



*Facultad de Ciencias Agrarias
Universidad Nacional del Nordeste*

Trabajo Final de Graduación

Modalidad Tesina

Título:

**ENSAYOS PRELIMINARES DE EVALUACIÓN DE
ADAPTACIÓN DE ESPECIES DEL GÉNERO *LOTUS* EN
CORRIENTES**

ALUMNO: Arce, Alejandro

Asesora: Ing. Agr. (Dra.) Fabiana D. Espasandin

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS:	3
FORMACIÓN ACADÉMICA:	4
RESUMEN:	¡Error! Marcador no definido.
1. INTRODUCCIÓN:	¡Error! Marcador no definido.
ANTECEDENTES:	¡Error! Marcador no definido.
2. OBJETIVOS GENERALES Y PARTICULARES:	¡Error! Marcador no definido.
<i>Objetivo general:</i>	¡Error! Marcador no definido.
<i>Objetivos particulares:</i>	¡Error! Marcador no definido.
3. MATERIALES Y MÉTODOS EMPLEADOS:	¡Error! Marcador no definido.
4. RESULTADOS:	¡Error! Marcador no definido.
5. DISCUSIONES Y CONCLUSIONES:	¡Error! Marcador no definido.
BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA:	¡Error! Marcador no definido.

AGRADECIMIENTOS

A la Ing. (Dra.) Fabiana Daniela Espasandin, que siendo mi directora de tesis, supo brindar tiempo y dedicación para guiarme en la realización del presente trabajo de investigación.

Al Laboratorio de Bioquímica Aplicada y Genómica Funcional de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Nordeste y los profesionales que en él se desempeñan por haber puesto a disposición el apoyo, lugar, tiempo y recursos para poder llevar adelante el presente trabajo.

A la Lic. (Dra.) Galdeano, Ernestina por su contribución al reconocimiento y determinación de agentes patógenos involucrados en las enfermedades presentes en el ensayo propuesto y por proveer de información y material de laboratorio adicional para la realización de los ensayos implicados.

A cada uno de los docentes de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Nordeste, que han sabido transmitir en igual magnitud sus conocimientos, dedicación y profesionalismo a la hora de realizar cualquier tarea que se presente.

A mis tutores y compañeros, quienes incansable e incesantemente brindaron el apoyo necesario.

FORMACIÓN ACADÉMICA EN EL CONTEXTO DE ESTA TESIS

El desarrollo del trabajo de graduación, posibilitó la siguiente producción científica:

Presentaciones a Reuniones:

- XVII Reunión de Comunicaciones Científicas, Técnicas y de Extensión, realizado los días 24 y 25 de noviembre de **2021** en la FCA/UNNE, denominado: **“Evaluación de variables agronómicas y contenido de polifenoles en dos especies del género *Lotus* y su híbrido interespecífico”**. Por: Arce Alejandro, Espasandin Fabiana.

- XVIII Reunión de Comunicaciones Científicas, Técnicas y de Extensión, a realizarse los días 04 y 05 de agosto de **2023** en la FCA/UNNE, denominado: **“Comportamiento de 3 especies del género *Lotus* bajo la influencia de patógenos”**. Por: Arce Alejandro, Ortíz Nicolás, Espasandin Fabiana.

RESÚMEN

Lotus sp. es una especie forrajera y productiva en varias regiones del país y del mundo, careciendo, prácticamente, de datos en nuestra región. Con el objeto de evaluar la calidad, la adaptación y el potencial de producción de biomasa forrajera de 3 especies leguminosas herbáceas del género *Lotus* a las condiciones climáticas y edáficas de Corrientes, se dispone de una población mejorada de *L. tenuis*, además de *L. corniculatus* y, una nueva accesión que se obtuvo mediante la generación de híbridos interespecíficos entre ambas especies denominada *L. híbrido C x T*. La siembra de las especies mencionadas fue realizada en mayo del 2020 en un predio del Campus Cabral de la FCA. Para comparar las especies en términos de adaptación se procedió a la determinación de peso seco, longitud de tallos y tasa de crecimiento del cultivo; en cuanto a la calidad se determinó el contenido de polifenoles. Los cortes se realizaron cada 45 días a partir de diciembre del mismo año. Como resultado, pudimos observar que el patrón de crecimiento es similar en las 3 especies sembradas, observando mayor producción de biomasa en verano. A pesar que el ciclo productivo de estas especies es de primavera a otoño, se observa que *L. corniculatus* presenta diferencias significativas debido a un mayor crecimiento en invierno, determinando que es la especie mejor adaptada a la condiciones expuestas durante la extensión del ensayo. Por otro lado, se observó mayor concentración de polifenoles en el período estival, en las 3 especies. En éste género, las enfermedades son limitantes en la persistencia de las plantas en el campo durante años; fue notable que *L. tenuis* y *L. híbrido* presentaron síntomas de enanismo, similares a los escoba de bruja de alfalfa, ocasionado por fitoplasmas; en cambio *L. corniculatus* solamente presentó signos de ataques fúngicos, ocasionando la muerte de las plantas de ésta especie.

INTRODUCCIÓN

El género *Lotus* es originario de Europa y Asia menor, en la Cuenca Del Mediterráneo, cuenta con alrededor de 200 especies, tanto perennes como anuales. Se estima que sus semillas llegaron a Argentina mezcladas con otras, o en las heces de animales traídos de Europa. Existen antecedentes que en el año 1930 se sembró en Pigué, en 1946 en Brandsen (Rio Salado Chico), y en el año 1950 en Ayacucho, San Miguel del Monte y Pipina. En el año 1960 se comenzó a producir semilla y a cosechar en San Miguel del Monte. En el año 1980 la especie *Lotus tenuis* (Waldst. et Kit. ex Willd) se establece en la Cuenca del Salado en una superficie muy importante. El éxito de su dispersión es su plasticidad fenotípica, su tolerancia a los anegamientos, y la diseminación por parte de los animales (Criado 2014). Varias especies del género *Lotus spp.* son reconocidas en diferentes países por su contribución como forrajeras en pastizales y pasturas (Díaz y col. 2005; Vignolio y col. 2010), además de recuperar la cobertura vegetal en suelos con restricciones edáficas. En nuestro país, especialmente en la zona de la Pampa Deprimida del Salado, *Lotus* ha sido llamado la alfalfa de los pobres porque se adapta a ambientes estresantes (Gebrehiwot y col. 2002; Quinos y col. 1998) y suelos más pobres ya que no posee tantos requerimientos de fósforo como la alfalfa, toleran un amplio rango de pH y no causan timpanismo por su alto contenido de taninos (García-Bonilla y col. 2014).

