

CARACTERIZACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA A NIVEL  
MORFO-FISIOLÓGICO Y MOLECULAR DE FAMILIAS DE MEDIOS HERMANOS  
DE *Lotus tenuis* TOLERANTES A SALINIDAD

Tesina de la

Alumna

MARÍA AGOSTINA AFFINITO

Este trabajo ha sido presentado

como requisito para la obtención del título de

INGENIERA AGRÓNOMA

Carrera: Ingeniería Agronómica

Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.

Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.

Pergamino, 25 de marzo de 2014-

CARACTERIZACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA A NIVEL  
MORFO-FISIOLÓGICO Y MOLECULAR DE FAMILIAS DE MEDIOS HERMANOS  
DE *Lotus tenuis* TOLERANTES A SALINIDAD

Tesina de la

Alumna

MARÍA AGOSTINA AFFINITO

Aprobada por el Tribunal Evaluador de Tesina

.....

Lic. María Aurora Maciel
-----------------------------

Ing. Agr. Susana Pistorale
-------------------------------

Ing. Agr. Mariela Acuña
----------------------------

.....

Ing. Agr. Adriana Noemí Andrés Directora
--

Ing. Agr. Antonio Horacio Díaz Paleo Co-Director
--

Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,

Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires

## Agradecimientos

---

A Dios.

A todas aquellas personas que colaboraron en la realización de este Trabajo Final de Grado: a la Dra. Adriana Andrés por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo bajo su dirección y por sus aportes; al Ing. Agr. Antonio Díaz Paleo por sus aportes en la etapa de laboratorio; y a ambos, por su confianza, apoyo, dedicación y paciencia.

Al personal de la Sección Forrajeras de la EEA INTA Pergamino por su colaboración y por hacerme ameno el día a día, especialmente a Lola, Catalina, Nelson, Baroni, Javier y Mariela.

Al personal, becarios y pasantes del Laboratorio de Biotecnología de EEA INTA Pergamino por su colaboración, paciencia y los ánimos que me dieron en la última etapa de mi trabajo, especialmente a Dani, Vivi, Marcelo, Estefy, Ceci, Emi, Luciano, Caro, Nati y Carla.

A todos los profesores de la Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales, y Ambientales de la UNNOBA por su contribución a mi formación profesional.

A todos los que en algún momento compartieron el aula conmigo, por hacer de mi etapa universitaria algo inolvidable, especialmente a Juan y Martín.

A mi familia: a mis padres por su apoyo, dedicación y esfuerzo para que pueda estudiar, a mis hermanos Emanuel y Ezequiel, a mis abuelos, tíos y primos, por estar siempre.

Y a todas aquellas personas que me animaron y se interesaron por mi trabajo.

# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>5</b>
<b>1.1- La salinidad y la especie en estudio</b> .....	<b>5</b>
1.1-1. La especie en estudio: <i>Lotus tenuis</i> .....	6
<b>1.2- La tolerancia de las plantas al estrés salino</b> .....	<b>8</b>
<b>1.3- La variabilidad genética</b> .....	<b>11</b>
<b>1.4- Los Marcadores Morfológicos</b> .....	<b>12</b>
<b>1.5- Los Marcadores Moleculares</b> .....	<b>12</b>
<b>1.6- Estudios sobre tolerancia a salinidad en <i>Lotus tenuis</i></b> .....	<b>14</b>
<b>1.7- El germoplasma de <i>Lotus tenuis</i> en estudio</b> .....	<b>17</b>
<b>1.8- Hipótesis</b> .....	<b>18</b>
<b>1.9- Objetivos</b> .....	<b>18</b>
1.9-1. Objetivo General .....	18
1.9-2. Objetivos específicos .....	18
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1- El germoplasma de <i>Lotus tenuis</i> en estudio</b> .....	<b>19</b>
<b>2.2- Las etapas del estudio</b> .....	<b>19</b>
2.2-1. Etapa de Invernáculo.....	19
2.2-2. Etapa de campo .....	20
2.2-3. Etapa de laboratorio .....	22
<b>2.3- Análisis de la información</b> .....	<b>28</b>
2.3-1. Análisis de la información generada en las etapas de invernáculo y de campo .....	28
2.3-2. Análisis de la información generada en la etapa de laboratorio .....	32
2.3-3. Análisis conjunto de la Caracterización Agronómica y la Caracterización Molecular .....	36
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>37</b>
<b>3.1- Caracterización morfo-fisiológica</b> .....	<b>37</b>
<b>3.2- Caracterización molecular</b> .....	<b>58</b>
<b>3.3- Análisis de Procrustes Generalizados</b> .....	<b>67</b>

**CONCLUSIONES ..... 69**

**BIBLIOGRAFÍA ..... 71**

**RESUMEN ..... 85**

**ANEXOS ..... 87**

## INTRODUCCIÓN

### 1.1- La salinidad y la especie en estudio

La salinidad es uno de los principales problemas que afecta a la producción agrícola (Yamaguchi y Blumwald, 2005; Ashraf, 2009), limitando el crecimiento, el rendimiento y la calidad de los cultivos. De acuerdo con la FAO Land and Plant Nutrition Management Service, más del 6% de la superficie mundial se encuentra afectada por salinidad o sodicidad (Cuadro 1), de las cuales 70 millones de hectáreas son agrícolas (FAO, 2005). Argentina es el tercer país con mayor superficie de suelos afectados por halomorfismo en el mundo, después de Rusia y Australia (Taboada y Lavado, 2009), con 20 millones de hectáreas.

Regiones	Área total	Suelos salinos		Suelos sódicos	
	Mha	Mha	%	Mha	%
África	1,899	39	2.0	34	1.8
Asia y Australia	3,107	195	6.3	249	8.0
Europa	2,011	7	0.3	73	3.6
América latina	2,039	61	3.0	51	2.5
Oriente medio	1,802	92	5.1	14	0.8
América del norte	1,924	5	0.2	15	0.8
Total	12,781	397	3.1%	434	3.4%

Fuente: FAO Land and Plant Nutrition Management Service

**Cuadro 1.** Distribución regional de suelos salinos y sódicos, en millones de has.

En los últimos años, la creciente expansión agrícola producida en Argentina, ocurrió en áreas ocupadas históricamente por la ganadería, desplazando la actividad hacia áreas marginales. Esta situación generó la necesidad de incrementar la producción de especies forrajeras adaptadas a condiciones edáficas restrictivas, caracterizadas por suelos salinos y sódicos. Entre las especies más importantes en dichos ambientes marginales se destaca *Lotus tenuis* Waldst. et Kit (= *Lotus glaber*

Mill), una leguminosa naturalizada en los campos bajos de la Pampa Deprimida Argentina, muy valorada por su aporte a la oferta forrajera de los sistemas ganaderos de la región. La importancia de desarrollar germoplasma tolerante a la salinidad, es un objetivo central en los programas de mejoramiento genético a nivel mundial (Flowers *et al.*, 1997; Munns, 2002). En particular, la identificación de las bases genéticas y fisiológicas de caracteres relacionados con la persistencia productiva de *Lotus tenuis* frente a factores abióticos como la salinidad, permite interpretar las respuestas poblacionales y establecer criterios de selección (Ashraf y Harris, 2004).

### **1.1-1. La especie en estudio: *Lotus tenuis***

*Lotus tenuis*, conocida vulgarmente como lotus, trébol pata de pájaro o lotus de hoja angosta, es una leguminosa herbácea perenne originaria de Europa y Asia Menor (Lambrechtsen *et al.*, 1986), distribuida en el norte de África, Europa, Oriente medio, Asia, India y China (Kirkbride, 1999). En Argentina la especie colonizó y se naturalizó en los campos bajos salino-alcalinos de la Pampa Deprimida de la Provincia de Buenos Aires, lo cual constituye un caso particular de invasión biológica positiva (León, 1975; León *et al.*, 1979). Es muy valorada por su aporte a la oferta forrajera de los sistemas ganaderos de la región, debido a su buena adaptación en áreas con predominancia de gramíneas y pobre presencia de leguminosas (Clúa *et al.*, 1997). Entre los atributos que pueden explicar el éxito de su propagación se citan la variabilidad genética de sus poblaciones, la plasticidad fenotípica de las plantas, su tolerancia al anegamiento y a la salinidad y la dispersión por animales (Vignolio *et al.*, 1994; Sevilla *et al.*, 1996; Stofella *et al.* 1998; Zamolinski, 2000; Mendoza *et al.* 2000; Kade *et al.*, 2003; Vignolio y Fernández, 2003, 2006).

Desde el punto de vista botánico (Figura 1), es una herbácea policárpica, perenne, sin órganos de propagación vegetativa. Sin competencia por luz, su crecimiento es postrado; en cambio sus tallos adquieren porte erecto cuando está asociada a pastizales altos (Beuselink *et al.*, 1986; Miñon *et al.*, 1990). A partir del primer año, el tallo principal forma una corona que posee numerosas yemas capaces de producir ramas herbáceas de crecimiento indefinido; las ramificaciones

secundarias y terciarias se producen a partir de yemas axilares (Miñon *et al.*, 1990) y la densidad de las mismas varía de acuerdo al genotipo y a las condiciones ambientales (De Battista, 2001). Las hojas están formadas por cinco folíolos lanceolados, dos en la base del pecíolo y tres en la parte terminal. La raíz es pivotante, con muchas ramificaciones en los primeros centímetros del suelo, caracterizadas por la presencia de nódulos producidos por la infección de bacterias nitrificantes (Miñon *et al.*, 1990).



**Figura 1.** Dibujo botánico de *Lotus tenuis*. Watson y Dallwitz, 1992.

El ciclo de crecimiento es primavero-estivo-otoñal, con una floración extendida desde noviembre hasta marzo. Las flores son de color amarillo, tienen pedicelo corto y están dispuestas en umbelas, cuyo número varía entre 1 y 6 (Lambrechtsen *et al.*, 1986; Miñon *et al.*, 1990; Vignolio *et al.*, 2002). La fecundación es cruzada y entomófila (Miñon *et al.*, 1990), aunque algunas flores no desarrollan frutos. Durante la maduración los frutos cambian de color verde a marrón y a la madurez se abren con violencia. La forma de los mismos es cilíndrica achatada con un diámetro máximo de 2 y 3 mm y mínimo entre 1,6 y 2 mm (Vignolio y Fernández, 2006) y su longitud es variable entre 0,6 y 3,5 cm (Lambrechtsen *et al.*, 1986; Vignolio *et al.*, 2002). La longitud y la

cantidad de semillas por fruto varían durante el ciclo reproductivo. El número de semillas por fruto puede variar entre 3 y 35, siendo su promedio entre 12 y 16 (Montes, 1988; Lambrechtsen *et al.*, 1986; Vignolio *et al.*, 1996; Vignolio *et al.*, 2002). Las semillas son pequeñas, duras, lisas y de color marrón (Arambarri, 1983). El peso de mil semillas está comprendido entre 0,652 y 1,53 g (Arambarri, 1983; Lambrechtsen *et al.*, 1986; Montes, 1988; Miñon *et al.*, 1990; Vignolio *et al.*, 1996). Las semillas maduras recién cosechadas en forma manual presentan una dureza que puede ser superior al 90% (Mujica y Rumi, 1998).

*Lotus tenuis* es diploide,  $2n=2x=12$  (Beuselinck *et al.*, 1986; Falistocco y Piccirilli, 1989), autoincompatible, polinizada por insectos, principalmente por abejas *Apis mellifera* (Seaney *et al.*, 1970). Sin embargo, es posible obtener algunas semillas viables por autopolinización (Montes, 1988). Se han obtenido autotetraploides de *Lotus tenuis* ( $2n=4x=24$ ) a partir de semillas y plántulas tratadas con colchicina. Estos poliploides presentaron mayor tamaño de cáliz, ovario, grano de polen, longitud y ancho del folíolo central y longitud de estomas que los diploides originales (Marseille y Grant, 1997; Barufaldi *et al.*, 2000).

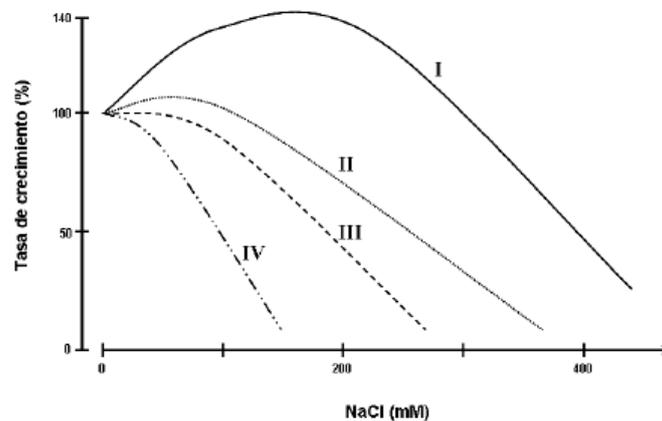
## **1.2- La tolerancia de las plantas al estrés salino**

La tolerancia de las plantas a estreses abióticos involucra respuestas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas, que permiten mantener los procesos de respiración, fotosíntesis y transporte de nutrientes (Wang *et al.*, 2003; Díaz *et al.*, 2005; Munns y Tester, 2008). La tolerancia a la salinidad se define como la habilidad de una planta para crecer y completar su ciclo de vida en un medio que contiene altas concentraciones de sal, y varía entre los sucesivos estados de crecimiento (Bernstein y Hayward, 1958). En particular el primer estadio durante el cual el cultivo se establece, se considera particularmente sensible, incluso para cultivos tolerantes (Maas y Hoffman, 1977).

Tanto la tolerancia a salinidad como a sequía son características complejas. Por ejemplo, la tolerancia muchas veces depende de la habilidad de compartimentalizar iones, la cual a su vez depende de la regulación de la transpiración, del estricto control de la pérdida de iones por el apoplasto de la raíz, de la naturaleza de las membranas de la vacuola, de la síntesis de solutos compatibles y de la habilidad para tolerar bajas relaciones  $K^+/Na^+$  en el citoplasma de las células.

Para definir el concepto de tolerancia a la salinidad, es necesario establecer dos aspectos fundamentales: uno biológico y otro agronómico. Desde el punto de vista biológico, por tolerancia a la salinidad en determinada especie o variedad, se debe entender aquel nivel de salinidad, hasta el cual las plantas son capaces de completar su ciclo de desarrollo y producir semillas viables (Udovenko, 1977). Desde el punto de vista agronómico, la tolerancia a la salinidad en determinada especie o variedad se define como la habilidad de las plantas de sobrevivir y producir rendimientos económicos en condiciones de estrés y se expresa como la relación entre el rendimiento de una especie o variedad en condiciones salinas con respecto a su rendimiento en condiciones normales. Con diferentes niveles de sales en el suelo esta relación puede variar, por lo que al caracterizar el grado de tolerancia de las variedades se debe indicar el nivel de salinidad del sustrato (Udovenko, 1977; González *et al.*, 2002). Muchas veces, se establecen como más tolerantes aquellas especies o variedades que mayor rendimiento producen; sin embargo, sólo se presentan los resultados sobre su productividad en condiciones adversas, y aunque este indicador es de gran importancia para la práctica agrícola, no constituye un criterio de tolerancia del organismo a la salinidad, ya que no se conoce su productividad en condiciones óptimas, por lo que no se puede determinar en qué medida estas se afectan en condiciones adversas (González *et al.*, 2002). Para aquellas especies de crecimiento lento, persistentes o que no han sido cultivadas, suele ser complejo evaluar la reducción de la biomasa producida respecto a condiciones no salinas, por lo que se puede utilizar el porcentaje de supervivencia (Munns, 2009).

Las distintas especies de plantas difieren ampliamente en su tolerancia a la salinidad (Greenway y Munns, 1980) (Figura 2). Según su respuesta a altas concentraciones salinas, las especies se han clasificado en halófitas y glicófitas presentando diversos comportamientos y mecanismos de adaptación al estrés salino. Las halófitas son aquellas plantas nativas de suelos salinos con capacidad de cumplir todo su ciclo ontogénico en dicho ambiente, e incluso tener un mejor desempeño comparado con un control sin contenido de sales; las glicófitas son aquellas plantas afectadas por la sal e incapaces de resistir determinadas concentraciones salinas como lo hacen las halófitas (Taiz y Zeiger, 1998).



**Figura 2.** Efecto de la salinidad del sustrato sobre el desarrollo relativo de varias especies vegetales desde (I) halófitas extremas hasta (IV) verdaderas glicófitas (Greenway y Munns, 1980).

Los vegetales en general, han desarrollado adaptaciones anatómicas y fisiológicas que les permiten sobrevivir y, en el caso de las halófitas, promover un mejor crecimiento bajo condiciones salinas. Algunas especies, que son altamente tolerantes a sal, presentan estimulación del crecimiento a concentraciones de  $\text{Cl}^-$  varias veces mayores que el umbral letal para especies sensibles (Greenway y Munns, 1980).

A nivel celular, la tolerancia a estrés salino está determinada inicialmente por la compensación osmótica seguida por las respuestas tendientes a mantener la homeostasis celular (Borsani *et al.*, 2001). A nivel de planta entera la tolerancia está definida por la capacidad de excluir

y traslocar Na<sup>+</sup>, por lo que una alta relación tallo/raíz, así como una mayor tasa de crecimiento, son necesarias para mantener bajos los niveles de Na<sup>+</sup> en hoja (Munns *et al.*, 2002; Yamaguchi y Blumwald, 2005).

La comprensión de los mecanismos bioquímicos y fisiológicos involucrados en las respuestas que exhiben las plantas en condiciones de estrés salino, plantea un desafío de gran importancia. Al estudiar la respuesta de las plantas frente a un estrés ambiental, se reconocen diferentes procesos por los cuales las mismas logran adaptarse y soportar los cambios que ocurren en su entorno.

### **1.3- La variabilidad genética**

A través de diversos estudios realizados en diversas especies vegetales se ha comprobado la existencia de variabilidad genética (Turesson, 1922; Clausen *et al.*, 1940, 1948; Bradshaw, 1971). Los trabajos pioneros de Turesson (1922) demostraron que la diferenciación poblacional en *Hieracium umbellatum* L. estaba relacionada con las condiciones ambientales a las que estaban sometidas las plantas. Clausen *et al.* (1940, 1948) encontraron grandes diferencias de adaptación climática en poblaciones de *Potentilla glandulosa* L. y *Achilea millefolium* L.

La variabilidad genética puede detectarse a niveles inter-específico e intra-específico (Briggs y Walters, 1984). La variabilidad intra-específica ocurre entre poblaciones y entre individuos dentro de la misma población, y puede ser afectada por el rango ecológico y geográfico de la especie (Van Valen, 1965), la localización geográfica, la heterogeneidad ambiental (Hedrick *et al.*, 1976), el sistema reproductivo (Wright, 1951) y la longevidad de la planta (Hamrick, 1979). La heterogeneidad ambiental y el rango ecológico y geográfico determinan la magnitud de variación intra e inter poblacional (Snaydon, 1984); mientras que la heterogeneidad ambiental que ocurre a pequeña escala y el sistema reproductivo determinarían la magnitud de la variación encontrada dentro de las poblaciones (Jain, 1975; Loveless y Hamrick, 1984).

Existen numerosos estudios de caracterización morfo-fisiológica y molecular de germoplasma de especies forrajeras de interés agronómico con el objetivo de detectar variabilidad genética para ser aplicada a programas de selección. Trabajos realizados en *Bromus auleticus* (Traverso y von der Phalen; 1982), en poblaciones naturales de *Agropirum scabrifolium* (Doell) Parodi (Andrés, 1987), en *Festuca arundinacea* (Ceron, 1993), en *Trifolium repens* (Pagano, 1993), en *Lolium multiflorum* (Acuña, 2008), detectaron presencia de variabilidad genética para ser utilizada en programas de mejoramiento de dichas especies.

#### **1.4- Los Marcadores Morfológicos**

Hasta la década del 60, los marcadores utilizados en estudios de genética y mejoramiento eran aquellos controlados por genes asociados a caracteres morfológicos, en general fenotipos de fácil identificación visual; los cuales contribuyeron significativamente al desarrollo teórico del análisis de ligamiento y a la construcción de las primeras versiones de mapas genéticos (Ferreira y Grattapaglia, 1998). Sin embargo pocos caracteres fenotípicos en los cultivos forrajeros se lograron caracterizar genéticamente y tampoco hubo alguna vinculación genética en estudios realizados al respecto (Barker y Warnke, 2001). Hoy día muchos de estos marcadores tales como forma, color, tamaño, altura, se convirtieron en importantes descriptores al momento de realizar inscripciones de cultivares (Picca *et al.*, 2004).

#### **1.5- Los Marcadores Moleculares**

En la actualidad, la caracterización morfo-fisiológica es complementada con herramientas biotecnológicas, tales como los marcadores moleculares, brindando así técnicas más directas y predictivas. Entre las principales ventajas del uso de los marcadores se destacan la precisión de detección de la variabilidad a nivel de ADN, que están ampliamente distribuidos en el genoma, que no están influenciados por el ambiente y que se pueden detectar en cualquier estado del desarrollo de la planta (Schlatter *et al.*, 2002).

