y LH: *L. tenuis* x *L. corniculatus* 1, 2, 3 y 4. La barra equivale a 5 cm.....59
- Figura 3.18.** Genotipos *L. tenuis* x *L. corniculatus* seleccionados, en los que se pueden observar los rizomas indicados con flechas azules.....60
- Figura 3.19.** Tinción foliar de TC de los materiales de *Lotus* spp. evaluados. **A.** *L. tenuis* “Pampa INTA”; **B, C, D, E, F, G** y **H.** diferentes plantas *L. tenuis* x *L. corniculatus*; **I.** *L. corniculatus* “charlii”.....61
- Figura 3.20.** Tinción de TC en vástago de los genotipos de *Lotus* spp. evaluados.....62
- Figura 3.21.** Cinética de digestibilidad *in-vitro* de proteínas de vástago de *Lotus* spp....65

- Figura 3.22.** Atenuación no fotoquímica (NPQ) en plantas de *Lotus* spp. bajo tratamiento control y salino.....70
- Figura 3.23.** Frecuencia absoluta del número de plantas obtenidas del cruzamiento entre híbridos en función de su contenido foliar de TC totales.....74
- Figura 3.24.** Tinción de TC en hojas de diferentes plantas obtenidas del cruzamiento entre híbridos *L. tenuis* x *L. corniculatus*.....75
- Figura 3.25.** Plantas obtenidas del cruzamiento entre híbridos *L. tenuis* x *L. corniculatus* (primavera del 2011).....79
- Figura 3.26.** Plantas de *Lotus* spp. bajo tratamiento control y salino. **A.** *L. tenuis* “Pampa INTA”, **B.** *L. corniculatus* “charlii”, **C.** *L. tenuis* x *L. corniculatus* 1, **D.** *L. tenuis* x *L. corniculatus* 2, **E.** *L. tenuis* x *L. corniculatus* 3 y **F.** *L. tenuis* x *L. corniculatus* 4.....80
- Figura 3.27.** Contenido foliar de TC en *Lotus* spp. Lc: *L. corniculatus* “charlii”; Lt: *L. tenuis*; Lt x Lc: plantas híbridas; (Lt x Lc) x Lc: retrocruza de las plantas híbridas con *L. corniculatus* “charlii” y (Lt x Lc) x (Lt x Lc): cruzamientos entre plantas híbridas.....84
- Figura 4.1.** Biosíntesis de las unidades iniciadoras de los TC (catequina y epicatequina) a partir de leucocianidina en *A. thaliana* y *L. corniculatus* (adaptado de Paolucci *et al.*, 2007).....86
- Figura 4.2.** Modelo esquemático de la estructura y regulación del complejo que activa la transcripción de los genes que regulan la biosíntesis de TC.....87
- Figura 4.3.** Visualización bajo luz UV de una de las repeticiones de las muestras de ARN obtenidas a partir de hojas y tallos de clones de los diferentes genotipos. Se pueden observar las bandas discretas correspondientes al ARN ribosomal (gel de agarosa 1% en buffer TAE 1X, 10V/cm).....89
- Figura 4.4.** Eficiencia de amplificación de los amplicones *1aEF*, *FeDFR*, *FeANS* y *FeLAR2*. Entre paréntesis se presenta la ecuación de la recta ajustada y su coeficiente de regresión.....95
- Figura 4.5.** Geles en donde se sembró el producto obtenido de la RT-qPCR de los genes *1aEF*, *FeTT2*, *FeCHS* y *FeLARI* para las muestras de hoja de Lt: *L. tenuis* “Pampa INTA”, Lc: *L. corniculatus* “charlii” y LH: *L. tenuis* x *L. corniculatus* 1, 2, 3 y 4. Gel de agarosa 2% en buffer TAE 1X, 10V/cm. Marcador de peso molecular 1Kb+.....95
- Figura 4.6.** Expresión relativa de los genes que regulan la biosíntesis de TC en hojas de plantas de *Lotus* spp. Valores expresados como $2^{-\Delta\Delta C_t}$ referidos a *L. tenuis*. Medias con la misma letra no presentan diferencias significativas ($p < 0,05$). Lc: *L. corniculatus* “charlii”, Lt: *L. tenuis* “Pampa INTA” LH: *L. tenuis* x *L. corniculatus* 1, 2, 3 y 4.....97

- Figura 4.7.** Expresión relativa de los genes que regulan la biosíntesis de TC en tallos de plantas de *Lotus* spp. Valores expresados como $2^{-\Delta\Delta C_t}$ referidos a hoja de *L. tenuis*. Medias con la misma letra no presentan diferencias significativas ($p < 0,05$). Lc: *L. corniculatus* “charlii”, Lt: *L. tenuis* “Pampa INTA” LH: *L. tenuis* x *L. corniculatus* 1, 2, 3 y 4.....98
- Figura 4.8.** Tinción de TC en hojas de *L. japonicus*. **A.** Ecotipo Gifu. **B.** Ecotipo MG20.....102
- Figura 4.9.** Tinción de TC en hojas de plantas obtenidas del cruzamiento entre híbridos interespecíficos. **A.** TC presentes en el tejido adyacente a los haces vasculares y distribuidos en el mesófilo. **B.** TC distribuidos en el mesófilo. **C.** TC presentes en el tejido adyacente a los haces vasculares. **D.** Sin presencia de TC.....103
- Figura 5.1.** Sistema de jarras Leonard utilizado para los ensayos de inoculación de plantas de *Lotus* spp. con cepas de rizobios.....108
- Figura 5.2.** **A.** Ejemplo de clones bajo tratamiento control sin inocular y tratamiento inoculado con la cepa NZP2213. **B.** Ejemplo de nódulos formados por la cepa NZP2213. **C.** Ejemplo de nódulos formados por la cepa NZP2309.....110
- Figura 5.3.** Tinción de TC en raíces, como ejemplo se muestran raíces y nódulos de clones del genotipo Sn10. **A.** Tratamiento control sin inocular; **B.** Tratamiento inoculado con la cepa NZP2213; **C.** Tratamiento inoculado con la cepa NZP2037; **D.** Tratamiento inoculado con la cepa NZP2309.....113
- Figura 5.4.** Plantas de *Lotus* spp. bajo tres tratamientos: Control: sin inocular; NZP2213: inoculado con la cepa NZP2213; NZP2309: inoculado con la cepa NZP2039.....114
- Figura 5.5.** Contenido de nitrógeno en vástago de los diferentes genotipos de *Lotus* spp. Lc: *L. corniculatus* “charlii”, Lt x Lc 2: *L. tenuis* x *L. corniculatus* 2, Lt: *L. tenuis* “Pampa INTA”, Lu: *L. uliginosus*. **A.** comparación entre tratamientos. **B.** comparación entre genotipos. Prueba de Duncan, dentro de cada gráfico medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).....115
- Figura 5.6.** Raíces de *Lotus* spp. en donde se pueden observar los nódulos formados por la cepa NZP2309.....116
- Figura 5.7.** Cromatografía en capa fina de celulosa de los TC hidrolizados provenientes de raíces sin nódulos de los clones de los diferentes genotipos evaluados. Dpy: delfinidina; Cy: cianidina; C: control sin inocular; M: inoculado con la cepa NZP2213; B: inoculado con la cepa NZP2039; Lt: *L. tenuis*; Lc: *L. corniculatus*; Lu: *L. uliginosus*; LH2: *L. tenuis* x *L. corniculatus* 2.....120
- Figura 5.8.** Cromatografía en capa fina de celulosa de los TC hidrolizados provenientes de nódulos de *Lotus* spp. Cy: cianidina; Dp: delfinidina; NZP2213: tratamiento inoculado con la cepa NZP2213; NZP2309: tratamiento inoculado con la cepa NZP2309.....120

Figura 5.9. Cromatografía en capa fina de celulosa de los TC hidrolizados provenientes de vástago de *Lotus* spp. Dpy: delfinidina; Cy: cianidina; Lc: *L. corniculatus* “charlii”; LH: *L. tenuis* x *L. corniculatus* 1, 2, 3 y 4; Lu: *L. uliginosus* “Maku”.....122

Figura 6.1. Resumen gráfico de la metodología propuesta para la diferenciación entre *L. tenuis* y *L. corniculatus*. Las semillas de la accesión de *L. tenuis* a evaluar se hacen germinar y se cultivan hasta que presenten dos hojas expandidas. Las plántulas así logradas pueden resultar en una mezcla entre *L. tenuis* y *L. corniculatus* las cuales son similares morfológicamente (A). De estas plantas se extrae una hoja (B) la cual es decolorada con etanol. Posteriormente en la hoja decolorada se realiza la tinción de TC y su patrón de tinción permite diferenciar de que especie se trata (C).....127

Figura 6.2. Esquema de los tratamientos evaluados y como ello influye en la formación de nódulos y su contenido de TC. FBN: Fijación Biológica de Nitrógeno.....129

Figura A1. Esquema topográfico de la Devesa de la Albufera de Valencia. En el mismo se pueden observar los tres tipos de suelos predominantes y sus horizontes (Rubio Delgado *et al.*, 1998).....150

Figura A2. A. Foto satelital de la Devesa del Parque Natural de la Albufera de Valencia. En ella se indican mediante círculos rojos la posición de las poblaciones de *L. corniculatus*. Los círculos de mayor tamaño indican las poblaciones representativas; su letra corresponde con las fotos de la derecha. B. Planta de *L. corniculatus* de la población que se encontraba en la zona con mayor conductividad eléctrica, lugar: Mallada de la Mata del Fang. C. Plantas de *L. corniculatus* creciendo en asociación con *Elymus elongatus* en la zona de menor conductividad eléctrica. D. Plantas de *L. corniculatus* creciendo en la zona de conductividad eléctrica intermedia, lugar: Mallada de la Rambla.....152

Figura A3. Plantas de *L. corniculatus* creciendo junto con *Juncus acutus* en dos de las poblaciones estudiadas en la Devesa de la Albufera de Valencia (España).....153

ABREVIATURAS

- TC = taninos condensados
- MS = materia seca
- nrITS = secuencias nucleotídicas de las regiones espaciadoras internas transcritas del ARN ribosomal
- PAL = fenilalanina amonio-liasa
- CHS = chalcona sintasa
- DFR = dihidroflavonol 4-reductasa
- ANS = antocianina sintasa
- ANR = antocianidina reductasa
- LAR = leucoantocianidina reductasa
- MATE = familia de extrusión de multifármacos y tóxicos
- d.e. = desvío estándar

RESUMEN

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

Algunas especies del género *Lotus* son utilizadas como forrajeras en ambientes de menor aptitud agrícola, las cuales presentan contenidos variables de taninos condensados (TC). La optimización del contenido de TC constituye un objetivo tecnológico de mejora en la calidad forrajera de las leguminosas. *L. tenuis* es considerada relativamente tolerante a diferentes estreses ambientales, pero no existen reportes relacionados a la optimización de sus niveles de TC. Debido a ello y utilizando el protocolo DMACA-HCl, se cuantificaron los niveles de TC en numerosas poblaciones de *L. tenuis*, observándose niveles inferiores a los recomendados para leguminosas forrajeras y quedando en evidencia simultáneamente, que no es posible su optimización por selección recurrente. Ello motivó el interés en evaluar la hibridación interespecífica entre *L. tenuis* y una población seleccionada de *L. corniculatus* como alternativa tecnológica de mejora. De esta manera, se obtuvo un material con mejores características forrajeras y mayor tolerancia al estrés salino. A su vez, estos materiales resultaron de interés para el estudio de la regulación transcripcional de los genes relacionados a la biosíntesis de TC, observándose que no dependen únicamente de los factores de transcripción y genes que presentan un papel central en otras especies. Por último, en ensayos de inoculación con rizobios, se determinó que los niveles de TC en raíces de *Lotus* no se encuentran relacionados a la especificidad de la simbiosis y que la

formación de nódulos inefectivos determina un incremento en los niveles de estos metabolitos secundarios.

Palabras clave: *Lotus*, taninos condensados, hibridación interespecífica, estrés salino, *TT2* rizobios

ABSTRACT

Condensed tannins in legumes of the *Lotus* genus: Study of their biological functions and their utility for increasing forage quality of species used for agronomical purposes.

Some *Lotus* species are used as forage in environments with low agronomical aptitude, and show variable condensed tannin (CT) levels. The optimization of CT levels is an important technological aim for legume breeding. *L. tenuis* shows a good level of tolerance to several environmental stresses, as compared to other species of this genus, but no attempts to optimize CT contents in this species have been done so far. Keeping this in mind, CT levels were quantified in *L. tenuis* populations using the DMACA-HCl protocol, and the levels found were lower than those recommended for forage legumes. In turn, the low degree of variability in CT contents among different individuals did not allow increasing CT levels to adequate values by using recurrent selection in this species. This led our interest to assess the potential of the interspecific hybridization between *L. tenuis* and a selected population of *L. corniculatus* as an alternative approach. In this way, hybrid plant material with improved forage quality and higher saline stress tolerance was obtained. In addition, this material was used to gain insight on the transcriptional regulation of genes involved in CT biosynthesis. Thus CT levels were found to depend not only on transcriptional factors and genes that play a central role in other plant species, but also to be regulated by additional mechanisms. Finally, the study of the role of CT in the symbiosis between *Lotus* spp and rhizobia demonstrated that root CT levels are not related to the specificity of the symbiosis.

However, CT levels were increased in ineffective nodules, thus suggesting a role for these metabolites in plant defense against non-beneficial microorganisms.

Palabras clave: *Lotus*, condensed tannins, interspecific hibridization, saline stress, *TT2* rhizobium

1. Capítulo 1. Introducción general.

1.1. El género *Lotus* y sus especies.

1.1.1. Taxonomía y distribución geográfica.

Las especies del género *Lotus* pertenecen a la tribu Loteae DC., familia Fabaceae (Santos 2007). Dicha tribu es un grupo monofilético (Allan y Porter 2000, Arambarri 2000, Allan *et al.* 2003) compuesto por cuatro géneros (Clifford y Grant 1993). Las plantas pertenecientes a esta tribu producen flores caracterizadas por una garra o quilla con los márgenes endurecidos y plegados hacia dentro, estambres diadelfos y un estilo endurecido desde la base (Kirkbride 1999, Arambarri 2000). El nombre y la descripción del género *Lotus* fueron introducidos por Linnaeus en 1753 y desde entonces la delimitación de especies dentro del mismo ha sufrido cambios en numerosas ocasiones (Allan y Porter 2000, Arambarri 2000). La delimitación del género *Lotus* es considerada una de las más problemáticas dentro de la taxonomía de la tribu *Loteae* (Clifford y Grant 1993, Allan *et al.* 2003). Ello se debe en parte a la limitación del uso de caracteres morfológicos para diferenciarlas (Arambarri 1999). Afortunadamente, las técnicas moleculares recientemente desarrolladas han contribuido significativamente a una mejor diferenciación entre las diferentes especies incluidas en el género (Campos *et al.* 1994, Gauthier *et al.* 1997, Allan y Porter 2000, Fjellstrom *et al.* 2001, Allan *et al.* 2003, García De Los Santos y Steiner 2003, Allan *et al.* 2004, Degtjareva *et al.* 2006, Degtjareva *et al.* 2008, Pina y Valdés 2009, Sandral *et al.* 2010). En particular aquella que se basa en los polimorfismos de las secuencias nucleotídicas de las regiones espaciadoras internas transcritas del ARN ribosomal (nrITS del inglés “Nuclear Ribosomal Internal Transcribed Spacer”) a permitido que se reconozcan hoy en día entre 100 y 130 especies incluidas dentro del género *Lotus*.

La mayoría de las especies de *Lotus* son nativas de Europa, Asia, África, Australia y algunas islas del océano Atlántico y Pacífico (Kirkbride 1999, Degtjareva *et al.* 2008). Pocas especies fueron descritas como nativas del Nuevo Mundo, pero más tarde segregaron en cuatro géneros distintos a *Lotus* (Arambarri *et al.* 2005, Sokoloff *et al.* 2007, Sokoloff y Lock 2005) o según Brouillet (Brouillet 2008) en dos. No obstante esto, las especies de *Lotus* presentan una distribución mundial, excepto en regiones muy frías y ciertas áreas tropicales del sudeste de Asia y América Central (Kirkbride 1999, Degtjareva *et al.* 2008). Esta amplia distribución geográfica, en parte, se debe a la introducción de estas especies por parte de las actividades humanas y a su adaptabilidad a diferentes estreses ambientales (Belesky 1999, Blumenthal y McGraw 1999), lo que conduce a una naturalización eficiente.

El principal centro de diversidad del género *Lotus* se encuentra en la región Mediterránea (Kirkbride 1999, Díaz *et al.* 2005, Degtjareva *et al.* 2008). En particular, Macaronesia presenta el mayor número de endemismos (aproximadamente 17 especies), principalmente distribuidas a lo largo de las islas Canarias. Seis de estos endemismos actualmente se encuentran en la categoría de peligro crítico en la lista roja de la flora vascular española (Acebes Ginovés y Oliva Tejera 2007, Allan, *et al.* 2004, Hind 2008, Kirkbride 1999, Moreno 2008, Oliva-Tejera *et al.* 2005).

1.1.2. Importancia científica de ciertas especies del género *Lotus*.

Las especies *L. japonicus* (Regel) Larsen, *L. filicaulis* Durieu y *L. burtii* Borsos han sido seleccionadas como modelos de estudio, y los mapas genéticos de las mismas se encuentran en proceso de obtención (Cyranoski 2001, Kawaguchi *et al.* 2005). *L. japonicus* es considerada especie modelo de las leguminosas de nodulación del tipo determinada. Su uso como modelo se debe a ciertas características que facilitan su estudio, como por ejemplo su genoma pequeño (470 Mb), un tiempo de generación corto (de 2 a 3 meses), su carácter autógeno, un reducido tamaño de planta, una abundante cantidad de flores, facilidad para su polinización manual, elevada capacidad de regeneración a partir de cultivos de tejidos y la posibilidad de su transformación genética con *Agrobacterium*, entre otras (Handberg y Stougaard 1992, Pajuelo y Stougaard 2005, Szczyglowski y Stougaard 2008). A su vez, se cuenta con líneas recombinantes entre dos ecotipos (MG20 y Gifu) de *L. japonicus* y entre *L. burtii* y *L. filicaulis* (Kawaguchi *et al.* 2001). Sumado a ello, recientemente se ha desarrollado un banco de mutantes mediante la utilización del Chromovirus *LORE1* (Fukai *et al.* 2010), las cuales constituyen importantes herramientas para los análisis genéticos. Por último, y a diferencia de *Arabidopsis thaliana*, proveen información relacionada a los procesos de la planta que gobiernan las interacciones simbióticas durante la nodulación y la fijación de nitrógeno, y la simbiosis con micorrizas (Jiang y Gresshoff 1997, Márquez 2005). Por otra parte, ya se ha completado la secuenciación del genoma para el ecotipo MG20 de *L. japonicus* (Sato *et al.* 2008) y la información se encuentra disponible en *Legume Base* (<http://www.kazusa.or.jp/lotus/>). Esta información disponible acerca de *L. japonicus* puede ser utilizada para estudios sobre otras especies del mismo género que cuentan con valor agronómico, e incluso para otros géneros de leguminosas.

1.1.3. Importancia agronómica.

Las leguminosas muestran una enorme diversidad biológica, incluyendo aproximadamente 720 géneros y más de 18.000 especies distribuidas en todo el mundo (Mabberley 1997, Wojciechowski 2003). La mayoría de las leguminosas, al igual que casi el 90 % de la totalidad de las plantas vasculares, son capaces de asociarse simbióticamente con hongos micorrícicos (Siddiqui *et al.* 2008, Smith y Read 2008). Además, las plantas de esta familia se caracterizan por su habilidad para establecer interacciones simbióticas con bacterias fijadoras de nitrógeno (Mabberley 1997, Albrecht *et al.* 1999, Gregerson *et al.* 1999, Hirsch *et al.* 2001, Doyle y Luckow 2003, Wojciechowski 2003, Pajuelo y Stougaard 2005, Pajuelo *et al.* 2007). Esta asociación las vuelve más competitivas en suelos con deficiencias de nutrientes y es por ello que usualmente se las reconoce como “plantas pioneras”. Estas ventajas de las leguminosas estimularon su adopción en los orígenes de la agricultura y se han vuelto una parte importante de los sistemas agrícolas sustentables (Singh *et al.* 2007). En el caso particular de las especies del género *Lotus*, su adaptabilidad y tolerancia a diversos estreses ambientales le otorgan una elevada potencialidad de utilización en la restauración de ambientes degradados y/o contaminados (Escaray *et al.* 2012). En relación a ello, en la Figura 1.1 podemos observar diferentes especies de *Lotus* creciendo en ambientes donde la implantación de otras leguminosas se ve significativamente restringida. A su vez, una de las especies del género que merece particular atención en cuanto a su adaptación a ambientes de menor aptitud agrícola resulta *L. tenuis*, para la misma se presentará más adelante un apartado con mayor detalle al respecto.



Figura 1.1. Especies de *Lotus* creciendo en diversos ambientes. **A.** *L. creticus* en el primer cordón dunar de la costa mediterránea (Valencia, España). **B.** *L. tenuis* en bajos inundados de la Pampa deprimida (Buenos Aires, Argentina). **C.** *L. uliginosus* en ambientes contaminados con metales pesados (Estarreja, Portugal). **D.** *L. corniculatus* en ambientes salino-alcálinos (Valencia, España).

Por otro lado, en los sistemas de producción ganadera los efectos benéficos derivados de la incorporación de especies leguminosas como forraje son reconocidos desde hace tiempo (Graham y Vance 2003). Las pasturas que contienen leguminosas forrajeras, comparadas con pasturas basadas exclusivamente en gramíneas, tienen una mayor digestibilidad y cantidad de proteína cruda, menor porcentaje de fibra detergente neutro y presentan una producción de materia seca más homogénea a través del año (Buxton 1996, Sleugh *et al.* 2000, Wen *et al.* 2002, Zemenchik *et al.* 2002).

La principal importancia agronómica del género *Lotus* está representada por algunas especies utilizadas en sistemas pastoriles como forrajeras de alta producción, incluyendo aquellos que se encuentran sujetos a condiciones ambientales y edáficas extremas (Blumenthal y McGraw 1999, Díaz *et al.* 2005).

Desde un punto de vista agronómico, *L. corniculatus* L., *L. uliginosus* Schkuhr., *L. tenuis* Waldst et Kit. (= *L. glaber* Mill.) y *L. subbiflorus* Lagasca son las especies más importantes del género (Blumenthal y McGraw 1999, Díaz *et al.* 2005).

Las especies de *Lotus* son utilizadas con propósitos agronómicos principalmente en Sudamérica, Norteamérica y Europa, con 1,85; 1,39 y 1,38 millones de hectáreas sembradas respectivamente (Díaz *et al.* 2005). El 90% del área sembrada con *Lotus* se

encuentra concentrada en solo 10 países, donde *L. corniculatus* ocupa el 90% de la misma (Díaz *et al.* 2005). Por su parte, *L. uliginosus* es sembrada en aproximadamente 100.000 hectáreas en Nueva Zelanda y las costas del sudeste de Australia (Blumenthal y McGraw 1999, Ayres *et al.* 2008), mientras que *L. subbiflorus* (la única especie anual con importancia agrícola) es principalmente sembrada en Uruguay, donde se cultiva en alrededor de 50.000 ha (Asuaga 1994, Blumenthal y McGraw 1999, Díaz, *et al.* 2005a). Por último el área total sembrada de *L. tenuis* supera las 160.000 hectáreas. Sin embargo, su uso e importancia para la producción de forraje en áreas templadas o subtempladas de Argentina, Chile, Uruguay, EEUU (principalmente en los estados del Oeste y del Este) y Australia ha ido en incremento en los últimos años (Hughes 1981, Montes 1988, Blumenthal y McGraw 1999). En la Figura 1.2 se puede observar a un lote de *L. tenuis* bajo pastoreo en la Estación Experimental Integrada Chascomús.



Figura 1.2. *L. tenuis* bajo pastoreo directo. Primavera del 2010, Chacra Experimental Integrada Chascomús.

L. corniculatus es considerada una de las leguminosas forrajeras más importante luego de la alfalfa (*Medicago sativa*) y el trébol blanco (*Trifolium repens*). Los rendimientos reportados para esta especie cultivada en suelos agrícolas se encuentran en valores comprendidos entre 8.000-10.000 kg de materia seca (MS) ha⁻¹ año⁻¹ (Acuña 1998, Cassida *et al.* 2000, Sleugh *et al.* 2000, Sartor *et al.* 2010), lo que representa alrededor del 50-80% de la producción alcanzada por la alfalfa bajo condiciones similares (Blumenthal y McGraw 1999). A modo de ejemplo de las especies forrajeras del género se puede mencionar que en suelos agrícolas de Iowa (EEUU), los monocultivos de *L. corniculatus* rindieron 10.000 kg MS ha⁻¹ año⁻¹, comparado con los 13.000 y 8.000 kg MS ha⁻¹ año⁻¹ obtenidos con alfalfa y *Trifolium ambiguum* Bieb respectivamente, bajo similares condiciones (Sleugh *et al.* 2000). Por otra parte, en suelos cultivables del sur de Paraná (Sartor *et al.* 2010) se reportaron rendimientos de 6.000 y superiores a 10.000 kg MS ha⁻¹ año⁻¹ para *L. subbiflorus* y *L. corniculatus* respectivamente, mientras que resultaron iguales a 8.000 y 3.500 kg MS ha⁻¹ año⁻¹ para trébol rojo y blanco. Similarmente, en suelos agrícolas de Michigan (EEUU), fue informado un rendimiento de 6.500, 7.500 y 8.500 kg MS ha⁻¹ año⁻¹ para *L. corniculatus*, alfalfa y trébol rojo, respectivamente (Cassida *et al.*

2000). En otro trabajo realizado en suelos chilenos con aptitud arrocera, fueron reportados rindes de 9.000-11.000 kg MS ha⁻¹ año⁻¹ para diferentes cultivares de *L. corniculatus* (Acuña 1998). En este último estudio, el autor también reportó rindes de 6.000-10.000 kg MS ha⁻¹ año⁻¹ para dos cultivares de *L. uliginosus* y de 7.500-10.000 kg MS ha⁻¹ año⁻¹ para dos cultivares de *L. tenuis*. Por último, en suelos vertisoles argentinos, *L. tenuis* produjo un rinde de 8.000 kg MS ha⁻¹ año⁻¹ (Miñón *et al.* 1990).

El inconveniente que presentan las especies de *Lotus* y en particular *L. corniculatus*, es su baja persistencia cuando son cultivadas en pasturas polifíticas. La persistencia de *Lotus* spp. depende de las especies involucradas y su resiembra natural (Blumenthal y McGraw 1999). Ello se debe a que presentan bajo vigor de plántula y resultan malas competidoras con respecto a las especies más agresivas (Hughes 1981, Díaz *et al.* 2005, Chapman *et al.* 2008, Ixtaina y Mujica 2010).

Una de las estrategias utilizadas por los mejoradores para incrementar la persistencia en leguminosas es la utilización de cultivares rizomatosos (Sulas *et al.* 2000). Por lo general, solamente las plantas de *L. uliginosus* presentan la capacidad de producir rizomas (Wedderburn y Gwynne 1981, Blumenthal 1998). Sin embargo, también se han descrito ciertas poblaciones de *L. corniculatus* provenientes de Turquía que resultan rizomatosas (Beuselinck y Steiner 1996). Actualmente, la obtención de cultivares rizomatosos de *Lotus* spp. es uno de los mayores objetivos de los mejoradores para incrementar la rentabilidad y productividad que se obtiene del cultivo de estas especies (Papadopoulos y Kelman 1999, Beuselinck 2004, Beuselinck *et al.* 2005).

1.1.4. *L. tenuis*, especie clave en ambientes con problemas de inundación y salinidad.

La Pampa Deprimida del Salado (Argentina) abarca una extensa región de la Provincia de Buenos Aires de gran importancia económica debido a la producción pecuaria desarrollada en la misma. Sin embargo, alrededor del 60 % de las 7.470.000 ha de esta región se ve afectado por condiciones de anegamiento y suelos con problemas de salinidad, alcalinidad y/o deficiencia de nutrientes (Soriano 1991, Maiola *et al.* 2003, Lavado 2007).

Las condiciones limitantes para la agricultura obligan a la mayoría de los productores a dedicarse a la ganadería de cría y recría, con los pastizales naturales como principal recurso forrajero (Montes 1988, Soriano 1991). Los pastizales naturales de esta región se caracterizan por una dominancia de gramíneas y marcada deficiencia de leguminosas nativas. Su máxima producción de forraje ocurre durante la primavera y principio del verano disminuyendo bruscamente durante el otoño e invierno (Soriano 1991, Ghera *et al.* 2007). Los intentos de implantación de leguminosas forrajeras tradicionales, tales como alfalfa y tréboles, generalmente no resultan exitosos porque su persistencia y rendimiento se ven fuertemente disminuidos como consecuencia de las condiciones desfavorables de algunos suelos de la región (León *et al.* 2007, Mazzanti *et al.* 1988, Montes 1988).

Una de las estrategias tendientes a solucionar el problema productivo de la Pampa Deprimida del Salado consiste en la introducción de leguminosas forrajeras tolerantes a las condiciones adversas, no solo con el objetivo de mejorar la producción y el valor forrajero de los pastizales, sino también como una herramienta para mejorar la condición edáfica gracias a la simbiosis mutualista con bacterias fijadoras de nitrógeno.

Muy pocas especies de relevancia agrícola son capaces de crecer bajo condiciones que combinan inundación y salinidad (Barrett-Lennard 2003, Rengasamy *et al.* 2003,

Rengasamy 2006, Bennett *et al.* 2009). En este sentido, se ha destacado en numerosos trabajos la elevada sobrevivencia de *L. tenuis* bajo condiciones de inundación prolongada y condiciones edáficas salinas, la cual es mayor que la de otras leguminosas forrajeras (Vignolio *et al.* 1994, Belesky 1999, Real *et al.* 2008, Teakle *et al.* 2010a, Teakle y Tyerman 2010), incluyendo a *L. corniculatus*, especie también considerada tolerante a la salinidad (Teakle *et al.* 2010a, Teakle y Tyerman 2010). La tolerancia de *L. tenuis* al estrés salino fue atribuida a una baja acumulación de cloruros en su parte aérea, la formación de aerénquimas y una baja pérdida radial de O₂ en raíces (Vignolio *et al.* 1994, Belesky 1999, Vignolio *et al.* 1999, Striker *et al.* 2005b, Teakle *et al.* 2006, Vignolio y Fernández 2006, Real *et al.* 2008, Clua *et al.* 2009, Teakle *et al.* 2010a). Además, se ha descrito que las plantas de *L. tenuis* se adaptan bien a suelos con valores de pH que se encuentran entre 6 y 9 (Stoffella *et al.* 1998, Correa *et al.* 2001), y que realizan una eficiente utilización de fósforo (Mendoza 2001, Kade *et al.* 2003, Sannazzaro *et al.* 2004). Establecen asociaciones simbióticas con rizobios y micorrizas, aún bajo condiciones de inundación (Mendoza *et al.* 2005) y mantienen buena calidad nutricional incluso bajo estrés salino (Robinson *et al.* 2004).

Existe incertidumbre sobre la fecha y forma en que *L. tenuis* fue introducida en esta región. El primer reporte de su siembra data del año 1930 en Pigüé (Buenos Aires) (Vignolio y Fernández 2006). A partir de entonces, esta especie ha sido utilizada como una manera de incrementar la sustentabilidad económica de la actividad ganadera y al mismo tiempo realizar una recuperación de los suelos con menor aptitud agrícola (Dear *et al.* 2003, Teakle *et al.* 2010a, Vignolio y Fernández 2006). Actualmente *L. tenuis* se encuentra naturalizado y es considerada una especie clave en los pastizales de la Pampa Deprimida del Salado, debido a su contribución como forraje y su influencia sobre el crecimiento de las especies asociadas, a través del mejoramiento progresivo de las condiciones edáficas donde se implanta (Quinos *et al.* 1998, Kade *et al.* 2003, Cauhépé 2004, Insausti 2004, Vignolio y Fernández 2006, Fernández *et al.* 2007, León *et al.* 2007, Pieckenstain *et al.* 2007).

La siembra de cobertura con *L. tenuis* es una estrategia recomendada para mejorar suelos con problemas de drenaje y salinización (Cisneros *et al.* 2007). Es por ello que actualmente su utilización no es recomendada únicamente para la Pampa Deprimida del Salado, siendo oportuno destacar que algunos autores sugieren el uso de *L. tenuis* como una opción para mejorar y rehabilitar ciertas regiones del sur de Australia, donde existen problemas de salinidad e inundación (Dear *et al.* 2003, Teakle *et al.* 2010a, Teakle *et al.* 2010b).

1.1.5. Valor nutricional.

Generalmente, el valor nutricional de las especies forrajeras de *Lotus* es considerado similar o superior al de otras leguminosas forrajeras. La digestibilidad de la MS para las especies de *Lotus* fluctúa entre el 72 y 78%, mientras que el porcentaje de proteína cruda se encuentra dentro del 20 y 24% de la MS y el porcentaje de la fibra detergente neutro varía entre el 24 y 30% de la MS (Montes 1988, Acuña 1998, Blumenthal y McGraw 1999, Cassida *et al.* 2000). Una ventaja de las especies de *Lotus* es que pueden ser utilizadas, manteniendo su valor nutricional, tanto como forraje en pie para el pastoreo directo como en forma de silo o heno, en contraste con otras leguminosas que no ofrecen todas estas posibilidades (Hughes 1981, Blumenthal y McGraw 1999).

Sin embargo la característica nutricional más atractiva de algunas de las especies de *Lotus* se encuentra en su capacidad de acumular taninos condensados (TC) a nivel foliar, lo que

las diferencia de otras forrajeras tradicionales como *Medicago spp.* y *Trifolium spp.*, cuyos vástagos carecen completamente de estos metabolitos (Aerts *et al.* 1999a, Cassida, *et al.* 2000, Díaz, *et al.* 2005a, Li *et al.* 1996). Cuando los rumiantes son alimentados con forrajes que contienen contenidos adecuados de TC producen en los mismos una serie de efectos benéficos que mejoran la producción animal. Tales beneficios serán detallados en el apartado siguiente.

1.2. Taninos condensados.

1.2.1. Descripción.

Los TC son polímeros fenólicos, y en su mayoría constituyen potentes antioxidantes (Kinsella *et al.* 1993). Dentro de los compuestos fenólicos podemos diferenciar dos grandes grupos: no flavonoides (ácidos fenólicos, estilbenos y taninos hidrolizables) y flavonoides (Figura 1.3). Dentro de este último grupo encontramos a los flavanoles y las antocianinas (García Ramirez 2005). Los flavanoles comprenden a los monómeros o flavan-3-oles, a los dímeros (dos moléculas de flavan-3-oles), a los oligómeros (3 a 10 moléculas de flavan-3-oles) y a los polímeros o TC (más de 10 moléculas de flavan-3-oles). Los dímeros y oligómeros suelen agruparse dentro de los TC indistintamente, mientras que los monómeros no son incluidos debido a que, a diferencia de los demás flavanoles, no poseen la propiedad de precipitar proteínas (Escribano Bailón 1993, García Ramirez 2005, Lea *et al.* 1979).

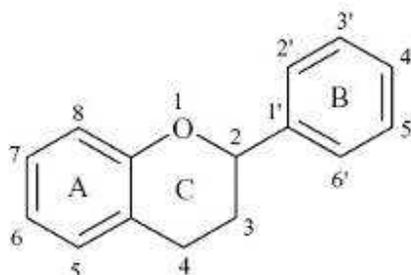


Figura 1.3. Unidad estructural común (difencilpirano) de los flavonoides. Constituye las unidades formadoras de los TC y antocianinas. Adaptado de García Ramirez (2005).

Los flavan-3-oles también se denominan catequinas y constituyen la base de los principales grupos de TC (Escribano Bailón 1993). En la Figura 1.4 se muestran los flavan-3-oles más comunes.

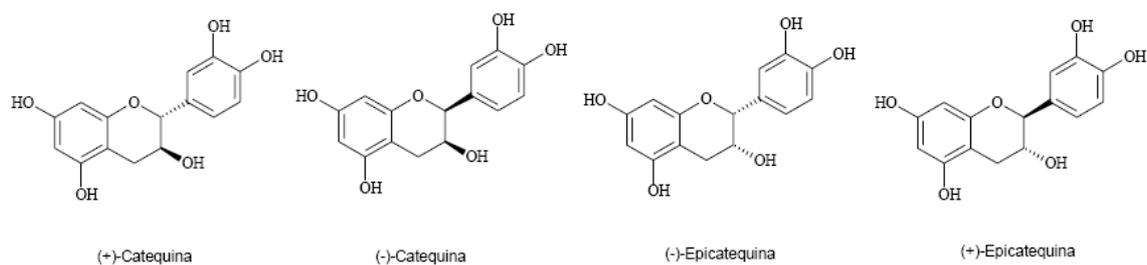


Figura 1.4. Estructura de los compuestos flavan-3-oles más comunes. Adaptado de García Ramirez (2005).

Los TC presentan un peso molecular comprendido entre 500 y 3.000 Daltons y se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal (Bate-Smith 1975, Hagerman y Butler 1981, Haslam 1996). Luego de una hidrólisis ácida, estos compuestos rinden antocianidinas, razón por la cual suele asignársele el nombre de proantocianidinas. Los TC cuya hidrólisis da origen a cianidina son denominados procianidinas. En cambio, los TC cuya hidrólisis produce delphinidina, son conocidos como prodelfinidinas (Figura 1.5). Estos dos tipos de TC son los más comunes en especies de la familia de las leguminosas (Aoki *et al.* 2000).

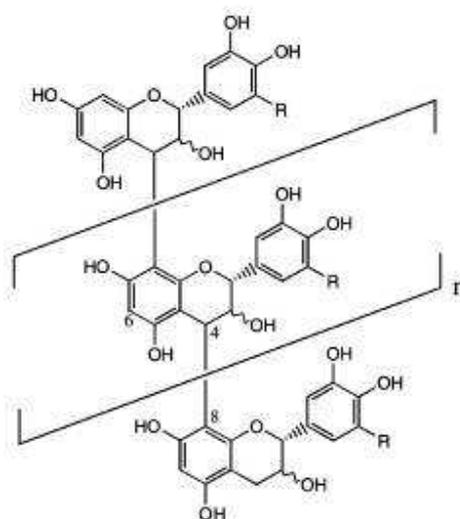


Figura 1.5. Modelo de la estructura de los TC. Si R = H u OH la estructura representa procianidinas o prodelfinidinas respectivamente. Adaptado de Schofield *et al.* (2001).

La solubilidad de estos compuestos en agua depende de su peso molecular; las formas de mayor tamaño poseen una baja solubilidad en cualquier solvente, lo cual limita la posibilidad de su extracción (Hagerman y Butler 1981). Sus principales características son: a) la capacidad para ligarse a proteínas (y otros polímeros como los polisacáridos) (Hagerman y Butler 1981, Haslam 1996, Aoki *et al.* 2000); b) la de actuar como antioxidantes debido al gran número de grupos hidroxilo que poseen y c) la de formar quelatos con iones metálicos (Hagerman y Butler 1981, Escribano Bailón 1993, Stoutjesdijk *et al.* 2001).

La formación de complejos TC-proteínas, los cuales son estables por uniones del tipo puente hidrógeno, depende del pH de la solución en la cual se encuentran. En soluciones de pH bajo a moderado, la formación de complejos es mayor de la que se produce a pH alto (> 9), condición en la cual prácticamente no se forman (Hagerman y Butler 1981, Barbehenn y Constabel 2011). La capacidad de formar complejos con proteínas por parte de estos compuestos deriva en una serie de efectos benéficos sobre los animales que consumen forrajes con contenidos moderados de TC (Aerts, *et al.* 1999a, Li, *et al.* 1996) los cuales son mencionados en el apartado siguiente.

1.2.2. Biosíntesis.

La primera etapa de la biosíntesis de los TC es común a la de las antocianinas y comienza con la acción de las enzimas *fenilalanina amonio-liasa (PAL)* y *chalcona sintasa (CHS)*, finalizando con la producción de leucoantocianidinas en un paso metabólico catalizado por la *dihidroflavonol 4-reductasa (DFR)* (Figura 1.6). Posteriormente, la biosíntesis de TC puede continuar por dos vías alternativas. Una de ellas, denominada “vía de las catequinas”, implica la producción de unidades de flavan-3-ol en un proceso regulado por la enzima *leucoantocianidina reductasa (LAR)*. Las unidades formadas (catequinas) son transportadas a la vacuola, donde son utilizadas para formar los polímeros (TC).

La otra vía, denominada “vía de las epicatequinas” comienza con la formación de antocianidinas a partir de las leucoantocianidinas en un proceso catalizado por la acción de la enzima *antocianina sintasa (ANS)*. Este metabolito intermediario puede ser utilizado para la síntesis de antocianinas a través de la acción de las enzimas *glutathion S-transferasa (GST)* y *glicosiltransferasas (GS)*. Otro camino que pueden tomar las antocianidinas es a través de la vía de las epicatequinas, donde son utilizadas, a través de la acción de la enzima *antocianidina reductasa (ANR)*, para la formación de las unidades de flavan-3-ol (epicatequinas).

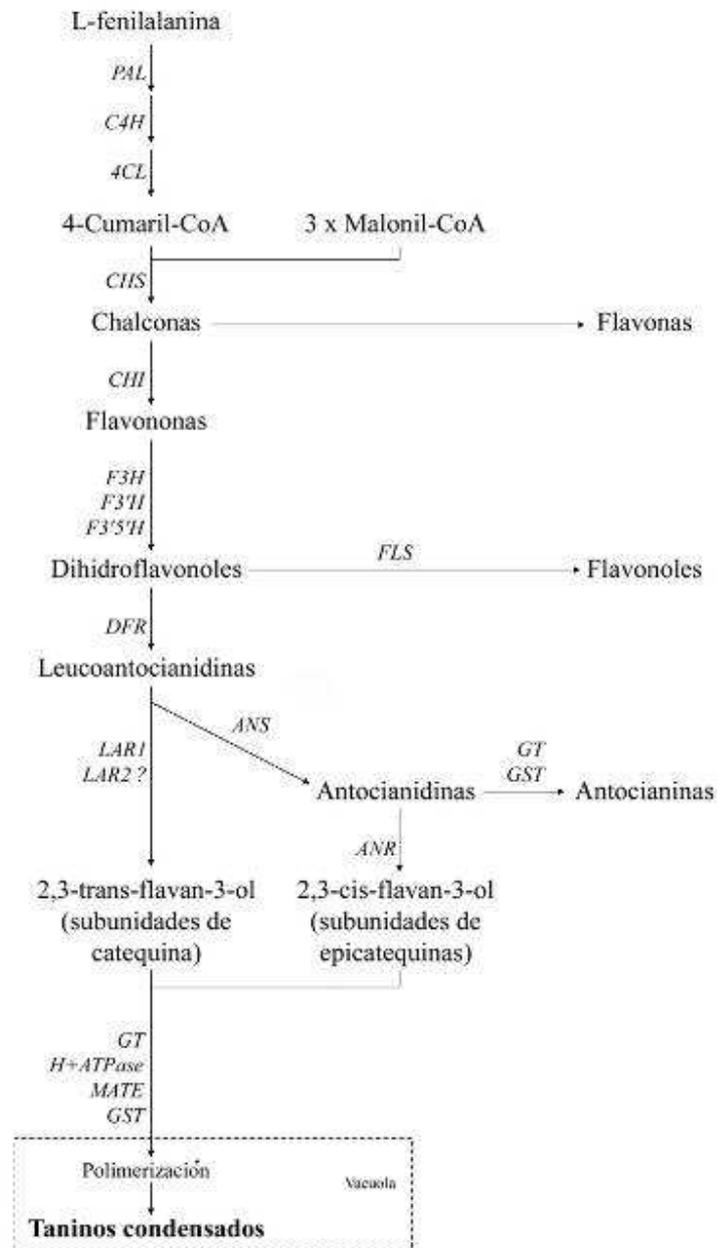


Figura 1.6. Biosíntesis de TC y antocianinas, mostrando las enzimas e intermediarios implicados. *4CL*: 4-cumarato CoA ligasa, *ANR*: antocianidina reductasa, *ANS*: antocianina sintasa, *C4H*: cinamato 4-hidroxilasa, *CHI*: chalcona isomerasa, *CHS*: chalcona sintasa, *DFR*: dihidroflavanol reductasa, *F3H*: flavanona-3-hidroxilasa, *F3'H*: flavonoide 3'-hidroxilasa, *F3'5'H*: flavonoide 3'-5'-hidroxilasa, *FLS*: flavonol sintasa, *GST*: glutation S-transferasa, *GT*: glicosiltransferasas, *LAR*: leucoantocianidina reductasa, *MATE*: familia de extrusión de multifármacos y tóxicos (del inglés “multidrug and toxic compound extrusion”), *PAL*: fenilalanina amonio-liasa. El signo de pregunta indica la actividad putativa de la proteína codificada por *LAR2*.

Las unidades de flavan-3-ol son las precursoras de los TC. Por ello son consideradas las “unidades de inicio” a partir de las cuales se formarán los TC en un proceso de polimerización por el cual se van adicionando unidades a través de enlaces carbono-carbono (Stafford 1989, Tanner y Kristiansen 1993, Singh *et al.* 1997, Schofield *et al.* 2001, Paolucci *et al.* 2005, Paolucci *et al.* 2007, Tian *et al.* 2008).

La biosíntesis de las unidades de flavan-3-ol ocurre en el citosol de la célula, donde son posteriormente glicosidadas. En relación a ello, se ha observado que el gen *UGT72L1* de *M. truncatula* codifica una proteína denominada *epicatequina glucosyltransferasa (UDP)* la cual es específica de las unidades –(-)epicatequinas y produce su glicosidación (Pang *et al.* 2008). Las unidades glicosidadas son transportadas hacia el interior de las vacuolas por la acción de la enzima codificada por el gen *TT12* perteneciente a la familia *MATE* (familia de extrusión de multifármacos y tóxicos, del inglés *multidrug and toxic compound extrusion*) que se encuentra ubicada en la membrana vacuolar (Zhao y Dixon 2009). Dentro de la vacuola se produce la polimerización a través de la unión de las unidades de catequinas y/o epicatequinas en un proceso que no ha sido completamente dilucidado aún (Zhao *et al.* 2010).

La estructura de los TC formados resulta variable, dependiendo de la estereoquímica y del patrón de hidroxilación de la subunidad de flavan-3-ol iniciadora y las subunidades de extensión que componen el polímero (Aoki *et al.* 2000).

Se ha propuesto que la hidroxilación del anillo B de los dihidroflavonoles intermediarios (Figura 1.7) sería el determinante del tipo de unidad de flavan-3-ol formada (Robbins *et al.* 2005). Esta hidroxilación se encontraría mediada por las enzimas *flavonoide 3' hidroxilasa (F3'H)* y *flavonoide 3'5' hidroxilasa (F3'5'H)*. Una versión simplificada de los caminos biosintéticos que pueden tomar estos compuestos puede observarse en la Figura 1.7.

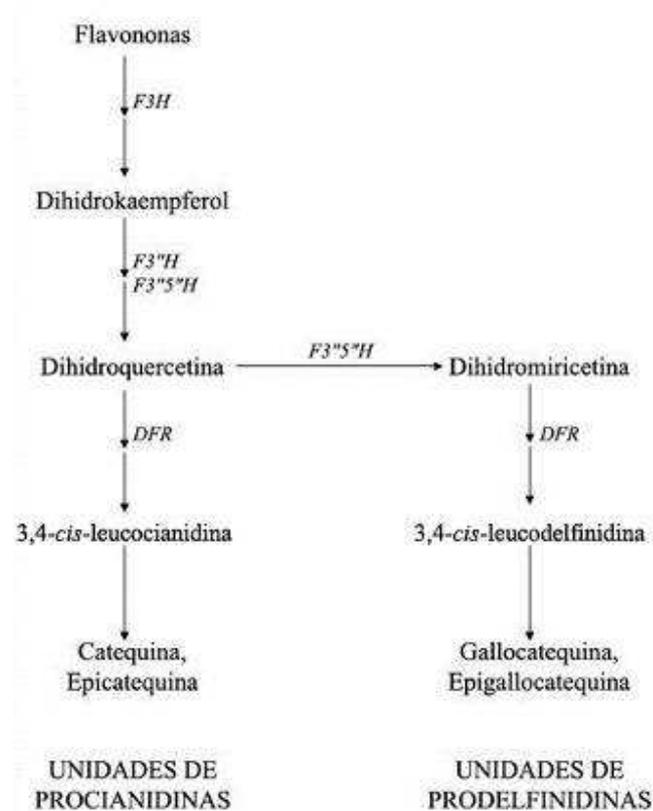


Figura 1.7. Esquema simplificado de las vías de hidroxilación que pueden tomar los precursores de las unidades de flavan 3-ol que forman los TC. Adaptado de Robbins *et al.* (2005).

1.2.3. Funciones de los taninos condensados en plantas.

Los TC son metabolitos secundarios y la mayoría de las plantas los sintetizan, pero en muchas de ellas estos metabolitos solamente se acumulan en la testa de la semilla, donde cumplen el rol de evitar la desecación y otros estreses abióticos (Debeaujon *et al.* 2000, Lepiniec *et al.* 2006). A su vez, los TC de las semillas, participan en la defensa contra patógenos y depredadores (Shirley 1998) y se encuentran relacionados con la dormancia y el desarrollo (Debeaujon *et al.* 2000). Otras plantas, en especial especies arbóreas, sintetizan TC en todos sus órganos, mientras que las gramíneas en general carecen totalmente de estos metabolitos (Barbehenn y Constabel 2011). Ciertas especies de *Lotus* presentan la capacidad de acumular TC en vástagos, a diferencia de otras leguminosas forrajeras como alfalfa y tréboles, cuyos tallos y hojas carecen completamente de TC (Cassida, *et al.* 2000, Díaz, *et al.* 2005a, Li, *et al.* 1996).

Además de las funciones que cumplen los TC en semillas, en plantas que acumulan estos compuestos en otros órganos, desempeñan funciones importantes relacionadas con la defensa frente al ataque de patógenos tales como bacterias, hongos y ciertos herbívoros (Taiz y Zeiger 1998, Dixon *et al.* 2005). Es por ello que se supone que la evolución de los TC en plantas se encuentra relacionada con la protección ante hongos y microorganismos (Aerts, *et al.* 1999a, Dixon y Paiva 1995, Dixon, *et al.* 2005).

Ha sido reportada la relación de estos compuestos con la tolerancia a ciertos estreses abióticos (Dixon y Paiva 1995, Winkel-Shirley 2002), su relación con el estrés salino será tratada con mayor detalle en el capítulo 3. En el caso particular de las especies de *Lotus*, los TC se encuentran relacionados con los mecanismos de tolerancia de *L. uliginosus* a las elevadas concentraciones edáficas de aluminio presentes en suelos ácidos (Stoutjesdijk *et al.*, 2001). Por último se ha sugerido que la composición y los niveles de TC presentes en raíces de plantas de *Lotus* forman parte de los mecanismos de determinación del rango de hospedantes en la simbiosis mutualista con rizobios (Pankhurst & Jones, 1979). En el capítulo 6, enfocado en el estudio del papel de los TC en la simbiosis de *L. tenuis* y *L. corniculatus* con rizobios se detallan los antecedentes referentes a este tema.

1.2.4. Efectos benéficos de los taninos condensados en el forraje.

El efecto más conocido derivado de estos metabolitos cuando se incorporan a la dieta animal es el de impedir el meteorismo (Li, *et al.* 1996, Spangenberg *et al.* 1999, Taiz y Zeiger 1998, Waghorn y Shelton 1997). El meteorismo, comúnmente llamado “empaste”, es un desorden alimenticio común que ocurre en animales que se alimentan de forrajes con elevado contenido de proteínas solubles. El mismo es causado por la formación de espuma proteica en el rumen de los animales, y generalmente se encuentra asociado a la ingesta de leguminosas tales como el trébol blanco y la alfalfa, en especial durante la primavera. Dicha espuma impide la liberación de los gases producidos por la fermentación y causa la expansión del rumen, lo cual en casos leves provoca la disminución del consumo, mientras que en casos agudos puede llegar a causar la muerte del animal por la presión que ejerce el rumen inflamado sobre el diafragma (Mangan 1959). Las pérdidas causadas por el empaste se estimaron en 310 y 180 millones de dólares por año en EEUU y Australia, respectivamente (Rumbaugh 1985). Al acomplejar las proteínas del forraje dentro del rumen, los TC impiden que los microorganismos allí presentes las digieran rápidamente, evitando así la formación de espuma y la ocurrencia de meteorismo (Waghorn y Shelton 1997) (Spangenberg, *et al.* 1999, Taiz y Zeiger 1998, Tanner *et al.* 1995).

De la misma manera, los TC aumentan la eficiencia en la digestión de proteínas provenientes de leguminosas forrajeras, ya que al formar complejos con ellas impiden que sean degradadas y asimiladas por los microorganismos del rumen, evitando de esta manera que sean convertidas en proteínas microbianas de menor valor nutricional (Aerts *et al.* 1999a). Cuando el complejo TC-proteína llega al intestino delgado, el cambio de pH disminuye la fuerza en las uniones del complejo y se liberan las proteínas, las cuales pueden ser absorbidas por el animal (proteína “bypass”), disminuyendo de esta manera la necesidad de suplementación proteica (Barry y Manley 1986, Taiz y Zeiger 1998).

Otro importante efecto benéfico sobre el ganado que consume forrajes con niveles adecuados de TC es el control que ejercen dichos compuestos sobre los parásitos internos (Niezen *et al.* 1995, Robertson *et al.* 1995, Molan *et al.* 2000, Iqbal *et al.* 2002, Otero y Hidalgo 2004). El uso regular de antiparasitarios ha causado la aparición de poblaciones de parásitos resistentes (McKenna 1994). Esta resistencia, sumada a la mayor demanda de producción orgánica de carnes, ha determinado un creciente interés en el control de parásitos internos por medio de los TC. En este sentido resulta importante señalar que se ha comprobado una disminución de hasta un 50% de la carga parasitaria en animales alimentados con pasturas que incluyen especies del género *Lotus*, con respecto a animales

alimentados con alfalfa o raigrás (Niezen *et al.* 1995, Robertson *et al.* 1995, Otero y Hidalgo 2004). Además se ha descrito una tendencia a reducir la incidencia de miasis en ovinos (Otero y Hidalgo 2004).

Por último se ha observado una reducción de la emisión de metano en animales que consumen forrajes que contienen TC (Tavendale *et al.* 2005, Patra y Saxena 2010). El metano es un gas que contribuye al efecto invernadero, que se produce en grandes cantidades dentro del rumen animal. La reducción de la emisión de este gas tendría un efecto benéfico sobre el medio ambiente, lo que determina un creciente interés científico en este tema.

1.2.5. Contenido adecuado de taninos condensados en el forraje.

Dependiendo de los autores y la metodología utilizada para la cuantificación de TC, se determinó que los niveles adecuados para el consumo animal se encuentran entre el 2 y el 4% de la MS (20-40 mg/g MS), siendo considerado excesivos los niveles superiores al 4% (Aerts *et al.* 1999a). Por otra parte, según Li *et al.* (Li *et al.* 1996) el contenido mínimo de TC para evitar el empaste es de 1 mg/g MS (0,1%). El mismo autor considera óptimos, para leguminosas forrajeras, contenidos de alrededor de 5 mg/g MS (0,5%), con el fin de obtener los beneficios derivados de estos compuestos sobre los rumiantes.

El exceso de TC afecta el valor nutricional de los forrajes (Aerts, *et al.* 1999a, Kumar y Singh 1984, Makkar 2003). La propiedad “astringente” de estos compuestos dada por la precipitación de proteínas salivares causan la disminución de la palatabilidad y, en consecuencia, del consumo voluntario por parte del animal (Kumar y Singh 1984). Por otra parte, los forrajes con exceso de TC presentan una reducción de su digestibilidad causada por la inhibición de las enzimas digestivas (Kumar y Singh 1984). En el caso particular de las especies forrajeras del género *Lotus*, se ha observado que la especie *L. uliginosus* presenta un exceso de TC. Los niveles inadecuados de TC de esta especie causan la disminución del consumo voluntario, la digestibilidad, la ganancia de peso y la producción de lana (Barry y Duncan 1984, Aerts *et al.* 1999a).

1.3. Antocianinas.

Como fuera mencionado anteriormente, las antocianinas comparten la vía de biosíntesis con los TC (Figura 6). Las antocianinas, al igual que los TC, pertenecen al grupo de los flavonoides (Winkel-Shirley 2001). Son pigmentos solubles en agua que se encuentran en los tejidos de casi la totalidad de las plantas, responsables de los colores rojo, azul, violeta y púrpura observados en ellas (Salisbury y Ross 1992, Shahidi y Naczki 1995, Chalker-Scott 1999). Si las antocianinas carecen de glucosa son denominadas antocianidinas, la presencia de una glucosa como parte de la estructura de las antocianinas les confiere mayor estabilidad química en relación a las antocianidinas (Salisbury y Ross 1992). En la Figura 1.8 se pueden observar las antocianidinas más comúnmente encontradas en los vegetales y su estructura general.

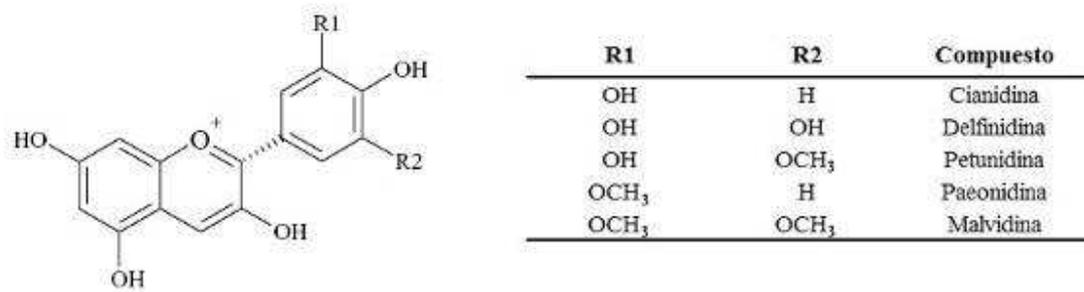


Figura 1.8. Estructura general y nomenclatura de las principales antocianidinas. Adaptado de García Ramirez (2005).

En cuanto a su funcionalidad en las plantas se ha reportado que la característica óptica de las antocianinas en los pétalos y frutos es considerada una adaptación para la atracción de insectos que polinizan las flores y/o dispersan los frutos (Harborne 1988, Winkel-Shirley 2001). Mientras que en hojas y tallos cabe destacar el rol que ejercen sobre la modificación de la cantidad y la calidad de luz capturada (Barker *et al.* 1997, Gould *et al.* 2000); su función en la protección ante el efecto de la luz UV-B (Burger y Edwards 1996, Klaper *et al.* 1996) y la protección ante la fotoinhibición (Gould *et al.* 1995, Dodd *et al.* 1998). También se ha discutido ampliamente sobre su relación con la defensa ante la herbivoría (Coley y Kusar 1996, Schaefer y Rolshausen 2005) y, por último, su rol en la detoxificación de especies reactivas del oxígeno (ROS) producidas durante los estreses de origen ambiental (Dixon y Paiva 1995, Shirley 1996, Yamasaki 1997, Sherwin y Farrant 1998, Schaefer y Rolshausen 2005).

En el caso particular de la especie modelo *L. japonicus*, se han detectado dos tipos de antocianidinas: las cianidinas y las peonidinas (Suzuki *et al.* 2008). Observándose diferencias en la acumulación de antocianinas entre diferentes ecotipos evaluados (Aoki *et al.* 2000, Kawaguchi *et al.* 2001, Pajuelo y Stougaard 2005, Suzuki *et al.* 2008, Hashiguchi *et al.* 2011).

1.4. Objetivo general.

La información presentada hasta el momento deja en evidencia la relevancia científica y agronómica de las especies del género *Lotus* y de los TC. En particular la capacidad de estas especies de acumular TC en cantidades variables sugiere una potencial utilización para el estudio de estos metabolitos. Debido a ello nos hemos propuesto el objetivo de contribuir a la mejora de la calidad forrajera y de la adaptabilidad de especies del género *Lotus* a suelos de menor aptitud agrícola, con especial énfasis en el estudio de las funciones biológicas y de los mecanismos de regulación de los niveles de los taninos condensados. Para ello se persiguieron una serie de objetivos particulares los cuales se encuentran planteados en sus capítulos correspondientes.

2. Capítulo 2. Contenido de taninos condensados en especies del género *Lotus*.

2.1. Introducción.

2.1.1. Contenido de taninos condensados en *Lotus* spp.

Como fuera mencionado en el capítulo anterior, una de las características forrajeras más atractivas de las especies de *Lotus* se encuentra asociada a su capacidad de acumular TC en vástago (Aerts *et al.* 1999a). Sin embargo, no todas las especies pertenecientes a este género acumulan contenidos de TC adecuados para su utilización como forraje. Esto se debe a que existe una gran variabilidad en los niveles foliares de TC presentes en las distintas especies de *Lotus* (Li *et al.* 1996, Sivakumaran *et al.* 2006, Gruber *et al.* 2008).

Algunas especies como *L. japonicus*, *L. burtii*, *L. decumbens* y *L. edulis* entre otras, no presentan o acumulan bajas cantidades de estos metabolitos en sus hojas (Sivakumaran *et al.* 2006, Gruber *et al.* 2008). Para la especie modelo *L. japonicus* se han determinado contenidos de TC comprendidos entre 0,4 y 1,3 % de la materia seca (MS), según se trate de una cosecha realizada en invierno o primavera respectivamente (Sivakumaran *et al.* 2006). Otros análisis realizados demostraron que en ésta última especie, los TC se encuentran presentes en flores, tallos, pecíolos y nódulos, pero están ausentes en el tejido foliar y raíces (Morris *et al.* 1993, Gruber *et al.* 2008).

Por otra parte, el contenido foliar de TC en plantas de *L. corniculatus* resulta moderado, con valores medios de 2,4 % de la MS, el cual resulta inferior a los valores reportados en *L. uliginosus* (6,5 % de la MS) (Kelman y Tanner 1990, Aerts *et al.* 1999a, Sivakumaran *et al.* 2006). Al mismo tiempo, es importante tener presente que también se han reportado variaciones inter-poblacionales en los niveles foliares de estos compuestos dentro de una misma especie. Por ejemplo, Lowther *et al.* (Lowther *et al.* 1987) reportaron valores comprendidos entre 0,13 y 3,9 % de la MS, medidos en 11 accesiones de *L. corniculatus*. En otro estudio realizado sobre 97 accesiones de *L. corniculatus* provenientes del banco de germoplasma del USDA (*United States Department of Agriculture*), los contenidos foliares de TC variaron entre 0 y 13,2 % de la MS; sin embargo, el 75 % de las accesiones medidas tenían menos de 4 % (Roberts *et al.* 1993). Otros autores, en mediciones realizadas en otras 22 accesiones de la misma especie, reportaron valores comprendidos entre 0,15 y 7,28 % de la MS (Kelman y Tanner 1990, Kelman 2006a). Por último, Acuña *et al.* (Acuña *et al.* 2008) reportaron valores comprendidos entre 4,7 y 8,7 % de la MS para cultivares comerciales y accesiones salvajes.

También se ha observado una marcada variación de los niveles foliares de TC entre plantas de *L. uliginosus*. Por ejemplo, para el cultivar tetraploide “Maku” se han reportado valores comprendidos entre 5,8 y 9,8 % de la MS (Lowther *et al.* 1987), mientras que en el desarrollo del cultivar “Sharnae” se utilizaron accesiones de *L. uliginosus* provenientes de Portugal que presentaban contenidos altos de TC (superiores al 4 %) (Kelman *et al.* 1997). Los contenidos de TC medidos en 10 accesiones diferentes resultaron entre 2,53 y 10,72 % de la MS (Kelman y Tanner 1990). En otro trabajo, se analizaron 38 accesiones provenientes de diferentes regiones del mundo, reportándose valores comprendidos entre 2,9 y 8 % de la MS (Kelman 2006a). Por último, en 22 accesiones de *L. uliginosus* recolectadas en Chile, se reportaron valores de TC foliares comprendidos entre 6,3 y 11 % de la MS (Acuña *et al.* 2008). En general, el contenido foliar de TC en *L. uliginosus* es

considerado demasiado alto, a tal punto que, debido a ello, su valor nutritivo se ha visto reducido (Barry y Duncan 1984, Lees *et al.* 1994).

Menos numerosos son los trabajos donde se evaluaron los contenidos de TC en accesiones de *L. tenuis*, y la mayoría de ellos reportan bajos valores de TC foliares (Roberts y Beuselinck 1992). En este sentido, un trabajo frecuentemente citado en la literatura es el realizado por Aerts *et al.* (Aerts *et al.* 1999a) quienes reportan contenidos de 0,6 % de la MS para esta especie. Asimismo, en mediciones realizadas para el cultivar “Esmeralda”, los contenidos totales observados fueron de alrededor de 0,8 % de la MS, la mayor proporción de los cuales corresponde a los TC solubles (0,6 %), mientras que el resto se encontró en la fracción asociada a las proteínas (0,1 %) y las fibras (0,1 %) (Sivakumaran *et al.* 2006). Es importante mencionar que estos mismos autores reconocen que no pudieron realizar la caracterización de la composición química de los TC aislados de *L. tenuis* debido a la imposibilidad de obtener cantidades suficientes para su análisis.

La importancia de *L. tenuis* como forrajera en ambientes marginales, motiva el creciente interés en su estudio. En particular, resulta interesante la evaluación del contenido foliar de TC en esta especie con la finalidad de lograr un incremento en su calidad forrajera. Debido a ello nos hemos propuesto los siguientes objetivos:

- Evaluar el contenido foliar de TC en especies de interés agrícola y científica, pertenecientes al género *Lotus*, con énfasis en la especie *L. tenuis*.
- Evaluar si es posible optimizar el contenido de TC foliares en poblaciones de *L. tenuis* a través de la selección recurrente.

2.1.2. Diferenciación entre *L. tenuis* y *L. corniculatus*.

En la Pampa Deprimida del Salado se cultivan dos especies de *Lotus*. Ellas son: *L. tenuis* y *L. corniculatus* (Miñón *et al.* 1990, Blumenthal y McGraw 1999, Díaz *et al.* 2005). Estas dos especies se diferencian agrónomicamente, ya que *L. corniculatus* es cultivada en menor proporción y en zonas con mejores aptitudes agrícolas en relación a *L. tenuis* que se cultiva en zonas menos aptas, en las que las condiciones restrictivas impiden frecuentemente la implantación exitosa de *L. corniculatus* y otras leguminosas forrajeras (Lagler 2003).

Si bien ambas especies se diferencian agrónomicamente, a nivel filogenético y morfológico son muy similares, siendo esta similitud morfológica aún más marcada en etapas ontogénicas tempranas (Fernandez 1981, Kramina 1999, Degtjareva *et al.* 2008). Esta situación constituye un problema para los productores al momento de adquirir semillas de cultivares comerciales de *L. tenuis*, debido a que con cierta frecuencia las semillas de esta especie presentan contaminaciones con semillas de *L. corniculatus* (Kade *et al.* 1997, Giorgieri *et al.* 1998), las cuales resultan indistinguibles entre sí. Como consecuencia, cuando estas semillas de menor pureza específica de *L. tenuis* son destinadas a zonas marginales, el rendimiento esperado disminuye significativamente. Este hecho, sumado a que las semillas de *L. tenuis* tienen mayor precio que las de *L. corniculatus*, provoca un importante perjuicio económico a los productores (Giorgieri *et al.* 1998).

En vista de este problema, se han desarrollado diversas metodologías con el objetivo de identificar / diferenciar a *L. tenuis* y *L. corniculatus*. Estas técnicas de diferenciación han utilizado el polimorfismo en el patrón de flavonoides analizados mediante cromatografía de capa delgada en dos dimensiones (Kade *et al.* 1997); el análisis de las proteínas de almacenamiento de semillas a través de electroforesis capilar en gel y de la electroforesis en

geles desnaturalizantes de poliacrilamida (Giorgieri *et al.* 1998, Galussi *et al.* 2006) y también a través de la cariología (Celotto y Sanso 2008).