Por su parte, los taninos condensados hacen la conversión de proteína vegetal en proteína animal más eficiente y por lo tanto, reduce la necesidad de incluir proteínas suplementarias en la dieta. Un nivel moderado de taninos condensados es otro rasgo importante en la calidad del forraje, debido a su contribución a la dieta de los rumiantes, evitando la hinchazón del ganado y reduciendo los parásitos intestinales (McNabb y col. 1996; Min y col. 2003). Sin embargo, las altas concentraciones de taninos se asocian con palatabilidad reducida e ingesta de forraje reducido. Siendo óptimo para el ganado entre un 2 y 4 % de la materia seca (Vignolio y col. 2010). Por lo tanto, obtener leguminosas con cantidades moderadas de taninos es una de las prioridades de los criadores de forraje en todo el mundo. Los taninos solo se acumulan en las capas de semillas de especies forrajeras más utilizadas, como la alfalfa (*Medicago sativa*) y tréboles (*Trifolium spp.*) pero están ausentes en sus hojas (Escaray et al. 2014). En marcado contraste, las especies del género *Lotus* muestran una gran variación en la acumulación de taninos en las hojas. Este género, pertenece a la familia de las leguminosas de persistencia perenne que incluye poblaciones con hábitos de crecimiento con aspectos muy diversos: rastrero, semi-erecto, erecto, sub-arbustivo (Kade y col. 2003); lo cual posibilita distintas formas de utilización en la alimentación del ganado, sea bajo pastoreo directo o mediante la confección de reservas según la estrategia de producción.

Lotus tenuis (Waldst. et Kit. ex Willd) posee una amplia variabilidad genética (Kade y col. 2003), constituyendo su clasificación y conservación *in situ* una reserva de "biodiversidad de genotipos adaptados al estrés" que presenta la ventaja de encontrarse expuesta a un proceso de evolución constante; informándose la existencia de la misma en suelos con rangos amplios de pH, concentraciones elevadas de sales y de sodio intercambiable lo que sugiere la existencia de genotipos tolerantes a las condiciones adversas de los bajos alcalinos en el germoplasma regional de la Pampa Deprimida del Salado. Las variedades de *L. tenuis* son más tolerantes al anegamiento, a las condiciones alcalinas y salinas que cualquier variedad

comercial de *L. corniculatus*. *L. tenuis* se considera una “especie clave” para la nutrición del ganado en áreas como la Pampa Argentina, frecuentemente sujetas a inundaciones. Es una especie perenne de lenta implantación de ciclo primavera-verano-otoño. La calidad del forraje es superior al *L. corniculatus*. Para que se produzca un buen rebrote, luego del pastoreo la altura del remanente debe ser 2,5 cm. Se siembra en otoño, a veces en primavera. Igual que el *L. corniculatus*, no produce empaste. Ideal para campos de cría. Produce forrajes de calidad comparable a la de otras leguminosas forrajeras como *Medicago spp.* y *Trifolium spp.* Sin embargo, contiene un nivel muy bajo de taninos en la parte aérea en comparación con otras especies del género *Lotus* (Escaray y col. 2014).

Lotus corniculatus L. es una especie tetraploide, que persiste en aquellos suelos de baja fertilidad, pobres en P y K, que son marginales para el trébol blanco o la alfalfa (Soto y col. 2005; Grant 2009), suelos con pH 5,5 a 7,5, arenosos o arcillosos y tolera ligera salinidad. Por su origen europeo, esta especie se adapta principalmente a climas templados y fríos, aunque crece también en latitudes tropicales y subtropicales. Tolerancia las heladas y las temperaturas elevadas del verano y puede ser afectada por el sombreado de otras especies especialmente durante el establecimiento o cuando está acompañada por gramíneas muy erectas y de mayor velocidad de crecimiento. A nivel mundial es la principal leguminosa perenne utilizada en los pastizales y además en nuestra región es ampliamente utilizada en Entre Ríos (Miñon y col. 2013). Sin embargo, existe una escasa oferta de materiales genéticos. Se implanta lentamente, de ciclo primavera-verano-otoño, es medianamente productiva y debido a la presencia de taninos condensados no produce empaste en el ganado. El forraje tiene alto contenido de proteínas y es aceptado por el ganado aun cuando la planta está florecida. Las variedades más erectas se adaptan al corte para henificar el forraje, produce un forraje de calidad aceptable sea para henificar o ensilar (Frame 1998). La evidencia bioquímica y genética indica que esta especie probablemente surgió como un híbrido entre *L. uliginosus* y *L. tenuis* (Escaray y col. 2014).

Lotus corniculatus x *Lotus tenuis* (híbrido CxT): Dentro del género *Lotus*, una especie que acumula taninos a nivel foliar es *L. corniculatus*, filogenéticamente cercano a *L. tenuis*. Sin embargo, los intentos de implantar cultivares comerciales de *L. corniculatus* (todas las poblaciones tetraploides) en algunas superficies han fracasado debido a sus requisitos edáficos más exigentes con respecto a *L. tenuis* (Antonelli y col. 2019). Recientemente, el IBB-INTECH (Chascomús) cruzó una accesión diploide silvestre de *L. corniculatus* (2n) con *L. tenuis*, produciendo híbridos interespecíficos altamente fértiles con niveles adecuados de taninos a nivel foliar heredados de la primera accesión (Escaray y col. 2014). Dado a que la hibridación interespecífica puede conducir a la generación de nuevos fenotipos moleculares y morfológicos que no puede ser producido por cruzamientos intraespecíficos (Arnold 1992; Cheng y col. 2011) se explorará éste híbrido interespecífico como medio para crear nuevas variedades dentro del género *Lotus* y así poder producir genotipos con niveles adecuados de taninos en tejidos comestibles sin afectar los rasgos parentales positivos, como el rendimiento del forraje y la tolerancia a estreses ambientales. Hasta ahora, la producción de híbridos de *L. tenuis* x *L. corniculatus* se ha visto obstaculizado por la diferencia en la ploidía entre estas especies (Grant 1999). Para superar este obstáculo, se cruzaron plantas de *L. tenuis* de una población seleccionada para crecer en áreas marginales de la Pampa Deprimida del Salado, con una población silvestre diploide de *L. corniculatus* que acumula taninos en las hojas y que

crece en una zona alcalino-salada de España. Dicho cruzamiento ha permitido producir híbridos de *Lotus* con adecuados niveles de taninos en las hojas (Escaray y col. 2014).