Entre los marcadores moleculares utilizados para la caracterización se destacan los microsatélites o repeticiones de secuencias simples (SSR o Simple Sequence Repeats). Estos marcadores están compuestos por repeticiones en tándem de dos a seis pares de bases flanqueadas por regiones conservadas no repetitivas, de copia única, son abundantes y suelen estar ubicados en regiones no codificantes (Forster *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001).

Los SSR son marcadores codominantes, multialélicos, altamente reproducibles, de implementación sencilla y que proveen un alto contenido de información polimórfica en comparación con otros marcadores como RFLP y RAPD, permitiendo una rápida construcción de mapas y análisis de caracteres específicos (Ferreira y Grattapaglia, 1998; Forster *et al.*, 2001).

Los SSR permiten diferenciar los genotipos homocigotas que presenten un único producto de amplificación, de los genotipos heterocigotas que presenten dos fragmentos distintos (Ferreira y Grattapaglia, 1998). Por estas características los SSR son marcadores particularmente aptos para realizar la evaluación y comparación de la variación genética dentro y entre especies cercanas (Morgante y Olivieri, 1993; Powell *et al.*, 1996). La desventaja más importante en el uso de estos marcadores es su costo de desarrollo (Ferreira y Grattapaglia, 1998; Zane *et al.*, 2002; Squirrel *et al.*, 2003; Saha *et al.*, 2006).

Para hacer frente a este problema, es posible transferir conocimiento de marcadores microsatélites ya desarrollados en alguna especie, a otra menos conocida relacionada filogenéticamente. Esto hace el uso de microsatélites más sencillo y menos costoso. Por ejemplo, Peakall *et al.* (1998) lograron la transferencia de marcadores SSR *Glycine max* a otras fabáceas. Se obtuvieron resultados similares en *Festuca arundinacea* Schreb., *Triticum aestivum* L., *Lolium multiflorum* Lam. y *Oriza sativa* L. (Saha *et al.*, 2006).

Los marcadores moleculares son potencialmente útiles para el mejoramiento genético de especies de *Lotus* usadas en agricultura. Se han utilizado marcadores RAPD para determinar la

relación genómica entre distintas especies del género (Campos *et al.*, 1994) y en *Lotus corniculatus* se utilizaron AFLP (Savo Sardaro *et al.*, 2008) y SSR (Savo Sardaro *et al.*, 2008; Alem *et al.*, 2011; Dos Santos *et al.*, 2011).

En el presente estudio se utilizaron SSR transferidos de *Lotus japonicus* (Savo Sardaro *et al.*, 2008; Alem *et al.*, 2011; Dos Santos *et al.*, 2011) y de *Trifolium repens* (Dos Santos *et al.*, 2011), que han sido utilizados de manera exitosa en *Lotus corniculatus*.

#### **1.6- Estudios sobre tolerancia a salinidad en *Lotus tenuis***

*Lotus tenuis* es considerada una especie tolerante a la salinidad (Ayers, 1948; Lambrechtsen *et al.*, 1986; Schachtman y Kelman, 1991; Rogers *et al.*, 1997; Vignolio y Fernández., 1999; Zamolinski, 2000; Grattan *et al.*, 2004). En los pastizales de la Pampa Deprimida, *Lotus tenuis* puede crecer en suelos bajos, anegables, alcalinos, típicos de comunidades vegetales dominadas por *Distichlis spicata* (Montes, 1988; Stofella *et al.*, 1998; Mendoza *et al.*, 2000).

Algunos estudios indican que en condiciones de campo y de laboratorio, la producción de biomasa de *Lotus tenuis* fue disminuyendo con el aumento de la salinidad (Ayers, 1948; Schachtman y Kelman, 1991; Rogers *et al.*, 1997). Sin embargo, los porcentajes de supervivencia y crecimiento de las plantas fueron mayores que en *Lotus uliginosus*, *Trifolium hybridum*, *Trifolium repens latum* y *Trifolium pratense* (Ayers, 1948). Por otra parte, *Lotus tenuis* es más tolerante a la salinidad y anegamiento que la mayormente conocida *Lotus corniculatus* (Schachtman y Kelman, 1991; Rogers *et al.*, 1997; Striker *et al.*, 2005; Teakle *et al.*, 2006; Teakle *et al.* 2007; Real *et al.* 2008). Teakle *et al.* (2006) compararon el efecto combinado de la salinidad y el anegamiento sobre distintos cultivares de *L. tenuis* y *L. corniculatus*, encontrando que los cultivares de *L. tenuis* eran más tolerantes que los de *L. corniculatus* basándose en la producción de materia seca.

Mujica y Rumi (1998), en un análisis del comportamiento de la germinación de dos poblaciones de *L. glaber* (= *Lotus tenuis*), señalan una inhibición total de la misma a una concentración de 220 mM de NaCl.

En una prueba de cribado a 12 genotipos de *L. tenuis*, Ixtaina y Mujica (2004) hallaron que la salinidad (300 mM de NaCl) no afectó a la supervivencia de los genotipos evaluados, pero existió una disminución del crecimiento observada, sin daño en los órganos de las plantas. Los caracteres afectados fueron: peso seco total y sus componentes (peso seco de raíz, de tallo y de hojas), número de tallos en corona, longitud de raíz y tallo principal, número de hojas en tallo principal y longitud de entrenudos. Del análisis de correlación de variables surgió la existencia de modificaciones en la asociación de algunos caracteres bajo el tratamiento salino. Por ejemplo, la longitud de raíz se correlacionó con peso seco total, de hojas, tallos y longitud de raíz/peso seco total en el tratamiento salino, pero no en el control. El peso seco total y sus componentes, se encuentran altamente correlacionados entre sí, tanto para el control como para el tratamiento salino.

Pesqueira *et al.* (2007) evaluaron diferentes accesiones de *Lotus tenuis* provenientes de la Depresión del Salado expuestas a salinidad, encontrando que ésta indujo cambios morfológicos y anatómicos, reduciendo el número de tallos por planta y provocando un engrosamiento de las láminas foliares.

Por su parte, Teakle *et al.* (2010), evaluando 40 materiales de *Lotus tenuis* para tolerancia a salinidad en las etapas de germinación y de crecimiento vegetativo, registraron que la mayoría de los materiales de *L. tenuis* son más tolerantes a la salinidad y tuvieron al menos un 50% menos de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> en tallo en comparación con algunas otras leguminosas forrajeras comunes como *Medicago sativa*, *M. polymorpha* y *Trifolium subterraneum*.

Los mecanismos fisiológicos involucrados en la respuesta a estrés salino en la especie aún no resultan claros. Sin embargo, distintos estudios indican la exclusión de Cl<sup>-</sup>, restringiéndose su

transporte a los órganos aéreos, en plantas creciendo en condiciones salinas (Teakle *et al.*, 2006; Pesqueira *et al.*, 2007), la exclusión de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> en condiciones combinadas de anegamiento y salinidad (Teakle *et al.*, 2006), una correlación positiva entre la acumulación de Na<sup>+</sup> en la parte aérea, y el crecimiento, indicando un posible papel de este ión en la osmorregulación (Pesqueira *et al.*, 2007), selectividad para el movimiento de Na<sup>+</sup> a nivel de las células corticales (Pesqueira *et al.*, 2008) y acumulación de prolina (indicador del ajuste osmótico) en la parte aérea (Barragán *et al.*, 2004; Pesqueira *et al.*, 2008). Con respecto a los mecanismos que permiten mantener el balance oxidativo, Melchiorre *et al.* (2009) trabajando con *L. japonicus* ecotipo MG20 hallaron una correlación positiva entre la tolerancia a la salinidad y la actividad de enzimas del complejo antioxidante Superóxido dismutasa (SOD) y Glutatión reductasa (GR).

Por otra parte, existe un número apreciable de trabajos que destacan la variabilidad de la tolerancia a la salinidad en esta especie (Schachtman y Kelman, 1991; Barragán *et al.*, 2004; Ixtaina y Mujica, 2004; Pesqueira *et al.*, 2007; Pesqueira, 2008; Teakle *et al.*, 2010).

Ixtaina y Mujica (2004) determinaron que el tratamiento salino aumentó la variabilidad de los caracteres evaluados, excepto longitud de raíz. Barragán *et al.* (2004), hallaron una alta variabilidad en la capacidad de supervivencia de las plántulas en un ensayo hidropónico de 45 días de duración bajo 200 mM NaCl, entre 20 genotipos pertenecientes a dos poblaciones provenientes de ambientes contrastantes de la Depresión del Río Salado. En el mismo sentido, Pesqueira (2008) encontró una alta variación en la capacidad de supervivencia a 300 mM de NaCl en genotipos provenientes de una población mejorada por su capacidad para tolerar situaciones de estrés salino-alkalino denominada Pampa INTA.

Pesqueira (2008) registró la existencia de una gran variabilidad entre distintas accesiones de *L. tenuis* en relación con la disminución del crecimiento provocada por la salinidad.

Por su parte, Teakle *et al.* (2010), encontraron una variación significativa en la tolerancia a la salinidad de *Lotus tenuis*, con valores de C<sub>50</sub> (concentraciones de NaCl en la cual la disminución de materia seca aérea es igual al 50% del control) que van desde aproximadamente 100 a 320 mM. También se encontró variación en la tolerancia a la salinidad en la etapa de germinación, con líneas que van desde 0 a 70% de germinación después de la recuperación de una exposición previa a 800 mM de NaCl durante 15 días.

### **1.7- El germoplasma de *Lotus tenuis* en estudio**

En los últimos años el INTA Pergamino ha desarrollado diferentes investigaciones en *Lotus tenuis* tendientes a la preservación de los recursos genéticos y al desarrollo de programas de mejoramiento genético. Entre los años 2004 y 2006 se realizaron diversos trabajos centralizados en la colecta y caracterización morfo-fisiológica y productiva de 35 poblaciones provenientes de campos bajos de la Provincia de Buenos Aires (Andrés y Rosso, 2007; Pesqueira *et al.*, 2007; Rosso *et al.*, 2008). Algunas de estas poblaciones fueron evaluadas y seleccionadas por su respuesta a la salinidad (Pesqueira *et al.*, 2007), con el objetivo de detectar germoplasma tolerante, de alta productividad de forraje y de semilla. A partir de estos estudios se conformaron *pooles* de genotipos tolerantes y susceptibles a la salinidad. La descendencia de estos *pooles* fue evaluada en condiciones de salinidad en hidroponía y a campo, a través de 24 familias de medios hermanos (FMH). Los resultados obtenidos hasta el presente indicaron una elevada variabilidad genética entre las familias y un alto componente genético aditivo para los caracteres asociados a la tolerancia a la salinidad, y para los caracteres de interés agronómico, como los asociados a la capacidad de establecimiento, la producción de materia seca y el rendimiento de semilla (Franco, 2014). En el presente trabajo, se estudiaron 7 FMH de *L. tenuis* tolerantes a la salinidad y de buen comportamiento agronómico (Franco, 2014), con el objetivo de determinar la variabilidad genética a nivel morfo-fisiológico y molecular, en condiciones de campo en suelo con restricciones sódicas.

## **1.8- Hipótesis**

Existe variabilidad genética a nivel morfo-fisiológico y molecular entre familias de medios hermanos de *Lotus tenuis* tolerantes a salinidad.

## **1.9- Objetivos**

### **1.9-1. Objetivo General**

Determinar la variabilidad genética a nivel morfo-fisiológico y molecular entre familias de medios hermanos de *Lotus tenuis* tolerantes a salinidad.

### **1.9-2. Objetivos específicos**

- ❖ Caracterizar fenotípicamente las familias de medios hermanos tolerantes a salinidad creciendo en condiciones de suelo sódicas.
- ❖ Estimar parámetros genéticos de las variables estudiadas.
- ❖ Realizar la puesta a punto de la técnica de marcadores moleculares (tipo SSR) en la especie utilizando marcadores moleculares transferidos de *Lotus japonicus* y *Trifolium repens*.
- ❖ Caracterizar molecularmente la variabilidad genética presente entre las familias de medios hermanos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1- El germoplasma de *Lotus tenuis* en estudio

En el presente trabajo, se estudiaron 7 familias de medios hermanos de *L. tenuis* caracterizadas por su tolerancia incrementada a la salinidad y buen comportamiento agronómico (Franco, M. 2014), identificadas como FMHs 447, 490, 685, 691, 1193, 1897 y 2241. Como testigo se utilizó un cultivar comercial.

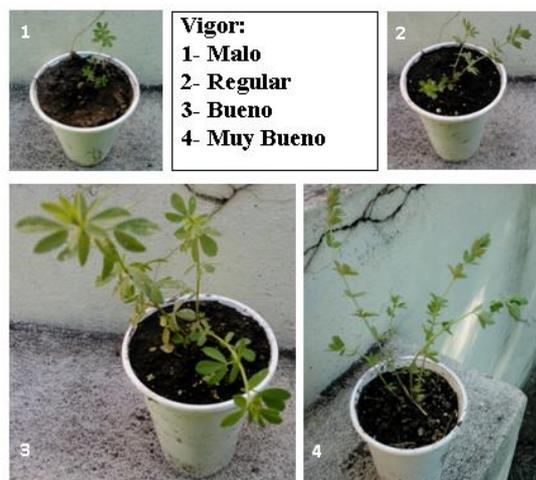
### 2.2- Las etapas del estudio

Entre marzo 2013 y marzo 2014 se realizó el estudio en la UI UNNOBA-INTA, EEA Pergamino, cubriendo diferentes etapas: 1) etapa de invernáculo; 2) etapa de campo; 3) etapa de laboratorio. A continuación se describen cada una de estas etapas:

#### 2.2-1. **Etapa de Invernáculo**

El día 01/03/13 se escarificaron y sembraron 60 semillas/familia en recipientes plásticos de 200 cm<sup>3</sup> rellenos de suelo y arena, dando un total de 420 plántulas. Los recipientes identificados se dispusieron aleatoriamente en terrinas para el riego por capilaridad y fueron mantenidos en invernáculo sin calefaccionar durante 47 días.

A los 40 días de la siembra (09/04) se registró en forma visual el **vigor de crecimiento inicial por planta (V0)** utilizando la siguiente escala: 1: Malo; 2: Regular, 3: Bueno, 4: Muy bueno. Los registros se tomaron sobre 20 genotipos/FMH.

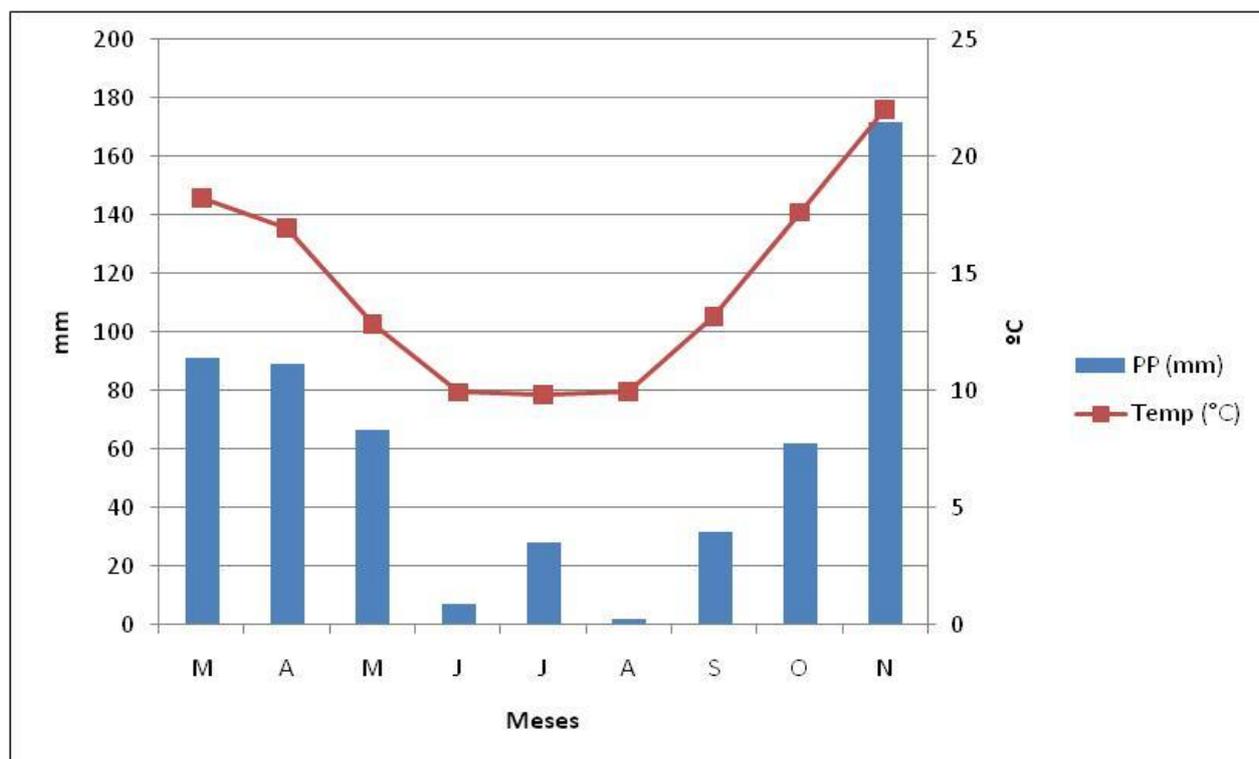


**Figura 3.** Vigor de crecimiento inicial por planta en etapa de invernáculo (V0)

## 2.2-2. Etapa de campo

### 2.2-2.1. *Trasplante y diseño experimental*

El 16/04/13 las plántulas se trasladaron al campo experimental de la EEA INTA Pergamino, ubicado a 33° 59' de latitud Sur y 60° 35' de longitud Oeste, en un suelo con pH 9,8 (muy fuertemente alcalino), CE 0,76 dS/m (escasa), C 5,9 mg/g (altamente desprovisto), PSI (Porcentaje Sodio Intercambiable 22% en condiciones de planta espaciada y bajo un diseño experimental en bloques completos al azar (DBCA) con 3 repeticiones. Se empleó la “Técnica de Cultivos Experimentales en Ambiente Homogéneo” propuesta por Turesson (1922), que permite despejar los efectos del ambiente sobre cada planta individual, y estimar con exactitud la expresión genética de cada carácter. Cada familia estuvo compuesta por 45 plantas (15 plantas por repetición), dispuestas a 0,50 m entre plantas dentro del mismo surco y a 1 m entre surcos, con caminos de 1m entre las repeticiones. La superficie total del ensayo fue de 196 m<sup>2</sup> (8 m x 24,5 m). Posterior al trasplante las plantas fueron regadas para asegurar la implantación. Las condiciones climáticas registradas durante los meses de evaluación se muestran en la figura 4.



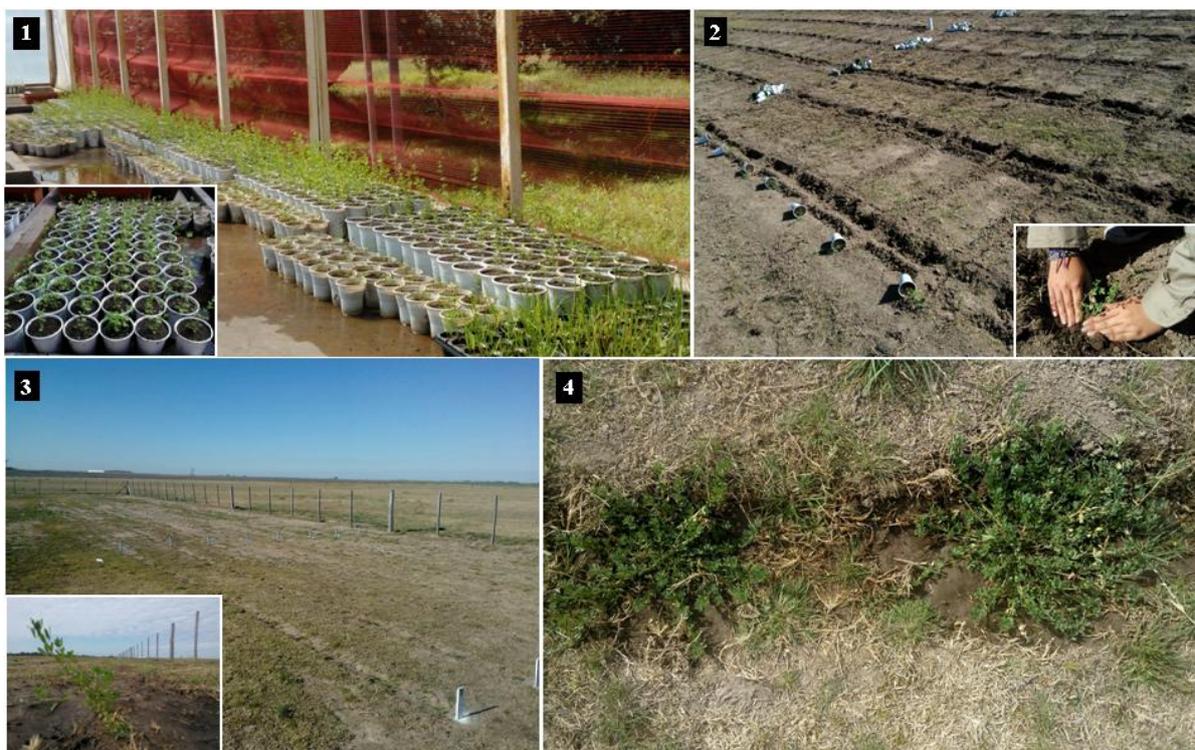
**Figura 4.** Temperatura media y precipitaciones registradas en la estación meteorológica INTA Pergamino durante los meses en que se llevó a cabo el ensayo a campo.