La metodología cariológica, basada en el conteo cromosómico, se fundamenta en el hecho de que las plantas de *L. tenuis* generalmente son diploides, con un número cromosómico igual a 12 ($2n = 2x = 12$), mientras que las plantas de *L. corniculatus* generalmente son tetraploides ($2n = 4x = 24$) (Löve y Löve 1961, Añon Suarez *et al.* 1967, Castroviejo 1982, Falistocco y Piccirilli 1989). Sin embargo, se ha reportado la existencia de poblaciones salvajes de *L. tenuis* tetraploides y poblaciones de *L. corniculatus* diploides (Grant 1995, Kirkbride 1999), lo que disminuye la utilidad de esta técnica. No obstante ello, esta metodología de diferenciación a través del conteo cromosómico ha sido propuesta como la mejor opción para las accesiones presentes en Argentina (Celotto y Sanso 2008).

Los problemas comunes que presentan las técnicas mencionadas con anterioridad es que se requiere de laboratorios de mediana complejidad, resultan relativamente costosas y no se permiten el análisis rápido de numerosas muestras en forma rutinaria. Por estas razones, consideramos de interés tecnológico el desarrollo de una técnica más sencilla que permita la diferenciación entre ambas especies forrajeras.

Relacionado a ello, se ha reportado que el patrón de tinción de TC en hojas de *L. tenuis* resultó diferente al observado en *L. corniculatus* (Li *et al.* 1996). Sin embargo, esta afirmación fue realizada sobre la base del estudio de una sola accesión de cada especie, lo que impide sacar conclusiones sobre la utilidad de dicho método de diferenciación entre especies. Es por ello que nos propusimos como objetivo evaluar el patrón de tinción de TC en numerosas accesiones de *L. tenuis* y de *L. corniculatus* con el fin de determinar si dicha metodología representa un método efectivo para diferenciar dichas especies en estadios fenológicos tempranos.

2.2. Hipótesis.

Hipótesis 1: El contenido foliar de TC en las plantas de *L. tenuis* resulta bajo en relación al recomendado para leguminosas con fines forrajeros.

Hipótesis 2: En *L. tenuis*, al igual que en *L. corniculatus*, existe variabilidad intra e inter-poblacional para el contenido foliar de TC y la misma puede ser aprovechada para modificar el contenido de dichos metabolitos a través de la selección recurrente.

Hipótesis 3: El patrón de tinción de TC representa una herramienta eficaz para la diferenciación específica entre *L. tenuis* y *L. corniculatus*.

2.3. Materiales y métodos.

2.3.1. Variación en el contenido de taninos condensados entre las especies del género *Lotus*.

2.3.1.1. Material vegetal.

Se utilizaron 27 accesiones de *L. tenuis*; 20 de ellas fueron colectadas en distintos ambientes de la Provincia de Buenos Aires y gentilmente cedidas por el Banco de Germoplasma de la Estación Experimental Agropecuaria INTA Pergamino: “ARLG02”, “ARLG03”, “ARLG04”, “ARLG06”, “ARLG08”, “ARLG10”, “ARLG12”, “ARLG14”, “ARLG18”, “ARLG20”, “ARLG22”, “ARLG26”, “ARLG28”, “Ayacucho”, “C. del Uruguay”, “El perdido”, “Giannone”, “Monte Urano”, “Ruta 63” y “Watfi”. Al mismo tiempo, se utilizaron dos accesiones autotetraploides (Pool A, Pool B) y 4 cultivares comerciales: “Pampa INTA” (Fertiprado), “Chajá” (KWS), “Aguapé” (Gapp) y “Esmeralda” (Gentos). También por último, se utilizó una accesión de cosecha propia que denominamos “Delta del Ebro” proveniente de España.

De la especie *L. corniculatus* se utilizaron 13 accesiones, 8 de las cuales fueron cedidas por la empresa Gentos S.A. (“Creeping”, “Creeping I”, “Creeping II”, “El Boyero”, “Persistencia”, “Vigor”, “Intermedio” y “Gladiador”). Estas accesiones incluyen algunos materiales comerciales y otros en vías de comercialización. Además, se utilizaron 4 accesiones cedidas por el Banco de Germoplasma de la Estación Experimental Agropecuaria INTA Pergamino (“San Gabriel”, “INIA Draco”, “Estanzuela” y “Larrañaga”). Por último se utilizó una accesión española de cosecha propia que denominamos “charlii” (la cual fue depositada en el banco de germoplasma del Jardín Botánico de Valencia bajo el número de identificación 158B2009), su descripción se encuentra con mayor detalle en el capítulo 3.

De las especies modelo se utilizaron los ecotipos “Gifu” y “MG20” de *L. japonicus* (Legume-Base, <http://www.shigen.nig.ac.jp/bean/lotusjaponicus/wildStrainListAction.do>) y las especies *L. burtii* y *L. filicaulis*, las cuales fueron gentilmente cedidas por el consorcio LOTASSA (*LOTus Adaptation and Sustainability in South America*, <http://www.lotassa.org>).

2.3.1.2. Tratamiento de las semillas y cultivo de plantas.

Las semillas fueron escarificadas utilizando ácido sulfúrico, para lo cual se las colocó en tubos cónicos de 50 ml. Posteriormente fueron cubiertas con ácido sulfúrico y se agitaron durante 2 minutos. El ácido sulfúrico fue inmediatamente retirado luego de la agitación y a continuación se realizaron 10 lavados con agua destilada. Las semillas escarificadas fueron sembradas en placas de Petri conteniendo agar-agua (0,8%) e incubadas en cámaras de cultivo. Cuando las plántulas presentaron los cotiledones expandidos, fueron trasplantadas a macetas de 250 cm³ conteniendo una mezcla de arena y vermiculita (1/1), irrigadas con solución Hoagland 0,5X y cultivadas en cámara de cultivo.

La cámara de cultivo (Figura 2.1) presentaba un ciclo diario con 16 horas de luz a una densidad de flujo fotónico de 225 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ brindado por lámparas fluorescentes e

incandescentes intercaladas. La temperatura fue de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ durante el periodo de luz y de $20 \pm 1^\circ\text{C}$ en el periodo de oscuridad, mientras que los valores de humedad oscilaron entre el 50 y 60%.



Figura 2.1. Vista de la cámara de cultivo donde se realizaron los ensayos con *Lotus* sp.

2.3.1.3. Propagación vegetativa.

Para la propagación vegetativa de los genotipos seleccionados se realizó la clonación de plantas de *Lotus* a través de la técnica descrita por Mujica y Rumi (Mujica y Rumi 1999). Para ello, se colectaron tallos de las plantas a clonar y de los mismos se descartaron las partes basales y apicales. Posteriormente se cortaron segmentos uninodales (estacas), teniendo la precaución de hacer un corte a bisel en la base para favorecer la producción de raíces. Los mismos se colocaron en macetas con arena como sustrato, para inducir el enraizamiento. Las macetas se colocaron en cámara de cultivo y se irrigaron con solución Hoagland 0,5X, comprobándose que en aproximadamente 10 días se produjo el desarrollo y crecimiento activo de raíces.

2.3.1.4. Cuantificación de taninos condensados.

Para la determinación del contenido de TC se tomó la totalidad de hojas y tallos de plantas de 30 días de edad. Las muestras se secaron en sobres de papel a 32°C hasta peso constante (para evitar la degradación de los TC lo cual ocurre a temperaturas mayores a 50°C), y posteriormente fueron homogéneamente molidas utilizando un molinillo hasta lograr un polvo fino. De la muestra así procesada se tomó una alícuota de 10 mg, la cual se colocó en un tubo para microcentrífuga de 1,5 ml.

La extracción y cuantificación de TC se realizó mediante el método DMACA-HCl propuesto por Li *et al.* (1996). Para ello, los TC solubles fueron extraídos con 1 ml de una solución de acetona acuosa al 70 % (v/v) más 0,1 % (p/v) de ácido ascórbico. La extracción se realizó a 4°C en oscuridad durante 30 minutos. Posteriormente se centrifugó el extracto durante 1 minuto a 9000 rpm y el sobrenadante se colectó en un tubo cónico de 15 ml. La extracción se repitió dos veces más durante 30 minutos y una vez más durante toda la noche, siempre en oscuridad y a 4°C . Al tubo cónico conteniendo los 4 ml de extracto se le

agregaron 3 ml de eter etílico y se agitó durante 1 minuto, incubándose luego en oscuridad a -20°C durante 20 minutos para lograr la separación de fases. De la fase acuosa (inferior), se tomó una alícuota de 770 μl (35% del volumen total de la fase acuosa) y se transfirió a un tubo de 1,5 ml, al que se agregaron 385 μl de metanol y 192 μl de una solución al 2 % de p-dimetilaminocinnamaldeído (p/v) disuelto en metanol:0,6 N HCl (1:1 v/v). Luego de incubarse a temperatura ambiente durante 20 minutos se midió la absorbancia a 643 nm en un espectrofotómetro (Lambda 25, Perkin Elmer, Waltham).

La curva estándar se realizó mediante el agregado de distintas cantidades de una solución de catequina ((+)-Catequina, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) disuelta en metanol (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) a un extracto de hoja de alfalfa (*Medicago sativa*). Su determinación posterior se realizó en forma simultánea y de la misma manera que las muestras incógnita. Los resultados fueron expresados en mg TC/g MS. Las muestras con concentraciones iguales o mayores a 2,5 mg TC/g MS fueron diluidas a la mitad usando el extracto de hoja de alfalfa. Para la cuantificación de TC insolubles se utilizó el precipitado sobrante de la extracción de TC solubles, el cual se secó durante 48 horas a 32°C . En el mismo tubo se agregaron 200 μl de una solución 1% de dodecilsulfato de sodio y 1200 μl de una solución preparada en proporción 19:1 (v/v) de n-butanol:HCl. Luego se incubó durante 90 minutos a 95°C y se midió la absorbancia a 550 nm usando un espectrofotómetro (Lambda 25, Perkin Elmer, Waltham). Para la conversión a mg TC / g MS se utilizó el coeficiente de extinción ($E^{1\%,550}$) calculado por Stafford y Cheng (Stafford y Cheng 1980).

Por último el cálculo del contenido total de TC, se realizó sumando el contenido de TC solubles más el insoluble y se expresó en mg TC / g MS.

2.3.1.5. Diseño experimental y análisis de datos.

En todos los casos se usó un diseño completamente al azar. Para evaluar la variación intra-poblacional del contenido foliar de TC se utilizaron 40 plantas de la accesión “Pampa INTA” de *L. tenuis* y otras 40 de la accesión “San Gabriel” de *L. corniculatus*. La unidad experimental consistió en la totalidad de hojas de cada planta. De cada accesión se seleccionaron cinco plantas con los contenidos foliares de TC más elevados (grupo de plantas con elevado contenido foliar de TC) y otras cinco con los más bajos (grupo de plantas con bajos contenidos foliares de TC). Las plantas seleccionadas se propagaron vegetativamente en un nuevo ensayo con 3 repeticiones (cada repetición era un clon) para cada genotipo en el cual se evaluaron las diferencias entre los grupos de plantas.

Para evaluar la variación inter-poblacional del contenido foliar de TC de *L. tenuis* y *L. corniculatus* se utilizaron 3 repeticiones para cada accesión. Cada repetición consistía en la totalidad de hojas provenientes de 5 plantas diferentes.

Por último para las especies modelo, *L. japonicus*, *L. burtii* y *L. filicaulis* se utilizaron 6 repeticiones para cada una. Cada repetición consistía en la totalidad de hojas de 5 plantas diferentes.

La homogeneidad de varianzas se comprobó a través de la prueba de Levene y la distribución normal de las observaciones a través de la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks. Para los datos que presentan distribución normal, el análisis se realizó a través de un ANOVA de una vía con un nivel de confianza del 95% y para aquellos casos en que se observó diferencias significativas se realizó el test de comparaciones múltiples de Duncan

con un nivel de confianza del 95%. Por otra parte, cuando los datos no presentaron una distribución normal se realizó un análisis no paramétrico a través de la prueba de Kruskal-Wallis y posterior comparación de a pares en caso de diferencias significativas. Para todos los análisis de datos se utilizó el programa InfoStat (Di Rienzo *et al.* 2011).

2.3.2. Diferenciación entre *L. tenuis* y *L. corniculatus* a través del patrón de tinción de los taninos condensados.

2.3.2.1. Material vegetal.

La evaluación se llevó a cabo en las mismas accesiones de *L. tenuis* denominadas “Chajá”, “Aguapé”, “Esmeralda”, “INTA Pampa”, “El perdido”, “Giannone”, “Ruta 63”, “Watfi”, “Pool A”, “Pool B” y “Delta del Ebro” utilizadas anteriormente. A su vez se evaluaron las accesiones “Gladiador”, “Estanzuela”, “INIA Draco”, “San Gabriel”, “Larrañaga” y “Charlii” de la especie *L. corniculatus*.

2.3.2.2. Tratamiento de las semillas y cultivo de plantas.

Las semillas fueron escarificadas y sembradas de la misma manera mencionada anteriormente. Cuando presentaron los cotiledones expandidos fueron transplantadas a macetas de 150 cm³ que contenían turba. Luego fueron irrigadas con agua destilada y cultivadas en cámara de cultivo. Transcurridas dos semanas desde la siembra, las plantas desarrollaron completamente dos hojas (Figura 2.2), y en ellas se realizó la extracción de los ápices radicales y el folíolo central de la segunda hoja desarrollada. Como en este estadio fenológico no es posible diferenciar morfológicamente ambas especies, las mismas plantas se volvieron a colocar en sus macetas y se continuaron cultivando hasta el momento de floración-fructificación para la confirmación taxonómica de su identidad.



Figura 2.2. Plantas de *Lotus* spp. en estadio de dos hojas desarrolladas, dos semanas luego de la siembra.

2.3.2.3. Determinación del número cromosómico.

La determinación del número cromosómico se llevó a cabo utilizando los ápices radicales. Para ello fueron pretratados con una solución 2 mM 8-hidroxyquinolina durante dos horas a 4 °C y dos horas más a temperatura ambiente. La visualización de cromosomas somáticos fue realizada de acuerdo a (Singh 2003). Los ápices radicales pretratados fueron fijados en una solución de etanol/ácido acético (3:1 v/v) y se dejaron a 4°C durante 2 días. El material fijado fue lavado en una solución 10 mM de tampón citrato a pH 4,6, macerado en una solución con 2% (v/v) de celulasa y 0,5% de pectinasa en tampón citrato 10 mM pH 4,6 durante 20 minutos a 37° C, lavadas en tampón citrato 10 mM pH 4,6 e inmediatamente hidrolizadas en HCl 1N durante 10 minutos a 60 °C. Los ápices radicales fueron teñidos con solución Feulgen (preparada con el reactivo de Schiff) y aplastados en un portaobjetos con una gota de 2% de hematoxilina propiónica para intensificar la tinción de cromosomas. La metafase se observó bajo un microscopio óptico (Nikon Eclipse 600, Nikon, Tokyo) donde se contó el número de cromosomas de 6 células diferentes por cada preparado.

2.3.2.4. Tinción de taninos condensados.

La tinción de TC se llevó a cabo en el foliolo central de la segunda hoja desarrollada. Para ello se utilizó la metodología propuesta por Li *et al.* (1996), para lo cual los foliolos se colocaron en tubos de 1,5 ml que contenían etanol 96% y luego de que la hoja se decoloró completamente con etanol, se retiró el solvente y se agregaron 400 µl de una solución 0,3 % de DMACA disuelto en metanol:HCl 0,6 N. Las muestras se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente e inmediatamente después fueron lavadas dos veces con etanol 96%. Luego de la tinción, los TC se observan de color azul a simple vista. Sin embargo, para una evaluación en mayor detalle, los foliolos se conservaron en etanol 96% y posteriormente fueron observados y fotografiados bajo escaso aumento (10 X) en un microscopio óptico (Nikon SMZ800, Nikon, Tokyo).

2.3.2.5. Identificación taxonómica.

Para la identificación inequívoca de las plantas utilizadas se realizó la confirmación a través de características morfológicas y reproductivas típicas de cada especie. Para ello se utilizaron criterios estándares para su identificación, los cuales se basan en la morfología de la hoja, flores y frutos (Kirkbride 1999, Valdés 2000). A grandes rasgos, la relación largo/ancho del foliolo principal es de 4-5/1 para plantas de *L. tenuis* y menor a 3/1 para plantas de *L. corniculatus*. Otra característica fácilmente observable es la disposición de la vaina, ya que suele encontrarse en posición pendular en plantas de *L. tenuis* mientras que en plantas de *L. corniculatus* suele ser más erecta. Por último, para diferenciar ambas especies, también nos hemos basado en la detallada descripción de las piezas florales realizada por Kirkbride (1999), lo que contribuyó a su mejor identificación taxonómica.

En las accesiones de cosecha propia (“Delta del Ebro” y “charlii”) la determinación taxonómica se llevó a cabo mediante la colaboración de los Dres Benito Valdés y Francisco Pina de la Facultad de Biología (<http://biologia.us.es/>) de la Universidad de Sevilla (España), referentes en la taxonomía del género *Lotus*.

2.3.2.6. Diseño experimental y análisis de datos.

Para todos los experimentos realizados se utilizó un diseño completamente al azar. Cada accesión se consideró como un tratamiento y se utilizaron 15 repeticiones para cada una; cada repetición consistió en una planta de la cual se tomaron 3 raíces para la determinación del número cromosómico y el folíolo central de la segunda hoja desarrollada para la tinción de células tánicas.

2.4. Resultados.

2.4.1. Contenido de taninos condensados en *L. tenuis*.

2.4.1.1. Variación intra-poblacional.

El contenido foliar de TC en el cultivar Pampa INTA dio como resultado los valores de $0,07 \pm 0,05$; $0,85 \pm 0,38$ y $0,92 \pm 0,39$ mg TC/g MS para los TC solubles, insolubles y totales respectivamente. Asimismo, se observó un elevado coeficiente de variación para las tres fracciones: 72% (TC solubles), 45% (TC insolubles) y 42% (TC totales). El contenido más elevado observado fue de 1,46 y el menor de 0,41 mg TC/g MS.

Con el objetivo de determinar si las diferencias en el contenido foliar de TC resultan propias de los genotipos y realizar una selección de aquellas que presenten mayores contenidos fueron seleccionaron y propagadas vegetativamente plantas que presentaron altos y bajos contenidos de TC en sus hojas. Sin embargo, luego de la determinación del contenido foliar de estas plantas no se observaron diferencias significativas para la fracción de TC solubles ($T=1,23$; $p=0,29$), insolubles ($T=-0,45$; $p=0,67$) y totales ($T=0,59$; $p=0,58$). Las determinaciones para cada grupo pueden observarse en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Contenido de TC en hojas de plantas previamente seleccionadas de la accesión “INTA Pampa” de *L. tenuis*. Valores expresados en mg TC/g MS.

	TC Solubles (Media \pm D.E.)	TC Insolubles (Media \pm D.E.)	TC Totales (Media \pm D.E.)
Plantas con mayor contenido de TC	0,32 \pm 0,09	0,66 \pm 0,10	0,98 \pm 0,06
Plantas con menor contenido de TC	0,22 \pm 0,10	0,71 \pm 0,14	0,93 \pm 0,13

2.4.1.2. Variación inter-poblacional.

De la evaluación de los niveles foliares de TC en 27 accesiones de *L. tenuis* se observó que los contenidos totales presentaron una media de $0,75 \pm 0,3$ mg TC/g MS, con valores comprendidos entre 0,21 (“Giannone”) y 1,29 mg TC/g MS (“ARLG03”). La fracción principal correspondió a los TC insolubles con $0,73 \pm 0,32$ mg TC/g MS mientras que los niveles medios de la fracción soluble fueron $0,06 \pm 0,05$ mg TC / g MS (Tabla 2.2). Ninguna accesión se diferenció significativamente del resto en cuanto al contenido total de estos compuestos en sus hojas ($H = 52,4$; $p = 0,0665$).

Tabla 2.2. Contenido foliar de TC de distintas accesiones de *L. tenuis*. Valores expresados en mg TC/g MS.

Accesión	TC Solubles (Media ± D.E.)	TC Insolubles (Media ± D.E.)	TC Totales (Media ± D.E.)
ARLG02	0,06 ± 0,04	0,93 ± 0,13	1,00 ± 0,09
ARLG03	0,01 ± 0,005	1,28 ± 0,05	1,29 ± 0,05
ARLG04	0,03 ± 0,03	0,62 ± 0,31	0,65 ± 0,33
ARLG06	0,06 ± 0,03	0,28 ± 0,22	0,34 ± 0,25
ARLG08	0,03 ± 0,01	0,26 ± 0,15	0,29 ± 0,14
ARLG10	0,05 ± 0,02	0,88 ± 0,45	0,94 ± 0,43
ARLG12	0,03 ± 0,02	0,80 ± 0,22	0,83 ± 0,22
ARLG14	0,05 ± 0,02	0,39 ± 0,17	0,44 ± 0,15
ARLG18	0,02 ± 0,01	1,09 ± 0,24	0,75 ± 0,38
ARLG20	0,08 ± 0,02	0,55 ± 0,10	0,63 ± 0,09
ARLG22	0,06 ± 0,02	1,25 ± 0,10	0,89 ± 0,41
ARLG26	0,02 ± 0,02	1,08 ± 0,34	1,10 ± 0,36
ARLG28	0,01 ± 0,01	0,54 ± 0,27	0,55 ± 0,28
Ayacucho	0,08 ± 0,02	0,93 ± 0,14	1,01 ± 0,15
C. del Uruguay	0,02 ± 0,01	0,57 ± 0,04	0,59 ± 0,03
Chajá	0,01 ± 0,004	1,06 ± 0,03	1,07 ± 0,03
El perdido	0,04 ± 0,02	0,33 ± 0,17	0,36 ± 0,19
Esmeralda	0,10 ± 0,01	0,78 ± 0,07	0,88 ± 0,07
Gapp	0,02 ± 0,004	0,55 ± 0,08	0,57 ± 0,08
Giannone	0,02 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,21 ± 0,01
INTA Pampa	0,25 ± 0,04	0,68 ± 0,05	0,92 ± 0,06
KWS	0,08 ± 0,01	0,79 ± 0,05	0,87 ± 0,06
Monte Urano	0,04 ± 0,01	1,08 ± 0,32	1,12 ± 0,33
Pool A	0,04 ± 0,005	0,54 ± 0,26	0,58 ± 0,26
Pool B	0,07 ± 0,03	1,14 ± 0,38	1,21 ± 0,40
Ruta 63	0,01 ± 0,005	0,59 ± 0,09	0,60 ± 0,09
Waltfi	0,02 ± 0,001	0,42 ± 0,10	0,44 ± 0,10

Se realizaron de la misma manera las mediciones de TC en tallos, determinándose valores medios de $0,03 \pm 0,04$; $1,07 \pm 0,18$ y $1,1 \pm 0,18$ mg TC/g MS para la fracción soluble, insoluble y total respectivamente. El coeficiente de variación fue bajo para la fracción insoluble y total (17%), pero resultó muy elevado para la fracción soluble (115%). Se observó que los niveles medios de TC en tallo no se diferenciaron de los valores medios determinados en hojas para la fracción soluble ($p=0,13$), insoluble ($p=0,07$) y total ($p=0,06$).

2.4.2. Contenido de taninos condensados en *L. corniculatus*.

2.4.2.1. Variación intra-poblacional.

El contenido foliar promedio de TC en la accesión “San Gabriel” fue de 1,45; 2,7 y 4,16 mg TC/g MS para la fracción soluble, insoluble y total respectivamente. El coeficiente de variación de la fracción soluble fue elevado (45%), pero para la fracción insoluble y total se observó un menor coeficiente (27 y 26 %, respectivamente). En el individuo con menores contenidos totales se detectaron 2,22 mg TC/g MS, mientras que para el individuo con los contenidos más elevados se obtuvieron 5,87 mg TC/g MS.

La reevaluación de plantas seleccionadas por su contenido foliar contrastante en TC, permitió observar diferencias significativas ($p < 0,0001$) entre el grupo de plantas con bajos niveles de TC y el grupo de plantas con altos contenidos de TC (Tabla 2.3). Las diferencias observadas entre los dos grupos fueron de 0,09; 1,69 y 1,78 mg TC/g MS para la fracción soluble, insoluble y total respectivamente.

Tabla 2.3. Contenido de TC en hojas de plantas de *L. corniculatus* “San Gabriel” previamente seleccionadas. El símbolo * indica diferencia significativa dentro de cada columna (Prueba t de Student para muestras independientes, $p < 0,0001$).

	TC Solubles (Media ± D.E.)	TC Insolubles (Media ± D.E.)	TC Totales (Media ± D.E.)
Plantas con mayor contenido	0,10 ± 0,10	2,34 ± 0,61	2,44 ± 0,68
Plantas con menor contenido	0,01 ± 0,03 *	0,65 ± 0,13 *	0,66 ± 0,13 *

2.4.2.2. Variación inter-poblacional.

Se evaluó el contenido foliar de TC en 13 accesiones de *L. corniculatus*. El contenido promedio de TC fue de 2,5; 4,06 y 7,75 mg TC/g MS para la fracción soluble, insoluble y total respectivamente. Se observó una mayor variabilidad para las tres fracciones que la observada para las accesiones de *L. tenuis*, siendo los coeficientes de variación de 103% (TC solubles), 61% (TC insolubles) y 82% (TC totales).

Contrariamente a lo observado al analizar el contenido de TC de las accesiones de *L. tenuis*, en el caso de *L. corniculatus* se observaron diferencias significativas en los niveles de las distintas accesiones estudiadas ($H=80,69$; $p < 0,0001$). Las accesiones “Estanzuela”, “Intermedio”, “Persistencia” y “Vigor” presentaron los menores contenidos totales (entre 2,2 y 4,12 mg TC/g MS) mientras que la accesión “charlii” presentó el contenido más elevado (23 mg TC/g MS) (Tabla 2.4).

Tabla 2.4. Contenido foliar de TC en diferentes accesiones de *L. corniculatus*, los valores están expresados en mg TC/g MS. Prueba de Kruskal-Wallis, comparación de a pares. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Accesión	TC Solubles			TC Insolubles			TC Totales		
	Media	D.E.	Rango	Media	D.E.	Rango	Media	D.E.	Rango
Charlii	10,62 ± 1,54	110	e	10,73 ± 4,88	106	e	23,13 ± 7,05	109	e
Creeping	1,13 ± 0,25	24	ab	4,95 ± 1,88	86	de	5,30 ± 0,59	68	cd
Creeping I	1,48 ± 0,46	35	abc	4,04 ± 0,68	79	cde	5,53 ± 1,01	70	cd
Creeping II	1,93 ± 1,41	43	abcd	4,88 ± 3,32	81	de	4,93 ± 0,96	61	bcd
El Boyero	0,75 ± 0,20	8	a	1,48 ± 0,52	30	ab	2,23 ± 0,52	9	a
Estanzuela	3,29 ± 0,73	85	de	5,42 ± 1,73	92	de	8,70 ± 2,38	89	de
Gladiador	1,32 ± 0,78	29	ab	3,33 ± 1,87	67	bcd	4,65 ± 2,14	50	bcd
INIA Draco	2,90 ± 0,68	77	cde	4,01 ± 2,37	72	bcde	6,91 ± 2,97	73	cde
Intermedio	1,07 ± 0,19	21	a	1,88 ± 0,43	41	abc	2,95 ± 0,49	21	ab
Larrañaga	2,56 ± 0,75	67	bcd	5,59 ± 0,93	95	de	8,16 ± 1,60	92	de
Persistencia	1,62 ± 0,69	39	abc	2,49 ± 1,14	54	abcd	4,12 ± 1,47	45	abc
San Gabriel	2,70 ± 0,73	70	cd	1,45 ± 0,66	29	a	4,16 ± 1,10	45	bc
Vigor	1,13 ± 0,49	23	a	2,64 ± 1,35	55	abcd	3,77 ± 1,65	39	abc

2.4.3. Comparación del contenido foliar de taninos condensados entre *L. tenuis* y *L. corniculatus*.

Luego de la comparación del contenido foliar de TC entre las 27 accesiones de *L. tenuis* y las 13 de *L. corniculatus*, pudieron observarse diferencias para la fracción soluble ($H=25,7$; $p<0,0001$), insoluble ($H=25,7$; $p<0,0001$) y total ($H=25,7$; $p<0,0001$). El contenido foliar de TC de *L. corniculatus* resultó significativamente mayor al de *L. tenuis* (Tabla 2.5). Las diferencias entre especies fueron de 2,44; 3,34 y 5,75 mg TC/g MS para la fracción soluble, insoluble y total respectivamente.

Tabla 2.5. Contenido foliar de TC en *L. tenuis* y *L. corniculatus*, valores expresados en mg TC/g MS. Prueba de Kruskal-Wallis, el símbolo * significa diferencia significativa dentro de cada columna ($p<0,01$).

Espece	TC solubles (Media \pm D.E.)	TC insolubles (Media \pm D.E.)	TC totales (Media \pm D.E.)
<i>L. tenuis</i>	0,06 \pm 0,05	0,73 \pm 0,32	0,75 \pm 0,30
<i>L. corniculatus</i>	2,50 \pm 2,57 *	4,07 \pm 2,47 *	6,50 \pm 5,34 *

2.4.4. Diferenciación entre *L. tenuis* y *L. corniculatus* a través del patrón de tinción de taninos condensados.

La identidad específica de todas las plantas utilizadas fue corroborada a través de sus características morfológicas y reproductivas.

Se pudo observar que la totalidad de plantas de las diferentes accesiones de *L. tenuis* carecían de TC o se encontraban presentes solamente en el tejido adyacente a los haces vasculares (Figura 2.3 A, B y C). En paralelo, todas las muestras presentaron un número de cromosomas diploide ($2n = 12$), exceptuando las accesiones autotetraploides “Pool A” y “Pool B” cuyo número cromosómico era $2n = 24$ (Figura 2.4 i, ii y iii).

Contrariamente, la totalidad de las plantas de las diferentes accesiones de *L. corniculatus* presentaron TC a lo largo de toda la hoja, tanto en el tejido adyacente a los haces vasculares como en el mesófilo (Figura 2.3 D, E y F). Al mismo tiempo pudo determinarse que la totalidad de las plantas presentaron un número de cromosomas tetraploide ($2n = 24$), con excepción de los individuos provenientes de la accesión “charlii”, la cuál resultó diploide (Figura 2.4 iv, v y vi).

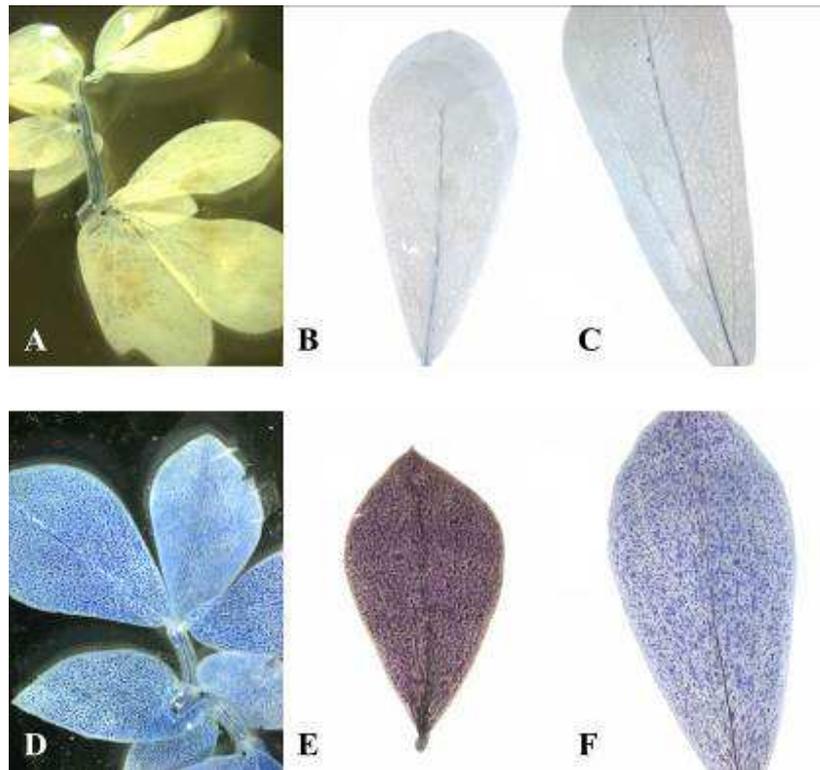


Figura 2.3. Tinción de TC en hojas de *Lotus* spp. Las fotos A, B y C corresponden a hojas de *L. tenuis*; las fotos D, E y F a *L. corniculatus*. A. “INTA Pampa”, B. “Pool A”, C. “Esmeralda”, D. “San Gabriel”, E. “charlii”, F. “Gladiator”.

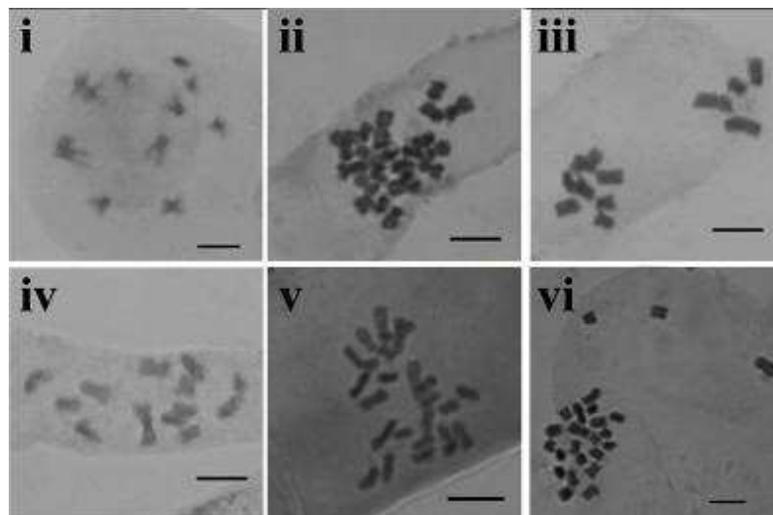


Figura 2.4. Células mitóticas de *Lotus* spp. teñidas con solución Felguen y hematoxilina propiónica (1000 X). Las fotos i, ii y iii corresponden a *L. tenuis* y las fotos iv, v y vi a *L. corniculatus*; i. “Delta del Ebro”, ii. “INTA Pampa”, iii. “Pool A”, iv. “Charlii”, v. “Gladiator” y vi. “San Gabriel”. La barra equivale a 5 μ m.

Incluso en la accesión “Estanzuela”, cuyos contenidos eran menores al de otras accesiones de *L. corniculatus*, pudo observarse claramente el patrón de tinción de TC característico de

la especie, aunque el patrón de TC presentó menor densidad. En la Figura 2.5 puede observarse el gradiente en la presencia de TC en las hojas de distintas plantas de *L. corniculatus*.



Figura 2.5. Patrón de tinción de TC en hojas de diferentes plantas de la especie *L. corniculatus*.

Se evaluó posteriormente si mediante la tinción de TC en estado de cotiledones expandidos se podía observar el mismo patrón diferencial entre las dos especies. Sin embargo los resultados demostraron que en cotiledones de *L. corniculatus* y *L. tenuis* no se observan TC (Figura 2.6). Incluso en poblaciones con contenidos de TC foliares muy elevados (“charlii”) se observó la ausencia de TC en cotiledones. Por el contrario, el patrón de tinción de TC foliares característico de cada especie fue detectable en estadios fenológicos tan tempranos como el correspondiente al de la primera hoja expandida (Figura 2.6).



Figura 2.6. Patrón de tinción de TC en cotiledones y primera hoja desarrollada de plantas de *L. tenuis* y *L. corniculatus*.

2.4.5. Contenidos foliares de taninos condensados en otras especies del género *Lotus*.

La evaluación del contenido foliar de TC en el cultivar “Maku” de *L. uliginosus* dio como resultado un nivel medio de $7,70 \pm 3,81$; $10,02 \pm 3,46$ y $17,72 \pm 6,32$ mg TC / g MS para la fracción soluble, insoluble y total respectivamente. En comparación con el contenido foliar promedio de TC en *L. corniculatus*, los contenidos en *L. uliginosus* fueron marcadamente superiores ($H=9,1$; $p=0,002$ para TC solubles, $H=10,7$; $p=0,001$ para TC insolubles y $H=9,5$; $p=0,002$ para TC totales) (Tabla 2.6).

A nivel poblacional, se observó que los contenidos foliares de TC en la accesión “charlii” de *L. corniculatus*, no se diferenciaron de aquellos determinados en las hojas del cultivar “Maku” ($H=2,5$; $p=0,11$). Por otra parte, el resto de las accesiones de *L. corniculatus* presentaron diferencias significativas con *L. uliginosus* ($p>0,05$).

Tabla 2.6. Contenido foliar de TC en *L. corniculatus* y *L. uliginosus*, valores expresados en mg TC/g MS. Prueba de Kruskal-Wallis, el símbolo * indica diferencias significativas dentro de cada columna ($p<0,01$).

Especie	TC solubles (Media \pm D.E.)	TC insolubles (Media \pm D.E.)	TC totales (Media \pm D.E.)
<i>L. corniculatus</i>	3,36 \pm 3,28	4,06 \pm 3,99	7,75 \pm 7,74
<i>L. uliginosus</i>	7,70 \pm 3,81 *	10,02 \pm 3,46 *	17,72 \pm 6,32 *

En las especies modelo de estudio (*L. japonicus*, *L. filicaulis* y *L. burtii*) se observó que el contenido foliar de TC resultó bajo (Tabla 2.7). Solamente los contenidos foliares de TC totales de *L. burtii* se diferenciaron significativamente del resto de las especies modelo ($F=8,2$; $p=0,0008$). Sin embargo, esta diferencia resultó relativamente baja (alrededor de 0,7 mg TC / g MS más que el resto).

Tabla 2.7. Contenido foliar de TC en especies de *Lotus* utilizadas como modelo científico. Prueba de Duncan, medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p<0,05$).

	TC solubles (Media \pm D.E.)	TC insolubles (Media \pm D.E.)	TC totales (Media \pm D.E.)
<i>L. burtii</i>	0,11 \pm 0,12 a	1,66 \pm 0,28 b	1,99 \pm 0,53 b
<i>L. filicaulis</i>	0,21 \pm 0,15 a	1,07 \pm 0,12 a	1,27 \pm 0,06 a
<i>L. japonicus</i> Gifu	0,13 \pm 0,10 a	0,93 \pm 0,47 a	1,06 \pm 0,51 a
<i>L. japonicus</i> MG20	0,13 \pm 0,15 a	1,00 \pm 0,13 a	1,13 \pm 0,20 a

No se observaron diferencias significativas en el contenido foliar total de TC ($p>0,01$) entre *L. tenuis* y el ecotipo Gifu de *L. japonicus*. Por otra parte, las plantas del ecotipo MG20 de *L. japonicus*; de *L. burtii* y de *L. filicaulis* presentaron contenidos levemente superiores ($F=18,5$; $p<0,0001$). Sin embargo, todas las especies modelo analizadas presentaron valores inferiores a *L. corniculatus* ($p>0,01$). Asimismo, pudo observarse que sus patrones de tinción de TC en hojas eran similares al observado en *L. tenuis* (Figura 2.7).

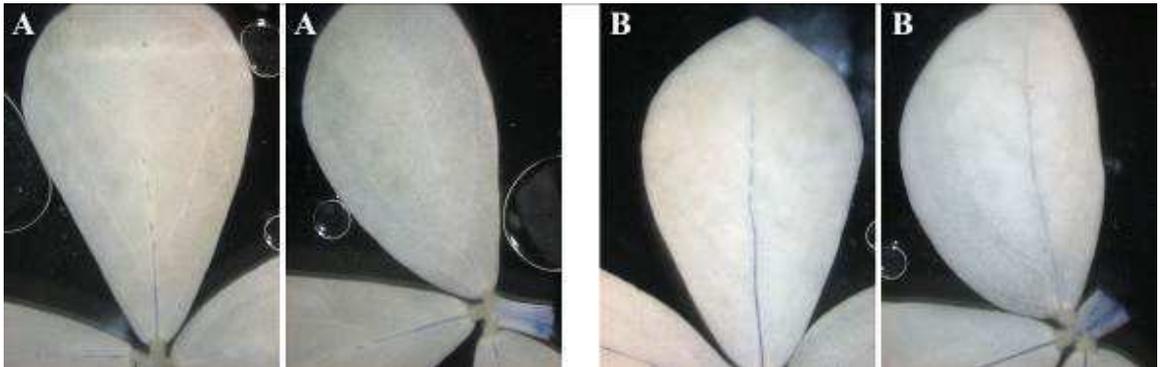


Figura 2.7. Tinción de TC en hojas de *L. japonicus*. **A.** ecotipo Gifu. **B.** ecotipo MG20.

2.5. Discusión.

Existe una marcada diferencia en los valores absolutos reportados en bibliografía sobre el contenido de TC en especies de *Lotus*. Ello se debe, posiblemente, a que existen numerosas y diferentes metodologías para la cuantificación de TC (Schofield *et al.* 2001). En el género *Lotus* los métodos más utilizados son tres: el ensayo del butanol-HCl (Porter *et al.* 1985); el ensayo de la vainillina-HCl (Price *et al.* 1978) y el ensayo del DMACA-HCl (Li *et al.* 1996). Sin embargo, los dos primeros métodos presentan ciertos inconvenientes, en este sentido, los usuarios del método del butanol-HCl deben considerar ciertas limitaciones y consideraciones como por ejemplo que la cantidad de agua en el medio de reacción resulta crítica en la formación de color, que la facilidad con que el ácido rompe el vínculo entre flavonoles varía ampliamente, que el número de grupos fenólicos en los anillos A y B afectan la longitud de onda en que se ocurre la máxima absorbancia y el coeficiente de extinción de los productos, que el rendimiento en color no siempre es lineal con la cantidad de TC que se incorpora, etc. (Schofield *et al.* 2001). Por otra parte, utilizando el método de la vainillina-HCl, cabe destacar que se ha reportado que la utilización de HCl como catalizador conduce a resultados con baja reproducibilidad (Scalbert 1992). Sumado a ello, se debe tener presente que la vainillina posee una reactividad variable con las subunidades de los TC (Schofield *et al.* 2001). Debido a ello, se ha reportado la sobreestimación en algunas fuentes ricas en flavonoides (García y Medina 2005) ya que la formación de cromógenos y la presencia de antocianidinas interfieren significativamente en la medición espectrofotométrica (Li *et al.* 1996).

Varias son las razones por las cuales el protocolo de extracción del DMACA-HCl resulta el más indicado para la determinación de estos compuestos en las especies de *Lotus*. La más importante es su sensibilidad, la cual resulta cinco veces mayor que la del método que utiliza vainillina-HCl, lo que permite la detección de valores muy bajos de estos compuestos. Otra ventaja del ensayo DMACA es su simpleza con respecto al ensayo de vainillina, ya que los experimentos pueden llevarse a cabo a temperatura ambiente (García Ramírez 2005). Sumado a ello, el DMACA resulta más específico, ya que no responde a un amplio rango de flavonoides, lo que determina que el método es altamente reproducible (Li *et al.* 1996).

Es importante tener en cuenta que la mayoría de los trabajos mencionados en la introducción, los valores reportados en las especies de *Lotus* se encuentran en el orden de 24-40 mg TC / g MS para *L. corniculatus*, 65-85 mg TC / g MS para *L. uliginosus* y 8 mg

TC / g MS para *L. tenuis*, ello se debe a que en los mismos se han utilizado metodologías diferentes para la determinación de los niveles de TC. Las determinaciones realizadas mediante el protocolo DMACA-HCl resultaron en el orden de los 2,5; 17,7 y 0,75 mg TC/g MS para *L. corniculatus*, *L. uliginosus* y *L. tenuis* respectivamente. Estos valores a su vez, exceptuando al de *L. tenuis*, son comparables a los reportados previamente por Li y col (Li *et al.* 1996) quienes realizaron las determinaciones de la misma manera.

Por otra parte, se ha reportado que la intensidad de luz afecta la biosíntesis de TC en plantas de *L. corniculatus* (Paolucci *et al.* 1999). Teniendo en cuenta que los ensayos fueron realizados en un cuarto de cultivo donde la intensidad de luz fue relativamente baja ($225 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en comparación con la que podrían recibir en un ambiente natural, podríamos considerar que esta situación podría haber afectado la acumulación de TC en las especies evaluadas. Sin embargo, en otros ensayos realizados con plantas de *L. tenuis* cultivadas en invernadero durante primavera-verano 2008-2009 a una densidad de flujo fotónico promedio de $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ se observaron niveles foliares de TC similares al de las mismas plantas cultivadas en cámara de cultivo ($T=1,4$; $p=0,18$ para TC solubles; $T=1,5$; $p=0,16$ para TC insolubles y $T=1,7$; $p=0,11$ para TC totales). En accesiones de *L. corniculatus* y la accesión "Maku" de *L. uliginosus* tampoco se observaron diferencias significativas ($p>0,01$) entre los valores determinados en individuos cultivados bajo condiciones de invernadero y aquellos cultivados en las condiciones del cuarto de cultivo. A su vez, las condiciones controladas del cuarto de cultivo permitieron mantener constantes otras variables que también han sido reportadas en la literatura como factores que podrían afectar el contenido de TC, como por ejemplo la temperatura, la humedad y el fotoperíodo (Carter *et al.* 1999) lo que nos permitió obtener una buena reproducibilidad en las determinaciones de TC.

Independientemente de los valores absolutos obtenidos y de aquellos reportados en la bibliografía, es indudable que las accesiones de *L. tenuis* presentan bajos contenidos foliares de TC, mientras que las accesiones de *L. uliginosus* presentan contenidos muy elevados. Por su parte las accesiones de *L. corniculatus* presentan contenidos intermedios y variables, lo cual resulta consistente con trabajos previamente realizados por otros laboratorios (Sivakumaran *et al.* 2006).

Si bien en la mayoría de las determinaciones del contenido foliar de TC realizadas en plantas de *L. tenuis* se observaron contenidos bajos de los mismos (Kelman y Tanner 1990, Strittmatter *et al.* 1992, Terrill *et al.* 1992, Gebrehiwot *et al.* 2002, Sivakumaran *et al.* 2006), también algunos autores han reportado valores elevados en la especie. En este sentido, Acuña y col. (Acuña *et al.* 2008) determinaron contenidos comprendidos entre 3,9 y 6,6 % de la MS para esta especie. Sin embargo, atribuyen este nivel al estado de avanzada madurez y floración de las plantas evaluadas. Li y col. (Li *et al.* 1996) también han reportado mayores contenidos en esta especie (5,5 mg TC/g MS).

Una de las razones posibles de que en dichos trabajos se hayan observado contenidos más elevados, constituye el hecho de haber incluido las flores en el material a evaluar. En este sentido, se ha reportado que las flores de *L. tenuis* presentan altos niveles de TC (Gebrehiwot *et al.* 2002), y por lo tanto, la presencia de una mayor proporción de las mismas en la muestra, determinaría una sobreestimación del contenido de TC. Otra de las posibles razones que justifique estos valores elevados, podría ser que la pureza específica de las plantas utilizadas para la determinación no sea totalmente confiable. Como ya se ha comentado, es muy común encontrar contaminaciones de semillas de *L. corniculatus* entre las semillas de *L. tenuis* (Kade *et al.* 1997, Giorgieri *et al.* 1998), y como su diferenciación

taxonómica resulta relativamente dificultosa, es probable que se cometa el error de cuantificar TC en una muestra que presente una mezcla de especies.

No obstante ello, la alta variabilidad fenotípica observada en plantas de *L. tenuis* (Pesqueira 2008) permitiría suponer que existen genotipos con mayores contenidos foliares de estos compuestos. Sin embargo, la determinación de TC en un número amplio de plantas y accesiones de *L. tenuis* realizado en este trabajo, demostró un contenido medio bajo (0,75 mg TC/g MS) para la especie. Si bien su coeficiente de variación fue del 42% al seleccionar individuos contrastantes, no se observaron diferencias significativas entre ellos. Sumado a ello, también es importante considerar que ninguna accesión superó los 1,3 mg TC / g MS y que ningún individuo de los numerosos analizados, superó los 1,5 mg TC/g MS. No se observó la misma respuesta para la población de *L. corniculatus* “San Gabriel”, que a pesar de presentar un coeficiente de variación relativamente menor para los niveles de TC totales (26%) al seleccionar individuos contrastantes para este carácter se lograron poblaciones diferenciales en sus niveles foliares de TC; en este sentido, la posibilidad de modificación de los niveles de TC en *L. corniculatus* ha sido reportada por otros autores anteriormente (Miller y Ehlke 1997).

Teniendo en cuenta que el valor objetivo para obtener los beneficios derivados de estos compuestos en leguminosas forrajeras es de alrededor de 5 mg TC/g MS (Li *et al.* 1996), las plantas de *L. tenuis* se encuentran por debajo de este valor. Más aún, su contenido promedio se encuentra por debajo del mínimo recomendado para evitar el empaste (1 mg TC/g MS) (Li *et al.* 1996).

Por su parte, se determinó que las plantas de *L. corniculatus* presentaron un contenido foliar promedio de 7,75 mg TC/g MS, el cual se encuentra muy cercano al recomendado para leguminosas forrajeras (Li *et al.* 1996). Esta observación resulta concordante con trabajos realizados anteriormente (Aerts *et al.* 1999a, Barry y McNabb 1999). Sumado a ello, se observó una alta variación para el contenido foliar de TC entre plantas y que a través de la selección de aquellas contrastantes se pueden obtener poblaciones de plantas con contenidos diferenciales de TC. En este sentido la variación del contenido foliar de TC en *L. corniculatus* y *L. uliginosus* ha permitido obtener poblaciones con contenidos adecuados de TC para su utilización como forrajeras a través de la selección masal (Miller y Ehlke 1996, Miller y Ehlke 1997, Kelman 1999, Larkin *et al.* 1999).

Por otra parte, en nuestro trabajo realizamos la determinación simultánea y comparación del contenido foliar de TC entre *L. tenuis* y *L. corniculatus* (Tabla 2.6), y del patrón de tinción foliar de estos compuestos en ambas especies. En este sentido pudimos observar que el patrón de tinción en hojas de *L. tenuis* y *L. corniculatus* resultó marcadamente diferente (Figura 2.3) y reproducible. Los resultados demostraron que, sin importar el nivel de ploidía, el patrón de tinción de TC constituye un carácter especie-específico que contribuye a su diferenciación.

También es digno de mención el hecho de que este método no requiere dispositivos ópticos, ya que las diferencias en la intensidad de tinción son observables a simple vista. Además, también es importante destacar que dichas diferencias son perceptibles en estadios fenológicos tempranos (una hoja desarrollada, Figura 2.6) lo cual podría insumir unos 10 días de crecimiento solamente. Sumado a ello, también es importante destacar que constituye un método no destructivo de la planta y reproducible en estado adulto (dato no mostrado). Por todo ello, los resultados de nuestro trabajo sugieren que el patrón de tinción de los TC en hojas constituye una técnica más rápida, fácil de realizar y económica que permite distinguir *L. tenuis* y *L. corniculatus*, lo que contrasta claramente con el análisis

cariológico, el análisis del patrón de flavonoides y de las proteínas de reserva. Por lo tanto, esta metodología constituye una opción práctica para los productores, la cual les permitiría evaluar la pureza del stock de semillas de *L. tenuis*.

2.6. Conclusiones.

- El incremento de los contenidos de TC foliares en *L. tenuis* constituye un objetivo tecnológico de mejora, la cual difícilmente podría ser lograda a través de la selección recurrente, si se tiene en cuenta la ausencia de individuos con contenidos elevados de dichos compuestos.
- El patrón de tinción de los TC foliares podría ser utilizado como técnica rutinaria para la determinación de la pureza específica de las diferentes poblaciones de *L. tenuis* y *L. corniculatus*.

3. Capítulo 3. La hibridación interespecífica como herramienta para el mejoramiento de la calidad forrajera en el género *Lotus*.

3.1. Introducción.

3.1.1. Mejoramiento de la calidad forrajera a través de la optimización del contenido foliar de taninos condensados.

Tal como se ha descrito en la introducción general, un adecuado contenido de TC en las leguminosas forrajeras se encuentra relacionado con múltiples beneficios para la producción ganadera. Es por ello que uno de los objetivos tecnológicos relacionados con el mejoramiento de la calidad forrajera en el género *Lotus*, es aquel inherente a la optimización del contenido foliar de TC (Larkin *et al.* 1999). En este sentido, se ha demostrado que es posible adecuar el mismo en algunas de las especies del género *Lotus* a través de técnicas de mejoramiento tradicionales como la selección masal (Miller y Ehlke 1997).

Ejemplo de ello lo constituye la obtención de cultivares de *L. uliginosus* con niveles óptimos de TC, a partir de ciertas poblaciones con contenidos excesivos para su utilización como forraje (>40 mg TC/g MS) (Kelman 1999, Larkin *et al.* 1999, Kelman *et al.* 2007). De la misma manera, en poblaciones de *L. corniculatus* se han realizado selecciones bidireccionales obteniéndose poblaciones con altos ó bajos contenidos de TC (Miller y Ehlke 1996).

La posibilidad de selección masal para adecuar el contenido de TC está dada por: a) el tipo de herencia de los genes que lo regulan y b) la existencia de variabilidad en el contenido de diferentes plantas de la misma especie.

En relación al primer punto, se determinó que el contenido foliar de TC en plantas de *L. corniculatus* se encuentra controlado por efectos genéticos aditivos, incluyendo epistasis aditiva, lo que indica un tipo de herencia cuantitativa para este carácter (Miller y Ehlke 1997). A su vez, se ha observado que los genes que regulan el contenido de TC presentan una heredabilidad cercana a 0,5 (Dalrymple *et al.* 1984, Kelman *et al.* 1997, Miller y Ehlke 1997). Esta última observación deja en evidencia que la limitante para la posibilidad de selección masal no está dada por el tipo de herencia de los genes que regulan la acumulación de TC.

El otro punto importante para llevar a cabo el mejoramiento vegetal del contenido de TC con un enfoque convencional, es la existencia de variabilidad en el germoplasma disponible (Larkin *et al.* 1999). En este sentido, la presencia de variabilidad en el contenido foliar de TC, junto con el tipo de herencia de los genes que los regulan, ha favorecido la efectividad de la selección masal para las especies *L. corniculatus* y *L. uliginosus* (Miller y Ehlke 1996, Kelman 1999, Larkin *et al.* 1999, Kelman *et al.* 2007).

Sin embargo, como fuera observado durante la realización de esta tesis, la ausencia de poblaciones o plantas de *L. tenuis* que se diferencien en el contenido foliar de TC, impide la utilización de técnicas convencionales de mejoramiento para la optimización de los niveles de estos compuestos en dicha especie. Al mismo tiempo, se pudo observar que las poblaciones de *L. tenuis* presentan contenidos foliares de TC bajos. Es por ello que el incremento moderado de su contenido contribuiría a mejorar la calidad forrajera de esta especie. No obstante, en la bibliografía disponible no existe ningún reporte sobre la obtención de poblaciones en las que se haya logrado incrementar el contenido de TC.

Por estas razones, nos planteamos realizar la evaluación y utilización de estrategias no tradicionales con el objetivo de lograr un incremento de estos compuestos en *L. tenuis*. En particular se evaluará el cruzamiento interespecífico entre *L. tenuis* y *L. corniculatus* el cual podría ser una estrategia interesante para la incorporación de TC a la primera de las especies.

Los cruzamientos interespecíficos constituyen una herramienta tecnológica frecuentemente utilizada por los mejoradores para incrementar la variabilidad en el germoplasma o para incorporar algún carácter de interés en determinadas especies (Razdan y Cocking 1981). En el caso particular de *Lotus*, algunos autores han sugerido su utilización para el mejoramiento genético de los caracteres agronómicos en el género (Kelman *et al.* 1997, Grant 1999, Kelman 2006a).

A su vez, los cruzamientos interespecíficos entre las especies del género *Lotus*, y en particular entre las que integran el grupo filogenético *Lotus corniculatus*, se ven favorecidos por el estrecho parentesco entre las mismas como se hace mención en el apartado siguiente.

3.1.2. El grupo filogenético *Lotus corniculatus* y la generación de híbridos interespecíficos.

Las especies agronómica y científicamente más importantes del género *Lotus* (*L. corniculatus*, *L. tenuis* y *L. japonicus*) se encuentran filogenéticamente incluidas, junto con otras pocas especies más, dentro del grupo *Lotus corniculatus* (Figura 3.1). Estas especies presentan diferentes niveles de ploidía, pero con un número básico de 6 cromosomas (Degtjareva *et al.* 2008).

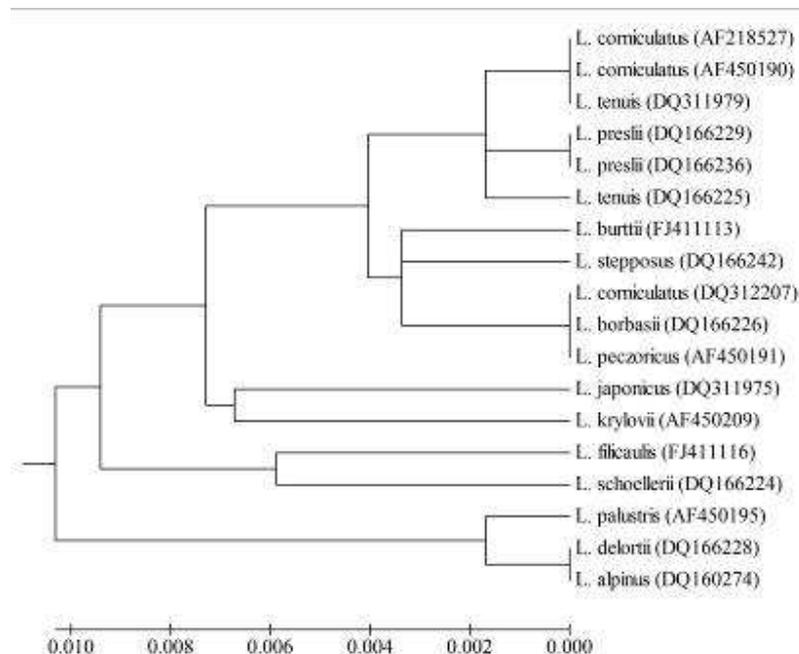


Fig. 3.1. Árbol filogenético de las especies pertenecientes al grupo *Lotus corniculatus*, basada en la secuencia nucleotídica de la región nrITS. Adaptado de Escaray *et al.* (2012).

Existe una gran controversia alrededor de las relaciones filogenéticas entre las especies del grupo *Lotus corniculatus*; debido a que ha sido posible el cruzamiento exitoso entre muchas de ellas (Somaroo y Grant 1971, Grant 1999). En este sentido, mediante la fertilización manual ha sido posible obtener con relativa facilidad, plantas híbridas a partir del cruzamiento entre diferentes especies integrantes del grupo *Lotus corniculatus* (Somaroo y Grant 1971). También se han obtenido híbridos fértiles entre *L. corniculatus* y *L. uliginosus* (Latour *et al.* 1978, Grant 1999) a pesar de que ésta última especie no se encuentra incluida dentro del grupo *Lotus corniculatus* (Gauthier *et al.* 1997).

Los mejoradores han utilizado la posibilidad de cruzar distintas especies de *Lotus*, como una herramienta para la generación de híbridos interespecíficos con diversos objetivos agronómicos. Algunos ejemplos de ello son los cruzamientos realizados con el objetivo de obtener cultivares rizomatosos (Beuselinck y Steiner 1996, Grant 1999, Beuselinck 2004); evitar la dehiscencia de la vaina (O'Donoghue y Grant 1988, Grant 1999, Repková y Hofbauer 2009); mejorar el vigor de plántula (Grant 1999, Beuselinck *et al.* 2003) y por último, mejorar la tolerancia al ataque de insectos y a ciertas enfermedades foliares (Grant 1999, Beuselinck *et al.* 2003).

Si bien *L. tenuis* y *L. corniculatus* se encuentran filogenéticamente cercanas, muchos mejoradores no han tenido éxito en la obtención de híbridos interespecíficos entre ambas. La principal causa de ello se debe al aborto embrionario durante estados tempranos de desarrollo (Grant 1999). Incluso, se ha llegado a sugerir que *L. corniculatus* no se podría hibridar con *L. tenuis* (Tomé y Johnson 1945).

Pese a esta sugerencia, algunos híbridos han sido obtenidos entre *L. corniculatus* (4X) y *L. tenuis* autotetraploides (4X) usando técnicas de cultivo de embriones (Grant 1999). Mientras que, en otros laboratorios, se han obtenido híbridos al cruzar plantas “macho estériles” de *L. corniculatus*, con plantas normales y diploides de *L. tenuis* (Negri y Veronesi 1989). Sin embargo, en ambos casos, el bajo número de semillas viables obtenidas dificultó su aplicación biotecnológica.

Queda en evidencia que el mayor problema en la obtención de plantas híbridas entre *L. tenuis* y *L. corniculatus* resulta de la diferencia en la ploidía de ambas especies. Es por ello que hasta el momento, los cruzamientos exitosos se han limitado a la obtención de plantas autotetraploides o al uso de gametas $2n$ de *L. tenuis*.

Otra estrategia posible es la obtención de plantas híbridas mediante el uso de poblaciones de *L. corniculatus* que, al igual que *L. tenuis*, sean diploides. En este sentido, cabe destacar que la existencia de diferentes poblaciones diploides de *L. corniculatus* ha sido reportada previamente (Grant 1995, Kirkbride 1999). Sin embargo, solo existe disponible un reporte preliminar donde se describe el uso de plantas de una accesión diploide de *L. corniculatus* para su cruzamiento con plantas diploides de *L. tenuis* (Samek y Beuselinck 1994). En función de ello, nos propusimos la estrategia de utilizar poblaciones diploides de *L. corniculatus* para su cruzamiento con poblaciones, también diploides, de *L. tenuis*.

Por otra parte, en las dos últimas décadas ha tenido lugar un notable aumento de las actividades agrícolas, lo que trajo como consecuencia una disminución y desplazamiento de las superficies destinadas a ganadería (Rearte 2004, Manuel-Navarrete *et al.* 2007, Rearte 2010). El desplazamiento de la ganadería hacia ambientes edafo-climáticos más restrictivos para la agricultura, incentivó la búsqueda de especies forrajeras que presenten buena implantación, supervivencia y producción bajo estas condiciones. Dentro de este contexto general, ciertas poblaciones de especies forrajeras del género *Lotus* se destacan por su adaptabilidad a condiciones de menor aptitud agrícola. Considerando esta ventaja, la

selección de los parentales adecuados para el cruzamiento interespecífico podría resultar en materiales vegetales con una mayor tolerancia a diferentes estreses ambientales junto con un contenido recomendado de TC.

Teniendo en cuenta que la tolerancia a condiciones edáficas restrictivas de *L. tenuis* resulta mayor que la demostrada para poblaciones comerciales de *L. corniculatus* (Escaray *et al.* 2012), es de interés la selección de poblaciones de *L. corniculatus* que no solo sean diploides sino que preferentemente hayan demostrado cierta tolerancia a diferentes estreses abióticos.

En este sentido, cabe destacar la población de *L. corniculatus* identificada en la Devesa de la Albufera y que en nuestro laboratorio denominamos como “charlii” (apéndice 1). Esta población, adaptada a condiciones edáficas restrictivas, resulta de interés para su evaluación y potencial utilización como parental para la obtención de híbridos interespecíficos. A su vez, su particular interés botánico motivó un nuevo objetivo orientado a profundizar su evaluación taxonómica conjuntamente con otras especies del género.

3.1.3. Tolerancia al estrés salino.

Como fuera mencionado, uno de los principales problemas a los cuales se encuentran expuestas las especies forrajeras en la Pampa Deprimida son las condiciones de salinidad.

La salinidad de los suelos afecta aproximadamente al 7% de la superficie terrestre total, lo cual equivale a 930 millones de ha (Szabolcs 1994). Asimismo, el continuo aumento que sufre el área de tierras afectadas por salinización secundaria causada por actividades antrópicas, es aún más preocupante. Estimaciones recientes afirman que más de 70 millones de hectáreas agrícolas se encuentran afectadas por este problema (FAO 2005).

Los suelos salinos suelen presentar distintas combinaciones de sales, siendo comunes los cloruros y los sulfatos de Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , los cuales son considerados sales neutras, debido a que no alcalinizan el suelo. Por el contrario, la presencia de carbonato y bicarbonato de Na^+ , causa un incremento del valor del pH edáfico.

La salinidad de la solución del suelo o del agua de riego, se cuantifica generalmente en términos de conductividad eléctrica; a concentraciones salinas más altas, mayor es la conductividad. Se considera entonces que un suelo es salino cuando el contenido de sales supera el 1,5%, o cuando su conductividad eléctrica es mayor o igual a 4 dS/m, valor que equivale aproximadamente a 40 mM de NaCl (Etchevehere 1976, Munns y Tester 2008).

La presencia de sales en el suelo tiene un efecto inmediato en el crecimiento celular y el metabolismo de las plantas. Concentraciones tóxicas de sales toman tiempo en acumularse dentro de las plantas y cuando esto ocurre, se ve afectado el funcionamiento normal de las mismas (Munns y Tester 2008). Esto se debe a que la salinidad edáfica afecta a las plantas de dos maneras, produciendo una respuesta bifásica (Figura 3.2).

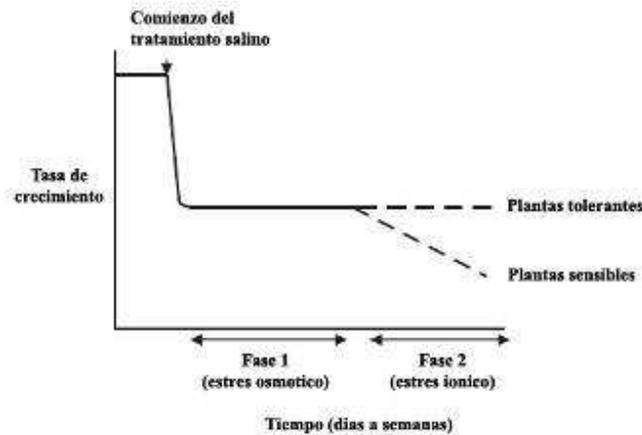


Figura 3.2. Esquema de la respuesta bifásica causada por el estrés salino en plantas. Adaptado de Munns (1993).

Durante una primera fase, las altas concentraciones de sales en el suelo reducen el potencial hídrico y resulta más difícil para las raíces extraer el agua. Este efecto causa una disminución en la tasa de crecimiento tanto de las plantas tolerantes como de las sensibles y es conocido como componente osmótico del estrés salino. Los procesos celulares y metabólicos que ocurren durante esta fase, son similares a los causados por la deficiencia hídrica (Munns 2002, Zhu 2003).

Durante la segunda fase, conocida como fase de estrés iónico, en las plantas sensibles se reduce aún más la tasa de crecimiento. La toxicidad debida a la excesiva absorción de iones Cl^- y Na^+ produce clorosis marginal de la hoja y, con ello, una disminución del área fotosintética, lo que determina reducciones en la fotosíntesis. La cinética de muerte de las hojas es crucial para la supervivencia de las plantas; si las “hojas viejas” mueren más rápido que lo que tarda en desarrollarse una nueva hoja, la planta no sobrevive (Munns 2005).

Adicionalmente, otro efecto causado por la toxicidad de iones es la disminución en la síntesis de proteínas, lo cual afecta procesos tales como la fotosíntesis y el metabolismo de producción de energía y de lípidos. Todo ello conduce a un desbalance nutricional que a la vez afecta la absorción y el transporte de otros nutrientes, influyendo de esta manera sobre la disponibilidad de los mismos (Hasegawa *et al.* 2000, Munns 2002, Parida *et al.* 2002).

Generalmente, la respuesta de una planta al estrés salino es una conjunción de los dos componentes antedichos. Cada uno de ellos a su vez, se encuentra condicionado por la especie vegetal, la identidad de la sal presente en el agua, la luz, la humedad y el estado fenológico de la planta. En este sentido, por ejemplo, la tolerancia a salinidad en los vegetales varía entre los sucesivos estados de crecimiento (Bernstein y Hayward 1958, Pasternak *et al.* 1995). El primer estadio, durante el cual el cultivo se implanta, se considera particularmente sensible, incluso para cultivos considerados tolerantes (Mass y Hoffman 1977).