ANTECEDENTES

Se observó que *Lotus spp.* es una especie productiva en varias regiones del país y del mundo (Díaz y col. 2005; Vignolio y col. 2010), encontrándose pocos datos de los mismos en nuestra región, por lo cual se prevén ensayos preliminares de implantación en suelos de la zona de distintas especies del género *Lotus*. Está comprobado que una misma variedad de forraje sembrada en dos lugares diferentes, en el mismo estado de desarrollo, suelen tener valores nutritivos distintos. Al respecto y con fines experimentales, actualmente se dispone de una población mejorada por selección recurrente de *L. tenuis* (Ing. Agr. Manual González García, Unidad Integrada UNMDP-EEA-INTA Balcarce) registrada con la denominación “INTA-PAMPA” (Instituto Nacional de Semillas, Resol. Nº: 288/98), además contamos con semillas de *L. corniculatus* y una nueva accesión que alberga rasgos agronómicos mejorados, que se obtuvo mediante la generación de híbridos interespecíficos entre ambas especies denominada *híbrido CxT*.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la adaptación y el potencial de producción de biomasa forrajera de 3 leguminosas herbáceas del género *Lotus* sometidas a las condiciones climáticas y edáficas de Corrientes.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar la adaptación y sobrevivencia de *Lotus tenuis*, *L. corniculatus* y un híbrido interespecífico (C x T) en nuestra zona.
- Efectuar un análisis de crecimiento de las 3 especies de *Lotus* mencionadas y compararlas.
- Efectuar determinaciones bioquímicas de compuestos fenólicos.
- Adquirir habilidades y conocimientos en la evaluación del rendimiento forrajero de una pastura y su calidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se llevó a cabo en la localidad de Corrientes en la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNNE, Campus Sargento Cabral, desde mayo del 2020 a diciembre del 2021. El clima de la región está caracterizado como subtropical o templado cálido, correspondiente a los “bosques siempreverdes” de tipo mediterráneo (Bruniard 2000). Por sus características, según Köppen corresponde a Climas Templados Húmedos (De Fina y Ravelo, 1985). Los registros de precipitaciones y las condiciones de temperatura del aire serán tomados de los registros de la estación meteorológica de CE.TE.PRO. del Ministerio de Producción de Corrientes (Gráfico Nº1)

I. Siembra y diseño del ensayo

La siembra se realizó con las semillas de *Lotus tenuis*, *L. corniculatus* y de un híbrido interespecífico entre *L. corniculatus* x *L. tenuis*, denominado “*Lotus CxT*” provenientes del INTECh (detallados en antecedentes), laboratorio en el cual mi directora se encuentra en contacto desde hace varios años y con quienes trabaja conjuntamente. Previo a la siembra, las semillas fueron escarificadas con NaOH 5% durante 15 minutos. Se tuvo especial cuidado los primeros meses de implantación ya que los tres primeros meses pos-siembra son críticos para el establecimiento de *Lotus* por poseer lenta implantación.

El diseño utilizado para la siembra fue completamente aleatorizado con 3 repeticiones de 3 plantas cada repetición, surcos distanciados a 0,50 m. La siembra se realizó en forma manual con un distanciamiento de 0,50 m entre planta, en otoño del 2020. Antes de la siembra se realizó remoción del suelo de forma manual con palas. No se realizaron aplicaciones de productos químicos para malezas, ni fertilizantes. El desmalezado fue realizado con carpidas manuales en entre líneas.



Fig. 1: Foto del ensayo tomada en abril del 2021

II. Determinación de caracteres morfológicos

Se realizó un conteo de las plantas que sobrevivieron durante el ensayo. Luego, se realizó un análisis de crecimiento y se determinaron y evaluaron parámetros morfológicos de las plantas.

— Entre las variables evaluadas se tomó la altura de la planta desde la base hasta su parte más alta antes de cada corte. Para estimar la producción de forraje y sobrevivencia se cortó la biomasa aérea de las plantas a una altura de 2,5 a 5 cm del suelo y se determinó rebrote cada 45 días aproximadamente (el 1° corte se realizó a los 120 días del inicio del ensayo, debido a la lenta implantación de *Lotus*). Esta altura de corte obedece a que es una

especie que tiene una corona pegada al suelo y se conserva suficiente área foliar para el rebrote (Formoso 1993; Barbazán et al. 2008).



– Se determinó la longitud de tallos, producción de materia seca secando el material en estufa a 70°C hasta peso constante, la cantidad de hoja y tallo, pesando por separado cada fracción y su relación. Se evaluaron otros parámetros como Tasa de Crecimiento del Cultivo (TCC) y la Tasa de Crecimiento Absoluta (TCA) (Antonelli et al. 2019).

$$\text{TCC en g. m}^{-2} \cdot \text{día}^{-1} = P_2 - P_1 / A (t_2 - t_1)$$

$$\text{TCA en g. día}^{-1} = P_2 - P_1 / (t_2 - t_1)$$

Donde:

A = Área donde el peso seco fue registrado

P₁ = Peso seco de la muestra en el tiempo 1

P₂ = Peso seco de la muestra en el tiempo 2

t₁ = Fecha de Muestreo 1 expresado en dds

t₂ = Fecha de Muestreo 2 expresado en dds

III. Determinación bioquímica de compuestos fenólicos

Obtención de Extractos: Se pesaron 0,5 g de hojas secas, se mezclaron con 20mL de una solución al 50% metanol-agua y se dejó en agitación constante por 1h a 50°C, se filtró y almacenó a temperatura de refrigeración para su uso posterior.

Se determinó el contenido de polifenoles con el **Método de Folin-Ciocalteu** detallado a continuación: Inicialmente se realizó una curva patrón de ácido tánico, para ello se midieron 125 µL de la solución patrón de ácido tánico, se adicionaron 0,5 mL de H₂O destilada y 125 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu; se deja reaccionar por 6 min y se agregaron 1,25 mL de una solución de Na₂CO₃ al 7 %, por último se agrega 1mL de H₂O destilada y se deja reposar por 90 min en condiciones de laboratorio, las lecturas se realizaron a una longitud de onda (λ) de 760 nm en el espectrofotómetro UV- visible.

Luego, cada extracto fue diluido 1:5 con solución metanólica al 50 %, y se determinó el contenido de polifenoles totales de la misma forma como se hizo con los patrones de ácido tánico (Nossa González y col. 2016).

El método de Folin-Ciocalteu se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno y

molibdeno, siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula (Gutiérrez Avella et al. 2008).

IV. Determinación de agentes causales de enfermedades y plagas

Durante el cultivo, a través de visitas semanales, se identificaron insectos como araña roja principalmente y, aparición de síntomas ocasionados por hongos o bacterias.

En cuanto al control de plagas y enfermedades, se procedió a aplicar imidacloprid (1L/ha) y abamectina (0,5L/ha) para controlar trips y araña roja respectivamente, las cuales crecieron debido a una sequía pronunciada y elevadas temperaturas en la época estival. Además, debido a la aparición de síntomas ocasionados por hongos se aplicó carbendazim (0,5L/ha).

Para la determinación de los microorganismos, se procedió a aislar a los hongos, de las plantas con síntomas, en cajas de Petri conteniendo medio de cultivo agar papa glucosado (APG) y luego se los observó en microscopio. En el caso de bacterias, se observó el síntoma en las plantas inicialmente y luego para determinar la presencia/ausencia de las mismas, se realizaron amplificaciones (PCR) con primers específicos para fitoplasmas.

V. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA), en caso de encontrar diferencias entre las medias, su significancia se analizó por el Test de Tukey ($p \leq 0,05\%$) con el programa InfoStat (Di Rienzo y col. 2011) y Graph Pad (GraphPad Software, San Diego, CA). Los datos fueron expresados como medias y desviaciones estándar.

RESULTADOS

En el momento de implantación, observamos que la sobrevivencia de las plantas fue del 100% en *Lotus corniculatus* y alrededor de 50% para *Lotus híbrido* y para *Lotus tenuis*. Fue un año atípico, en el cual la sequía fue muy pronunciada y con temperaturas muy elevadas. En el gráfico n°1 se pueden comparar las temperaturas y precipitaciones promedio del año 2021 con las temperaturas y precipitaciones promedios históricas.

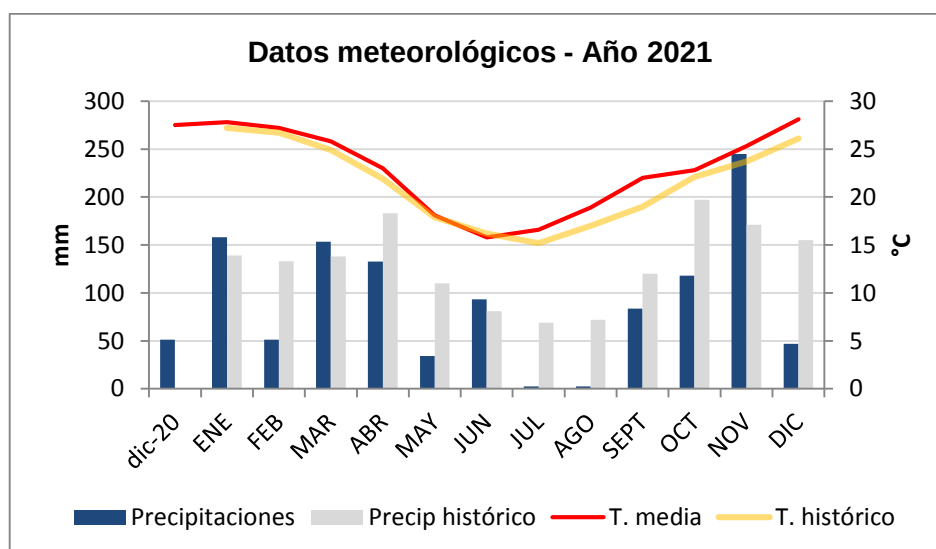


Gráfico N°1: Registro de precipitaciones y temperaturas

El ciclo productivo de estas 3 especies es de primavera a otoño, observándose éste patrón de crecimiento en *L. tenuis* y *L. híbrido*, a pesar de ello la mayor producción de biomasa de *L. corniculatus* es atribuida a un mayor crecimiento tanto estival como invernal, mostrando diferencias significativas con *L. tenuis* y *L. híbrido* en los meses de julio, octubre y diciembre (Gráfico N°2).

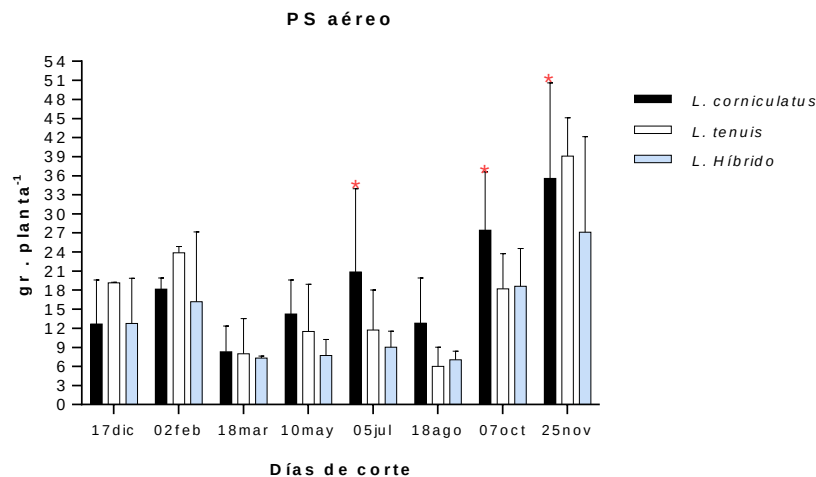


Gráfico N°2: Peso seco aéreo en gramos de los 3 genotipos por corte realizado.

En cuanto al comportamiento de altura de las plantas por corte (Gráfico N°3), no existió diferencia de alturas entre cortes ($P < 0.05$). Las mayores alturas de planta se registraron con temperaturas medias mayores de 20 °C, como ser verano y primavera 2021. Estos resultados muestran que el crecimiento de la planta disminuyó con el descenso de la temperatura aunado a la poca precipitación.

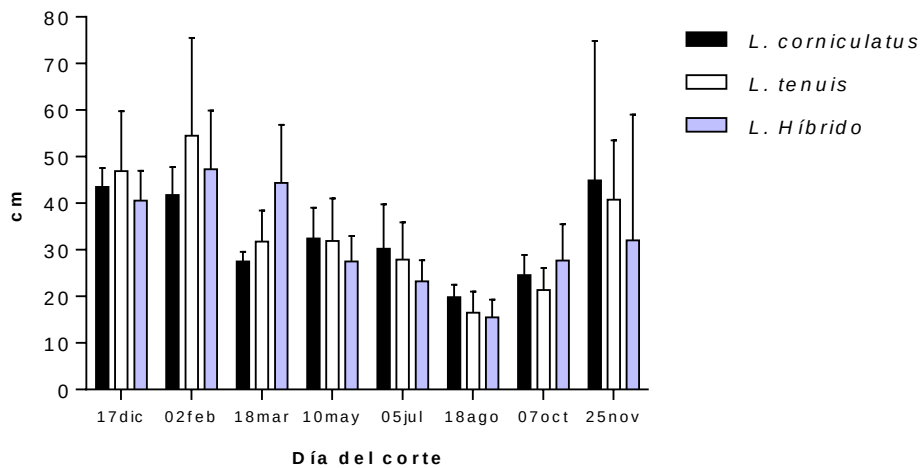


Gráfico N°3: Altura de planta en centímetros, de los 3 genotipos por corte realizado.

Relación Hoja/Tallo y tasas de crecimiento por corte:

Existieron diferencias significativas ($P < 0.05$) en la relación Hoja/Tallo entre los cortes de febrero, marzo y agosto (Gráfico N°4a). Los valores menores se observaron en los cortes *L. tenuis* y *L. híbrido*. De igual manera que el peso seco aéreo (Gráfico N°2), la TCA tuvo similar resultado, observándose mayor tasa de crecimiento en *L. corniculatus* durante el invierno, respecto de los otros 2 genotipos (Gráfico N°4 c). Sin embargo, la TCC fue superior en *L. tenuis* en la época invernal (Gráfico N°4 b).