### 2.2-2.2. Caracteres evaluados

Entre el 16/04 y el 12/11 se registraron 19 caracteres cualitativos y cuantitativos en cada planta individual, indicadores del crecimiento vegetativo. Si bien el trasplante fue exitoso, las condiciones climáticas y las restricciones propias del suelo sódico donde se condujo el ensayo provocaron una alta mortandad de genotipos.

- ❖ **Sobrevivencia (S):** Se realizó el recuento de plantas vivas para calcular el porcentaje de sobrevivencia por familia y por repetición en 10 fechas desde el trasplante.
- ❖ **Vigor de planta (V):** A los 14, 36 y 210 días desde el trasplante, se registró en forma visual el vigor de crecimiento por genotipo, utilizando la siguiente escala: 1: Malo; 2: Regular; 3: Bueno, 4: Muy bueno.
- ❖ **Número de tallos vegetativos (NTV):** se realizó el recuento de tallos vegetativos sobre cada genotipo, a los 23, a los 120 y a los 210 días desde el trasplante.

- ❖ **Diámetro de planta (D):** A los 36, a los 143 y a los 210 días desde el trasplante, se midió el diámetro (cm) de cada planta (genotipo) con regla graduada.



**Figura 5.** Etapas de invernáculo y campo. 1. Plántulas en invernáculo, 30 días después de la siembra. 2. Trasplante a campo el día 16/04. 3- Ensayo a campo 53 días después del trasplante. 4- Plantas a los 143 días del trasplante.

### 2.2-3. Etapa de laboratorio

#### 2.2-3.1. *Material vegetal*

Se utilizó material proveniente del ensayo a campo, de las tres FMH que mostraron una mayor sobrevivencia y crecimiento hacia el final del mismo (1193, 447, 490) y como control negativo, se utilizó material fresco de las familias 691 y 1897, que mostraron un peor comportamiento. En este caso, se sembraron 20 semillas/FMH en spilding y se mantuvieron en condiciones semi-controladas.

### 2.2-3.2. *Extracción de ADN*

El material genómico se extrajo según protocolo Kleinhofs *et al.* (1993):

- 1- Colocar material fresco en microtubos de 2 ml y estos dentro de Nitrógeno líquido. Moler las muestras sin que se descongelen con un vástago de punta cónica. O bien 50 mg de material liofilizado en microtubos de 2 ml.
- 2- Agregar 600µl de buffer de extracción (sin CTAB ni SDS) cuya composición se detalla en la Cuadro 2, a 65°C en cada tubo.
- 3- Incubar en baño de agua a 65°C durante 10 minutos.
- 4- Agregar 75µl de SDS y 75µl de CTAB, calientes.
- 5- Incubar en baño de agua a 65° C, durante 30 minutos.
- 6- Agregar 750µl de cloroformo.
- 7- Mezclar suavemente mediante inversiones durante 10 minutos.
- 8- Centrifugar a 12000 rpm, durante 30 minutos.
- 9- Extraer la fase acuosa ( $\pm$  670µl) y colocarlo en un microtubo de 1,5 ml.
- 10- Agregar un volumen igual de cloroformo.
- 11- Mezclar suavemente mediante inversiones, durante 10 minutos.
- 12- Centrifugar a 12000 rpm, durante 30 minutos.
- 13- Extraer la fase acuosa y colocarlo en un microtubo de 1,5 ml.
- 14- Precipitar el ADN con isopropanol frio, agregando un 60% del volumen. Mezclar suavemente.
- 15- Centrifugar 10 minutos a 12000 rpm.
- 16- Descartar la fase acuosa.

#### Lavados de pellet

- 17- Agregar 1 ml de etanol 70%.
- 18- Centrifugar.
- 19- Descartar la fase acuosa y realizar el segundo lavado con etanol al 70%.

20- Centrifugar y descartar la fase acuosa.

21- Dejar secar el pellet hasta evaporación total del etanol al 70%.

22- Resuspender el ADN con 40µl de TE 1X.

Componentes	Concentración final	1X
1M TrisClH (pH 8)	100mM	75µl
5M NaCl	700mM	105µl
0.5M EDTA (pH 8)	50mM	75µl
SDS 20% *	2%	75µl
CTBA 10% *	1%	75µl
H <sub>2</sub> O		345µl
<i>Volumen total</i>		<i>750µl</i>

**Cuadro 2.** Composición del buffer de extracción (\* agregado después de calentar a 65 °C)

### 2.2-3.3. *Cuantificación de ADN*

Para la cuantificación y control de la integridad del ADN extraído, se realizó electroforesis horizontal en geles de agarosa al 0,8% teñidos con bromuro de etidio (0.1µg/ml). Por pocillo se sembró un volumen de 2µl de muestra con 6µl de azul de bromo fenol (BPB) 1X. La electroforesis se llevo a cabo a un voltaje constante de 150 Volts/cm aproximadamente durante 30 minutos. Para la misma se utilizo buffer TAE 1X (TAE 1X = 100ml, TAE 10X= 1000ml; Stock TAE 10X= 400mM Tris, 50mM de Acido Acético Glacial (NaOAc), 7,7mM EDTA) y ajustado a pH 8.0 con Acido Acético Glacial. La visualización del ADN se realizó con luz ultravioleta en transiluminador UVP Modelo M-20. La concentración de ADN se determinó visualmente y como referencia se utilizaron concentraciones conocidas de ADN.

### 2.2-3.4. Análisis SSR

Las 5 FMH fueron evaluadas mediante 7 microsatélites. La lista de los *primers* SSR utilizados se detalla a continuación:

SSR	Cebador Forward (5' - 3') / Cebador Reverse (3' - 5')	T. Annealing
*TM0046	ATCTAACCAAAACGTGCTTC TTCTTGCCCTTTCTCTGTGG	52°C
*TM0083	CTCTCTCTCAGGGCCAACAC TGATTCTTGAAGATTTAAAAGATG	56°C
*TM0203	CTGTTTTGACGAATCGATAG TACGAAGGTTTCTTCATTCC	52°C
*TM0208	TGGCTAGGAATGATGTTGTG TACAATCATGTTTATAAATGTGG	54°C
*TM0212	CTTCCTTCCTCACCCTTAG TAAACGAAAATGAAGCAGAG	50°C
*BM1397	ATTCAGTAACAGAAATCCCG AAAGACTCGAGACCAATACC	52°C
**PRS612	TTGAACTAGTCGTTGGATGGG GAGAGGGTTTCAGGAACATACG	58°C

\*Primer desarrollado para *Lotus japonicus*    \*\*Primer desarrollado para *Trifolium repens*

**Cuadro 3.** Lista de los *loci* evaluados, las secuencias de los cebadores flanqueantes y su temperatura de *annealing*.

### 2.2-3.5. Amplificación por PCR

Las muestras fueron amplificadas en placas de 96 pocillos en un volumen de reacción de 12,5µl. En cada reacción se utilizó 0,13µl de dNTPs 200µM cada uno, 1,67µl *Buffer* Taq 10X, 0,67µl de Mg<sup>++</sup> 2,5mM, 1 µl de cada oligonucleótido (cebador *forward* y *reverse*), 0,125 µl Taq-Polimerasa (Invitrogen®) y 60ng de ADN templado.

Las reacciones de amplificación (PCR) se llevaron a cabo en un termociclador MJ Research PTC-100, utilizando un perfil de PCR según se detalla a continuación:

- ❖ Desnaturalización inicial a 95°C, durante 1 minuto

- ❖ 35 ciclos:
  - Desnaturalización a 95°C, durante 15 segundos
  - Hibridación a temperatura de *annealing* de cada primer, durante 30 segundos
  - Extensión a 72° C, durante 30 segundos
- ❖ Extensión final a 72°C, durante 7 minutos

### **2.2-3.6. Visualización de los productos de amplificación**

Los productos de amplificación fueron separados mediante electroforesis vertical en cubas de secuenciación en geles desnaturalizantes de poliacrilamida 6% (19:1 acrilamida-bisacrilamida) de 0,4 mm de espesor utilizando el equipo *Sequi-Gen DNA Electrophoresis Cell*, Bio-Rad.

El armado de los geles y preparación de los vidrios se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Los vidrios recibieron un tratamiento especial con la finalidad de adherir el gel a uno sólo de ellos. Para esto, se trató el vidrio con solución adherente (3µl *Bind Silane*, 5µl ácido acético glacial 0,5%, 950µl etanol) y la cuba se trató con solución repelente de agua (*Rain X®*), se colocaron espaciadores entre el vidrio y la cuba y se sujetaron con *clamps* (sujetadores). Se distribuyó 70ml de la solución fresca de poliacrilamida con 330µl de APS (persulfato de amonio) y 33µl de TEMED (N,N,N',N'-tetrametilendiamina), controlando que no se formen burbujas durante el proceso. Finalmente se colocó el peine con los dientes orientados hacia la parte superior del gel, para marcar el frente. El peine se sujetó con broches. Se dejó polimerizar como mínimo durante dos horas.

El gel fue sometido a una pre-corrída en buffer TBE (11% tris base, 6% ácido bórico, 0,6% EDTA 0,5M) de dos concentraciones distintas (0,5X arriba y 1X abajo). Previo a la siembra, se agregó a las muestras amplificadas *buffer* de carga (200µl EDTA 0,5M, 9,6ml formamida y 300µl colorante-azul bromofenol y xileno cianol) y se desnaturalizó por calentamiento a 94°C durante 5

minutos, enfriando posteriormente a 0°C para evitar la unión de las cadenas. El volumen de siembra fue de 2 µl por calle.

La electroforesis de las muestras se llevó a cabo durante una hora y media aproximadamente a una potencia constante de 55W, con un voltaje variable entre 14000 y 2000 volts y con control de temperatura (máximo: 55° C).

Una vez finalizada la corrida electroforética, se separaron los vidrios y se procedió a la tinción de los mismos siguiendo el protocolo de tinción con plata para secuenciación de Promega Corp, que se detalla:

- 1- Colocar el vidrio con el gel en una bandeja de plástico y cubrir con solución fijadora (10% ácido acético glacial). Agitar bien durante 20 minutos o hasta que no queden rastros de colorante.

- 2- Enjuagar el gel 3 veces durante 2 minutos por vez con agua bidestilada con agitación. Dejar el gel fuera del agua unos segundos escurriéndose antes de transferirlo al próximo paso.

- 3- Transferir el gel a otra bandeja con la solución de tinción (2 litros agua bidestilada + 2gr nitrato de plata  $\text{AgNO}_3$  + 3ml formaldehído 37%) y agitar durante 30 minutos. Sacar el gel de la bandeja y dejarlo escurrir unos segundos.

- 4- Colocar brevemente (no más de 10 segundos) en una bandeja limpia con agua bidestilada, escurrirlo y colocarlo inmediatamente en la bandeja con solución de revelado fría (1litro agua bidestilada + 30gr carbonato de sodio  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , dejarlo enfriar a 10°C e inmediatamente antes de usarlo agregar 1,5ml formaldehído 37% y 200µl tiosulfato).

### **2.2-3.7. Lectura de los geles**

Una vez secos los geles se registraron las bandas obtenidas mediante la visualización de los productos de amplificación, colocando los vidrios sobre un transiluminador de luz blanca. De acuerdo a información previa, se consideró que cada individuo presentó a lo sumo dos bandas. Esto está de acuerdo a lo esperado por ser una especie diploide. Según la ubicación de las bandas en las calles del gel, se las numeró en orden ascendente.

Las imágenes se almacenaron mediante digitalización, utilizando Scanner Astra 2400slt.

## **2.3- Análisis de la información**

### **2.3-1. Análisis de la información generada en las etapas de invernáculo y de campo**

Para el análisis de los datos registrados a campo se utilizaron diferentes procedimientos del paquete estadístico SAS 9.1 (SAS Institute Inc., 1989) e Infostat Versión 2.0., los que se enumeran a continuación:

#### **2.3-1.1. Comprobación del cumplimiento de los supuestos ANOVA**

Los datos obtenidos fueron testados para comprobar el cumplimiento de los supuestos básicos para someter a análisis de la varianza (ANOVA). Se aplicó el test de Bartlett para comprobar la homogeneidad de las varianzas, el *test* de Shapiro-Wilk para evaluar la normalidad de los residuales y el *test* de no-aditividad de Tukey, para comprobar la aditividad del modelo.

### 2.3-1.2. Análisis de la variabilidad genética

Para conocer y determinar la variación genética presente entre las familias de *Lotus tenuis* se aplicó análisis de variancia (ANOVA) para todas las variables evaluadas. El modelo estadístico lineal utilizado para el análisis de la variable evaluada en invernáculo (V0) fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

donde:  $Y_{ij}$  es la  $j$ -ésima observación del  $i$ -ésimo tratamiento,  $\mu$  representa la media poblacional,  $\tau_i$  es el efecto del  $i$ -ésima familia y  $\varepsilon_{ij}$  es la componente aleatoria correspondiente a la  $j$ -ésima observación del  $i$ -ésima familia. En el cuadro 4 se detallan los componentes de la partición del ANOVA, donde:  $f$  es el número de familias incluidas en el ensayo y  $n$  el número de plantas evaluadas por FMH. Este análisis estadístico se aplicó a la variabilidad genética de las variables evaluadas en invernáculo en la etapa de estudio A.

Fuente de Variación	GL	CM	E(CM)
Familias	(f-1)	CMf	$\sigma^2 + n\sigma_f^2$
Error	f (n-1)	CMe	$\sigma^2$

Aclaraciones: Fuentes de variación, grados de libertad (GL), y esperanza de los cuadrados medios E (CM), para cada componente de variancia en el análisis de la variabilidad entre familias.

**Cuadro 4.** Tabla de partición ANOVA del ensayo de invernáculo

Para las variables evaluadas a campo, el modelo estadístico lineal utilizado fue:

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:  $Y_{ijk}$  es la observación  $k$ -ésima debido al  $i$ -ésima familia del  $j$ -ésimo bloque,  $\mu$  representa la media poblacional,  $\tau_i$  es el efecto de la  $i$ -ésima familia,  $\beta_j$  es el efecto del  $j$ -ésimo bloque,  $\varepsilon_{ijk}$  es el término de error de la  $ijk$  observación. En el cuadro 5 se detallan los componentes de la partición del ANOVA, donde:  $r$ = número de repeticiones o bloques,  $f$ = número de familias,  $\sigma_e^2$ = variancia del error

que expresa la variación ambiental entre parcelas y  $\sigma_g^2$  = variancia genética entre las familias de medios hermanos.

Fuente de Variación	GL	CM	E (CM)
<b>Bloques</b>	(r-1)	CMr	
<b>FMH</b>	(f-1)	CMf	$\sigma_e^2 + r \sigma_g^2$
<b>Error</b>	(f-1) (r-1)	CMe	$\sigma_e^2$

**Cuadro 5.** Tabla de partición del ANOVA para el ensayo a campo

En los casos en que se detectaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre las familias se aplicó la *Prueba t* para la diferencia mínima significativa (LSD, *least significant difference*) mediante el procedimiento ANOVA, con el objetivo de detectar qué familias difirieron significativamente en la media de los caracteres evaluados.

Como consecuencia de la mortandad ocurrida, para analizar los caracteres evaluados posteriormente al 16/10, se tomaron 16 plantas/FMH, divididas en dos repeticiones, exceptuando la FMH 691 que totalizó 15 plantas y la FMH 1897 que presentó 11 plantas al 8/11, resultando un total de 122 genotipos. Se aplicó el procedimiento proc GLM del programa estadístico SAS 9.1.

### 2.3-1.3. *Estimación de los componentes de variancia y parámetros genéticos*

Los componentes de variancia para cada variable se estimaron a partir de las esperanzas de los cuadrados medios (E (CM)) obtenidas en las tablas de análisis de variancia (Cuadros 4 o 5). Una vez obtenidas las estimaciones de los componentes de variancia se estimó la heredabilidad en sentido estricto ( $h^2$ ) a partir de la siguiente fórmula:

$$h^2_{PFM} = \frac{\sigma_g^2}{\sigma_e^2 + \sigma_g^2}$$

Donde:

$\sigma_g^2$  es la variancia genética existente entre las familias de medios hermanos y surge de:

$$\sigma_g^2 = (CMf - CMe) / r$$

$\sigma_e^2$  es la variancia del error que expresa la variación ambiental entre parcelas y es igual a  $CMe$

#### 2.3-1.4. Asociación lineal

La asociación entre dos caracteres que pueden ser directamente observados es la correlación de valores fenotípicos o correlación fenotípica. Esta se determina para conocer el grado de asociación entre los caracteres, para ser utilizados en futuros procesos de selección. Para esta estimación se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson que es una medida de la magnitud de la asociación lineal entre dos variables que no depende de las unidades de medida de las variables originales. Para las variables j-ésima y k-ésima se define como:

$$r_{jk} = \frac{S_{jk}}{\sqrt{S_j^2 S_k^2}} = \frac{\left( \sum_{i=1}^n (x_{ij} - \bar{x}_j)(x_{ik} - \bar{x}_k) \right) / (n-1)}{\sqrt{\left( \left( \sum_{i=1}^n (x_{ij} - \bar{x}_j)^2 \right) / (n-1) \right) \left( \left( \sum_{i=1}^n (x_{ik} - \bar{x}_k)^2 \right) / (n-1) \right)}}$$

donde  $S_{jk}$  es la covariancia entre la variable j y la variable k,  $S_j^2$  y  $S_k^2$  son las variancias de las variables j y k respectivamente.

#### 2.3-1.5. Análisis multivariado

Con los datos obtenidos de las variables, se decidió aplicar un análisis de componentes principales (ACP). Este análisis se basa en la transformación de un conjunto de variables cuantitativas originales en otro conjunto de variables independientes no correlacionadas, llamadas componentes principales. El objetivo de este análisis es poder condensar la información obtenida,

en unas pocas componentes principales que expliquen la mayor variabilidad posible. El mismo se realizó mediante Análisis de Componentes Principales del paquete estadístico Infostat 2.0.

### **2.3-2. Análisis de la información generada en la etapa de laboratorio**

A partir de los alelos identificados se construyó una Matriz Básica de Datos (MBD) computando la presencia/ausencia de banda o alelo, mediante 1 y 0 respectivamente. Se consideró que se trata de marcadores codominantes.

Se calcularon los siguientes parámetros utilizando el programa estadístico Info-Gen (Balzarini y Di Rienzo, 2004).

#### **2.3-2.1. Número de alelos por locus**

El número de alelos se determinó por conteo directo.

#### **2.3-2.2. Frecuencias alélicas**

La frecuencia de un alelo en una FMH consiste en la proporción de dicho alelo en un locus dado, en una FMH específica. Es el número de veces que aparece el alelo dividido el número total de alelos presentes en la FMH.

Para un locus y para cada alelo la frecuencia es igual a:

$$\text{Frecuencia alelo } i = \frac{2N_{ii} + N_{ij}}{2N}$$

Donde:

$N_{ii}$ = número de individuos homocigotas xx

$N_{ij}$ = número de individuos heterocigotos, donde y puede ser cualquier otro alelo

$N$ = número de individuos

### 2.3-2.3. *Heterocigosis*

Una medida simple de variación genética en una población es la proporción de individuos heterocigotas observados. La heterocigosis observada ( $H_o$ ) de un locus estima la probabilidad de que un individuo sea heterocigota para ese locus en la población.

Se calculó la heterocigosis por conteo directo, determinando la proporción de individuos muestreados que son heterocigotas:

$$H_o = \frac{\text{N}^\circ \text{ de Heterocigotas}}{N}$$

### 2.3-2.4. *Contenido de información polimórfica*

El índice de Contenido de Información Polimórfica (PIC) expresa el grado de polimorfismo capaz de ser detectado por un determinado marcador molecular (Powell *et al.*, 1996). Cuando un locus o marcador es monomórfico, el valor de PIC es igual a cero, mientras que si es altamente discriminativo tenderá a uno, es decir que presentará muchos alelos en igual frecuencia. El PIC fue calculado como:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k 2p_i^2 p_j^2$$

Donde  $p_i$  es la frecuencia del  $i$ -ésimo alelo,  $p_j$  la frecuencia del  $j$ -ésimo alelo y  $k$  es el número de alelos.