Según su respuesta a elevadas concentraciones salinas, las plantas pueden dividirse en dos grandes grupos: a) halófitas: son aquellas plantas nativas de suelos salinos que son capaces de cumplir todo su ciclo ontogénico en ese ambiente, e incluso tener un mejor desempeño en dichos suelos que en otros no salinos y b) glicófitas: son aquellas plantas afectadas por la sal e incapaces de resistir concentraciones salinas tan elevadas como las de las halófitas. A

su vez, dentro de las plantas consideradas glicofitas, existe un amplio grado de variación en el nivel de tolerancia a salinidad (Munns y Tester 2008).

Considerando el caso particular de las especies del género *Lotus*, se ha reportado que existe variabilidad en cuanto al efecto que causa el estrés salino sobre las mismas (Sanchez *et al.* 2011). Estos mismos autores sugieren que en función de la tolerancia al estrés salino, *L. corniculatus* puede ser considerada una especie glicófito relativamente sensible, *L. tenuis* una glicófito relativamente tolerante y *L. creticus* una halófito.

Los mecanismos de tolerancia de las plantas al estrés salino pueden ser de tres tipos: a) tolerancia al estrés osmótico; b) mediante la exclusión de Na^+ y Cl^- en las raíces; c) tolerancia “de tejido”, lo que requiere de la adecuada compartimentarización a nivel celular para impedir que la acumulación de iones en el citoplasma alcance niveles tóxicos (Munns y Tester 2008).

Si bien, en la mayoría de las plantas, los iones Na^+ y Cl^- son efectivamente excluidos por las raíces cuando adsorben agua del suelo (Munns 2005) se ha demostrado que las halófitas son capaces de mantener la exclusión de iones a mayor salinidad que las glicófitas. En este sentido, se ha reportado que la exclusión de Cl^- del xilema es una pieza clave en la tolerancia a salinidad de *L. tenuis*, comparada con la respuesta encontrada en *L. corniculatus* (Teakle *et al.* 2007, Sanchez *et al.* 2011).

En varios países la salinidad es un problema grave para la agricultura y puede convertirse en un tema clave para el desarrollo económico de los mismos. Consecuentemente, detener el avance de la salinización y desarrollar cultivos tolerantes a salinidad, son considerados objetivos tecnológicos importantes a nivel mundial (Flowers *et al.* 1997, Munns 2002, Flowers y Flowers 2005, Munns y Tester 2008).

En relación a este objetivo, resultan de particular interés las especies del género *Lotus*, ya que presentan una elevada tolerancia relativa a diferentes estreses ambientales, incluyendo al estrés salino, en comparación a la tolerancia de otras leguminosas forrajeras (Blumenthal y McGraw 1999, Díaz *et al.* 2005, Nichols *et al.* 2008, Teakle *et al.* 2010b, Escaray *et al.* 2012).

Considerando la importancia de desarrollar cultivos tolerantes a la salinidad, el cruzamiento interespecífico de *L. tenuis* con poblaciones relativamente más tolerantes de *L. corniculatus*, podría resultar en materiales que presenten un buen desempeño bajo estas condiciones.

Para finalizar con la introducción, en base a la información presentada se elaboraron los siguientes objetivos particulares:

- Evaluar poblaciones de especies del género *Lotus* que presenten mejores características forrajeras y que al mismo tiempo se destaquen en su adaptabilidad a los ambientes de menor aptitud agrícola.
- Evaluar la hibridización interespecífica en el género *Lotus*, como alternativa tecnológica para la obtención de materiales vegetales con mejores características forrajeras y mayor tolerancia al estrés abiótico.

3.2. Hipótesis.

El cruzamiento interespecífico entre *L. tenuis* y *L. corniculatus* permite la obtención de materiales vegetales novedosos que combinen las mejores características forrajeras de ambas especies junto con una mayor tolerancia al estrés salino.

3.3. Materiales y métodos.

3.3.1. Población seleccionada de *L. corniculatus*.

3.3.1.1. Determinación morfológica.

De cada población de *L. corniculatus* proveniente de la Albufera de Valencia (apéndice 1) se tomaron plantas adultas en estado reproductivo, las cuales se utilizaron para la determinación taxonómica de acuerdo a lo mencionado en la sección 2.3.2.5. Con posterioridad, la identidad taxonómica de estas plantas fue confirmada en colaboración con los doctores Benito Valdés y Francisco Pina de la Universidad de Sevilla (España).

3.3.1.2. Tratamiento de semillas y cultivo de plantas.

Para los ensayos realizados se utilizaron las semillas colectadas del tipo de población que se desarrollaba en el ambiente con las condiciones edáficas de mayor salinidad (ver Apéndice 1, *L. corniculatus* "charlii"). Las semillas fueron escarificadas y se hicieron germinar de acuerdo a lo mencionado previamente y cultivadas en cámara de cultivo bajo condiciones semi-controladas durante 30 días (sección 2.3.1.2). Para ello las plantas fueron transplantadas en macetas de 250 cm³ que contenían vermiculita/arena (1/1) e irrigadas con solución nutritiva Hoagland 0,5X.

3.3.1.3. Extracción de ADN.

Se realizó la extracción de ADN de ocho plantas distintas que fueron cultivadas como se mencionó anteriormente. Para ello se utilizaron las hojas de cada planta, las cuales fueron congeladas en nitrógeno líquido y molidas en mortero. La extracción se realizó mediante la metodología propuesta por Doyle y Doyle (Doyle y Doyle 1987), para lo cual una alícuota de aproximadamente 100 mg del material molido fue colocada en un tubo de 1,5 ml, inmediatamente después de lo cual se agregaron 500 µl de tampón CTAB. El tampón CTAB se preparó con 2% CTAB; 1,4 M de NaCl; 20 mM de EDTA y 100 mM de Tris-HCl a pH 8 y se esterilizó en autoclave durante 20 min a 1 atmósfera. Inmediatamente antes de su utilización se le añadió 0,2 % de β-mercaptoetanol. El material vegetal resuspendido en el tampón CTAB fue incubado en agitación durante 30-45 minutos a 60°C. Posteriormente se añadieron 200 µl de una solución de cloroformo/isoamílico (24/1) y se mezcló vigorosamente. Se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 minutos y se transfirió el sobrenadante a un tubo de 1,5 ml al que se añadieron 2 volúmenes de EtOH 96% a -20°C y se mezcló suavemente. Luego de 20 minutos de incubación a -20°C, se centrifugó durante 15 minutos a 13.000 rpm. Se descartó el sobrenadante y el precipitado fue lavado dos veces con EtOH 70% a -20°C. Por último el precipitado fue secado a temperatura ambiente y resuspendido en 50 µl de agua miliQ estéril.

La calidad del ADN fue evaluada por electroforesis en gel de agarosa (0,8%) en tampón TAE 1X, con 8 µl de BrEt/100 ml, durante 20 minutos a 10 V/cm. Se sembraron en el gel 3 µl de la preparación de ADN mezclados con 2 µl de tampón de carga (azul de bromofenol en glicerina).

3.3.1.4. Amplificación y secuenciación de las regiones nrITS.

Se realizó la amplificación y secuenciación de las regiones nrITS en las 8 muestras de ADN de *L. corniculatus* de la Devesa de la Albufera que se obtuvieron tal como se describió en el apartado anterior. Además se realizó la amplificación de una muestra de ADN de referencia como control positivo y agua como control negativo. Para cada reacción de amplificación se utilizó 1 µl de ADN; 0,25 µl de los cebadores específicos a una concentración 10 µM (ITS1: 5' GGAAGGAGAAGTCGTAACAAGG 3' y ITS4: 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'); 0,25 µl de enzima ADN polimerasa (Promega, GoTaq Flexi DNA Polimerase); 2,5 µl de tampón 5X (Promega); 1,25 µl de Cl₂Mg 25mM; 0,5 µl de dNTPs 25 mM y agua miliQ estéril hasta alcanzar los 25 µl de volumen final. La programación del termociclador se realizó de la siguiente manera: un paso inicial de 20 seg a 94°C; un segundo paso, repetido 50 veces, de 7 seg a 94°C, 10 seg a 52°C y 45 seg a 72°C y por último se realizó un tercer paso de 1 min a 72°C.

Luego de la amplificación se preparó un gel de agarosa (1%) en tampón TAE 1X con 8 µl de BrEt/100 ml en el cual se sembraron 5 µl del producto de amplificación junto con 2 µl del tampón de carga en cada pocillo. En el mismo gel, además de las muestras y los controles se sembró un marcador de peso molecular (1kb+). La corrida electroforética se realizó durante 20 minutos a 10 V/cm y posteriormente el gel fue visualizado bajo lámpara UV. La correcta amplificación fue corroborada mediante la presencia de una banda de alrededor de 700 pb.

El amplificado fue purificado utilizando un kit comercial (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. El amplificado purificado fue posteriormente secuenciado.

3.3.1.5. Análisis filogenético.

El análisis filogenético se llevó a cabo sobre la base de los polimorfismos de la secuencia nucleotídica de la región nrITS. Para ello se utilizaron las secuencias obtenidas de las plantas de *L. corniculatus* “charlii” y *L. tenuis* “Pampa INTA”. Junto con estas secuencias se utilizaron las secuencias de 71 taxones diferentes de *Loteae* provenientes del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). El alineamiento de secuencias se llevó a cabo utilizando el programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/>). Las secuencias alineadas fueron analizadas utilizando el programa MEGA, versión 4.0 (Tamura *et al.* 2007). El análisis filogenético de las secuencias de nrITS fue llevado a cabo usando el algoritmo UPGMA (Sneath y Sokal 1973). Las distancias filogenéticas fueron computadas usando el método de p-distancia y calculadas sobre la base de la proporción de nucleótidos diferentes. Dicha proporción se obtuvo dividiendo el número de los nucleótidos diferentes por el número total de nucleótidos comparados (Nei y Kumar 2000).

3.3.1.6. Evaluación de la supervivencia bajo estrés salino.

Para evaluar en una primera instancia la tolerancia al estrés salino de la población “charlii” de *L. corniculatus* se realizó un ensayo de supervivencia junto con plantas de *L. creticus* (semillas cedidas por el Servicio Devesa-Albufera del Ayuntamiento de Valencia, España) y las poblaciones comerciales de *L. tenuis* “Pampa INTA” y *L. corniculatus* “San Gabriel”. Para ello, 50 semillas y plántulas de cada accesión fueron tratadas de manera similar a la

mencionada en la sección 2.3.1.2 y posteriormente transplantadas a macetas de 400 cm³ de volumen que contenían vermiculita/arena (1/1). Las plantas fueron cultivadas en cámaras de cultivo bajo condiciones semi-controladas (ver sección 2.3.1.2) irrigándolas por capilaridad con solución nutritiva Hoagland 0,5X hasta que presentaron dos hojas completamente expandidas. A partir de ese momento se comenzó con el tratamiento de salinización el cual consistió en el incremento progresivo de la concentración de NaCl en la solución nutritiva (25 mM cada tres días) hasta alcanzar una concentración final de 300 mM, condición que se mantuvo hasta la muerte de la totalidad de plantas. Durante el desarrollo del ensayo se registraron los síntomas presentados por los diferentes materiales evaluados y el número de días desde comenzado el tratamiento hasta la muerte de cada planta.

3.3.1.7. Cuantificación de taninos condensados.

La determinación de los niveles foliares de TC se llevó a cabo en hojas de 20 plantas de *L. corniculatus* “charlii” que fueron cultivadas como se mencionó anteriormente. El procedimiento de cuantificación se realizó de acuerdo a lo descrito en la sección 2.3.1.4.

3.3.2. Desarrollo y evaluación de las plantas *L. tenuis* x *L. corniculatus*.

3.3.2.1. Cruzamientos interespecíficos.

En el diseño experimental para la realización de la cruce sexual, las plantas de *L. tenuis* fueron utilizadas como madres, mientras que el polen fue tomado de flores de diferentes plantas de *L. corniculatus* “charlii”. En total se utilizaron 300 plantas de diferentes accesiones de *L. tenuis* y un número similar de plantas de la población de *L. corniculatus* “charlii”. Las mismas fueron cultivadas individualmente en macetas de 500 cm³ que contenía tierra e irrigadas con agua de lluvia hasta el estado fenológico de floración.

De cada planta de *L. tenuis* se utilizaron tres inflorescencias, las cuales fueron raleadas con el objetivo de utilizar solamente tres flores por inflorescencia. Posteriormente estas flores fueron emasculadas. La emasculación se realizó retirando en primer lugar los pétalos denominados “alas”, luego los pétalos soldados que forman la “quilla” y por último los estambres (Figura 3.3). Por otra parte, de las flores de *L. corniculatus* se extrajo el polen en forma manual apretando los pétalos que forman la “quilla”. El polen así extraído se utilizó inmediatamente para la fertilización manual. La fertilización se realizó colocando el polen de *L. corniculatus* sobre el estilo de las flores emasculadas de *L. tenuis*.

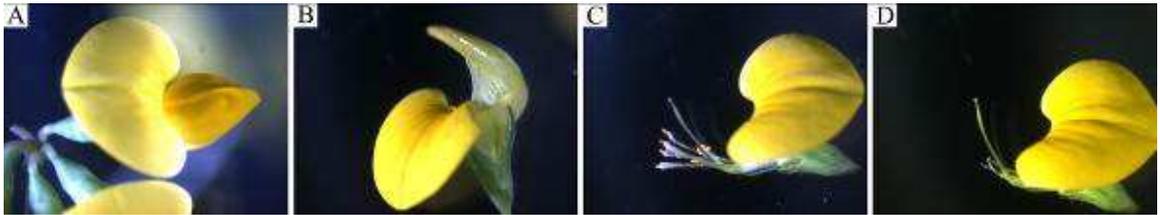


Figura 3.3. Proceso de emasculación de las flores de *Lotus*. **A.** Flor con los 5 pétalos. **B.** Flor en donde se han quitado los dos pétalos denominados “alas”. **C.** Flor en donde se han quitado todos los pétalos menos el “estandarte”. **D.** Flor emasculada lista para ser polinizada.

El éxito de la fertilización se pudo observar mediante el cambio de color del estandarte 24 horas post-fertilización, ya que este pétalo permanece de color amarillo si la fertilización no resultó exitosa ó se modifica el mismo, tornándose rojizo en el caso contrario. Las vainas obtenidas de las plantas de *L. tenuis* polinizadas manualmente fueron trilladas a mano y conservadas en un lugar seco para su posterior utilización.

3.3.2.2. Tratamiento de semillas y cultivo de plantas.

Parte de las semillas obtenidas fueron escarificadas y se la hizo germinar de manera similar a la mencionada anteriormente. De las plántulas obtenidas se seleccionaron 50 al azar, las cuales fueron cultivadas durante 30 días bajo condiciones semi-controladas de una cámara de cultivo (sección 2.3.1.2) e irrigadas con solución nutritiva Hoagland 0,5X.

La otra parte de las semillas obtenidas (2,5 gramos) fue entregada a la empresa Gentos S.A. para su multiplicación. Así se obtuvieron 280 plantas que fueron transplantadas a campo, aisladas de otras poblaciones de *Lotus* (Pergamino, Buenos Aires), durante noviembre del 2010 en un diseño completamente aleatorio con plantas espaciadas cada 0,75 metros.

3.3.2.3. Selección de genotipos.

En las 50 plantas obtenidas se realizó la tinción de TC en la segunda hoja desarrollada (ver sección 2.3.2.4). A su vez, se extrajo la totalidad de hojas de cada una de dichas plantas para la cuantificación del contenido de TC (ver sección 2.3.1.4). Posteriormente, en base al contenido foliar de TC de las 50 plantas obtenidas, se seleccionaron representativamente cuatro plantas híbridas provenientes del cruzamiento entre una planta de la accesión “Pampa INTA” de *L. tenuis* y una planta de *L. corniculatus* “charlii”. Los seis genotipos (los cuatro híbridos interespecíficos seleccionados y sus parentales) fueron propagados vegetativamente mediante la técnica de estacas (ver sección 2.3.1.3) y cultivados en condiciones semi-controladas de cuarto de cultivo e irrigadas con solución nutritiva Hoagland 0,5X. Estos seis genotipos, propagados vegetativamente, fueron utilizados para la realización de la mayoría de los ensayos.

3.3.2.4. Cuantificación de taninos condensados.

Para la cuantificación de TC se utilizaron los genotipos seleccionados y los mismos fueron propagados vegetativamente y cultivados en condiciones semi-controladas en una cámara de cultivo (sección 2.3.1.2) durante 30 días. De estas plantas se tomaron las hojas, tallos y raíces, material a partir del cual se realizaron las determinaciones de los niveles de TC (2.3.1.4).

3.3.2.5. Confirmación del estado híbrido de las plantas obtenidas.

De los cuatro genotipos seleccionados junto con sus parentales se realizó la extracción de ADN de manera similar a la descrita anteriormente. El ADN obtenido fue utilizado para la amplificación de la región nrITS (ver sección 3.3.1.4). El producto de dicha amplificación fue secuenciado directamente o bien luego de su clonación en bacterias mediante el vector “pGEM-T Easy Vector System I” (Promega). La secuenciación se realizó usando el producto “Big Dye Terminador Cycle Sequencing Kit” y un secuenciador “ABI Prism 310” (Applied Biosystems). Los cebadores utilizados para la secuenciación fueron el M13 y el T7 para los fragmentos amplificados que fueron clonados y los cebadores específicos de la región nrITS para la secuenciación directa.

3.3.2.6. Parámetros morfológicos.

Los cuatro genotipos seleccionados se propagaron vegetativamente (sección 2.3.1.3) junto con ambos parentales. Las estacas fueron colocadas en macetas de 150 cm³ que contenían arena, irrigadas con agua destilada bajo condiciones semi-controladas en una cámara de cultivo (sección 2.3.1.2) durante 10 días. Posteriormente, fueron trasplantadas a macetones de 1.500 cm³ que contenían tierra. La tierra utilizada fue colectada en panes de 20 cm de profundidad de un suelo Natracuol típico proveniente de la Chacra Experimental Integrada Chascomús. Este suelo resultó alcalino (pH de 8,6) pero no salino (1,13 dS/m), con 4,1% de materia orgánica y un contenido de fósforo de 8,7 ppm. Las plantas así trasplantadas fueron cultivadas en invernadero durante primavera-verano del 2009 irrigándolas con agua de lluvia colectada (Figura 3.4). Se determinó la producción de materia seca del vástago entero, el número de tallos por planta y el largo de los mismos en cuatro cortes espaciados cada 30 días. Durante la segunda y cuarta cosecha se determinó el área foliar y, debido a su posible relación con los TC (Dubos *et al.* 2008), la densidad de tricomas de la cuarta hoja expandida del tallo principal de cada planta. Por último, las plantas se mantuvieron durante el otoño de 2009 para observar si presentaban la capacidad de formar rizomas.



Figura 3.4. A. Maceta con dos plantas de *L. tenuis* x *L. corniculatus* 1. B. Ensayo realizado en primavera-verano del 2009.

3.3.2.7. Cuantificación de antocianinas.

Para la cuantificación de antocianinas, las muestras frescas fueron molidas en un mortero y en presencia de nitrógeno líquido. Se colocó una alícuota de 0,1 g de la muestra molida en tubos de 15 ml, y luego de agregar 3 ml de una solución 0,1% HCl/metanol se incubaron durante 60 min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 2.500 rpm durante 10 min y se tomó una alícuota de 1 ml, a la cual se agregaron 0,75 ml de agua y 2 ml de cloroformo. Luego de la separación de fases se tomó la fase acuosa y se midió la absorbancia a 536 nm en un espectrofotómetro (Lambda 25, Perkin Elmer, Waltham). El contenido total de antocianinas fue calculado sobre la base de la absorptividad molar de la cianidina-3-O-glucósido.

3.3.2.8. Análisis de la calidad forrajera y cinética de digestibilidad de proteínas.

Se analizó la digestibilidad de la materia seca y el contenido de proteína bruta de los cuatro genotipos híbridos seleccionados y sus parentales. Para ello se utilizaron las muestras de vástago obtenidas en el ensayo realizado durante primavera-verano 2009. El análisis fue realizado por el laboratorio de nutrición y evaluación de calidad de forrajes del INTA Balcarce.

Para la determinación de la cinética de digestibilidad de proteínas se utilizaron los vástagos de los clones de *L. corniculatus* “charlii”, *L. tenuis* “Pampa INTA” y *L. tenuis* x *L. corniculatus* 2 previamente secados a 32°C. Las muestras se incubaron durante 0, 6, 24 y 48 horas en bolsitas filtrantes de porosidad estándar. Para ello se utilizó licor ruminal y solución buffer, colocados en frascos en un incubador Daisy II de Ankom que mantiene la temperatura de rumen y rotación constante. El licor ruminal fue obtenido de un novillo fistulado de la raza Aberdeen Angus, alimentado a mantenimiento con heno de alfalfa de buena calidad.

Luego de la digestión, el material remanente fue congelado con nitrógeno líquido y liofilizado en un instrumento marca Leybold modelo Lyovac GT 2. En las muestras secas

se determinó la proteína bruta ($PB = N \times 6,25$) por el método de Kjeldhal (Nelson y Sommers 1973).

3.3.2.9. Evaluación de tolerancia a salinidad.

3.3.2.9.1. Material vegetal y protocolo de salinización.

Se utilizaron clones de *L. tenuis* “Pampa INTA”, *L. corniculatus* “charlii” y “San Gabriel” de los cuatro genotipos *L. tenuis* x *L. corniculatus* seleccionados. Los mismos fueron propagados vegetativamente como fuera mencionado anteriormente en la sección 2.3.1.3 e implantados en macetas de 250 cm³ que contenían vermiculita/arena (1/1). Los clones fueron cultivadas en cámaras de cultivo bajo condiciones semi-controladas (sección 2.3.1.2) e irrigadas con solución nutritiva Hoagland 0,5X durante 10 días hasta el comienzo de los tratamientos. Se evaluaron dos tratamientos: a) control y b) salino. Los clones destinados al tratamiento control fueron irrigados con solución nutritiva Hoagland 0,5X, mientras que los clones destinados al tratamiento salino fueron irrigados con solución Hoagland 0,5X más el agregado de concentraciones crecientes de NaCl. El incremento de la concentración de NaCl en la solución de riego se realizó a intervalos de cuatro días comenzando con 50 mM y finalizando con 150 mM, concentración que se mantuvo durante 21 días hasta la finalización del ensayo. En la Figura 3.5. A puede observarse una representación del protocolo de salinización empleado. Para los dos tratamientos, el material fue cosechado luego de 47 días de cultivo.

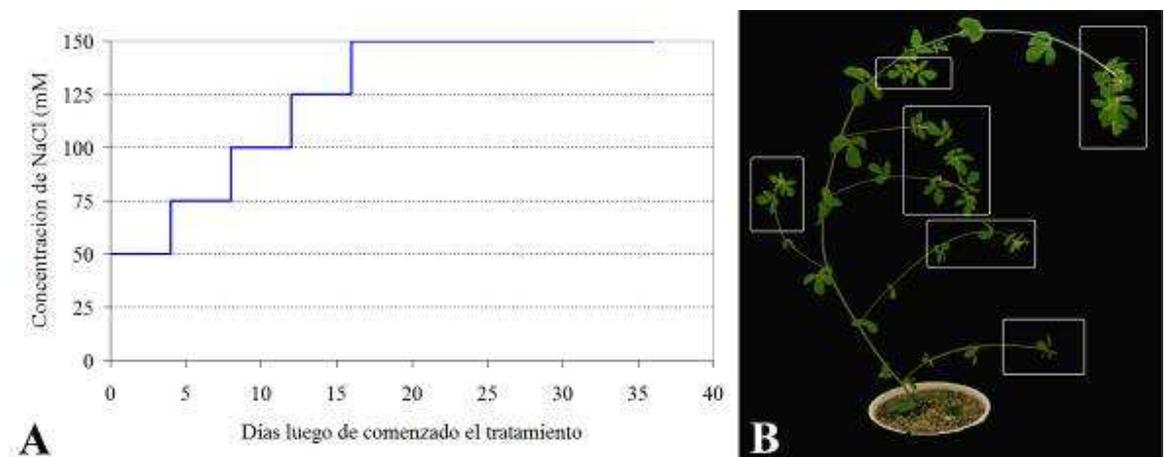


Figura 3.5. A. Esquema de la aplicación del tratamiento salino utilizado en el ensayo. **B.** Planta de *Lotus* sp., con recuadros blancos se marcan aquellas hojas que fueron incluidas en la fracción de “hojas nuevas”, el resto de hojas que no se encuentran recuadradas se incluyeron dentro de la fracción de las “hojas viejas”.

En el momento de la cosecha, las plantas intactas se retiraron de las macetas, se separaron las raíces de los vástagos y se lavaron con agua destilada para eliminar restos de sustrato. Luego del vástago se separaron las hojas de los tallos y a su vez se separaron las “hojas viejas” de las “hojas nuevas” de la manera en que se muestra en la Figura 3.5. B. Posteriormente, raíces, hojas y tallos, se secaron a 37°C hasta alcanzar un peso constante.

Las muestras secas se molieron en molinillo hasta la obtención de un polvo fino, y se almacenaron a temperatura ambiente. Paralelamente, parte de las muestras frescas se congelaron en nitrógeno líquido en el momento del muestreo y se conservaron a -80°C hasta su utilización para las determinaciones analíticas que así lo requirieron.

3.3.2.9.2. Actividad del fotosistema II.

La actividad del fotosistema II fue determinada a través de la medición de fluorescencia de la clorofila a. Para ello, en los días previos a la finalización del ensayo se realizaron mediciones no destructivas utilizando un fluorómetro marca Walz, con el cual se recopilaban datos obtenidos de hojas totalmente expandidas no senescentes. Las mediciones se realizaron durante las horas cercanas al medio día para evitar efectos del fotoperíodo. Los parámetros medidos fueron:

- Rendimiento cuántico máximo (RCM) = F_v/F_m
- qP (coeficiente de atenuación fotoquímica) = $(F_m' - F_t)/(F_m' - F_o')$
- qN (coeficiente de atenuación no fotoquímica) = $(F_m - F_m')/(F_m - F_o')$
- NPQ (atenuación no fotoquímica) = $(F_m - F_m')/F_m'$

La metodología utilizada para el cálculo de los mismos se realizó en concordancia con lo descrito en la bibliografía disponible (Baker 2008). Para ello, las mediciones fueron realizadas en el folíolo central de la tercera hoja desarrollada (contando desde el ápice hacia la base). En un primer paso se colocó la pinza de medición en el folíolo, evitando dañarlo, y posteriormente se lo cubrió con papel de aluminio para lograr que la hoja quede en oscuridad. Luego de 20 minutos en oscuridad se realizó la medición de RCM y por último, luego de una readaptación a la oscuridad de 5 minutos, se realizaron mediciones cada minuto durante 15 min con pulsos de luz actínica de $700 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidad para el cálculo del resto de los parámetros.

3.3.2.9.3. Procedimientos analíticos.

En el material obtenido se determinó el peso seco de las hojas, tallos y raíces. A su vez, en una alícuota de 10 mg del material seco y finamente molido se determinó el contenido de iones Na^+ , K^+ y Ca^{2+} . Para ello, se agregó a cada muestra 1 ml de HCl 0,1N y se incubó durante dos horas a 60°C . Posteriormente, las muestras así tratadas se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se centrifugaron durante 5 minutos a 10.000 rpm. El sobrenadante obtenido fue utilizado para la determinación de las concentraciones de sodio, potasio y calcio mediante un fotómetro de llama (Marca Zeltec, Modelo ZF 250). Los valores obtenidos se interpolaron en una curva de calibración para los tres elementos a determinar. Por otra parte, también se determinó el contenido de Cl. Para ello, 25 mg de muestra seca y molida fueron digeridos en tubos herméticamente cerrados, con una solución extractora compuesta por 1 ml de peróxido de hidrógeno al 30%, 1 ml de ácido nítrico concentrado y una gota de alcohol isoamílico durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras la digestión, se aforó la solución resultante a 10 ml con agua destilada y se centrifugó 5 minutos a 10.000 rpm. Para las muestras correspondientes a plantas cultivadas bajo tratamiento control se tomó una alícuota de 320 μl del sobrenadante recuperado y se le añadió 1 ml de reactivo de color, compuesto por 15 ml de solución de tiocianato de mercurio (4,17 g/L metanol), 15 ml de solución de nitrato de hierro (202 g de nitrato de

hierro + 21 ml de ácido nítrico concentrado, enrasado a 1 L con H₂O destilada) y 50 µl de Brij® 35 (polietilen glicol dodecil éter) al 4%. Para las muestras correspondientes a clones expuestos al tratamiento salino se trabajó de forma similar, pero partiendo de una alícuota de 50 µl a la que se agregaron 270 µl de solución extractora y 1 ml de reactivo de color. Tras mezclar bien se midió la absorbancia a 450 nm (utilizando un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25) y los valores obtenidos se interpolaron en una curva de calibración comprendida entre 0-40 mg/L obtenida luego de emplear una solución patrón de CIK.

Por último se evaluaron los niveles foliares de TC de la misma manera mencionada en la sección 2.3.1.4 y el contenido de antocianinas en el tallo de la manera anteriormente mencionada.

3.3.3. Cruzamientos entre las plantas híbridas.

Se realizaron cruzamientos sexuales entre los cuatro genotipos híbridos seleccionados de la misma manera en que se trabajó con anterioridad. Se obtuvieron 50 plantas, las cuales fueron cultivadas bajo condiciones controladas y evaluadas por su contenido de TC. En función del contenido foliar de TC se seleccionaron tres plantas con altos contenidos, tres con bajo y otras tres con contenidos medios, las cuales fueron propagadas vegetativamente para continuar con los análisis.

Por otra parte, de la multiplicación realizada por Gentos S.A. se obtuvieron 200 plantas, las cuales fueron cultivadas en macetas de 500 cm³ en invernadero durante invierno-primavera del 2011. Sobre las mismas se realizó la tinción de TC en la segunda hoja desarrollada y en función de la intensidad del patrón de tinción se seleccionaron 10 plantas con elevados contenidos y 10 con bajos contenidos para la cuantificación del contenido foliar de TC.

3.3.4. Retrocruzas con el parental.

De la misma manera mencionada anteriormente se realizaron cruzamientos sexuales entre los cuatro genotipos híbridos seleccionados y el parental *L. corniculatus* "charlii". De las semillas obtenidas, 25 fueron usadas para obtener plantas que fueron cultivadas bajo condiciones semi-controladas de cámara de cultivo (ver sección 2.3.1.2) e irrigadas con solución de riego Hoagland 0,5X. Luego de 30 días de cultivo se tomaron las hojas para realizar la cuantificación de TC.

3.3.5. Diseño experimental y análisis de datos.

El diseño experimental utilizado varió según el ensayo realizado. En este sentido, para evaluar la supervivencia bajo condiciones de estrés salino se utilizó un diseño completamente aleatorizado con 50 repeticiones para cada accesión. Cada accesión evaluada fue considerada como un tratamiento y la unidad muestral consistió en una planta cultivada en forma individual en una maceta.

Por otra parte, para el ensayo realizado en el invernadero durante primavera-verano del 2009 se utilizó un diseño completamente aleatorizado con 10 repeticiones. Cada genotipo fue considerado como un tratamiento y la unidad muestral consistió en dos clones de cada genotipo que se encontraban en una misma maceta (Figura 3.4).

Para el resto de los ensayos realizados con los clones de los cuatro genotipos híbridos seleccionados y los clones de sus dos parentales en cámara de cultivo se utilizó un diseño completamente aleatorizado con 6 repeticiones. Cada genotipo se consideró como un tratamiento y la unidad muestral consistió en una planta cultivada individualmente en una maceta.

Para la evaluación de las plantas obtenidas del cruzamiento entre híbridos y del cruzamiento entre híbridos y el parental *L. corniculatus* se utilizó un diseño completamente aleatorizado, pero en el mismo se utilizaron 3 repeticiones de cada genotipo seleccionado para la evaluación de las diferencias entre grupos. La unidad muestral consistió en una planta cultivada individualmente en una maceta.

Por último, para los experimentos de estrés salino se utilizó un diseño completamente aleatorizado, donde un primer factor correspondía con los tratamientos (control y salino) y el segundo factor correspondía con el genotipo evaluado. Se utilizaron 6 repeticiones para cada tratamiento x genotipo y cada unidad experimental consistió en una planta cultivada individualmente en una maceta.

Para todos los casos, la homogeneidad de varianzas se comprobó a través de la prueba de Levene y la distribución normal de las observaciones a través de la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks. Para los datos que presentaron una distribución normal, el análisis se realizó a través de un ANOVA de una o dos vías (dependiendo del ensayo) con un nivel de confianza del 95% y para aquellos casos en que se observó diferencias significativas se realizó el test de comparaciones múltiples de Duncan con un nivel de confianza del 95%. Para aquellos casos donde los datos no presentaron una distribución normal se realizó un análisis no paramétrico a través de la prueba de Kruskal-Wallis y posterior comparación de pares en caso de haber detectado diferencias significativas. El análisis de los parámetros de fotosíntesis se realizó a través de un enfoque multivariado de medidas repetidas en el tiempo. Para todos los análisis se utilizó el programa InfoStat (Di Rienzo *et al.* 2011).

3.4. Resultados.

3.4.1. Evaluación de la población seleccionada de *L. corniculatus*.

3.4.1.1. Descripción morfológica y taxonómica.

Las plantas pertenecientes a las poblaciones encontradas en la Albufera de Valencia son hierbas perennes, glabras o sub-glabras. Con tallos de hasta 80 cm de largo, ascendentes y macizos. Hojas con 5 folíolos de forma ovado-lanceolada, menos de 3 veces más largos que anchos. Inflorescencias con 2-7 flores y una bráctea generalmente trifoliada; pedúnculos de 5-9 cm de largo, recto o ligeramente curvado, erecto; pedicelos más cortos que el tubo del cáliz. Cáliz actinomorfo con todos los dientes iguales, sub-glabro, tubo de 1,5-2,5 mm, obcónico; dientes tan largos como el tubo, agudos. Corola de 8-16 mm, amarilla con las venas del estandarte purpúreas o rojizas; estandarte con la lámina más larga que la uña, anchamente ovada; alas con lámina obovada; quilla falcada con pico curvado. Estilo cilíndrico, sin diente. Fruto de 10-35 x 1,5-4 mm, cilíndrico, más o menos recto, erecto o patente, con 5 a 15 semillas, uniseriadas. Semillas de 1,2 mm, más o menos globosas, pardas o pardo-rojizas.

Las características morfológicas y reproductivas mencionadas permitieron determinar que se trata de plantas de *L. corniculatus* subsp. *corniculatus*. Sin embargo, estas plantas mostraron dos características que las diferenciaron del resto de las plantas pertenecientes a esta subespecie: a) presencia de rizomas y b) complemento cromosómico diploide ($2n=12$), el cual fue determinado durante el desarrollo del capítulo 2.

La presencia de rizomas pudo observarse en las plantas presentes en las malladas valencianas y con posterioridad, en plantas obtenidas a partir de semillas y cultivadas en invernadero durante el otoño del 2010 y el otoño del 2011 (Figura 3.6).



Figura 3.6. Foto de plantas de la población de *L. corniculatus* de la Devesa, donde se pueden observar los rizomas.

A través del análisis filogenético realizado mediante la utilización de la secuencia de nucleótidos de la región nrITS, se pudo observar que las plantas provenientes de la Albufera de Valencia se encuentra dentro del grupo filogenético *Lotus corniculatus*. Sin embargo, también pudo observarse que existe cierta distancia con respecto al resto de las accesiones de *L. corniculatus* y de *L. tenuis* analizadas. Se observó que estas plantas se ubican en una posición taxonómica más cercana a las especies *L. alpinus*, *L. delortii* y *L. palustris* (Figura 3.7).

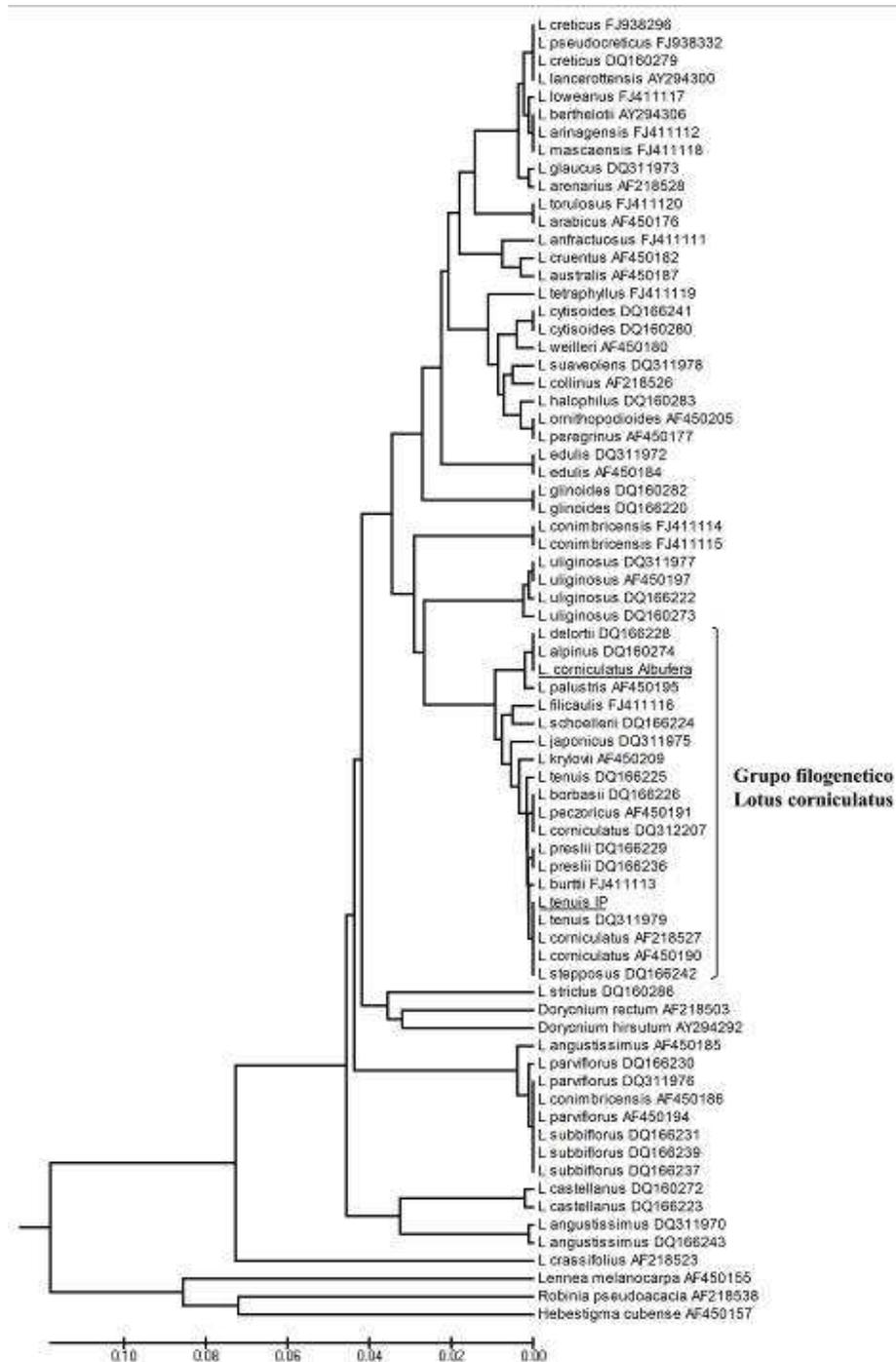


Figura 3.7. Filogenia de las especies de *Lotus* basada en los polimorfismos de la secuencia nucleotídica de la región nrITS. El árbol fue construido a partir de la secuencia de nucleótidos usando el algoritmo UPGMA y las distancias filogenéticas fueron calculadas usando el método de p-distancia. Las líneas horizontales son proporcionales a diferencias en los nucleótidos e indican la p-distancia. Las especies seguidas con un código alfa numérico son aquellas cuya secuencia fue obtenida a partir de la base de datos *GenBank*. La secuencia de *L. corniculatus* “charlii” y *L. tenuis* “Pampa INTA” se encuentran subrayadas.

3.4.1.2. Tolerancia al estrés salino.

Entre los materiales evaluados, los cambios morfológicos causados por el estrés salino fueron diferentes. Las plantas de *L. corniculatus* “San Gabriel” presentaban un tallo principal y uno o dos brotes basales cuando la salinidad indujo la senescencia en ellas. En general, en estas plantas las hojas basales del tallo principal senescieron primero, progresando desde las hojas basales hacia las apicales y finalmente al ápice del tallo. Una vez que el tallo principal senesció, los brotes basales murieron en pocos días más (Figura 3.8 A). En plantas de *L. tenuis*, la senescencia de hojas basales inducida por la salinidad en el tallo principal comenzó antes que en *L. corniculatus*, y las mismas se desprendieron más rápido de la planta, resultando en una apariencia verde clara del tallo remanente. En un paso posterior, las hojas apicales y el ápice del tallo principal senescieron, con síntomas similares a los provocados por la deshidratación, muriendo más tarde los brotes basales (Figura 3.8 B). Por otra parte, la senescencia inducida por la salinidad en plantas de *L. creticus* fue similar a la de *L. tenuis*. Sin embargo, luego de la senescencia del tallo principal, los tallos secundarios remanentes continuaron creciendo. La senescencia de las hojas basales comenzó más tarde y progresó de manera más lenta que en *L. tenuis* y *L. corniculatus* “San Gabriel”. La senescencia de la planta entera ocurrió semanas después de la pérdida de la primera hoja basal del tallo principal, y mucho más tarde que en las otras dos poblaciones (Figura 3.8 C).

Por último en las plantas de la población *L. corniculatus* “charlii” se pudo observar que los síntomas fueron similares a los observados para *L. tenuis* y *L. creticus*. En ellas se observó en un principio la caída de las hojas basales, lo cual ocurrió más tarde en relación a *L. tenuis*. Posteriormente se observó la muerte del ápice principal, pero los ápices secundarios se mantuvieron vivos por un par de semanas más. Cabe destacar que, una vez que senesció el tallo principal, el crecimiento de los tallos secundarios de las plantas de *L. corniculatus* “charlii” fue marcadamente menor al observado en *L. creticus* (Figura 3.8 D).

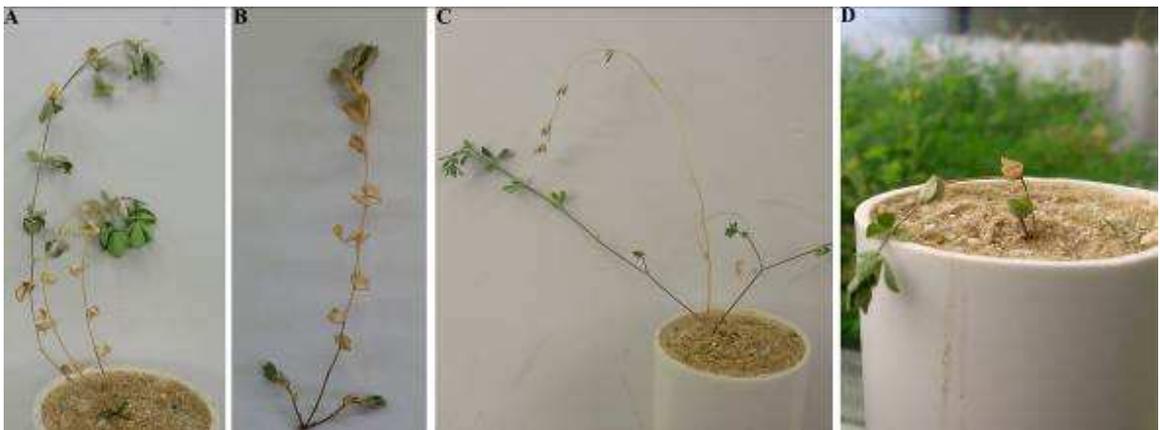


Figura 3.8. Síntomas causados por el estrés salino en plantas de *Lotus* spp. **A.** *L. corniculatus* “San Gabriel”. **B.** *L. tenuis*. **C.** *L. creticus*. **D.** *L. corniculatus* “charlii”

En relación a la supervivencia de las plantas bajo estrés salino se observaron marcadas diferencias entre los materiales evaluados ($H=106,9$; $p<0,0001$). Se observó que la mayor vida media bajo dosis letales de NaCl la presentaron las plantas de *L. creticus*, mientras que la menor fue observada para la población “San Gabriel” de *L. corniculatus*. Las plantas de

la población “charlii” de *L. corniculatus* presentaron una vida media mayor a las de la accesión “San Gabriel” e incluso a las de *L. tenuis* (Figura 3.9).

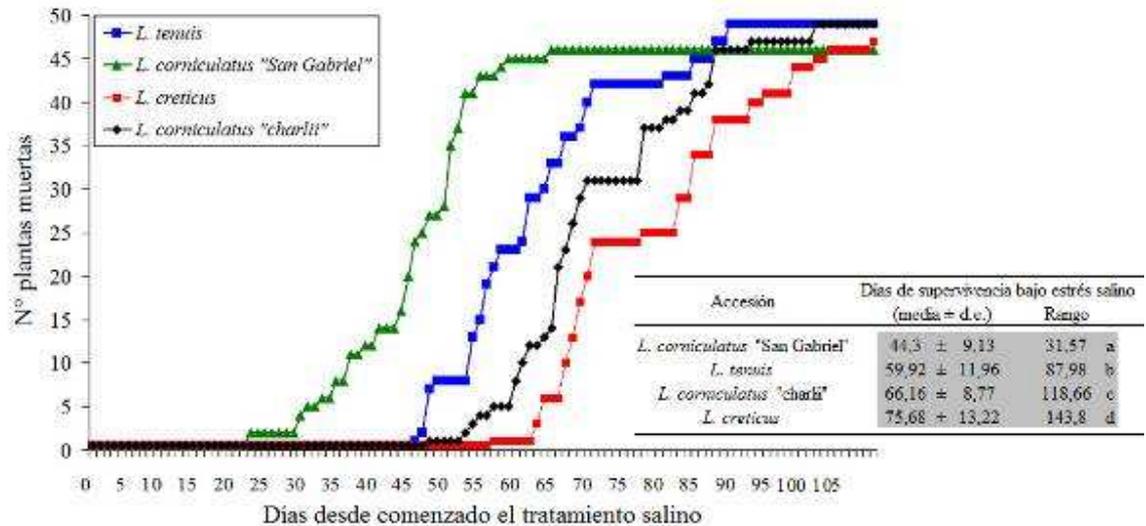


Figura 3.9. Supervivencia de plantas de *Lotus* spp. bajo estrés salino. Prueba de Kruskal-Wallis, comparación de a pares ($p < 0,05$), medias con una letra en común no son diferentes significativamente.

3.4.1.3. Contenido de taninos condensados.

Las plantas pertenecientes a la población de *L. corniculatus* “charlii” presentaron elevados contenidos foliares de TC. Bajo condiciones semi-controladas, el contenido foliar promedio de las plantas evaluadas fue de $10,62 \pm 1,54$; $10,73 \pm 4,88$ y $23,13 \pm 7,05$ mg TC/g MS para la fracción soluble, insoluble y total respectivamente. El contenido foliar de TC observado en estas plantas resultó superior al resto de las accesiones de *L. corniculatus* evaluadas en nuestro laboratorio ($p < 0,05$) y similar al de las plantas de la accesión “Maku” de *L. uliginosus* ($p = 0,11$). Asimismo, mediante la tinción foliar de los TC, se pudo observar que el patrón de distribución de los mismos fue similar al de otras poblaciones de *L. corniculatus* (Figura 3.10)



Figura 3.10. Tinción de TC en hojas de *L. corniculatus* que se encontraban en las malladas de la Devesa de la Albufera de Valencia.

3.4.2. Desarrollo del híbrido interespecífico *L. tenuis* x *L. corniculatus*.

3.4.2.1. Obtención y viabilidad de semillas.

La mayoría de las flores que fueron emasculadas y polinizadas en forma manual presentaron una fertilización exitosa. El éxito de la fertilización fue evidente a través del cambio de color de amarillo a rojizo del pétalo denominado “estandarte”. Las vainas formadas presentaron tamaño normal pero con una característica pigmentación rojiza en su superficie, la cual se encuentra ausente en vainas normales de ambos parentales (Figura 3.11). Las vainas presentaron un número normal de semillas (de 2 a 9 semillas), y el fenotipo de las mismas también resultó similar al de las semillas de las especies parentales. La viabilidad de las semillas obtenidas resultó muy elevada, alcanzando un porcentaje de plántulas viables superior al 95%.



Figura 3.11. Vainas que produjeron las flores de *L. tenuis* fertilizadas con polen de *L. corniculatus* “charlii”.

3.4.2.2. Confirmación molecular del estado híbrido de las plantas obtenidas.

Las secuencias de nucleótidos obtenidas de la región nrITS de acuerdo a lo descrito con anterioridad, presentaron una longitud de alrededor de 700 pares de bases. Al comparar las secuencias de los dos parentales se observaron un total de 13 indeles; cinco de ellos correspondían a deleciones y los ocho restantes a inserciones. El alineamiento completo de la secuencia de nucleótidos de la región nrITS puede observarse en el apéndice 2.

Un punto diferencial importante observado entre las secuencias de nucleótidos de la región nrITS de *L. tenuis* y *L. corniculatus* se encuentra entre la posición 75 y 77 inclusive del alineamiento, en donde se observó una deleción de 3 nucleótidos (Figura 3.12). Cuando se analizaron las secuencias de nucleótidos obtenidas directamente del producto de amplificación de la región nrITS de las plantas híbridas, se observó una superposición de picos en los electroferogramas a partir de este punto (datos no presentados). Esta superposición podría deberse a la presencia de un polimorfismo en dicha posición, dado que al secuenciar directamente el producto de amplificación de la región nrITS de plantas potencialmente híbridas, se analizan en forma simultánea las secuencias provenientes de ambos parentales. De este modo, sabiendo que ambos parentales difieren en sus secuencias nrITS en dicha posición, es de esperar encontrar la superposición de picos antes mencionada en el caso de que las plantas sean efectivamente híbridas. Con el fin de confirmar que dicho fenómeno se debió efectivamente a que las plantas analizadas eran híbridas y no se trataba de un artefacto de la técnica, se secuenciaron los productos de

amplificación de la región nrITS previamente clonados en un vector plasmídico. De este modo, sabiendo que cada clon bacteriano transformado con dichos vectores incorpora uno solo de los dos posibles productos de amplificación, en caso de que las plantas analizadas fueran efectivamente híbridas, era de esperar que algunos clones bacterianos contuvieran plásmidos con secuencias de uno de los parentales, mientras que otros clones contendrían secuencias del otro parental. Así se pudo corroborar el carácter híbrido de las plantas en cuestión, dado que cada una de ellas presentaba una combinación de las secuencias de nucleótidos de la región nrITS de los dos parentales (Figura 3.12). Del estudio filogenético realizado utilizando estas secuencias se pudo determinar que las plantas híbridas se encontraban a distancias intermedias entre ambos parentales (Figura 3.13).

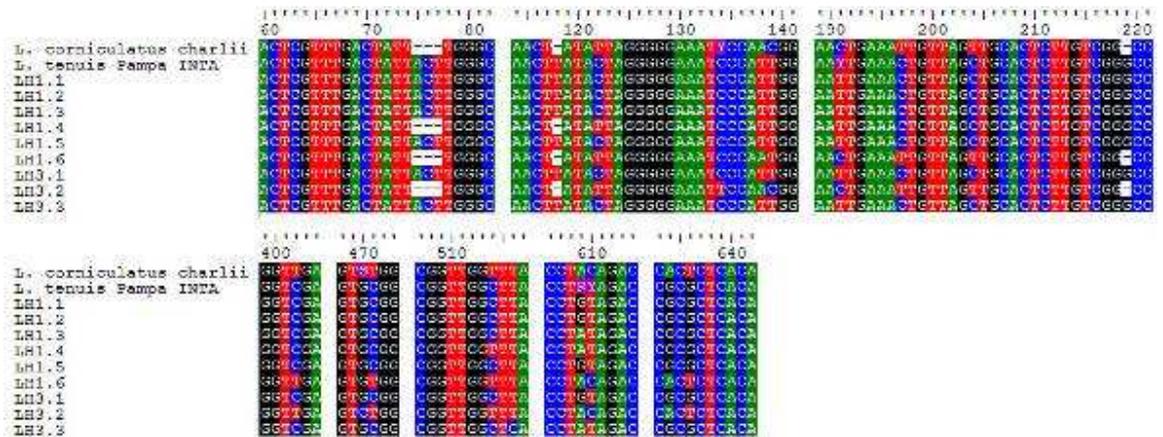


Figura 3.12. Fragmentos de la secuencia de nucleótidos de la región nrITS de *Lotus* spp.; LH1.1, 2, 3, 4, 5 y 6: secuencias correspondientes a diferentes colonias de bacterias transformadas con el vector plasmídico clonado con el producto de amplificación de la región nrITS proveniente de la planta *L. tenuis* x *L. corniculatus* 1; LH3.1, 2 y 3 secuencias correspondientes a diferentes colonias de bacterias transformadas con el vector plasmídico clonado con el producto de amplificación de la región nrITS proveniente de la planta *L. tenuis* x *L. corniculatus* 3.

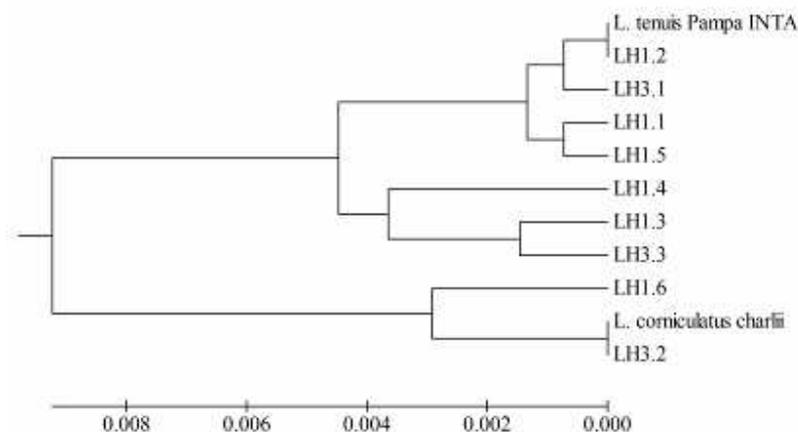


Figura 3.13. Árbol filogenético construido a partir de la secuencia de nucleótidos de la región nrITS de *Lotus* spp. LH: *L. tenuis* x *L. corniculatus* 1 y 3.

3.4.2.3. Morfología de las plantas obtenidas.

Las plantas obtenidas del cruzamiento interespecífico no presentaron ninguna característica fenotípica que las diferenciara de sus parentales en el estado fenológico de plántula. Sin embargo, en un estado fenológico posterior se pudieron observar algunas diferencias morfológicas evidentes. Entre ellas, la más llamativa resultó el porte relativamente más voluminoso y erecto que presentaron los clones de los genotipos *L. tenuis* x *L. corniculatus* (Figura 3.14).



Figura 3.14. Plantas de *Lotus* spp. de 30 días de edad cultivadas en las mismas condiciones. A. *L. tenuis* “Pampa INTA”. B. *L. corniculatus* “charlii”. C. *L. tenuis* x *L. corniculatus*.

En los clones de los genotipos *L. tenuis* x *L. corniculatus* se observó que sus tallos presentaron una mayor longitud en comparación al de sus parentales. Sin embargo, el número de tallos por planta resultó menor (Figura 3.15). Interesantemente, en la realización de otros ensayos bajo condiciones de crecimiento semi-controladas de cámara de cultivo, pudo observarse que los tallos principales de los clones de los cuatro genotipos híbridos al cabo de dos meses de crecimiento alcanzaron una longitud de hasta 150 cm. Mientras que en clones de ambos parentales se observó que la longitud de sus tallos, en las mismas condiciones y período de cultivo, no superaron los 50 cm.

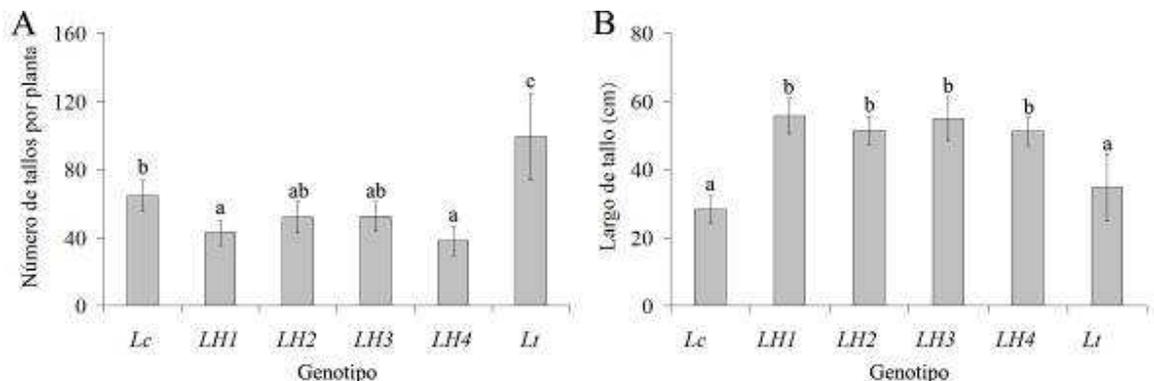


Figura 3.15. Morfología de las plantas de *Lotus* spp. luego de 30 días de cultivo. **A.** Número de tallos por planta. **B.** Largo del tallo principal. Lc: *L. corniculatus* “charlii”, Lt: *L. tenuis* y LH: *L. tenuis* x *L. corniculatus* 1, 2, 3 y 4. Prueba de Duncan, dentro de cada gráfico medias con letras en común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Asimismo, en las hojas de los distintos materiales también fue posible observar diferencias en la densidad de tricomas ($H=44,7$; $p < 0,0001$); en la relación largo/ancho del foliolo central ($H=37,2$; $p < 0,0001$) y en el área de los folíolos basales ($F=7,2$; $p < 0,0001$). En la Tabla 3.3 puede observarse la densidad media de tricomas en hojas de los diferentes

materiales. Se evidencia que los clones de *L. tenuis* “Pampa INTA” presentaron una mayor densidad de tricomas que los clones de *L. corniculatus* “charlii”, mientras que la mayoría de los clones de los genotipos híbridos presentaron densidades de tricomas intermedias (Figura 3.16), con excepción de los clones de una de ellas (*L. tenuis* x *L. corniculatus* 1) que presentaron la misma densidad de tricomas que los de su parental *L. tenuis* (Tabla 3.3). Por su parte, la relación largo/ancho del foliolo central en los clones de *L. corniculatus* “charlii” fue inferior a los de *L. tenuis* “Pampa INTA”, mientras que los clones de los genotipos híbridos presentaron una situación intermedia ya que para *L. tenuis* x *L. corniculatus* 1 y 2 la relación fue similar a los clones de *L. corniculatus* mientras que para *L. tenuis* x *L. corniculatus* 3 y 4 fue similar a los clones de *L. tenuis* (Tabla 3.1).



Figura 3.16. Foliolos de diferentes genotipos de *Lotus* aumentados 10 veces. **A.** *L. tenuis* “Pampa INTA”. **B.** *L. tenuis* x *L. corniculatus* 2. **C.** *L. corniculatus* “charlii”.

Tabla 3.1. Densidad de tricomas y relación largo/ancho de hojas de *Lotus* spp. Prueba de Kruskal-Wallis. Comparación de a pares, dentro de cada bloque de color gris rangos con una letra en común no son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

Material	Tricomas/cm ² (media ± d.e.)	Rango	Relación largo/ancho (media ± d.e.)	Rango
<i>L. corniculatus</i> "Charlii"	33,59 ± 11,88	5,22 a	1,85 ± 0,20	18,90 a
<i>L. tenuis</i> "Pampa INTA"	208,02 ± 47,03	50,67 c	1,76 ± 0,08	11,40 a
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 1	112,67 ± 27,98	41,33 c	1,90 ± 0,13	23,10 ab
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 2	64,05 ± 6,16	21,56 b	2,08 ± 0,12	40,90 c
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 3	66,88 ± 14,67	24,10 b	2,02 ± 0,10	36,20 bc
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 4	71,77 ± 15,42	25,56 b	2,26 ± 0,14	51,67 c

Por su parte, los valores del área foliar de los distintos materiales evaluados puede observarse en la Tabla 3.2. Al igual que lo observado para otros parámetros, los clones de los genotipos híbridos presentaron valores de área foliar total intermedios a los de sus parentales, excepto para los clones de *L. tenuis* x *L. corniculatus* 2, los cuales no presentaron diferencia para el área foliar en relación al de los clones de *L. tenuis* “Pampa INTA”.

Asimismo pudo observarse que las diferencias en el área foliar total no fueron atribuibles a los tres foliolos superiores ($F=0,33$; $p=0,89$) sino que las mismas se encontraron en el área de los dos foliolos restantes, o sea, de aquellos que se encuentran más cerca de la base de la hoja ($F=7,24$; $p < 0,0001$). Los mayores valores del área de los foliolos basales pudieron observarse en los clones de *L. corniculatus*, seguidos en valores por los clones de los genotipos híbridos y por último los de *L. tenuis* (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Área foliar de los distintos genotipos de *Lotus* spp. Valores expresados en cm². Test de Duncan, dentro de cada bloque gris medias con letras en común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Material	Hoja completa (media \pm d.e.)	Foliolos principales (media \pm d.e.)	Foliolos basales (media \pm d.e.)
<i>L. corniculatus</i> "Charlii"	1,83 \pm 0,42 b	1,23 \pm 0,27 a	0,59 \pm 0,15 c
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 1	1,64 \pm 0,18 ab	1,25 \pm 0,15 a	0,41 \pm 0,12 b
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 2	1,50 \pm 0,21 a	1,20 \pm 0,25 a	0,40 \pm 0,09 ab
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 3	1,64 \pm 0,28 ab	1,31 \pm 0,32 a	0,45 \pm 0,11 b
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 4	1,60 \pm 0,23 ab	1,28 \pm 0,13 a	0,45 \pm 0,09 b
<i>L. tenuis</i> "Pampa INTA"	1,50 \pm 0,28 a	1,20 \pm 0,22 a	0,30 \pm 0,07 a

Es importante destacar que en los clones de los cuatro genotipos híbridos resultó muy frecuente la presencia de un foliolo adicional, lo cual no fue observado para ninguno de los clones de *L. tenuis* y *L. corniculatus* evaluados. En la Figura 3.17 puede observarse esta característica fenotípica del material híbrido obtenido.

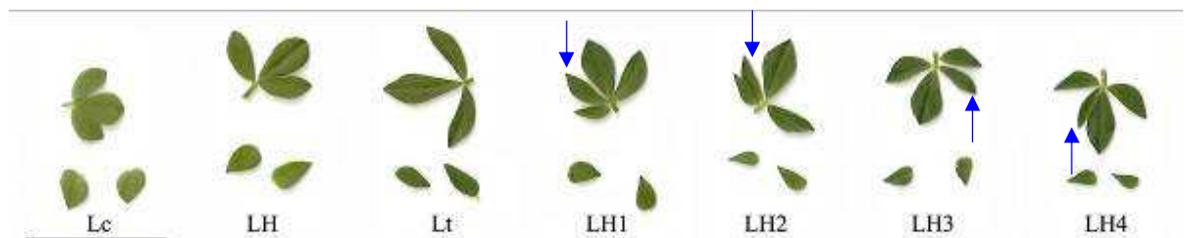


Figura 3.17. Hojas de *Lotus* spp. Las tres primeras hojas son normales. En las restantes, puede observarse el foliolo adicional señalado con una flecha azul. Lc: *L. corniculatus* "charlii", Lt: *L. tenuis* y LH: *L. tenuis* x *L. corniculatus* 1, 2, 3 y 4. La barra equivale a 5 cm.

Asimismo, y tal como fuera mencionado anteriormente, es importante destacar la presencia de rizomas en el parental *L. corniculatus* "charlii". Esta misma capacidad pudo observarse simultáneamente durante el otoño del 2010 y el otoño del 2011 en los diferentes genotipos *L. tenuis* x *L. corniculatus* obtenidos (Figura 3.18). Dicha observación resulta particularmente interesante, ya que en ninguna de las poblaciones de *L. tenuis* y *L. corniculatus* evaluadas en nuestro laboratorio se detectó esa característica.

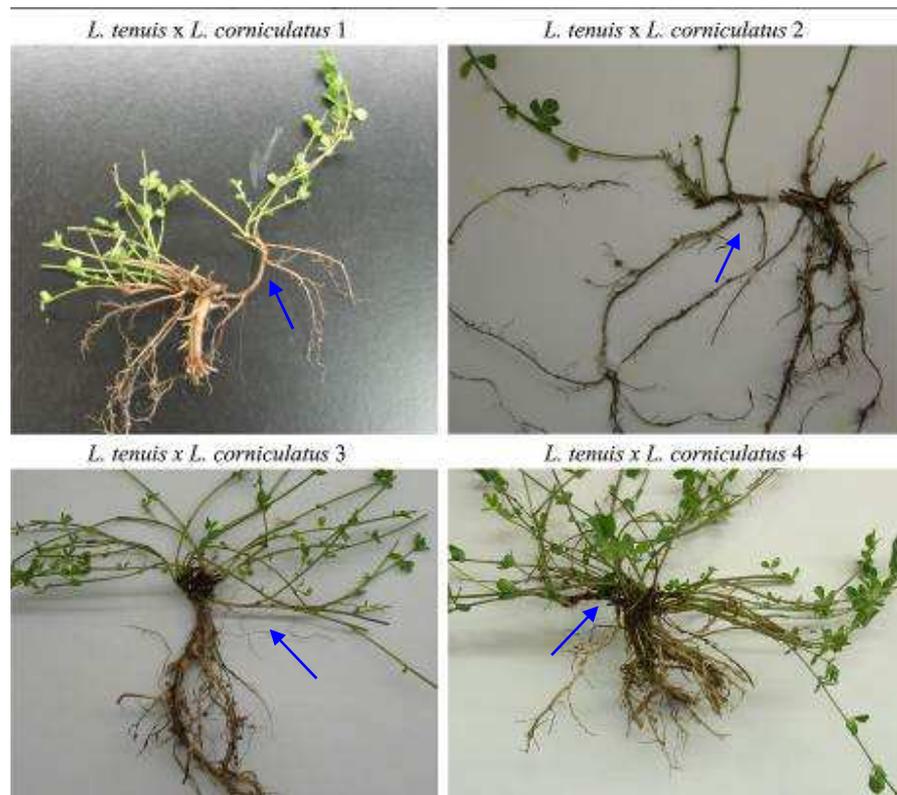


Figura 3.18. Genotipos *L. tenuis* x *L. corniculatus* seleccionados, en los que se pueden observar los rizomas indicados con flechas azules.

Otra diferencia observada entre los clones de los parentales y los del material híbrido fue la producción, medida a través del peso seco del vástago obtenido en cuatro cosechas durante primavera-verano del 2010. En los diferentes materiales se observaron diferencias tanto para el vástago entero ($F=6,7$; $p<0,0001$) como para las hojas ($F=6,4$; $p<0,0001$) y los tallos ($F=9,8$; $p<0,0001$) por separado. De la misma manera, también se observaron diferencias en la relación hoja/tallo entre los distintos materiales evaluados ($F=191,6$; $p<0,0001$). El peso seco de vástago de los clones del parental *L. corniculatus* “charlii” fue menor al de los clones del parental *L. tenuis* “Pampa INTA”. De la misma manera, entre clones de ambos parentales, se observaron diferencias para el peso seco de los tallos. Sin embargo, para el peso seco de las hojas las diferencias no fueron significativas (Tabla 3.3). Por otra parte, y exceptuando a los clones del genotipo *L. tenuis* x *L. corniculatus* 4, en los demás clones de los genotipos híbridos se observó que el peso seco del vástago entero, de las hojas y de los tallos por separado fueron similares a los observados en clones de *L. tenuis* (Tabla 3.3). En la misma tabla también se presentan los valores de la relación hoja/tallo. En este sentido, se pudo observar que la mejor relación relativa la presentaron los clones de *L. corniculatus* “charlii”; mientras que los clones de *L. tenuis* presentaron valores relativamente más bajos, los cuales a su vez, no se diferenciaron significativamente de los clones de los genotipos *L. tenuis* x *L. corniculatus* (con excepción de *L. tenuis* x *L. corniculatus* 4).