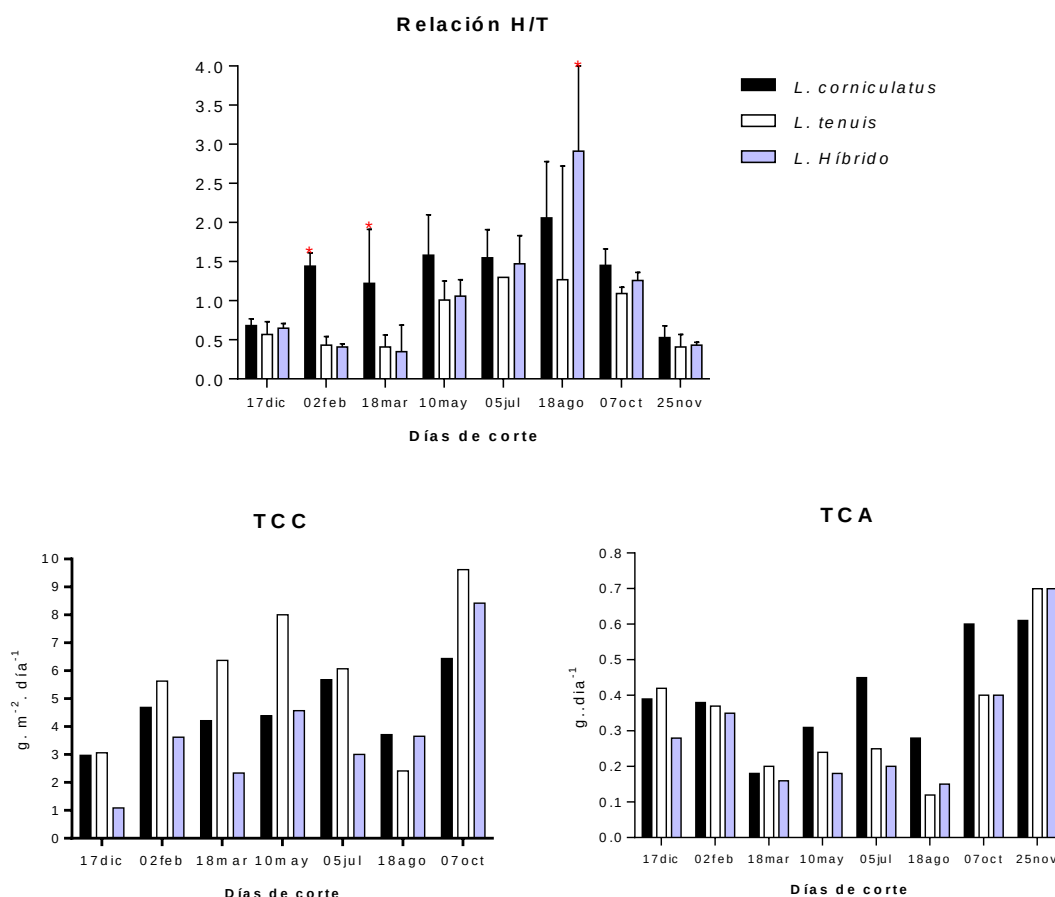


Gráfico 4: a) Relación Hoja/Tallo, b) Tasa de Crecimiento del Cultivo (TCC) y c) Tasa de Crecimiento Absoluto (TCA) de los 3 genotipos por corte realizado.

En cuanto al contenido de polifenoles totales de las especies oscila entre 80 y 220 mg de ac. tánico/g de materia seca, mostrado el mismo patrón durante las estaciones en los 3 genotipos estudiados. Siendo mayor la acumulación en los meses más cálidos (oct – nov.).

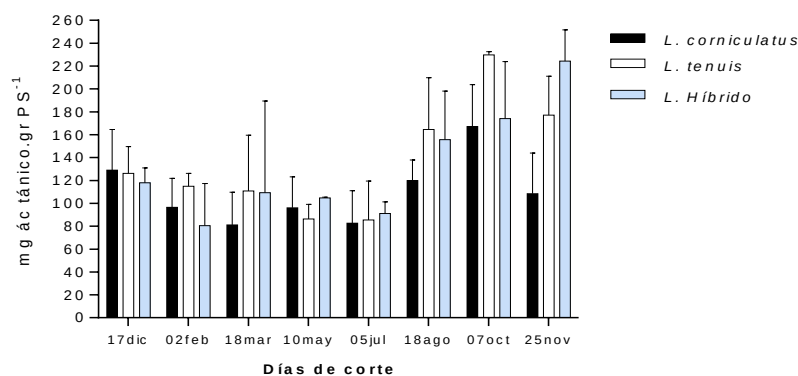


Fig. 5: Contenido de polifenoles de los 3 genotipos, por corte realizado.

Impacto de las enfermedades y plagas:

Podemos destacar el hecho de que las plantas de *Lotus tenuis* y plantas del híbrido interespecífico presentaron síntomas de enanismo similares a aquellos considerados como “escoba de bruja” observada en alfalfa. Enfermedad que se caracteriza por excesiva cantidad de rebrotes en la corona y tallos finos y cortos (Fig. 2a, b). Se tomaron muestras de las plantas con los síntomas y se realizó PCR con los primers R16F2/R16R2 y P1/P7 (Suaste Dzul y col. 2012) para confirmar la presencia de fitoplasmas en esas plantas (Fig. 2c, d), observándose resultados positivos para ambos primers utilizados, indicando la presencia de los mismos.



Fig. 2 a, b: Plantas de L. Híbrido CxT (barra= 20 cm)
Izq.: Condiciones normales. Derecha: Con síntomas de enanismo.

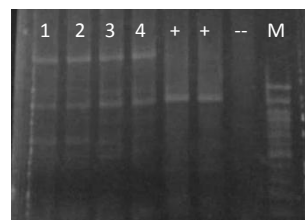


Fig. 2 c: Primers R16F2/R16R2



Fig. 2 d: Primers P1/P7.
Calles 1-4: plantas con síntomas por duplicado. +/- : control positivo/negativo.
M: Marcador de PM.

Sin embargo, *L. corniculatus* presentó signos de ataques fúngicos en tallos y hojas (Fig. 3) que iniciaron en otoño, finalmente en primavera - verano la enfermedad causó la muerte de la planta desde la corona. También se tomaron muestras de esas plantas, se sembraron porciones de hojas con síntomas en cajas de Petri con APG y se logró aislar el patógeno (Fig. 4).



Fig. 3: Izq.: Plantas de *L. corniculatus* con crecimiento normal. Centro: Hojas y corona con signos de la enfermedad. Derecha: Síntoma de marchitamiento avanzado de la planta desde la corona (barra= 20 cm).