### 2.3-2.5. *Número de alelos efectivos por locus*

Se calcula como el recíproco de la suma de frecuencias alélicas al cuadrado para el locus en cuestión:

$$\frac{1}{\sum_{i=1}^l p_i^2}$$

Donde  $p_i$  es la frecuencia del  $i$ -ésimo alelo.

### 2.3-2.6. *Relación genética entre FMH*

Se construyó la matriz de similitud utilizando el coeficiente de similitud de Jaccard (Jaccard, 1908 citado por Savo Sardaro, 2008), que permite estimar el nivel de semejanza genética entre las distintas FMH:

$$J_{ij} = \frac{a}{a+b+c}$$

donde  $a$  representa el número de alelos compartidos,  $b$  representa el número de alelos presentes en la FMH $_i$  y ausentes en la FMH $_j$  y  $c$  representa el número de alelos ausentes en la FMH $_i$  presentes en la  $j$ .

Por tratarse de datos binarios, se transformó el coeficiente utilizando la función  $D = \sqrt{1-S}$  para expresarlo como una métrica de similitud como una métrica de distancia. Los valores obtenidos varían entre 0 (máxima similitud) y 1 (mínima similitud).

La matriz de distancia resultante se utilizó para el análisis de Cluster jerárquico (o análisis de conglomerados) con criterio de agrupamiento UPGMA (*Unweighted Pair Group Arithmetic Average Method*). El objetivo de este análisis, es formar grupos tal que los elementos de un grupo presenten más parecido entre sí que con los elementos de otro grupo. Los agrupamientos fueron visualizados en un dendrograma.

### 2.3-2.7. *Análisis Molecular de la Variancia (AMOVA)*

El *Analysis of Molecular Variance* – AMOVA- (Excoffier *et al.*, 1992), es un método para estimar la diferenciación de una población directamente de datos moleculares y evaluando hipótesis sobre esa diferenciación. Es un método de partición de sumas de cuadrados, en el contexto de información molecular multivariada. En este análisis, las sumas de cuadrados se obtienen a partir de

la matriz de distancias entre todos los pares de muestras, siendo definidas como la sumatoria de las distancias al cuadrado entre todos los pares de observaciones. Estas sumas de cuadrados pueden ser analizadas en el marco de un análisis anidado de varianza. En los análisis anidados los datos son agrupados jerárquicamente y los cuadrados medios son computados por agrupamientos a todos los niveles de la jerarquía. Se puede entonces evaluar hipótesis sobre diferencias entre grupos y dentro de grupos a distintos niveles jerárquicos.

En este trabajo, se estudió la distribución de la variabilidad teniendo en cuenta dos factores: comportamiento ante estrés salino y relación genética (a través de FMH), estimando la variancia de los componentes intrafamiliares e interfamiliares mediante el AMOVA.

El modelo lineal utilizado fue:

$$p_{ikj} = p + A_i + A > B_{k[i]} + \omega_{ikj}$$

donde  $p_{ikj}$  es el perfil (constitución genética a lo largo de los *loci* o genotipo) del j-ésimo elemento individual (planta) en la i-ésima clase del factor A (comportamiento ante estrés salino) de la k-ésima clase del factor B (FMH, familia de medios hermanos) y  $p$  el perfil (genotipo) esperado.

La variancia total  $\sigma^2$  es la suma de componentes de variación asociados a cada efecto:

$$\sigma^2 = \sigma_A^2 + \sigma_{A>B}^2 + \sigma_w^2$$

donde  $\sigma_w^2$  es la variabilidad entre individuos dentro de una misma FMH,  $\sigma_{A>B}^2$  es la variancia entre distintas FMH pero de un mismo comportamiento a salinidad y  $\sigma_A^2$  es la variancia entre FMH de distinto comportamiento a salinidad.

$$\sigma^2 = \sigma_A^2 + \sigma_{A>B}^2 + \sigma_w^2$$

Se realizó otro AMOVA sin tener en cuenta la selección por estrés, cuyo modelo lineal fue:

$$p_{ij} = p + B_i + \omega_{ij}$$

donde  $p_{ij}$  es el genotipo de la  $j$ -ésima planta en la  $i$ -ésima clase de FMH y  $p$  genotipo esperado.

La variancia total  $\sigma^2$  es:

$$\sigma^2 = \sigma_B^2 + \sigma_w^2$$

donde  $\sigma_w^2$  es la variabilidad entre individuos dentro de una misma FMH y  $\sigma_B^2$  es la variancia entre distintas FMH.

### **2.3-2.8. *Análisis de Coordenadas Principales (ACoorP)***

El Análisis de Coordenadas Principales (ACoorP), también conocido como escalamiento multidimensional métrico (EMD) es una técnica multivariada de reducción de dimensión (TRD) aplicable a datos provenientes de marcadores moleculares que opera sobre una matriz de distancias, por lo que es conveniente utilizarlo cuando los datos son de naturaleza binaria. Los resultados se representan en un *Biplot*.

### **2.3-3. Análisis conjunto de la Caracterización Agronómica y la Caracterización Molecular**

El objetivo de realizar el análisis conjunto de los caracteres agronómicos y moleculares, fue determinar las posibles relaciones existentes entre ambos en aquellas FMH que se analizaron con ambas caracterizaciones. Para ello se realizó el Análisis de Procrustes Generalizados (Gower, 1975) que permite utilizar para cada tipo de variable una medida de distancia y un método de ordenación particular, obteniendo tantas configuraciones de individuos como fueran necesarias, para luego promediarlas en una única configuración denominada configuración de consenso (Bramardi, 2000). De esta forma se obtuvo un dato consenso entre los datos moleculares y los agronómicos para cada población, como también su dispersión desde el punto consenso. Los datos fueron analizados mediante el programa Info-Gen.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se conoce que la germinación y el crecimiento vegetativo temprano de las plántulas son las etapas más sensibles al estrés salino en la mayoría de las especies vegetales en comparación con las etapas de crecimiento más avanzadas (Ashraf *et al.*, 1986, 1994). Por lo tanto, la evaluación de germoplasma de una especie en las fases de desarrollo tempranas puede llevar a descubrir genotipos tolerantes a la salinidad en etapas de crecimiento posteriores, si el grado de tolerancia se mantiene constante a lo largo de su ciclo de vida.

La validación a campo de los resultados obtenidos en etapas tempranas de crecimiento de cualquier especie, en particular en condiciones controladas, es una exigencia experimental central, para la toma de decisiones en programas de mejoramiento genético.

En el presente estudio, las familias de medios hermanos de *Lotus tenuis* evaluadas provenían de selecciones previas por tolerancia a salinidad, en etapas tempranas de crecimiento y no habían sido sometidas a condición de crecimiento a campo en suelo con restricciones sódicas. Por lo tanto surge la necesidad de establecer la caracterización morfo-fisiológica y molecular de dichas familias, en condiciones experimentales cercanas a las condiciones reales de uso de la especie, con el objetivo de detectar la presencia de variabilidad genética y las posibilidades de aplicar selección.

### **3.1- Caracterización morfo-fisiológica**

#### **3.1-1. El origen de las familias de medios hermanos estudiadas**

De acuerdo a los resultados obtenidos por Franco (2014), las siete familias intervinientes en el presente estudio se distinguieron por su tolerancia a salinidad y comportamiento agronómico deseable, en suelo sin restricciones. La familia 1193 fue una de las familias más promisorias para incorporar al programa de mejoramiento de la especie. Además, otras familias se destacaron en distintos aspectos tales como la 685 y la 2241 con alta tolerancia en la fase de germinación; la 1897 combinó alta tolerancia en la fase de crecimiento vegetativo y alta capacidad de establecimiento y

nivel de productividad a campo; las familia 691 mostró tolerancia incrementada a la salinidad durante la fase de crecimiento vegetativo, combinado con elevada capacidad de establecimiento a campo; la 2241 se destacó en condiciones ambientales sin restricciones por sus buenas características agronómicas; la 447 fue superior en tolerancia a salinidad y elevado crecimiento; y la familia 490 fue de vigor aceptable, menor tolerancia a salinidad, pero con elevada productividad de materia seca. Según Franco (2014) todas estas familias podrían proporcionar fuentes de genes para el mejoramiento de caracteres relacionados al vigor inicial, la productividad forrajera y de semilla y para tolerancia incrementada a la salinidad. A corto plazo, la siembra de variedades que combinen estas características puede resultar exitosa debido a la alta variabilidad espacio-temporal que caracteriza a los suelos propios de las regiones “objetivo”.

### **3.1-2. Variabilidad genética entre Familias**

El punto de inicio de cualquier programa de mejora es examinar la variación presente en el germoplasma disponible. Las especies alógamas, entre las cuales se incluyen la mayoría de las forrajeras de clima templado como *Lotus tenuis* presentan un alto grado de variabilidad morfo-genética entre poblaciones y dentro de ellas (Tyler *et al.*, 1987; Schultze-Kraft, 1990). Los resultados obtenidos permitieron detectar variabilidad genética entre las familias de *Lotus tenuis* en estudio para los caracteres evaluados en invernáculo y a campo (Cuadro 7), coincidiendo con la variabilidad hallada por otros autores en poblaciones naturalizadas (León, 1975; Stoffella *et al.*, 1998; Kade *et al.*, 2000; Andrés y Rosso, 2007; Ixtaina y Mujica, 2010), poblaciones mejoradas (Colares *et al.*, 1999) y en familias de medios hermanos (Franco, 2014).

Los caracteres estudiados estuvieron agrupados por el vigor de crecimiento, el diámetro de planta y el número de tallos vegetativos, registrados en diferentes fechas a lo largo del ciclo de crecimiento del cultivo.

### 3.1-3. Caracteres evaluados

En el cuadro 6 se presenta el comportamiento del análisis conjunto de las 7 FMH de *Lotus tenuis* y el testigo comercial: media, desvío estándar, máximo, mínimo y coeficiente de variación para todos los caracteres estudiados. En el Cuadro 7, se observa el comportamiento promedio de las 7 FMH de *Lotus tenuis* y el testigo comercial para estos caracteres y la significancia estadística asociada a la diferencia de medias familiares. Se detectaron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) para todas las variables analizadas.

Variable	Media	D.E.	CV	Máx.	Mín.
V0 (escala 1-4)	3,01	0,78	25,79	4,00	1,00
V1 (escala 1-4)	2,37	1,05	44,28	4,00	1,00
NTV1(tallos/pl)	8,19	2,68	32,69	18,00	2,00
D1 (cm)	19,31	5,82	30,14	37,60	6,00
V2 (escala 1-4)	1,92	0,70	36,48	4,00	1,00
NTV2(tallos/pl)	18,46	9,03	48,91	63,00	1,00
D2 (cm)	19,75	8,50	43,02	54,00	2,00
V3 (escala 1-4)	1,60	0,90	56,11	4,00	1,00
NTV3(tallos/pl)	33,62	32,29	96,03	148,00	1,00
D3 (cm)	29,62	19,33	65,25	120,00	2,00

**Cuadro 6.** Comportamiento promedio de las 7 FMH de *Lotus tenuis* y el testigo comercial evaluados en condiciones de planta aislada en la EEA Pergamino. Media, desvío estándar, máximo, mínimo y coeficiente de variación.

<b>FMH</b>	<b>V0 (escala 1-4)</b>	<b>V1 (escala 1-4)</b>	<b>NTV1 (tallos/pl)</b>	<b>D1 (cm)</b>	<b>V2 (escala 1-4)</b>	<b>NTV2 (tallos/pl)</b>	<b>D2 (cm)</b>	<b>V3 (escala 1-4)</b>	<b>NTV3 (tallos/pl)</b>	<b>D3 (cm)</b>
<b>447</b>	3,10	2,11	7,60	18,17	2,04	17,37	17,56	1,62	30,12	26,62
<b>490</b>	3,10	2,33	8,09	18,80	1,87	20,67	22,67	1,81	41,12	39,06
<b>685</b>	2,60	2,33	8,71	19,44	2,02	18,10	21,12	1,50	22,88	24,81
<b>691</b>	3,10	2,53	8,78	20,09	1,73	18,57	16,84	1,00	14,00	15,73
<b>1193</b>	3,45	3,09	8,84	21,97	2,40	24,46	23,24	2,00	61,62	41,56
<b>1897</b>	3,35	2,51	8,44	18,36	1,82	13,51	18,05	1,27	20,00	18,09
<b>2241</b>	2,30	1,58	7,27	15,72	1,40	12,63	13,34	1,50	27,62	30,25
<b>Testigo</b>	3,10	2,49	7,75	21,91	2,04	21,41	23,87	1,94	46,12	36,38
<b>Media</b>	3,01	2,37	8,19	19,31	1,92	18,46	19,75	1,60	33,62	29,62
<b>CV</b>	25,79	44,28	32,69	30,14	36,48	48,91	43,02	56,11	96,03	65,25
<b>Pr&gt;F</b>	<0,0001	<0,0001	0,0217	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,033	0,0003	0,0003
<b>LSD(0,05)</b>	0,44	0,40	1,08	2,29	0,27	3,62	3,49	0,63	21,48	12,72

**Cuadro 7.** Medias, coeficientes de variación, nivel de significancia (Pr>F) y diferencias mínimas significativas (0,05) de las FMH de *Lotus tenuis* y el testigo comercial, evaluados en condiciones de planta aislada en la EEA Pergamino.

### 3.1-3.1. *Sobrevivencia*

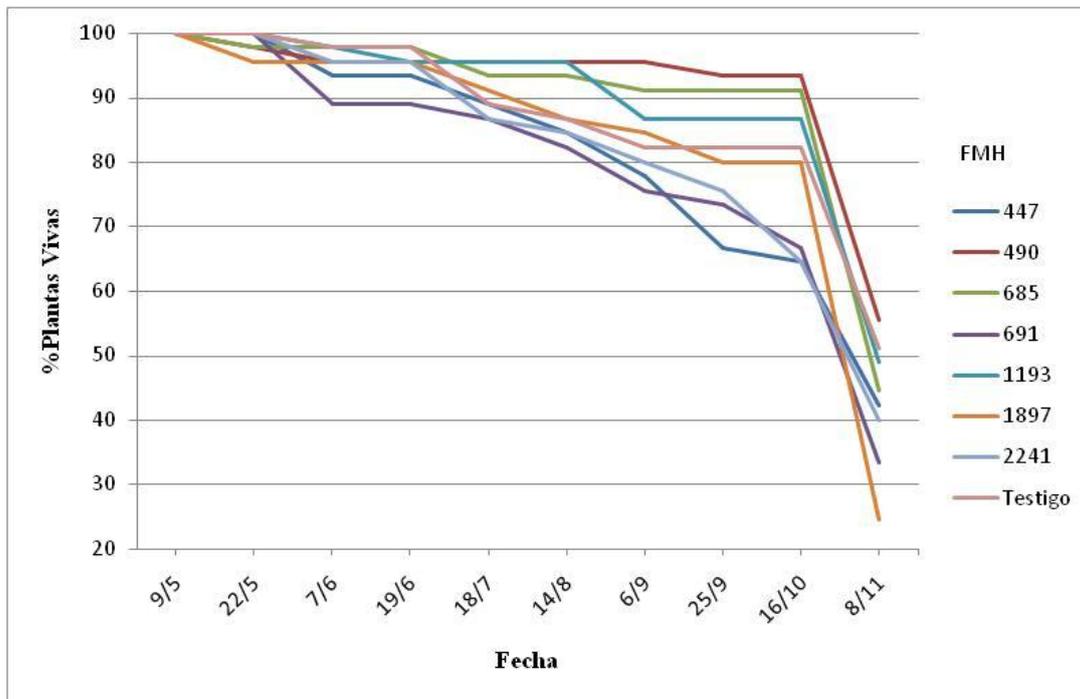
La sobrevivencia de cualquier especie vegetal está asociada a aspectos de adaptación al ambiente que deben enfrentar los genotipos que la componen. Esta sobrevivencia se traduce en número de plantas y posteriormente en producción de materia seca y de semillas, por lo tanto son caracteres de alta importancia en el mejoramiento de forrajeras. El patrón estacional de crecimiento de *Lotus tenuis* es primavero-estivo-otoñal, presentando variaciones en la producción total de forraje de acuerdo a las condiciones ambientales, tanto climáticas como edáficas, la edad de la pastura y el manejo de la defoliación. En general la distribución estacional de la producción de materia seca de la especie muestra un marcado pico primaveral salvo en el año de implantación donde la máxima tasa de crecimiento se observa en el fin de primavera principio de verano (Formoso, 1993).

En el presente trabajo la sobrevivencia varió acorde al tiempo transcurrido desde el trasplante hasta el fin de ciclo del cultivo. En el cuadro 8 se presenta la Sobrevivencia, medida como porcentaje de plantas vivas sobre el total de plantas trasplantadas por FMH, de las 7 FMH de *Lotus tenuis* y el testigo comercial.

FMH	09/May	22/May	07/Jun	19/Jun	18/Jul	14/Ago	06/Sep	25/Sep	16/Oct	08/Nov
447	100,00	100,00	93,33	93,33	88,89	84,44	77,78	66,67	64,44	42,22
490	100,00	97,78	95,56	95,56	95,56	95,56	95,56	93,33	93,33	55,56
685	100,00	97,78	97,78	97,78	93,33	93,33	91,11	91,11	91,11	44,44
691	100,00	100,00	88,89	88,89	86,67	82,22	75,55	73,33	66,67	33,33
1193	100,00	100,00	97,78	95,56	95,56	95,56	86,67	86,67	86,67	48,89
1897	100,00	95,56	95,56	95,56	91,11	86,67	84,44	80,00	80,00	24,44
2241	100,00	100,00	95,56	95,56	86,67	84,44	80,00	75,56	64,44	40,00
Testigo	100,00	100,00	97,78	97,78	88,89	86,66	82,22	82,22	82,22	51,11

**Cuadro 8.** Sobrevivencia (% de plantas vivas) de las FMH de *Lotus tenuis* y el testigo comercial, medida en 10 fechas desde el trasplante.

. En la figura 6 puede observarse una gran disminución en la Sobrevivencia de todos los materiales evaluados, ocurrida entre el 16/10 y el 8/11.



**Figura 6.** Supervivencia (% de plantas vivas) de las FMH de *Lotus tenuis* y el testigo comercial, medida en 10 fechas desde el trasplante.

Si bien el trasplante de los genotipos se realizó con éxito, y la mortandad registrada durante los 5 primeros meses fue la esperada (19%), la mayor pérdida de plantas (57,5%) se produjo a partir del 16/10. Las posibles causas de mortandad inicial pudieron estar asociadas a bajas precipitaciones y bajas temperaturas registradas durante el invierno (Figura 4). Entre los meses de octubre y noviembre, la mortandad aumentó drásticamente, con un marcado exceso de precipitaciones que pudieron generar anoxia y alterar la concentración de sales en el suelo.

Según Lavado (2008) los suelos afectados por sales en ambientes húmedos en la Argentina, presentan un balance hídrico positivo y se caracterizan por la presencia de napas freáticas cercanas a la superficie. Son en general suelos con grandes dificultades para ser utilizados en agricultura, e inclusive están sujetos a inundaciones, por lo que se dedican fundamentalmente a pastoreo. Algunos de estos suelos tienen baja salinidad, pero en algunos momentos del año el nivel salino sube por ascenso capilar. Además de estos episódicos puntos de salinidad, el principal problema de esos suelos desde el punto de vista productivo son sus pobres propiedades físicas, causadas por el

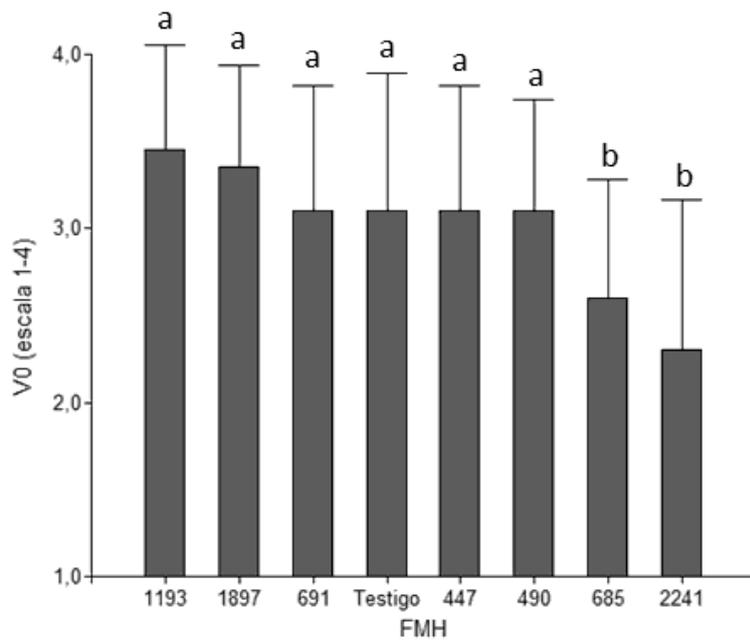
nivel de sodicidad presente, y periódicas condiciones de anoxia causadas por el exceso de agua no drenada. En el presente estudio, estas pudieron ser las causas de la mortandad observada en los genotipos integrantes de las familias entre los meses de octubre y noviembre.