Tabla 3.3. Peso seco de hoja, tallo y vástago (valores expresados en gramos) y la relación hoja/tallo de plantas de *Lotus* spp. Test de Tukey, dentro de cada bloque gris medias con letras en común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Material	Hojas (media \pm d.e.)	Tallos (media \pm d.e.)	Vástago (media \pm d.e.)	Hoja/Tallo (media \pm d.e.)
<i>L. corniculatus</i> "Charlii"	15,53 \pm 2,33 ab	7,03 \pm 1,36 c	22,56 \pm 3,56 a	2,23 \pm 0,23 a
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 1	15,18 \pm 4,00 ab	14,36 \pm 4,10 ab	29,54 \pm 7,94 b	1,07 \pm 0,13 bc
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 2	19,43 \pm 2,71 a	16,36 \pm 3,04 a	35,79 \pm 5,62 b	1,20 \pm 0,10 b
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 3	16,38 \pm 3,42 a	15,28 \pm 3,56 ab	31,66 \pm 6,83 b	1,08 \pm 0,11 bc
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 4	11,39 \pm 3,25 b	11,60 \pm 3,70 bc	22,99 \pm 6,86 a	0,99 \pm 0,11 c
<i>L. tenuis</i> "Pampa INTA"	18,61 \pm 5,07 a	15,08 \pm 4,44 ab	33,69 \pm 9,30 b	1,25 \pm 0,15 b

3.4.2.4. Contenido de taninos condensados.

El patrón de tinción foliar de TC en las plantas *L. tenuis* x *L. corniculatus* fue similar al observado en plantas de *L. corniculatus* (Figura 3.19). Sin excepción, en las hojas de todos los genotipos híbridos obtenidos se observaron TC distribuidos a través del mesófilo de la hoja. Por su parte, las plantas de *L. tenuis* "Pampa INTA" presentaron TC solamente en tejidos adyacentes a los haces vasculares. Si bien, en los genotipos híbridos el patrón de tinción fue similar al parental *L. corniculatus* "charlii", a simple vista se pudo determinar una menor densidad de TC en sus hojas (Figura 3.19).

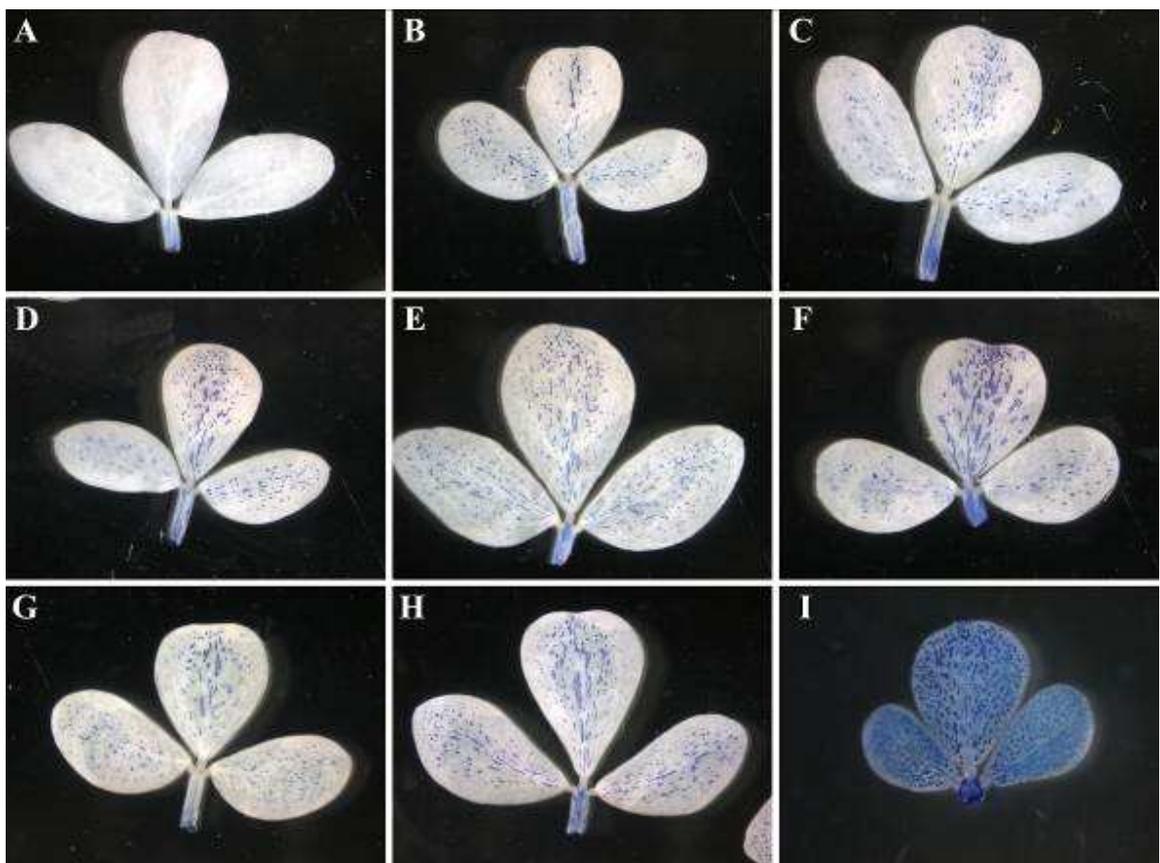


Figura 3.19. Tinción foliar de TC de los materiales de *Lotus* spp. evaluados. A. *L. tenuis* "Pampa INTA"; B, C, D, E, F, G y H. diferentes plantas *L. tenuis* x *L. corniculatus*; I. *L. corniculatus* "charlii".

Los cuatro genotipos *L. tenuis* x *L. corniculatus* seleccionados presentaron el mismo patrón de tinción en vástago que el resto de las plantas. La tinción del vástago entero de estas plantas junto con sus parentales puede observarse en la Figura 3.20.

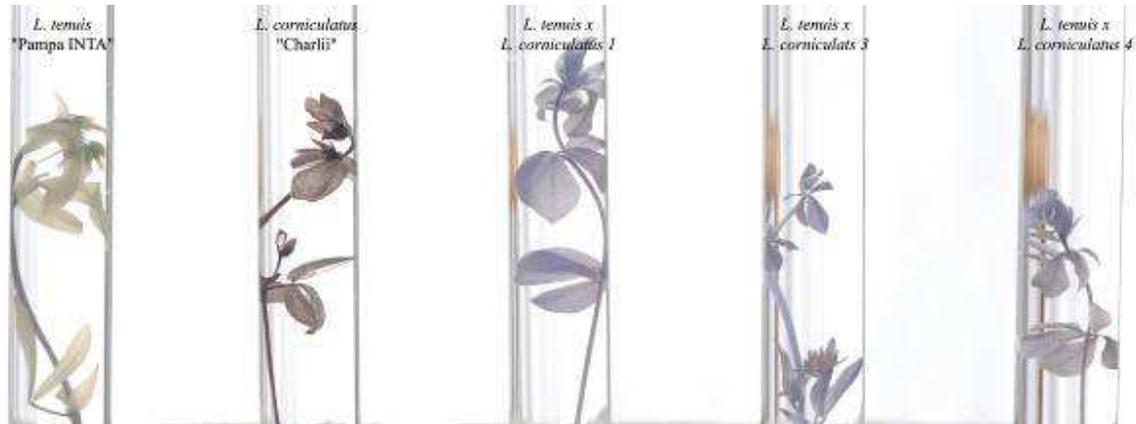


Figura 3.20. Tinción de TC en vástago de los genotipos de *Lotus* spp. evaluados.

Asimismo se observó una marcada diferencia en el contenido foliar de TC entre las dos especies utilizadas como parentales ($p < 0,0001$ para las tres fracciones, Tabla 3.4). Los clones de *L. corniculatus* “charlii” presentaron una concentración 26 veces mayor de TC en sus hojas que los clones de *L. tenuis* “Pampa INTA”. En las plantas *L. tenuis* x *L. corniculatus* se observó un contenido medio de TC en hojas de $0,97 \pm 0,6$; $4,70 \pm 1,8$ y $5,67 \pm 2,1$ mg/g MS para la fracción soluble, insoluble y total. El coeficiente de variación fue 38% para los TC totales.

A su vez, entre los clones de los genotipos híbridos seleccionados se observaron diferencias en su contenido foliar de TC. Los clones del genotipo *L. tenuis* x *L. corniculatus* 4 presentaron valores más elevados que los encontrados en sus similares numerados como 2 y 3, mientras que los clones del genotipo híbrido 1 presentaron valores similares a los del híbrido 4 aunque tampoco se diferenciaron del contenido foliar de TC en los clones de los otros dos genotipos híbridos (Tabla 3.4).

Tabla 3.4. Contenidos de TC en los genotipos de *Lotus* spp. evaluados. Lc: *L. corniculatus* "charlii", Lt: *L. tenuis* y LH: *L. tenuis* x *L. corniculatus* 1, 2, 3 y 4. Prueba de Kruskal-Wallis. Comparación de a pares, dentro de cada bloque gris rangos con letras en común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Material	TC solubles				TC insolubles				TC totales							
	Media	±	d.e.	Rango	Media	±	d.e.	Rango	Media	±	d.e.	Rango				
Hojas	Lc	10,84	±	1,51	65,50	e	12,30	±	4,14	63,50	c	25,85	±	4,85	65,50	d
	LH1	1,08	±	0,18	41,58	cd	4,71	±	0,98	37,33	b	5,79	±	0,94	37,75	bc
	LH2	0,58	±	0,30	25,67	bc	4,25	±	1,58	32,25	b	4,83	±	1,67	29,75	b
	LH3	0,50	±	0,12	24,00	b	3,97	±	1,92	29,25	b	4,47	±	1,91	27,83	b
	LH4	1,71	±	0,58	50,75	de	5,86	±	1,99	45,17	b	7,58	±	2,42	46,67	c
	Lt	0,06	±	0,02	6,00	a	0,93	±	0,34	6,00	a	0,99	±	0,34	6,00	a
Tallos	Lc	0,37	±	0,16	52,50	d	2,49	±	1,15	46,90	c	2,82	±	1,13	48,50	c
	LH1	0,07	±	0,04	23,65	abc	1,16	±	0,70	24,60	b	1,23	±	0,73	24,30	b
	LH2	0,11	±	0,06	31,15	bc	1,47	±	0,41	36,50	bc	1,58	±	0,42	36,00	bc
	LH3	0,14	±	0,06	36,80	c	1,07	±	0,35	24,89	b	1,20	±	0,36	26,33	b
	LH4	0,05	±	0,04	17,10	ab	1,07	±	0,24	26,67	b	1,11	±	0,26	24,56	b
	Lt	0,03	±	0,01	11,13	a	0,40	±	0,04	6,50	a	0,43	±	0,04	6,25	a

También pudo determinarse que el contenido de la fracción soluble, insoluble y total de TC en tallos fue inferior al de las hojas en todos los materiales evaluados ($p < 0,0001$). Sin embargo y a pesar de ello, se observaron diferencias entre los clones de ambos parentales para el contenido en tallo de TC; mientras que los clones del parental "charlii" presentaron el contenido más elevado, en los tallos de los clones del parental "Pampa INTA" se observaron los contenidos más bajos. Por su parte, los clones de los genotipos híbridos presentaron niveles intermedios entre los de ambos parentales (Tabla 3.4).

Por otra parte, el contenido de TC en raíces de todos los materiales analizados también resultó marcadamente inferior al observado a nivel foliar ($p < 0,0001$). Pero, a diferencia del contenido de TC en hojas y tallos, en raíces se observó una tendencia diferente para el contenido de TC. En ellas, los clones del parental "charlii" presentaron bajos contenidos totales de TC en raíces, al igual que los clones de los genotipos híbridos 3 y 4; mientras que en los clones del parental "Pampa INTA" se observaron los contenidos más altos en raíz al igual que los clones de los genotipos híbridos 1 y 2 (Tabla 3.5).

Tabla 3.5. Contenido de TC en raíz de *Lotus* spp. expresados en mg TC/g MS. Prueba de Duncan, dentro de cada bloque gris medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Material	TC solubles (media ± d.e.)			TC insolubles (media ± d.e.)			TC totales (media ± d.e.)					
<i>L. corniculatus</i> "charlii"	0,46	±	0,13	a	0,65	±	0,10	b	1,12	±	0,19	ab
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 1	0,82	±	0,34	bc	0,72	±	0,11	bc	1,54	±	0,38	bc
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 2	0,86	±	0,18	c	0,66	±	0,17	bc	1,52	±	0,34	bc
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 3	0,47	±	0,18	a	0,36	±	0,14	a	0,83	±	0,30	a
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 4	0,50	±	0,10	ab	0,36	±	0,14	a	0,86	±	0,21	a
<i>L. tenuis</i> "Pampa INTA"	0,74	±	0,18	bc	0,96	±	0,10	c	1,70	±	0,26	c

3.4.2.5. Contenido de antocianinas.

Para las hojas de los genotipos evaluados el contenido de antocianinas resultó nulo, sin poder detectarse la presencia de las mismas mediante la técnica utilizada. Por el contrario, si se observaron contenidos diferenciales de antocianinas en tallos de los distintos materiales evaluados ($F=13,5$; $p<0,0001$). En los clones del parental *L. tenuis* "Pampa INTA" se observó el contenido relativo más bajo de antocianinas (0,02 mmol de cianidina/g peso fresco). En comparación, los clones del parental "charlii" presentaron 10 veces más antocianinas que los de *L. tenuis*; en ellos se observó un nivel de 0,2 mmol de cianidina/g peso fresco, mientras que en los clones de los genotipos *L. tenuis* x *L. corniculatus*, se observaron valores intermedios (Tabla 3.6).

Tabla 3.6. Contenido de antocianinas en tallo de *Lotus* spp. Prueba de Duncan, medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p<0,05$).

Material	mmol cianidina / g PF			
	(media \pm d.e.)			
<i>L. corniculatus</i> "charlii"	0,20	\pm	0,03	A
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 1	0,09	\pm	0,03	B
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 2	0,11	\pm	0,05	B
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 3	0,12	\pm	0,04	B
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 4	0,12	\pm	0,04	B
<i>L. tenuis</i> "Pampa INTA"	0,02	\pm	0,01	C

3.4.2.6. Calidad forrajera y cinética de digestibilidad de proteínas.

Se observó una elevada digestibilidad de la materia seca para todos los materiales evaluados. Los clones de los genotipos híbridos presentaron valores comprendidos entre 80-84% al igual que los de *L. tenuis* "Pampa INTA"; la digestibilidad de los clones del parental *L. corniculatus* "charlii" resultó levemente inferior (78%). Por su parte, el contenido de proteína bruta fue elevado también para los clones de los genotipos híbridos, observándose valores comprendidos entre 21,4 y 22,3%. Por otra parte, los clones del parental *L. tenuis* presentaron contenidos de alrededor de 23% mientras que en los del parental *L. corniculatus* se observaron valores más bajos (16,2%).

Para la evaluación de cinética de digestibilidad *in-vitro* de la proteína en vástago de clones de *L. tenuis*, *L. corniculatus* y *L. tenuis* x *L. corniculatus* 2 se observó la ausencia de interacción tiempo de digestión x genotipo ($F=0,49$; $p=0,81$); sin embargo, se observaron diferencias entre genotipos ($F=41,33$; $p<0,0001$) y entre tiempos de digestión ($F=17,97$; $p<0,0001$). En este sentido se observó que los clones de *L. tenuis* "Pampa INTA" presentaron para todos los tiempos de digestión, valores de proteína más elevados que los clones de *L. corniculatus*, mientras que los clones de *L. tenuis* x *L. corniculatus* 2 presentaron valores intermedios. En cuanto al tiempo de digestión, se observó para todos los genotipos los contenidos más elevados de proteínas en el tiempo cero, mientras que a las 48 horas de digestión se observaron los contenidos más bajos. Los contenidos de proteínas a las 6 y 24 horas de digestión fue similares entre sí, pero intermedios en relación a las 0 y 48 horas de digestión (Figura 3.21).

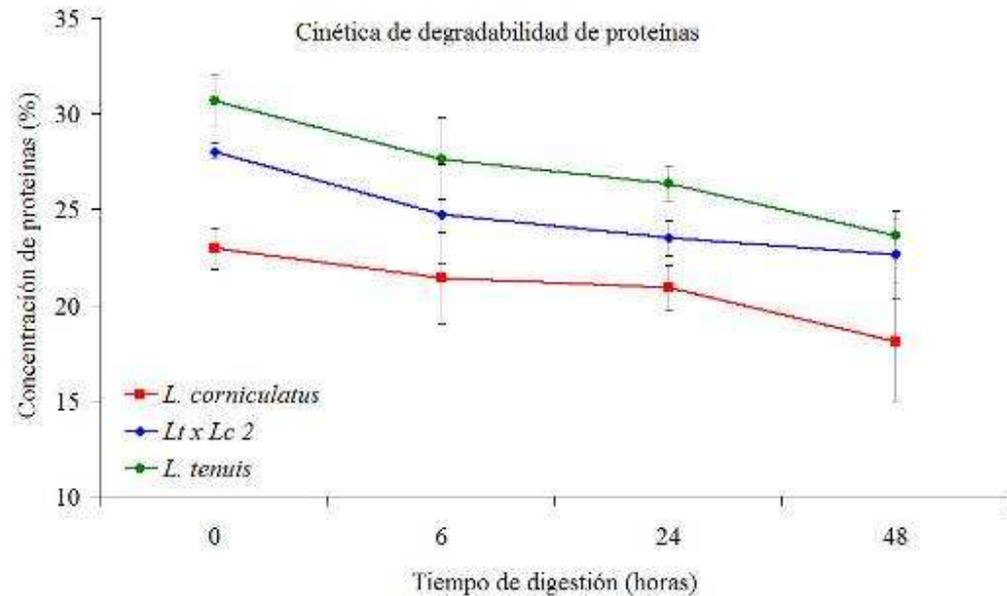


Figura 3.21. Cinética de digestibilidad *in-vitro* de proteínas en vástago de *Lotus* spp.

3.4.2.7. Evaluación bajo estrés salino.

3.4.2.7.1. Parámetros de crecimiento.

En general se observó una disminución marcada del crecimiento de los diferentes materiales bajo tratamiento salino en comparación al control. Esto pudo ser medido a través del peso seco, para el cual se observó una interacción tratamiento x genotipo significativa para el peso seco de la hoja ($p=0,04$) y el tallo ($p=0,01$). Por el contrario, no resultó significativa para el peso seco de las raíces ($p=0,7$). Para las tres fracciones, en todos los materiales evaluados, se observó un menor peso seco bajo tratamiento salino en comparación al control ($p<0,05$). Para el peso seco de raíz se observó que en general, los clones de las plantas híbridas (excepto los clones del genotipo híbrido 1) presentaron un mayor peso seco que el observado en ambos parentales (Tabla 3.7). No se observaron diferencias en el peso seco de las hojas de los distintos materiales bajo tratamiento salino. Sin embargo, bajo tratamiento control, los clones del genotipo *L. tenuis* x *L. corniculatus* 2 presentaron un peso mayor que el observado para ambos parentales (Tabla 3.7). Para el peso seco del tallo se observó que bajo tratamiento control, los diferentes materiales no presentaron diferencias. Por último, bajo estrés salino, el mayor peso seco del tallo fue observado en *L. tenuis* y el menor en *L. corniculatus* “charlii”, mientras que los clones de los genotipos híbridos presentaron valores intermedios (Tabla 3.7).

Tabla 3.7. Peso seco de hoja, tallo y raíz de los diferentes genotipos de *Lotus* spp. bajo tratamiento control y salino. Prueba de Duncan, dentro de cada bloque gris medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Material	Peso seco de hojas (g / planta)				
	Control		Salino		p-valor control vs. salino
	media	d.e.	media	d.e.	
<i>L. corniculatus</i> "charlii"	0,48 ± 0,14	a	0,32 ± 0,04	a	0,0278
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 1	0,45 ± 0,19	a	0,27 ± 0,04	a	0,0397
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 2	0,76 ± 0,10	c	0,32 ± 0,05	a	<0,0001
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 3	0,72 ± 0,15	bc	0,32 ± 0,05	a	0,0003
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 4	0,60 ± 0,26	abc	0,33 ± 0,06	a	0,0303
<i>L. tenuis</i> "Pampa INTA"	0,52 ± 0,14	ab	0,32 ± 0,08	a	0,0148

Material	Peso seco de tallos (g / planta)				
	Control		Salino		p-valor control vs. salino
	media	d.e.	media	d.e.	
<i>L. corniculatus</i> "charlii"	0,44 ± 0,10	a	0,14 ± 0,01	a	0,0001
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 1	0,68 ± 0,29	a	0,17 ± 0,02	ab	0,0017
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 2	0,89 ± 0,17	a	0,19 ± 0,04	ab	<0,0001
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 3	0,79 ± 0,19	a	0,19 ± 0,04	ab	<0,0001
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 4	0,85 ± 0,38	a	0,24 ± 0,04	bc	0,0029
<i>L. tenuis</i> "Pampa INTA"	0,62 ± 0,19	a	0,30 ± 0,11	c	0,0071

Material	Peso seco de raíces (g / planta)				
	Control		Salino		p-valor control vs. salino
	media	d.e.	media	d.e.	
<i>L. corniculatus</i> "charlii"	0,30 ± 0,11	a	0,19 ± 0,03	a	<0,0001
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 1	0,43 ± 0,13	bc	0,33 ± 0,07	bc	<0,0001
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 2	0,53 ± 0,10	c	0,31 ± 0,05	c	<0,0001
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 3	0,47 ± 0,19	c	0,33 ± 0,09	c	<0,0001
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 4	0,45 ± 0,16	c	0,38 ± 0,06	c	<0,0001
<i>L. tenuis</i> "Pampa INTA"	0,37 ± 0,10	ab	0,23 ± 0,05	ab	<0,0001

Teniendo en cuenta el peso seco de la planta entera se observó que *L. tenuis* presentó en promedio $0,85 \pm 0,23$ g/planta bajo tratamiento salino, el cual fue superior ($p < 0,05$) que el observado para *L. corniculatus* "charlii" bajo las mismas condiciones ($0,65 \pm 0,04$ g/planta), mientras que los clones de los genotipos híbridos presentaron peso seco intermedio entre ambos parentales (entre 0,76 y 0,83 g/planta).

3.4.2.7.2. Contenido de iones.

Mediante la evaluación de los niveles de iones en las hojas de los materiales ensayados, se observó una interacción tratamiento x genotipo significativa para el contenido de K^+ , tanto en la fracción de "hojas viejas" ($p < 0,0001$) como en la de "hojas nuevas" ($p = 0,0003$) y también para el contenido de Na^+ en la fracción de "hojas nuevas" ($p = 0,013$). Sin embargo, la interacción no fue significativa para el contenido de Na^+ en la fracción de "hojas viejas" ($p = 0,21$). Los valores obtenidos para los contenidos de Na^+ y K^+ en los distintos materiales evaluados bajo ambos tratamientos pueden observarse en la Tabla 3.8.

Tabla 3.8. Contenido de K^+ y Na^+ en “hojas viejas” y “hojas nuevas” de *Lotus* spp. Prueba de Duncan, dentro de cada bloque gris medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Material	Potasio (mg/kg MS)					
	Hojas viejas			Hojas nuevas		
	Control (media \pm d.e.)	Salino (media \pm d.e.)	p-valor control vs salino	Control (media \pm d.e.)	Salino (media \pm d.e.)	p-valor control vs salino
<i>L. corniculatus</i> "charlii"	65,97 \pm 6,44 ab	26,76 \pm 4,38 c	<0,0001	51,94 \pm 4,45 c	27,00 \pm 2,62 c	<0,0001
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 1	62,33 \pm 3,80 a	9,79 \pm 2,14 a	<0,0001	43,35 \pm 4,70 ab	15,92 \pm 2,56 a	<0,0001
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 2	83,10 \pm 5,88 c	16,67 \pm 6,72 b	<0,0001	51,76 \pm 2,58 c	19,01 \pm 2,16 b	<0,0001
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 3	72,36 \pm 5,84 b	9,01 \pm 3,34 a	<0,0001	48,01 \pm 2,27 bc	14,10 \pm 0,94 a	<0,0001
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 4	66,95 \pm 11,79 ab	12,67 \pm 2,66 ab	<0,0001	46,10 \pm 5,74 ab	14,67 \pm 1,46 a	<0,0001
<i>L. tenuis</i> "Pampa INTA"	59,58 \pm 5,68 a	12,34 \pm 2,65 ab	<0,0001	41,98 \pm 5,57 a	19,81 \pm 2,40 b	<0,0001

Material	Sodio (mg/kg MS)					
	Hojas viejas			Hojas nuevas		
	Control (media \pm d.e.)	Salino (media \pm d.e.)	p-valor control vs salino	Control (media \pm d.e.)	Salino (media \pm d.e.)	p-valor control vs salino
<i>L. corniculatus</i> "charlii"	3,49 \pm 1,54 ab	54,26 \pm 5,07 ab	<0,0001	2,99 \pm 2,57 b	39,06 \pm 11,31 bc	<0,0001
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 1	2,44 \pm 1,29 a	48,05 \pm 11,36 a	<0,0001	0,95 \pm 0,87 a	35,97 \pm 4,54 abc	<0,0001
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 2	2,14 \pm 0,94 ab	49,79 \pm 8,10 ab	<0,0001	0,21 \pm 0,32 a	32,04 \pm 4,95 ab	<0,0001
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 3	2,84 \pm 1,03 b	57,33 \pm 7,82 b	<0,0001	0,76 \pm 0,51 a	44,31 \pm 5,75 c	<0,0001
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 4	2,47 \pm 0,99 ab	52,41 \pm 4,53 ab	<0,0001	0,95 \pm 0,75 a	36,20 \pm 5,16 abc	<0,0001
<i>L. tenuis</i> "Pampa INTA"	2,51 \pm 0,91 b	57,39 \pm 5,37 b	<0,0001	0,39 \pm 0,57 a	29,49 \pm 5,41 a	<0,0001

Cabe destacar que en todos los materiales evaluados bajo estrés salino y para las dos fracciones de hojas se observó un aumento de los niveles de Na^+ y contrariamente, una disminución de los niveles de K^+ en comparación al tratamiento control. A su vez, en clones de *L. tenuis* y *L. corniculatus* se observó una mayor acumulación de Na^+ en la fracción de “hojas viejas” en relación a la fracción de “hojas nuevas” ($p < 0,05$). Esto mismo pudo observarse para los clones de los genotipos híbridos 2 y 3. Sin embargo, los clones de los genotipo híbridos 1 y 3 presentaron contenidos similares de Na^+ tanto en la fracción de “hojas viejas” como en la de “hojas nuevas” ($p = 0,31$ y $p = 0,43$; respectivamente). Por último resulta interesante el contenido de K^+ en *L. corniculatus* “charlii” el cual fue mayor al del resto de los materiales evaluados bajo tratamiento salino tanto en las “hojas viejas” como en las “nuevas” ($p < 0,05$).

Por otra parte, para el contenido de Cl^- se observó interacción tratamiento x genotipo significativa tanto para la fracción de “hojas viejas” ($p < 0,0001$) como para la de “hojas nuevas” ($p = 0,01$). Los resultados de las determinaciones de los niveles de Cl^- en los distintos materiales puede observarse en la Tabla 3.9.

Tabla 3.9. Contenido de Cl⁻ en “hojas viejas” y “hojas nuevas” de *Lotus* spp. Prueba de Duncan, dentro de cada bloque gris medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Genotipo	Cloruros (mg/kg MS) en hojas viejas		
	Control	Salino	p-valor
	(media \pm d.e.)	(media \pm d.e.)	control vs salino
<i>L. corniculatus</i> "charlii"	5,82 \pm 2,41 ab	35,71 \pm 20,32 a	0,0265
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 1	6,98 \pm 1,19 b	61,39 \pm 2,19 c	<0,0001
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 2	4,96 \pm 0,40 ab	43,66 \pm 9,74 ab	0,0002
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 3	4,01 \pm 0,69 a	55,75 \pm 5,48 bc	<0,0001
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 4	4,49 \pm 1,14 ab	44,86 \pm 5,23 ab	<0,0001
<i>L. tenuis</i> "Pampa INTA"	6,67 \pm 2,23 b	86,44 \pm 8,64 d	<0,0001

Genotipo	Cloruros (mg/kg MS) en hojas nuevas		
	Control	Salino	p-valor
	(media \pm d.e.)	(media \pm d.e.)	control vs salino
<i>L. corniculatus</i> "charlii"	6,86 \pm 1,13 c	27,95 \pm 4,86 ab	0,0001
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 1	5,65 \pm 0,34 abc	34,54 \pm 3,76 b	<0,0001
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 2	4,95 \pm 0,69 a	23,46 \pm 4,69 a	0,0002
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 3	5,19 \pm 0,46 ab	34,41 \pm 4,25 b	<0,0001
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 4	5,33 \pm 1,10 ab	28,66 \pm 3,89 ab	<0,0001
<i>L. tenuis</i> "Pampa INTA"	6,62 \pm 1,32 bc	32,36 \pm 5,18 b	0,0001

Se observó que para todos los materiales y para los dos tipos de hojas bajo tratamiento salino los niveles de Cl⁻ resultan superiores a los observados bajo tratamiento control. El incremento de cloruros dependió del material evaluado y se encontró comprendido entre 30 y 80 mg/kg MS para las “hojas viejas”, observándose el mayor aumento en *L. tenuis*, y entre 21 y 29 mg/kg MS en las “hojas nuevas”. Bajo condición salina y en las “hojas nuevas”, las diferencias observadas en los niveles de Cl⁻ no fueron muy marcadas. Sin embargo, en las “hojas viejas” se observó una importante diferencia, donde los clones de *L. corniculatus* “charlii” y los de los genotipos híbridos presentaron menores contenidos de Cl⁻ que los clones de *L. tenuis*. Por último, se observó que en general, bajo tratamiento salino, las “hojas viejas” presentaron un mayor contenido de Cl⁻ en relación al contenido en las “hojas nuevas” ($p < 0,01$), excepto para los clones de *L. corniculatus* “charlii” en los cuales no se observaron diferencias entre las dos fracciones de hojas ($p = 0,48$).

3.4.2.7.3. Actividad del fotosistema II.

La actividad del fotosistema II fue evaluada para *L. tenuis* “Pampa INTA”, *L. corniculatus* “charlii”, *L. corniculatus* “San Gabriel” y clones de los genotipos *L. tenuis* x *L. corniculatus*. Para el parámetro RCM no se observó interacción tratamiento x genotipo ($p = 0,103$) ni tampoco se observaron diferencias debido al tratamiento ($p = 0,201$) o al genotipo ($p = 0,251$). El valor medio observado fue de $0,74 \pm 0,05$ (Fv/Fm).

El coeficiente de atenuación no fotoquímica (qP) no resultó modificado como consecuencia del estrés salino en ninguno de los materiales evaluados (Tabla 3.12). Tampoco se observaron diferencias entre los distintos genotipos bajo tratamiento control ($p = 0,10$) y salino ($p = 0,33$). Para el coeficiente de atenuación no fotoquímica (qN) se observó un aumento del mismo bajo tratamiento salino para la mayoría de los materiales evaluados, excepto para *L. corniculatus* “charlii” y los clones del genotipo *L. tenuis* x *L. corniculatus* 1

(Tabla 3.10). Se pudo observar que bajo estrés salino los valores de qN observados en *L. corniculatus* “charlii” fueron los únicos que se diferenciaron del resto de los materiales evaluados ($p=0,0045$); las plantas de esta población presentaron valores relativamente más bajos. En el tratamiento control también se observaron diferencias entre genotipos para los valores de qN ($p=0,045$); bajo este tratamiento, los clones de *L. corniculatus* “charlii”, junto con los clones de los cuatro genotipos híbridos, presentaron los valores más elevados.

Tabla 3.10. Coeficiente de atenuación fotoquímico (qP) y coeficiente de atenuación no fotoquímico (qN) en plantas de *Lotus* spp. bajo tratamiento control y salino. Valores promedio de las últimas 4 mediciones.

Material	Tratamiento	qP		p-valor control vs salino	qN		p-valor control vs salino
		media	d.e.		media	d.e.	
<i>L. corniculatus</i> "San Gabriel"	Control	0,64 ± 0,16		0,805	0,53 ± 0,11		0,020
	Salino	0,67 ± 0,14			0,73 ± 0,11		
<i>L. tenuis</i> "Pampa INTA"	Control	0,71 ± 0,03		0,053	0,64 ± 0,10		0,013
	Salino	0,54 ± 0,12			0,83 ± 0,02		
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 1	Control	0,73 ± 0,10		0,135	0,83 ± 0,07		0,572
	Salino	0,55 ± 0,11			0,86 ± 0,02		
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 2	Control	0,61 ± 0,05		0,220	0,72 ± 0,07		0,016
	Salino	0,54 ± 0,06			0,86 ± 0,03		
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 3	Control	0,59 ± 0,07		0,640	0,70 ± 0,05		0,002
	Salino	0,56 ± 0,04			0,90 ± 0,03		
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 4	Control	0,72 ± 0,16		0,756	0,77 ± 0,05		0,037
	Salino	0,68 ± 0,13			0,89 ± 0,02		
<i>L. corniculatus</i> "charlii"	Control	0,52 ± 0,02		0,162	0,52 ± 0,02		0,325
	Salino	0,54 ± 0,03			0,54 ± 0,03		

Más interesantes aún resultaron los valores obtenidos para el parámetro NPQ, en donde se observó que el tratamiento salino, en relación al tratamiento control, produjo un incremento en el mismo para los materiales *L. corniculatus* “San Gabriel” ($p=0,006$) y *L. tenuis* ($p<0,0001$). Por el contrario, no se observaron diferencias entre los tratamientos para los materiales *L. corniculatus* “charlii” ($p=0,601$) y *L. tenuis* x *L. corniculatus* ($p=0,6413$). Las curvas obtenidas para este parámetro pueden observarse en la Figura 3.22.

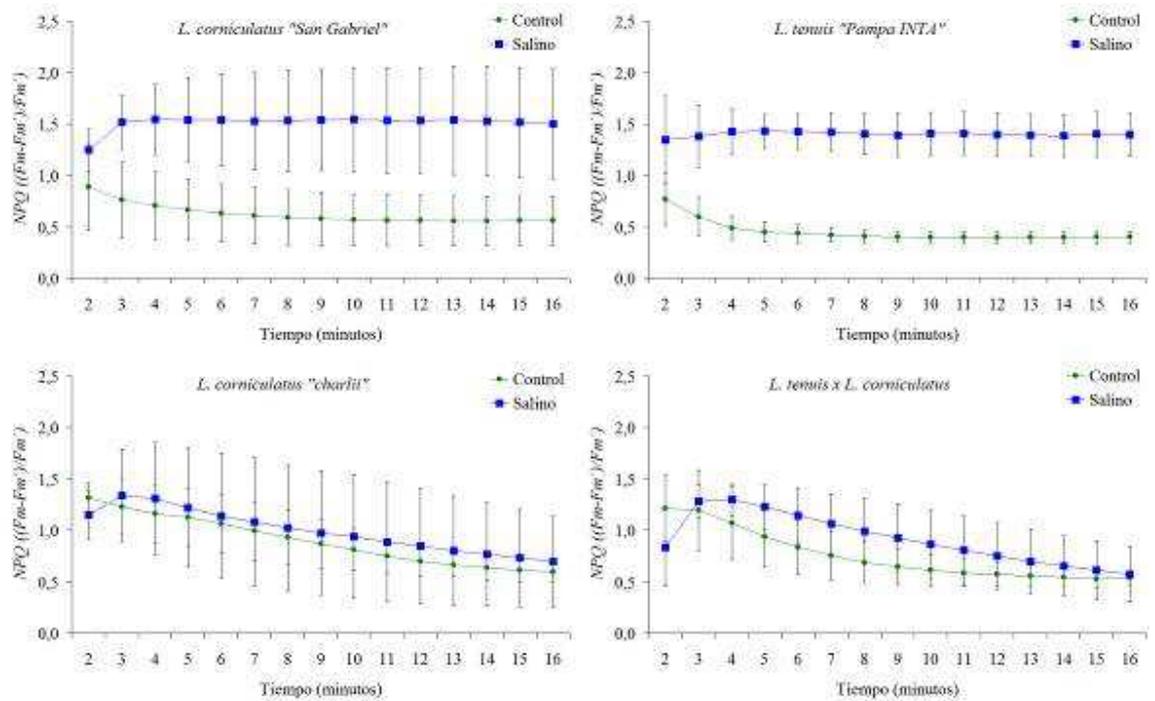


Figura 3.22. Atenuación no fotoquímica (NPQ) en plantas de *Lotus* spp. bajo tratamiento control y salino.

3.4.2.7.4. Niveles de taninos condensados y antocianinas.

Para los niveles de TC en hojas de los genotipos evaluados se observó una interacción genotipo x tratamiento significativa para la fracción soluble ($F=8,65$; $p<0,0001$), insoluble ($F=2,31$; $p=0,048$) y total ($F=4,49$; $p=0,0009$). En general se observó, que el contenido foliar de TC de los diferentes materiales evaluados, no se afectó por el tratamiento. Únicamente para la fracción de TC solubles en hojas de los clones de *L. corniculatus* "charlii", se observó un menor contenido bajo tratamiento salino en comparación con los mismos bajo tratamiento control. No obstante ello, tanto en el tratamiento salino como en el control se observó que las plantas de *L. corniculatus* "charlii" presentaron niveles foliares relativamente más elevados de TC en contraste a las plantas de *L. tenuis* que presentaron los niveles más bajos, mientras que en los clones de los genotipos híbridos se observaron niveles intermedios. Los niveles foliares de TC en los materiales evaluados puede observarse en la Tabla 3.11.

Tabla 3.11. Contenido de TC en hojas de *Lotus* spp. Prueba de Duncan, dentro de cada bloque gris medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Fracción	Material	Control (mg TC/g MS)			Salino (mg TC/g MS)			p-valor control vs. salino
		Media	d.e.		Media	d.e.		
Soluble	<i>L. corniculatus</i> "charlii"	11,17	± 1,04	e	9,16	± 1,8	d	0,004
	<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 1	1,08	± 0,18	c	1,14	± 0,57	b	0,6986
	<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 2	0,51	± 0,2	b	0,6	± 0,27	ab	0,3671
	<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 3	0,48	± 0,08	b	0,37	± 0,21	ab	0,1432
	<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 4	1,83	± 0,43	d	2,3	± 0,97	c	0,1508
	<i>L. tenuis</i> "Pampa INTA"	0,06	± 0,02	a	0,06	± 0,04	a	0,6409
Insoluble	<i>L. corniculatus</i> "charlii"	14,02	± 3,47	d	11,9	± 4,19	e	0,2688
	<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 1	4,71	± 0,98	b	6,67	± 2,92	d	0,1842
	<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 2	3,92	± 1,13	b	4,09	± 1,55	bc	0,7747
	<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 3	3,97	± 1,92	b	3,04	± 1,13	b	0,1903
	<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 4	6,24	± 1,57	c	6,05	± 1,38	cd	0,7694
	<i>L. tenuis</i> "Pampa INTA"	0,93	± 0,34	a	0,75	± 0,28	a	0,2098
Total	<i>L. corniculatus</i> "charlii"	24,59	± 2,41	d	21,41	± 3,94	d	0,0635
	<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 1	5,79	± 0,94	b	7,82	± 2,44	c	0,0647
	<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 2	4,49	± 1,25	b	4,69	± 1,43	b	0,7286
	<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 3	4,47	± 1,91	b	3,4	± 1,06	b	0,1316
	<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 4	8,07	± 1,79	c	8,8	± 1,84	c	0,3562
	<i>L. tenuis</i> "Pampa INTA"	0,99	± 0,34	a	0,8	± 0,28	a	0,1735

Para el contenido de TC en tallos se observó la ausencia de interacción tratamiento x genotipo para la fracción soluble ($F=0,5$; $p=0,78$), insoluble ($F=1,63$; $p=0,17$) y total ($F=1,65$; $p=0,16$). Si bien no se observó un efecto del tratamiento en la fracción soluble e insoluble de los niveles de TC ($p > 0,05$), sí fue observado para el contenido total de TC ($F=4,06$; $p=0,048$). En este sentido, el contenido de TC totales bajo tratamiento salino fue inferior al mismo bajo tratamiento control. A su vez, también se observaron diferencias entre genotipos para las tres fracciones de TC ($p > 0,05$). Los clones de *L. corniculatus* presentaron los contenidos más elevados, mientras que los de *L. tenuis* los más bajos. Los clones de los genotipos híbridos presentaron en sus tallos valores de TC intermedios o similares a *L. tenuis* (Tabla 3.12).

Tabla 3.12. Contenido de TC en tallos de *Lotus* spp. Prueba de Duncan, dentro de cada bloque gris medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Fracción	Material	Control (mg TC/g MS)		Salino (mg TC/g MS)		Promedio genotipos (mg TC/g MS)		p-valor control vs. salino
		Media	d.e.	Media	d.e.	Media	d.e.	
Soluble	<i>L. corniculatus</i> "charlii"	0,31 ± 0,16	0,31 ± 0,22	0,31 ± 0,19	b	0,3219		
	<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 1	0,08 ± 0,04	0,04 ± 0,02	0,06 ± 0,04	a	0,3219		
	<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 2	0,10 ± 0,06	0,04 ± 0,02	0,07 ± 0,05	a	0,3219		
	<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 3	0,13 ± 0,08	0,06 ± 0,03	0,09 ± 0,06	a	0,3219		
	<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 4	0,05 ± 0,05	0,09 ± 0,10	0,07 ± 0,07	a	0,3219		
	<i>L. tenuis</i> "Pampa INTA"	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,02	0,03 ± 0,02	a	0,3219		
Insoluble	<i>L. corniculatus</i> "charlii"	2,70 ± 1,28	1,29 ± 1,39	2,00 ± 1,47	c	0,0624		
	<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 1	1,15 ± 0,68	1,10 ± 0,91	1,13 ± 0,77	ab	0,0624		
	<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 2	1,46 ± 0,41	0,75 ± 0,37	1,11 ± 0,52	ab	0,0624		
	<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 3	1,07 ± 0,36	0,85 ± 0,85	0,96 ± 0,63	ab	0,0624		
	<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 4	1,42 ± 0,86	1,47 ± 0,77	1,44 ± 0,78	bc	0,0624		
	<i>L. tenuis</i> "Pampa INTA"	0,40 ± 0,04	0,55 ± 0,34	0,48 ± 0,26	a	0,0624		
Total	<i>L. corniculatus</i> "charlii"	3,01 ± 1,25	1,61 ± 1,35	2,31 ± 1,44	c	0,0485		
	<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 1	1,22 ± 0,71	1,14 ± 0,93	1,18 ± 0,79	ab	0,0485		
	<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 2	1,56 ± 0,42	0,79 ± 0,38	1,17 ± 0,55	ab	0,0485		
	<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 3	1,19 ± 0,36	0,91 ± 0,88	1,05 ± 0,66	ab	0,0485		
	<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 4	1,48 ± 0,89	1,55 ± 0,78	1,51 ± 0,80	b	0,0485		
	<i>L. tenuis</i> "Pampa INTA"	0,43 ± 0,04	0,58 ± 0,35	0,51 ± 0,26	a	0,0485		

Por último, para el contenido de TC en raíces se observó interacción tratamiento x genotipo significativa para la fracción soluble ($p=0,0012$) y total ($p=0,0037$). Sin embargo, para la fracción insoluble no fue significativa ($p=0,0814$).

En general, pudo observarse una disminución de los niveles de TC totales en raíz bajo tratamiento salino en comparación a los mismos bajo tratamiento control, con excepción de los clones del genotipo *L. tenuis* x *L. corniculatus* 4 los cuales no presentaron diferencias debido al tratamiento (Tabla 3.13). Esta disminución también se observó para la fracción soluble. Por el contrario, no se observaron diferencias en el contenido de TC insolubles en raíces debido al tratamiento.

Tabla 3.13. Contenido de TC en raíces de *Lotus* spp. Prueba de Duncan, dentro de cada bloque gris medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Fracción	Material	Control (mg TC/g MS) (media \pm d.e.)	Salino (mg TC/g MS) (media \pm d.e.)	p-valor control vs. salino
Soluble	<i>L. corniculatus</i> "charlii"	0,46 \pm 0,13 a	0,15 \pm 0,08 b	0,0005
	<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 1	0,82 \pm 0,34 b	0,15 \pm 0,05 b	0,0008
	<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 2	0,86 \pm 0,18 b	0,15 \pm 0,08 b	<0,0001
	<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 3	0,47 \pm 0,18 a	0,05 \pm 0,03 a	0,0005
	<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 4	0,50 \pm 0,10 a	0,17 \pm 0,12 b	0,0003
	<i>L. tenuis</i> "Pampa INTA"	0,74 \pm 0,18 b	0,02 \pm 0,01 a	<0,0001
Insoluble	<i>L. corniculatus</i> "charlii"	0,65 \pm 0,10 bc	0,68 \pm 0,15 bc	0,3923
	<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 1	0,72 \pm 0,11 c	0,73 \pm 0,06 c	0,3923
	<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 2	0,66 \pm 0,17 b	0,52 \pm 0,14 b	0,3923
	<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 3	0,36 \pm 0,14 a	0,29 \pm 0,11 a	0,3923
	<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 4	0,36 \pm 0,14 a	0,53 \pm 0,29 a	0,3923
	<i>L. tenuis</i> "Pampa INTA"	0,96 \pm 0,10 d	0,77 \pm 0,13 d	0,3923
Total	<i>L. corniculatus</i> "charlii"	1,12 \pm 0,19 a	0,83 \pm 0,19 b	0,0287
	<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 1	1,54 \pm 0,38 b	0,88 \pm 0,06 b	0,0019
	<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 2	1,52 \pm 0,34 b	0,67 \pm 0,21 b	0,0008
	<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 3	0,83 \pm 0,30 a	0,34 \pm 0,14 a	0,008
	<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 4	0,86 \pm 0,21 a	0,70 \pm 0,36 b	0,3696
	<i>L. tenuis</i> "Pampa INTA"	1,70 \pm 0,26 b	0,79 \pm 0,14 b	0,0001

Por otra parte, para el contenido de antocianinas en tallo se observó interacción tratamiento x genotipo significativa ($p < 0,0001$). Bajo tratamiento salino se observó un aumento del contenido de antocianinas en tallo para todos los materiales evaluados (Tabla 3.14). A su vez, bajo tratamiento control, las plantas de *L. corniculatus* "charlii" presentaron los mayores contenidos, lo que contrasta con las plantas de *L. tenuis* que presentaron los niveles más bajos; los clones de los genotipos híbridos presentaron niveles intermedios. Bajo estrés salino, los clones del genotipo *L. tenuis* x *L. corniculatus* 2 incrementaron marcadamente sus niveles de antocianinas en tallo, observándose en ellos los valores más elevados. Por otra parte, los tallos de *L. tenuis*, a pesar del incremento, continuaron presentando los contenidos relativos más bajos de antocianinas, mientras que el resto de los materiales presentaron niveles intermedios (Tabla 3.14).

Tabla 3.14. Contenidos de antocianinas en tallo de *Lotus* spp. Valores expresados en milimoles de cianidina/g PF. Prueba de Duncan, dentro de cada bloque gris medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Muestra	Control (media \pm d.e.)	Salino (media \pm d.e.)	p-valor control vs. salino
<i>L. corniculatus</i> "charlii"	0,20 \pm 0,03 c	0,34 \pm 0,07 c	0,0009
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 1	0,09 \pm 0,03 b	0,20 \pm 0,04 b	0,0002
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 2	0,12 \pm 0,05 b	0,56 \pm 0,12 d	<0,0001
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 3	0,12 \pm 0,04 b	0,34 \pm 0,07 c	0,0001
<i>L. tenuis</i> x <i>L. corniculatus</i> 4	0,11 \pm 0,04 b	0,24 \pm 0,05 b	0,0004
<i>L. tenuis</i> "Pampa INTA"	0,02 \pm 0,01 a	0,05 \pm 0,01 a	0,0002

3.4.3. Cruzamientos entre híbridos.

Los cruzamientos manuales realizados entre los cuatro genotipos *L. tenuis* x *L. corniculatus*, al igual que los cruzamientos realizados con anterioridad, resultaron exitosos. Del mismo se obtuvieron vainas de aspecto normal, conteniendo entre 2 y 6 semillas cada una y de aspectos fenotípicos también normales. El porcentaje de germinación de las semillas colectadas manualmente fue elevado (>95%). A nivel morfológico, las plantas logradas no se diferenciaron marcadamente de sus parentales híbridos.

Del análisis del contenido foliar de TC en 50 de estos nuevos genotipos obtenidos, se observó que presentaban un contenido foliar medio de $0,40 \pm 0,50$; $3,22 \pm 2,04$ y $3,62 \pm 2,4$ mg/g MS para la fracción soluble, insoluble y total respectivamente. La variación en el contenido total de TC fue elevada (coeficiente de variación = 66%). Cabe destacar que el 86% de las plantas obtenidas superaron el contenido foliar medio de *L. tenuis* “Pampa INTA” (1 mg/g MS); sin embargo, ningún genotipo alcanzó los valores medios de TC observados en plantas de *L. corniculatus* “charlii”. En relación al contenido foliar medio de TC de los genotipos *L. tenuis* x *L. corniculatus* usados como parentales, solo el 18% de su descendencia superaron el mismo. En la Figura 3.23 se puede observar la frecuencia absoluta del número de plantas en función de su contenido foliar de TC.

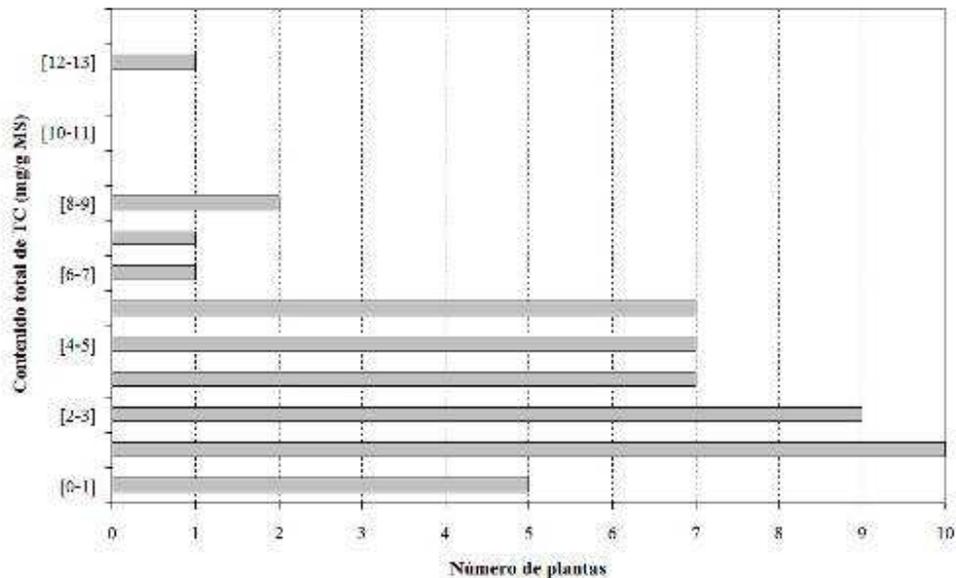


Figura 3.23. Frecuencia absoluta del número de plantas obtenidas del cruzamiento entre híbridos en función de su contenido foliar de TC totales.

De esta población se seleccionaron aquellos genotipos que resultaron contrastantes para el contenido foliar de TC. Los genotipos seleccionados, tanto de bajo como de medio y alto contenido de TC, mantuvieron su fenotipo al propagarlas vegetativamente. En ellos se observó una diferencia en el contenido foliar de TC totales de 9,3 mg TC / g MS entre el grupo de clones con altos contenidos y el grupo de clones con bajos contenidos de TC ($F=9,41$; $p=0,004$). Los valores de TC obtenidos pueden observarse en la Tabla 3.15.

Tabla 3.15. Contenido foliar de TC en plantas previamente seleccionadas obtenidas del cruzamiento entre híbridos *L. tenuis* x *L. corniculatus*. Valores expresados en mg TC/g MS. Prueba de Duncan, dentro de cada bloque gris medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Grupo de plantas	TC solubles (media \pm d.e.)	TC insolubles (media \pm d.e.)	TC totales (media \pm d.e.)
Alto	3,45 \pm 2,55 b	6,81 \pm 3,16 b	10,25 \pm 2,30 c
Medio	1,24 \pm 1,31 a	2,70 \pm 1,31 a	3,93 \pm 1,89 b
Bajo	0,23 \pm 0,21 a	0,68 \pm 0,32 a	0,91 \pm 0,36 a

En las plantas obtenidas a partir de las semillas colectadas en colaboración con la empresa Gentos S.A. se observó una gran variabilidad en cuanto a la tinción de TC en hojas (Figura 3.24). La mayoría de las plantas (65%) presentaron un patrón de distribución foliar de TC similar al de *L. tenuis*, donde los TC se encontraban en el tejido adyacente a los haces vasculares. El resto de las plantas (35%) presentaron un patrón de tinción similar al de *L. corniculatus* con densidad de TC variable.

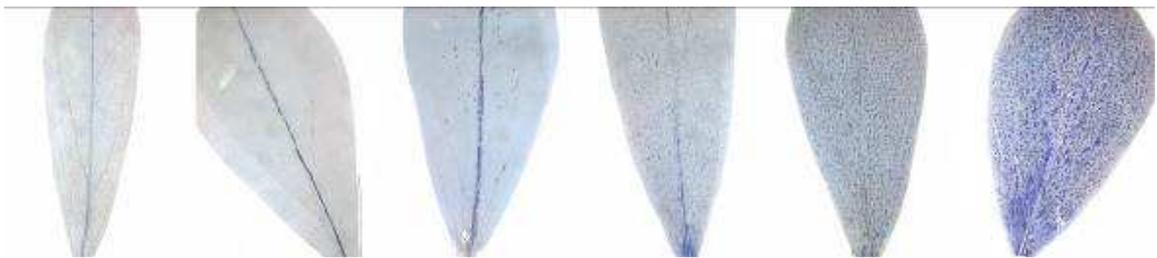


Figura 3.24. Tinción de TC en hojas de diferentes plantas obtenidas del cruzamiento entre híbridos *L. tenuis* x *L. corniculatus*.

En los dos grupos de plantas seleccionadas que presentaban tinción de TC contrastante, también se observaron diferencias en el contenido foliar de TC para la fracción soluble ($T=5,7$; $p=0,0003$), insoluble ($T=6,2$; $p=0,0002$) y total ($T=7,2$; $p < 0,0001$) (Tabla 3.16).

Tabla 3.16. Contenido foliar de TC en plantas previamente seleccionadas. El símbolo * indica diferencias significativas comparando entre los dos grupos de plantas ($p < 0,001$).

TC (mg/g de MS)	Plantas con alto contenido	Plantas con bajo contenido
Solubles	2,72 \pm 1,44	0,11 \pm 0,07 *
Insolubles	4,40 \pm 1,99	0,45 \pm 0,36 *
Totales	7,12 \pm 2,84	0,56 \pm 0,40 *

3.4.4. Retrocruzamientos.

También los retrocruzamientos de las plantas de los cuatro genotipos *L. tenuis* x *L. corniculatus* seleccionados con su parental *L. corniculatus* “charlii” resultaron exitosos, obteniéndose plántulas con alto porcentaje de viabilidad. El contenido foliar medio de TC en los genotipos obtenidos a partir de la retrocruza fue de $4,27 \pm 1,39$; $6,34 \pm 1,66$ y $10,62 \pm 2,58$ mg/g MS para la fracción soluble, insoluble y total respectivamente.

En relación a los genotipos *L. tenuis* x *L. corniculatus*, los contenidos foliares de TC en las plantas obtenidas a través de la retrocruza resultaron superiores ($F=15,1$; $p=0,0007$), pero menores a los observados en *L. corniculatus* “charlii” ($F=23,62$; $p=0,0001$).

3.5. Discusión.

Consideraciones sobre la población seleccionada de L. corniculatus

La población de *L. corniculatus* identificada en la Albufera de Valencia se destaca por diversas características que pueden ser de utilidad para su aprovechamiento como material forrajero. Una de ellas, y a diferencia de las plantas pertenecientes a cultivares comerciales de *L. corniculatus*, es que los individuos de esta población diploide son nativos de ambientes edáficos marginales y de baja aptitud agrícola.

Resulta importante destacar la similitud existente entre el ambiente donde naturalmente se encuentran las plantas de la población *L. corniculatus* “charlii” (ver apéndice 1) y los bajos salino-alcálicos de la Pampa Deprimida del Salado. Ambos ecosistemas presentan condiciones edáficas halo-hidromórficas, lo que limita el cultivo de la mayoría de las leguminosas forrajeras utilizadas en nuestro país (Mazzanti *et al.* 1988, Montes 1988, Rubio Delgado *et al.* 1998). Es menester recordar que más del 60% de los suelos de la pampa inundable corresponde con este tipo de condiciones edáficas, comúnmente constituidos por suelos natracuales asociados con natracualfes y natralboles (Soriano 1991). Una de las limitantes edáficas en esta clase de suelos, resulta su condición salina. En este sentido, la mayor supervivencia relativa bajo este tipo de estrés observada para la población “charlii”, resulta sobresaliente sugiriendo su potencial uso en dichos ambientes.

Cabe destacar que actualmente la mayoría de los programas de mejoramiento forrajero del género *Lotus* se realizan en parcelas agrícolas donde las condiciones no son limitantes para el crecimiento; ello genera cultivares con buenas características forrajeras en cuanto a porte, persistencia y productividad, pero dejando parcialmente de lado su adaptabilidad a diferentes ambientes con menor aptitud agrícola (Escaray *et al.* 2012). Es por ello que la incorporación de nuevo germoplasma como el de la población “charlii”, que amplían la base genética relacionada a la tolerancia a diferentes estreses, se traduce en la posibilidad de seleccionar mejores materiales para condiciones edáficas con menor aptitud agrícola.

Por otra parte, además de su mejor adaptabilidad en ambientes marginales, otra de las características remarcable de las plantas de la población “charlii”, constituye su capacidad de producir rizomas. En este sentido, es de destacar que la producción de de los mismos en las especies forrajeras del género *Lotus* resulta casi exclusiva de *L. uliginosus*, ya que las plantas de las diferentes poblaciones de *L. tenuis* y *L. corniculatus* disponibles no los producen (Kirkbride 1999, Valdés 2000, Vignolio y Fernández 2006).

Sin embargo, en trabajos previos se ha reportado la existencia de una población de *L. corniculatus*, nativa de Turquía, que presenta la capacidad de producir rizomas (Beuselinck y Steiner 1996, Li y Beuselinck 1996). Estos mismos autores resaltan la importancia de tales órganos en la mejora de la persistencia de las plantas de *Lotus* en las pasturas, motivo por el cual utilizaron esta población, con el objetivo de obtener cultivares mejorados. Actualmente, la obtención de cultivares rizomatosos de *Lotus* spp. constituye uno de los mayores objetivos de los mejoradores para incrementar la rentabilidad y productividad de estas especies (Papadopoulos y Kelman 1999, Beuselinck 2004, Beuselinck *et al.* 2005).

Por último, al igual que el resto de las poblaciones de *L. corniculatus*, las plantas de la población “charlii” presentaron la capacidad de acumular TC en sus hojas. Sin embargo, los niveles foliares de TC de las plantas pertenecientes a la población “charlii” resultaron comparables a los observados en plantas de *L. uliginosus*. En relación a ello y teniendo en cuenta que se ha reportado que mediante la utilización de *L. uliginosus* como forraje el consumo voluntario por parte de los animales se encuentra afectado debido a su elevado contenido de TC (Barry y Duncan 1984, Barry y Manley 1986, Lees *et al.* 1994), existía la probabilidad que la palatabilidad del forraje producido por las plantas de la población “charlii” se viera también afectada, lo que limitaría su posible utilización directa como forraje.

También es importante destacar que a pesar de que esta población fue confirmada taxonómicamente como *L. corniculatus* subsp. *corniculatus*, la misma presenta diferencias morfológicas con respecto a otras poblaciones de la misma subsp. (el nivel de ploidía, la capacidad de producir rizomas y el mayor contenido de TC). Ello destaca su particular interés botánico debido a que resulta factible suponer que podría tratarse de una subespecie o incluso hasta de una especie diferente. En este sentido, las características mencionadas que diferencian a esta población del resto de poblaciones de *L. corniculatus*, coinciden con características morfológicas típicas de *L. uliginosus*, en especial en lo referente a la formación de rizomas (Valdés 2000). Sin embargo, las plantas de esta última especie se caracterizan morfológicamente por presentar tallos fistulosos. A diferencia de ellas, las plantas de *L. corniculatus* “charlii” presentan tallos macizos. Adicionalmente, también se debe destacar que la morfología de las piezas florales resultó concluyente en la determinación taxonómica de esta población diploide, las cuales presentaron piezas florales morfológicamente similares a las descritas para la especie *L. corniculatus*.

Sumado a estas características morfológicas determinantes de la taxonomía, mediante el análisis filogenético a través de la secuencia de la región nrITS se determinó que los genotipos evaluados de la población “charlii” se correspondían con el grupo filogenético *Lotus corniculatus*, diferenciándose de las plantas de *L. uliginosus* (Figura 3.7). Mediante el mismo análisis también se pudo observar que los genotipos evaluados tampoco se encontraban muy cercanos al resto de las accesiones de *L. corniculatus* evaluadas.

La información obtenida no resulta concluyente en la determinación de un nuevo taxón, sin embargo resulta un objetivo sumamente interesante profundizar los análisis taxonómicos sobre las especies de este género vegetal.

Consideraciones sobre el éxito de la hibridización interespecífica.

No cabe duda de que la estrategia del cruzamiento interespecífico para el mejoramiento de las características forrajeras de *Lotus* spp. constituye una herramienta de suma utilidad como fuera sugerido (Kelman *et al.* 1997, Grant 1999, Kelman 2006a).

Sin embargo, el cruzamiento interespecífico entre *L. tenuis* y *L. corniculatus* no había sido previamente evaluado con éxito desde un punto de vista de interés agronómico. Posiblemente ello se deba a la dificultad de obtención de híbridos viables a partir de este cruzamiento interespecífico a causa del diferente nivel de ploidía entre estas especies (Löve y Löve 1961, Añón Suarez *et al.* 1967, Castroviejo 1982, Falistocco y Piccirilli 1989) (Grant 1999).

La viabilidad de las semillas resulta un punto importante en este tipo de cruzamiento, ya que mediante la utilización de diversas estrategias, solo a través de la técnica de rescate

embrionario se han podido obtener plantas viables de *L. tenuis* x *L. corniculatus* (Latour *et al.* 1978, Grant 1999). En este sentido, la utilización de una población diploide de *L. corniculatus* para su cruzamiento con *L. tenuis* fue decisiva para la obtención de plantas híbridas viables de manera simple. Estas características incrementan el potencial de aplicación agronómica de los híbridos obtenidos.

Algunos autores han sugerido que la viabilidad de los híbridos interespecíficos obtenidos resulta mayor cuando los genotipos utilizados como parentales se encuentran distanciados geográficamente (Grant 1999). En este sentido, la utilización de una población argentina de *L. tenuis* para su cruzamiento con una población de *L. corniculatus* proveniente de España, puede haber favorecido el éxito de la estrategia utilizada.

Consideraciones sobre la morfología del híbrido interespecífico obtenido.

Se pudo observar que las características de mayor interés desde el punto de vista tecnológico de ambos parentales se podían encontrar en la descendencia híbrida. Una de ellas resulta la capacidad de producir rizomas observada en los genotipos híbridos obtenidos (*L. tenuis* x *L. corniculatus*), lo cual diferencia notoriamente a estos materiales de su parental materno *L. tenuis*. Estos resultados se encontrarían en correspondencia con lo sugerido previamente en cuanto a que la expresión de rizomas en *L. corniculatus* se encuentra controlado por un único gen dominante (R) (Beuselinck *et al.* 1996). Sin embargo, el número y largo de los rizomas producidos es posible que se encuentren influenciados por la acción de genes aditivos (Beuselinck *et al.* 1996). Por ello, resulta de interés continuar con la evaluación cuantitativa de los mismos en el material híbrido obtenido para seleccionar aquellas plantas que presenten las mejores características.

Por otra parte, se pudo observar que a diferencia de sus parentales, los clones de los genotipos híbridos presentaron un porte más erecto y mayor longitud de tallos. En este sentido, se ha reportado que el tipo de hábito de crecimiento erecto es una de las características que mejora la habilidad competitiva de las plantas de *Lotus* frente a otras especies (Blumenthal y McGraw 1999).

A su vez, el porte erecto favorecería la biomasa accesible para el consumo animal cuando se encuentran en pasturas polifíticas. Considerando ello, las plantas de *L. tenuis* presentan un porte postrado (Miñón *et al.* 1990) por lo que gran parte de su biomasa queda cubierta por otras especies de la pastura, afectando su productividad.

Por último, se ha reportado que las plantas de *L. tenuis* presentan mayor tolerancia al anegamiento que las plantas de *L. corniculatus*; ello se debe a su mayor porcentaje de aerénquimas en raíces, su alta proporción de biomasa aérea por encima del nivel del agua y su mayor conductancia estomática (Striker *et al.* 2005a). También se ha descrito que cuando las inundaciones resultan profundas, los tallos de *L. tenuis* quedan sumergidos produciendo la muerte por anoxia de la planta. En este sentido, es posible que las plantas híbridas soporten inundaciones más profundas gracias a sus tallos de mayor longitud y su porte erecto, lo cual nos hemos propuesto estudiar a la brevedad posible.

El mismo hábito de crecimiento fue observado en las plantas obtenidas a partir del cruzamiento entre plantas *L. tenuis* x *L. corniculatus* (Figura 3.25), lo que permitiría la selección de genotipos que presenten las características de porte deseadas como objetivo tecnológico de mejora.



Figura 3.25. Plantas obtenidas del cruzamiento entre híbridos *L. tenuis* x *L. corniculatus* (primavera del 2011).

Independientemente de esta marcada diferencia en el porte de la planta, es interesante destacar que para otros parámetros morfológicos observados (área, densidad de tricomas y relación ancho/largo en las hojas de los clones de los genotipos híbridos) se determinaron valores intermedios entre sus parentales.

Uno de ellos, la densidad de tricomas, fue evaluado considerando que se ha demostrado previamente en *Arabidopsis thaliana*, que la regulación transcripcional de la densidad de tricomas se encuentra relacionada positivamente con la regulación de la expresión de los genes que determinan la biosíntesis de TC y antocianinas (Dubos *et al.* 2008). Sin embargo en el material vegetal evaluado en este trabajo se observó lo contrario, ya que las plantas de *L. corniculatus* con elevados contenidos de TC y antocianinas, presentaron la menor densidad de tricomas. Estos resultados estarían en acuerdo con lo que fuera reportado previamente por Gruber *et al.* (Gruber *et al.* 2008), quienes observaron que la densidad de tricomas no se encuentra relacionada con el contenido de TC en plantas de *Lotus* spp.

Por otra parte, la relación ancho/largo del folíolo central se ha utilizado como una de las características morfológicas para diferenciar *L. tenuis* de *L. corniculatus* (Valdés 2000), y los valores intermedios observados en las plantas híbridas confirmarían, entre otras características, su estatus híbrido.

Consideraciones sobre la tolerancia al estrés salino.

La tolerancia al estrés salino observada para los diferentes genotipos híbridos en relación a sus parentales. Cabe destacar que bajo tratamiento salino en los ensayos realizados no se observó un efecto diferente a la reducción del crecimiento dentro del período de 21 días en presencia de 150 mM de NaCl. Sin embargo, cuando los clones de genotipos híbridos, junto con los de sus parentales fueron sometidos a estrés durante más tiempo (unos 45 días bajo 150 mM de NaCl) no se observaron síntomas en ninguno de los clones de los genotipos

híbridos (Figura 3.26 C, D, E y F). Por el contrario, la toxicidad fue evidente en los clones de *L. tenuis* “Pampa INTA”, donde se observó la caída de hojas basales y la muerte del ápice principal (Figura 3.26 A). Por su parte las plantas de *L. corniculatus* “charlii” no presentaron síntomas causados por el estrés salino en sus hojas apicales, aunque se observó la caída prematura de hojas basales (Figura 3.26 B).