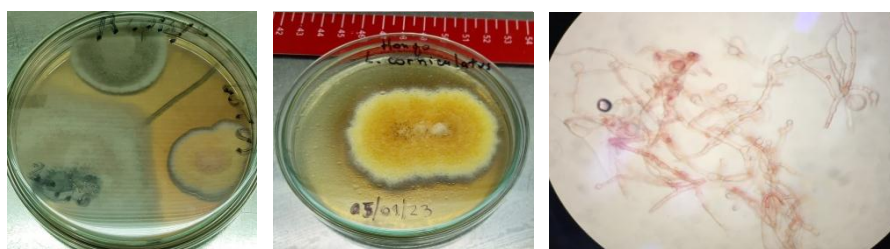


Fig. 4: Hongo patógeno aislado de plantas de *L. corniculatus* con signos y síntomas. En la imagen de la derecha se observa el micelio en el microscopio.

Finalmente, en cuanto a las plagas, observamos ataques de ácaros en los 3 genotipos en los períodos más secos y cálidos y de trips en *L. corniculatus* especialmente (Fig. 5).



Fig. 5: Ácaros y trips sobre las hojas

DISCUSIÓN

En el momento de implantación la variedad que obtuvo el mayor porcentaje de supervivencia es *L. corniculatus*, la cual fue del 100%, seguida de las otras dos especies las cuales obtuvieron porcentajes de supervivencia mucho menores (alrededor del 50%). Luego, debido al ataque de patógenos, estos porcentajes fueron variando en el transcurso del ensayo.

El porcentaje de supervivencia se asemeja al obtenido por Fernández y col. (1990) quienes evaluaron la dinámica poblacional y el porcentaje de supervivencia de *L. tenuis* en zonas de la pampa deprimida, asociando la mortandad de las mismas a factores medioambientales, pastoreos excesivos, cortes durante el periodo de floración y sobre todo a los cortes en periodos estivales donde la competencia con otras pasturas era máxima. Por otra parte el resultado de supervivencia obtenido para *L. corniculatus* es mucho mayor al establecido por Altier y Rebuffo (1995) quienes estimaron que dicho porcentaje es cercano al 10 % para el primer ciclo de producción y 40% para el segundo, distinguiendo como principal causa de muertes de plantas a la podredumbre de corona y raíz.

El análisis obtenido implica que la elección de la variedad, dentro de las expuestas en el ensayo, determinará cuestiones esenciales en cuanto al establecimiento del cultivo a campo y su supervivencia, como por ejemplo la cantidad de semillas a utilizar o el análisis detallado de las condiciones climáticas a las que se van a someter las distintas variedades al momento de la siembra e implantación.

Si se consideran los máximos rendimientos se puede destacar que *L. corniculatus* fue la especie que tuvo la mejor performance durante la mayor parte del ciclo productivo. La generación de biomasa vegetativa por planta promedio para el total del ciclo productivo fue de 152,96 g/planta (6 Ton/ha) para *L. corniculatus*, 102,07 g/planta (4 Ton/ha) para el híbrido interespecífico y 122,63 g/planta (4,8 Ton/ha) para *L. tenuis* (tomando en consideración la densidad expresada en materiales y métodos).

Se observó que los 3 cultivares utilizados obtuvieron mayores rendimientos en los meses de Octubre y Noviembre, además se puede distinguir un segundo pico de producción en el periodo correspondiente al mes de Febrero. Durante el mes de agosto se pudo observar una disminución de la producción lo que se atribuye a las bajas temperaturas y escasas precipitaciones registradas en los meses de julio y agosto, a pesar de ello, *L. corniculatus* fue significativamente superior. En promedio se puede observar que en las diferentes estaciones del año se distinguieron distintas variedades, durante los periodos estivales y primavera tardía la especie que generó mayor cantidad de biomasa fue *L. tenuis*. En los periodos otoñales, invernales y primavera temprana la especie que generó más biomasa fue *L. corniculatus*. El híbrido interespecífico no pudo destacarse en promedio, solo superando a *L. tenuis* en el periodo de invierno tardío-primavera temprana.

Vignolio y Cambareri (2008) destacan la variación en la producción de biomasa en *L. tenuis* que se obtiene al realizar distintos planteos con variación en sus densidades, en este caso se puede ver como la biomasa vegetativa generada pasa de 65 a 25g/planta para un ciclo

de producción, cuando la densidad aumenta de 4 a 16 plantas/m². Vignolio, Cambareri y Maceira (2010) ensayaron producciones de *L. tenuis* puro en pastizales de Balcarce, hallando una variación estacional de la productividad que se asemeja a la obtenida en el presente trabajo, de la investigación surge que fue del 3% en invierno, 19% en otoño y 78% en primavera-verano. También es coincidente la conclusión de que en algunos ensayos, la productividad de *L. tenuis* ha sido superior a la de *L. corniculatus*, aunque generalmente se registra la situación inversa como es el caso de este ensayo; sin embargo, cabe aclarar que ambas especies se utilizan en suelos diferentes. Ellos destacan que para nuestro país la producción de forraje de *L. tenuis* llegó a tomar la dimensión de 8.492 kg MS/ha/año, y que al asumir una densidad optima de 8 plantas/m² designada anteriormente por los mismos autores, se puede concluir una generación de biomasa de 106,1 g / planta / año; en Italia y Chile se obtuvieron valores próximos a 10.000 kg MS/ha/año (Vignolio y col. 2010).

La TCC que mide el incremento de biomasa por unidad de tiempo, presentó variaciones a lo largo del año para las tres especies bajo estudio, *L. tenuis* ha sido la variedad cuya tasa de crecimiento se destacó en la mayor parte del año mostrando los mayores valores en el corte correspondiente al mes de octubre, los que a su vez fueron los más altos en todo el ensayo (95 kg/ha/día), y su menor valor en el mes de agosto. La TCC de *L. corniculatus* también ha tenido su pico en el corte del mes de octubre sin embargo, a diferencia de *L. tenuis*, su mínimo se dio durante el corte que corresponde a enero. El híbrido interespecífico mantuvo una tasa de crecimiento inferior a las de sus parentales, y su distribución a lo largo del ciclo fue similar a la de *L. corniculatus*, obteniendo máximos en octubre y mínimo en diciembre, lo que también representa el menor valor obtenido en el ensayo (10 kg/ha/día). Tanto *L. corniculatus* como el híbrido interespecífico superaron a *L. tenuis* en el corte correspondiente a agosto. En cuanto a la relación H/T se observó que *L. corniculatus* presentó una mejor relación en la mayor parte del año, lo cual indicaría su mayor calidad forrajera con respecto a las otras variedades. Antonelli y col. (2019) han comparado dicho parámetro bajo diferentes condiciones habiendo hallado que *L. corniculatus* mantenía la mayor relación hoja/tallo tanto en los ejemplares utilizados como testigos como en los que se encontraban sometidos a estrés abiótico.