### 3.1-3.2. *Vigor de planta*

El éxito de implantación de *Lotus tenuis* se encuentra severamente restringido por la escasa habilidad competitiva de sus plántulas, sobre todo si se desea su incorporación por interseembra para la mejora de pastizales naturales o bien en siembras de pasturas consociadas. Esto indica que el manejo agronómico y la mejora genética del carácter vigor de plantas en fases de desarrollo tempranas son importantes para mejorar la capacidad de establecimiento de *L. tenuis*. Se ha detectado en esta especie variabilidad inter e intra-poblacional para el vigor de plántula y caracteres vinculados a éste en poblaciones mejoradas (Colares *et al.*, 1999) y naturales de *L. tenuis* (Ixtaina y Mujica, 2003; Andrés y Rosso, 2007) e interacción poblaciones x ambientes para el mismo carácter (Ixtaina y Mujica, 2003; Ixtaina y Mujica, 2009).

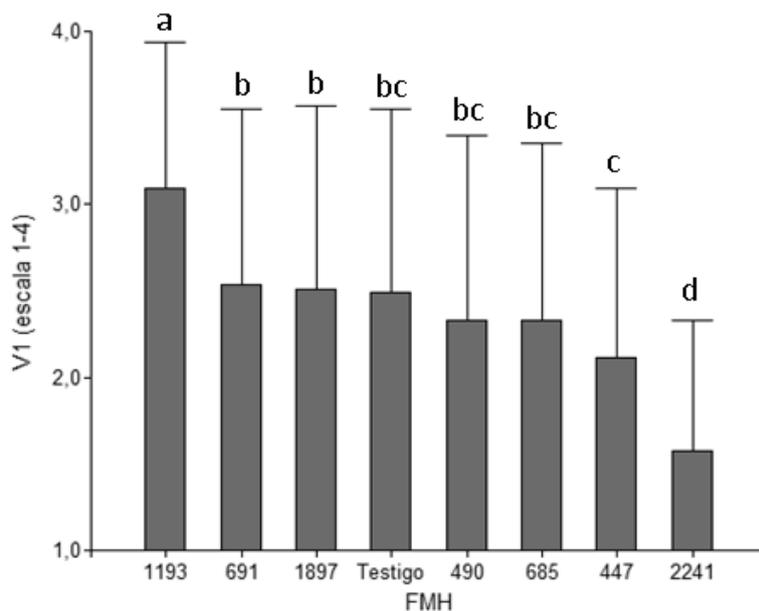
En el presente estudio el vigor de planta promedio entre todas las FMH fue calificado como bueno en la condición de invernáculo (V0), de regular a bueno en la condición a campo en la primera fecha (V1) y de malo a regular en la segunda y tercera fecha (V2 y V3) (Cuadro 6). Se detectaron diferencias entre las FMH (Cuadro 7) en todos los casos.

En condición de invernáculo (V0) se observaron dos grupos de FMH, el primero con un vigor bueno a muy bueno, y el segundo con un vigor regular a bueno (Figura 7). El vigor promedio de todas las FMH fue de 3,01 y se detectaron diferencias altamente significativas ( $P < 0,0001$ ) entre ellas (Cuadro 7). Las familias destacadas fueron la 1193, 1897, 691, 447 y 490.



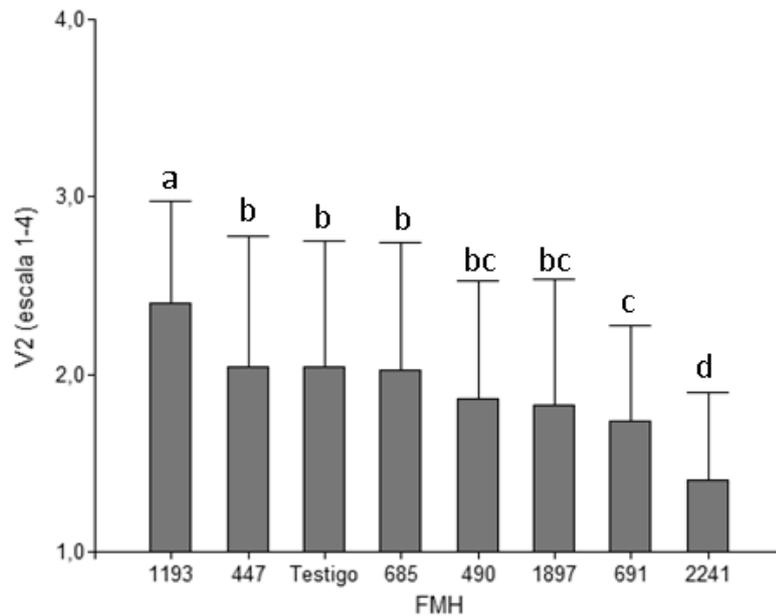
**Figura 7.** Vigor inicial promedio de los 8 materiales, medido en invernáculo. Letras distintas indican diferencias significativas al 0,05 (Prueba LSD). Las barras verticales representan a las medias  $\pm$  D.E.

El vigor de planta promedio de todas las FMH medido a campo el 30/04 (V1) fue de 2,37, detectándose diferencias altamente significativas ( $P < 0,0001$ ) entre ellas (Cuadro 7). La FMH de mayor vigor en esta fecha fue la 1193 y la de menor vigor la 2241 (Figura 8).



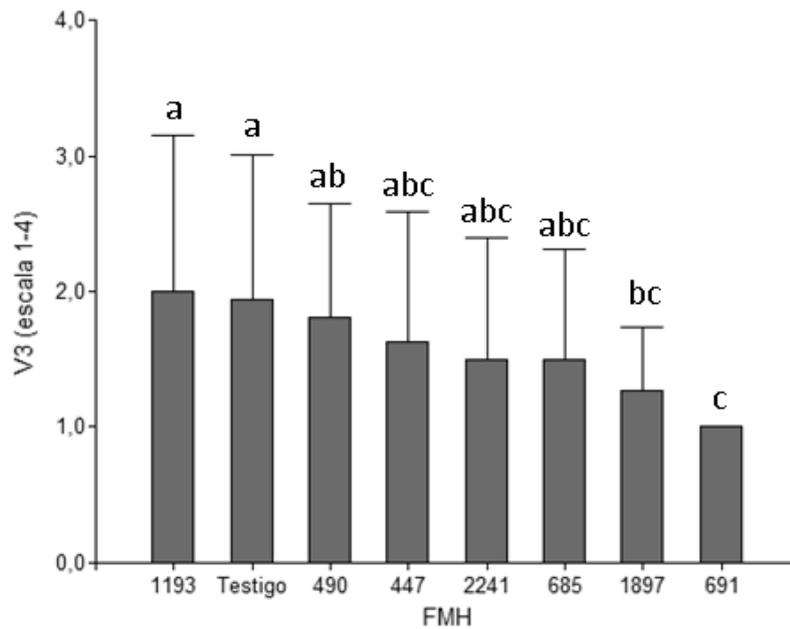
**Figura 8.** Vigor promedio de los 8 materiales, medido a campo a los 14 días del trasplante. Letras distintas indican diferencias significativas al 0,05 (Prueba LSD). Las barras verticales representan a las medias  $\pm$  D.E.

El vigor de planta promedio de todas las FMH medido a campo el 22/05 (V2) fue de 1,92, detectándose diferencias altamente significativas ( $P < 0,0001$ ) entre ellas (Cuadro 7). Al igual que en la primera fecha, la FMH de mayor vigor fue la 1193 y la de menor vigor la 2241 (Figura 9).



**Figura 9.** Vigor promedio de los 8 materiales, medido a campo a los 36 días del trasplante. Letras distintas indican diferencias significativas al 0,05 (Prueba LSD). Las barras verticales representan a las medias  $\pm$  D.E.

Para la tercera fecha (12/11), el vigor de planta (V3) promedio entre las FMH fue de 1,60, detectándose diferencias significativas ( $P = 0,033$ ) entre ellas. La FMH de mayor vigor en esta fecha fue la 1193 y la de menor vigor la 691 (Figura 10).



**Figura 10.** Vigor promedio de los 8 materiales, medido a campo a los 210 días del trasplante. Letras distintas indican diferencias significativas al 0,05 (Prueba LSD). Las barras verticales representan a las medias  $\pm$  D.E.

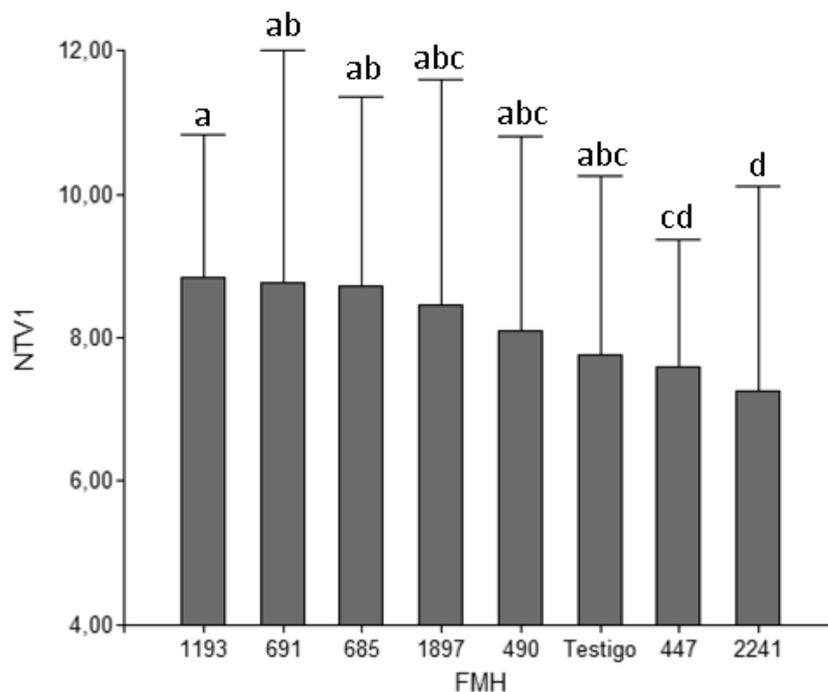
La variabilidad en el vigor de planta hallada coincide con lo encontrado por otros autores (Colares *et al.*, 1999; Ixtaina y Mujica, 2003; Andrés y Rosso, 2007; Ixtaina y Mujica, 2009; Franco, 2014). En particular, el elevado vigor de la FMH 1193 comprobado en este estudio, es coincidente con los resultados obtenidos por Franco (2014), tanto en hidroponia como en condiciones de campo sin restricciones.

### 3.1-3.3. *Número de tallos vegetativos*

El número de tallos en la corona es un componente estratégico en la ocupación inicial del espacio aéreo y por lo tanto está íntimamente asociado al vigor de las plántulas (Mujica y Rumi, 1998; Ixtaina y Mujica, 2009). Según Busqué *et al.* (1999), la densidad de tallos asociada con alguna variable indicadora de su tamaño promedio, puede considerarse como la medida más objetiva de vigor o persistencia de la especie en la pastura. Asimismo, Newman y Delgado (1999) plantean que entre otros componentes de la arquitectura de especies forrajeras, el número de hojas y número de tallos dependen del genotipo y de los factores ecológicos a los cuales están expuestas.

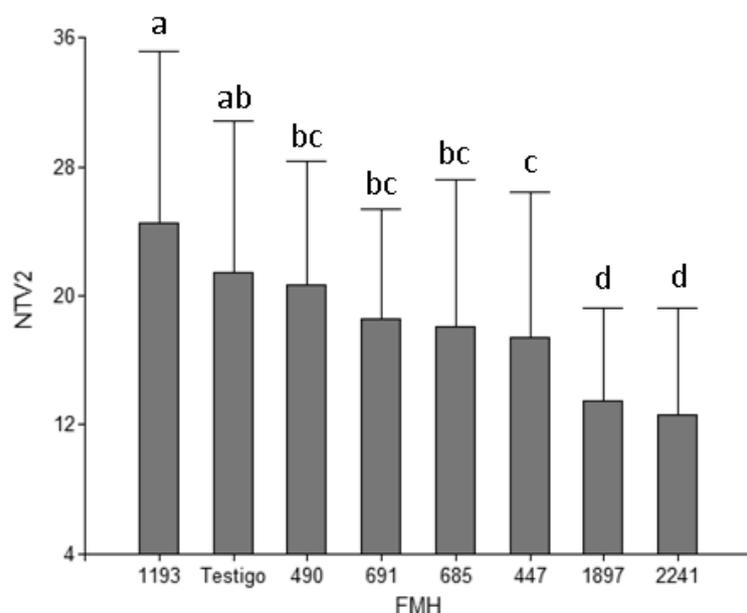
El número de tallos vegetativos promedio de todas las FMH medido a campo el 9/05 (NTV1) fue de 8,19 (Rango 2 a 18), de 18,46 (Rango 1 a 63) el 14/8 (NTV2) y de 33,62 (Rango 1 a 148) el 12/11 (NTV3) (Cuadro 6), y se detectaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre las FMH (Cuadro 7) para todos los casos.

En la primera fecha (NTV1), se detectaron diferencias significativas ( $P = 0,0217$ ) entre las FMH (Cuadro 7). La FMH de mayor NTV fue la 1193 y la de menor NTV la 2241 (Figura 11).



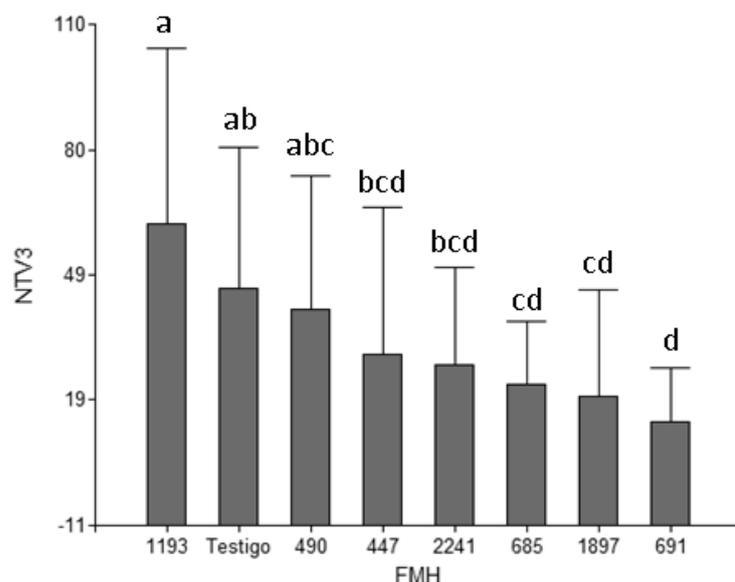
**Figura 11.** NTV promedio de los 8 materiales, medido a campo a los 23 días del trasplante. Letras distintas indican diferencias significativas al 0,05 (Prueba LSD). Las barras verticales representan a las medias  $\pm$  D.E.

En la segunda fecha (NTV2), se detectaron diferencias significativas ( $P < 0,0001$ ) entre las FMH (Cuadro 7). Coincidiendo con la primera fecha, la FMH de mayor NTV fue la 1193. Las de menor NTV fueron la 1897 y la 2241 (Figura 12).



**Figura 12.** NTV promedio de los 8 materiales, medido a campo a los 120 días del trasplante. Letras distintas indican diferencias significativas al 0,05 (Prueba LSD). Las barras verticales representan a las medias  $\pm$  D.E.

En la tercera fecha de medición, se detectaron diferencias significativas entre las FMH ( $P=0,0003$ ) para el número de tallos vegetativos (NTV3) (Cuadro 7). Nuevamente, la FMH que mayor NTV presentó fue la 1193. La FMH de menor NTV en esta fecha fue la 691 (Figura 13).



**Figura 13.** NTV promedio de los 8 materiales, medido a campo a los 210 días del trasplante. Letras distintas indican diferencias significativas al 0,05 (Prueba LSD). Las barras verticales representan a las medias  $\pm$  D.E.

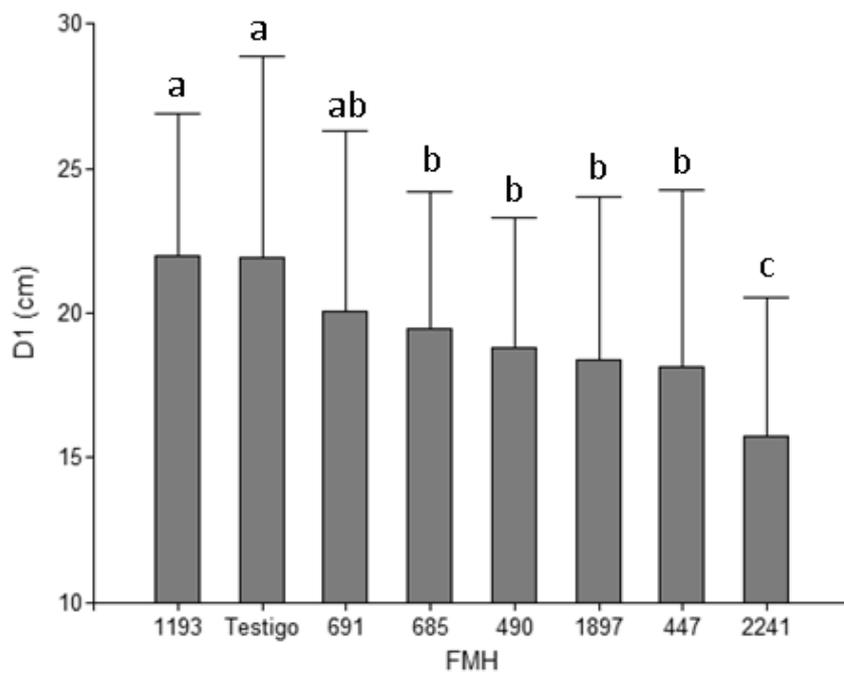
La variabilidad en el número de tallos vegetativos hallada coincide con lo encontrado por otros autores trabajando con poblaciones naturalizadas (León, 1975; Stoffella *et al.*, 1998; Kade *et al.*, 2000; Andrés y Rosso, 2007; Ixtaina y Mujica, 2010) y familias de medios hermanos (Franco, 2014).

### **3.1-3.4. Diámetro de planta**

La estructura del canopeo en plantas forrajeras está determinada por el hábito de crecimiento o porte y por el diámetro de la planta y condiciona el manejo de las pasturas (Pearson e Ison, 1994). En poblaciones bajo pastoreo la intensidad y frecuencia de defoliación y la competencia (Snaydon, 1978), son factores que afectan la persistencia y/o fecundidad de individuos de distinto hábito de crecimiento.

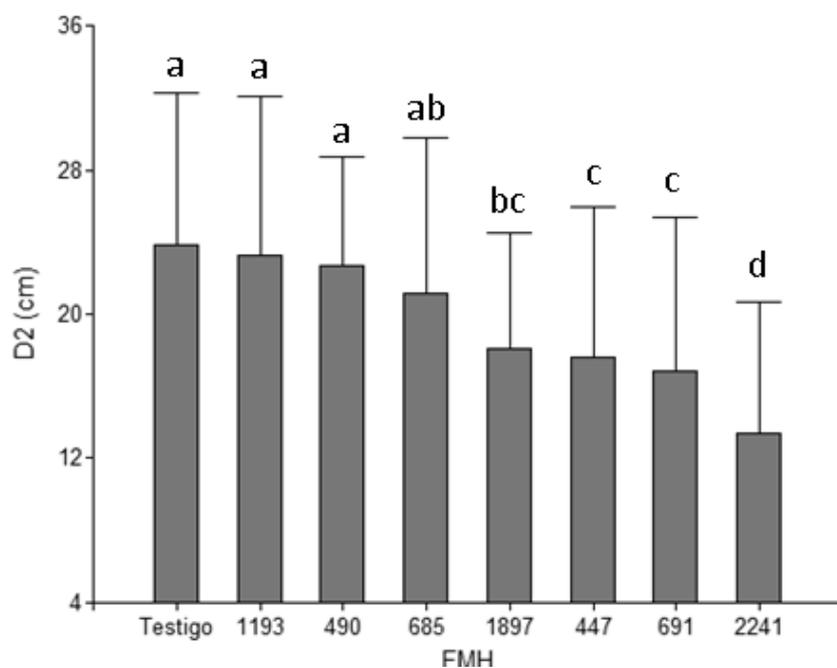
El diámetro promedio de todas las FMH medido a campo el 22/05 (D1) fue de 19,31 (Rango 6 a 37,6), de 19,75 (Rango 2 a 54) el 6/9 (D2) y de 29,62 (Rango 2 a 120) el 12/11 (D3) (Cuadro 6), y se detectaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre las FMH (Cuadro 7) para todos los casos.