Como fuera mencionado, se ha sugerido que la acumulación de iones tóxicos en las hojas causan la muerte prematura de hojas más “viejas” (Munns y Tester 2008). Sin embargo, cabe destacar que en las plantas de *L. corniculatus* “charlii”, las “hojas viejas” no mostraban los síntomas típicos de toxicidad (clorosis marginal) antes de que se desprendan de la planta. Es probable que el proceso de eliminación gradual de las “hojas viejas” con altos contenidos de iones tóxicos, constituya un mecanismo de tolerancia por parte de la planta.



Figura 3.26. Plantas de *Lotus* spp. bajo tratamiento control y salino. **A.** *L. tenuis* “Pampa INTA”, **B.** *L. corniculatus* “charlii”, **C.** *L. tenuis* x *L. corniculatus* 1, **D.** *L. tenuis* x *L. corniculatus* 2, **E.** *L. tenuis* x *L. corniculatus* 3 y **F.** *L. tenuis* x *L. corniculatus* 4.

Estas consideraciones, junto a la integración del conjunto de parámetros determinados bajo tratamiento salino en relación al control, permite sugerir que los clones de los genotipos híbridos presentan mayor tolerancia al estrés salino que las plantas de *L. tenuis* “Pampa INTA”.

Uno de los parámetros que mejor explica la tolerancia al estrés salino en especies de *Lotus* lo constituye el contenido de cloruros en vástago. La concentración de este anión ha sido previamente correlacionada con la sobrevivencia de plantas de *Lotus* bajo estrés salino

(Teakle *et al.* 2010b, Sanchez *et al.* 2011) y se ha sugerido la posibilidad de incrementar la tolerancia a salinidad mediante la selección de genotipos que presenten una baja acumulación de cloruros (Rogers *et al.* 1997).

En este sentido, resultó interesante observar que los clones de *L. corniculatus* “charlii” presentaron la menor acumulación de cloruros en la fracción de “hojas viejas”. Por su parte, los clones de los genotipos híbridos también presentaron niveles menores de cloruros en la fracción de “hojas viejas” que los observados en los clones de *L. tenuis* “Pampa INTA”. Estas observaciones podrían explicar parcialmente las diferencias observadas en la tolerancia al estrés salino de los genotipos evaluados.

Otro de los parámetros medidos que resultó interesante para detectar diferencias en la tolerancia relativa al estrés salino, fueron aquellos relacionados a la actividad del fotosistema II. En particular para aquellos parámetros relacionados con la atenuación no fotoquímica (qN y NPQ), se observaron diferencias entre aquellas plantas relativamente más tolerantes con respecto a las de menor tolerancia relativa. En este sentido, cuando la planta se encuentra expuesta a luz intensa, es capaz de protegerse a sí misma incrementando la disipación de energía de la luz en forma de calor; esta disipación, es determinada a través de los parámetros de atenuación no fotoquímica (Baker 2008).

Se ha observado en *A. thaliana* (especie relativamente sensible al estrés salino) un marcado incremento en el NPQ cuando es expuesta a 150 mM de NaCl, y se atribuye parte de este aumento a la fotoinhibición causada por los iones tóxicos presentes en hojas (Stepien y Johnson 2009). Los mismos autores realizaron mediciones en la especie *Thellungiella halophila* (relativamente tolerante al estrés salino) y observaron que bajo las misma situación de estrés salino, el NPQ no se ve incrementado en relación al control.

Considerando ello, es posible que en los materiales evaluados que resultan relativamente más sensibles al estrés salino, exista un aumento de la fotoinhibición debida a los iones tóxicos, lo que se relaciona con el incremento del NPQ observado.

Consideraciones sobre la relación entre el estrés salino y los niveles de TC y antocianinas.

Como fuera mencionado en la introducción general, los TC y antocianinas han sido relacionados con diferentes estreses ambientales. Particularmente para los TC, se ha observado que el aumento de CO₂, la temperatura y la deficiencia hídrica (Anuraga *et al.* 1993, Carter *et al.* 1999), así como la intensidad de la luz (Paolucci *et al.* 2005) y la deficiencia nutricional (Barry y Duncan 1984, Kelman 2006b) afectan los niveles de TC en vástago de plantas de *Lotus* spp.

No obstante ello, en los materiales evaluados no pudo determinarse un efecto del estrés salino sobre los niveles de TC a nivel foliar. Por otra parte, si fue observada una disminución de los niveles de TC totales en tallos y raíces, lo cual resulta contrario a las determinaciones realizadas para raíces de la leguminosa *Prosopis strombulifera* donde se observó un marcado aumento del contenido de TC bajo estrés salino (Reinoso *et al.* 2004).

Se ha sugerido que los TC, al ser compuestos con propiedades antioxidantes (Hagerman *et al.* 1998) se encontrarían relacionados con los mecanismos de detoxificación de las especies reactivas del oxígeno y que ello se relacionaría con una mayor tolerancia al estrés salino (Reinoso *et al.* 2004). Sin embargo, para los materiales evaluados en la presente tesis, junto con la evaluación de otras especies del género (datos no mostrados) resulta difícil sugerir que los TC se encuentran relacionados con los mecanismos de tolerancia al estrés salino, al menos bajo las condiciones ensayadas.

Por otra parte, se ha observado que los niveles de antocianinas también se encuentran afectados por diferentes estreses ambientales como el incremento de luz UV, la deficiencia de nitrógeno y fósforo, el ataque de patógenos y la exposición a bajo valores de pH (Dixon y Paiva 1995, Chalker-Scott 1999, Keller 2003). Nuevamente, es posible suponer una posible relación de estos compuestos con la tolerancia al estrés debida a su capacidad antioxidante y a la detoxificación de las especies reactivas del oxígeno causadas por el mismo (Chalker-Scott 1999, Warren y Mackenzie 2001).

Pudimos determinar que el estrés salino causó un marcado incremento en los niveles de antocianinas en tallo. Cabe destacar que estos resultados fueron consistentes con respecto a otras especies del género evaluadas (*L. japonicus*, *L. filicaulis*, *L. burtii* y *L. creticus*), en donde se pudo observar la misma tendencia (datos no mostrados). Pese a ello, hasta el momento no ha sido posible determinar una correlación entre los niveles endógenos de estos compuestos y la tolerancia al estrés salino en plantas de *Lotus* spp.

Consideraciones sobre la calidad forrajera de los híbridos interespecíficos.

La calidad del forraje producido por los clones de los genotipos híbridos resultó superior al de los clones de *L. corniculatus* “charlii” y similar al de los clones de *L. tenuis* “Pampa INTA”. En este sentido, los genotipos híbridos presentaron alrededor de un 80% de digestibilidad de la MS y alrededor de 21,5% de proteína bruta, lo que se corresponde con contenidos que resultan similares a los reportados para *L. tenuis* (Montes 1988, Acuña 1998, Blumenthal y McGraw 1999).

Por otra parte, los beneficios derivados de utilizar leguminosas forrajeras que presenten contenidos adecuados de TC para la alimentación animal han sido detalladamente explicados en el capítulo 1. En relación a ello, cabe recordar que se ha determinado que *L. tenuis* presenta niveles foliares de estos compuestos considerados subóptimos. Si bien la ocurrencia de meteorismo agudo en animales que consumen *L. tenuis* no ha sido reportada, es de suponer que en determinadas situaciones se den casos de meteorismo subclínico, afectando el consumo y por lo tanto la ganancia de peso de los animales.

Debido a ello, es posible que una de las mejoras más importante observada en los genotipos híbridos sea su moderado contenido foliar de TC. En este sentido, los genotipos *L. tenuis* x *L. corniculatus* presentaron un contenido medio de 5,7 mg TC totales/g MS, el cual se encuentra muy cercano a los niveles considerados como “óptimos” (alrededor de 5 mg/g MS) para las leguminosas forrajeras (Li *et al.* 1996).

Además de la capacidad de impedir el empaste, un contenido adecuado de TC mejora la eficiencia de utilización de las proteínas provenientes de leguminosas por parte de los rumiantes (Barry y Manley 1986, Waghorn *et al.* 1987, Aerts *et al.* 1999b, Barry y McNabb 1999, Cassida *et al.* 2000).

Sin embargo, mediante la digestión a distintos tiempos del vástago de los diferentes genotipos evaluados, no fue posible observar diferencias en la cinética de digestibilidad de las proteínas a pesar de que los mismos presentaron niveles diferenciales de TC. En este sentido, hay que tener en consideración que el análisis se realizó a través de la digestión *in-vitro*, y es probable que ello influya en los resultados obtenidos. Por ello, resulta interesante continuar el estudio mediante un análisis *in-vivo* de estos materiales para una mejor evaluación de los mismos.

Consideraciones sobre la segregación de los TC y su aplicación en la mejora vegetal.

Pudimos observar que el contenido foliar de TC en los clones de los genotipos *L. tenuis* x *L. corniculatus* seleccionados, no resultó intermedio a los niveles de TC de ambos parentales (Tabla 3.4). Dicha posibilidad, sólo resultaría cierta si los genes que controlan la acumulación de TC a nivel foliar fueran simples y con dominancia completa, como se había propuesto originalmente (Ross y Jones 1983, Dalrymple *et al.* 1984). Sin embargo, con posterioridad otros autores han sugerido que los TC se encuentran controlados por efectos genéticos aditivos y presentan una herencia del tipo cuantitativa (Miller y Ehlke 1997). Este nuevo postulado explicaría la razón por la cual en las plantas híbridas obtenidas se observó un contenido inferior al intermedio entre ambos parentales.

No obstante ello, todas las plantas *L. tenuis* x *L. corniculatus* obtenidas presentaron un patrón de tinción de TC similar al de las plantas de *L. corniculatus* “charlii” (parental paterno) y diferente al de *L. tenuis* (parental materno), situación que se correspondería con la alta heredabilidad reportada para los genes involucrados en su acumulación (Dalrymple *et al.* 1984, Miller y Ehlke 1996, Kelman *et al.* 1997).

Es menester también tener en cuenta la elevada variabilidad en el contenido de TC que se observó en las plantas obtenidas del cruzamiento entre los genotipos híbridos, lo cual resulta coherente con una herencia del tipo cuantitativa para este carácter, para la cual se ha reportado incluso la existencia de efectos de epistasis aditiva para los genes que controlan la acumulación de éstos metabolitos secundarios (Miller y Ehlke 1997). En estas plantas se observó un contenido promedio de TC levemente inferior al de sus parentales híbridos.

Asimismo, sobre el material segregante, se han podido seleccionar grupos de plantas que presentaban marcadas diferencias en el contenido foliar de TC (Tabla 3.16). En este sentido, es probable que en una nueva generación obtenida mediante el cruzamiento libre entre híbridos interespecíficos, su contenido de TC medio tendiera a reducirse. También se puede suponer que mediante la selección recurrente, sería posible la obtención de una población que posea contenidos adecuados de TC.

Otra posibilidad de mejora tecnológica se podría realizar mediante retrocruzas con el parental *L. corniculatus* “charlii”, ya que, como pudo ser observado en nuestro laboratorio, la población obtenida de estos cruzamientos presentó un contenido foliar de TC superior al de sus parentales.

En la Figura 3.27 se pueden observar los contenidos foliares de TC en los distintos materiales obtenidos a través de este procedimiento y de que manera los diferentes cruzamientos afectan este carácter en la población segregante.

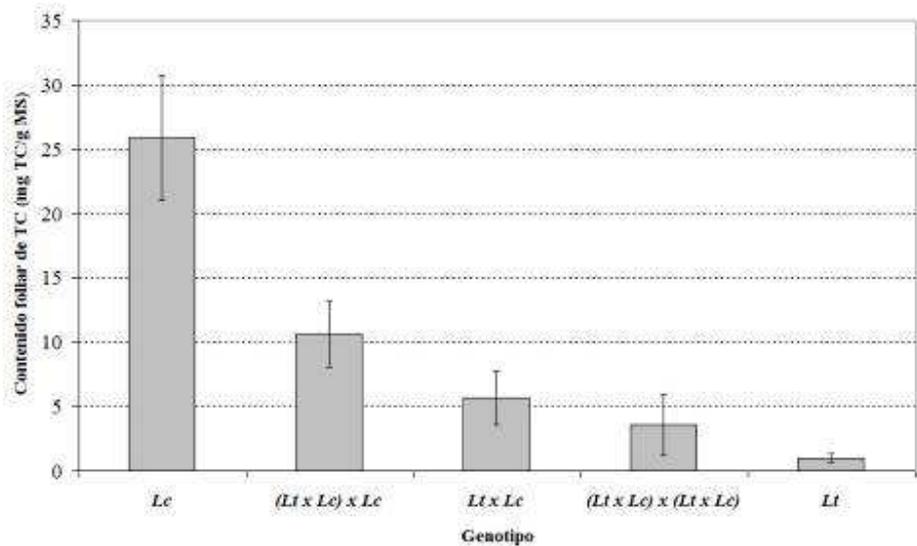


Figura 3.27. Contenido foliar de TC en *Lotus* spp. Lc: *L. corniculatus* “charlii”; Lt: *L. tenuis*; Lt x Lc: plantas híbridas; (Lt x Lc) x Lc: retrocruza de las plantas híbridas con *L. corniculatus* “charlii” y (Lt x Lc) x (Lt x Lc): cruzamientos entre plantas híbridas.

Para finalizar, cabe considerar que los materiales obtenidos representan un sistema novedoso para continuar con el estudio de la segregación de este carácter. En este sentido mediante la evaluación del contenido foliar de TC en generaciones posteriores, junto con la selección y cruzamiento de aquellos individuos contrastantes en este carácter, se podría concluir con mayor precisión respecto al tipo de herencia que presentan estos compuestos.

3.6. Conclusiones.

- Las plantas de *L. corniculatus* provenientes de la Albufera de Valencia constituyen un material vegetal que se destaca para su utilización en programas de mejoramiento orientado al incremento de las características forrajeras y adaptabilidad a condiciones de menor aptitud agrícola en el género.
- El cruzamiento interespecífico entre *L. tenuis* y *L. corniculatus* constituye un método eficaz para la mejora de las características forrajeras en el género.
- La mayor tolerancia al estrés salino de las plantas híbridas supone un elevado potencial de utilización en ambientes afectados por condiciones edáficas salinas.

Capítulo 4. Regulación genética de la biosíntesis de taninos condensados en *Lotus* spp.

4.1. Introducción.

4.1.1. Especies utilizadas para el estudio de la regulación de la biosíntesis de taninos condensados.

La vía metabólica de flavonoides, de la cual derivan los TC, es una de las más estudiadas del metabolismo secundario de las plantas. El estudio de esta vía metabólica se ha visto favorecido en las plantas por la disponibilidad de mutantes de *Arabidopsis thaliana* L. que presentan alteraciones en su biosíntesis (los mutantes TT, del inglés *transparent testa*) (Koornneef 1990, Shirley *et al.* 1995). Esta especie ha sido ampliamente utilizada como modelo de estudio de la biosíntesis de TC hasta hace pocos años (Lepiniec *et al.* 2006). Sin embargo, presenta dos inconvenientes que la convierten en un modelo incompleto para el estudio de la biosíntesis de estos compuestos: a) únicamente sintetiza y acumula TC en la testa de la semilla (Debeaujon *et al.* 2003) y b) solo acumula TC basados en unidades iniciadoras de epicatequina ya que carece de un homólogo del precursor de LAR (Abrahams *et al.* 2003, Tanner *et al.* 2003) (Figura 4.1).

Por otra parte, la inducción de la biosíntesis y acumulación de TC en *Medicago sativa* (alfalfa) es uno de los principales objetivos para la mejora forrajera de esta especie. Debido a ello, la especie modelo *M. truncatula* ha comenzado a utilizarse frecuentemente para el estudio de estos metabolitos (Goplen *et al.* 1980, Xie *et al.* 2003, Dixon *et al.* 2005, Pang *et al.* 2007, Pang *et al.* 2008, Pang *et al.* 2009, Peel *et al.* 2009, Zhao y Dixon 2009), aunque al igual que *A. thaliana*, las plantas de *M. truncatula* solo acumulan TC en la testa de la semilla (Pang *et al.* 2007).

También existen estudios de la regulación genética de la acumulación de TC realizados con plantas del género *Lotus*, particularmente en la especie modelo *L. japonicus* (Marles *et al.* 2003, Yoshida *et al.* 2008, Yoshida *et al.* 2010). A diferencia de las otras dos especies mencionadas anteriormente, las plantas de *L. japonicus* presentan cierta acumulación de TC en vástago. Sin embargo, los niveles de TC en esta especie son bajos y solo se acumulan en tejidos adyacentes a los haces vasculares, tal como ocurre en plantas de *L. tenuis*.

Considerando que las especies modelo (sobre las cuales se realiza un análisis más exhaustivo de sus secuencias genómicas) constituyen un sistema incompleto para el estudio de los TC, algunos investigadores han sugerido la utilización de plantas de la especie *L. corniculatus* para el estudio de los mismos (Morris *et al.* 1993, Damiani *et al.* 1999, Paolucci *et al.* 2005, Paolucci *et al.* 2007). Esta especie no solo presenta la capacidad de acumular TC en sus hojas, sino que en la biosíntesis de los mismos se encuentran presente, en igual importancia, la vía de biosíntesis de las epicatequinas y la vía de biosíntesis de las catequinas (Figura 4.1). Estas dos últimas consideraciones permiten suponer que la especie *L. corniculatus* constituye un modelo más completo para el estudio del control genético de la biosíntesis de TC (Paolucci *et al.* 1999).

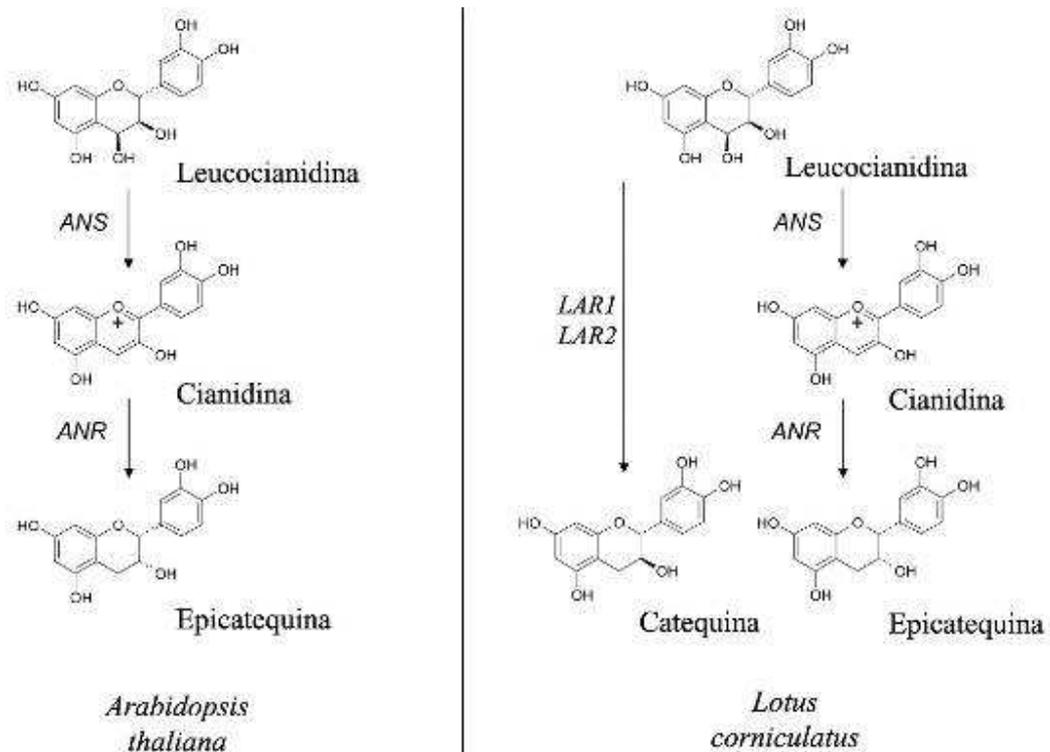


Figura 4.1. Biosíntesis de las unidades iniciadoras de los TC (catequina y epicatequina) a partir de leucocianidina en *A. thaliana* y *L. corniculatus* (adaptado de Paolucci *et al.*, 2007).

4.1.2. Regulación genética de la biosíntesis de taninos condensados.

Se ha observado que la expresión del gen *ANR* en plantas de *A. thaliana* se encuentra estrictamente limitada a las células que acumulan TC durante el desarrollo de la testa de la semilla (Debeaujon *et al.* 2003). Este gen codifica para la enzima antocianidina reductasa, la cual cumple un rol central en la biosíntesis de TC y su actividad se relaciona directamente con los niveles de TC encontrados no sólo en *A. thaliana*, sino también en *M. truncatula* (Xie *et al.* 2003).

Mediante el estudio de las mutantes TT de *A. thaliana* se determinó que el gen *ANR* se encuentra regulado por tres factores de transcripción codificados por: *TT2*, *TT8* y *TTG1* (Nesi *et al.* 2000, Nesi *et al.* 2001, Debeaujon *et al.* 2003). El gen *TT2* codifica para una proteína con motivo R2R3-MYB (Nesi *et al.* 2001), mientras que *TT8* codifica para una proteína con motivo beta hélice-giro-hélice (bHLH), la cual ha sido identificada como un gen ortólogo al gen *R* de maíz (Nesi *et al.* 2000). Por último, *TTG1* codifica para una proteína en la cual se repite cuatro veces el motivo WD40 (Walker y Davison 1999). Se ha determinado que estas proteínas, codificadas por los genes *TT2*, *TT8* y *TTG1*, forman un complejo ternario el cual regula directamente la expresión de *ANR* y los niveles de TC en la planta (Baudry *et al.* 2004, Lepiniec *et al.* 2006). Un esquema de este complejo puede ser observado en la Figura 4.2.

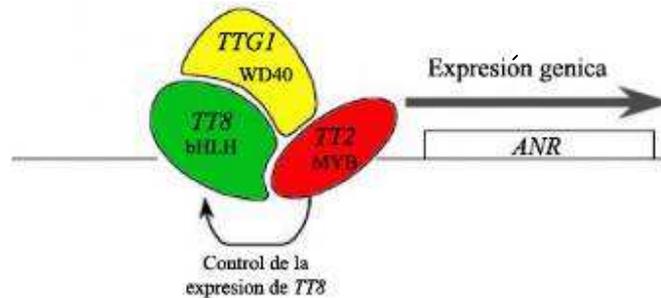


Figura 4.2. Modelo esquemático de la estructura y regulación del complejo que activa la transcripción de los genes relacionados a la biosíntesis de TC.

En este complejo ternario, una secuencia específica de ADN es reconocida por el motivo MYB de la proteína codificada por el gen *TT2* al igual que el motivo bHLH de la proteína codificada por *TT8*. Si bien el complejo MYB/bHLH por sí solo puede activar la expresión de *ANR*, se ha sugerido que la proteína con motivos WD40 (codificado por *TTGI*) participa promoviendo la activación del complejo MYB/bHLH y en la unión del mismo al promotor de *ANR*. Sin embargo, su función aún no ha sido definida completamente (Baudry *et al.* 2004).

Si bien se conoce el papel que juegan estos factores de transcripción en la biosíntesis de TC, se ha descrito que tanto las proteínas codificadas por *TT8* y por *TTGI* participan también en la regulación de distintos procesos del desarrollo de la planta, como la formación de tricomas, de raíces y de mucílago en la testa de la semilla (Schiefelbein 2003, Zhang *et al.* 2003, Broun 2005, Yoshida *et al.* 2008).

Sobre esta base se ha propuesto que el factor de transcripción codificado por el gen *TT2* sería el principal responsable de la acumulación de TC en plantas. En relación a ello, se ha observado que la ausencia del gen *TT2* en plantas de *A. thaliana* no afecta la expresión de los genes *CHS*, *CHI*, *F3H* y *F3'H* (considerados “genes tempranos”). Sin embargo, esto sí determina que la expresión de *ANR* se vea fuertemente disminuida, al igual que la de los genes *DFR*, *ANS* y *MATE* (Nesi *et al.* 2001). Los mismos autores observaron que la expresión de *TT2* induce la expresión de *TT8* en raíces de *A. thaliana* y que la inducción de los “genes tardíos” (aquellos genes que se encuentran involucrados directamente en la biosíntesis de TC) no ocurre cuando la expresión de *TT2* es normal pero se encuentra ausente el gen *TT8*.

Por otra parte, en los estudios realizados sobre la especie modelo *L. japonicus* se han determinado tres genes homólogos a *TT2* de *A. thaliana*. Tales genes han sido denominados *LjTT2a*, *LjTT2b* y *LjTT2c* y codifican para proteínas con motivos conservados R2R3-MYB, las cuales presentan propiedades de interacción con proteínas que presentan motivos bHLH y WD40 (Yoshida *et al.* 2008). A su vez, se ha observado que en esta especie, de manera similar a lo que ocurre en *A. thaliana*, la biosíntesis de TC se encuentra controlada por un complejo ternario formado por alguna de las proteínas codificadas por *LjTT2*, junto a las proteínas codificadas por *LjTT8* (con motivo bHLH, gen homólogo a *TT8* de *A. thaliana*) y proteínas codificadas por *LjTTG1* (con motivos WDR, gen homólogo a *TTGI* de *A. thaliana*). La inducción de la expresión de los genes *LjTT2* regula positivamente la expresión de *LjANR*. Sin embargo, se ha determinado que la regulación positiva es mucho mayor mediante la expresión conjunta de *LjTT2*, *LjTT8* y *LjTTG1* (Yoshida *et al.* 2010). A su vez, si bien los tres genes *LjTT2* regulan la biosíntesis de TC, se ha determinado que el

gen *LjTT2a* presenta la mayor actividad regulatoria de la expresión de *LjANR* (Yoshida *et al.* 2010). Por último, se ha demostrado que la expresión ectópica de los tres genes *LjTT2* en plantas de *A. thaliana* provoca una inducción de la expresión de los genes *DFR*, *ANS* y *ANR* y que, a su vez, la expresión de *LjTT2a* incrementa la acumulación de TC en plántulas de *A. thaliana* (Yoshida *et al.* 2010).

Por otra parte, existen reportes sobre la modulación negativa de la biosíntesis de flavonoides por parte de proteínas con motivos R2R3 y R3MYBs (Aharoni *et al.* 2001, Dubos *et al.* 2008, Matsui *et al.* 2008). En este sentido, la expresión ectópica en plantas de tabaco del gen *FaMYB1* (que codifica para una proteína R2R3-MYB) causó una disminución del contenido de antocianinas debido a su interacción con la proteína con motivo bHLH perteneciente al complejo que regula la expresión de los genes relacionados a la biosíntesis de antocianinas (Aharoni *et al.* 2001). De la misma manera, la expresión ectópica de este mismo gen en plantas de *L. corniculatus* tuvo un efecto represor sobre la expresión de los genes que regulan ambas vías de biosíntesis de TC (catequinas y epicatequinas). Los autores sugirieron que su efecto podría estar dado por la competencia entre las proteínas codificadas por los genes *FaMYB1* y *LcTT2* por el mismo sitio de unión en el complejo R2R3MYB-bHLH-WDR, o bien por la represión transcripcional del gen *TT8* (Paolucci *et al.* 2011).

Con excepción de los trabajos realizados en plantas transgénicas de *L. corniculatus*, la mayoría de los estudios sobre la expresión de los genes que regulan la biosíntesis de TC fueron realizados en plantas que no acumulan niveles significativos de TC a nivel foliar (*L. japonicus*, *M. truncatula*, *A. thaliana* y *Zea mays*). Es por ello que resulta interesante el estudio de la expresión endógena de los factores de transcripción y de los genes relacionados a la biosíntesis de TC en especies que naturalmente presentan diferentes contenidos foliares de los mismos. En este sentido, el estudio de la expresión de estos genes en los materiales obtenidos durante el desarrollo de la presente tesis constituye una alternativa de gran interés. Considerando ello, nos propusimos el objetivo de incrementar la información disponible en el género *Lotus* sobre la regulación de la expresión de los genes relacionados a la biosíntesis de TC y evaluar su correlación con los niveles de TC.

4.2. Hipótesis.

El contenido foliar de TC en plantas de *Lotus* spp. se encuentra regulado por los niveles de expresión de los factores de transcripción codificados por *TT2* y *TT8*, así como de los genes *PAL*, *DFR*, *CHS*, *ANS*, *ANR*, *LARI*, *LAR2* y *MATE*.

4.3. Materiales y métodos.

4.3.1. Material vegetal.

Se utilizaron clones de los genotipos obtenidos durante el desarrollo de las actividades del capítulo 3 (*L. tenuis* “Pampa INTA”, *L. corniculatus* “charlii” y los 4 genotipos *L. tenuis* x *L. corniculatus*). A su vez, se utilizaron ocho plantas obtenidas del cruzamiento entre híbridos que fueron seleccionadas en función de su contenido de TC.

4.3.2. Propagación y cultivo de plantas.

Todos los materiales fueron propagados en forma vegetativa por clonación mediante estacas (Mujica y Rumi 1999). Las estacas fueron plantadas en macetas de 150 cm³ conteniendo arena/vermiculita (1/1), irrigadas con solución Hoagland 0,5X y cultivadas en cámara de cultivo durante 30 días. Las condiciones de la cámara de cultivo fueron similares a las descritas en la sección 2.3.1.2.

4.3.3. Extracción de ARN y síntesis de ADNc.

Se recolectó la totalidad de hojas y tallos de cada clon en forma separada y se congelaron dichas muestras en N₂ líquido en forma previa a su almacenamiento a -80°C. Posteriormente las muestras fueron molidas en mortero mediante la utilización de N₂ líquido, sobre las cuales se realizó la extracción de ARN mediante la utilización del kit de extracción “*Total RNA Plant Isolation kit*” (Sigma) siguiendo las instrucciones sugeridas por los fabricantes. La integridad del ARN se evaluó por electroforesis en gel de agarosa (1%) en tampón TAE 1X, con 8 µl de BrEt/100 ml, durante 30 minutos a 10 V/cm. Se sembraron en el gel 5 µl del ARN total mezclados con 3 µl de tampón de carga. Las bandas correspondientes a los ARNr se visualizaron mediante un transiluminador de luz UV y la presencia de bandas discretas permitió determinar la integridad del ARN extraído (Figura 4.3).

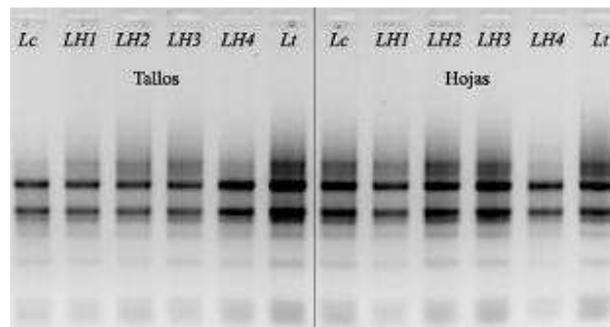


Figura 4.3. Visualización bajo luz UV de una de las repeticiones de las muestras de ARN obtenidas a partir de hojas y tallos de clones de los diferentes genotipos. Se pueden observar las bandas discretas correspondientes al ARN ribosomal (gel de agarosa 1% en buffer TAE 1X, 10V/cm).

Luego de la extracción de ARN se realizó el tratamiento de las muestras con una enzima degradadora de ADN con el fin de eliminar una posible contaminación con material genómico. Para ello, se tomó una alícuota del ARN total y se trató con la enzima Dnase I (Ambion) de acuerdo al protocolo reportado por el fabricante. Posteriormente se corroboró la ausencia de contaminación mediante la amplificación de la región nrITS de la misma manera mencionada anteriormente en la sección 3.3.1.4. La ausencia de amplificado en las muestras indicaron que el ARN se encontraba libre de contaminaciones con ADN genómico. A continuación se llevó a cabo la evaluación y cuantificación espectrofotométrica del ARN tratado, para lo cual se realizó una dilución de 5 µl de la muestra en 1 ml de agua y se midió la absorbancia a 260 y 280 nm. Solo se utilizaron las muestras que presentaron una relación de absorbancia 260 nm/280 nm comprendida entre 2 y 2,2. Para la cuantificación se utilizó el valor obtenido a una absorbancia de 260 nm

considerando que, a esta longitud de onda, una unidad de absorbancia corresponden a 40 mg de ARN/ml.

Para la síntesis de ADNc se utilizó una alícuota de las muestras anteriores conteniendo 3 µg del ARN tratado. La reacción de transcripción reversa fue realizada por el método de cebado al azar (*random priming*) utilizando la enzima “SuperScript III H-Reverse Transcriptase” (Invitrogen) y 100 pmol de hexámeros (Pharmacia Biotech) siguiendo las recomendaciones del fabricante. De esta manera se obtuvo el ADNc disuelto en un volumen final de 40 µl, el cual fue almacenado a -20°C hasta su utilización.

4.3.4. Clonación de genes.

4.3.4.1. Diseño de cebadores y amplificación específica de los genes.

Para el diseño de cebadores degenerados se identificaron las secuencias nucleotídicas de los genes de interés presentes en las especies *A. thaliana*, *M. truncatula*, *L. japonicus* y *L. corniculatus*, tal como fueron reportadas por el banco de genes del *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Posteriormente, las secuencias correspondientes a cada gen fueron alineadas mediante la utilización del programa BioEdit versión 5.0.6 (Hall 1999), a partir de lo cual se detectaron las regiones conservadas y se diseñaron cebadores sobre la base de las mismas mediante la utilización del programa “OligoExpress” (Applied Biosystems). Los cebadores diseñados fueron utilizados para la amplificación de los genes correspondientes utilizando como molde el ADN genómico y ADNc extraído de los clones de *L. corniculatus* “charlii”, *L. tenuis* “Pampa INTA” y *L. tenuis* x *L. corniculatus*. Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCRs) se realizaron de manera similar a la descrita en la sección 3.3.1.4 con la diferencia de que para cada par de cebadores se adecuó el programa utilizado por el termociclador en función de las características de los mismos y de la longitud de la secuencia del amplicón. El producto de amplificación obtenido fue directamente, o indirectamente a través de transformación bacteriana, utilizado para su secuenciación.

4.3.4.2 Preparación de células competentes y transformación bacteriana.

Para la transformación de los productos de amplificación de interés, las células bacterianas competentes fueron preparadas según el método descrito por Inoue *et al.* (1990), el cual permite obtener células con una eficiencia de transformación de 1 a 3 x 10⁹ UFC µg⁻¹ de ADN plasmídico. Para ello, se tomaron células de *Escherichia coli* XL-1 Blue, almacenadas a -80°C y se realizó una siembra por agotamiento en placas de Petri con medio LB-agar (10 g triptona, 5 g extracto levadura, 5 g NaCl, 1 ml NaOH 1 N, 15 g agar, agua destilada hasta 1000 ml) suplementadas con tetraciclina a una concentración final de 12 µg ml⁻¹, las cuales fueron incubadas durante toda la noche a 37°C. Luego se inocularon 6 colonias en 100 ml de medio SOB (triptona 20 g, extracto de levadura 5 g, NaCl 0,5 g, KCl 250 mM 10 ml, MgCl₂ 2M 5 ml, agua destilada hasta 1000 ml, pH final 7,0) y se incubó este cultivo a 18°C con agitación vigorosa hasta alcanzar una densidad óptica de 0,6 (a una longitud de onda de 600 nm). La suspensión celular obtenida se incubó a 4°C durante 10 min y se centrifugó a 2500 rpm por 10 min a 4°C. El precipitado formado se resuspendió en 32 ml de una solución TB (Pipes 10 mM, MnCl₂ 55 mM, CaCl₂ 15 mM, KCl 250 mM) pre-enfriada y se incubó a 4°C durante 10 min. Posteriormente se centrifugó

la muestra a 2500 rpm durante 10 min a 4°C y el precipitado obtenido se resuspendió en 8 ml de solución TB, a la cual se adicionó DMSO hasta una concentración final de 7% (v/v). Se incubó la muestra a 4°C durante 10 min y la suspensión celular se dividió en alícuotas de 200 µl, las cuales se congelaron en N₂ líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

La clonación y transformación bacteriana de los fragmentos amplificados se realizó mediante el sistema T&A Cloning Vector Kit (Real Biotech Corporation) siguiendo las instrucciones provistas por el fabricante. La mezcla de reacción se componía de 2 µl del vector de clonación (25 ng/µl), 1 µl de T4 ADN ligasa (3U/µl), 1 µl de tampón A de ADN ligasa, 1 µl de tampón B de ADN ligasa, el producto de PCR y agua miliQ hasta completar los 10 µl. Luego de incubar esta mezcla durante toda la noche a 4°C fue adicionada a un tubo con 200 µl de células competentes y se incubó en hielo por 30 min. Posteriormente se procedió a aplicar un choque térmico a las muestras, de 45°C por 45 segundos, seguido de una inmediata incubación en hielo por 5 min. Posteriormente, se añadieron 750 µl de medio de cultivo LB y 75 µl de glucosa 2 M. Se incubó la muestra a 37°C en agitación por 1 hora, luego de lo cual fue centrifugada a 3000 rpm por 10 min para acumular las células en el fondo del tubo. Las células se resuspendieron en 50 µl de medio de cultivo líquido y fueron plaqueadas en placas de Petri conteniendo medio de cultivo LB agar suplementado con ampicilina (concentración final de 50 µg ml⁻¹) más 100 µl de IPTG 100 mM y 20 µl de X-gal (50 mg ml⁻¹). Las colonias transformadas se seleccionaron por el método blanco/azul (*blue/white*). Se extrajo ADN plasmídico de las colonias seleccionadas y se secuenció el fragmento de amplificación presente en los mismos utilizando cebadores específicos del vector (M13 y T7).

4.3.4.3. Secuenciación y diseño de cebadores específicos.

El producto de amplificación ya sea directo o proveniente de bacterias transformadas fue purificado mediante el método etanol/EDTA/acetato de sodio en placas de 96 pocillos. El mismo se realizó agregando a cada producto de PCR 1 µl de acetato de sodio 3M y 25 µl de etanol 100% (v/v); posteriormente se agitó suavemente invirtiendo la placa 4 veces y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se centrifugó durante 45 minutos a 1650 rpm, inmediatamente después se invirtió la placa y se centrifugó a 185 rpm durante 1 minuto para luego descartar el sobrenadante. Con posterioridad se agregaron 35 µl de etanol 70% (v/v) a cada pocillo y nuevamente se centrifugó a 1650 rpm durante 15 minutos y luego de invertir a 185 rpm durante 1 minuto para descartar el sobrenadante.

A continuación las muestras se resuspendieron en la solución tampón para su posterior inyección en el analizador de secuencias nucleotídicas provisto por el kit “BigDye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit” y fueron inyectadas en un analizador ABI Prism 3100 (Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas fueron alineadas utilizando el programa BioEdit versión 5.0.3. La secuencia nucleotídica y el alineamiento entre las poblaciones “charlii” de *L. corniculatus* y “Pampa INTA” de *L. tenuis* para los genes *FeTT2*, *FebHLH*, *FePAL*, *FeDFR*, *FeCHS*, *FeANS*, *FeANR*, *FeLARI* y *FeLAR2* pueden observarse en el Apéndice 3.

En ellas se detectaron las regiones conservadas, a partir de las cuales se diseñaron cebadores específicos utilizando el programa OligoExpress (Applied Biosystems) para su utilización en la cuantificación relativa a tiempo real. La secuencia de los mismos puede observarse en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Cebadores específicos utilizados para la cuantificación relativa a tiempo real de la expresión de los genes que regulan la biosíntesis de TC en *Lotus* spp.

Nombre		Secuencia			
<i>Fe1aEF</i>	Forward	5'	TGACAAGCGTGTGATCGAGAGG	3'	
<i>Fe1aEF</i>	Reverse	5'	GATACCTCTTTCACGCTCAGCCTT	3'	
<i>FeTT2</i>	Forward	5'	GCAGGTTTGAAGCGTTGTGG	3'	
<i>FeTT2</i>	Reverse	5'	TGATATATTGCCTCTCTTGATACCTGG	3'	
<i>FeTT2 a-c</i>	Forward	5'	CAGGTTTGAAGCGTTGTGGG	3'	
<i>FeTT2 a-c</i>	Reverse	5'	ATTGCCTCTCTTGATACCTGGTTT	3'	
<i>FeTT2 b</i>	Forward	5'	CAGGTTTGAAGCGTTGTGGC	3'	
<i>FeTT2 b</i>	Reverse	5'	ATTGCCTCTCTTGATACCTGGTCTT	3'	
<i>FebHLH</i>	Forward	5'	CAGAGGATCTCTCAGATTCAGAGTGG	3'	
<i>FebHLH</i>	Reverse	5'	CCAGGCAAACCTTTGGTTGGG	3'	
<i>FePAL</i>	Forward	5'	GGCACCCCAATTGGTGTIT	3'	
<i>FePAL</i>	Reverse	5'	CGGTGAACTGAGCAAACATGAG	3'	
<i>FeCHS</i>	Forward	5'	CAATTTTTTGGATTGCACACCC	3'	
<i>FeCHS</i>	Reverse	5'	GAATAGGACACATGCACCTTGACATG	3'	
<i>FeDFR</i>	Forward	5'	GTCCACTTGGATGATCTTTGTCTTG	3'	
<i>FeDFR</i>	Reverse	5'	AATGTCATGGATAGTAGCCTCAGATG	3'	
<i>FeANS</i>	Forward	5'	GGAAGTTACCAGCGACTATGCAA	3'	
<i>FeANS</i>	Reverse	5'	CCTTCCTTCTTCGAGACCCAA	3'	
<i>FeANR</i>	Forward	5'	CCAACCTCGCTACACCTGTGAATTT	3'	
<i>FeANR</i>	Reverse	5'	TGACCCGTTTAACTTTCGCC	3'	
<i>FeLAR1</i>	Forward	5'	GCTAAATCATTCATGGTGTATAAACGA	3'	
<i>FeLAR1</i>	Reverse	5'	ACCTACGAGTGAAATGACAACGTCTAT	3'	
<i>FeLAR2</i>	Forward	5'	CCTTCAGAATTTGGGCACGAT	3'	
<i>FeLAR2</i>	Reverse	5'	TTCGAACAGATGTAGGTGTATGGGA	3'	
<i>FeMATE</i>	Forward	5'	CCCTTACTCTCAGCTTCTCTTGG	3'	
<i>FeMATE</i>	Reverse	5'	GAGCTTGAAATAAGGCCAAATTCC	3'	

4.3.4. Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real.

Las muestras de ADNc obtenidas fueron diluidas con agua miliQ en una relación 1:10 y utilizadas para la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-qPCR) mediante la utilización de un equipo ABI Prism 7300 SDS (Applied Biosystems). En cada reacción se utilizaron 5 µl de la muestra; 10 µl de SYBR Green (Applied Biosystems); 0,2 µl de cada cebador (a una concentración de 10 µM) y 4,6 µl de agua miliQ. El programa de amplificación estaba comprendido de un primer paso a 50°C durante 2 min; un segundo paso de desnaturalización a 95°C durante 10 min; un tercer paso de 50 ciclos donde se alternó una temperatura de 95°C durante 15 seg y 60°C durante 1 min. Por último, se realizó un cuarto paso donde se determinó la curva de desnaturalización de los fragmentos amplificados mediante un ciclo de incubación a 95°C por 15 seg, 60°C por 1 min y 95°C por 15 segundos. Además, los fragmentos amplificados fueron evaluados por electroforesis en gel de agarosa (1%) en tampón TAE 1X, con 8 µl de BrEt/100 ml, durante 30 minutos a

10 V/cm, donde se comprobó la ausencia de productos inespecíficos y el tamaño del amplicón.

Para el cálculo de la eficiencia de amplificación de cada gen se realizaron seis diluciones seriadas del ADNc obtenido de las hojas de los clones de *L. corniculatus* “charlii”, y posteriormente estas muestras fueron analizadas con sus cebadores específicos por medio de RT-qPCR. El valor de Ct obtenido fue graficado en función del logaritmo en base 10 de la dilución y la eficiencia fue calculada a partir de la pendiente de la recta ajustada por regresión (Pfaffl 2001).

4.3.5. Cuantificación de taninos condensados.

De las mismas muestras a partir de las cuales se realizó la extracción de ARN se realizó la cuantificación de TC de manera similar a como fuera descrito en la sección 2.3.1.4.

4.3.6. Diseño experimental y análisis de datos.

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con 4 repeticiones biológicas donde cada tratamiento correspondía a los distintos genotipos evaluados. Cada repetición biológica se encontraba constituida por el ADNc proveniente de 8 clones del mismo genotipo. A su vez, de cada muestra de ADNc se realizaron dos repeticiones técnicas. Los datos obtenidos se analizaron mediante la utilización del método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ propuesto por Livak y Schmittgen (Livak y Schmittgen 2001). Para ello, se utilizó el gen de referencia *1 α EF* y el valor de Ct obtenido para un gen de una muestra en particular fue referido al valor de Ct obtenido con el gen de referencia en esa misma muestra (se obtiene así el valor ΔCt). Posteriormente este valor se refirió al ΔCt de la muestra de referencia (los valores fueron referidos al ΔCt promedio de las muestras de ADNc obtenido de las hojas de los clones de *L. tenuis* “Pampa INTA”), se obtuvo de esta manera el valor $\Delta\Delta Ct$ el cual fue aplicado a la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

El análisis estadístico de la expresión relativa se realizó mediante la aplicación de análisis de micromatrices de ADN del programa InfoStat (Di Rienzo *et al.* 2011) con 5000 ciclos de remuestreo y comparación de a pares ($p < 0,05$). Los análisis de correlación se realizaron mediante la determinación de coeficientes de correlación de Pearson con un nivel de confianza del 99% utilizando el programa InfoStat.

4.4. Resultados.

4.4.1. Clonación de genes y control de la especificidad de los cebadores.

A modo de resumen en la Tabla 4.2 se detallan la longitud e identidad de los genes *1 α EF*, *FebHLH*, *FeTT2*, *FePAL*, *FeDFR*, *FeCHS*, *FeANS*, *FeANR*, *FeLAR1* y *FeLAR2*.

Tabla 4.2. Genes clonados en las plantas Lt: *L. tenuis* “Pampa INTA” y Lc: *L. corniculatus* “charlii” y su identidad con secuencias depositadas en el banco de genes (NCBI). Referencias: 1. (Paolocci *et al.* 2005); 3. (Bavage *et al.* 1997); 5. Allison G.G. y Robbins, M.P., sin publicar; 6. Hughes, J.W. y Robbins, M.P., sin publicar; 7. (Paolocci *et al.* 2007) y 8. (Yoshida *et al.* 2010).

Gen	Especie	Longitud (pb)	Descripción	Presenta similitud con:	Similitud	Ref.
<i>IaEF</i>	<i>Lt</i>	676	ADNc	L. corniculatus, factor de elongación 1-alpha,	98%	1
<i>IaEF</i>	<i>Lc</i>	805	ADNc	ARNm secuencia parcial (AY633710)	98%	
<i>FebHLH</i>	<i>Lt</i>	671	ADNc	L. japonicus, factor de transcripción bHLH	99%	8
<i>FebHLH</i>	<i>Lc</i>	649	ADNc	(LjTAN1), ARNm (AB492285)	99%	
<i>FeTT2</i>	<i>Lt</i>	716	ADNc	L. japonicus, factor de transcripción R2R3-MYB	99%	8
<i>FeTT2</i>	<i>Lc</i>	711	ADNc	(LjTT2b), ARNm secuencia completa (AB300034)	99%	
<i>FePAL</i>	<i>Lt</i>	436	ADNc	L. corniculatus, fenilalanina amonio-liasa (PAL),	97%	1
<i>FePAL</i>	<i>Lc</i>	369	ADNc	ARNm secuencia parcial (AY633709)	98%	
<i>FeDFR</i>	<i>Lt</i>	1696	ADN genómico	L. corniculatus, dihidroflavanol reductasa (DFRa)	95%	3
<i>FeDFR</i>	<i>Lc</i>	1751	ADN genómico	L. corniculatus, dihidroflavanol reductasa (DFR),	93%	1
				secuencia completa (AY633707)		
<i>FeCHS</i>	<i>Lt</i>	325	ADNc	L. corniculatus, chalcona sintasa (CHS), secuencia	92%	5
				parcial (AF308143)		
<i>FeCHS</i>	<i>Lc</i>	322	ADNc	L. corniculatus, chalcona sintasa (CHS), secuencia	94%	5
				parcial (AF308143)		
<i>FeANS</i>	<i>Lt</i>	1348	ADN genómico	L. corniculatus, antocianina sintasa (ANS),	99%	6
				secuencia parcial (AY028931)		
<i>FeANS</i>	<i>Lc</i>	330	ADNc	L. corniculatus, antocianina sintasa (ANS),	99%	6
				secuencia parcial (AY028931)		
<i>FeANS</i>	<i>Lc</i>	1493	ADN genómico	L. corniculatus, antocianina sintasa (ANS),	98%	6
				secuencia parcial (AY028931)		
<i>FeANR</i>	<i>Lt</i>	457	ADNc	L. corniculatus, antocianidina reductasa (ANR1-1),	99%	7
<i>FeANR</i>	<i>Lc</i>	465	ADNc	ARNm secuencia completa (DQ349108)	99%	
<i>FeLARI</i>	<i>Lt</i>	687	ADNc	L. corniculatus, leucoantocianidina reductasa	99%	7
<i>FeLARI</i>	<i>Lc</i>	705	ADNc	(LAR1-2), ARNm secuencia completa (DQ349101)	99%	
<i>FeLAR2</i>	<i>Lt</i>	498	ADNc	L. corniculatus, leucoantocianidina reductasa	99%	7
				(LAR2-1), ARNm secuencia completa (DQ349104)		
<i>FeLAR2</i>	<i>Lt</i>	910	ADN genómico	L. corniculatus, leucoantocianidina reductasa	98%	
				(LAR2-2), secuencia completa (DQ349107)		
<i>FeLAR2</i>	<i>Lc</i>	498	ADNc	L. corniculatus, leucoantocianidina reductasa	100%	
				(LAR2-1), ARNm secuencia completa (DQ349104)		
<i>FeLAR2</i>	<i>Lc</i>	911	ADN genómico	L. corniculatus, leucoantocianidina reductasa	89%	
				(LAR2-2), secuencia completa (DQ349107)		

En el apéndice 3 puede observarse que para cada alineamiento se ha resaltado en color verde la secuencia sobre la cual se diseñaron los cebadores que fueron utilizados para la cuantificación relativa de la expresión de los genes correspondientes. La amplificación sobre las muestras de ADNc utilizando estos cebadores dio como resultado un producto de 111 pb para *IaEF*, 64 pb para *FeTT2*, 82 pb para *FePAL*, 104 pb para *FeDFR*, 142 pb para *FeCHS*, 93 pb para *FeANS*, 121 pb para *FeANR*, 92 pb para *FeLARI* y 131 pb para *FeLAR2*.

La eficiencia de amplificación para todos los cebadores evaluados resultó superior al 90% y no se observaron diferencias para la eficiencia de los diferentes genes ($p > 0,01$). En la Figura 4.4 se puede observar como ejemplo algunas de las curvas obtenidas.

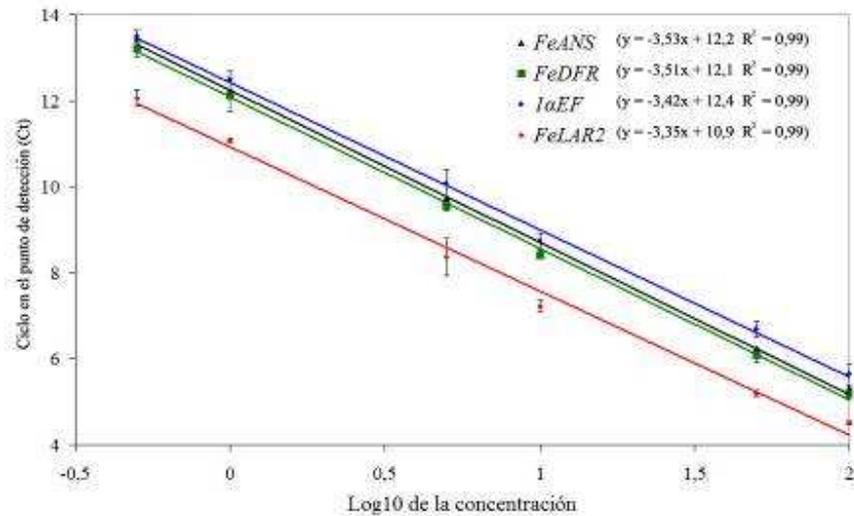


Figura 4.4. Eficiencia de amplificación de los amplicones *1αEF*, *FeDFR*, *FeANS* y *FeLAR2*. Entre paréntesis se presenta la ecuación de la recta ajustada y su coeficiente de regresión.

La especificidad de los cebadores pudo ser confirmada a través de la presencia de una sola banda del tamaño esperado luego de realizar la electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados en la reacción de RT-qPCR (Figura 4.5).

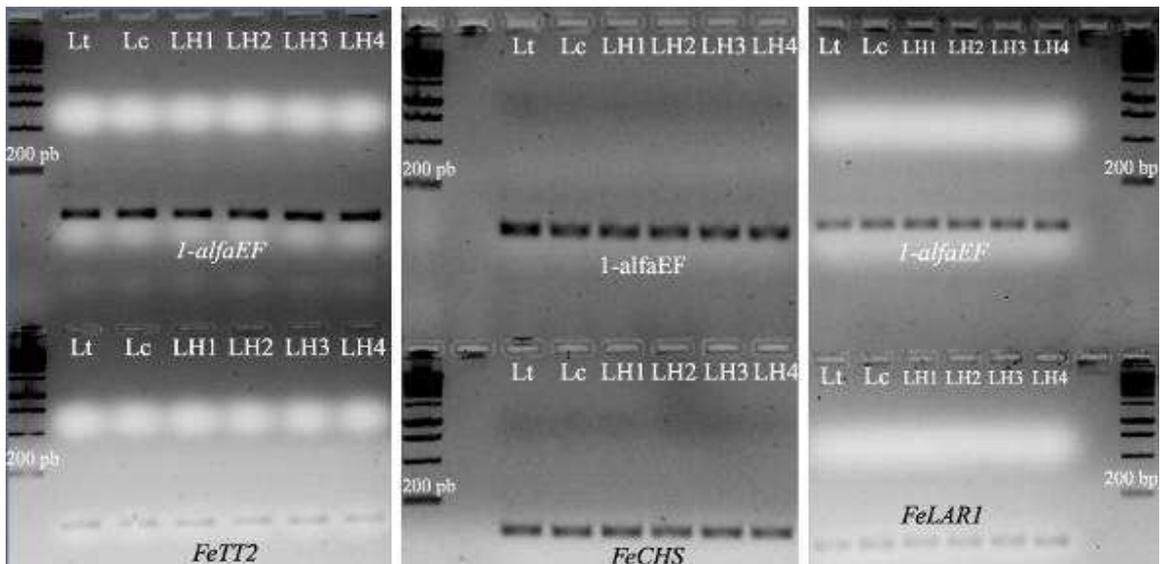


Figura 4.5. Geles en donde se sembró el producto obtenido de la RT-qPCR de los genes *1αEF*, *FeTT2*, *FeCHS* y *FeLARI* para las muestras de hoja de Lt: *L. tenuis* “Pampa INTA”, Lc: *L. corniculatus* “charlii” y LH: *L. tenuis* x *L. corniculatus* 1, 2, 3 y 4. Gel de agarosa 2% en buffer TAE 1X, 10V/cm. Marcador de peso molecular 1Kb+.

Adicionalmente, la especificidad de los cebadores se confirmó mediante el estudio de la curva de desnaturalización, donde se pudo observar la presencia de un único pico correspondiente con la temperatura de fusión del producto amplificado. La temperatura de fusión observada para el gen de referencia *1αEF* fue de 82,2°C. Para el factor de transcripción *FeTT2* se observaron dos picos a 76,5 y 79,3 °C, mientras que se determinaron picos únicos a 76,7°C, 79,2°C y 78,4°C para *FeTT2a-c*, *FeTT2b* y *FebHLH*, respectivamente. Por su parte, para los genes *FePAL*, *FeCHS*, *FeDFR*, *FeANS*, *FeANR*, *FeLAR1*, *FeLAR2* y *FeMATE* la temperatura de fusión del producto amplificado fue de 80,2; 81,2; 78,9; 81,1; 80,4; 75,9; 82,2 y 80,3°C respectivamente.

4.4.2. Cuantificación relativa de la expresión génica.

Los valores de expresión relativa para los distintos genes evaluados en hoja se pueden observar en la Figura 4.6. Estos datos indican una baja expresión relativa en los clones de *L. tenuis* “Pampa INTA” para los genes *FeTT2*, *FeTT2b*, *FeCHS*, *FeDFR*, *FeANS*, *FeANR*, *FeLAR1*, *FeLAR2* y *FeMATE* en relación a la expresión observada en clones de *L. corniculatus* “charlii” ($p < 0,05$). En este sentido resulta interesante remarcar que la expresión del factor de transcripción *FeTT2b* en los clones de *L. corniculatus* “charlii” resultó 73 veces superior al determinado para los clones de *L. tenuis*. Por su parte, se observaron expresiones relativas intermedias en los clones de los genotipos *L. tenuis* x *L. corniculatus*, en especial aquellas correspondientes a los factores de transcripción *FeTT2* y *FeTT2b* y la de los “genes tardíos” que regulan la biosíntesis de TC (*FeANS*, *FeANR*, *FeLAR1* y *FeMATE*).

También se observaron diferencias entre genotipos para la expresión relativa de los factores de transcripción *FeTT2a-c* y *FebHLH* y del gen *FePAL* ($p < 0,05$). Sin embargo, en este caso se observó un patrón diferente al observado en la expresión del resto de genes. De esta manera, para la forma a-c del factor de transcripción *FeTT2* pudo observarse que su expresión relativa no se diferenció entre clones de ambos parentales. Por el contrario, en los clones de los genotipos híbridos se observó una expresión relativamente menor, con excepción de los clones de *L. tenuis* x *L. corniculatus* 1, los cuales presentaron valores similares a aquellos observados en clones de ambos parentales. Para el factor de transcripción *FebHLH* los valores más bajos de expresión fueron observados para los clones de *L. corniculatus*. En los clones de los genotipos híbridos pudo observarse una mayor expresión relativa de *FebHLH* con respecto a aquella determinada en los clones de *L. corniculatus*, la cual resultó similar a la de *L. tenuis* para algunos genotipos o incluso superior a otros. Para el gen *FePAL* los valores más bajos de expresión relativa fueron observados en los clones de *L. tenuis*, los cuales se diferenciaron de los valores de expresión observados en los clones de *L. corniculatus*. A su vez, los clones de los genotipos híbridos presentaron una expresión similar a la de ambos parentales. De todas formas, las diferencias observadas en la expresión relativa de estos tres genes mencionados fueron menores a 2.

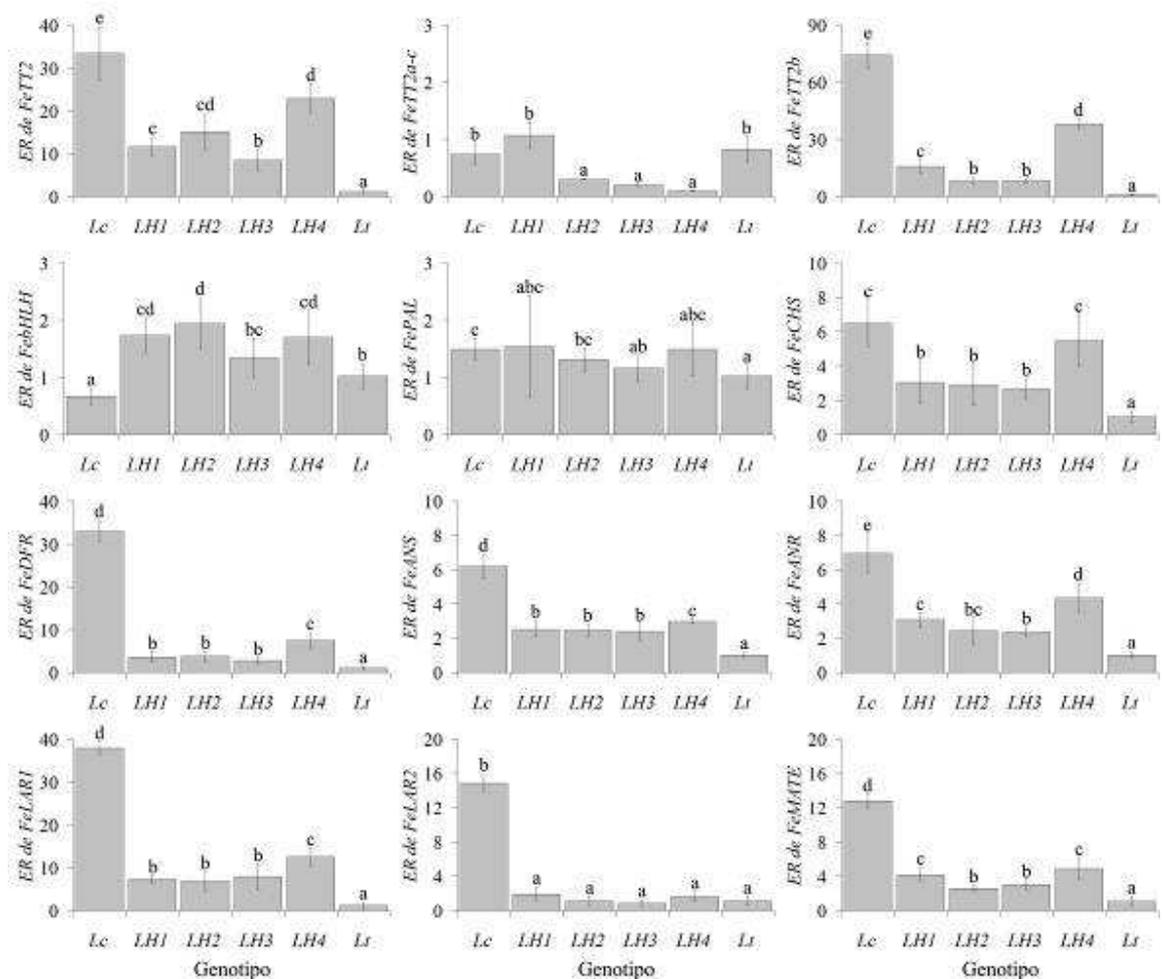


Figura 4.6. Expresión relativa (ER) de los genes *FeTT2*, *FeTT2a-c*, *FeTT2b*, *FebHLH*, *FePAL*, *FeCHS*, *FeDFR*, *FeANS*, *FeANR*, *FeLAR1*, *FeLAR2* y *FeMATE* en hojas de plantas de *Lotus* spp. Valores expresados como $2^{-\Delta\Delta C_t}$ referidos a *L. tenuis*. Medias con la misma letra no presentan diferencias significativas ($p < 0,05$). Lc: *L. corniculatus* “charlii”, Lt: *L. tenuis* “Pampa INTA” LH: *L. tenuis* x *L. corniculatus* 1, 2, 3 y 4.

Por otra parte, el análisis de la expresión relativa de los distintos genes en muestras de tallo pueden observarse en la Figura 4.7. En este caso se pudo observar que la expresión relativa presentó un patrón similar al observado en las hojas, aunque las diferencias en expresión fueron menos marcadas. En este sentido, para los clones de *L. corniculatus* se observó una expresión relativa más elevada para los genes *FeTT2*, *FeTT2a-c*, *FeTT2b*, *FeCHS*, *FeDFR*, *FeANS*, *FeANR*, *FeLAR1*, *FeLAR2* y *FeMATE* en relación a la expresión observada para los clones de *L. tenuis* ($p < 0,05$). Los clones de los genotipos híbridos presentaron valores de expresión relativa intermedios al determinado en los clones de ambos parentales. Para el factor de transcripción *FebHLH* se observó una expresión mayor en clones de *L. tenuis* en relación a los de *L. corniculatus*, mientras que los clones de *L. tenuis* x *L. corniculatus* 3 presentaron expresiones relativamente mayores.

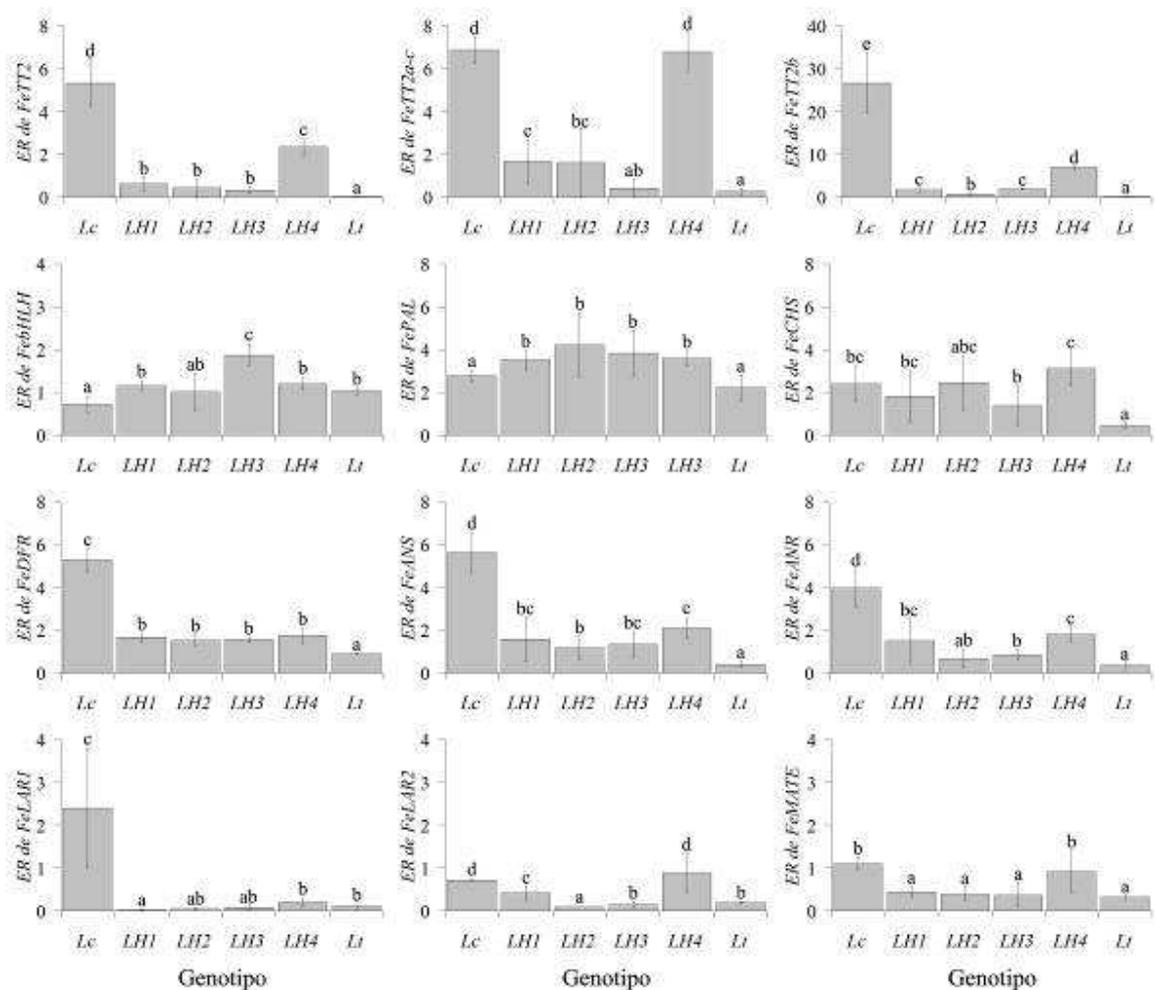


Figura 4.7. Expresión relativa (ER) de los genes *FeTT2*, *FeTT2a-c*, *FeTT2b*, *FebHLH*, *FePAL*, *FeCHS*, *FeDFR*, *FeANS*, *FeANR*, *FeLARI*, *FeLAR2* y *FeMATE* en tallos de plantas de *Lotus* spp. Valores expresados como $2^{-\Delta\Delta C_t}$ referidos a *L. tenuis*. Medias con la misma letra no presentan diferencias significativas ($p < 0,05$). Lc: *L. corniculatus* “charlii”, Lt: *L. tenuis* “Pampa INTA” LH: *L. tenuis* x *L. corniculatus* 1, 2, 3 y 4.