Formoso (1993) ha llegado a realizar distinciones similares a las obtenidas en el presente trabajo en cuanto a tasa de crecimiento y su variación en el ciclo productivo, alegando que en primavera puede tomar valores de 74,4 kg de MS/ha/día y en invierno dicha tasa puede llegar a tomar valores de 1,2 kg de MS/ha/día no obstante en su trabajo se destacan las fluctuaciones tanto a nivel del ciclo como a lo largo de la vida útil de la pastura, resalta que su especie bajo estudio, *L. corniculatus* va disminuyendo su tasa de crecimiento a lo largo de los distintos años de cosecha y a su vez destaca que la diferencia entre la tasa de crecimiento otoño-invernal y la primavera-estival se acentúa con el tiempo, es decir que la tasa de crecimiento de primavera-verano decae mucho menos que la tasa de otoño-invierno, lo que distorsiona la oferta forrajera a través de los años de vida útil de la pastura.

Se ha determinado el contenido de fenoles totales en las 3 especies usadas como forraje. El método de referencia utilizado (Folin Cicolteau) con este propósito es bien sustentado tanto en la teoría como en la práctica y es ampliamente reportado en la literatura científica que trata sobre la medición de esta magnitud bioquímica (Gutiérrez Avella y col. 2008).

En cuanto al contenido de polifenoles, se observó que los 3 genotipos mantuvieron el mismo patrón de concentración durante el año, a pesar que se pretendía inferirlo como cuantificación de taninos, pudimos observar presencia de otro tipo de polifenoles en las especies, ya que *L. tenuis* y el *Lotus* híbrido se caracterizan por no presentar taninos condensados en las hojas (Escaray y col. 2014) y nuestros resultados no estarían mostrando esos valores, probablemente presentando otro tipo de polifenoles. Las plantas contienen una mezcla compleja de polifenoles y la distribución de éstos en las plantas es muy amplia y, se han encontrado en más del 60% de las especies vegetales donde se ha investigado su presencia.

Las isoflavonas se presentan casi exclusivamente en leguminosas (Quiñones y col. 2012). Además, aunque con frecuencia se piense que los polifenoles son pigmentos exclusivos de flores y frutos, también pueden encontrarse en todo el vegetal, incluidas la raíz, el tallo o las hojas (Quiñones y col. 2012).

Los fenoles desempeñan importantes funciones fisiológicas en los vegetales, en general y se oxidan con mucha facilidad actuando como antioxidantes ya que atrapan o inhiben la producción de radicales libres (Gordo M 2017). Además, los fenoles se acumulan, mayoritariamente, en las capas más superficiales de los vegetales y captan hasta el 90% de las radiaciones UV, impidiendo los efectos nocivos de estas radiaciones en los tejidos internos de la planta. También establecen relaciones químicas de las plantas con su entorno, como ser las relaciones entre plantas, con insectos, vertebrados y microorganismos. A nivel de microorganismos, las plantas se defienden del ataque de patógenos sintetizando, mayoritariamente polifenoles, que son tóxicos para los microorganismos y su presencia previene las infecciones (Vázquez Flores y col. 2013). Además, numerosos factores medioambientales como la luz, el grado de madurez u otros pueden afectar al contenido total. El clima (exposición al sol, precipitaciones, etc.) o factores agronómicos juegan un papel fundamental. La exposición a la luz es, en particular, uno de los principales condicionantes para determinar el contenido de la mayoría de los polifenoles (Quiñones y col. 2012).

En concordancia con la bibliografía podemos inferir que nuestras 3 especies en estudio, presentaron contenidos mayores de polifenoles en épocas de mayor temperatura y cuando presentaron mayor ataque de patógenos. Las distintas variedades bajo estudio se encontraron sujetas a diferentes adversidades bióticas.

En cuanto a las afecciones por enfermedades las especies de *L. tenuis* e híbrido padecieron ataques de fitoplasmas (patógenos pertenecientes a la clase *Mollicutes*), lo que provocó el achaparramiento de las plantas. Dichos síntomas se manifestaron en dos individuos, uno de cada ejemplar por lo que la incidencia de la enfermedad se la puede asumir como 14,28%, y su severidad fue del 100% ya que afectó a la totalidad de cada una de las plantas infectadas, no obstante no logró provocar su muerte en el ciclo de producción bajo estudio. Por otro lado las plantas de *Lotus corniculatus* experimentaron ataques fúngicos que se localizaron en la corona y estructuras inmediatas (base de los tallos y las hojas anexas), caracterizadas por eflorescencias blanquecinas en la cara adaxial de las hojas y en los tallos, y también por la necrosis de los tejidos involucrados. Tras la extracción de muestras, aislamiento del patógeno y su crecimiento en medio de cultivo APG en un ambiente con temperatura y humedad controladas, mediante la identificación morfológica inferimos que podría pertenecer a la clase de los *Oomycetes*. Causando la muerte de la totalidad de las plantas. La incidencia de enfermedades reduce el periodo de persistencia de las plantas en cultivo.

En cuanto a la infección por fitoplasmas, Altier (1997) destaca la ausencia de flores en las plantas enfermas y que las mismas morían prematuramente. También distingue el aumento de la incidencia de la enfermedad a lo largo de la vida útil de la pastura, resultando ésta la causa del 15% de los decesos. Klostermeyer y Menzies (1.951) describieron síntomas similares en *Lotus*, y se los atribuyeron a organismos procariotas unicelulares que carecen de pared celular verdadera, de la clase *Mollicutes*. Alba, Suaste y Dzul (2012) encontraron síntomas similares a los manifestados en plantas de *Opuntia ficus-indica* y comprobaron la presencia de fitoplasmas tras la utilización de los mismos primers (R16F2/R16R2 y P1/P7) que hemos utilizado en este trabajo.

CONCLUSIONES

- La especie mejor adaptada a las condiciones expuestas durante la extensión temporal del ensayo y, dadas las condiciones ambientales descritas ha sido *L. corniculatus*.
- *L. corniculatus* es la especie de mayor productividad durante la mayor parte del año. Tiene rendimientos de materia seca de forraje en promedio hasta 6000 kg/ha.
- El contenido de polifenoles mostró alteraciones a lo largo del año siendo su máxima producción en los meses cálidos (octubre y noviembre).
- *L. corniculatus* experimentó enfermedades fúngicas. *L. tenuis* y *L. híbrido* manifestaron ataques de fitoplasmas.

PERSPECTIVAS FUTURAS

- Se realizarán nuevos ensayos similares y, además ensayos con diferentes densidades de siembra, con el fin de recolectar datos mas certeros. Debido a la aparición de enfermedades no se pudo continuar el ensayo en el tiempo previsto.
- Son necesarios mayores estudios relacionados con las etiologías de las enfermedades observadas, por lo cual se realizará extracción de ADN de hongos y plantas infectadas con fitoplasmas para una posterior secuenciación e identificación más específica de los patógenos. Por otro lado, se harán pruebas de patogenicidad mediante los postulados de Koch.
- Se realizará un análisis más detallado de cuales son los polifenoles presentes en las plantas.