En la primera fecha (D1), se detectaron diferencias significativas ( $P < 0,0001$ ) entre las FMH (Cuadro 7). La FMH de mayor diámetro fue la 1193 y la de menor diámetro la 2241 (Figura 14).



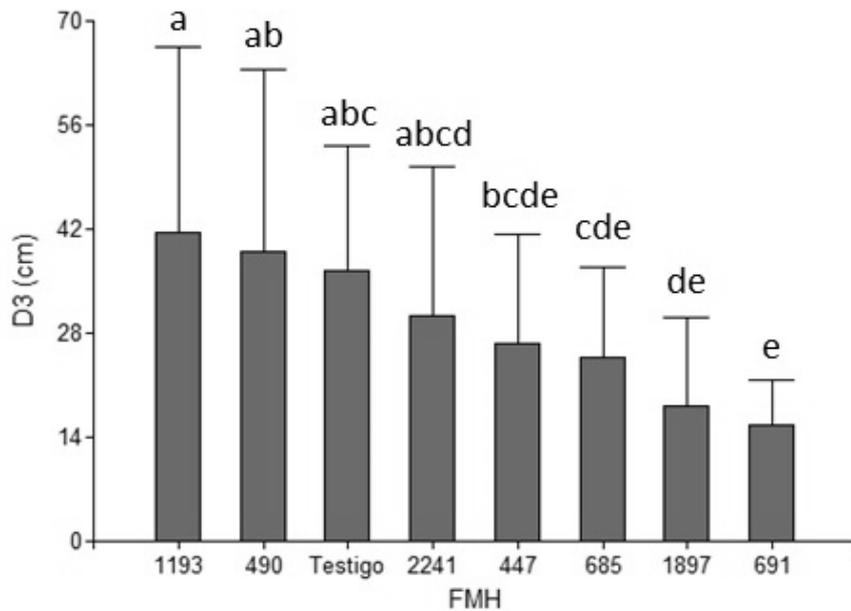
**Figura 14.** Diámetro (D) promedio de los 8 materiales, medido a campo a los 36 días del trasplante. Letras distintas indican diferencias significativas al 0,05 (Prueba LSD). Las barras verticales representan a las medias  $\pm$  D.E.

En la segunda fecha (D2), se detectaron diferencias significativas ( $P < 0,0001$ ) entre las FMH (Cuadro 7). En esta medición, las FMH de mayor diámetro fueron la 1193 y la 490. La de menor diámetro fue la 2241 (Figura 15).



**Figura 15.** Diámetro (D) promedio de los 8 materiales, medido a campo a los 143 días del trasplante. Letras distintas indican diferencias significativas al 0,05 (Prueba LSD). Las barras verticales representan a las medias  $\pm$  D.E.

En la tercera fecha de medición, se detectaron diferencias significativas entre las FMH ( $P=0,0003$ ) para el diámetro (D3). La FMH que mayor diámetro presentó fue la 1193. La FMH de menor diámetro fue la 691 (Figura 16).



**Figura 16.** Diámetro (D) promedio de los 8 materiales, medido a campo a los 210 días del trasplante. Letras distintas indican diferencias significativas al 0,05 (Prueba LSD). Las barras verticales representan a las medias  $\pm$  D.E.

Trabajos realizados por Ixtaina y Mujica (2007) han determinado variabilidad en el diámetro de planta entre poblaciones de *Lotus tenuis* naturalizadas en la Pampa Deprimida, lo que coincide con los resultados de este trabajo.

El aumento del diámetro de planta a lo largo del tiempo varió con la familia considerada. En general las familias con mayor sobrevivencia tuvieron un mayor crecimiento en diámetro, registrado hacia el final del estudio. Otras familias, con menor sobrevivencia de plantas detuvieron el crecimiento en diámetro en la tercera fecha de registro.

### 3.1-4. Correlaciones Fenotípicas

La asociación entre dos caracteres puede explicarse tanto por efectos genéticos como por efectos ambientales o por ambos. Las causas ambientales de la asociación de los valores fenotípicos pueden acentuar o atenuar los causales genéticos de la correlación (Mariotti, 1986). En el presente

estudio, se discuten aquellas correlaciones fenotípicas significativas ( $p < 0,05$ ) consideradas de mayor importancia desde el punto de vista de un programa de mejoramiento (Cuadro 9).

	V0	V1	NTV1	V2	D1	NTV2	D2	V3	NTV3	D3
V1	0,827 0,011									
NTV1	0,479 0,230	0,789 0,020								
V2	0,655 0,078	0,801 0,017	0,484 0,225							
D1	0,636 0,090	0,871 0,005	0,568 0,142	0,789 0,020						
NTV2	0,534 0,173	0,747 0,033	0,425 0,294	0,806 0,016	0,865 0,006					
D2	0,518 0,189	0,700 0,053	0,381 0,352	0,789 0,020	0,811 0,014	0,844 0,008				
V3	0,192 0,649	0,253 0,546	0,226 0,592	0,600 0,116	0,410 0,313	0,641 0,087	0,697 0,055			
NTV3	0,384 0,347	0,478 0,231	0,016 0,970	0,667 0,071	0,550 0,157	0,757 0,030	0,690 0,058	0,932 <0,001		
D3	0,111 0,794	0,200 0,635	0,215 0,609	0,449 0,264	0,329 0,427	0,642 0,086	0,616 0,104	0,950 <0,001	0,932 <0,001	
Sf*	0,047 0,913	0,103 0,808	0,176 0,677	0,415 0,306	0,360 0,380	0,703 0,052	0,661 0,074	0,828 0,011	0,730 0,040	0,872 0,005

\*Sf: Supervivencia final (medida el 8/11)

**Cuadro 9.** Coeficiente de correlación de Pearson,  $H_0: r=0$  (para el número de observaciones). En la primera fila se observa el coeficiente de correlación y en la segunda fila el nivel de significancia. En gris se observan las correlaciones significativas.

Según Busqué *et al.* (1999), la densidad de tallos asociada con alguna variable indicadora de su tamaño promedio puede considerarse como la medida más objetiva de vigor o persistencia de la especie en la pastura. Coincidiendo con esto, en este estudio podemos observar correlaciones significativas entre el vigor, el número de tallos y el diámetro de planta (Cuadro 9). En las dos primeras fechas, si bien el ordenamiento de las familias no fue el mismo, se observó consistencia en el comportamiento, destacándose la familia 1193 por presentar los valores de media más elevados, y contrariamente la familia 2241 evidenció la menor media para todos los caracteres.

La correlación significativa y positiva existente entre el vigor y el número de tallos vegetativos, coincide con la encontrada por Franco (2014) para estos caracteres y a su vez coincide con lo remarcado por otros autores (Mujica y Rumi, 1998; Busqué *et al.*, 1999; Ixtaina y Mujica, 2009, 2010).

En cuanto a los caracteres evaluados posteriormente a la mortandad, mostraron correlación positiva significativa entre ellos, incluyendo la sobrevivencia final medida en porcentaje de plantas vivas al 8/11.

### **3.1-5. Estimación de los componentes de variancia fenotípica**

La variabilidad natural es una característica fundamental de las especies, que les permite sobrevivir y reproducirse mejor en un mayor rango ambiental. Por otra parte, la existencia de variabilidad, que previamente debe ser cuantificada, es un requisito indispensable para todo programa de mejoramiento (Abbott y Pistorale, 2010).

La idea básica del estudio de la variación es su partición en componentes atribuibles a diferentes causas. La magnitud relativa de estas componentes determina las propiedades genéticas de la población, en particular el grado de parecido entre parientes. La cantidad de variación se mide y se expresa como la variancia (Falconer y Mackay, 1996).

La varianza total o fenotípica es una medida de la variabilidad fenotípica entre los individuos de la población, y sus componentes son la varianza genotípica, la varianza ambiental y la varianza de la interacción genotipo-ambiente. La varianza genotípica se origina por las diferencias que existen entre genotipos, por lo que mientras sea mayor el número de *loci* segregantes, mayor será el número de genotipos diferentes en la población (Molina, 1992). A su vez, la variancia genética se compone de varianza aditiva (VA), dominante (VD) (o de dominancia) y de interacción (o epistática) (VI). De éstas la más importante es la varianza aditiva (varianza de los valores reproductivos), ya que es la causa principal del parecido entre parientes y determinante de las

propiedades genéticas observables de la población (heredabilidad y correlación genética aditiva) y de la respuesta positiva a la selección (Falconer y Mackay, 1996). La varianza ambiental comprende toda la variación de origen no genético, y gran parte de ésta se encuentra fuera del control del investigador; la varianza de la interacción genotipo-ambiente mide el comportamiento diferencial de los genotipos según el ambiente en el que se desarrollan.

La heredabilidad de un carácter cuantitativo expresa la proporción de la variancia total que es atribuible a los efectos medios de los genes y esto es lo que determina el grado de parecido entre parientes (Falconer y Mackay, 1996), es decir, expresa la confiabilidad del valor fenotípico como indicador del valor genotípico. Representa también una medida de la importancia relativa de la variación heredable respecto a la variación fenotípica.

Los valores de heredabilidad en sentido estricto fueron calculados en base de la media fenotípica familiar, obtenidas de diferentes repeticiones del experimento, con el propósito de disminuir el efecto ambiental (Nguyen y Sleper, 1983) (Cuadro 10).

De acuerdo con Stanfield (1971), los caracteres se consideran de heredabilidad alta cuando ésta es mayor que 0,50, de heredabilidad media entre 0,20 y 0,50 y de heredabilidad baja si es menor a 0,20. Los valores de heredabilidad estimados resultaron ser altos para siete caracteres estudiados (V1, D1, V2, NTV2, D2, NTV3 y D3), media para dos (NTV1 y V3) y baja para uno (V0) (Cuadro 10).

Caracteres	Media	$\sigma^2_e$	$\sigma^2_g$	$\sigma^2_f$	$h^2$
<b>V0 (escala 1-4)</b>	3,01	0,50	0,12	0,62	0,19
<b>V1 (escala 1-4)</b>	2,37	0,91	2,43	3,34	0,73
<b>NTV1</b>	8,19	6,77	3,12	9,89	0,32
<b>D1 (cm)</b>	19,31	30,40	53,71	84,11	0,64
<b>V2 (escala 1-4)</b>	1,92	0,42	1,12	1,54	0,73
<b>NTV2</b>	18,46	67,28	186,23	253,51	0,73
<b>D2 (cm)</b>	19,75	59,31	149,22	208,53	0,72
<b>V3 (escala 1-4)</b>	1,60	0,75	0,48	1,23	0,39
<b>NTV3</b>	33,62	882,8	1443,14	2325,94	0,62
<b>D3 (cm)</b>	29,62	309,48	511,45	820,96	0,62

**Cuadro 10.** Estimación de los componentes de la variancia fenotípica y heredabilidad en sentido estricto ( $h^2$ ).

Con excepción de V0, las heredabilidades estimadas mostraron valores medios a altos indicando una importante variabilidad genética heredable. Franco (2014) encontró valores altos de heredabilidad en sentido estricto para el vigor y el número de tallos vegetativos en FMH de *Lotus tenuis* y Andrés y Rosso (2007) hallaron altos valores de GDG (grado de determinación genética) para el carácter vigor inicial en poblaciones de *Lotus tenuis* provenientes de la Provincia de Bs. As. Esto es de suma importancia en el mejoramiento de la especie ya que caracteres como el vigor inicial o el número de tallos en fases de desarrollo tempranas determinan en forma indirecta la velocidad de crecimiento de las plántulas y con ello el éxito de implantación y a su vez está asociado a la acumulación de materia seca posterior (Franco, 2014). La elevada variabilidad y un componente genético alto para los caracteres evaluados, resultan promisorios para su aplicación en programas de selección orientados a la mejora genética de *Lotus tenuis* de las FMH más promisorias a través de una combinación óptima o índice de selección.

### 3.1-6. Análisis Multivariado

Con el objeto de resumir y agrupar toda la información previamente analizada se llevó a cabo un análisis de componentes principales para todos los caracteres analizados en esta fase de estudio. El 87% de la variación total fue explicada por las dos primeras componentes generadas y el 92% por las tres primeras componentes (Cuadro 11).

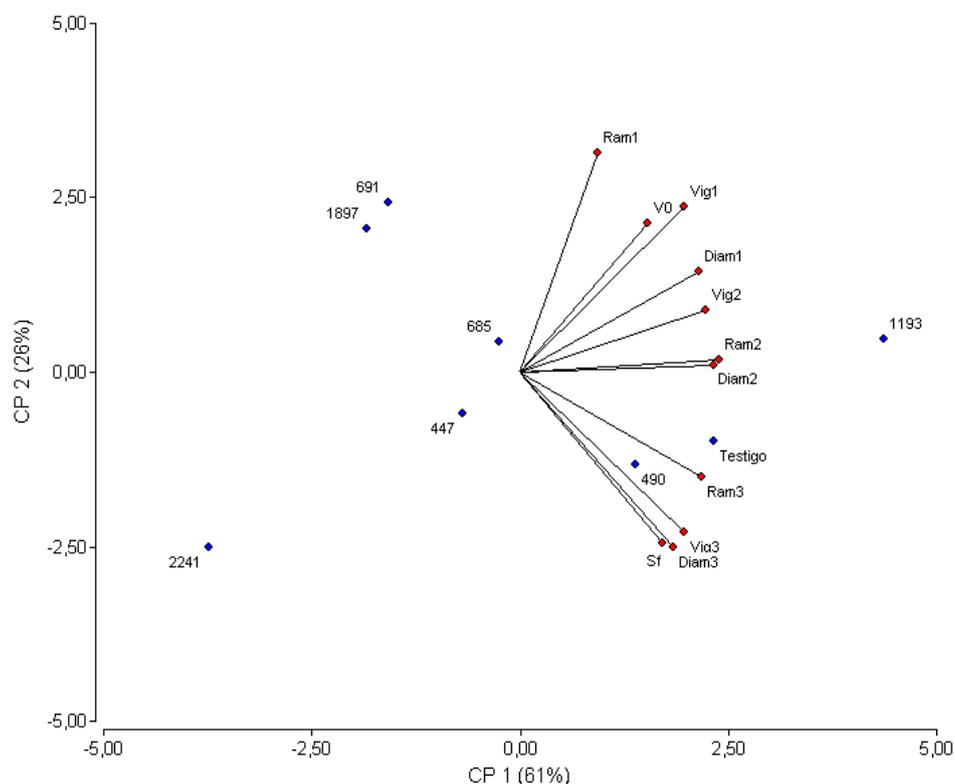
La figura muestra la distribución de las familias a través de las componentes 1 y 2 (87% de la variación). La primera componente explica el 61% de la variación y la segunda componente explica el 26% de la variación. Las variables obtenidas luego de que se produjera la mayor disminución en el porcentaje de plantas vivas mostraron una ponderación positiva para la primera componente y negativa para la segunda componente (Cuadro 17).

Lambda	Valor	Proporción	Prop. Acumulada
1	6,68	0,61	0,61
2	2,84	0,26	0,87
3	0,63	0,06	0,92
4	0,28	0,03	0,95
5	0,24	0,02	0,97
6	0,18	0,02	0,99
7	0,15	0,01	1,00
8	0,00	0,00	1,00
9	0,00	0,00	1,00
10	0,00	0,00	1,00
11	0,00	0,00	1,00

**Cuadro 11.** Autovalores de la matriz de correlación, proporción que explica cada autovalor y proporción acumulada.

Variables	e1	e2
V0	0,24	0,33
V1	0,30	0,36
NTV1	0,14	0,48
V2	0,34	0,14
D1	0,33	0,22
NTV2	0,37	0,03
D2	0,36	0,01
V3	0,30	-0,35
NTV3	0,33	-0,23
D3	0,28	-0,39
Sf	0,26	-0,38

**Cuadro 12.** Autovectores (e) correspondientes a la CP1 (e1) y a la CP2 (e2) para las variables analizadas.



**Figura 17.** Análisis de componentes principales para las 11 variables analizadas y los 8 materiales en estudio.

El agrupamiento de las familias varió de acuerdo al momento de registro de las variables consideradas. Posterior a la mayor mortandad de plantas, se observó comportamiento diferencial entre las familias. Las familias de mejor comportamiento fueron la 1193 y la 490 y las de peor comportamiento fueron la 691 y la 1897.

### 3.2- Caracterización molecular

Las técnicas moleculares proporcionan a los investigadores una nueva fuente de información, que conjuntamente con la información morfológica y agronómica contribuye a incrementar la eficacia del programa de mejoramiento (Faleiro, 2007).

Los *primers* probados en este estudio amplificaron, demostrando la capacidad de transferir *primers* de *Lotus japonicus* y *Trifolium repens* a *Lotus tenuis*, coincidiendo con Acuña *et al.* (2012), que habían logrado la transferencia de 4 de los marcadores microsatélites de *Lotus japonicus* a esta

especie. La ventaja de la utilización de marcadores de otras especies, es que se evita el elevado costo de desarrollo de *primers* específicos cuando estos no están disponibles para la especie estudiada.

Si bien se han realizado varios trabajos relacionados con el estudio de la diversidad genética en poblaciones naturales y cultivares de distintas especies con la técnica de microsatélites, no se han encontrado trabajos que utilicen microsatélites para determinar la variabilidad genética en *Lotus tenuis*. Sin embargo, se han realizado trabajos en especies relacionadas como, *Lotus corniculatus* (Savo Sardaro *et al.*, 2008; Alem *et al.*, 2011; Dos Santos *et al.*, 2011) y otras forrajeras como, *Medicago sativa* (Flajoulout *et al.*, 2005) y *Lolium perenne* (Kubik *et al.*, 2001; Acuña, 2008).

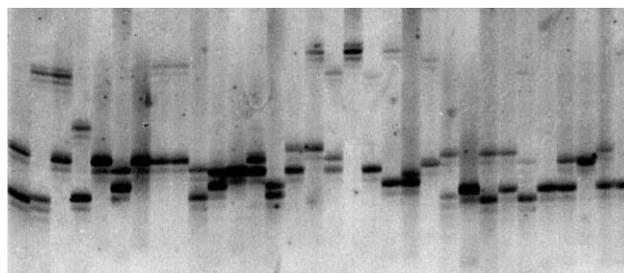
Los 7 marcadores microsatélites generaron un total de 84 alelos en los 69 genotipos analizados. Para el análisis molecular de la varianza, *cluster* jerárquico y análisis de coordenadas principales se utilizaron 50 genotipos y 6 marcadores microsatélites (se descartó el microsatélite PRS612) porque en esa combinación se determinaron todas las alternativas posibles de variación alélica (ver Cuadro 1 del Anexo). El número de alelos por locus a través de todas las FMH fue en promedio de 12 alelos/locus (Cuadro 13) y varió entre 8 y 18 alelos/locus. El número de alelos por FMH varió entre 3 y 11 alelos por locus.

Las especies del género *Lotus* muestran una gran variabilidad genética, tanto intra como interespecíficas, y es necesario comprenderla mejor y utilizarla en los programas de mejoramiento, para prevenir los cuellos de botella genéticos (Steiner, 1999). En este trabajo, el elevado promedio de alelos por locus, sumado al alto número de alelos por FMH, sugieren que las mismas cuentan con una amplia base genética.

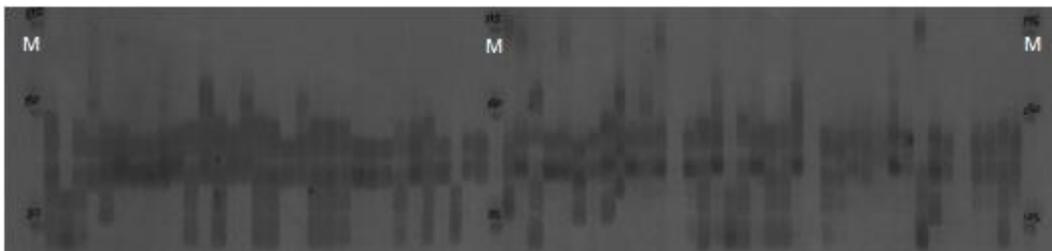
Estadístico	FMH					Total
	447	490	1193	691	1897	
<b>Loci polimórficos(95)</b>	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
<b>Heterocigosis promedio</b>	0,657	0,691	0,521	0,549	0,417	0,580
<b># promedio de alelos</b>	6,429	7,143	4,429	7,143	5,429	12,000

**Cuadro 13.** Estadísticos de variabilidad genética calculados a través de todos los *loci* analizados para cada FMH.

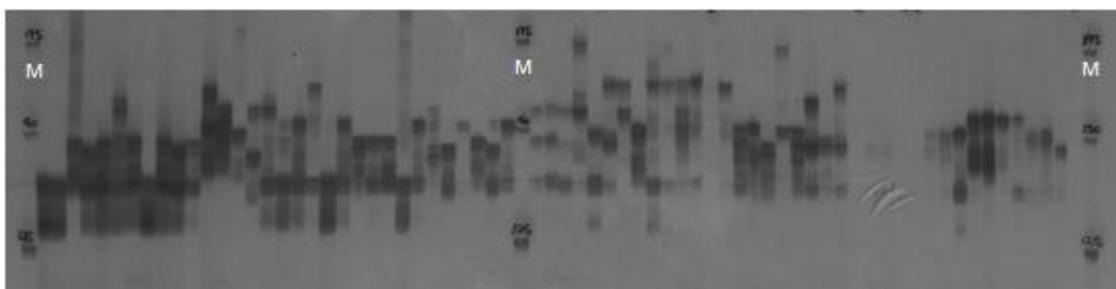
Las Figuras 18 a 20 muestran geles escaneados que contienen patrones de bandas de algunos loci.