4.4.3. Correlación entre la expresión de los genes y los niveles de taninos condensados.

Se observó una correlación positiva entre los contenidos de las diferentes fracciones de TC y la expresión relativa de los factores de transcripción *FeTT2* y *FeTT2b*. De la misma manera, la expresión de los genes *FeDFR*, *FeCHS*, *FeANS*, *FeANR*, *FeLARI*, *FeLAR2* y *FeMATE* correlacionó positivamente con los niveles de las distintas fracciones de TC (Tabla 4.3). No obstante, no se observó correlación alguna en relación a la expresión del gen *FePAL*, así como de la expresión de los factores de transcripción *FeTT2a-c* y *FebHLH* con los niveles de ninguna de las fracciones de TC.

Tabla 4.3. Correlación entre la expresión de los genes que regulan la biosíntesis de TC y el contenido de TC. Correlación de Pearson.

Gen	TC solubles		TC insolubles		TC totales	
	Coefficiente de correlación	p-valor	Coefficiente de correlación	p-valor	Coefficiente de correlación	p-valor
<i>FeTT2</i>	0,83	0,0008	0,97	<0,0001	0,91	<0,0001
<i>FeTT2a-c</i>	-0,17	0,5900	-0,25	0,4400	-0,21	0,5100
<i>FeTT2b</i>	0,94	<0,0001	0,93	<0,0001	0,95	<0,0001
<i>FebHLH</i>	-0,36	0,2500	-0,11	0,7500	-0,25	0,4200
<i>FePAL</i>	-0,31	0,3300	-0,50	0,1000	-0,40	0,2000
<i>FeDFR</i>	0,99	<0,0001	0,92	<0,0001	0,98	<0,0001
<i>FeCHS</i>	0,78	0,0029	0,90	<0,0001	0,85	0,0005
<i>FeANS</i>	0,70	0,0100	0,76	0,0045	0,74	0,0100
<i>FeANR</i>	0,82	0,0010	0,92	<0,0001	0,88	0,0002
<i>FeLARI</i>	0,97	<0,0001	0,98	<0,0001	0,99	<0,0001
<i>FeLAR2</i>	0,99	<0,0001	0,89	<0,0001	0,97	<0,0001
<i>FeMATE</i>	0,95	<0,0001	0,98	<0,0001	0,99	<0,0001

Cabe destacar que, a su vez, estos datos indican que la expresión de los factores de transcripción *FeTT2* y *FeTT2b* se encontró correlacionada de forma positiva con la expresión de los genes *FeDFR*, *FeCHS*, *FeANS*, *FeANR*, *FeLARI*, *FeLAR2* y *FeMATE* (Tabla 4.4). Por otro lado, la expresión de estos factores de transcripción se encontró correlacionada negativamente con la expresión del gen *FePAL*. En relación a los factores de transcripción *FeTT2a-c* y *FebHLH* no se observó correlación significativa entre su expresión y la expresión de los otros genes evaluados (Tabla 4.4).

Tabla 4.4. Correlación entre la expresión relativa de los factores de transcripción y los genes evaluados. Correlación de Pearson.

Gen	<i>FeTT2</i>		<i>FeTT2a-c</i>		<i>FeTT2b</i>		<i>FebHLH</i>	
	Coefficiente de correlación	p-valor						
<i>FePAL</i>	-0,49	0,0010	-0,41	0,01	-0,29	0,060	-0,002	0,90
<i>FeDFR</i>	0,82	<0,0001	-0,10	0,54	0,92	<0,0001	-0,27	0,09
<i>FeCHS</i>	0,79	<0,0001	0,04	0,80	0,77	<0,0001	0,07	0,68
<i>FeANS</i>	0,70	<0,0001	0,31	0,05	0,85	<0,0001	-0,30	0,05
<i>FeANR</i>	0,89	<0,0001	0,06	0,73	0,90	<0,0001	-0,18	0,26
<i>FeLARI</i>	0,91	<0,0001	-0,25	0,13	0,93	<0,0001	-0,23	0,15
<i>FeLAR2</i>	0,78	<0,0001	-0,15	0,37	0,87	<0,0001	-0,32	0,04
<i>FeMATE</i>	0,90	<0,0001	-0,23	0,15	0,92	<0,0001	-0,19	0,24

Por último, se realizó la cuantificación de los niveles foliares de TC y de la expresión relativa de los genes *FePAL*, *FeCHS*, *FeDFR*, *FeANS*, *FeANR*, *FeLARI* y los factores de transcripción *FeTT2* y *FeTT2b* en las plantas obtenidas y seleccionadas a partir del cruzamiento entre genotipos híbridos (segunda generación). Los valores obtenidos en este caso pueden observarse en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5. Expresión relativa de genes relacionados a la biosíntesis de TC y niveles de TC foliares en plantas obtenidas del cruzamiento entre los cuatro genotipos *L. tenuis* x *L. corniculatus* seleccionados. nd: no determinado.

	<i>FeTT2</i> (2- $\Delta\Delta$ Ct)	<i>FeTT2b</i> (2- $\Delta\Delta$ Ct)	<i>FePAL</i> (2- $\Delta\Delta$ Ct)	<i>FeCHS</i> (2- $\Delta\Delta$ Ct)	<i>FeDFR</i> (2- $\Delta\Delta$ Ct)	<i>FeANS</i> (2- $\Delta\Delta$ Ct)
Planta 1	24,70	150,10	2,20	2,54	1,85	16,69
Planta 2	50,47	133,64	2,75	3,58	0,27	8,96
Planta 3	45,81	91,37	3,69	3,01	0,87	16,03
Planta 4	nd	140,65	nd	nd	nd	nd
Planta 5	nd	282,22	nd	nd	nd	nd
Planta 6	32,82	146,23	3,36	2,82	1,25	11,68
Planta 7	50,92	252,46	3,01	2,77	0,64	12,80
Planta 8	18,71	216,71	2,42	3,01	1,10	21,10
	<i>FeANR</i> (2- $\Delta\Delta$ Ct)	<i>FeLARI</i> (2- $\Delta\Delta$ Ct)	TC solubles (mg/g MS)	TC insolubles (mg/g MS)	TC totales (mg/g MS)	
Planta 1	7,01	0,80	0,54	0,73	1,27	
Planta 2	3,36	0,50	0,23	2,15	2,37	
Planta 3	6,28	0,22	0,19	2,39	2,59	
Planta 4	9,45	nd	0,25	3,45	3,69	
Planta 5	23,42	nd	3,34	3,83	7,17	
Planta 6	6,34	1,57	2,85	5,77	8,62	
Planta 7	6,81	8,37	2,27	7,29	9,56	
Planta 8	10,30	5,64	5,94	7,86	13,80	

Cabe destacar, que a diferencia de las observaciones realizadas anteriormente en clones de *L. corniculatus*, *L. tenuis* y los genotipos seleccionados de su progenie híbrida, no se observó correlación significativa ($p > 0,05$) entre la expresión de estos genes y los niveles de TC en estos nuevos materiales.

4.5. Discusión.

Como fuera mencionado previamente, el factor de transcripción codificado por *TT2* regula la expresión de los “genes tardíos” de la biosíntesis de TC en las especies modelo *A. thaliana*, *M. truncatula* y *L. japonicus* (Nesi *et al.* 2001). De la misma manera, en los materiales evaluados en este trabajo de tesis, pudo observarse que los niveles relativos de expresión de *FeTT2* se encuentran correlacionados con los niveles de expresión de los genes *FeANS*, *FeANR*, *FeLARI*, *FeLAR2* y *FeMATE*.

Además, también pudo determinarse una correlación entre los niveles de expresión de *FeTT2* y los de *FeCHS* y *FeDFR*, ambos genes considerados “genes tempranos”. Por otra parte, cabe destacar que se ha reportado que el factor de transcripción codificado por *TT8* resulta necesario junto con *TT2* para la adecuada regulación de los “genes tardíos” de la biosíntesis de TC en las plantas modelo (Baudry *et al.* 2004), y que mediante la expresión ectópica de *TT8* en plantas de *L. corniculatus*, se logró modificar la expresión de los “genes tardíos” de la biosíntesis de TC y en consecuencia los niveles de los mismos (Damiani *et al.* 1999, Paolucci *et al.* 1999). Sin embargo, en los materiales obtenidos y evaluados en esta tesis, no se observó que los niveles de expresión de *FebHLH* se encuentren correlacionados con la expresión de los “genes tardíos” o bien con los niveles de TC.

Por otra parte, el nivel de expresión del factor de transcripción *FeTT2* y de los “genes tardíos” se encontraron fuertemente correlacionados con el contenido de TC en el sistema de estudio formado por *L. corniculatus* “charlii”, *L. tenuis* “Pampa INTA” y los cuatro genotipos híbridos seleccionados. De esta manera se podría sugerir que el nivel de expresión de *TT2* resulta determinante de los niveles de TC en plantas agrónomicamente importantes del género *Lotus*, así como fuera sugerido en otros trabajos en especies modelo (Nesi *et al.* 2001). Sin embargo, en las plantas obtenidas del cruzamiento entre los híbridos interespecíficos no se observó una correlación significativa entre los niveles de expresión de este factor de transcripción y el contenido de TC. De la misma manera en otros ensayos realizados, en los cuales se evaluaron tres genotipos obtenidos de la retrocruza entre los híbridos y *L. corniculatus* “charlii” y plantas de las poblaciones comerciales “Boyero” y “Gladiador” de *L. corniculatus*, junto con plantas de la población “Maku” de *L. uliginosus* se observó la ausencia de correlación entre la expresión relativa de *FeTT2* y los niveles de TC (datos no mostrados). Debido a ello, podríamos sugerir como hipótesis alternativa que la expresión del factor de transcripción *TT2* no es el único determinante de los niveles de TC.

Como fuera mencionado en la introducción, la mayoría de los estudios de la regulación de la biosíntesis de TC fueron realizados en plantas que no presentan la capacidad de acumular estos compuestos en sus hojas. En este sentido, solo la especie modelo *L. japonicus* tiene la capacidad de acumular TC a nivel foliar, si bien se alcanzan niveles relativamente bajos (Gruber *et al.* 2008) y, a nivel foliar, los mismos se ubican solamente en tejidos adyacentes a los haces vasculares de manera similar a *L. tenuis*. Por su parte, en *A. thaliana* la acumulación de TC solo ocurre en sus silicuas (Debeaujon *et al.* 2003), lo que ha podido incrementarse mediante la expresión ectópica de *LjTT2* (Yoshida *et al.* 2010). Sin embargo, estos mismos autores observaron que, luego de realizar la tinción de TC en las plantas transformadas, los mismos se encontraban en el tejido adyacente a los haces vasculares y no distribuidos en el mesófilo de las hojas. De esta manera, se podría sugerir que la acumulación de TC en el tejido adyacente a los haces vasculares en hoja, podría encontrarse determinado por los niveles de expresión de *TT2*, y que la acumulación de TC en las células del mesófilo no se encuentra determinado únicamente por los niveles de expresión de este factor de transcripción.

En este sentido es importante destacar que si bien no existen diferencias en el contenido total de TC en hojas de los dos ecotipos de *L. japonicus* ($1,06 \pm 0,5$ mg TC/g MS para el ecotipo Gifu y $1,13 \pm 0,2$ mg TC/g MS para el ecotipo MG20), en determinaciones realizadas en nuestro laboratorio se observó en los mismos una expresión diferencial del factor de transcripción *FeTT2* (datos no mostrados), donde el ecotipo Gifu presentó una expresión relativa 13 veces superior a la del ecotipo MG20. En relación a ello, al analizar las imágenes de la tinción de TC en las hojas de estos dos ecotipos se pudo observar que ambos presentaban TC solamente en el tejido adyacente a los haces vasculares. Sin embargo se observó que para el ecotipo MG20, los TC se encuentran localizados en forma mayoritaria hasta el ápice del folíolo, mientras que en el ecotipo Gifu se encuentran presentes de la mitad del folíolo hacia la base (Figura 4.8). Es posible que esta sutil diferencia en la intensidad de tinción de TC se encuentre relacionada con la diferencia observada en los niveles de expresión de *TT2* para ambos ecotipos de *L. japonicus*. Nuevas determinaciones y análisis son requeridos para confirmar esta nueva hipótesis.

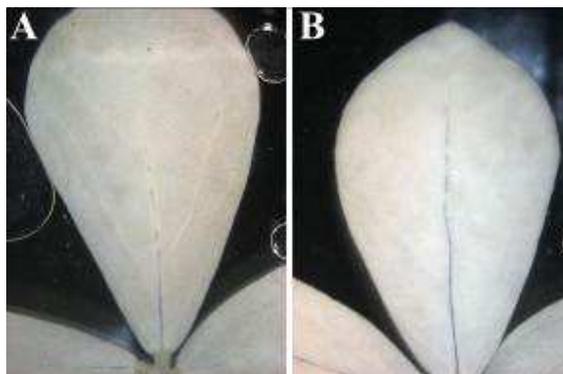


Figura 4.8. Tinción de TC en hojas de *L. japonicus*. **A.** Ecotipo Gifu. **B.** Ecotipo MG20.

Sobre la base de esta hipótesis, se analizaron las fotografías de las tinciones foliares de TC en *L. corniculatus* “charlii” y *L. tenuis* “Pampa INTA”. En ellas se pudo observar que independientemente de la diferencia muy marcada de la presencia o no de TC en el tejido del mesófilo, en el tejido adyacente a los haces vasculares de las plantas *L. corniculatus* se observó una mayor cantidad de TC que en el tejido adyacente a los haces vasculares de las hojas de *L. tenuis*. Posiblemente, esta diferencia marque que en estos materiales la correlación entre el contenido foliar de TC y los niveles de expresión de *FeTT2* resulten significativos, lo cual puede observarse también en el material obtenido a partir de los tallos de estos mismos materiales.

Por otra parte, en los materiales vegetales obtenidos del cruzamiento entre híbridos interespecíficos se observan cuatro situaciones diferentes en relación al contenido de TC: a) TC en el tejido adyacente a los haces vasculares y en el mesófilo, b) TC en el mesófilo pero ausente en el tejido adyacente a los haces vasculares, c) TC en el tejido adyacente a los haces vasculares pero ausente en el mesófilo y d) TC ausentes en el tejido adyacente a los haces vasculares y en el mesófilo (Figura 4.9). Al realizar la cuantificación del contenido foliar de TC en la situación a y b se observarán niveles elevados de TC, mientras que en la situación c y d se observarán niveles bajos de TC. Si bien en la situación b se observan altos contenidos de TC, los mismos se encuentran ausentes o en menor medida en el tejido adyacente a los haces vasculares lo que se correspondería con bajos niveles relativos de la expresión del factor de transcripción *FeTT2*. De la misma manera en la situación d, se observarían niveles bajos de TC y simultáneamente se observarían elevados niveles relativos de la expresión de *FeTT2*. De esta manera, podrían explicarse los resultados observados en relación a la ausencia de correspondencia entre el nivel de expresión del factor de transcripción *FeTT2* y el contenido foliar de TC para las plantas obtenidas a partir del cruzamiento entre genotipos híbridos.

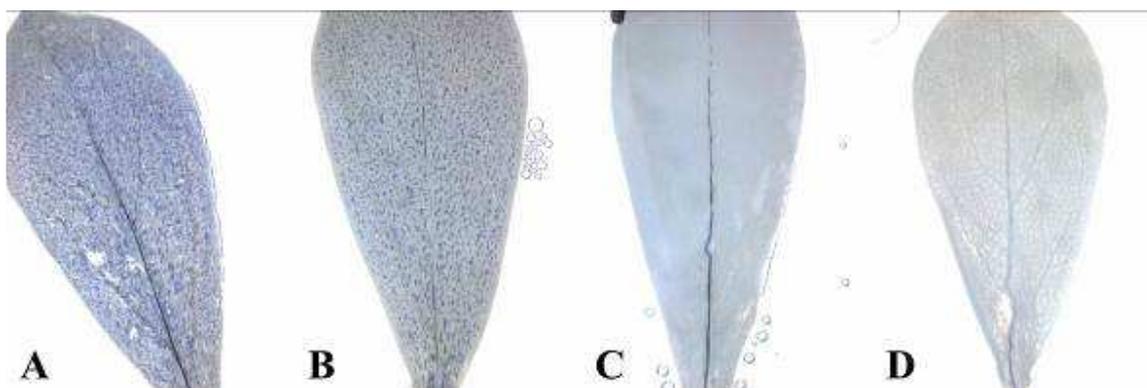


Figura 4.9. Tinción de TC en hojas de plantas obtenidas del cruzamiento entre híbridos interespecíficos. **A.** TC presentes en el tejido adyacente a los haces vasculares y distribuidos en el mesófilo. **B.** TC distribuidos en el mesófilo. **C.** TC presentes en el tejido adyacente a los haces vasculares. **D.** Sin presencia de TC.

Por otra parte, cabe destacar que si bien se ha reportado que la expresión de la forma *LjTT2a* en *L. japonicus* presenta la mayor actividad regulatoria de la expresión de *LjANR* (Yoshida *et al.* 2010), en el sistema de estudio utilizado para el desarrollo de la presente tesis se observó que la expresión de *FeTT2a-c* (homóloga a *LjTT2a* y *LjTT2c*) no presentó correlación con la expresión de *FeANR*. Sin embargo, sí se encontró una correlación significativa entre la expresión de la forma *FeTT2b* y del gen *FeANR*, de la misma manera que para la mayoría de los otros genes evaluados que se encuentran relacionados a la biosíntesis de TC.

4.6. Conclusiones.

- La obtención de híbridos interespecíficos entre *L. tenuis* y *L. corniculatus* representa una herramienta útil para el estudio de los mecanismos de regulación de los niveles de TC.
- En plantas de *Lotus* spp. que presentan naturalmente niveles diferenciales de TC, la expresión del factor de transcripción *FebHLH* no sería determinante de los mismos.
- La regulación de los niveles de TC es un proceso metabólico complejo que no depende exclusivamente de los niveles de expresión de los genes analizados en este trabajo.

5. Capítulo 5. Rol de los taninos condensados en la simbiosis mutualista entre *Lotus* spp. y rizobios

5.1. Introducción.

5.1.1. Fijación biológica de nitrógeno.

La mayoría de las leguminosas establecen simbiosis mutualistas con bacterias de suelo capaces de fijar nitrógeno. Estas bacterias son conocidas genéricamente como rizobios. A su vez, la infección de los rizobios en las raíces de leguminosas, causa el desarrollo de nuevos órganos, los cuales se denominan nódulos (Hirsch *et al.* 2001).

Los nódulos son colonizados por rizobios y se establece una cooperación metabólica planta-rizobio, donde la bacteria reduce el nitrógeno atmosférico en amonio, el cual es provisto a la planta para su incorporación en compuestos orgánicos. Por su parte, la planta le provee a la bacteria los carbohidratos derivados del proceso de fotosíntesis, los cuales son utilizados como fuente de energía y carbono (Mylona *et al.* 1995). De esta manera, el proceso simbiótico permite a las leguminosas utilizar el nitrógeno atmosférico, siendo capaces de colonizar suelos con bajos contenidos de este elemento y contribuyendo a una mejor adaptación de las mismas a las condiciones edáficas adversas (Bordeleau y Prévost 1994, Zahran 1999).

Se reconocen dos tipos diferentes de nódulos que se desarrollan en las raíces de las leguminosas: los del tipo indeterminado y los del tipo determinado. Los nódulos indeterminados son cilíndricos y presentan un meristema persistente que continuamente genera nuevas células, las cuales son infectadas por el rizobio. Estas nuevas células infectadas y las bacterias que se encuentran en ellas, forman un nuevo tejido, el cual presenta una activa fijación de nitrógeno. Este proceso genera un gradiente de estados de desarrollo; desde el meristema joven en el ápice del nódulo hasta el tejido viejo y senescente en la base del nódulo cerca de la raíz. Por otra parte, los nódulos determinados son de forma esférica y carecen del meristema persistente, por lo que no presentan un gradiente de estados de desarrollo (Gage 2004).

El tipo de nódulo que se desarrolla en respuesta de la infección por rizobios es específico del hospedante y no depende de la bacteria. La alfalfa (*Medicago sativa*) y los tréboles (*Trifolium* spp.) forman nódulos indeterminados al igual que *M. truncatula*, la cual es utilizada como modelo de estudio de las leguminosas con este tipo de nodulación (Cook 1999). Por su parte, las especies de *Lotus* desarrollan nódulos determinados al igual de lo que ocurre con soja (*Glycine max*) y *Phaseolus* spp. (Brewin 1991). En virtud de ello, como fuera mencionado anteriormente, la especie *L. japonicus* es utilizada como modelo de estudio de las leguminosas con nodulación del tipo determinado (Pajuelo y Stougaard 2005).

5.1.2. Especificidad de la simbiosis entre rizobios y las especies de *Lotus*.

Mesorhizobium loti y *Bradyrhizobium* sp. son considerados tradicionalmente como los simbiosiontes de las especies de *Lotus* (Jarvis *et al.* 1982, Kaneko *et al.* 2000). Algunas especies del género, como *L. corniculatus*, *L. tenuis*, *L. filicaulis* y *L. japonicus*, establecen simbiosis con *M. loti*. Por el contrario, las cepas de *Bradyrhizobium* sp. no nodulan o forman nódulos inefectivos en las especies de *Lotus* anteriormente mencionadas, pero son

capaces de nodular otras especies del género como *L. uliginosus*, *L. angustissimus* o *L. subbiflorus*. Por el contrario, éstas últimas, no establecen simbiosis efectiva con *M. loti* (Monza *et al.* 1992, Brockwell *et al.* 1994, Irisarri *et al.* 1996, Baraibar *et al.* 1999).

En la actualidad existe poca información disponible sobre los rizobios capaces de nodular a las especies *L. uliginosus*, *L. angustissimus* y *L. subbiflorus*. Por el contrario, es mayor el conocimiento sobre aquellos capaces de nodular a las especies del grupo *L. corniculatus*, y ello se debe a que establecen simbiosis efectiva con la especie modelo *L. japonicus* y con otras especies del género que presentan interés económico. En este sentido, la secuenciación del genoma completo de la cepa MAFF303099 se ha realizado ya hace varios años atrás, junto con la determinación de la estructura molecular de los factores Nod (moléculas bacterianas requeridas para la nodulación) producidos por diferentes cepas de esta especie (Saeki y Kouchi 2000). Sin embargo, reportes recientes indican que las bacterias que nodulan *Lotus* podrían presentar una diversidad mayor que aquella que se había descrito inicialmente y que las limitaba a las dos especies mencionadas (Estrella *et al.* 2009).

Independientemente de la especie que se encuentre formando nódulos en *Lotus* spp., existen cepas que son capaces de establecer simbiosis efectivas en ciertas especies del género pero no en otras. Es muy poco aún lo que se conoce sobre las razones que regulan esta especificidad, habiéndose sugerido que la misma podría depender solamente del hospedante al igual que para el tipo de nódulo formado.

Algunos autores han sugerido que la composición y los niveles de TC presentes en raíces de plantas de *Lotus* forman parte de los mecanismos de determinación del rango de hospedantes en la simbiosis mutualista con rizobios (Pankhurst 1970, Pankhurst *et al.* 1979, Pankhurst y Jones 1979, Pankhurst *et al.* 1982, Cooper y Rao 1992). Estos autores han estudiado tres tipos de cepas de referencia según su especificidad de hospedante: a) una cepa de estrecho rango de hospedante conocida como NZP2213, la cual forma nódulos efectivos con las especies *L. tenuis*, *L. corniculatus* y *L. japonicus*; b) otras dos cepas de estrecho rango de hospedante denominadas NZP2309 y CC8145, que forman nódulos efectivos con la especie *L. uliginosus* y c) una cepa de amplio rango de hospedante denominada NZP2037, y la cual forma nódulos efectivos en todas las especies mencionadas (Pankhurst 1970, Pankhurst *et al.* 1979). Estos autores también han sugerido que la cepa NZP2213 resulta sensible a los niveles elevados y a la predominancia de prodelfinidina en los TC presentes en las raíces de *L. uliginosus*.

En este sentido, Pankhurst *et al.* (1982) evaluaron el efecto de los TC de *L. uliginosus* en el crecimiento *in vitro* de las cepas NZP2213 y NZP2037 y observaron que la viabilidad de ambas era afectada por la presencia de TC durante la fase estacionaria de crecimiento. Sin embargo, cuando fueron agregados en la fase exponencial de crecimiento de la cepa NZP2213, pudieron observar un efecto bacteriostático durante un periodo de 5 horas, luego de lo cual, las células perdieron viabilidad súbitamente. Cabe recordar que un efecto bacteriostático es aquel que no produce la muerte de la bacteria, sino que impide su reproducción; la bacteria envejece y muere sin dejar descendencia. Por el contrario, con la cepa NZP2037 se observó que el efecto bacteriostático resultó más duradero en el tiempo (10 horas), para posteriormente observarse una declinación en la viabilidad.

En otro experimento, los mismos autores observaron que la cepa NZP2037 era capaz de crecer aún en presencia de concentraciones de 100 µg TC/ml, mientras que la cepa NZP2213 detenía su crecimiento en presencia de una concentración cuatro veces inferior (25 µg TC/ml). Teniendo en cuenta estos resultados postularon que la tolerancia de la cepa

NZP2037 se debía a la mayor capacidad de las células de acomplejar TC, lo que determinaba que fueran necesarias concentraciones más elevadas de TC, para inhibir completamente las funciones celulares.

Por otra parte, se ha observado que las especies de *Lotus* que formaron nódulos inefectivos con la cepa NZP2213 (*L. uliginosus*, *L. subbiflorus* y *L. angustissimus*), diferían de las otras especies en la proporción de prodelfinidina en sus raíces, ya que su relación prodelfinidina/procianidina/otras se encontraba entre 61/38/1 y 75/25/0, mientras que en ninguna de las especies que formaban nódulos efectivos con esta misma cepa (*L. corniculatus*, *L. tenuis*, *L. japonicus*, *L. krylovii*, *L. filicaulis* y *L. schoelleri*) presentaban prodelfinidina en sus raíces y la relación prodelfinidina/procianidina/otras, se encontraba entre 0/90/10 y 0/95/5 (Pankhurst y Jones 1979).

Es importante destacar que las conclusiones de los trabajos mencionados anteriormente se han basado en el estudio de la composición cuali y cuantitativa de diferentes especies del género *Lotus*. A partir de estos resultados, cabría la posibilidad de que las diferencias observadas en la capacidad de tales especies para establecer simbiosis efectivas con determinados rizobios, no se deban exclusivamente a su particular composición cuali/cuantitativa de TC, sino también a otros factores involucrados en la determinación de la especificidad de la simbiosis, no necesariamente relacionados con el metabolismo de estos polifenoles.

De este modo, adquiere relevancia la posibilidad de estudiar cómo se afecta la simbiosis mutualista entre rizobios y plantas de una misma especie de *Lotus* y que simultáneamente presenten diferencias en la composición cuali/cuantitativa de TC, evitando así la influencia de otros factores inherentes a la especie que pudieran estar involucrados. Considerando ello nos planteamos el objetivo de evaluar la posible incidencia de los TC en las raíces de especies del género *Lotus* en la especificidad de la interacción entre *Lotus* spp y rizobios.

5.2. Hipótesis

Los TC afectan la especificidad en la simbiosis mutualista entre rizobios y especies del género *Lotus* spp.

5.3. Materiales y métodos.

5.3.1 Material vegetal.

Para los primeros ensayos se utilizaron plantas de *L. corniculatus* cv. Leo transformadas con la construcción CaMV35S-*Sn*, las cuales fueron cedidas por el Dr. Francesco Paolucci (IGV-CNR Italia). El factor de transcripción *Sn* (alelo *bol3*, gen *R*) codifica para una proteína con dominio bHLH, la cual promueve la biosíntesis de antocianinas en maíz (Tonelli *et al.* 1991). En las plantas de *L. corniculatus* transformadas, la expresión de este factor de transcripción afectó los niveles de acumulación de TC, obteniéndose de esta manera genotipos con mayores o menores niveles de los mismos (Damiani *et al.* 1999, Paolucci *et al.* 1999), lo que las convierte en herramientas de estudio de suma utilidad para evaluar el efecto de los TC en la especificidad de la simbiosis.

Se usaron 4 genotipos (denominados 121.1; Sn6; Sn9 y Sn10) los cuales presentaban contenidos contrastantes de TC. El genotipo 121.1 constituía el genotipo control, ya que se encontraba transformado con el vector vacío. Por otra parte, los otros tres genotipos se

encontraban transformados con el vector que portaba el factor de transcripción *Sn*, bajo el control del promotor CaMV35S. En relación al genotipo 121.1 (control), los genotipos denominados Sn6, Sn9 presentaban menores niveles de TC y el genotipo Sn10 presentaba mayores niveles.

En otros ensayos realizados, se utilizaron plantas de *L. uliginosus* “Maku”, *L. tenuis* “Pampa INTA”, *L. corniculatus* “charlii” y el genotipo híbrido *L. tenuis* x *L. corniculatus* 2. En todos los casos, se utilizó el método de propagación vegetativo mediante la clonación por estacas (ver sección 2.3.1.3).

5.3.2. Cepas utilizadas para la inoculación de *Lotus* spp.

Para la aplicación de los tratamientos se utilizaron, en forma separada, tres cepas de referencia. En la Tabla 5.1 se incluye una breve descripción de las mismas.

Tabla 5.1. Cepas utilizadas para la inoculación de plantas de *Lotus* spp. El símbolo + significa que la formación de nódulos; el símbolo ± significa la formación de pseudonódulos; la letra E significa fijación de nitrógeno eficiente mientras que la I significa fijación de nitrógeno ineficiente. Adaptado de Pankhurst *et al.* (1979a y 1979b).

Cepa	Rango de infección	<i>L. tenuis</i> / <i>L. corniculatus</i>		<i>L. uliginosus</i>	
		Formación de nódulos	Fijación de nitrógeno	Formación de nódulos	Fijación de nitrógeno
<i>Mesorhizobium loti</i> NZP2213	estrecho	+	E	±	I
<i>Bradyrhizobium loti</i> NZP2309	estrecho	+	I	+	E
<i>Mesorhizobium loti</i> NZP2037	amplio	+	E	+	E
Contenido de TC en raíces		Bajo		Alto	

Los cultivos celulares se realizaron en medio líquido TY (5 g de tripteína, 3 g de extracto de levadura y 0,5 g de cloruro de calcio/1000 ml de agua destilada) y los mismos se cultivaron a 32°C en agitación durante aproximadamente dos días. Una vez alcanzada una densidad óptica de 0,8 (a 600 nm), se utilizaron dichos cultivos para la inoculación de las plantas.

5.3.3. Inoculación y cultivo de plantas.

Las plantas fueron cultivadas en jarras Leonard de 300 cm³ de capacidad. Las mismas permitieron trabajar con sustrato y soluciones de riego estériles evitando la contaminación (Figura 5.1) El sustrato utilizado consistió en una mezcla de vermiculita/perlita/arena de cuarzo en proporción 1/1/1. La mezcla fue esterilizada en autoclave a 1 atm durante 60 min y posteriormente utilizada para montar las jarras Leonard a las cuales se les agregó solución nutritiva Evans 1X sin el agregado de nitrógeno. Una vez armadas se autoclavaron a 1 atm durante 20 min. Las estacas fueron desinfectadas utilizando hipoclorito de sodio al 10% durante 5-7 minutos y posteriormente fueron implantadas en las jarras, trabajando dentro de un flujo laminar. Los clones fueron luego cultivados durante 10 días en cámara de cultivo bajo condiciones semi-controladas (ver sección 2.3.1.2). A los 10 días de cultivo, las plantas se encontraban enraizadas y en ese momento se realizó la inoculación con las

diferentes cepas bacterianas según el tratamiento correspondiente. Para ello se agregó 1 ml del cultivo en TY líquido entre medio de las raíces de plantas, para lo cual se utilizó una micropipeta y la punta se hundió en diferentes puntos del sustrato mientras se expulsaba el líquido. Luego de la inoculación las plantas se continuaron cultivando bajo condiciones semi-controladas de cámara de cultivo durante 25 días. En el momento de la cosecha se tomaron datos de la longitud del tallo principal y cada planta se fraccionó según el tejido en raíces, tallos y hojas. Las muestras fueron secadas a 37°C y se determinó el peso seco de cada tejido. Estas muestras así tratadas fueron utilizadas posteriormente para la determinación de TC y contenido de nitrógeno.

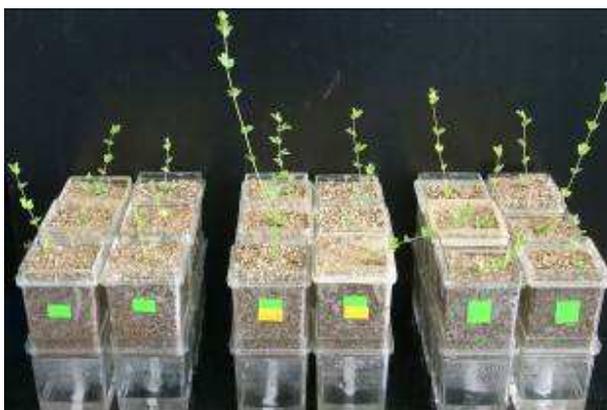


Figura 5.1. Sistema de jarras Leonard utilizado para los ensayos de inoculación de plantas de *Lotus* spp. con cepas de rizobios.

5.3.4. Análisis de taninos condensados.

La cuantificación de TC se realizó para hojas, tallos, raíces y nódulos de los diferentes materiales evaluados. Para ello se utilizó la metodología descrita en la sección 2.3.1.4. A su vez se realizó la tinción de TC en raíces noduladas de los diferentes genotipos, mediante la metodología mencionada en la sección 2.3.1.4.

Por otra parte, para determinar cualitativamente los TC presentes en los distintos tejidos de plantas de *Lotus* evaluadas, se utilizó la técnica de cromatografía de capa fina (TLC, del inglés *Thin Layer Chromatography*) en placas de celulosa. Para ello, en un primer paso se realizó la hidrólisis ácida de los TC para convertirlos en antocianinas (de allí el nombre de proantocianidinas: las prodelfinidinas rendirán delfinidinas y las procianidinas rendirán cianidina). Para la hidrólisis se tomó una alícuota de 10 mg de material seco y molido y se colocó en un tubo para microcentrífuga de 1,5 ml con 200 μ l de SDS 1% y 1,2 ml de n-butanol/HCl (19/1). Luego se incubó durante 90 minutos a 95°C, se centrifugó durante 30 segundos a 9000 rpm y con posterioridad se extrajo el sobrenadante traspasándolo a un nuevo tubo de 1,5 ml donde se lo secó. Posteriormente, el precipitado se resuspendió en HCl 2N y se incubó 10 minutos en agitación a 75°C. Por último, para separar las antocianinas se agregaron 60 μ l de alcohol isoamílico, se agitó y se centrifugó durante 30 segundos a 9000 rpm. La fase superior (que contiene las antocianinas) se extrajo a un nuevo tubo el cual fue almacenado en oscuridad a -20°C para su posterior análisis mediante TLC. La TLC se llevó a cabo en un solo sentido utilizando como solvente agua/ácido fórmico/ácido clorhídrico (10/30/3) siguiendo la metodología propuesta por Nybom (Nybom 1964).

La muestra se sembró en el extremo inferior de la placa de celulosa. Para ello, la siembra se realizó en alícuotas de 1 µl y repitiéndose cinco veces y dejando secar entre siembras. Luego la placa se introdujo en una cuba para TLC saturada con el solvente. La separación se dio por concluida, una vez que el frente húmedo alcanzó la parte superior de la placa. Las antocianinas pudieron ser observadas a simple vista. Como patrones de referencia se utilizaron cianidina y delfinidina puras (Sigma-Aldrich).

5.3.5. Determinación de nitrógeno.

Los niveles de nitrógeno totales fueron estimados a través de la concentración de N-Kjeldahl. Para ello se realizó la determinación a partir de una alícuota de 50 mg de material seco y molido mediante la técnica propuesta por Nelson y Sommers (Nelson y Sommers 1973) la cual consta de tres pasos: digestión, destilación y por último titulación. Para la digestión se colocó la muestra en tubos Pirex[®] y se añadieron 4 ml de H₂SO₄ y una “punta de espátula” del catalizador (K₂SO₄/CuSO₄ 1/15 p/p). La mezcla fue digerida durante 5 minutos a 460°C. Luego se agregaron 10 ml de H₂O₂ y se digirió 1 minuto más a 460°C. Luego de la digestión, se completó el volumen de la muestra hasta 50 ml con agua miliQ y de allí se tomó una alícuota de 10 ml para la destilación.

En el destilador se colocaron los 10 ml de la muestra digerida y se agregaron 3 ml de hidróxido de sodio para neutralizar la muestra. La destilación se realizó durante 5 minutos y el destilado obtenido fue recogido dentro de un erlenmeyer conteniendo 10 ml de ácido bórico y un indicador para titulación (verde de bromocresol y rojo de metilo).

Por último, la titulación se realizó con H₂SO₄ 0,004 N y los valores se refirieron a ppm de N mediante una curva de calibración construida con glicina digerida y destilada de la misma manera que las muestras.

5.3.6. Diseño experimental y análisis estadístico.

En los primeros ensayos con las plantas transgénicas de *L. corniculatus* se utilizó un diseño completamente aleatorizado con dos factores; el primer factor correspondió con el tratamiento y constaba de cuatro niveles (control sin inocular, inoculado con NZP2213, inoculado con NZP2037 e inoculado con NZP2309); el segundo factor correspondió con el genotipo y constaba de cuatro niveles también (121.1, Sn6, Sn9 y Sn10). Se utilizaron 6 repeticiones para cada genotipo x tratamiento las cuales consistían en una planta clonada cultivada en una jarra Leonard. Para los otros ensayos realizados en diferentes especies de *Lotus*, se utilizó un diseño completamente al azar con dos factores de manera similar a los anteriores. Sin embargo, para el primer factor que correspondió con el tratamiento se utilizaron solamente tres niveles (control sin inocular, inoculado con NZP2213 e inoculado con NZP2309); el segundo factor correspondió con la especie y presentó 4 niveles (*L. tenuis* “Pampa INTA”, *L. corniculatus* “charlii”, *L. uliginosus* “Maku” y *L. tenuis* x *L. corniculatus* 2). Se utilizaron 6 repeticiones para cada tratamiento x especie y cada repetición se encontraba constituida por una planta clonada cultivada en una jarra Leonard. Para todos los casos, la homogeneidad de varianzas se comprobó a través de la prueba de Levene y la distribución normal de las observaciones a través de la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks. El análisis se realizó a través de un ANOVA de dos vías con un nivel de confianza del 95% y para aquellos casos en que se observó diferencias significativas se

realizó el test de comparaciones múltiples de Duncan con un nivel de confianza del 95%. Para todos los análisis se utilizó el programa InfoStat (Di Rienzo *et al.* 2011).

5.4. Resultados.

5.4.1. Ensayos realizados con las plantas transgénicas de *L. corniculatus*.

Mediante una estimación visual en el momento de la cosecha del ensayo, se pudo observar que todos los genotipos inoculados con las cepas NZP2309 y los clones sin inocular, presentaban un aspecto clorótico en relación con aquellos clones inoculados con las cepas NZP2213 y NZP2037 (Figura 5.2 A). Luego de retirar los clones de las jarras Leonard, se pudo observar que aquellos que se encontraban bajo tratamiento control (sin inocular) no formaron nódulos, lo cual indicaba ausencia de contaminación. Al mismo tiempo, se observó que los clones inoculados con la cepa NZP2213, así como los inoculados con las cepas NZP2037 y NZP2309, presentaban numerosos nódulos. Asimismo, pudo observarse que los nódulos formados por las cepas NZP2213 y NZP2037 presentaban color rosado (Figura 5.2 B), mientras que aquellos formados por la cepa NZP2309, eran de color blanquecino y de menor tamaño relativo (Figura 5.2 C).

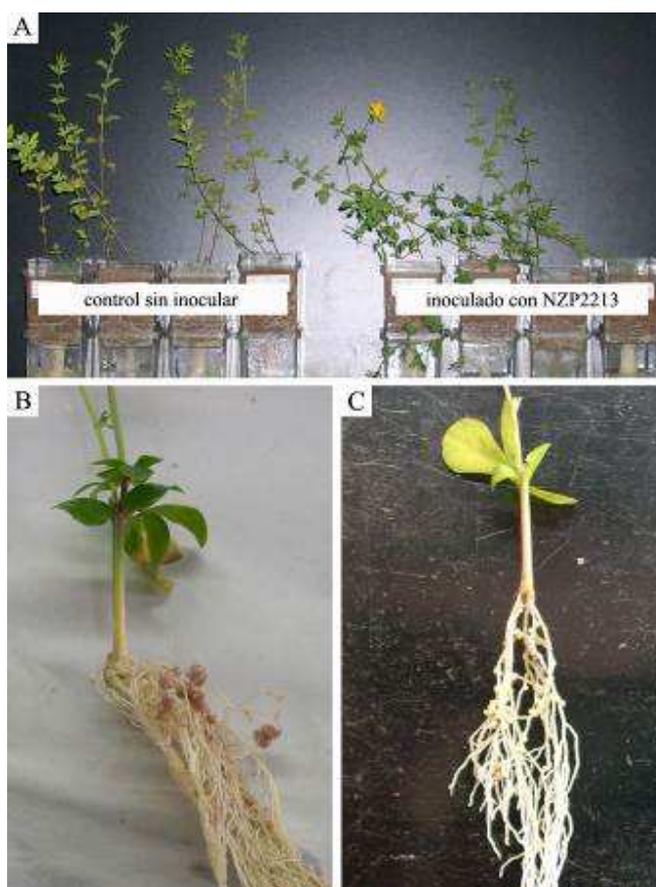


Figura 5.2. A. Ejemplo de clones bajo tratamiento control sin inocular y tratamiento inoculado con la cepa NZP2213. B. Ejemplo de nódulos formados por la cepa NZP2213. C. Ejemplo de nódulos formados por la cepa NZP2309.

Por otra parte, no se observó interacción significativa entre el genotipo x tratamiento para la longitud del tallo principal ($F=0,93$; $p=0,51$), tampoco para el peso seco del vástago ($F=0,88$; $p=0,55$). Si bien para los clones de los distintos genotipos se observaron diferencias en el largo del tallo principal ($F=20,54$; $p<0,0001$), simultáneamente no fue posible observar diferencias entre los mismos para el peso seco del vástago ($F=1,43$; $p=0,25$). Finalmente, se observaron diferencias debidas al tratamiento, tanto para la longitud del tallo principal ($F=19,09$; $p<0,0001$) como para el peso seco del vástago ($F=10,58$; $p=0,0001$). Los valores obtenidos para estos dos parámetros pueden observarse en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2. Altura y peso seco del vástago de los diferentes genotipos transgénicos de *L. corniculatus*. Prueba de Duncan, dentro de cada bloque gris medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p<0,05$).

Longitud del tallo principal (cm)					
Genotipo	Control (media \pm d.e.)	NZP2037 (media \pm d.e.)	NZP2213 (media \pm d.e.)	NZP2309 (media \pm d.e.)	Promedio genotipos (media \pm d.e.)
121.1	17,33 \pm 4,60	22,33 \pm 1,36	25,06 \pm 4,55	15,06 \pm 0,35	19,94 \pm 5,00 c
Sn10	12,67 \pm 2,03	15,89 \pm 3,25	21,61 \pm 2,84	14,83 \pm 2,33	16,25 \pm 4,13 b
Sn6	10,83 \pm 1,26	12,50 \pm 5,77	15,83 \pm 1,48	10,22 \pm 2,06	12,35 \pm 3,56 a
Sn9	10,89 \pm 1,06	11,56 \pm 0,86	16,72 \pm 0,79	11,56 \pm 1,67	12,68 \pm 2,64 a
Tratamiento					Promedio tratamientos (media \pm d.e.)
Control					12,93 \pm 3,57 a
NZP2037					15,57 \pm 5,28 b
NZP2213					19,81 \pm 4,59 c
NZP2309					12,92 \pm 2,65 a
Peso de vástago (g/planta)					
Genotipo	Control (media \pm d.e.)	NZP2037 (media \pm d.e.)	NZP2213 (media \pm d.e.)	NZP2309 (media \pm d.e.)	Promedio genotipos (media \pm d.e.)
121.1	0,06 \pm 0,03	0,12 \pm 0,04	0,14 \pm 0,05	0,10 \pm 0,02	0,11 \pm 0,04 a
Sn10	0,08 \pm 0,01	0,13 \pm 0,02	0,17 \pm 0,04	0,10 \pm 0,04	0,12 \pm 0,04 a
Sn6	0,09 \pm 0,01	0,10 \pm 0,01	0,13 \pm 0,03	0,10 \pm 0,02	0,11 \pm 0,02 a
Sn9	0,08 \pm 0,01	0,11 \pm 0,00	0,11 \pm 0,02	0,10 \pm 0,01	0,10 \pm 0,02 a
Tratamiento					Promedio tratamientos (media \pm d.e.)
Control					0,08 \pm 0,02 a
NZP2037					0,12 \pm 0,02 bc
NZP2213					0,14 \pm 0,04 c
NZP2309					0,10 \pm 0,02 b

Cabe destacar que los clones de todos los genotipos inoculados con la cepa NZP2213 presentaron una mayor longitud del tallo principal y mayor peso seco del vástago en relación al tratamiento inoculado con la cepa NZP2309 y el control sin inocular, y que los clones inoculados con la cepa NZP2037 presentaron valores intermedios para estos mismos parámetros.

Por otra parte, en el análisis del número de nódulos (dejando de lado el tratamiento control que no presentó nódulos) no se observó interacción tratamiento x genotipo significativa ($F=0,37$; $p=0,89$) y tampoco se observaron diferencias debido al genotipo ($F=0,33$; $p=0,80$). Sin embargo, sí pudieron observarse diferencias debidas al tratamiento ($F=50,46$; $p<0,0001$). En este sentido se observó que los clones inoculados con la cepa NZP2309

formaron un número de nódulos mayor al formado por los clones inoculados con las cepas NZP2213 y NZP2037. Los valores obtenidos pueden observarse en la Tabla 5.3.

Tabla 5.3. Número de nódulos formados en raíces de los diferentes genotipos transgénicos de *L. corniculatus*. Prueba de Duncan, dentro de cada bloque gris medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Número de nódulos por planta				
Genotipo	NZP2037 (media \pm d.e.)	NZP2213 (media \pm d.e.)	NZP2309 (media \pm d.e.)	Promedio genotipos (media \pm d.e.)
121.1	68,67 \pm 18,34	60,00 \pm 26,27	152,33 \pm 54,81	93,67 \pm 54,39 a
Sn10	56,67 \pm 25,01	71,11 \pm 14,17	179,56 \pm 51,52	102,44 \pm 65,22 a
Sn6	63,44 \pm 28,32	60,33 \pm 17,33	160,89 \pm 25,68	94,89 \pm 53,78 a
Sn9	48,89 \pm 5,42	45,56 \pm 13,62	171,00 \pm 36,38	88,48 \pm 64,94 a
			Tratamiento	Promedio tratamientos (media \pm d.e.)
			NZP2037	59,42 \pm 19,65 a
			NZP2213	59,25 \pm 18,45 a
			NZP2309	165,94 \pm 38,78 b

Para el contenido de TC en raíces se observó una interacción tratamiento x genotipo significativa ($F=16,14$; $p < 0,0001$) y también se observaron diferencias entre genotipos ($F=497,4$; $p < 0,0001$) y entre tratamientos ($F=215,8$; $p < 0,0001$). Del análisis de los diferentes genotipos dentro de cada tratamiento, se pudo determinar que en general, los clones del genotipo Sn10 presentaron niveles de TC en raíces marcadamente superiores a los encontrados en los clones de los demás genotipos. Asimismo, pudo determinarse que los clones de los genotipos Sn6 y Sn9 presentaron niveles similares a los del genotipo 121.1 (Tabla 5.4). Por otra parte, se observó que todos los genotipos de los clones inoculados con la cepa NZP2213, presentaron menores contenidos de TC en raíces, que aquellos inoculados con la cepa NZP2309 (Tabla 5.4).

Tabla 5.4. Contenido de TC en raíces de los diferentes genotipos de *L. corniculatus*. Prueba de Duncan, dentro de cada bloque gris medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Genotipo	Tratamiento	mg TC/g MS (media \pm d.e.)	Tratamiento	Genotipo	mg TC/g MS (media \pm d.e.)
121.1	Control	2,78 \pm 1,79 a	Control	121.1	2,78 \pm 1,79 a
	NZP2213	1,83 \pm 0,23 a		Sn10	27,42 \pm 1,43 b
	NZP2309	5,82 \pm 0,67 b		Sn6	5,48 \pm 1,35 a
Sn10	Control	27,42 \pm 1,43 b	NZP2213	Sn9	4,92 \pm 3,26 a
	NZP2213	7,42 \pm 0,29 a		121.1	1,83 \pm 0,23 a
	NZP2309	22,95 \pm 4,16 b		Sn10	7,42 \pm 0,29 b
Sn6	Control	5,48 \pm 1,35 b	NZP2309	Sn6	1,93 \pm 0,66 a
	NZP2213	1,93 \pm 0,66 a		Sn9	1,98 \pm 0,4 a
	NZP2309	7,87 \pm 2,17 b		121.1	5,82 \pm 0,67 a
Sn9	Control	4,92 \pm 3,26 ab	NZP2309	Sn10	22,95 \pm 4,16 b
	NZP2213	1,98 \pm 0,4 a		Sn6	7,87 \pm 2,17 a
	NZP2309	7,53 \pm 1,71 b		Sn9	7,53 \pm 1,71 a

En general, se observaron diferencias en el patrón de tinción de TC en los nódulos formados por las diferentes cepas. En relación a ello, se observó que en los nódulos formados en clones inoculados con la cepa NZP2213 y NZP2037, los TC se ubicaron de forma aleatoria en la superficie del nódulo, pudiendo observarse incluso el centro de color rosado (Figura 5.3 B y C). Por su parte, en los nódulos formados por la cepa NZP2309 se observó una mayor densidad de TC en la superficie del nódulo (Figura 5.3 D).

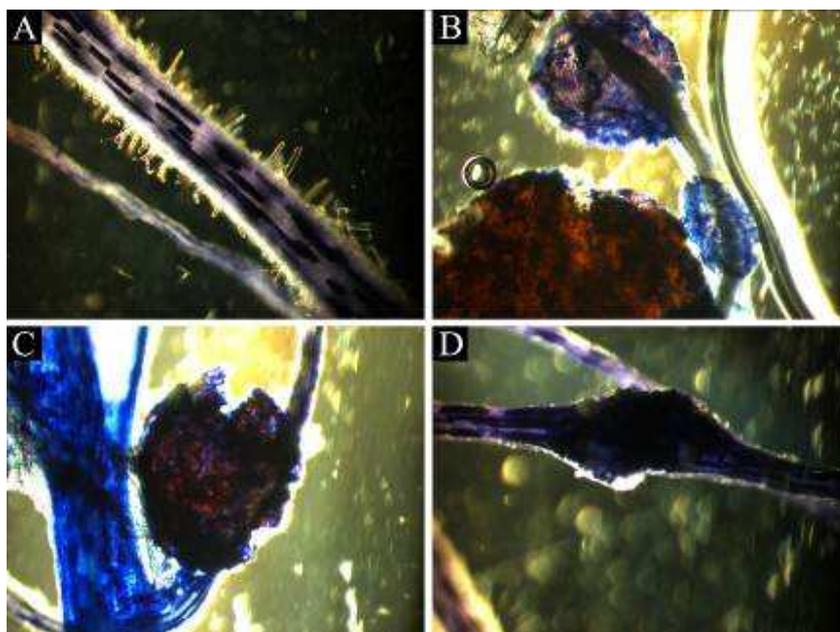


Figura 5.3. Tinción de TC en raíces, como ejemplo se muestran raíces y nódulos de clones del genotipo Sn10. **A.** Tratamiento control sin inocular; **B.** Tratamiento inoculado con la cepa NZP2213; **C.** Tratamiento inoculado con la cepa NZP2037; **D.** Tratamiento inoculado con la cepa NZP2309.

5.4.2. Ensayos realizados con diferentes especies de *Lotus*.

Al igual que en los ensayos realizados en las plantas transgénicas, se observó al momento de la cosecha que los clones de *L. corniculatus* “charlii”, *L. tenuis* “Pampa INTA” y *L. tenuis* x *L. corniculatus* 2 bajo tratamiento control e inoculado con la cepa NZP2309, presentaban un aspecto clorótico en relación a los clones inoculados con la cepa NZP2213. De manera contraria, para clones de *L. uliginosus* se observó aspecto clorótico en aquellos inoculados con la cepa NZP2213 en relación a los inoculados con la cepa NZP2309 (Figura 5.4).

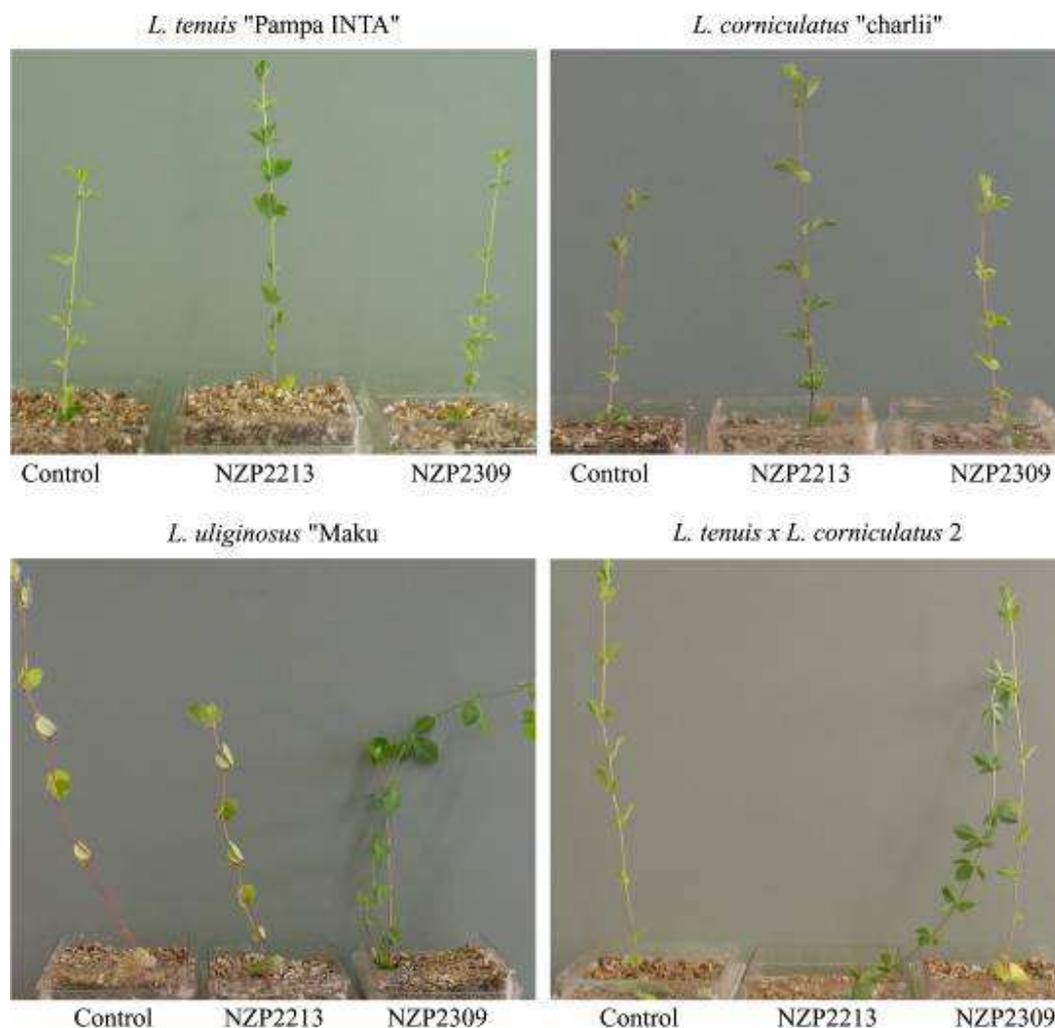


Figura 5.4. Plantas de *Lotus* spp. bajo tres tratamientos: Control: sin inocular; NZP2213: inoculado con la cepa NZP2213; NZP2309: inoculado con la cepa NZP2309.

5.4.2.1. Contenido foliar de nitrógeno.

Para el contenido de nitrógeno en vástago se observó una interacción tratamiento x genotipo significativa ($F=17,02$; $p<0,0001$). Por un lado, y al analizar el contenido de nitrógeno dentro de cada genotipo, se observaron diferencias debido al tratamiento para los clones de *L. corniculatus* ($p=0,019$), *L. tenuis* x *L. corniculatus* 2 ($p=0,001$) y *L. tenuis* ($p=0,003$). Aquellos genotipos inoculados con la cepa NZP2213 presentaron niveles de nitrógeno más elevados en relación al tratamiento control y al genotipo inoculado con la cepa NZP2309. Por el contrario, si bien se observaron diferencias en el contenido de nitrógeno en clones de *L. uliginosus* debidas al tratamiento ($p=0,002$), se determinaron mayores contenidos en los clones inoculados con la cepa NZP2309, en comparación con el tratamiento control y con el tratamiento de inoculación con la cepa NZP2213 (Figura 5.5. A). Por otro lado, se observaron diferencias entre los genotipos dentro de cada tratamiento ($p<0,05$). En este sentido, y para los clones inoculados con la cepa NZP2309, se observaron

valores superiores y similares para los genotipos *L. tenuis* y *L. uliginosus* en comparación con los observados en *L. corniculatus* y el híbrido interespecífico. Estas diferencias se modificaron cuando las plantas se encontraban bajo tratamiento control sin el agregado de nitrógeno, donde *L. uliginosus* y el híbrido interespecífico presentaron valores inferiores mientras que *L. tenuis* el más elevado, siendo intermedio en *L. corniculatus*. Por último en plantas inoculadas con la cepa NZP2213, los contenidos superiores se observaron en *L. tenuis* y los menores en *L. uliginosus*, resultando intermedios en *L. corniculatus* y en las plantas híbridas (Figura 5.5 B).

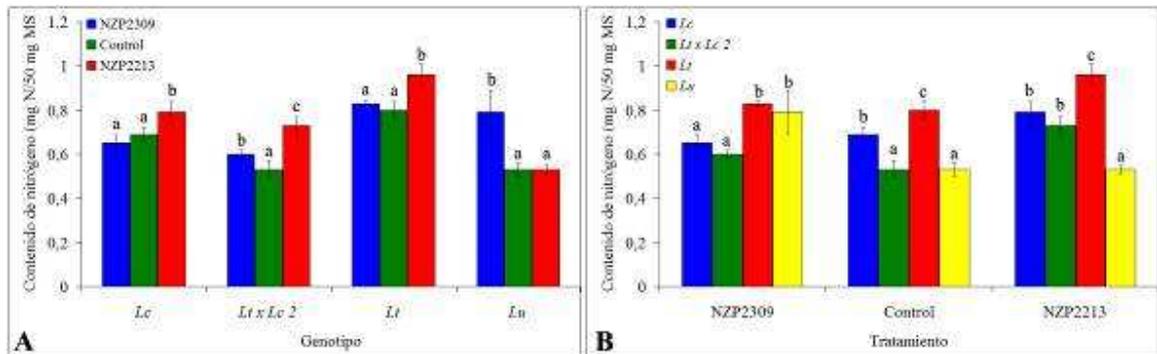


Figura 5.5. Contenido de nitrógeno en vástago de los diferentes genotipos de *Lotus* spp. Lc: *L. corniculatus* “charlii”, Lt x Lc 2: *L. tenuis* x *L. corniculatus* 2, Lt: *L. tenuis* “Pampa INTA”, Lu: *L. uliginosus*. **A.** comparación entre tratamientos. **B.** comparación entre genotipos. Prueba de Duncan, dentro de cada gráfico medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

5.4.2.2. Parámetros de crecimiento.

Para el peso seco del vástago se observó interacción tratamiento x genotipo significativa ($F=3,68$; $p=0,004$). Del análisis de este parámetro para los distintos tratamientos dentro de cada genotipo se observó que no todos los genotipos evaluados presentaron diferencias causadas por el tratamiento. En este sentido, se observó que los clones de *L. corniculatus* “charlii” ($F=2,57$; $p=0,11$) y *L. tenuis* x *L. corniculatus* 2 ($F=0,52$; $p=0,61$) presentaron similar peso seco del vástago bajo los tres tratamientos. Sin embargo, en los clones de *L. tenuis* sí pudieron observarse diferencias ($F=3,84$; $p=0,04$) al igual que para los clones de *L. uliginosus* ($F=6$; $p=0,01$). Por otra parte, del análisis de los genotipos dentro de cada tratamiento se observaron diferencias para el tratamiento control ($F=16,84$; $p < 0,0001$) y el inoculado con la cepa NZP2309 ($F=8,22$; $p=0,0009$). Por el contrario, no se observaron diferencias para los genotipos bajo tratamiento inoculado con NZP2213 ($F=3,08$; $p=0,051$). Los resultados obtenidos pueden observarse en la Tabla 5.5.

Tabla 5.5. Peso seco de vástago de los diferentes materiales de *Lotus* evaluados. Valores expresados en gramos. Prueba de Duncan, dentro de cada bloque gris medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Genotipo	Tratamiento	Peso seco (media \pm d.e.)	Tratamiento	Genotipo	Peso seco (media \pm d.e.)
<i>L. corniculatus</i>	NZP2309	0,39 \pm 0,11 a	NZP2309	<i>L. corniculatus</i>	0,39 \pm 0,11 b
	Control	0,25 \pm 0,09 a		<i>Lt x Lc 2</i>	0,41 \pm 0,10 b
	NZP2213	0,44 \pm 0,21 a		<i>L. tenuis</i>	0,18 \pm 0,05 a
<i>Lt x Lc 2</i>	NZP2309	0,41 \pm 0,10 a	Control	<i>L. uliginosus</i>	0,59 \pm 0,24 c
	Control	0,48 \pm 0,11 a		<i>L. corniculatus</i>	0,25 \pm 0,09 a
	NZP2213	0,46 \pm 0,15 a		<i>Lt x Lc 2</i>	0,48 \pm 0,11 c
<i>L. tenuis</i>	NZP2309	0,18 \pm 0,05 a	NZP2213	<i>L. tenuis</i>	0,19 \pm 0,03 a
	Control	0,19 \pm 0,03 ab		<i>L. uliginosus</i>	0,35 \pm 0,02 b
	NZP2213	0,25 \pm 0,06 b		<i>L. corniculatus</i>	0,44 \pm 0,21 a
<i>L. uliginosus</i>	NZP2309	0,59 \pm 0,24 b	NZP2213	<i>Lt x Lc 2</i>	0,46 \pm 0,15 a
	Control	0,35 \pm 0,02 a		<i>L. tenuis</i>	0,25 \pm 0,06 a
	NZP2213	0,32 \pm 0,07 a		<i>L. uliginosus</i>	0,32 \pm 0,07 a

5.4.2.3. Nódulos.

Se observó que los nódulos formados por la cepa NZP2213 en los materiales *L. tenuis* “Pampa INTA”, *L. corniculatus* “charlii” y *L. tenuis* x *L. corniculatus* 2 eran en general de color rojizo y algunos pocos de color verde. Para los nódulos formados en clones de estos mismos genotipos pero con la cepa NZP2309, se observaron diferencias según el genotipo que se evaluó, ya que para los clones de *L. tenuis* inoculados con esta cepa, los nódulos formados resultaron en su totalidad de color blanco. En los clones de *L. corniculatus* “charlii” y *L. tenuis* x *L. corniculatus* 2, la mayor proporción resultaron blancos, pero también fue posible observar un número significativo de nódulos de color rojizo. Por otra parte, para los clones de *L. uliginosus* los nódulos formados por la cepa NZP2039 resultaron rojizos y en algunos casos de color rojo intenso, mientras que los formados por la cepa NZP2213 eran en su mayoría de color blanco. Los nódulos formados por la cepa NZP2309 en los distintos materiales pueden observarse en la Figura 5.6.

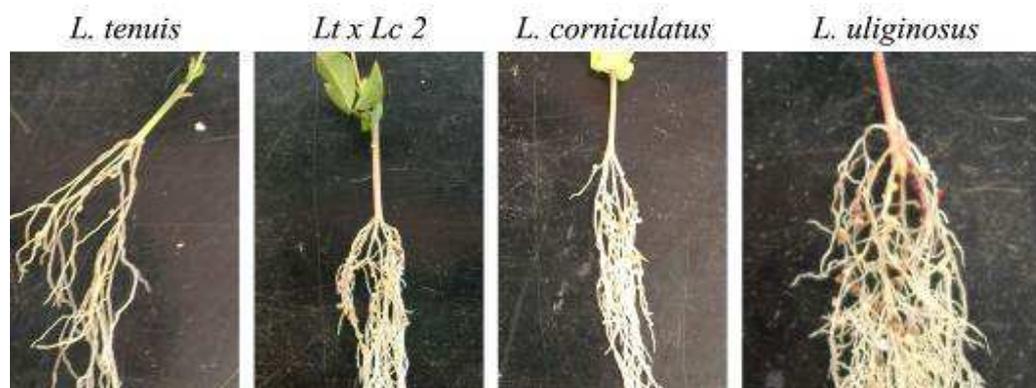


Figura 5.6. Raíces de *Lotus* spp. en donde se pueden observar los nódulos formados por la cepa NZP2309.

En cuanto al número de nódulos, se observó que todas las plantas sin inocular (controles) se encontraban desprovistas de nódulos. Al evaluar el número de nódulos en los clones bajo los tratamientos inoculados se observó interacción tratamiento x genotipo significativa ($F=7,58$; $p=0,0004$). Del análisis del efecto del tratamiento dentro de cada genotipo se observaron diferencias para los clones de *L. corniculatus*, *L. tenuis* y *L. uliginosus* ($p<0,01$). En este sentido cabe destacar que en los clones de *L. corniculatus*, al igual que para los de *L. uliginosus* se observó un mayor número de nódulos en aquellos inoculados con la cepa NZP2309 en relación a los inoculados con la cepa NZP2213. Lo contrario pudo observarse en los clones de *L. tenuis*, donde se observó un menor número de nódulos en aquellos inoculados con la cepa NZP2309 en relación a los inoculados con la cepa NZP2213. Al mismo tiempo, pudo determinarse que en los clones de *L. tenuis* x *L. corniculatus* 2 no se observaron diferencias debidas al tratamiento para este parámetro ($F=16,33$; $p=0,91$). Los datos obtenidos pueden ser observados en la Tabla 5.6.

Tabla 5.6. Número de nódulos en *Lotus* spp. inoculados con dos tipos de cepas (NZP2309 y NZP2213). Prueba de Duncan, dentro de cada bloque gris medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p<0,05$).

Genotipo	Tratamiento	N° nodulos (media \pm d.e.)	Tratamiento	Genotipo	N° nodulos (media \pm d.e.)
<i>L. corniculatus</i>	NZP2309	55,50 \pm 20,32 b	NZP2309	<i>L. corniculatus</i>	55,50 \pm 20,32 b
	NZP2213	26,33 \pm 9,42 a		<i>Lt x Lc 2</i>	78,33 \pm 26,90 b
<i>Lt x Lc 2</i>	NZP2309	78,33 \pm 26,90 a		<i>L. tenuis</i>	6,67 \pm 7,06 a
	NZP2213	76,00 \pm 39,43 a		<i>L. uliginosus</i>	71,67 \pm 26,95 b
<i>L. tenuis</i>	NZP2309	6,67 \pm 7,06 a	NZP2213	<i>L. corniculatus</i>	26,33 \pm 9,42 a
	NZP2213	42,17 \pm 24,36 b		<i>Lt x Lc 2</i>	76,00 \pm 39,43 b
<i>L. uliginosus</i>	NZP2309	71,67 \pm 26,95 b		<i>L. tenuis</i>	42,17 \pm 24,36 a
	NZP2213	23,00 \pm 7,46 a		<i>L. uliginosus</i>	23,00 \pm 7,46 a

5.4.2.4. Contenido de taninos condensados.

Para el contenido total de TC en raíces a las que se les retiraron previamente los nódulos, se observó interacción tratamiento x genotipo significativa ($F=2,64$; $p=0,024$). Se pudo determinar que el tratamiento no afectó los niveles de TC totales en raíces de los clones de *L. corniculatus*, *L. tenuis* x *L. corniculatus* 2 y *L. uliginosus* ($p<0,05$). Por su parte, para los clones de *L. tenuis*, sí pudieron observarse diferencias debido al tratamiento ($F=5,3$; $p=0,018$). En clones de este genotipo, las raíces que fueron inoculadas con la cepa NZP2309 presentaron un mayor contenido de TC que aquellas inoculadas con la cepa NZP2213. Por otra parte, se observaron diferencias entre genotipos bajo tratamiento control ($F=3,45$; $p=0,036$), inoculado con la cepa NZP2309 ($F=7,68$; $p=0,001$) e inoculado con la cepa NZP2213 ($F=13,66$; $p<0,0001$). Los valores obtenidos pueden observarse en la Tabla 5.7.