BIBLIOGRAFÍA

- Akashi, R., Uchiyama, T., Sakamoto, A., Kawamura, O. & Hoffmann, F. (1998). *Journal of Plant Physiology*, 152 (1): 84-91.
- Altier N. (1997). Enfermedades de lotus en Uruguay. Serie técnica Nº 93. Unidad de difusión e información tecnológica del INIA.
- Altier, N. & Rebuffo, M. (1995). Mejoramiento genético de *Lotus corniculatus*. INIA Series Actividades de Difusión.
- Antonelli, C., Calzadilla, P., Vilas, J., Campestre, M., Escaray, F. & Ruiz, O. (2019). Physiological and anatomical traits associated with tolerance to long term partial submergence stress in the *Lotus* genus: responses of forage species, a model and an interspecific hybrid. *J of Agronomy and Crop Science* 205(1): 65-76.
- Arnold, M.L. (1992). Natural Hybridization as an Evolutionary Process. *Annu Rev Ecol Syst* 23(1): 237–261.
- Barbazán, M., Ferrando, M. & Zamalvide, J. (2008). *Informaciones Agronómicas* 39: 6-13.
- Bruniard, E.D. (2000). El Clima y el paisaje. Claves del clima para la caracterización de los complejos naturales. Facultad de Humanidades. UNNE.
- Cheng D., Kirk H., Mulder, P. & Vrieling, K. (2011) Pyrrolizidine alkaloid variation in shoots and roots of segregating hybrids between *Jacobaea vulgaris* and *Jacobaea aquatica*. *New Phytol* 192(4):1010–1023.
- Criado, Carlos Alberto (2014). LOTUS “PAMPA” INTA Una herramienta de trabajo para los suelos bajos-inundables. Publicación Técnica. EEA-INTA Cuenca del Salado.
- De Fina, A.L. & Ravelo, A.C. (1985). Climatología y Fenología Agrícolas. 4º Ed. EUDEBA. Buenos Aires, Argentina. 354 pp
- Díaz P., Borsani O. & Monza J. (2005). In: Márquez A.J. (eds) *Lotus japonicus Handbook*. Springer, Dordrecht.
- Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M. & Robledo, W. (2011). InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Escaray, F., Passeri, V., Babuin, F., Marco, F., Carrasco, P., Carrasco, P., Damiani, F., Pieckenstain, F., Francesco, P. & Ruiz, O. (2014). *Lotus tenuis* x *L. corniculatus* interspecific hybridization as a means to breed bloat-safe pastures and gain insight into the genetic control of proanthocyanidin biosynthesis in legumes, *BMC Plant Biol.* 14(1): 14–40.
- Fernández, O., Miñón, D., Montes, L. & Sevilla, G. (1990). *Lotus tenuis*: Leguminosa forrajera para la Pampa Deprimida. *Boletín técnico*, 98.
- Formoso, F. (1993). *Lotus corniculatus* I. Performance forrajera y características agronómicas asociadas. Serie Técnica no. 37. INIA. Uruguay. 20 p.

- Frame, J. (1998). *Lotus corniculatus*. FAO.
<http://www.fao.org/AG/aGp/agpc/doc/DATA/pf00344.HTM>.
- García Bonilla, D., Guerrero Rodríguez, J., García de los Santos, G. & Lagunes Rivera, S. (2014). *Revista Electrónica Nova Scientia* Nº 13 Vol. 7 (1), 170-189.
- Gebrehiwot, L. Beuselinck, P. & Roberts, C. (2002). *Agronomie Journal* 94(5): 1059-1065.
- Grant, W.F. (1999). Interspecific hybridization and amphidiploidy of *Lotus* as related to phylogeny and evolution. In In Trefoil: *The Science and Technology of Lotus*. Edited by Beuselinck PR. Madison, Wisconsin: CSSA Special Publication Number 28: 43–60.
- Grant, W. 2009. *Lotus corniculatus*. Scitopics.
http://www.scitopics.com/Lotus_corniculatus.html.
- Gordo, M. (2018). Los compuestos fenólicos, un acercamiento a su biosíntesis, síntesis y actividad biológica. *Revista de investigación agraria y ambiental*, 9(1), 81-104.
- Gutiérrez Avella, D., Ortiz García, C. & Mendoza Cisneros, A. (22 al 24 de Octubre de 2008). *Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal*. Simposio de Metrología. Santiago de Querétaro, México.
- Kade, M., Pagani, E., & Mendoza, R. (2003). A morphological study of populations of *Lotus glaber* Mill.(Fabaceae). *Agronomie*, 23(3), 203-207.
- Klostermeyer, E. C. & Menzies, J. D. (1951). Insect transmission of alfalfa witch's broom virus to other legumes. *Phytopathology*, 41, 456-458.
- McNabb, W., Waghorn, G., Peters, J., & Barry, T. (1996). The effect of condensed tannins in *Lotus pedunculatus* on the solubilization and degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (EC 4.1. 1.39; Rubisco) protein in the rumen and the sites of Rubisco digestion. *British Journal of Nutrition*, 76(4), 535–549.
- Min, B., Barry, T., Attwood, G., & McNabb, W. (2003). The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 106(1–4), 3–19.
- Miñón D, Gallego J, Barbarossa RA (2013). INFORMACIÓN TÉCNICA N°33. AÑO 7 N°15. ISSN 1666-6054.
- Nossa G., Talero P. & Rozo N. Determinación del contenido de polifenoles y actividad antioxidante de los extractos polares de comfrey (*Symphytum officinale* L). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2016; 21(2): 125-132.
- Quinos P. M; Insausti P; Soriano A. (1998). *Oecologia* 114:427-431.
- Quinos, P., Insausti, P. & Soriano, A. (1998). Facilitative effect of *Lotus tenuis* on *Paspalum dilatatum* in a lowland grassland of Argentina. *Oecologia* 114, 427–431.
- Quiñones, M., Miguel, M. y Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr. Hosp.* 27:76-89.
- Soto O., Jhan B., Velasco, R. & Arredondo S. (2005). Especies leguminosas forrajeras para corte en suelos arcillosos de mal drenaje. *Agricultura Técnica* 65(2): 157-164.

- Suaste Dzul, A., Rojas Martínez, R., Zavaleta Mejía, E. & Pérez Brito, D. (2012). Detección molecular de fitoplasmas en nopal tunero (*Opuntia ficus-indica*) con síntomas de engrosamiento del cladodio. *Revista mexicana de fitopatología* 30(1): 81-85.
- Vázquez Flores, Alma A; Alvarez Parrilla, Emilio; López Díaz, José Alberto; Wall Medrano, Abraham y De la rosa, Laura A. (2013). Taninos hidrolizables y condensados: Naturaleza química, ventajas y desventajas de su consumo. *Revista de ciencia y tecnología Tecnociencia Chihuahua* 6(2): 83-94.
- Vignolio O., Cambareri G. & Maceira N. (2010). *Lotus tenuis*. Productividad y manejo agronómico. *Revista Argentina de Producción Animal*, 30(1): 97-116.