**Figura 18:** Patrón de bandas del microsatélite TM0083 para 32 individuos analizados.



**Figura 19:** Patrón de bandas del microsatélite TM0203 para la totalidad de los individuos analizados.



**Figura 20:** Patrón de bandas del microsatélite TM0046 para la totalidad de los individuos analizados.

M: Marker

Las frecuencias alélicas medias de cada alelo se detallan en la Cuadro 14.

Locus	Alelos	Frecuencia alélica media	Locus	Alelos	Frecuencia alélica media
TM0046	a	0,246	TM0083	a	0,031
	b	0,008		b	0,131
	c	0,046		c	0,177
	d	0,223		d	0,069
	e	0,146		e	0,131
	f	0,069		f	0,138
	g	0,131		g	0,077
	h	0,023		h	0,015
	i	0,015		i	0,015
	j	0,054		j	0,046
	k	0,031		k	0,015
	l	0,008		l	0,008
TM0203	a	0,187	BM1397	a	0,010
	b	0,037		b	0,020
	c	0,007		c	0,049
	d	0,194		d	0,039
	e	0,336		e	0,078
	f	0,127		f	0,069
	g	0,037		g	0,157
	h	0,030		h	0,127
	i	0,007		i	0,029
	j	0,022		j	0,108
	k	0,015		k	0,147
	TM0208	a		0,246	PRS612
b		0,115	b	0,032	
c		0,246	c	0,177	
d		0,300	d	0,032	
e		0,015	e	0,016	
f		0,031	f	0,226	
g		0,038	g	0,081	
h		0,008	h	0,032	
			i	0,016	
			j	0,081	

**Cuadro 14.** Frecuencia alélica media para cada alelo.

Locus	Alelos	Frecuencia alélica media
TM0212	a	0,016
	b	0,365
	c	0,143
	d	0,127
	e	0,119
	f	0,016
	g	0,103
	h	0,016
	i	0,056
	j	0,016
	k	0,024

**Cuadro 14 (continuación).** Frecuencia alélica media para cada alelo.

Todos los marcadores son polimórficos. El contenido de información polimórfica (PIC) promedio del material analizado fue de 0,789. El rango de los PIC para los microsatélites analizados varió entre 0,645 y 0,885, para PRS612 y TM0083 respectivamente, lo que demuestra el alto poder discriminatorio de los marcadores utilizados, por lo que son altamente informativos y por lo tanto de utilidad para futuros estudios de caracterización molecular (Cuadro 15).

Locus	Estadístico	FMH					Total
		447	490	1193	691	1897	
TM0046	Heterocigosis	0,700	0,818	0,545	0,722	0,333	0,594
	PIC	0,544	0,759	0,742	0,774	0,546	0,813
	Alelos efectivos	2,410	4,654	4,481	4,985	2,632	5,996
	Número de alelos	5,000	8,000	6,000	8,000	6,000	12,000
TM0203	Heterocigosis	0,400	0,818	0,273	0,706	0,444	0,536
	PIC	0,709	0,747	0,701	0,783	0,682	0,768
	Alelos efectivos	3,922	4,566	3,967	5,026	3,682	4,881
	Número de alelos	6,000	6,000	4,000	9,000	5,000	11,000
TM00208	Heterocigosis	0,200	0,545	0,455	0,263	0,143	0,290
	PIC	0,634	0,436	0,720	0,635	0,711	0,747
	Alelos efectivos	3,077	2,180	4,172	3,297	3,960	4,569
	Número de alelos	5,000	3,000	5,000	4,000	5,000	8,000
TM0212	Heterocigosis	0,900	0,636	0,455	0,250	0,333	0,464
	PIC	0,737	0,767	0,419	0,714	0,602	0,786
	Alelos efectivos	4,348	4,840	1,906	3,879	2,961	5,181
	Número de alelos	6,000	8,000	3,000	7,000	5,000	11,000
TM0083	Heterocigosis	0,800	0,818	0,727	0,889	1,000	0,855
	PIC	0,765	0,826	0,691	0,829	0,807	0,885
	Alelos efectivos	4,651	6,368	3,723	6,480	5,769	9,437
	Número de alelos	8,000	9,000	5,000	11,000	10,000	18,000

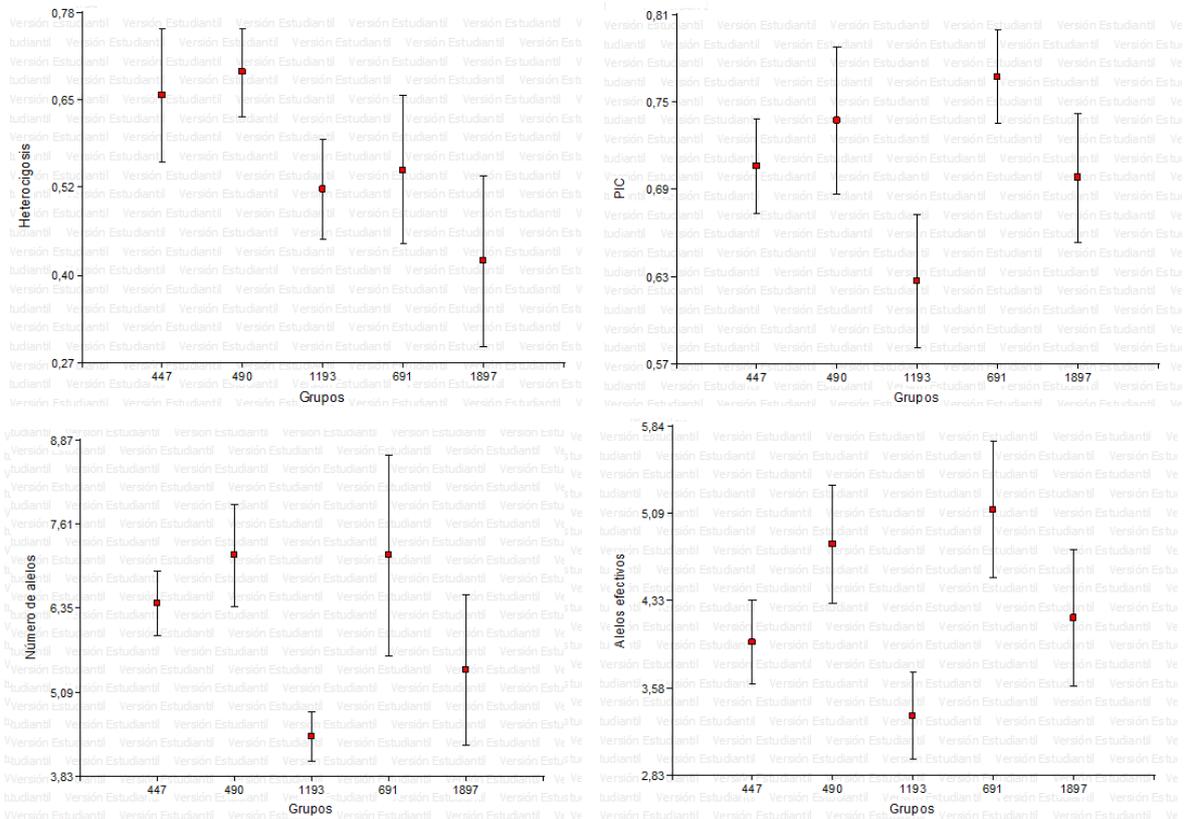
**Cuadro 15.** Estadísticos de variabilidad genética por locus, calculados para cada FMH.

FMH							Total
Locus	Estadístico	447	490	1193	691	1897	
BM1397	Heterocigosis	0,800	0,400	0,375	0,467	0,250	0,406
	PIC	0,790	0,808	0,547	0,844	0,815	0,880
	Alelos efectivos	5,263	5,882	2,510	7,031	6,095	9,103
	Número de alelos	8,000	8,000	4,000	11,000	7,000	14,000
PRS612	Heterocigosis	0,800	0,800	0,818	sd*	sd	0,913
	PIC	0,730	0,790	0,539	sd	sd	0,645
	Alelos efectivos	4,167	5,263	2,602	sd	sd	3,279
	Número de alelos	7,000	8,000	4,000	0,000	0,000	10,000

\*sd: sin datos

**Cuadro 15 (Continuación).** Estadísticos de variabilidad genética por locus, calculados para cada FMH.

En la Figura 21 se muestran los gráficos de los promedios por FMH con sus errores estándar para cada una de las medidas seleccionadas por FMH para facilitar su comparación. La FMH 490 fue la que presentó mayor heterocigosis observada y número de alelos, y la 691 fue la que presentó mayor PIC y Alelos efectivos.



**Figura 21.** Gráficos de promedios con errores estándar por FMH para las medidas de variabilidad genética.

El promedio de los valores de distancias genéticas de Jaccard entre los pares de FMH fue 0,923, con valores extremos de 0,88 y 0,97. Las FMH que presentan mayor similitud a través de todos los *loci* son la 1193 con la 447 y la 691 con la 1897. Las FMH que presentan mayor distancia son la 1193 y 691, que presentaron comportamiento contrastante a campo (Cuadro 16).

	447	490	691	1193	1897
447	0,00				
490	0,93	0,00			
691	0,92	0,94	0,00		
1193	0,88	0,95	0,97	0,00	
1897	0,91	0,92	0,88	0,93	0,00

**Cuadro 16.** Distancias genéticas de Jaccard ( $\sqrt{1-S}$ ) entre FMH.

El Análisis de la Variancia Molecular (AMOVA) exhibe que existe variabilidad genética entre las FMH en las frecuencias moleculares promedios ( $p < 0,0001$ ). También existe variabilidad genética estadísticamente significativa dentro de cada una de las FMH ( $p < 0,0001$ ). Por otra parte, la diferencia entre la variabilidad de frecuencias alélicas en familias tolerantes y susceptibles no resultó estadísticamente significativa. El 92,13% de la variancia genética molecular se encontró dentro de las FMH y el 6,25% entre las FMH que presentan un mismo comportamiento frente a estrés salino. (Cuadro 17).

F.V.	SC	gl	CM	p-valor	Iter.#	Porcentaje
<b>Selección</b>	0,89	1	0,89	0,2425	400	1,63
<b>Selección&gt;FMH</b>	1,99	3	0,66	<0,0001	400	6,25
<b>Dentro</b>	18,24	45	0,41	<0,0001	400	92,13
<b>Total</b>	21,12	49	0,43			100,00

**Cuadro 17.** Análisis de la variancia molecular de las 5 FMH analizadas, incluyendo la selección por salinidad.

Se realizó otro AMOVA sin tener en cuenta la selección por estrés, en el que tanto la variabilidad genética entre FMH como dentro de las mismas resultaron estadísticamente

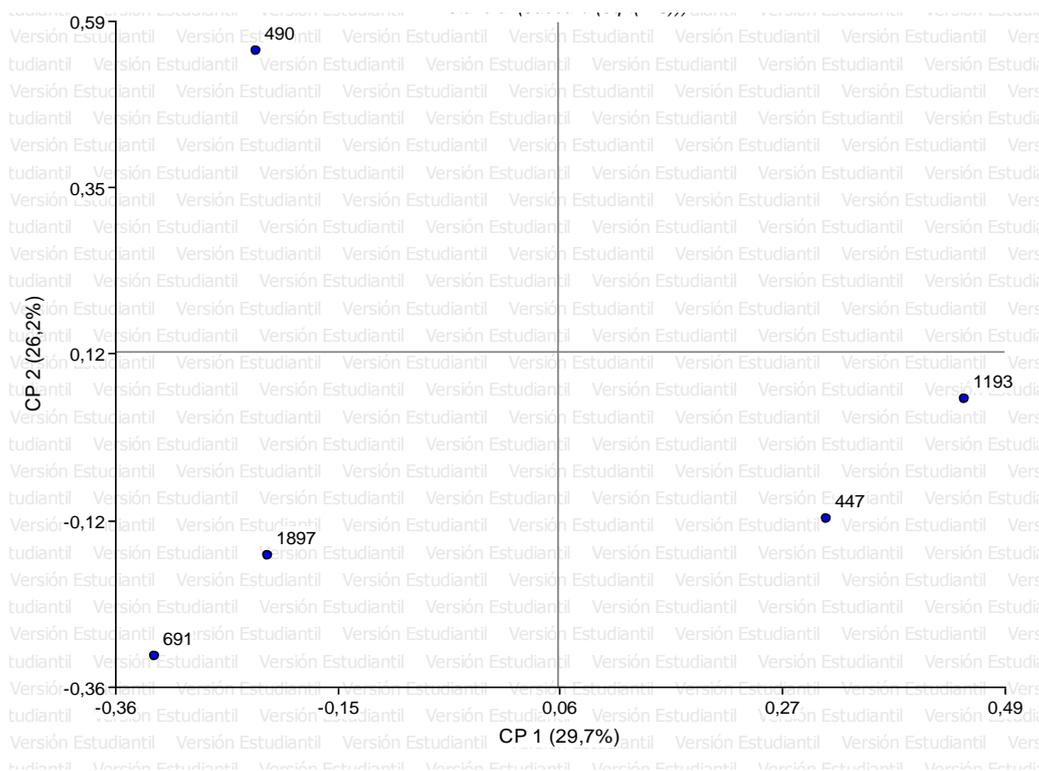
significativas. En este AMOVA, el 97,48% de la variancia genética molecular se encontró dentro de las FMH y el 2,52% entre las mismas. (Cuadro 18).

<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>p-valor</b>	<b>Iter.#</b>	<b>Porcentaje</b>
<b>FMH</b>	2,36	4	0,59	<0,0001	400	2,52
<b>Dentro</b>	21,18	45	0,47	<0,0001	400	97,48
<b>Total</b>	23,54	49	0,48			100,00

**Cuadro 18.** Análisis de la variancia molecular de las 5 FMH analizadas

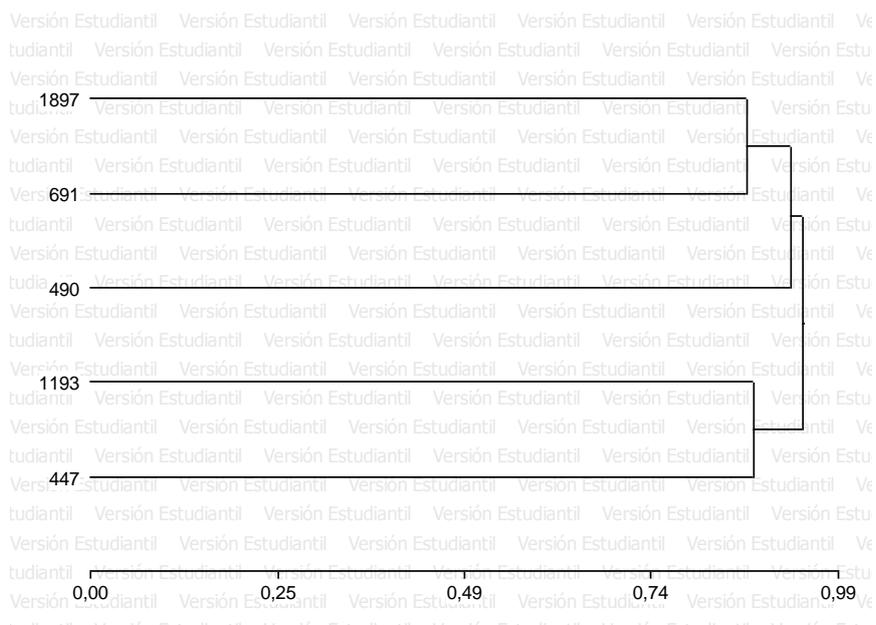
La existencia de diferencias moleculares entre y dentro de las FMH de acuerdo al AMOVA evidencia una amplia base genética y variabilidad de los materiales evaluados y está de acuerdo con lo encontrado en otros estudios de plantas alógamas (Thillai Rajasekar *et al.*, 2005) y otras especies del género Lotus (Savo Sardaro *et al.*, 2008; Alem *et al.*, 2011).

En el Análisis de Coordenadas Principales (ACoorP) basado en las estimaciones de las distancias genéticas de Jaccard, las primeras tres coordenadas principales explicaron 29,7; 26,2 y 24,0% de la variación total, respectivamente (Figura 22).



**Figura 22.** Gráfico del Análisis de Coordenadas Principales de las 5 FMH basado en la distancia genética de Jaccard. CP1 y CP2 son la primera y segunda coordenadas principales.

A nivel de la primera coordenada, las FMH 691, 1897 y 490 se diferencian de las FMH 447 y 1193. A nivel de la segunda, se diferencian las FMH 691, 1897, 447 y 1193 de la FMH 490. La FMH 691 se ubicó cercana a la 1897, mientras que la 447 y la 1193 también mostraron cercanía. A su vez, en el Análisis de Cluster jerárquico (Figura 23), obtenido a partir de la matriz de distancias genéticas de Jaccard, se pueden observar dos grupos. En uno de ellos encontramos que las FMH 691 y 1897 se unen a menor distancia que la FMH 490, que pertenece al mismo grupo. Las FMH 447 y 1193 conforman el otro grupo.



**Figura 23.** Análisis de Cluster jerárquico con criterio de encadenamiento UPGMA de las 5 FMH analizadas per se a partir de la matriz de distancias genéticas de Jaccard.

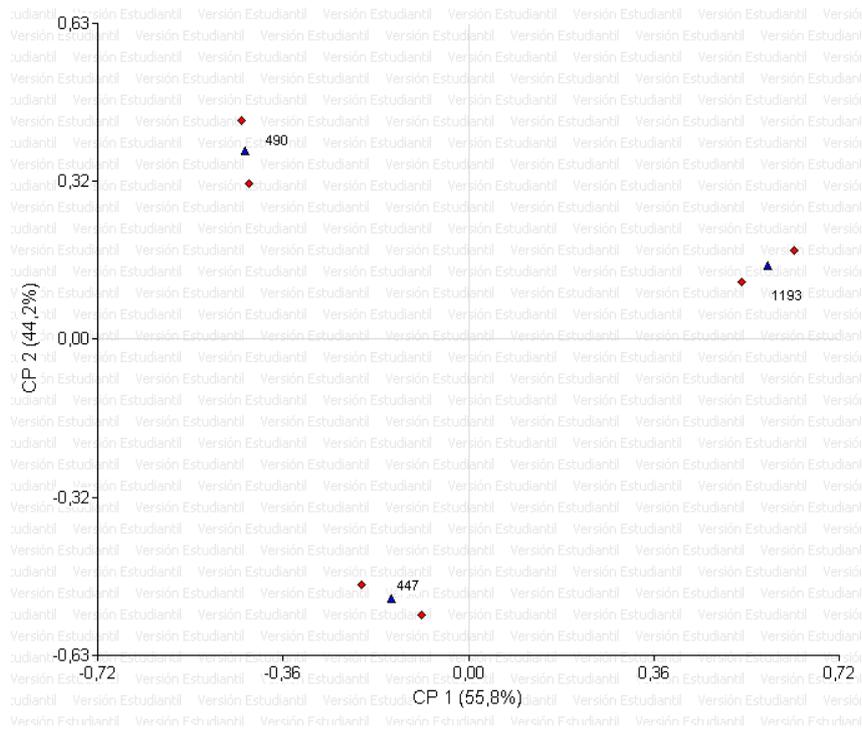
### 3.3- Análisis de Procrustes Generalizados

Se obtuvo una configuración consenso a partir del Análisis de Procrustes Generalizados (Gower 1975) de los dos tipos de caracterizaciones, con el fin de determinar si las FMH de las cuales se tomó material del ensayo a campo para el estudio molecular (FMH 447, 490 y 1193), expresan la misma o diferente variabilidad intraespecífica (Faccioli *et al.*, 1995).