Tabla 5.7. Contenido de TC totales en raíces de *Lotus* spp. evaluados bajo tratamiento control, inoculado con NZP2309 e inoculado con NZP2213. Prueba de Duncan, dentro de cada bloque gris medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Genotipo	Tratamiento	TC totales (mg/g MS) (media \pm d.e.)	Tratamiento	Genotipo	TC totales (mg/g MS) (media \pm d.e.)
<i>L. corniculatus</i>	NZP2309	5,96 \pm 1,15 a	NZP2309	<i>L. corniculatus</i>	5,96 \pm 1,15 c
	Control	5,15 \pm 2,07 a		<i>Lt x Lc 2</i>	4,54 \pm 0,70 bc
	NZP2213	5,11 \pm 1,44 a		<i>L. tenuis</i>	2,93 \pm 0,59 a
<i>Lt x Lc 2</i>	NZP2309	4,54 \pm 0,70 a	Control	<i>L. uliginosus</i>	3,03 \pm 2,06 ab
	Control	3,80 \pm 0,62 a		<i>L. corniculatus</i>	5,15 \pm 2,07 b
	NZP2213	3,56 \pm 0,95 a		<i>Lt x Lc 2</i>	3,80 \pm 0,62 ab
<i>L. tenuis</i>	NZP2309	2,93 \pm 0,59 b	NZP2213	<i>L. tenuis</i>	2,56 \pm 0,69 a
	Control	2,56 \pm 0,69 ab		<i>L. uliginosus</i>	4,78 \pm 2,05 b
	NZP2213	1,88 \pm 0,37 a		<i>L. corniculatus</i>	5,11 \pm 1,44 c
<i>L. uliginosus</i>	NZP2309	3,03 \pm 2,06 a	NZP2213	<i>Lt x Lc 2</i>	3,56 \pm 0,95 b
	Control	4,78 \pm 2,05 a		<i>L. tenuis</i>	1,88 \pm 0,37 a
	NZP2213	5,36 \pm 1,20 a		<i>L. uliginosus</i>	5,36 \pm 1,20 c

Por otra parte, para el contenido de TC en los nódulos se pudo observar una interacción significativa entre el tratamiento x genotipo ($F=28,26$; $p < 0,0001$). Por un lado, para todos los genotipos evaluados se observaron diferencias en el contenido de TC del nódulo en función a la cepa utilizada ($p < 0,05$). En este sentido se observó que cuando los clones de *L. corniculatus*, *L. tenuis* x *L. corniculatus* 2 y *L. tenuis* fueron inoculados con la cepa NZP2213, el contenido de TC del nódulo formado fue inferior que en aquellos formados por la cepa NZP2309 para el mismo genotipo, mientras que lo contrario pudo ser observado en los clones de *L. uliginosus*, donde los valores inferiores fueron determinados en aquellos nódulos formados por la cepa NZP2309. Por otra parte, se observaron diferencias en el nivel de TC de los nódulos formados por los clones de los distintos genotipos evaluados tanto para la cepa NZP2309 ($F=6,38$; $p=0,005$) como para la cepa NZP2213 ($F=85,91$; $p < 0,0001$). Los valores de TC en nódulos pueden observarse en la Tabla 6.8.

Tabla 5.8. Contenido de TC en nódulos de los diferentes materiales de *Lotus* spp. inoculados con las cepas NZP2213 y NZP2309. Prueba de Duncan, dentro de cada bloque gris medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Genotipo	NZP2213	NZP2309	p-valor
	(media \pm d.e.)	(media \pm d.e.)	NZP2213 vs NZP2309
<i>L. corniculatus</i>	3,14 \pm 2,89 a	6,76 \pm 2,19 a	0,0347
<i>Lt x Lc 2</i>	2,89 \pm 1,32 a	15,78 \pm 5,90 b	0,0004
<i>L. tenuis</i>	1,35 \pm 0,32 a	8,13 \pm 2,47 a	0,0007
<i>L. uliginosus</i>	25,54 \pm 4,10 b	11,51 \pm 0,55 ab	0,0009

Por último, también se evaluó el contenido de TC en vástago. En este caso, a diferencia de los anteriores, la interacción tratamiento x genotipo no fue significativa para TC solubles ($F=1,9$; $p=0,1$), insolubles ($F=0,48$; $p=0,8$) y totales ($F=0,83$; $p=0,5$). Tampoco se observaron diferencias significativas para los diferentes tratamientos (TC solubles $F=1,17$; $p=0,3$; insolubles $F=0,02$; $p=0,9$ y totales $F=0,07$; $p=0,9$), aunque si se observaron

diferencias significativas entre los clones de los distintos genotipos para el contenido de TC solubles ($F=164,1$; $p<0,0001$), insolubles ($F=64,3$; $p<0,0001$) y totales ($F=94,1$; $p<0,0001$). Los contenidos foliares de TC en todos los casos fueron superiores en los clones de *L. uliginosus* “Maku” y *L. corniculatus* “charlii” e inferiores en *L. tenuis* “Pampa INTA”, mientras que los clones del genotipo *L. tenuis* x *L. corniculatus* 2 presentaron niveles intermedios (Tabla 5.9).

Tabla 5.9. Contenido de TC en vástago de los diferentes materiales de *Lotus* spp. evaluados bajo tratamiento control, inoculados con la cepa NZP2309 e inoculados con la cepa NZP2213. Prueba de Duncan, dentro de cada bloque gris medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p<0,05$).

Genotipo	TC solubles (mg/g MS)			Promedio genotipos
	Control	NZP2309	NZP2213	
<i>L. corniculatus</i>	1,98 ± 1,21	1,83 ± 1,16	1,96 ± 1,83	1,91 ± 1,32 b
<i>L. tenuis</i>	0,04 ± 0,04	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,02 a
<i>Lt x Lc 2</i>	0,05 ± 0,01	0,12 ± 0,06	0,03 ± 0,02	0,07 ± 0,05 a
<i>L. uliginosus</i>	12,99 ± 4,79	12,52 ± 3,14	12,71 ± 4,54	7,53 ± 1,69 c
Genotipo	TC insolubles (mg/g MS)			Promedio genotipos
	Control	NZP2309	NZP2213	
<i>L. corniculatus</i>	17,87 ± 1,24	17,46 ± 1,59	18,67 ± 0,11	17,96 ± 1,23 d
<i>L. tenuis</i>	0,39 ± 0,02	0,29 ± 0,02	0,61 ± 0,22	0,49 ± 0,20 a
<i>Lt x Lc 2</i>	7,86 ± 2,55	9,56 ± 2,42	7,14 ± 1,27	8,19 ± 2,28 b
<i>L. uliginosus</i>	7,91 ± 1,35	6,09 ± 1,74	8,59 ± 0,96	12,74 ± 3,97 c
Genotipo	TC totales (mg/g MS)			Promedio genotipos
	Control	NZP2309	NZP2213	
<i>L. corniculatus</i>	19,85 ± 2,07	19,29 ± 1,04	20,62 ± 1,87	19,88 ± 1,66 c
<i>L. tenuis</i>	0,44 ± 0,06	0,32 ± 0,02	0,64 ± 0,23	0,52 ± 0,21 a
<i>Lt x Lc 2</i>	7,92 ± 2,56	9,68 ± 2,45	7,18 ± 1,28	8,26 ± 2,31 b
<i>L. uliginosus</i>	20,90 ± 5,19	18,61 ± 4,69	21,30 ± 4,32	20,27 ± 4,62 c

5.4.2.5. Diferencias cualitativas de los taninos condensados.

Se evaluaron los tipos de TC predominantes en los clones de los diferentes genotipos bajo los tratamientos evaluados. Para las raíces sin nódulos de los clones de *L. tenuis*, *L. corniculatus* y *L. tenuis* x *L. corniculatus* 2 se observó que presentaban solamente TC del tipo de las procianidinas, mientras que para los clones de *L. uliginosus* se observó una diferencia en el tipo de TC según el tratamiento aplicado, ya que las raíces controles e inoculadas con la cepa NZP2213 presentaban TC del tipo de las prodelphinidinas y del tipo de las procianidinas en similares proporciones, mientras que en los clones inoculados con la cepa NZP2039 presentaron en sus raíces predominancia de TC del tipo de las procianidinas (Figura 5.7).

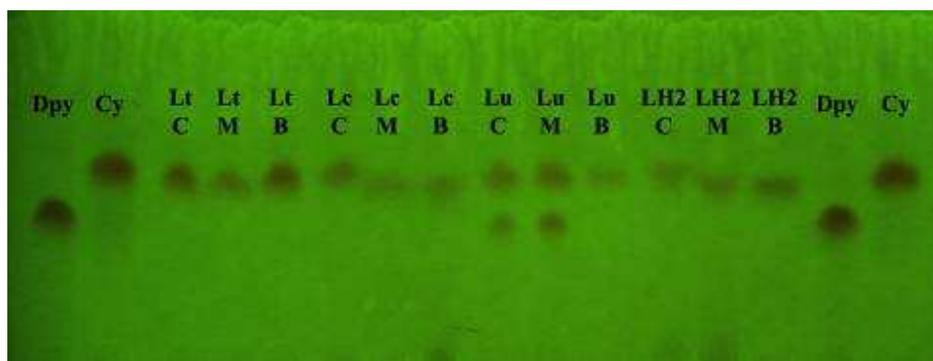


Figura 5.7. Cromatografía en capa fina de celulosa de los TC hidrolizados provenientes de raíces sin nódulos de los clones de los diferentes genotipos evaluados. Dpy: delfinidina; Cy: cianidina; C: control sin inocular; M: inoculado con la cepa NZP2213; B: inoculado con la cepa NZP2309; Lt: *L. tenuis*; Lc: *L. corniculatus*; Lu: *L. uliginosus*; LH2: *L. tenuis* x *L. corniculatus* 2.

Por otra parte, en los nódulos formados en raíces de los clones de los genotipos *L. tenuis*, *L. corniculatus* y *L. tenuis* x *L. corniculatus* 2 se observó una predominancia de TC del tipo de las procianidinas independientemente de la cepa inoculada, mientras que en los clones de *L. uliginosus* se observó que tanto los nódulos formados por la cepa NZP2213 como por NZP2309, presentaron TC de los dos tipos (procianidinas y prodelfinidinas), con una mayor predominancia de aquellas del tipo prodelfinidinas (Figura 5.8).

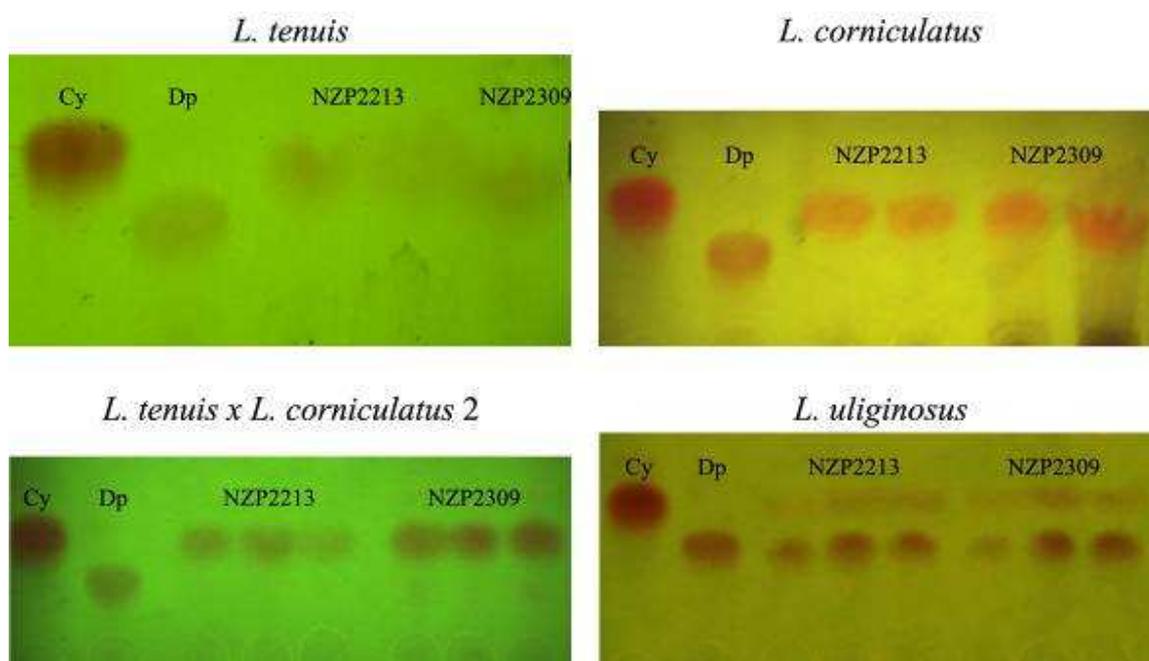


Figura 5.8. Cromatografía en capa fina de celulosa de los TC hidrolizados provenientes de nódulos de *Lotus* spp. Cy: cianidina; Dp: delfinidina; NZP2213: tratamiento inoculado con la cepa NZP2213; NZP2309: tratamiento inoculado con la cepa NZP2309.

5.5. Discusión.

Como fuera mencionado, algunos autores han propuesto que los niveles de TC se encuentran relacionados a la especificidad de la simbiosis (Pankhurst *et al.* 1979, Pankhurst y Jones 1979, Pankhurst *et al.* 1982), sin embargo esta hipótesis resulta objetable en el sentido de que se ha basado en resultados obtenidos mediante la utilización de diferentes especies del género *Lotus*. En este sentido, cabe la posibilidad de que las diferencias observadas por estos autores en la capacidad de tales especies para establecer simbiosis efectivas con determinados rizobios, no se debieran exclusivamente a su particular composición cuali/cuantitativa de TC, sino también a otros factores involucrados en la determinación de la especificidad de la simbiosis, no necesariamente relacionados con el metabolismo de estos polifenoles. La utilización de genotipos similares que solo presentan modificaciones en sus niveles y en la composición de TC, permite evitar la influencia de otros determinantes propios de la especie relacionados con la especificidad de la simbiosis y mejorar las evaluaciones del efecto de estos metabolitos. En este sentido, los materiales transgénicos utilizados en el presente trabajo constituyeron un material vegetal apropiado para evaluar si los niveles de TC afectan la nodulación. Si bien el contenido de TC en raíces (a diferencia del contenido foliar) de los genotipos Sn6 y Sn9 resultaron similares a los del genotipo 121.1, los mismos fueron marcadamente superiores para el genotipo Sn10, el cual presentó niveles incluso mayores a los observados en raíces de *L. uliginosus*.

Cuando estos genotipos fueron inoculados con las mismas cepas de referencia utilizadas en los trabajos previos (Pankhurst *et al.* 1979, Pankhurst y Jones 1979) se pudo observar la ausencia de interacción tratamiento x genotipo para los parámetros observados. Esto indicaría que independientemente del contenido de TC en raíces, los genotipos evaluados responden de la misma manera a la inoculación con diferentes cepas. En este sentido, los nódulos formados por la cepa NZP2309 resultaron marcadamente más numerosos, de menor tamaño y aspecto blanquecino, en relación con aquellos formados por la cepa NZP2213, los cuales presentaban un aspecto rojizo. Previamente, se ha reportado que el aspecto rojizo de los nódulos se encuentra relacionado generalmente con su capacidad fijadora de nitrógeno (Lodwig *et al.* 2003) y que la inoculación con cepas que forman nódulos pero que resultan inefectivos en la fijación de nitrógeno (denominadas “fix-“) resultan generalmente hipernodulantes (Lohar y VandenBosch 2005). Estas consideraciones, en conjunto con los resultados obtenidos en los parámetros de crecimiento, indican que los nódulos formados por la cepa NZP2309 en estos genotipos resultaron ineficientes para la fijación de nitrógeno. Por el contrario, los nódulos formados por la cepa NZP2213 resultaron eficientes para la fijación de nitrógeno.

Los resultados obtenidos se encuentran en concordancia con los reportes realizados con anterioridad para estas mismas cepas, ya que se ha observado que la cepa NZP2213 resulta de estrecho rango de hospedante y solo interacciona efectivamente con las especies *L. tenuis* y *L. corniculatus*, mientras que la cepa NZP2309 resulta también de estrecho rango pero interacciona efectivamente con *L. uliginosus* (Pankhurst 1970). Por último, similares conclusiones pueden elaborarse a partir de los resultados obtenidos en los ensayos realizados con clones de *L. tenuis*, *L. corniculatus*, *L. tenuis* x *L. corniculatus* 2 y *L. uliginosus* con estas dos cepas de estrecho rango.

Si bien algunos autores han sugerido que los TC ejercen un efecto bactericida, y que las bacterias de la cepa NZP2213 en particular, se encuentran afectadas por el nivel de los mismos (Pankhurst *et al.* 1982), cabe destacar que en los clones del genotipo Sn10 (los

cuales presentaban niveles de TC muy elevados en sus raíces), la formación de nódulos efectivos por parte de la cepa NZP2213 no se vio afectada, y tampoco modificó el efecto observado en presencia de la cepa NZP2309.

Lamentablemente, mediante la utilización de los genotipos transgénicos no pudo evaluarse la posible influencia de la composición de TC en la especificidad de la simbiosis, ya que estos genotipos presentaban TC cualitativamente similares. Como fuera mencionado anteriormente, se ha reportado que la relación procianidina/prodelfinidina podría encontrarse relacionada con la especificidad de la simbiosis (Pankhurst *et al.* 1979, Pankhurst y Jones 1979). En relación al efecto cualitativo de los TC, cabe destacar que para el genotipo “charlii” de *L. corniculatus* y los genotipos híbridos *L. tenuis* x *L. corniculatus*, se observó que a nivel foliar presentaron cierta predominancia de TC del tipo de las prodelfinidinas, aunque también se observó la presencia del tipo de las procianidinas, mientras que para *L. uliginosus* se observó únicamente la presencia de prodelfinidinas (Figura 5.9).

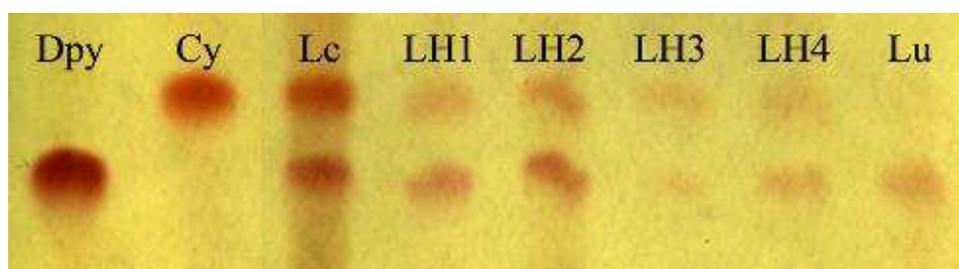


Figura 5.9. Cromatografía en capa fina de celulosa de los TC previamente hidrolizados provenientes de vástago de *Lotus* spp. Dpy: delfinidina; Cy: cianidina; Lc: *L. corniculatus* “charlii”; LH: *L. tenuis* x *L. corniculatus* 1, 2, 3 y 4; Lu: *L. uliginosus* “Maku”.

Sin embargo, a diferencia del vástago, al evaluar cualitativamente los TC de la raíces de los clones de *L. corniculatus* y *L. tenuis* x *L. corniculatus* 2, se observó que solamente presentaban TC del tipo de las procianidinas (Figura 5.8). Por otro lado, para los clones de *L. corniculatus* se observó una marcada diferencia en los niveles de TC entre el vástago y las raíces y además se determinó que los mismos formaban nódulos efectivos con la cepa NZP2213. Por otra parte, cabe destacar que en los clones de *L. tenuis* x *L. corniculatus* 2 se observó un aumento del contenido de nitrógeno en los clones inoculados con la cepa NZP2309 con respecto a los clones sin inocular (Figura 5.5). Esta observación, sumada a la presencia de una proporción no menor de nódulos de aspecto rojizo, permite suponer que los mismos realizan, al menos parcialmente, un aporte de nitrógeno.

Para poder concluir al respecto del efecto cualitativo de los TC presentes en raíces sobre la especificidad de la simbiosis, resulta recomendable la utilización (al igual que para el estudio cuantitativo) de genotipos similares entre sí, pero que se diferencien en la relación prodelfinidina/procianidina. En este sentido, son interesantes los estudios de Robbins *et al.* (2005), quienes transformaron plantas de *L. corniculatus* con el gen que codifica para la enzima F3'5'H (ver Figura 1.5). Sin embargo, no pudieron lograrse genotipos que se diferencien en cuanto a la proporción de procianidina/prodelfinidina/propelargonidina (81/14/5) que presentan normalmente los cultivos de raíz de *L. corniculatus* no transformados. Por ello, resulta interesante la obtención de materiales con estas características para poder avanzar con los estudios correspondientes.

Por último, cabe destacar el mayor contenido de TC observado en raíces de los clones de los diferentes genotipos transgénicos cuando fueron inoculados con la cepa NZP2039 en relación con aquellos inoculados con la cepa NZP2213. De la misma manera, también fue observado un mayor contenido de TC en nódulos formados por cepas inefectivas en los clones de las diferentes especies de *Lotus*, en relación con aquellos formados por cepas efectivas. En este sentido, se ha reportado que en los nódulos inefectivos formados por la cepa NZP2213 en plantas de *L. uliginosus* se observan niveles elevados de TC (4,75 mg TC/g PF), a diferencia de los niveles de TC en nódulos formados por la cepa NZP2039 (0,39 mg TC/g PF) los cuales resultaron significativamente inferiores (Pankhurst *et al.* 1979, Pankhurst y Jones 1979, Cooper y Rao 1992). En el desarrollo del presente capítulo pudimos observar esta misma situación, no solo para los clones de *L. uliginosus* inoculados con NZP2213, sino también en clones de *L. tenuis*, *L. tenuis* x *L. corniculatus* 2 y diferentes genotipos de *L. corniculatus* inoculados con la cepa NZP2309, por lo que podría suponerse que el aumento de TC en nódulos inefectivos se corresponde con una respuesta general para las especies del género evaluadas.

5.6. Conclusiones.

- El contenido de TC en raíces de *Lotus* spp. no afecta la especificidad de la simbiosis con rizobios.
- No es posible descartar la hipótesis de que la relación prodelphinidina/procianidina se encuentre relacionada con la especificidad de la simbiosis con rizobios. Por ello, resulta imprescindible realizar nuevos estudios para poder concluir fehacientemente sobre su posible incidencia en los mecanismos de interacción y reconocimiento que podrían estar involucrados.
- El desarrollo de nódulos inefectivos en *Lotus* spp. se encuentra acompañado de un incremento en los niveles de TC, lo cual sugiere la participación de estos compuestos, en los mecanismos de defensa de la planta.

6. Consideraciones finales.

Sobre las hipótesis planteadas y sus conclusiones.

A partir del objetivo propuesto de contribuir a la mejora de la calidad forrajera y de la adaptabilidad de especies del género *Lotus* a suelos de menor aptitud agrícola, con especial énfasis en el estudio de las funciones biológicas y de los mecanismos de regulación de los niveles de los taninos condensados, se plantearon originalmente tres hipótesis a poner a prueba.

Una de ellas “*los TC afectan la especificidad en la simbiosis mutualista entre rizobios y especies del género Lotus spp*”, ha sido puesta a prueba mediante las actividades desarrolladas en el capítulo 5. A partir de los resultados obtenidos se ha podido determinar que los niveles de TC en raíces de *Lotus spp.* no afectan la especificidad de la simbiosis con rizobios. A su vez, se ha podido concluir que el desarrollo de nódulos inefectivos en *Lotus spp.* se encuentra acompañado de un incremento de los niveles de TC, lo cual sugiere la participación de estos compuestos, en los mecanismos de defensa de la planta.

Las otras dos hipótesis planteadas “*el contenido foliar de TC en las plantas de L. tenuis resulta bajo en relación al recomendado para leguminosas con fines forrajeros*” y “*en L. tenuis, al igual que en L. corniculatus, existe variabilidad intra e inter-poblacional para el contenido foliar de TC y la misma puede ser aprovechada para modificar el contenido de dichos metabolitos a través de la selección recurrente*” han sido puestas a prueba durante el desarrollo de las actividades del capítulo 2. Sobre la base de los resultados obtenidos se ha podido concluir que el incremento de los contenidos de TC foliares en *L. tenuis* constituye un objetivo tecnológico de mejora, la cual difícilmente podría ser lograda a través de la selección recurrente, si se tiene en cuenta la ausencia de individuos con contenidos elevados de dichos compuestos.

Los resultados obtenidos hasta ese momento nos motivaron a plantear dos nuevas hipótesis. Una de ellas, “*el patrón de tinción de TC representa una herramienta eficaz para la diferenciación específica entre L. tenuis y L. corniculatus*” se puso a prueba en el capítulo 2. Los resultados obtenidos permitieron concluir que el patrón de tinción de los TC foliares podría ser utilizado como técnica de rutina para la determinación de la pureza específica de las diferentes poblaciones de *L. tenuis* y *L. corniculatus*.

La otra hipótesis planteada fue “*el cruzamiento interespecífico entre L. tenuis y L. corniculatus permite la obtención de materiales vegetales novedosos que combinen las mejores características forrajeras de ambas especies junto con una mayor tolerancia al estrés salino*”. Las actividades para poner a prueba esta hipótesis corresponden aquellas descritas en el capítulo 3. Mediante los resultados obtenidos en este capítulo pudimos concluir que el cruzamiento interespecífico entre *L. tenuis* y *L. corniculatus* constituye un método eficaz para la mejora de las características forrajeras (niveles de TC, presencia de rizomas y porte de las plantas) en el género y que la mayor tolerancia al estrés salino de las plantas híbridas supone un elevado potencial de utilización en ambientes afectados por condiciones edáficas salinas.

Posteriormente nos planteamos una nueva hipótesis motivada por los resultados obtenidos en el capítulo 3. Con esta hipótesis se propuso poner a prueba que “*el contenido foliar de TC en plantas de Lotus spp. se encuentra regulado por los niveles de expresión de los factores de transcripción codificados por TT2 y TT8, así como de los genes PAL, DFR, CHS, ANS, ANR, LAR1, LAR2 y MATE*”. Las actividades desarrolladas, presentes en el

capítulo 4 permitieron concluir que la obtención de híbridos interespecíficos entre *L. tenuis* y *L. corniculatus* representa una herramienta útil para el estudio de los mecanismos de regulación de los niveles de TC. Por otra parte, también se pudo concluir que en plantas de *Lotus* spp. que presentan naturalmente niveles diferenciales de TC, la expresión del factor de transcripción *FebHLH* no sería determinante de los mismos, mientras que la regulación de los niveles de TC es un proceso metabólico complejo que no depende exclusivamente de los niveles de expresión de los genes mencionados.

A continuación se realiza una reseña de los resultados más relevantes durante el desarrollo del presente trabajo de tesis considerando su impacto y los nuevos objetivos e hipótesis que se plantean a partir de ellos.

Sobre el impacto de los resultados y perspectivas futuras.

Algunas de las especies del género *Lotus* se destacan por su capacidad de acumular TC a nivel foliar. Debido a los beneficios que otorgan a la nutrición animal, estos compuestos han sido objeto de estudio para su aplicación biotecnológica en leguminosas forrajeras.

Esta capacidad, junto con la relevancia agronómica y científica de estas especies motivó su utilización como sistema de estudio. En particular *L. tenuis*, es considerada especie clave en la Pampa Deprimida del Salado y su utilización como forrajera para ambientes restrictivos se ha incrementado en los últimos años.

A pesar de la importancia de *L. tenuis*, la información publicada sobre sus niveles foliares de TC resultaba controvertida y la variabilidad intraespecífica para este carácter no había sido evaluada. Tampoco existía información sobre un proceso de mejora tendiente a adecuar el contenido foliar de TC en poblaciones de *L. tenuis*, a diferencia de *L. corniculatus* y *L. uliginosus*, especies acerca de las cuales sí existían antecedentes de tales procesos.

Nuestros resultados demostraron, contrariamente a lo esperado, que *L. tenuis* acumula niveles sub-óptimos de TC a nivel foliar y que los mismos carecen de variabilidad intra e inter-poblacional. A partir de los mismos se puede concluir que si bien un incremento moderado en los niveles de TC de *L. tenuis* tendría un efecto beneficioso sobre su calidad forrajera, el mismo no podría ser logrado por selección recurrente.

Durante el desarrollo de estas actividades quedó en evidencia la problemática existente y el daño económico que causa la dificultad de diferenciación taxonómica entre *L. tenuis* y *L. corniculatus*. Las metodologías propuestas hasta el momento por diferentes autores resultaban complejas, costosas y no permitían el análisis rápido de numerosas muestras en forma rutinaria (capítulo 2). En relación a ello, pudimos determinar que mediante la observación del patrón de tinción de TC en hojas se puede diferenciar ambas especies de manera rápida, sencilla y con un bajo costo. Un resumen gráfico de la metodología propuesta puede observarse en la Figura 6.1.

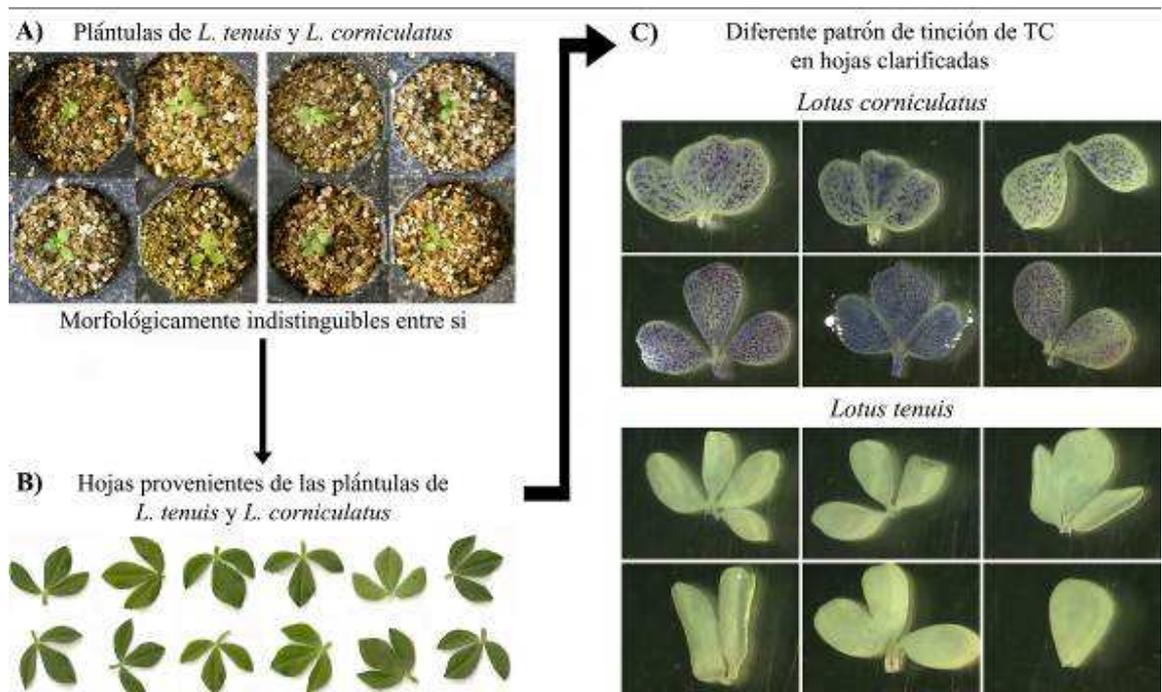


Figura 6.1. Resumen gráfico de la metodología propuesta para la diferenciación entre *L. tenuis* y *L. corniculatus*. Las semillas de la accesión de *L. tenuis* a evaluar se hacen germinar y se cultivan hasta que presenten dos hojas expandidas. Las plántulas así obtenidas pueden resultar en una mezcla de *L. tenuis* y *L. corniculatus*, las cuales son similares morfológicamente (A). Se extrae una hoja de estas plantas (B), la cual es decolorada con etanol. Posteriormente en la hoja decolorada se realiza la tinción de TC y su patrón de tinción permite diferenciar de que especie se trata (C).

Si bien mediante la metodología propuesta se pueden diferenciar a estas dos especies, cabe destacar que la taxonomía de algunas de las especies que integran este género resulta difícil de determinar. Debido a ello, es necesario continuar con los estudios que faciliten una diferenciación taxonómica precisa de las especies que integran el género *Lotus*.

Por otra parte, debido al fracaso en obtener una población de *L. tenuis* con contenidos foliares adecuados de TC a través de selección masal, se utilizó una metodología alternativa con el mismo fin. La misma se basó en la técnica de hibridación interespecífica entre *L. tenuis* y *L. corniculatus*. En este sentido, utilizando poblaciones tetraploides de *L. corniculatus* y *L. tenuis*, se han obtenido con anterioridad híbridos interespecíficos. Sin embargo, la baja viabilidad del material logrado dificultó su aplicación agronómica. Debido a ello nos planteamos la estrategia novedosa de utilizar poblaciones diploides de *L. corniculatus* para su cruzamiento con *L. tenuis*.

Esta estrategia requirió orientar los esfuerzos a seleccionar una población de *L. corniculatus* diploide y preferentemente con una mayor tolerancia relativa a diferentes estreses ambientales. En este sentido, cabe destacar que los cultivares de *L. corniculatus* comercialmente disponibles, además de ser tetraploides en su totalidad, derivan de programas de mejoramiento orientados a la obtención de materiales con alta potencialidad de producción. Estos cultivares, pensados para su utilización en sistemas ganaderos

intensivos que cuentan con buenos recursos edáficos, resultan en cultivares productivos pero a la vez poco tolerantes a diferentes estreses abióticos.

Debido a ello, el hallazgo de la población de *L. corniculatus* en la Albufera de Valencia resultó uno de los puntos cruciales para el éxito del cruzamiento interespecífico. Ello se debe a las características de esta población, la cual representa un germoplasma sumamente interesante para ser utilizado en programas de mejoramiento de la calidad forrajera en el género. A modo de comparación entre especies y poblaciones, en la Tabla 6.1 se mencionan aquellas características relevantes.

Tabla 6.1. Comparación de las características relevantes entre especies y poblaciones de *L. tenuis* y *L. corniculatus*.

	<i>L. tenuis</i>	<i>L. corniculatus</i> (población diploide)	<i>L. corniculatus</i> (poblaciones comerciales)
Ploidía	2n = 2x = 12	2n = 2x = 12	2n = 4x = 24
Niveles de TC	0,75 ± 0,3 mg TC/g MS	23,13 ± 7,1 mg TC/g MS	6,5 ± 5,3 mg TC/g MS
Rizomas / estolones	No produce	Produce	No produce
Aptitud	Especie tolerante a condiciones edáficas marginales, utilización en áreas de baja aptitud agrícola	Población adaptada a condiciones edáficas marginales, potencial de utilización en áreas de baja aptitud agrícola	Poblaciones seleccionadas por su potencial productivo, utilización en áreas de elevada aptitud agrícola

Del cruzamiento entre esta población con *L. tenuis* se destaca, en primer lugar, la facilidad del mismo y el elevado porcentaje de viabilidad de la semilla obtenida. En este sentido, en estudios previos, la realización de cruzamientos entre estas dos especies presentaba la limitante del escaso porcentaje de viabilidad de semillas obtenidas.

En segundo lugar, los híbridos obtenidos a partir de este cruzamiento representan un material destacable en cuanto a su potencial forrajero. El adecuado contenido foliar de TC, la presencia de rizomas, el porte más erecto, tallos de mayor longitud y mayor tolerancia al estrés salino lo diferencian de los cultivares de *L. tenuis* disponibles en el mercado. Debido a ello, el híbrido obtenido ha sido premiado en el Concurso Nacional de Innovaciones (INNOVAR 2009) dentro de la categoría “Innovaciones en el Agro”.

A su vez, considerando que ambos parentales provienen de ambientes donde se encuentran sujetos a diferentes estreses ambientales, es probable que presenten una elevada tolerancia a otros estreses abióticos que suelen afectar la producción de forraje. Debido a ello, resulta interesante determinar la tolerancia de estos materiales al estrés alcalino y al anegamiento, uno de los objetivos a los que estamos orientando nuestras investigaciones actualmente.

Una de las posibles limitaciones que presentan los resultados del presente trabajo de tesis deriva del hecho de que la totalidad de los experimentos han sido llevados a cabo bajo condiciones semi-controladas en cuartos de cultivo e invernaderos. Teniendo en cuenta el potencial de aplicación del material obtenido, actualmente nos encontramos desarrollando la evaluación a campo y del consumo animal de los materiales obtenidos.

De la misma manera, se prevé continuar con la realización de cruzamientos interespecíficos utilizando nuevas poblaciones de *L. corniculatus* diploides provenientes de diferentes ambientes, así como el seguimiento de la descendencia de las poblaciones híbridas resultantes.

Para considerar el impacto científico, cabe mencionar que desde hace años la importancia nutricional de los TC en leguminosas ha motivado el estudio de la biosíntesis de estos

metabolitos. El objetivo de ello es el de realizar una posible mejora biotecnológica tendiente a incrementar y/o inducir su acumulación en aquellas especies forrajeras carentes de los mismos en sus vástagos.

Estos estudios, que comprenden la regulación transcripcional y biosíntesis de estos compuestos, han sido realizados en especies modelo de estudio (*Arabidopsis thaliana* y *Medicago truncatula* principalmente). Sin embargo, a pesar de que se han obtenido transformantes que sobreexpresan diferentes “genes candidatos” involucrados en su biosíntesis, hasta el momento no se han logrado obtener plantas de *M. sativa* y *Trifolium repens* que presenten una acumulación marcada de TC a nivel foliar.

En este sentido, cabe destacar que ninguna de las especies modelo estudiadas tiene la capacidad de acumular TC a nivel foliar. Resulta sorprendente que a pesar de sus múltiples ventajas, solo unos pocos autores han utilizado como modelo de estudio de la biosíntesis de TC a las especies del género *Lotus*. En este sentido, se destacan los trabajos realizados en *L. japonicus* (leguminosa modelo de estudio). Sin embargo, como se puede observar en los resultados obtenidos en el presente trabajo, esta especie, al igual que *L. tenuis*, presenta bajos contenidos foliares de estos compuestos y los mismos solo se encuentran distribuidos en el tejido adyacente a los haces vasculares.

Debido a ello, el sistema de estudio utilizado en el presente trabajo resulta novedoso por el hecho de incluir especies filogenéticamente cercanas con contenidos contrastantes de TC y en diferente ubicación tisular, junto con su descendencia híbrida que presenta niveles intermedios. De estos estudios pudo concluirse que la regulación de la acumulación de TC a nivel foliar resulta más compleja de lo que fuera planteado originalmente sobre las especies modelo de estudio.

Esta evidencia refuerza la idea de que las especies del género *Lotus* son potenciales candidatos y herramientas útiles de trabajo para complementar los estudios sobre la regulación de la acumulación de TC. A partir de ello se podrían poner a prueba nuevas hipótesis, pudiendo algunas de ellas fundamentarse en que estos compuestos presentarían una regulación órgano-específica, en la cual la acumulación de TC en el tejido del mesófilo de la hoja se encuentra dominada por los mismos genes, pero en manera diferente a lo que ocurre en otros órganos o incluso regulada por diferentes genes. Por otro lado, se podría plantear la hipótesis de que la acumulación de TC a nivel foliar depende del correcto balance transcripcional de *TT2*, *TT8* y *TTG1*, integrantes del complejo que regula la biosíntesis de los mismos. Asimismo, se podría poner a prueba la hipótesis de que existe un gen inhibidor que se encuentre expresado en hojas de aquellas plantas que no acumulan TC. Para finalizar, se encuentra reportado en la bibliografía que tanto el contenido como el tipo de TC presentes en raíces afectan la especificidad de la simbiosis (capítulo 5). Sin embargo, pudimos observar que en plantas con diferentes niveles de TC en raíces, pero con el mismo fondo genético, la especificidad de la nodulación no se vió afectada. Estas plantas de *L. corniculatus* formaron nódulos efectivos con cepas de *Mesorhizobium loti* e inefectivos con cepas de *Bradyrhizobium* sp. independientemente de sus niveles de TC en raíces. A su vez, en plantas de *L. tenuis*, *L. corniculatus* y *L. uliginosus*, se observó que la infección con cepas ineficientes en la fijación de nitrógeno tiene un efecto inductor de la acumulación de TC en raíces de la planta infectada, estos resultados pueden observarse en la Figura 6.2.

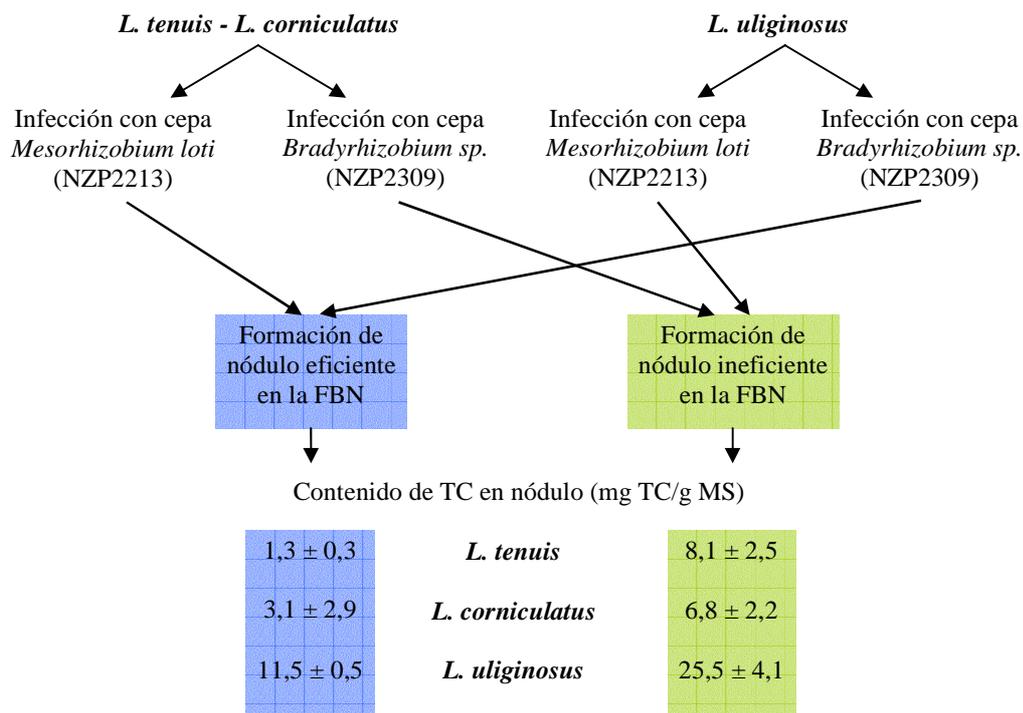


Figura 6.2. Esquema de los tratamientos evaluados y como ello influye en la formación de nódulos y su contenido de TC. FBN = Fijación Biológica de Nitrógeno.

Sobre la base de las observaciones realizadas, resulta interesante continuar con los estudios relacionados al efecto de los TC sobre la especificidad de los rizobios que interactúan simbióticamente con las especies de *Lotus*. Para ello se han planteado nuevas hipótesis donde se pretende probar que la inoculación con cepas ineficientes en la fijación biológica de nitrógeno induce la expresión de los factores de transcripción que regulan la acumulación de TC y posiblemente la composición de los mismos, (en especial la proporción delfinidina:cianidina), afectando la especificidad de la relación simbiótica.

Considerando que muchos de los resultados obtenidos durante el desarrollo del presente trabajo han generado nuevas hipótesis y objetivos, a continuación se presenta un resumen de aquellas perspectivas de interés futuro:

- Continuar con el estudio taxonómico de la población hallada en la Albufera de Valencia. Ya que, si bien a partir de sus caracteres morfológicos y reproductivos esta población fue determinada como *L. corniculatus* subsp. *corniculatus*, los resultados obtenidos mediante el análisis de polimorfismos en la secuencia de nrITS sugieren que podría tratarse de un nuevo taxón.
- Considerando el potencial de aplicación del material híbrido obtenido, entendemos necesario su evaluación a campo y la respuesta ante el consumo animal, con el objeto de obtener un cultivar comercial para su utilización por parte de los productores.
- Realizar nuevos cruzamientos interespecíficos con poblaciones de *L. corniculatus* diploides provenientes de diferentes ambientes y junto con los híbridos ya obtenidos, llevar a cabo la evaluación de su tolerancia a diferentes estreses abióticos.

- Continuar con el estudio de la regulación transcripcional de la acumulación foliar de TC aprovechando la ventaja de contar con materiales genotípicamente similares pero con contenidos foliares contrastantes de TC.
- Evaluar el efecto de la composición de TC (relación procianidina:prodelfinidina) sobre la especificidad de la simbiosis mutualista entre rizobios y *Lotus* spp. A su vez, evaluar si la efectividad en la fijación biológica de nitrógeno afecta la expresión de aquellos genes que regulan la acumulación de TC.

Referencias bibliográficas.

- Abrahams, S., Lee, E., Walker, A.R., Tanner, G.J., Larkin, P.J., Ashton, A.R. (2003) The Arabidopsis TDS4 gene encodes leucoanthocyanidin dioxygenase (LDOX) and is essential for proanthocyanidin synthesis and vacuole development. *Plant Journal*, 35: 624-636.
- Acuña, H., Concha, A., Figueroa, M. (2008) Condensed tannin concentrations of three Lotus species grown in different environments. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 68: 31-41.
- Acuña, H.P. (1998) Varietal comparison of three species of genus Lotus (*L. corniculatus* L., *L. uliginosus* Cav. y *L. tenuis* Wald et Kit.) in soils with aptitude for cropping rice. *Agricultura Técnica Chile*, 58: 7-14.
- Aerts, R.J., Barry, T.N., McNabb, W.C. (1999a) Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 75: 1-12.
- Aerts, R.J., McNabb, W.C., Molan, A., Barry, T.N., Peters, J.S. (1999b) Condensed tannins from *Lotus corniculatus* and *Lotus pedunculatus* exert different effects on the in vitro rumen degradation of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase / oxigenase (Rubisco) protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79: 79-85.
- Aharoni, A., De Vos, C.H., Wein, M., Sun, Z., Greco, R., Kroon, A., Mol, J.N., O'Connell, A.P. (2001) The strawberry FaMYB1 transcription factor suppresses anthocyanin and flavonol accumulation in transgenic tobacco. *Plant Journal*, 28: 319-332.
- Albrecth, C., Geurts, R., Bisseling, T. (1999) Legume nodulation and mycorrhizae formation; two extremes in host specificity meet. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 18: 281-288.
- Allan, G.J., Francisco-Ortega, J., Santos-Guerra, A., Boerner, E., Zimmer, E.A. (2004) Molecular phylogenetic evidence for the geographic origin and classification of Canary Island Lotus (Fabaceae: Loteae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32: 123-138.
- Allan, G.J., Porter, J.M. (2000) Tribal delimitation and phylogenetic relationships of Loteae and Coronilleae (Faboideae: Fabaceae) with special reference to Lotus: evidence from nuclear ribosomal ITS sequences. *American Journal of Botany*, 87: 1871-1881.
- Allan, G.J., Zimmer, E.A., Wagner, W.L., Sokoloff, D.D. (2003) Molecular phylogenetic analyses of tribe Loteae (Leguminosae): Implications for classification and biogeography, in: Klitgaard, B.B., Bruneau (Eds.), *Royal Botanic Gardens, Kew*. pp. 371-393.
- Anuraga, M., Duarsa, P., Hill, M., Lovett, J. (1993) Soil moisture and temperature affect condensed tannin concentrations and growth in *Lotus corniculatus* and *Lotus pedunculatus*. *Australian Journal of Agricultural Research*, 44: 1667-1681.
- Añon Suarez, D., Boelcke, O., Burkart, A., Cabrera, A.L., Dawson, G., Fabris, H.A., Giusti, L., Pontiroli, A. (1967) *Flora de la provincia de Buenos Aires. Piperaceas a Leguminosas* Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Buenos Aires.
- Aoki, T., Akashi, T., Ayabe, S.-i. (2000) Flavonoids of leguminous plants: structure, biological activity, and biosynthesis. *Journal of Plant Research*, 113: 475-488.
- Arambarri, A.A. (1999) Illustrated catalogue of Lotus L. seeds (Fabaceae), in: Beuselinck, P.R. (Ed.), *CSSA Special Publication Number 28, Madison, Wisconsin*. pp. 21-41.

- Arambarri, A.M. (2000) A cladistic analysis of the New World species of *Lotus* L. (Fabaceae, Loteae). *Cladistics*, 16: 283-297.
- Ayres, J.F., Kelman, W.M., Blumenthal, M.J. (2008) The Sharna greater lotus (*Lotus uliginosus* Schkuhr) germplasm-potential for low latitude environments. *Lotus Newsletter*, 38: 7-19.
- Baker, N.R. (2008) Chlorophyll Fluorescence: a Probe of Photosynthesis In Vivo. *Annual Review of Plant Biology*: 89-113.
- Baraibar, A., Frioni, L., Guedes, M.E., Ljunggren, H. (1999) Symbiotic effectiveness and ecological characterization of indigenous *Rhizobium loti* populations in Uruguay. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 34: 1010-1017.
- Barbehenn, R.V., Constabel, P.C. (2011) Tannins in plant-herbivore interactions. *Phytochemistry*.
- Barker, D.H., Seaton, G.G.R., Robinson, S.a. (1997) Internal and external photoprotection in developing leaves of the CAM plant *Cotyledon orbiculata*. *Plant, Cell and Environment*, 20: 617-624.
- Barrett-Lennard, E.G. (2003) The interaction between waterlogging and salinity in higher plants: causes, consequences and implications. *Plant and Soil*, 253: 35-54.
- Barry, T.N., Duncan, S.J. (1984) The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. *British Journal of Nutrition*, 51: 485-491.
- Barry, T.N., Manley, T.R. (1986) Interrelationships between the concentrations of total condensed tannin, free condensed tannin and lignin in *Lotus* sp. and their possible consequences in ruminant nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 37: 248-254.
- 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*: 263-272.
- Bate-Smith, E.C. (1975) Phytochemistry of proanthocyanidins. *Phytochemistry*, 14: 1107-1113.
- Baudry, A., Heim, M.a., Dubreucq, B., Caboche, M., Weisshaar, B., Lepiniec, L. (2004) TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of BANYULS and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 39: 366-380.
- Bavage, A.D., Davies, I.G., Robbins, M.P., Morris, P. (1997) Expression of an *Antirrhinum* dihydroflavonol reductase gene results in changes in condensed tannin structure and accumulation in root cultures of *Lotus corniculatus* (bird ' s foot trefoil). *Plant Molecular Biology*, 35: 443-458.
- Belesky, D.P. (1999) *Lotus* species used in reclamation, renovation, and revegetation, in: Beuselinck, P.R. (Ed.), *CSSA Special Publication Number 28*, Madison, Wisconsin. pp. 133-143.
- Benavent Olmos, J.M., Collado Rosique, F., Martí Crespo, R.M., Muñoz Caballer, A., Quintana Trenos, A., Sánchez Codoner, A., Vizcaino Matarredona, A. (2004) La restauración de las dunas litorales de la devesa de l'Albufera de Valencia Adjuntament de València, València.
- Bennett, S., Barrett-Lennard, E.G., Colmer, T. (2009) Salinity and waterlogging as constraints to saltland pasture production: A review. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 129: 349-360.
- Bernstein, L., Hayward, H.E. (1958) Physiology of Salt Tolerance. *Annual Review of Plant Physiology*, 9: 25-46.

- Beuselinck, P.R. (2004) Registration of ARS-2424 birdsfoot trefoil germplasm. *Crop Science*, 44: 2277-2278.
- Beuselinck, P.R., Brummer, E.C., Viands, D.K., Asay, K.H., Smith, R.R., Steiner, J.J., Brauer, D.K. (2005) Genotype and environment affect rhizome growth of birdsfoot trefoil. *Crop Science*, 45: 1736-1740.
- Beuselinck, P.R., Li, B., Steiner, J.J. (1996) Rhizomatous *Lotus corniculatus* L.: I. Taxonomic and Cytological Study. *Crop Science*, 36: 179-185.
- Beuselinck, P.R., Steiner, J.J. (1996) Registration of "ARS-2620" Birdsfoot trefoil. *Crop Science*, 36: 1414-1414.
- Beuselinck, P.R., Steiner, J.J., Rim, Y.W. (2003) Morphological comparison of progeny derived from 4x-2x and 4x-4x hybridizations. *Crop Science*, 43: 1741-1746.
- Blumenthal, M. (1998) Effects of photoperiod and temperature on shoot, root and rhizome growth in three *Lotus uliginosus* Schkuhr populations. *Annals of Botany*, 81: 55-59.
- Blumenthal, M.J., McGraw, R.L. (1999) Lotus adaptation, use, and management, in: Beuselinck, P.R. (Ed.), *Trefoil: the science and technology of Lotus*, CSSA Special Publication Number 28, Madison, Wisconsin. pp. 97-119.
- Bordeleau, L., Prévost, D. (1994) Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. *Plant and Soil*, 161: 115-125.
- Brewin, N.J. (1991) Development of the legume root nodule. *Annual Review of Cell Biology*, 7: 191-226.
- Brockwell, J., Hebb, D.M., Kelman, W.M. (1994) Symbiotaxonomy of *Lotus* species and symbiotically related plants and of their root-nodule bacteria, in: Beuselinck, P.R., Roberts, C.A. (Eds.), *Proceedings of the First International Lotus Symposium*, University Extension, University of Missouri, Columbia. pp. 30-35.
- Brouillet, L. (2008) The taxonomy of North American *Loti* (Fabaceae: Loteae): new names in *Acemison* and *Hosackia*. *Journal of the Botanical Research Institute of Texas*, 2: 387-394.
- Broun, P. (2005) Transcriptional control of flavonoid biosynthesis: a complex network of conserved regulators involved in multiple aspects of differentiation in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Plant Biology*, 8: 272-279.
- Burger, J., Edwards, G.E. (1996) Photosynthetic efficiency, and photodamage by UV and visible radiation, in red versus green leaf coleus varieties. *Plant and Cell Physiology*, 37: 395-399.
- Campos, L.P., Raelson, J.V., Grant, W.F. (1994) Genome relationships among *Lotus* species based on random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Theoretical and Applied Genetics*, 88: 417-422.
- Carter, E.B., Theodorou, M.K., Morris, P. (1999) Responses of *Lotus corniculatus* to environmental change . 2 . Effect of elevated CO₂, temperature and drought on tissue digestion in relation to condensed tannin and carbohydrate accumulation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79: 1431-1440.
- Cassida, K.A., Griffin, T.S., Rodriguez, J., Patching, S.C., Hesterman, O.B., Rust, S.R. (2000) Protein degradability and forage quality in maturing alfalfa, red clover, and birdsfoot trefoil. *Crop Science*, 40: 209-215.
- Castroviejo, S. (1982) Números cromosómicos de plantas occidentales, 157-163. *Anales Jardín Botánico de Madrid*, 38: 157-163.
- Cauhépé, M.A. (2004) Does *Lotus glaber* improve beef production at the Flooding Pampas? *Lotus Newsletter*, 34: 38-43.

- Celotto, A.I., Sanso, A.M. (2008) Chromosome number, seedlings and seed size in *Lotus tenuis* and *L. corniculatus*. *Lotus Newsletter*, 38: 64-65.
- Cisneros, J.M., Degioanni, A., Cantero, J.J., Cantero, A. (2007) Caracterización y manejo de suelos salinos en el área Pampeana central, in: Taleisnik, E., *et al.* (Eds.), Universidad Católica de Argentina, Córdoba. pp. 17-46.
- Clifford, W.C., Grant, W.F. (1993) Pollen morphology in Loteae (Leguminosae) with particular reference to the genus *Lotus* L. *Grana*, 32: 129-153.
- Clua, A., Orsini, H., Beltrano, J. (2009) Incidence of variable flooding period on *Lotus tenuis* biomass production and leaf senescence. *Lotus Newsletter*, 39: 13-20.
- Coley, P.D., Kusar, T.A. (1996) Anti-herbivore defences of young tropical leaves: physiological constraints and ecological tradeoff, in: Mulkey, S.S., *et al.* (Eds.), Chapman and Hall, New York. pp. 305-335.
- Cook, D.R. (1999) *Medicago truncatula*-a model in the making! *Current Opinion in Plant Biology*, 2: 301-304.
- Cooper, J.E., Rao, J.R. (1992) Localized changes in flavonoid biosynthesis in roots of *Lotus pedunculatus* after infection by *Rhizobium loti*. *Plant Physiology*, 100: 444-450.
- Correa, O.S., Aranda, A., Barneix, A.J. (2001) Effects of pH on growth and nodulation of two forage legumes. *Journal of Plant Nutrition*, 24: 1367-1375.
- Costa, M., Perís, J.B., Figuerola, R. (1984) La vegetación de la Devesa de l'Albufera Ajuntament de València, València, España.
- Cyranoski, D. (2001) Japanese legume project may help to fix nitrogen problem. *Nature*, 409: 272-272.
- Chalker-Scott, L. (1999) Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochemistry and Photobiology*, 70: 1-9.
- Chapman, G., Bork, E., Donkor, N., Hudson, R. (2008) Forage yield and quality of chicory, birdsfoot trefoil, and alfalfa during the establishment year. *The Open Agriculture Journal*, 2: 68-74.
- Dalrymple, E.J., Goplen, B.P., Howarth, R.E. (1984) Inheritance of tannins in birdsfoot trefoil. *Crop Science*, 24: 921-923.
- Damiani, F., Paolucci, F., Cluster, P.D., Arcioni, S., Tanner, G.J., Joseph, R.G., Li, Y.-G., Majnik, J.D., Larkin, P.J. (1999) The maize transcription factor Sn alters proanthocyanidin synthesis in transgenic *Lotus corniculatus* plants. *Australian Journal of Plant Physiology*, 26: 159-169.
- Dear, B.S., Moore, G.A., Hughes, S.J. (2003) Adaptation and potential contribution of temperate perennial legumes to the southern Australian wheatbelt: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 43: 1-18.
- Debeaujon, I., Le, K.M., Koornneef, M. (2000) Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 122: 403-413.
- Debeaujon, I., Nesi, N., Perez, P., Devic, M., Grandjean, O., Caboche, M., Lepiniec, L. (2003) Proanthocyanidin-accumulating cells in *Arabidopsis* testa: regulation of differentiation and role in seed development. *Plant Cell*, 15: 2514-2531.
- Degtjareva, G.V., Kramina, T.E., Sokoloff, D.D., Samigullin, T.H., Sandral, G., Valiejo-Roman, C.M. (2008) New data on nrITS phylogeny of *Lotus* (*Leguminosae*, *Loteae*). *Wulfenia*, 15: 35-49.
- Degtjareva, G.V., Kramina, T.E., Sokoloff, D.D., Samigullin, T.H., Valiejo-Roman, C.M., Antonov, A.S. (2006) Phylogeny of the genus *Lotus* (*Leguminosae*, *Loteae*):

- evidence from nrITS sequences and morphology. *Canadian Journal of Botany*, 84: 813-830.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C.W. (2011) InfoStat versión 2011, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Díaz, P., Borsani, O., Monza, J. (2005) *Lotus*-related species and their agronomic importance, in: Marquez, A.J. (Ed.), Springer, Netherlands. pp. 25-37.
- Dixon, R.A., Paiva, N.L. (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, 7: 1085-1097.
- Dixon, R.A., Xie, D.-Y., Sharma, S.B. (2005) Proanthocyanidins – a final frontier in flavonoid research? *New Phytologist*, 165: 9-28.
- Dodd, I.C., Critchley, C., Woodall, G.S., Stewart, G.R. (1998) Photoinhibition in differently coloured juvenile leaves of *Syzygium* species. *Journal of Experimental Botany*, 49: 1437-1445.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L. (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical bulletin*, 19: 11-15.
- Doyle, J.J., Luckow, M.A. (2003) The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiology*, 131: 900-910.
- Dubos, C., Le Gourrierc, J., Baudry, A., Huep, G., Lanet, E., Debeaujon, I., Routaboul, J.-M., Alboresi, A., Weisshaar, B., Lepiniec, L. (2008) MYBL2 is a new regulator of flavonoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 55: 940-953.
- Escaray, F.J., Menendez, A.B., Gárriz, A., Pieckenstain, F.L., Estrella, M.J., Castagno, L.N., Carrasco, P., Sanjuán, J., Ruiz, O.A. (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: 121-133.
- Escaray, F.J., Rosique, F.J.C., Scambato, A.A., Bilenca, D., Carrasco, P., Matarredona, A.V., Ruiz, O.A., Menéndez, A.B. (2010) Evaluation of a technical revegetation action performed on foredunes at Devesa de la Albufera, Valencia, Spain. *Land Degradation & Development*, 21: 239-247.
- Escribano Bailón, M.T. (1993) Estudio de la composición flavánica de las semillas de uva, Facultad de farmacia, Universidad de Salamanca.
- Estrella, M.J., Muñoz, S., Soto, M.J., Ruiz, O., Sanjuán, J. (2009) Genetic diversity and host range of rhizobia nodulating *Lotus tenuis* in typical soils of the Salado River Basin (Argentina). *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 1088-1098.
- Etchevehere, P.H. (1976) Normas de reconocimiento de suelos CIRN, Dept. de Suelos de Castelar, Colección Suelos Nro. 52.
- Falistocco, E., Piccirilli, M. (1989) The basic karyotype of *Lotus tenuis* C-banding and feulgen studies. *Annals of Botany*, 63: 401-404.
- FAO. (2005) Global network on integrated soil management for sustainable use of salt-affected soils, FAO Land and Plant Nutrition Management Services, Rome, Italy.
- Fernandez, A. (1981) Contribution à la connaissance des lotiers du groupe *Corniculatus* de la Péninsule Ibérique et des îles Baléares. *Boletim da Sociedade Broteriana*, 55: 29-86.
- Fernández, O.N., Vignolio, O.R., Maceira, N.O., Cambareri, G.S. (2007) Contribution of *Lotus tenuis* to the ecological services of grasslands under different productive scenarios of the Flooding Pampa, Argentina. *Lotus Newsletter*, 37: 37-38.

- Fjellstrom, G., Beuselinck, P.R., Steiner, J.J. (2001) RFLP marker analysis supports tetrasomic inheritance in *Lotus corniculatus* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 102: 718-725.
- Flowers, T., Garcia, A., Koyama, M., Yeo, A. (1997) Breeding for salt tolerance in crop plants — the role of molecular biology. *Acta Physiologiae Plantarum*, 19: 427-433.
- Flowers, T.J., Flowers, S.A. (2005) Why does salinity pose such a difficult problem for plant breeders. *Agricultural Water Management*, 78: 15-24.
- Fukai, E., Umehara, Y., Sato, S., Endo, M., Kouchi, H., Hayashi, M., Stougaard, J., Hirochika, H. (2010) Derepression of the plant Chromovirus LORE1 induces germline transposition in regenerated plants. *PLoS genetics*, 6: e1000868-e1000868.
- Gage, D.J. (2004) Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68: 280-300.
- Galussi, A.A., Reinoso, P.D., Zimmermann, L.R., Soldá, G.I., Lui, L.M. (2006) Identificación de cultivares de *Lotus spp.* por análisis de proteínas seminales. *Revista de la Facultad de Agronomía de La Plata*, 106: 21-26.
- García De Los Santos, G., Steiner, J.J. (2003) Genetic diversity in *Lotus corniculatus* determined by morphologic traits and RAPDs. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 26: 173-181.
- García, D.E., Medina, M.G. (2005) Metodologías para el estudio de compuestos polifenólicos en especies forrajeras: un enfoque histórico. *Zootecnia Tropical*, 23: 259-294.
- García Ramirez, B. (2005) Absorción in vivo de Oligómeros de Epicatequina, *Bioquímica i Biotecnologia, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona*. pp. 251.
- Gauthier, P., Lumaret, R., Bedecarrats, A. (1997) Chloroplast-DNA variation in the genus *Lotus* (Fabaceae) and further evidence regarding the maternal parentage of *Lotus corniculatus* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 95: 629-636.
- Gebrehiwot, L., Beuselinck, P.R., Roberts, C.A. (2002) Seasonal variations in condensed tannin concentration of three *Lotus* species. *Agronomy Journal*, 94: 1059-1065.
- Ghersa, C.M., Perelman, S.B., Burkart, S.E., León, R.J.C. (2007) Floristic and structural changes related to opportunistic soil tilling and pasture planting in grassland communities of the Flooding Pampa, in: Hawksworth, D.L., Bull, A.T. (Eds.), *Springer Netherlands*. pp. 1-18.
- Giorgieri, S., Paňak, K., Díaz, L.E., Etchepare, G., Ruiz, O.A. (1998) Comparative analysis of storage proteins of *Lotus spp.* seeds by CGE and SDS-PAGE. *Journal of Capillary Electrophoresis*, 5: 177-179.
- Goplen, B.P., Howarth, R.E., Sarkar, S.K., Lesins, K. (1980) A search for condensed tannins in annual and perennial species of *Medicago*, *Trigonella* and *Onobrychis*. *Crop Science*, 20: 801-804.
- Gould, K.S., Kuhn, D.N., Lee, D.W., Oberbauer, S.F. (1995) Why leaves are sometimes red. *Nature*, 378: 241-242.
- Gould, K.S., Markham, K.R., Smith, R.H., Goris, J.J. (2000) Functional role of anthocyanins in the leaves of *Quintinia serrata* A. Cunn. *Journal of Experimental Botany*, 51: 1107-1115.
- Graham, P.H., Vance, C.P. (2003) Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiology*, 131: 872-877.

- Grant, W.F. (1995) A chromosome atlas and interspecific-intergenic index for *Lotus* and *Tetragonolobus* (*Fabaceae*). *Can. J. Botany*, 73: 1787-1809.
- Grant, W.F. (1999) Interspecific hybridization and amphidiploidy of *Lotus* as related to phylogeny and evolution, in: Beuselinck, P.R. (Ed.), *CSSA Special Publication Number 28*, Madison, Wisconsin. pp. 43-60.
- Gregerson, R.G., Robinson, D.L., Vance, C.P. (1999) Carbon and nitrogen metabolism in *Lotus*, in: Beuselinck, P.R. (Ed.), *CSSA Special Publication Number 28*, Madison, Wisconsin. pp. 167-185.
- Gruber, M., Skadhauge, B., Yu, M., Muir, A., Richards, K. (2008) Variation in morphology, plant habit, proanthocyanidins, and flavonoids within a *Lotus* germplasm collection. *Canadian Journal of Plant Science*, 88: 121-121.
- Hagerman, A.E., Butler, L.G. (1981) The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 256: 4494-4497.
- Hagerman, A.E., Riedl, K.M., Jones, G.A., Sovik, K.N., Ritchard, N.T., Hartzfeld, P.W., Riechel, T.L. (1998) High Molecular Weight Plant Polyphenolics (Tannins) as Biological Antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 1887-1892.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.
- Handberg, K., Stougaard, J. (1992) *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *Plant Journal*, 2: 487-496.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.-K., Bohnert, H.J. (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51: 463-499.
- Hashiguchi, M., Tsuruta, S.-i., Akashi, R. (2011) Morphological Traits of *Lotus japonicus* (Regal) Ecotypes Collected in Japan. *Interdisciplinary Bio Central*, 3: 4-7.
- Haslam, E. (1996) Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of Natural Products*, 59: 205-215.
- Hirsch, A.M., Lum, M.R., Downie, J.A., Fred, E.W., Baldwin, I.L. (2001) What makes the rhizobia-legume symbiosis so special? *Plant Physiology*, 127: 1484-1492.
- Hughes, H.D. (1981) Cuernecillo, in: Hughes, H.D., *et al.* (Eds.), *Compañía Editora Continental*, Mexico. pp. 215-232.
- Insausti, P. (2004) Substitution of *Lotus glaber* for the dicots of a natural grassland in the flooding Pampa of Argentina. *Lotus Newsletter*, 34: 34-37.
- Iqbal, Z., Mufti, K.A., Khan, M.N. (2002) Anthelmintic effects of condensed tannins. *International Journal of Agriculture and Biology*, 4: 438-440.
- Irisarri, P., Milnitsky, F., Monza, J., Bedmar, E.J. (1996) Characterization of rhizobia nodulating *Lotus subbiflorus* from Uruguayan soils. *Plant and Soil*, 180: 39-47.
- Ixtaina, V.Y., Mujica, M.M. (2010) Seedling vigor response of *Lotus tenuis* populations to contrasting variations of water and nutrient availability. *Agrociencia*, 44: 31-41.
- Jarvis, B.D.W., Pankhurst, C.E., Patel, J.J. (1982) *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 32: 378-380.
- Kade, M., Pagani, E.A., Mendoza, R.E. (2003) Phosphorus utilization efficiency in populations of narrow-leaf birdsfoot trefoil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 34: 271-284.

- Kade, M., Wagner, M.L., Strittmatter, C.D., Ricco, R.A., Gurni, A.A. (1997) Identification of *Lotus tenuis* and *Lotus corniculatus* seeds by their flavonols. *Seed Science and Technology*, 25: 585-587.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Mochizuki, Y., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M., Tabata, S. (2000) Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Research*, 7: 331-338.
- Kawaguchi, M., Motomura, T., Imaizumi-Anraku, H., Akao, S., Kawasaki, S. (2001) Providing the basis for genomics in *Lotus japonicus*: the accessions Miyakojima and Gifu are appropriate crossing partners for genetic analyses. *Molecular Genetics & Genomics*, 266: 157-166.
- Kawaguchi, M., Pedrosa-Harand, A., Yano, K., Hayashi, M., Murooka, Y., Saito, K., Nagata, T., Namai, K., Nishida, H., Shibata, D., Sato, S., Tabata, S., Hayashi, M., Harada, K., Sandal, N., Stougaard, J., Bachmair, A., Grant, W.F. (2005) *Lotus burtii* takes a position of the third corner in the *Lotus* molecular genetics triangle. *DNA Research*, 12: 69-77.
- Kelman, W.M. (1999) Genetics and breeding of low tannin *Lotus pedunculatus* Cav, in: Langridge, P., *et al.* (Eds.), Adelaide. Vol 2. University of Adelaide, South Australia. pp. 43-44.
- Kelman, W.M. (2006a) Germplasm sources for improvement of forage quality in *Lotus corniculatus* L. and *L. uliginosus* Schkuhr (Fabaceae). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53: 1707-1713.
- Kelman, W.M. (2006b) The interactive effects of phosphorus, sulfur and cultivar on the early growth and condensed tannin content of greater lotus (*Lotus uliginosus*) and birdsfoot trefoil (*L. corniculatus*). *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 46: 53-58.
- Kelman, W.M., Blumenthal, M.J., Harris, C.A. (1997) Genetic variation for seasonal herbage yield, growth habit, and condensed tannins in *Lotus pedunculatus* Cav. and *Lotus corniculatus* L. *Australian Journal of Agricultural Research*, 48: 959-968.
- Kelman, W.M., Blumenthal, M.J., O'Connor, J.W., Borchard, P.A. (2007) *Lotus uliginosus* (greater lotus) breeding line LUX97: a high seed producing, low condensed tannin population. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 47: 116-118.
- Kelman, W.M., Tanner, G.J. (1990) Foliar condensed tannin levels in *Lotus* species growing on limed and unlimed soils in South- Eastern Australia. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association*, 52: 51-54.
- Keller, S.Y. (2003) The influence of P nutrition on the root metabolism in *Lotus japonicus* (Regel) K. Larsen: An approach at transcriptional level, Swiss Federal Institute of Technology, Zürich. pp. 97-97.
- Kinsella, J.E., Frankel, E., German, B., Kanner, J. (1993) Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food technology*, 47: 85-89.
- Kirkbride, J.H. (1999) *Lotus* systematics and distribution, in: Beuselinck, P.R. (Ed.), CSSA Special Publication Number 28, Madison, Wisconsin. pp. 1-20.
- Klaper, R., Frankel, S., Berenbaum, M.R. (1996) Anthocyanin Content and UVB Sensitivity in *Brassica rapa*. *Photochemistry and Photobiology*, 63: 811-813.

- Koornneef, M. (1990) Mutations affecting the testa colour in *Arabidopsis*. *Arabidopsis Information Service*, 27: 1-4.
- Kramina, T.E. (1999) A contribution to the taxonomic revision of the *Lotus corniculatus* complex (Leguminosae, Loteae) in the European part of the former USSR. *Systematics and Geography of Plants*, 68: 265-279.
- Kumar, R., Singh, M. (1984) Tannins: their adverse role in ruminant nutrition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32: 447-453.
- Lagler, J.C. (2003) *Lotus*: un género que no acaba en dos especies. *Revista Forrajes y Granos*, 62: 72-76.
- Larkin, P.J., Tanner, G.J., Joseph, R.G., Kelman, W.M. (1999) Modifying condensed tannin content in plants, in: Buchanan-Smith, J.G., *et al.* (Eds.), *Canadian Forage Council*, Canada. pp. 8-19.
- Latour, G., Jones, W.T., Ross, M.D. (1978) Production of interspecific hybrids in *Lotus* aided by endosperm transplants. *New Zealand Journal of Botany*, 16: 61-80.
- Lavado, R.S. (2007) Visión sintética de la distribución y magnitud de los suelos afectados por salinidad en la Argentina, in: Taleisnik, E., Grunberg, K.G. (Eds.), *Universidad Católica de Argentina, Córdoba*. pp. 11-15.
- Lees, G.L., Hinks, C.F., Suttill, N.H. (1994) Effect of high temperature on condensed tannin accumulation in leaf tissues of big trefoil (*Lotus uliginosus* Schkuhr). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 65: 415-421.
- León, R.J.C., Striker, G.G., Insausti, P., Perelman, S.B. (2007) Río de la Plata grasslands and *Lotus tenuis*. *Lotus Newsletter*, 37: 67-68.
- Lepiniec, L., Debeaujon, I., Routaboul, J.-M., Baudry, A., Pourcel, L., Nesi, N., Caboche, M. (2006) Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 405-430.
- Li, B., Beuselinck, P.R. (1996) Rhizomatous *Lotus corniculatus* L.: II. Morphology and Anatomy of Rhizomes. *Crop Science*, 36: 407-411.
- Li, Y.-G., Tanner, G., Larkin, P. (1996) The DMACA-HCl protocol and the threshold proanthocyanidin content for bloat safety in forage legumes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 70: 89-101.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-DDCt Method. *Methods*, 25: 402-408.
- Lodwig, E.M., Hosie, A.H.F., Bourdes, A., Findlay, K., Allaway, D., Karunakaran, R., Downie, J.A., Poole, P.S. (2003) Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume-Rhizobium symbiosis. *Nature*, 422: 722-726.
- Lohar, D.P., VandenBosch, K.a. (2005) Grafting between model legumes demonstrates roles for roots and shoots in determining nodule type and host/rhizobia specificity. *Journal of Experimental Botany*, 56: 1643-1650.
- Löve, Á., Löve, D. (1961) *Chromosome numbers of Central and Northwest European plant species* Almqvist & Wiksell, Stockholm.
- Lowther, W.L., Manley, T.R., Barry, T.N. (1987) Condensed tannin concentrations in *Lotus corniculatus* and *L. pedunculatus* cultivars grown under low fertility conditions. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 30: 23-25.
- Mabberley, D.J. (1997) *The plant-book: a portable dictionary of the vascular plants* Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Maiola, O., Gabellone, N., Hernández, M. (2003) *Inundaciones en la Región Pampeana* Edulp, La Plata.

- Mangan, J.L. (1959) Bloat in cattle XI. The foaming properties of proteins, saponins, and rumen liquor. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 2: 47-61.
- Manuel-Navarrete, D., Gallopín, G.C., Blanco, M., Díaz-Zorita, M., Ferraro, D.O., Herzer, H., LATERRA, P., Murmis, M.R., Podestá, G.P., Rabinovich, J., Satorre, E.H., Torres, F., Viglizzo, E.F. (2007) Multi-causal and integrated assessment of sustainability: the case of agriculturization in the Argentine Pampas. *Environment, Development and Sustainability*, 11: 621-638.
- Marles, M.A.S., Ray, H., Gruber, M.Y. (2003) New perspectives on proanthocyanidin biochemistry and molecular regulation. *Phytochemistry*, 64: 367-383.
- Mass, E.V., Hoffman, G.J. (1977) Crop salt tolerance-current assessment. *Journal of the Irrigation and Drainage Division*, 103: 115-134.
- Matsui, K., Umemura, Y., Ohme-Takagi, M. (2008) AtMYBL2, a protein with a single MYB domain, acts as a negative regulator of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 55: 954-967.
- Mazzanti, A., Montes, L., Muñón, D., Sarlangue, H., Cheppi, C. (1988) Utilización de *Lotus tenuis* en establecimientos ganaderos de la Pampa Deprimida: Resultados de una encuesta. *Revista Argentina de Producción Animal*, 8: 301-305.
- McKenna, P.B. (1994) The occurrence of anthelmintic-resistant sheep nematodes in the southern North Island of New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, 42: 151-152.
- Mendoza, R. (2001) Phosphorous nutrition and mycorrhizal growth response of broadleaf and narrowleaf birdsfoot trefoils. *Journal of Plant Nutrition*, 24: 203-214.
- Mendoza, R., Escudero, V., Garcia, I. (2005) Plant growth, nutrient acquisition and mycorrhizal symbioses of a waterlogging tolerant legume (*Lotus glaber* Mill.) in a saline-sodic soil. *Plant and Soil*, 275: 305-315.
- Miller, P.R., Ehlke, N.J. (1996) Condensed tannins in birdsfoot trefoil: genetic relationships with forage yield and quality in NC-83 germplasm. *Euphytica*, 92: 383-391.
- Miller, P.R., Ehlke, N.J. (1997) Inheritance of condensed tannins in birdsfoot trefoil. *Canadian Journal of Plant Science*, 77: 587-593.
- Miñón, D.P., Sevilla, G.H., Montes, L., Fernández, O.N. (1990) *Lotus tenuis*: leguminosa forrajera para la Pampa Deprimida, Boletín técnico n° 98 Unidad Integrada Balcarce. pp. 16-16.
- Molan, A.L., Waghorn, G.C., Min, B.R., McNabb, W.C. (2000) The effect of condensed tannins from seven herbage on *Trichostrongylus colubriformis* larval migration in vitro. *Folia Parasitologica*, 47: 39-44.
- Montes, L. (1988) *Lotus tenuis*. *Revista Argentina de Producción Animal*, 8: 367-376.
- Monza, J., Fabiano, E., Arias, A. (1992) Characterization of an indigenous population of rhizobia nodulating *Lotus corniculatus*. *Soil Biology & Biochemistry*, 24: 241-247.
- Morris, P., Carron, T.R., Robbins, M.P., Webb, K.J. (1993) Distribution of condensed tannins in flowering plants of *Lotus corniculatus* var. japonicus and tannin accumulation by transformed root cultures. *Lotus Newsletter*, 24: 60-63.
- Mujica, M.M., Rumi, C.P. (1999) A technique of vegetative propagation by stem cuttings was fitted to *Lotus glaber* Mill. (= *Lotus tenuis* Waldst. et Kit. ex Wild.). *Lotus Newsletter*, 30.
- Munns, R. (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, cell & environment*, 25: 239-250.

- Munns, R. (2005) Genes and salt tolerance: bringing them together. *The New phytologist*, 167: 645-663.
- Munns, R., Tester, M. (2008) Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 651-681.
- Mylona, P., Pawlowski, K., Bisseling, T. (1995) Symbiotic nitrogen fixation. *Plant Cell*, 7: 869-885.
- Negri, V., Veronesi, F. (1989) Evidence for the existence of $2n$ gametes in *Lotus tenuis* Wald. et Kit. ($2n=2x=12$): their relevance in evolution and breeding of *Lotus corniculatus* L. ($2n=4x=24$). *Theoretical and Applied Genetics*, 78: 400-404.
- Nei, M., Kumar, S. (2000) *Molecular evolution and phylogenetics* Oxford University Press, New York.
- Nelson, D.W., Sommers, L.E. (1973) Determination of total nitrogen in plant material. *Agronomy Journal*, 65: 109-112.
- Nesi, N., Debeaujon, I., Jond, C., Pelletier, G., Caboche, M., Lepiniec, L. (2000) The TT8 gene encodes a basic helix-loop-helix domain protein required for expression of DFR and BAN genes in *Arabidopsis* siliques. *The Plant Cell Online*, 12: 1863-1863.
- Nesi, N., Jond, C., Debeaujon, I., Caboche, M., Lepiniec, L. (2001) The *Arabidopsis* TT2 gene encodes an R2R3 MYB domain protein that acts as a key determinant for proanthocyanidin accumulation in developing seed. *The Plant cell*, 13: 2099-2114.
- Nichols, P.G.H., Rogers, M.E., Craig, A.D., Albertsen, T.O., Miller, S.M., McClements, D.R., Hughes, S.J., D'Antuono, M.F., Dear, B.S. (2008) Production and persistence of temperate perennial grasses and legumes at five saline sites in southern Australia. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 48: 536-552.
- Niezen, J.H., Waghorn, T.S., Charleston, W.A.G., Waghorn, G.C. (1995) Growth and gastrointestinal nematode parasitism in lambs grazing either lucerne (*Medicago sativa*) or sulla (*Hedysarum coronarium*) which contains condensed tannins. *The Journal of Agricultural Science*, 125: 281-289.
- Nybom, N. (1964) Thin-Layer chromatographic analysis of anthocyanidins. *Physiologia Plantarum*, 17: 157-164.
- O'Donoghue, L.S., Grant, W.F. (1988) New sources of indehiscence for birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*, Fabaceae) produced by interspecific hybridization. *Genome*, 30: 459-468.
- Otero, M.J., Hidalgo, L.G. (2004) Condensed tannins in temperate forage species: effects on the productivity of ruminants infected with internal parasites (a review). *Livestock Research for Rural Development*, 16: 1-17.
- Pajuelo, E., Carrasco, J.A., Romero, L.C., Chamber, M.A., Gotor, C. (2007) Evaluation of the metal phytoextraction potential of crop legumes. Regulation of the expression of O-acetylserine (thiol)lyase under metal stress. *Plant Biology*, 9: 672-681.
- Pajuelo, E., Stougaard, J. (2005) *Lotus japonicus* as a model system, in: Marquez, A.J. (Ed.), Springer, Netherlands. pp. 3-24.
- Pang, Y., Peel, G.J., Sharma, S.B., Tang, Y., Dixon, R.A. (2008) A transcript profiling approach reveals an epicatechin-specific glucosyltransferase expressed in the seed coat of *Medicago truncatula*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105: 14210-14225.
- Pang, Y., Peel, G.J., Wright, E., Wang, Z., Dixon, R.A. (2007) Early Steps in Proanthocyanidin Biosynthesis in the Model Legume *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, 145: 601-615.

- Pang, Y., Wenger, J.P., Saathoff, K., Peel, G.J., Wen, J., Huhman, D., Allen, S.N., Tang, Y., Cheng, X., Tadege, M., Ratet, P., Mysore, K.S., Sumner, L.W., Marks, M.D., Dixon, R.A. (2009) A WD40 Repeat Protein from *Medicago truncatula* Is Necessary for Tissue-Specific Anthocyanin and Proanthocyanidin Biosynthesis But Not for Trichome Development. *Plant Physiology*, 151: 1114-1129.
- Pankhurst, C.E. (1970) Development of effective and ineffective root nodules on two *Lotus* species. *New Zealand Journal of Science*, 13: 519-531.
- Pankhurst, C.E., Craig, A.S., Jones, W.T. (1979) Effectiveness of *Lotus* root nodules. I. Morphology and flavolan content of nodules formed on *Lotus pedunculatus* by fast-growing *Lotus* rhizobia. *Journal of Experimental Botany*, 30: 1085-1093.
- Pankhurst, C.E., Jones, W.T. (1979) Effectiveness of *Lotus* root nodules. II. Relationship between root nodule effectiveness and 'in vitro' sensitivity of fast-growing *Lotus* rhizobia to flavolans. *Journal of Experimental Botany*, 30: 1095-1107.
- Pankhurst, C.E., Jones, W.T., Craig, A.S. (1982) Bactericidal effect of *Lotus pedunculatus* root flavolan on fast-growing *Lotus* rhizobia. *Journal of General Microbiology*, 128: 1567-1576.
- Paolucci, F., Bovone, T., Tosti, N., Arcioni, S., Damiani, F. (2005) Light and exogenous transcription factor qualitatively and quantitatively affect the biosynthetic pathway of condensed tannins in *Lotus corniculatus* leaves. *Journal of Experimental Botany*, 56: 1093-1103.
- Paolucci, F., Capucci, R., Arcioni, S., Damiani, F. (1999) Birdsfoot trefoil: a model for studying the synthesis of condensed tannins, in: Groos, G.G., *et al.* (Eds.), Kluwer/Plenum Press, New York. pp. 343-356.
- Paolucci, F., Robbins, M.P., Madeo, L., Arcioni, S., Martens, S., Damiani, F. (2007) Ectopic expression of a basic Helix-Loop-Helix gene transactivates parallel pathways of proanthocyanidin biosynthesis. Structure, expression analysis, and genetic control of Leucoanthocyanidin 4-Reductase and Anthocyanidin Reductase genes in *Lotus corniculatus*. *Plant Physiology*, 143: 504-516.
- Paolucci, F., Robbins, M.P., Passeri, V., Hauck, B., Morris, P., Rubini, A., Arcioni, S., Damiani, F. (2011) The strawberry transcription factor FaMYB1 inhibits the biosynthesis of proanthocyanidins in *Lotus corniculatus* leaves. *Journal of Experimental Botany*, 62: 1189-1189.
- Papadopoulos, Y., Kelman, W. (1999) Traditional breeding of *Lotus* species, in: Beuselinck, P.R. (Ed.), CSSA Special Publication Number 28. pp. 187-198.
- Parida, A., Das, A., Das, P. (2002) NaCl stress causes changes in photosynthetic pigments, proteins, and other metabolic components in the leaves of a true mangrove, *Bruguiera parviflora*, in hydroponic cultures. *Journal of Plant Biology*, 45: 28-36.
- Pasternak, D., Sagih, M., DeMalach, Y., Keren, Y., Shaffer, A. (1995) Irrigation with brackish water under desert conditions XI. Salt tolerance in sweet-corn cultivars. *Agricultural Water Management*, 28: 325-334.
- Patra, A.K., Saxena, J. (2010) A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*, 71: 1198-1222.
- Peel, G.J., Pang, Y., Modolo, L.V., Dixon, R.A. (2009) The LAP1 MYB transcription factor orchestrates anthocyanidin biosynthesis and glycosylation in *Medicago*. *The Plant Journal*, 59: 136-149.

- Pesqueira, J. (2008) Cambios bioquímicos, morfológicos y ecofisiológicos en plantas del género *Lotus* bajo estrés salino, Departamento de Biología Molecular, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia. pp. 172.
- Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29: 2003-2007.
- Pieckenstain, F.L., Estrella, M.J., Sannazzaro, A., Menéndez, A.B., Fracaroli, V., Castagno, N., Echeverría, M., Pesqueira, J., Vertiz, P., Paz, R.C., Micieli, M.E., Escaray, F.J., Bergottini, V., Schulmeister, S., Uchiya, P., Rosso, B., Andres, A., Ruiz, O.A. (2007) *Lotus tenuis* as a keystone species for the Salado River Basin (Argentina). *Lotus Newsletter*, 37: 74-75.
- Pina, F.J., Valdés, B. (2009) A New Species of *Lotus* (Leguminosae, Loteae) from the *L. angustissimus* (sect. *Lotus*) Complex. *Systematic Botany*, 34: 709-714.
- Porter, L.J., Hrstich, L.N., Chan, B.G. (1985) The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry*, 25: 223-230.
- Price, M.L., Van Scoyoc, S., Butler, L.G. (1978) A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26: 1214-1218.
- Quinos, P.M., Insausti, P., Soriano, A. (1998) Facilitative effect of *Lotus tenuis* on *Paspalum dilatatum* in a lowland grassland of Argentina. *Oecologia*, 114: 427-431.
- Ramírez De Arellano, J.B. (2007) Requisitos edáficos de algunas especies de interés especial de las malladas del Parque Natural de la Albufera, Escola Politècnica de València, Universitat Politècnica de València. pp. 96.
- Razdan, M.K., Cocking, E.C. (1981) Improvement of legumes by exploring extra-specific genetic variation. *Euphytica*, 30: 819-833.
- Real, D., Warden, J., Sandral, G.A., Colmer, T.D. (2008) Waterlogging tolerance and recovery of 10 *Lotus* species. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 48: 480-487.
- Rearte, D. (2004) El futuro de la ganadería argentina, 2º Jornada de Actualización Ganadera, Balcarce. pp. 6-11.
- Rearte, D. (2010) Situación actual y prospectiva de la producción de carne vacuna. Sitio Argentino de Producción Animal.
- Reinoso, H., Sosa, L., Ramírez, L., Luna, V. (2004) Salt-induced changes in the vegetative anatomy of *Prosopis strombulifera* (Leguminosae). *Canadian Journal of Botany*, 82: 618-628.
- Rengasamy, P. (2006) World salinization with emphasis on Australia. *Journal of Experimental Botany*, 57: 1017-1023.
- Rengasamy, P., Chittleborough, D., Helyar, K. (2003) Root-zone constraints and plant-based solutions for dryland salinity. *Plant and Soil*, 257: 249-260.
- Repková, J., Hofbauer, J. (2009) Seed pod shattering in the genus *Lotus* and its overcoming. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 45: 39-44.
- Robbins, M.P., Bavage, A.D., Allison, G., Davies, T., Hauck, B., Morris, P. (2005) A comparison of two strategies to modify the hydroxylation of condensed tannin polymers in *Lotus corniculatus* L. *Phytochemistry*, 66: 991-999.
- Roberts, C.A., Beuselinck, P.R. (1992) Condensed tannins in *Lotus* species. *Lotus Newsletter*, 23: 41-41.

- Roberts, C.A., Beuselinck, P.R., Ellersieck, M.R., Davis, D.K., McGraw, R.L. (1993) Quantification of tannins in birdsfoot trefoil germplasm. Crop Science Society of America, Madison, WI, ETATS-UNIS.
- Robertson, H.A., Niezen, J.H., Waghorn, G.C., Charleston, W.A.G., Jinlong, M. (1995) The effect of six herbage on liveweight gain, wool growth and faecal egg count of parasitised ewe lambs. Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production, 55: 199-201.
- Robinson, P.H., Grattan, S.R., Getachew, G., Grieve, C.M., Poss, J.A., Suarez, D.L., Benes, S.E. (2004) Biomass accumulation and potential nutritive value of some forages irrigated with saline-sodic drainage water. Animal Feed Science and Technology, 111: 175-189.
- Rogers, M.E., Noble, C.L., Halloran, G.M., Nicolas, M.E. (1997) Selecting for salt tolerance in white clover (*Trifolium repens*): chloride ion exclusion and its heritability. New Phytologist, 135: 645-654.
- Ross, M.D., Jones, W.T. (1983) A genetic polymorphism for tannin production in *Lotus corniculatus* and its relationship to cyanide polymorphism. Theoretical and Applied Genetics, 64: 263-268.
- Rubio Delgado, J.L., Perez, V.A., Sanchis Duato, E. (1998) Los suelos de la Devesa de la Albufera. Revista Valenciana d'Estudis Autònoms, 22: 129-144.
- Rumbaugh, M.D. (1985) Breeding bloat-safe cultivars of bloat-causing legumes, in: Barnes, F.R., *et al.* (Eds.), Proc. Bilateral Workshop, Palmerston North, NZ, Washington. pp. 238-245.
- Saeki, K., Kouchi, H. (2000) The *Lotus* symbiont, *Mesorhizobium loti*: molecular genetic techniques and application. Journal of Plant Research, 113: 457-465.
- Salisbury, F.B., Ross, C.W. (1992) Fisiología Vegetal. Ed. Iberoamérica.
- Samek, J.R., Beuselinck, P.R. (1994) *Lotus corniculatus* L. diploids and their hybridization with *L. tenuis* Waldst & Kit. Ex Willd, in: Beuselinck, P.R., Roberts, C.A. (Eds.), University of Missouri, Columbia, St Louis, MO. pp. 229-231.
- Sanchez, D.H., Pieckenstein, F.L., Escaray, F., Erban, A., Kraemer, U., Udvardi, M.K., Kopka, J. (2011) Comparative ionomics and metabolomics in extremophile and glycophytic *Lotus* species under salt stress challenge the metabolic pre-adaptation hypothesis. Plant, Cell and Environment, 34: 605-617.
- Sandral, G., Degtjareva, G.V., Kramina, T.E., Valiejo-Roman, C.M. (2010) Are *Lotus creticus* and *Lotus cytisoides* (Leguminosae) closely related species? Evidence from nuclear ribosomal ITS sequence data. Genetic Resources and Crop Evolution, 57: 501-514.
- Sannazzaro, A.I., Ruiz, O.A., Albertó, E., Menéndez, A.B. (2004) Presence of different arbuscular mycorrhizal infection patterns in roots of *Lotus glaber* plants growing in the Salado River basin. Mycorrhiza, 14: 139-142.
- Santos, A. (2007) Una visión global del género *Lotus* (Loteae, Fabaceae). Lotus Newsletter, 37: 52-53.
- Sartor, L.R., Adami, P.F., Soares, A.B., Pitta, C.S.R., Montardo, D.P., Dall'Agnol, M. (2010) Cool season forage legumes in southwestern of Paraná. Scientia Agraria, 11: 293-298.
- Sato, S., Nakamura, Y., Kaneko, T., Asamizu, E., Kato, T., Nakao, M., Sasamoto, S., Watanabe, A., Ono, A., Kawashima, K., Fujishiro, T., Katoh, M., Kohara, M., Kishida, Y., Minami, C., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimizu, Y., Shinpo, S.,

- Takahashi, C., Wada, T., Yamada, M., Ohmido, N., Hayashi, M., Fukui, K., Baba, T., Nakamichi, T., Mori, H., Tabata, S. (2008) Genome structure of the legume, *Lotus japonicus*. *DNA Research*, 15: 227-239.
- Scalbert, A. (1992) Quantitative methods for the estimation of tannins in plant tissues, in: Hemingway, R.W., Laks, P.E. (Eds.), Plenum Press, New York. pp. 259-280.
- Schaefer, H.M., Rolshausen, G. (2005) Plants on red alert: do insects pay attention? *BioEssays*, 27: 1-7.
- Schiefelbein, J. (2003) Cell-fate specification in the epidermis: a common patterning mechanism in the root and shoot. *Current Opinion in Plant Biology*, 6: 74-78.
- Schofield, P., Mbugua, D.M., Pell, A.N. (2001) Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 91: 21-40.
- Shahidi, F., Naczki, M. (1995) Food phenolics: sources, chemistry, effects, applications, Lancaster, Pennsylvania.
- Sherwin, H.W., Farrant, J.M. (1998) Protection mechanisms against excess light in the resurrection plants *Craterostigma wilmsii* and *Xerophyta viscosa*. *Plant Growth Regulation*, 24: 203-210.
- Shirley, B.W. (1996) Flavonoid biosynthesis: "new" functions for an "old" pathway. *Trends in Plant Science*, 1: 377-382.
- Shirley, B.W. (1998) Flavonoids in seeds and grains: physiological function, agronomic importance and the genetics of biosynthesis. *Seed Science Research*, 8: 415-422.
- Shirley, B.W., Kubasek, W.L., Storz, G., Bruggemann, E., Koornneef, M., Ausubel, F.M., Goodman, H.M. (1995) Analysis of *Arabidopsis* mutants deficient in flavonoid biosynthesis. *The Plant Journal*, 8: 659-671.
- Siddiqui, Z.A., Akhtar, M.S., Futai, K. (2008) Mycorrhizae: sustainable agriculture and forestry Springer, The Netherlands.
- Singh, R.J. (2003) Plant cytogenetics CRC Press.
- Singh, R.J., Chung, G.H., Nelson, R.L. (2007) Landmark research in legumes. *Genome*, 50: 525-537.
- Singh, S., McCallum, J., Gruber, M.Y., Towers, G.H.N., Muir, A.D., Bohm, B.A., Koupai-Abyazani, M.R., Glass, A.D.M. (1997) Biosynthesis of flavan-3-ols by leaf extracts of *Onobrychis viciifolia*. *Phytochemistry*, 44: 425-432.
- Sivakumaran, S., Rumball, W., Lane, G.A., Fraser, K., Foo, L.Y., Yu, M., Meagher, L.P. (2006) Variation of proanthocyanidins in *Lotus* species. *Journal of Chemical Ecology*, 32: 1797-1816.
- Sleugh, B., Moore, K.J., George, J.R., Brummer, E.C. (2000) Binary legume-grass mixtures improve forage yield, quality, and seasonal distribution. *Agronomy Journal*, 92: 24-29.
- Smith, S.E., Read, D.J. (2008) Mycorrhizal symbiosis Elsevier, Great Britain.
- Sneath, P.H.A., Sokal, R.R. (1973) Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification Freeman, San Francisco.
- Somaroo, B.H., Grant, W.F. (1971) Interspecific hybridization between diploid species of *Lotus* (Leguminosae). *Genetica*, 42: 353-367.
- Soriano, A. (1991) Rio de la Plata Grasslands, in: Coupland, R.T. (Ed.), Elsevier, Amsterdam - London - New York - Tokio. pp. 367-407.
- Stafford, H.A. (1989) The enzymology of proanthocyanidin biosynthesis, in: Hemingway, R.W., Karchesy, J.J. (Eds.), Plenum Press, New York. pp. 47-70.

- Stafford, H.A., Cheng, T.Y. (1980) The procyanidins of douglas fir seedlings, callus and cell suspension cultures derived from cotyledons. *Phytochemistry*, 19: 131-135.
- Stepien, P., Johnson, G.N. (2009) Contrasting responses of photosynthesis to salt stress in the glycophyte *Arabidopsis* and the halophyte *thellungiella*: role of the plastid terminal oxidase as an alternative electron sink. *Plant Physiology*, 149: 1154-1165.
- Stoffella, S.C., Posse, G., Collantes, M. (1998) Variabilidad fenotipica y genotipica de poblaciones de *Lotus tenuis* que habitan suelos con distinto pH. *Ecologia Austral*, 8: 57-63.
- Stoutjesdijk, P.A., Sale, P.W., Larkin, P.J. (2001) Possible involvement of condensed tannins in aluminium tolerance of *Lotus pedunculatus*. *Australian Journal of Plant Physiology*, 28: 1063-1074.
- Striker, G., Insausti, P., Grimoldi, A., Ploschuk, E., Vasellati, V. (2005a) Physiological and anatomical basis of differential tolerance to soil flooding of *Lotus corniculatus* L. and *Lotus glaber* Mill. *Plant and Soil*, 276: 301-311.
- Striker, G.G., Insausti, P., Grimoldi, A.A., Ploschuk, E.L., Vasellati, V. (2005b) Physiological and anatomical basis of differential tolerance to soil flooding of *Lotus corniculatus* L. and *Lotus glaber* Mill. *Plant and Soil*, 276: 301-311.
- Strittmatter, C.D., Ricco, R.A., Kade, M., Wagner, M.L., Gurni, A.A. (1992) Condensed Tannins in *Lotus tenuis* Waldst. et Kit. *Lotus Newsletter*, 23: 41-44.
- Sulas, L., Franca, A., Caredda, S. (2000) Persistence and regeneration mechanism in forage legumes. *Cahiers Options Mediterraneenes*, 45: 331-342.
- Suzuki, H., Sasaki, R., Ogata, Y., Nakamura, Y. (2008) Metabolic profiling of flavonoids in *Lotus japonicus* using liquid chromatography Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Phytochemistry*, 69: 99-111.
- Szabolcs, I. (1994) Salt affected soils as the ecosystems for halophytes, in: Squires, V., Ayoub, T.A. (Eds.), *Kluwer Academic Publishers, Netherlands*. pp. 12-24.
- Szczyglowski, K., Stougaard, J. (2008) *Lotus* genome: pod of gold for legume research. *Trends in Plant Science*, 13: 515-517.
- Taiz, L., Zeiger, E. (1998) *Plant physiology* Sinauer Associates.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596-1599.
- Tanner, G.J., Francki, K.T., Abrahams, S., Watson, J.M., Larkin, P.J., Ashton, A.R. (2003) Proanthocyanidin biosynthesis in plants. Purification of legume leucoanthocyanidin reductase and molecular cloning of its cDNA. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 31647-31656.
- Tanner, G.J., Kristiansen, K.N. (1993) Synthesis of 3,4-cis-[3H]leucoanthocyanidin and enzymatic reduction to catechin. *Analytical Biochemistry*, 209: 274-277.
- Tavendale, M.H., Meagher, L.P., Pacheco, D., Walker, N., Attwood, G.T., Sivakumaran, S. (2005) Methane production from in vitro rumen incubations with and, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. *Animal Feed Science and Technology*, 123-124: 403-419.
- Teakle, N.L., Amtmann, A., Real, D., Colmer, T.D. (2010a) *Lotus tenuis* tolerates combined salinity and waterlogging: maintaining O₂ transport to roots and expression of an NHX1-like gene contribute to regulation of Na⁺ transport. *Physiologia Plantarum*, 139: 358-374.

- Teakle, N.L., Flowers, T.J., Real, D., Colmer, T.D. (2007) Lotus tenuis tolerates the interactive effects of salinity and waterlogging by 'excluding' Na⁺ and Cl⁻ from the xylem. *Journal of Experimental Botany*, 58: 2169-2180.
- 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: 369-383.
- Teakle, N.L., Snell, A., Real, D., Barrett-Lennard, E.G., Colmer, T.D. (2010b) Variation in salinity tolerance, early shoot mass and shoot ion concentrations within *Lotus tenuis*: towards a perennial pasture legume for saline land. *Crop & Pasture Science*, 61: 379-388.
- Teakle, N.L., Tyerman, S.D. (2010) Mechanisms of Cl⁻ transport contributing to salt tolerance. *Plant, Cell and Environment*, 33: 566-589.
- Terrill, T.H., Rowan, A.M., Douglas, G.B., Barry, T.N. (1992) Determination of extractable and bound condensed tannin concentration in forage plants, protein concentrate meals and cereal grain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 58: 321-329.
- Tian, L., Pang, Y., Dixon, R. (2008) Biosynthesis and genetic engineering of proanthocyanidins and (iso)flavonoids. *Phytochemistry Reviews*, 7: 445-465.
- Tomé, G.A., Johnson, I.J. (1945) Self- and cross-fertility relationships in *Lotus corniculatus* L. and *Lotus tenuis* Wald. Et Kit. *Journal of American Society of Agronomy*, 37: 1011-1023.
- Tonelli, C., Consonni, G., Dolfini, S.F., Dellaporta, S.L., Viotti, A., Gavazzi, J. (1991) Genetic and molecular analysis of Sn, a light-inducible, tissue specific regulatory gene in maize. *Molecular and General Genetics*, 225: 401-410.
- Valdés, B. (2000) *Lotus*, in: Talavera, S., *et al.* (Eds.), *Real Jardín Botánico*, Madrid. pp. 776-812.
- Vignolio, O.R., Fernández, O.N. (2006) Bioecología de *Lotus glaber* Mill. (Fabaceae) en la Pampa Deprimida (provincia de Buenos Aires, Argentina). *Revista Argentina de Producción Animal*, 26: 113-130.
- Vignolio, O.R., Fernández, O.N., Maceira, N.O. (1999) Flooding tolerance in five populations of *Lotus glaber* Mill. (Syn. *Lotus tenuis* Waldst. et. Kit.). *Australian Journal of Agricultural Research*, 50: 555-559.
- Vignolio, O.R., Maceira, N.O., Fernández, O.N. (1994) Efectos del anegamiento en invierno y verano sobre el crecimiento y la supervivencia de *Lotus tenuis* y *Lotus corniculatus*. *Ecologia Austral*, 4: 19-28.
- Waghorn, G.C., Shelton, I.D. (1997) Effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* on the nutritive value of pasture for sheep. *Journal of Agricultural Science*, 128: 365-372.
- Waghorn, G.C., Ulyatt, M.J., John, A., Fisher, M.T. (1987) The effect of condensed tannins on the site of digestion of amino acids and other nutrients in sheep fed on *Lotus corniculatus* L. *British Journal of Nutrition*, 57: 115-126.
- Walker, A.R., Davison, P.A. (1999) The TRANSPARENT TESTA GLABRA1 locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 repeat protein. *The Plant cell*, 11: 1337-1350.
- Warren, J., Mackenzie, S. (2001) Why are all colour combinations not equally represented as flower-colour polymorphisms? *New Phytologist*, 151: 237-241.

- Wedderburn, M.E., Gwynne, D.C. (1981) Seasonality of rhizome and shoot production and nitrogen fixation in *Lotus uliginosus* under upland conditions in south-west Scotland. *Annals of Botany*, 48: 5-13.
- Winkel-Shirley, B. (2001) Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology*, 126: 485-493.
- Winkel-Shirley, B. (2002) Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 218-223.
- Wojciechowski, M.F. (2003) Reconstructing the phylogeny of Legumes (Leguminosae): an early 21 st century perspective, in: Klitgaard, B.B., Bruneau, A. (Eds.), *Royal Botanic Gardens, Kew*. pp. 5-35.
- Xie, D.-Y., Sharma, S.B., Paiva, N.L., Ferreira, D., Dixon, R.a. (2003) Role of anthocyanidin reductase, encoded by BANYULS in plant flavonoid biosynthesis. *Science*, 299: 396-399.
- Yamasaki, H. (1997) A function of colour. *Trends in Plant Science*, 2: 7-8.
- Yoshida, K., Iwasaka, R., Kaneko, T., Sato, S., Tabata, S., Sakuta, M. (2008) Functional differentiation of *Lotus japonicus* TT2s, R2R3-MYB transcription factors comprising a multigene family. *Plant and Cell Physiology*, 49: 157-169.
- Yoshida, K., Kume, N., Nakaya, Y., Yamagami, A., Nakano, T., Sakuta, M. (2010) Comparative analysis of the triplicate proanthocyanidin regulators in *Lotus japonicus*. *Plant and Cell Physiology*, 51: 912-922.
- Zahran, H.H. (1999) Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63: 968-989.
- Zhang, F., Gonzalez, A., Zhao, M., Payne, C.T., Lloyd, A. (2003) A network of redundant bHLH proteins functions in all TTG1-dependent pathways of Arabidopsis. *Development (Cambridge, England)*, 130: 4859-4869.
- Zhao, J., Dixon, R.A. (2009) The 'ins' and 'outs' of flavonoid transport. *Trends in Plant Science*, 15: 72-80.
- Zhao, J., Pang, Y., Dixon, R.A. (2010) The mysteries of proanthocyanidin transport and polymerization. *Plant Physiology*, 153: 437-443.
- Zhu, J.-K. (2003) Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 6: 441-445.

Apéndices.

Apéndice 1.

La Devesa de la Albufera de Valencia.

A unos 15 km al sur de la ciudad de Valencia (España) se encuentra el Parque Natural de la Albufera (*Parc Natural de l'Albufera*), el cual cuenta con 21.120 ha y constituye uno de los espacios naturales más representativos e interesantes de la Comunidad Valenciana. Dentro del parque se pueden distinguir tres subsistemas o ambientes principales: a) la laguna, b) el marjal-arrozal y c) la restinga (Benavent Olmos *et al.* 2004). La restinga es un cordón litoral emergido de unos 30 km de longitud y 1 km de ancho. Solo una parte de este cordón (unos 10 km) se libró del proceso urbanístico y constituye una de las áreas de mayor valor ecológico de la península: la Devesa de la Albufera de Valencia (Benavent Olmos *et al.* 2004, Ramírez De Arellano 2007).

En la Devesa se pueden encontrar algunas especies nativas del género *Lotus*; siendo la más abundante *L. creticus*, la cual cumple un importante rol como especie pionera en la fijación del primer cordón dunar (Escaray *et al.* 2010). Por otra parte, en las depresiones interdunares de la Devesa, se ha observado la presencia de poblaciones de *L. corniculatus* (Costa *et al.* 1984, Ramírez De Arellano 2007).

Las depresiones interdunares se encuentran a lo largo de toda la Devesa y son conocidas localmente como malladas (*les mallaes*). Originalmente ocupaban un 25% de la superficie de la Devesa, pero debido al proceso de urbanización, su superficie disminuyó drásticamente (Benavent Olmos *et al.* 2004). Entre las distintas malladas se han observado diferentes condiciones edáficas, reconociéndose en ellas dos tipos de suelos predominantes: los Solonchacks gleycos y los Gleysoles calcáricos (Figura A1). En ambos tipos de suelos predomina la estructura limosa, se encuentran afectados por condiciones halo-hidromórficas y en general presentan bajo contenido de nutrientes y materia orgánica. La diferencia entre ellos está dada en que los suelos del tipo Solonchacks gleycos presentan condiciones salinas, mientras que los Gleysoles calcáricos no se encuentran afectados por elevadas concentraciones de sales (Rubio Delgado *et al.* 1998). En la Tabla A1 puede observarse los valores medios de pH y conductividad eléctrica de cinco malladas típicas.

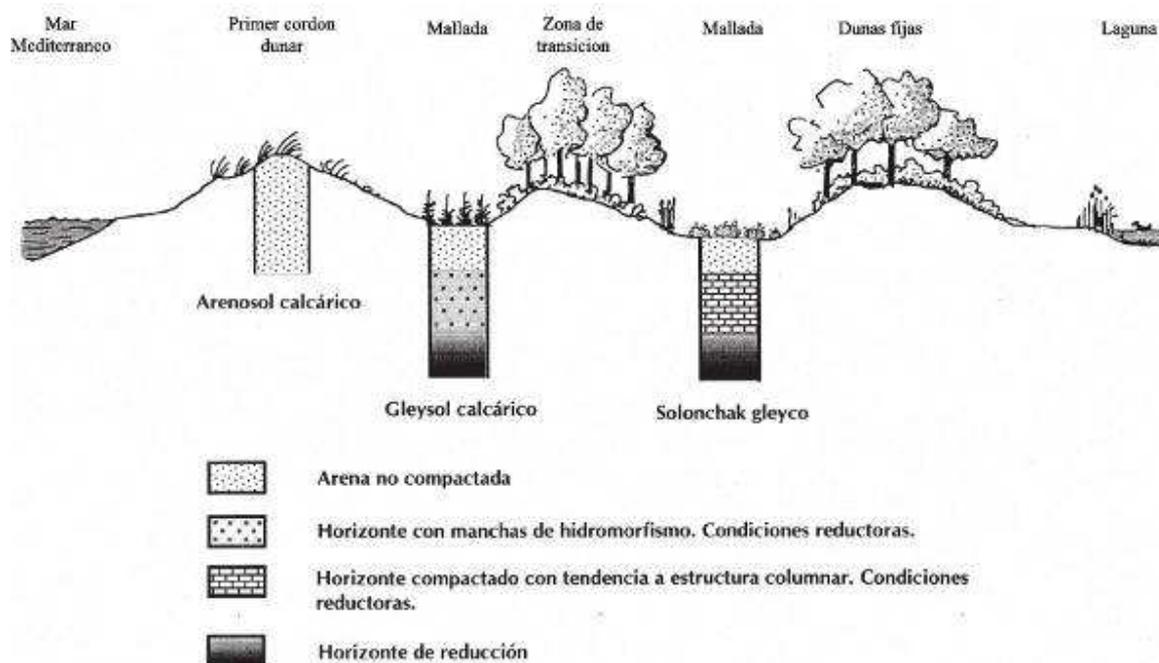


Figura A1. Esquema topográfico de la Devesa de la Albufera de Valencia. En el mismo se pueden observar los tres tipos de suelos predominantes y sus horizontes (Rubio Delgado *et al.* 1998).

Tabla A1. Valores de pH y conductividad eléctrica (CE) a diferentes profundidades de suelo (0 a 10, 10 a 15 y 10 a 20 cm) de cinco malladas de la Albufera de Valencia (Ramírez De Arellano 2007).

Mallada	pH		CE (dS/m)	
	0 a 10 cm	10 a 15 cm	0 a 10 cm	10 a 20 cm
Canyar	8,99	9,10	4,50	6,80
Canyar 2	8,96	9,14	9,10	7,90
Malladeta/Cayar	9,00	9,13	5,00	4,40
Malladeta	9,02	9,67	3,00	6,60
Tubería	9,19	9,51	9,20	7,30

Las condiciones edáficas restrictivas de las malladas han determinado que en ellas se desarrollen comunidades vegetales del tipo halófito o sub-halófito. Asimismo, se distinguen cuatro clases fitosociológicas: *Thero-Salicornietea*, *Arthrocnemetea*, *Juncetea maritimi* y *Nerio tamaricetea* (Costa *et al.* 1984).

Climáticamente el área corresponde según Köpen, al subtipo mediterráneo, y según Thornthwaite se define como Semiárido D, con exceso de agua en invierno, Mesotérmico B₃ y con baja concentración estival de la eficacia térmica. La precipitación media anual es de 450 mm y la temperatura media anual es de 17,5°C, con reducida oscilación térmica debido al efecto del mar Mediterráneo. Sin embargo, ocasionalmente se producen heladas en los meses de diciembre y enero (Ramírez De Arellano 2007).

En función de las condiciones edáficas restrictivas a las que se encuentran sujetas las especies presentes en las malladas de la Albufera de Valencia, resulta de interés la evaluación de las poblaciones de *L. corniculatus* allí presentes.

Para ello, durante los meses de junio y julio del 2007 se procedió a ubicar, evaluar y recolectar semillas de las poblaciones de *L. corniculatus* que se encontraban en la Devesa de la Albufera de Valencia (España). Los datos de posicionamiento global y superficie de las poblaciones encontradas fueron tomados con un instrumento Garmin-GPS 12 usando el sistema de coordenadas UTM (del inglés *Universal Transverse Mercator*). Se seleccionaron las tres poblaciones de *L. corniculatus* que presentaban la mayor superficie y de ellas se colectaron las semillas provenientes del mayor número posible de plantas integrantes de cada población. A su vez, se tomaron muestras compuestas de los primeros 20 cm del suelo en el que crecían. En estas muestras se determinó el pH y la conductividad eléctrica (CE) mediante la utilización de un pH-metro/conductímetro (Hanna, HI 255). El pH se determinó en agua, para lo cual se realizó una dilución suelo/agua de 1/2,5; mientras que la CE se determinó utilizando el procedimiento de pasta saturada.

Para cada población seleccionada se identificaron las especies vegetales acompañantes utilizando una clave dicotómica desarrollada por la Oficina Técnica Devesa-Albufera y la colaboración del botánico Antonio Vizcaíno y Francisco Collado (ambos pertenecientes a dicha oficina).

Se pudieron ubicar 12 poblaciones naturales de *L. corniculatus* en la Devesa de la Albufera, las cuales se encontraban confinadas en diferentes malladas (Figura A2.A). En dicha época se observó que en la mayoría de las malladas, su parte central se encontraban encharcada o húmeda. Por su parte, las condiciones edáficas donde se encontraban las poblaciones de *L. corniculatus* presentaban en común un elevado pH (> 8,5); mientras que la conductividad eléctrica resultó variable. De esta manera se determinaron tres tipos diferentes de poblaciones en función de la conductividad eléctrica del suelo en el que se encontraban: a) poblaciones en suelos con elevada conductividad eléctrica (alrededor de 13 dS/m); b) poblaciones en suelos con baja conductividad eléctrica (0,2–0,5 dS/m) y c) poblaciones en suelos con conductividad eléctrica intermedia (2–6 dS/m).

Las poblaciones de mayor tamaño que se seleccionaron cubrían una superficie de 490 m², 110 m² y 200 m² para las de tipo a, b y c respectivamente. Su ubicación geográfica en escala UTM era 731307,7-4358456,4 para la población del tipo a (Figura A2.B); 730322,2-4361704,4 para la del tipo b (Figura A2.C) y 730357,3-4361549,5 para la del tipo c (Figura A2.D).

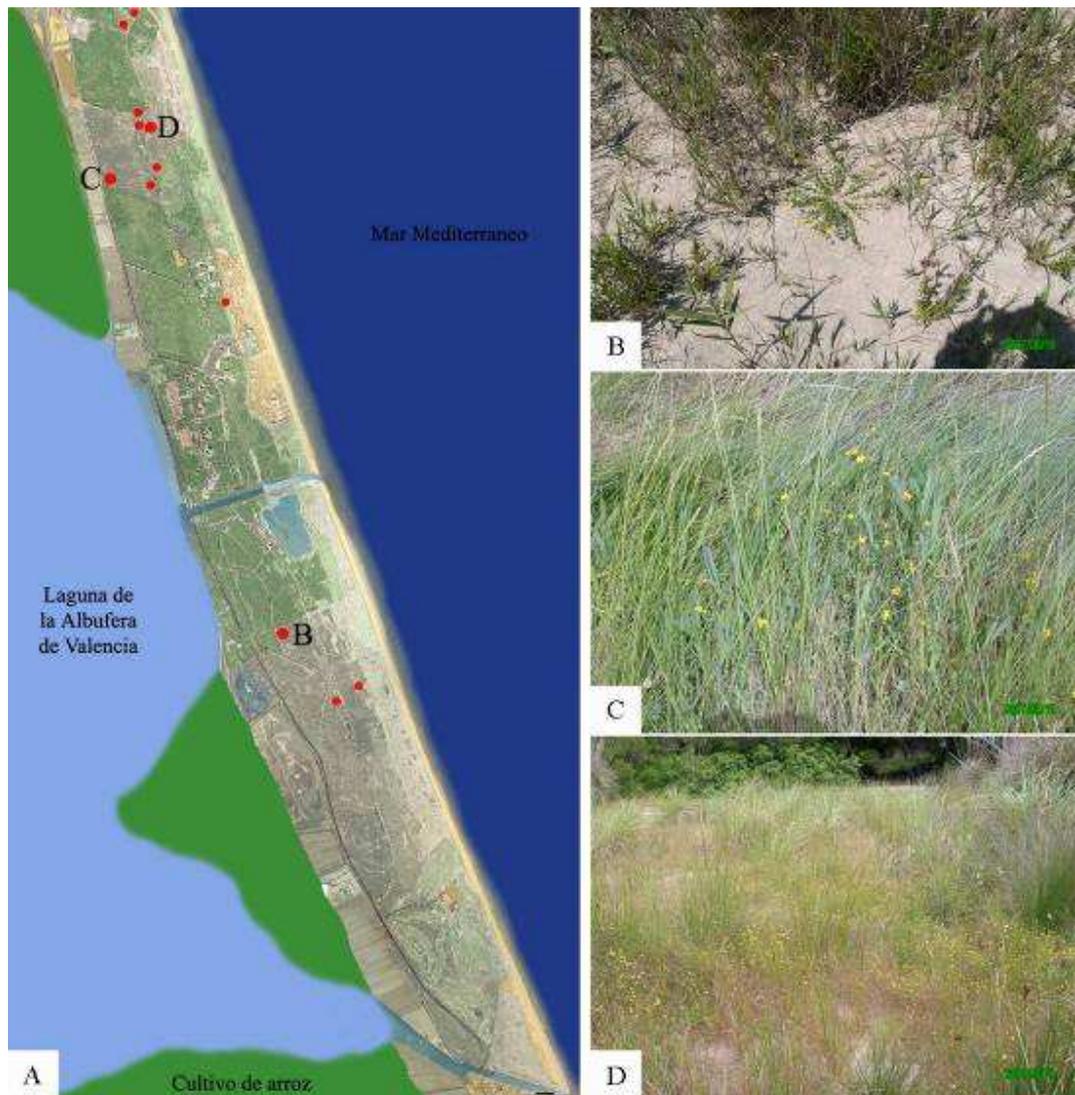


Figura A2. A. Foto satelital de la Devesa del Parque Natural de la Albufera de Valencia. En ella se indican mediante círculos rojos la posición de las poblaciones de *L. corniculatus*. Los círculos de mayor tamaño indican las poblaciones representativas; su letra corresponde con las fotos de la derecha. B. Planta de *L. corniculatus* de la población que se encontraba en la zona con mayor conductividad eléctrica, lugar: Mallada de la Mata del Fang. C. Plantas de *L. corniculatus* creciendo en asociación con *Elymus elongatus* en la zona de menor conductividad eléctrica. D. Plantas de *L. corniculatus* creciendo en la zona de conductividad eléctrica intermedia, lugar: Mallada de la Rambla.

Las especies vegetales que acompañaban a las poblaciones de *L. corniculatus* resultaron diferentes según el tipo de población se tratase. Las poblaciones del tipo a y c se encontraban acompañadas por especies vegetales halófitas o sub-halófitas. Mientras que en las del tipo b se destacó la presencia de agropiro alargado (*Elymus elongatus*) la cual se encontraba en mayor abundancia acompañando a *L. corniculatus*. En la Tabla A2 se puede observar una lista de las especies que en mayor proporción se encontraban acompañando a las poblaciones de *L. corniculatus*.


```

L. corniculatus GTGGTGCATA TTAGAGAGAC CCTTAATTAA ATGGTTGTGT AATTGATAAT TCTTGTGTGG ATCACAAATT CAATGTAT--
L. tenuis -----
      810      820      830      840      850      860      870      880
L. corniculatus -----GTG TATAAAATTA CACGTCATTA AAGTAAAATT TGTAACATAAT TGTTGGTTATA AAAGTGACGT GTTGAGTTTG
L. tenuis TTTTGTAGTG TATAAAATTA CACATCATT AAGTAAAATT TGTAACATAAT TGTTGGTTATA AAAGTGACGT GTTGAGTTTG
      890      900      910      920      930      940      950      960
L. corniculatus TGCTCACACA AGAATGAAGA ATCAATCATG TGTTACCACT CTATAGTAAT TACATTCTTA AACA---TTA TGGCTTCTAA
L. tenuis TGCTCGCACA AGAATGAAGA ATCAATCATG TGTTACCACT CTACAGTAAT TACATTCTTA AACAATATTA TGGCTTCTAA
      970      980      990      1000      1010      1020      1030      1040
L. corniculatus TGAAAAAATC TTGACTTATT GACTAGTTGG TTG---AGA CTTTCTTTT CTTTTATGAA TAGTAGTAGA TGTTTTGAGT
L. tenuis TGAAAAAATC TTGACTTATT GACTAGTTGG TTGTTAAGA CTTTCTTTT CTTT---GAA TAGTAGTAGA TGTTTTGAGT
      1050      1060      1070      1080      1090      1100      1110      1120
L. corniculatus TGGTTAAGAG GTGCCCTTC TCTATTGATG TTAAGATTGT GATTTTAAAG GGTTCATT CTTTGGGTT TCAGGTTATA
L. tenuis TGGTTAAGAG GTGCCCTTC TCTATTGATG TTAAGATTGT GATTTTAAAG GGTTCATT CTTTGGGTT TCAGGTTATA
      1130      1140      1150      1160      1170      1180      1190      1200
L. corniculatus CAAATTTTT T-GAGATGTC ATTCTCTTT GGATTGTTT GGTCTTGT ACCGGTGCTA TTTCTCTTC TGAGATGGT
L. tenuis CAAATTTTT TTGAGATGTC ATTCTCTTT GGATTGTTT GGTCTTGT ACCGGTGCTA TTTCTCTTC TGAGATGGT
      1210      1220      1230      1240      1250      1260      1270      1280
L. corniculatus TGTGGTCTT TTGTGGCACT TTAATTATAT GAATTAATTG CTTTTCTTA AAAAAGAAAG TTTCAATAA TTAGTTAAAA
L. tenuis TGTGGTCTT TTGTGGCACT TTAATTATAT GAATTAATTG CTTTTCTTA AAAAAGAGAA TTTCAATAA TTAGTTAAAA
      1290      1300      1310      1320      1330      1340      1350      1360
L. corniculatus ATGTTGTAAT GAAACTTACT ATAATTATCG TGAA-----
L. tenuis ATGTTGTAAT GAAACTTACT ATAATTATCG TGAAGGAAAA TGTTCCTTC CCACCTCACT TTGAGGTGGA AGGAGATGGA
      1370      1380      1390      1400      1410      1420      1430      1440
L. corniculatus ----- TAGAAAAAAC TCATTGA--- ---TTAA TCTTTACCGT TTAATAG---
L. tenuis GGAGGAGAGA GATAGGAAGA TAAGAAAAG TAAGAGAGAG AAAGTATGAG ATGTGATAGA TTATTAGATG AGAGAGGTAG
      1450      1460      1470      1480      1490      1500      1510      1520
L. corniculatus -----CTTG AAAGATTAGT C--TCACA-- --ACTATCAA GTTTTAAATC GTTTGTGACT
L. tenuis AAACAAAAT AGGTGGAAAT GAAGTGTCA AAAGATGAGG TGTTTATATA TCATTACCCA GTTTTAAATC ATTTGTGACT
      1530      1540      1550      1560      1570      1580      1590      1600
L. corniculatus TGAATAAACA CAGGGAAGTT ACCAGCGACT ATGCAAGGCC ACTAAGAGTG CYTGCGAGCA AGATACTGGA AGTGCTATCT
L. tenuis TGAATAAACA CAGGGAAGTT ACCAGCGACT ATGCAAGGCC ACTAAGAGTG CCTGCGAGCA AGATACTGGA AGTGCTATCT
      1610      1620      1630      1640      1650      1660      1670      1680
L. corniculatus CTGGAAITGG GTCTCGAAGA AGGAAGCTTA GAAAGG---
L. tenuis CTGGAAITGG GTCTCGAAGA AGGAAGCTTA GAGAAGGAAG TTGGTGAAT GAAAGAGCTT CTACTTCAGA TGAAATCAA
      1690
L. corniculatus -----
L. tenuis CTACTACCCA AAA

```

Alineamiento de las secuencias nucleotídicas del gen *FeANS* de las muestras de *L. corniculatus* “charlii” y *L. tenuis* “Pampa INTA”. ADNc, secuencia parcial.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
L. corniculatus TTAGCAAGCT TGCCAACAAT GCCAGTGGTC AGCTTGAATG GGAAGATTAC TTCTTCCACC TTATCTTTCC AGARGACAAG
      90      100      110      120      130      140      150      160
L. corniculatus CGTGACCTCT CCATCTGGCC CAAGACACCA TCATATTATA CGGAAGTTAC CAGCGACTAT GCAAGGCGAC TAAGAGTCT
      170      180      190      200      210      220      230      240
L. corniculatus TGCGAGCAAG ATACTGGAAG TGCTATCTCT GAAITGGGT CTCGAAGAAG GAAGGTTAGA RAAGGAAGTT GGTGGAATGG

```

```

                250      260      270      280      290      300      310      320
L. corniculatus  AAGAGCTTCT ACTTCAGATG AAAATCAACT ACTACCCAAA ATGCCCCAG CCAGAGCTAG CTCTCGGAGT TGAAGCCTCA
                ....|....|
                330
L. corniculatus  CACTGAGAAA

```

Alineamiento de las secuencias nucleotídicas del gen *FeANR* de las muestras de *L. corniculatus* “charlii” y *L. tenuis* “Pampa INTA”. ADNc, secuencia parcial.

```

                10      20      30      40      50      60      70      80
L. corniculatus  TCTGAAGTTA TAAGAGTGTG TGAGTGAGGG AGTTTGAGAA ACATGGCAAG CATCAAGCCA ATTTATGAAA AGAAGAAGGC
L. tenuis        -----
                90      100     110     120     130     140     150     160
L. corniculatus  ATGTGTGATT GGTGGCACTG GATTTGTGGC GTCCTTGCTG ATCAAGCAGT TGCTTGAAA GGGTTATGCT GTTAATACCA
L. tenuis        ATGTGTGATT GGTGGCACTG GATTTGTGGC GTCCTTGCTG ATCAAGCAGT TGCTT-AAAA GGGTTATGCT GTTAATACCA

                170     180     190     200     210     220     230     240
L. corniculatus  CTGTTAGAGA TCCAGATAAT CATCAAAAAGA TATCTCACCT TCTGGCACTG CAAAGTTTGG GTGAACATAA TATATTTAGA
L. tenuis        CTGTTAGAGA TCCAGATAAT CATAAAAAGA TATCTCACCT TCTGGCACTG CAAAGTTTGG GCGAACATAA TATATTTGGA

                250     260     270     280     290     300     310     320
L. corniculatus  GGAGAGCTAA CTGTTGAAA CGATTTTGAT ACCCCCATAG CAGGCTCTGA ACTTGTCTT CAACTCGCTA CACCTGTGAA
L. tenuis        GGAGAGCTAA CTGTTGAAA CGATTTTGAT ACCCCCATAG CAGGCTCTGA ACTTGTCTT C AACTCGCTA CACCTGTGAA

                330     340     350     360     370     380     390     400
L. corniculatus  TTTCGCTTCT GAAGATCCTG AGAATGACAT GATCAAGCCT GCAATCAAAG GTGTGTTGAA TGTGTTAAAA TCATGTGCAC
L. tenuis        TTTCGCTTCT GAAGATCCTG AGAATGACAT GATCAAGCCT GCAATCAAAG GTGTGTTGAA TGTGTTAAAA TCATGTGCAC

                410     420     430     440     450     460     470     480
L. corniculatus  GGCCGAAAGT TAAACGGGTC ATCTTAAACAT CCTCAGCAGC TTCTGTGACT ATAAGTGAAC TCAAA-----
L. tenuis        GGCCGAAAGT TAAACGGGTC ATCTTAAACAT CCTCAGCAGC TTCTGTGACT ATAAGTGAAC TCAAAGGGAC AGATCTTGTG

                490
L. corniculatus  -----
L. tenuis        ATGGATGAAA GCA

```

Alineamiento de las secuencias nucleotídicas del gen *FeLARI* de las muestras de *L. corniculatus* “charlii” y *L. tenuis* “Pampa INTA”. ADNc, secuencia parcial.

```

                10      20      30      40      50      60      70      80
L. corniculatus  AGGTCAGTTC ATTACTAAGG CAAGTCTTGG CTTGGACGC TCCACCTATC TGCTTCTAAG GCCAGTGTCT CTCACTCCCT
L. tenuis        -----CTAAGG CAAGTCTTGG CTTGGACGC TCCACCTATC TGCTTCTAAG GCCAGTGTCT CTCACTCCCT

                90      100     110     120     130     140     150     160
L. corniculatus  CCAAGGCTGC CATGTGCAAA AGCTTCAAG ACAGGGGGC TAAAGTCATT CATGGTGTTA TAAACGACAA GGAATTGATG
L. tenuis        CCAAGGCTGC CATGTGCAAA AGCTTCAAG ACAGGGGGC TAAAGTCATT CATGGTGTTA TAAACGACAA GGAATTGATG

                170     180     190     200     210     220     230     240
L. corniculatus  GTGAAGATTT TGAAGACTA CGAGATAGAC GTTGTCAATT CACTCGTAGG TGGAGGAAAT CTCATGGATC AGCGTACACT
L. tenuis        GTGAAGATTT TGAAGACTA CGAGATAGAC GTTGTCAATT CACTCGTAGG TGGAGGAAAT CTCATGGATC AGCGTACACT

                250     260     270     280     290     300     310     320
L. corniculatus  TGTGGAYGCC ATTAAGTCTG TCAAGACGGT CAAGAGGTTT TTGCCTCAG AGTTTGGGCA TGATACAGAC AGGGCTAATC
L. tenuis        TGTGGAYGCC ATTAAGTCTG TCAAGACGGT CAAGAGGTTT TTGCCTCAG AGTTTGGGCA TGATACAGAC AGGGCTAATC

                330     340     350     360     370     380     390     400
L. corniculatus  CTGTGGAGCC AGGTCTAACM ATGTACAAAG AGAAACGGTT GATTAGGCGT TTGATTGAGG AATCTGGGAT TCCCTACACT
L. tenuis        CTGTGGAGCC AGGTCTAACM ATGTACAAAG AGAAACGGTT GATTAGGCGT TTGATTGAGG AATCTGGGAT TCCCTACACT

                410     420     430     440     450     460     470     480
L. corniculatus  TAYATTTGTT GCAACTCCAT TGCTTCTTGG CCATACCATG ACAATTGCCA CCCATCCAAG GTTCCCCCAC CTGTGGACCA
L. tenuis        TAYATTTGTT GCAACTCCAT TGCTTCTTGG CCATACCATG ACAATTGCCA CCCATCCAAG GTTCCCCCAC CTGTGGACCA

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      490      500      510      520      530      540      550      560
L. corniculatus GTTTCCTTATC TATGGTGATG GCTCTGTCAA AGCATACTTT GTGGATGGCA ATGATATTGG AAAGTTCACA ATGAAAGCCA
L. tenuis      GTTTCCTTATC TATGGTGATG GCTCTGTCAA AGCATACTTT GTGGATGGCA ATGATATTGG AAAGTTCACA ATGAAAGCCA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      570      580      590      600      610      620      630      640
L. corniculatus TTGATGATAT CAGAACAAGG AACAAAAATG TTCATTTTCG ACCCCAAGC AACTGTTACA GCATCAATGA GCTTGCTTCT
L. tenuis      TTGATGATAT CAGAACAAGG AACAAAAATG TTCATTTTCG ACCCCAAGC AACTGTTACA GCMTCAATGA GCTTGCTTCT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      650      660      670      680      690      700
L. corniculatus TTATGGGAAA AGATCATTGG TCGCAAAAT CCCAGAGC-C ACCGTTTCAG CAGAAGATCT TCTTGT
L. tenuis      TTATGGGAAA AGATCATTGG TCGSAAAAT CCCAGAGCAY ACCGTTTCAG CAGAAGAWCT T-----

```

Alineamiento de las secuencias nucleotídicas del gen *FeLAR2* de las muestras de *L. corniculatus* “charlii” y *L. tenuis* “Pampa INTA”. ADNc, secuencia parcial.

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      10      20      30      40      50      60      70      80
L. corniculatus CATGGGCAGG TTTATGGCGG AGGCAAGCCT CGCCGCAGCA CACCCAACCT ATTTGCTCGT CCGCCAACCT CTCATCCCTT
L. tenuis      CATGGGTAGG TTTATGGCGG AGGCAAGCCT CGCCGCAGCA CACCCAACCT ATTTGCTCGT CCGCCAACCT CTCATCCCTT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      90      100     110     120     130     140     150     160
L. corniculatus CCAAGGCCAC CATGTGTTAA ACCTTCCAAG ACAAGGTGC CATAGTCATT CAGGGTGTA TGAATGATA GGAGTTCATG
L. tenuis      CCAAGGCCAC CATGTGTTAA ACCTTCCAAG ACAAGGTGC CATAGTCATT CAGGGTGTA TGAATGATA GGAGTTCATG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      170     180     190     200     210     220     230     240
L. corniculatus CAGAAGATTT TGAAGAGTA CCAATAGAC ATCGTCATTT CTA CTACTGTCGG CGGGGCTCAC GGTTTGCTGG ATCAGCTTAC
L. tenuis      CAGAAGATTT TGAAGAGTA CCAATAGAC ATCGTCATTT CTA CTACTGTCGG CGGGGCTCAC GGTTTGCTGG ATCAGCTTAC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      250     260     270     280     290     300     310     320
L. corniculatus ACTGGTGGAG GCCATGAAAT CTGTCAACAC TATAAAAAGG TTTTTCCTT CAGAATTGG GCACGATGTG GACAGGGCAG
L. tenuis      ACTGGTGGAG GCCATGAAAT CTGTCAACAC TATAAAAAGG TTTTTCCTT CAGAATTGG GCACGATGTG GACAGGGCAG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      330     340     350     360     370     380     390     400
L. corniculatus ATCCTGTGGA GCCAGTCTA GCAATGTACA AAGAGAAACG TTTGGTTAGG CGTGTGATTG AGGAATCTGG AATCCCATAC
L. tenuis      ATCCTGTGGA GCCAGTCTA GCAATGTACA AAGAGAAACG TTTGGTTAGG CGTGTGATTG AGGAATCTGG AATCCCATAC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      410     420     430     440     450     460     470     480
L. corniculatus ACCTACATCT GTTGCAATTC AATTGCTTCT TGGCCCTACT ATAACAATTG TCATCCATCA CAGCTTCTCT CACCCTTGGA
L. tenuis      ACCTACATCT GTTGCAATTC AATTGCTTCT TGGCCCTACT ATAACAATTG TCATCCATCA CAGCTTCTCT CACCCTTGGA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      490
L. corniculatus TCAGATGCAC ATATATGG
L. tenuis      TCAGATGCAC ATATATGG

```