El análisis, indica que la variabilidad explicada a través del Eje 1 de la descomposición de la matriz de consenso es 55,8%. Con los dos primeros ejes se explica el 100% de la variabilidad contenida en el total de los marcadores. El consenso fue del 98,8% entre ambas caracterizaciones.

En la figura 24 se observa representada la matriz de consenso entre los datos moleculares y agronómicos. El punto de consenso se representa con un triángulo y los datos agronómicos y moleculares se representan con un rombo. Cada punto de consenso se encuentra a una distancia equidistante de los parámetros moleculares y agronómicos. Cuanto menor es la distancia entre los

rombos, mayor es el grado de consenso entre ambas caracterizaciones. Las tres FMH presentan un gran consenso.



**Figura 24.** Configuración consenso a partir del Análisis de Procrustes Generalizados entre distancias genéticas de las poblaciones y similitudes estimadas a partir de los parámetros biométricos.

## CONCLUSIONES

Los ensayos realizados en este trabajo permitieron detectar una elevada variabilidad genética a nivel morfo-fisiológico y molecular entre familias de medios hermanos de *Lotus tenuis* tolerantes a salinidad.

En la búsqueda de validar los resultados obtenidos en condiciones de hidroponia por Franco (2014) para 7 de las 24 familias de medios hermanos de *Lotus tenuis* evaluadas anteriormente, se encontró que las familias presentaron variabilidad genética heredable para los caracteres morfo-fisiológicos evaluados.

Coincidiendo con Franco, la familia 1193 que se había mostrado altamente auspiciosa al combinar tolerancia incrementada a la salinidad en estado de crecimiento inicial y en germinación, y por su productividad superior, fue la más destacada. La familia 490 que presentaba menor nivel de tolerancia pero con mayor productividad en hidroponia, también resulta interesante, al haber sido la que presentó un mayor porcentaje de plantas vivas hacia el final del ensayo. Las familias 691 y 1897, si bien mostraron tolerancia a salinidad en el ensayo hidropónico, evidenciaron un mal comportamiento agronómico hacia el final del ensayo a campo, con bajos niveles de sobrevivencia y detención en su crecimiento; en tanto que la familia 2241 considerada susceptible en hidroponia fue la de peor comportamiento a lo largo del ensayo y previo a la mortandad registrada. Cabe destacar que esta familia se había seleccionado por su tolerancia en fase de germinación y por destacarse en condiciones ambientales sin restricciones por sus buenas características agronómicas.

Por otra parte, se logró transferir marcadores moleculares microsátélites de *Lotus japonicus* y *Trifolium repens* a *Lotus tenuis*, encontrando variabilidad genética entre y dentro de las familias de medios hermanos evaluadas. No se encontraron diferencias entre la variabilidad de frecuencias alélicas en familias consideradas tolerantes y susceptibles luego del estudio a campo.

La caracterización morfo-fisiológica y molecular de las familias de medios hermanos de *Lotus tenuis* tolerantes a salinidad, estudiadas en condiciones experimentales cercanas a las condiciones reales de uso de la especie, permitió validar resultados obtenidos en condiciones de hidroponia, y detectar elevada variabilidad genética para aplicar selección.

## BIBLIOGRAFÍA

Abbott, L., y Pistorale, S. (2010). Determinación de Componentes de la varianza y heredabilidad en cebadilla criolla (*Bromus catharticus* Vahl.). *Agriscientia*, 27 (2), 115-123.

Acuña, M. L. (2008). Variabilidad genética en poblaciones naturalizadas de *Lolium multiflorum* (Lam.). Tesis Maestría Genética Vegetal. UNR – INTA.

Acuña, M., Maciel, M., Affinito, M. A. y Andrés, A. (2012). Molecular characterization of *Lotus tenuis* with contrasting behavior for salinity. Proceedings of the 7<sup>th</sup> International Symposium on the Molecular Breeding of Forage and Turf. MBFT2012-Salt Lake City, Utah, USA. P. 101.

Alem, D., Narancio, R., Dellavalle, P. D., Rebuffo, M., Zarza, R., y Dalla Rizza, M. (2011). Molecular characterization of *Lotus corniculatus* cultivars using transferable microsatellite markers. *Ciencia e Investigación Agraria*, 38(3), 453-461.

Andrés A. y Rosso B. (2007). Characterization of *Lotus glaber* germoplasm from Buenos Aires province – Argentina. *Lotus Newsletter*, Volume 37 (1), 24.

Andrés, A. (1987). Variabilidad genética en poblaciones naturales de *Agropyron scabrifolium* (Doell). Parodi. Tesis de Ms Sc. Pergamino INTA-UNR Curso de Posgrado en Mejoramiento Vegetal.

Arambarri, A. M. (1983). Morfología y anatomía de las semillas de *Lotus tenuis* y *Lotus corniculatus* (Leguminosae-Papilionoideae). *Rev. Fac. Agron. La Plata*. 59, 175-189.

Ashraf, M. y Harris, P. J. C. (2004). Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science*, 166(1), 3-16.

Ashraf, M. (1994). Breeding for salinity tolerance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 13, 17-42.

Ashraf, M. (2009). Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotech. Adv.* 27, 84–93.

Ashraf, M., McNeilly, T., Bradshaw A. D. (1986). The response of selected salt-tolerant and normal lines of four grass species to NaCl in sand culture. *New Phytol.*, 104, 453-461.

Ayers, A.D. (1948). Salt tolerance of birdsfoot trefoil. *J. Am. Soc. Agron.* 4, 331-334.

Balzarini, M. y Di Rienzo, J. (2004). *Info-Gen: Software para análisis estadístico de datos genéticos*. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba. Argentina.

Barker, R., y Warnke, S. (2001). Application of molecular markers to genetic diversity and identity in forage crops. *Molecular breeding of forage crops*. Chapter 7, 135-148.

Barragán, M., Clua, A., Giménez, D. O. y Castro, A. M. (2004). Evaluación de la Tolerancia al Estrés Salino en Genotipos de *Lotus glaber*. *AAPA*. P. 88.

Barufaldi, M., Andres, A., Crosta, H. y Eseiza, M. (2000). Obtención de una población autotetraploide de *Lotus glaber* Mill. (*Lotus tenuis* Waldst. y Kit). *Rev. de Tecnología Agropecuaria-INTA Pergamino*. 15, 47-50.

Bernstein, L., y Hayward, H. E. (1958). Physiology of salt tolerance. *Annual Review of Plant Physiology*, 9(1), 25-46.

Beuselinck, P. R., Ben Younes, M. y McGraw, R. L. (1986). Taxonomic investigation of an accession of *Lotus spp.* *Crop Sci.* 26, 661-664.

Borsani, O., Valpuesta, V., y Botella, M. A. (2001). La evidencia de un papel de ácido salicílico en el daño oxidativo generado por NaCl y estrés osmótico en plántulas de *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 126 (3), 1024-1030.

Bradshaw, P. (1971). *An introduction to turbulence and its measurement*.

Bramardi, J. S. (2000). Estrategias para el análisis de datos en la caracterización de recursos fitogenéticos. Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Valencia.

Briggs, S. y Walters, B. D. (1984). Plant variation and evolution. World.

Busqué, J., Joaquin, N. y Herrero, M. (1999). Atributos Funcionales de las Plantas y su Implicación para el Manejo de Pasturas Tropicales. En: Herrero, M. y A. Ramirez (eds.). Manejo y Utilización de Pasturas Tropicales. Pasturas Tropicales, Volumen Especial, CIAT, Colombia.

Campos, L. P., Raelson J. V. y Grant, W. F. (1994). Genome relationships among Lotus species based on random amplified polymorphic DNA (RAPD). Theor. Appl. Genet. 88, 417-422.

Cerono, J. (1993). Variabilidad genética e identificación varietal en *Festuca arundinaceae* Schreb. cultivar El Palenque MAG. Tesis de Maestría. Curso de Posgrado en Mejoramiento Genético Vegetal. INTA-UNR, p. 78.

Clausen, J., Keck, D. D. y Hiesey, W. (1940). Experimental studies on the nature of species. I. Effects of varied environments on western North American plants. Carnegie Inst. Wash. Pub. 520. VII. 452 pp.

Clausen, J., Keck, D. D. y Hiesey, W. (1948). Experimental studies on the nature of species. III. Environmental responses of climatic races of *Achillea*. Carnegie Inst. Wash. Pub. 581. IV. 129 pp.

Clúa A. A., Giménez D. O., y Fernández L. (1997). Increase in forage yield in narrowleaf birdsfoot (*Lotus tenuis* Waldst y Kit ex Willd) in a permanent pasture with foliar applied gibberellic acid (GA3), and phosphorus. Plant Growth Regulation 21, 223-228.

Cook D.R., VandenBosch K., de Bruijn F.J., Huguet T. (1997). Model Legumes Get the Nod, Meeting Report, The Plant Cell 275-281.

Colares, M., Mujica, M. M. y Rumi, C. P. (1999). Analysis of the early expression characters of *Lotus glaber* Mill. (= *Lotus tenuis* Waldst. et Kit. ex Wild.). Lotus Newsletter. Available at <http://www.psu.missouri.edu/lnl/>. (Accessed July 2009).

De Battista J. (2001). Trébol de cuernitos. Trébol de cuernitos de hoja angosta. En: Forrajeras y Pasturas del ecosistema Templado húmedo de la Argentina. Maddaloni, J y Ferrari, L(Ed). UNLZ-INTA. Buenos Aires. 79-92.

Díaz, P., Monza, J. y Márquez, A. (2005). Drought and saline stress in *Lotus japonicus*. En: Márquez AJ. [Ed.] *Lotus japonicus* Handbook. Dordrecht: Springer. pp. 39 - 50.

Dos Santos, A. M., Dall'Agnol, M., Janke, A., Bortolini, F., y Huber, K. G. C. (2011). Análise da diversidade genética de cornichão com o uso de marcadores microssatélites1. R. Bras. Zootec, 40(6), 1188-1194.

Excoffier, L., Smouse, P., Quattro, J. (1992). Analysis of Molecular Variance Inferred From Genetic Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. Genetics 131, 479-491.

Faccioli, P., Terzi, V., Monetti, A., Nicola, J., Pecchioni, N. (1995) B-hordein STS markers for barley genotype identification: comparison with RFLPs, hordein A-PAGE and morphophysiological traits. Seed Science and Technology 23, 415-427.

Falconer, D. S., Mackay, T. F., y Frankham, R. (1996). Introducción a la Genética Cuantitativa (4<sup>a</sup> ed). Trends in Genetics , 12 (7), 280.

Faleiro, F .G. (2007). Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos. Planaltina: Embrapa Cerrados. 102p.

Falstocco, E. y Piccirilli, M. (1989). The basic karyotype of *Lotus tenuis* C-banding and feulgen studies. Ann. Bot. 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.

Ferreira, M. E. y Grattapaglia, D. (1998). Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. EMBRAPA, 220 pp.

Flajoulot, S., Ronfort J., Baudouin, P., *et al.* (2005). Genetic diversity among alfalfa (*Medicago sativa*) cultivars coming from a breeding program, using SSR markers. Theoretical and Applied Genetics, 111, 1420-1429.

Flowers T. J., García A., Koyama M. y Yeo A. R. (1997). Breeding for salt tolerance in crop plants- the role of molecular biology. Acta Physiologiae Plantarum 19 (4), 427-433.

Formoso, F. (1993). Lotus corniculatus I. Performance forrajera y características agronómicas asociadas. INIA La Estanzuela, Uruguay. Serie Técnica N° 37. 20 pp.

Forster, J. W., Jones, E. S., Kolliker, R., Drayton, M. C., Dumsday, J., Dupal, M. P., Guthridge, K. M., Mahoney, N. L., van Zijll de Jong, E., y Smith K. F. (2001). Development and implementation of molecular markers for forage crop improvement. In Molecular breeding of forage crops. Edited by G. Spangenberg. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. pp. 101–133

Franco, M. (2014, inédito). Estudio de la variabilidad genética en familias de medios hermanos de *Lotus tenuis* sometido a estrés salino. Tesis Maestría en Genética Vegetal. UNR.

González, L. M., González, M. C., y Ramírez, R. (2002). Reseña bibliográfica Aspectos generales sobre la tolerancia a la salinidad en las plantas cultivadas. Cultivos Tropicales, 23(2), 27-37.

Grattan, S. R., Grieve, C. M., Poss, J. A., Robinson, P. H., Suarez, D. L., y Benes, S. E. (2004). Evaluation of salt-tolerant forages for sequential water reuse systems: I. Biomass production. *Agricultural water management*, 70(2), 109-120.

Greenway H. y Munns R. (1980). Mechanism of salt tolerance in nonhalophytes. *Annu Rev Plant Physiol* 31, 149-190.

Gower, J. C. (1975). Generalized procrustes analysis. *Psychometrika*. 40,33-51.

Hedrick, P. W., Ginevan, M. E., & Ewing, E. P. (1976). Genetic polymorphism in heterogeneous environments. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 7(1), 1-32.

Hamrick, J. (1979). Genetic variation and longevity. In: Solbrig, O., S. Jain, G. Jonson and P. Raven (Eds.), *Topics in Plant Population Biology*. Columbia Univ. Press., New York. pp. 84-113.

InfoStat. Versión2.0. Universidad Nacional de Córdoba. Estadística y Diseño. Facultad de Agronomía.

Ixtaina, V. Y., y Mújica, M. M. (2003). Variabilidad inter e intrapoblacional e interacción poblaciones-ambiente en el vigor de plántula de *Lotus glaber*. *Journal of Basic & Applied Genetics (BAG)* XV, 127.

Ixtaina, V. Y., y Mujica, M. M. (2004). Variability in the salt tolerance in *Lotus glaber* Mill. genotypes selected in situ in a saline basin of the Flooding Pampas (Province of Buenos Aires, Argentina). *Revista Pastos*, p. 34.

Ixtaina, V. Y., y Mújica, M. M. (2009). Respuesta de poblaciones de *Lotus tenuis* a variaciones ambientales contrastantes de disponibilidad de agua, luz y nutrientes. *Agrociencia* 44, 31-41.

Ixtaina, V. Y., y Mújica, M. M. (2010). Variabilidad en los componentes del vigor de plántulas de *Lotus tenuis* según las épocas y densidades de siembra. *Phyton* (B. Aires), Vicente López, 79, 1.

Jaccard, P. (1908) Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.*, 44, 223- 270

Jain, S. (1975). Population structure and the effects of breeding system. En: O. Frankel y J. Hawkes. *Crop genetic resources for today and tomorrow*. London. pp. 15 – 36.

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(1-2), 271-284.

Kade, M., Pagani, E. A. y Mendoza, R. E. (2003). A morphological study of population of *Lotus glaber* Mill. (Fabaceae). *Agronomie* 23, 203-207.

Kirkbride J. H. (1999). *Lotus* systematics and distribution. In: Beuselinck PR, ed. *Trefoil: The Science and Technology of Lotus*. CSSA Special Publication n°28. American Society of Agronomy, pp. 1–20.

Kleinhofs, A., Kilian, A., Saghai Maroof, M., Biyashev, R. M., Hayes, P., Chen, F. Q., Lapitan, N., Fenwick, A. y Steffenson, B. J. (1993) A Molecular isozyme and morphological map of the barley (*Hordeum vulgare*) genome. *TAG* 86, 705-712.

Kubik, C., Sawkins, M., Meyer, W. A. *et al.* (2001). Genetic diversity in seven perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) cultivars based on SSR markers. *Crop Science*, 41, 1565-1572.

Lambrechtsen, N. C., Wills, B. J. y Douglas, G. B. (1986). Management and uses of *Lotus tenuis* (Narrow-leaved birdsfoot trefoil). In *Plant Material Handbook for Soil Conservation*. Eds. van Kraayenoord, C.W.S., Hatha-way, R.L. 271-274.

Lavado, R. (2008). Visión sintética de la distribución y magnitud de los suelos afectados por salinidad en la Argentina. En Taleisik, E., Grumberg, K. y Santa María, G. La salinización de suelos en la Argentina: su impacto en la producción agropecuaria. EDUCC (Editorial Universidad Católica de Córdoba), Córdoba. ISBN: 978-987.

León, R. J. C. (1975). Las comunidades herbáceas de la región de Castelli-Pila. Monografía Comisión de Investigaciones Científicas de la provincia de Buenos Aires. La Plata, 75-107.

León, R. J. C., Burkart S. E. y Movia C.P. (1979). Relevamiento Fitosociológico del Pastizal del Norte de la Depresión del Salado: La Vegetación de la República Argentina. Serie Fitogeográfica N° 17. Buenos Aires, INTA, 90 p.

Loveless, M. y Hamrick, J. (1984). Ecological determinants of genetic structure in plant populations. Ann. Rev. Ecol. Sist.. 15, 65 – 95.

Marseille, P. S, y Grant, W. F. (1997). Segregation by morphological analyses of trisomy types in *Lotus tenuis* (Fabaceae). Can. J. Bot. 75, 1209-1214

Melchiorre, M., Quero, G. E, Parola, R., Racca, R., Trippi, V. S., Lascano, R. (2009). Physiological characterization of four model *Lotus* diploid genotypes: *L. japonicus* (MG20 and Gifu), *L. filicaulis*, and *L. burttii* under salt stress. Plant Science, 177 (6), 618-628.

Mendoza, R. E., Pagani, E. y Pomar, M. C. (2000). Variabilidad poblacional de *Lotus glaber* en relación con la absorción de fósforo del suelo. Ecología Austral. 10, 3-14.

Miñón, D. P, Sevilla, G. H., Montes, L. y Fernández, O. N. (1990). *Lotus tenuis*: leguminosa forrajera para la Pampa Deprimida. Unidad Integrada Balcarce. FCA-EEA Boletín Técnico N 98. pp. 16.

Maas, E. V., y Hoffman, G. J. (1977). Crop Salt Tolerance\Current Assessment. Journal of the irrigation and drainage division, 103(2), 115-134.

Mariotti, J. A. (1986). Fundamentos de genética biométrica. Aplicaciones al Mejoramiento Genético Vegetal. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Washington, DC.

Molina, G. J. D. (1992). Introducción a la Genética de Poblaciones y Cuantitativa (algunas implicaciones en genotecnia). AGT Editor. México, D. F. 349 pp.

Montes, L. (1988). *Lotus tenuis*. Rev. Arg. Prod. Anim. 8, 367-376.

Morgante, M. y Olivieri, M. (1993). PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. Plant J. 3, 175-182.

Mujica, M. M. y Rumi, C. P. (1998). El crecimiento inicial de *Lotus glaber* afectado por la remoción y el sombreado de los cotiledones. Rev. Fac. Agron. La Plata. 103, 127-133.

Munns, R. y Tester, M. (2008). Mechanisms of Salinity Tolerance. Annu. Rev. Plant Biol. 59, 651-681.

Munns, R. (2009). Strategies for crop improvement in saline soils. Salinity and water stress. Springer Netherlands. 99-110.

Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. Plant Cell Environ 20, 239-250.

Newman, Y. y Delgado, H. (1999). Crecimiento del pasto buffel. 1. Arquitectura de planta. Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ) 16, 319-326.

Nguyen, H. T., & Sleper, D. A. (1983). Theory and application of half-sib matings in forage grass breeding. Theoretical and applied genetics, 64(3), 187-196.

Pagano, E. (1993). Variabilidad genética de la población de trébol blanco (*Trifolium repens* L.) "El Lucero MAG". Tesis de Maestría. Curso de Posgrado en Mejoramiento Genético Vegetal. INTA-UNR, pp. 90.

Peakall, R., Gilmore, S., Keys, W., Morgante, M., y Rafalski, A. (1998). Cross species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeat (SSRs) within the genus and other legume genera: Implications for transferability of SSRs in plants. *Mol. Biol. Evol.* 15, 1275–1287.

Pearson, C. e Ison, R. 1994. *Agronomía de los sistemas pastoriles*. Ed. Hemisferio Sur: 27-46.

Pesqueira J., Fracaroli, V., Vértiz, P., Andrés, A., Rosso, B., Ruiz, O. A., Pieckenstain, F. (2007). Evaluación de parámetros fisiológicos, morfológicos y bioquímicos de la respuesta al estrés salino de diferentes accesiones de *Lotus tenuis*. *Lotus Newsletter*. Volumen 37 (1), 28-29.

Pesqueira, J. (2008). Cambios bioquímicos, morfológicos y ecofisiológicos en plantas del género *Lotus* bajo estrés salino. Tesis doctoral. Universidad Politécnica De Valencia.

Picca, A., Helguera, M., Salomón, N. y Carrera, A. (2004). IV. Marcadores Moleculares. En *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. Argenbio-INTA. 61-68.

Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafe, M., Vogel, J., Tingey, S. y Rafalsky, A. (1996). The comparison of RFLP, RPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers. *Conservation Biology* 12(4), 844-855.

Real, D., Warden, J., Sandral, G. A., y Colmer, T. D. (2008). Waterlogging tolerance and recovery of 10 *Lotus* species. *Animal Production Science*, 48(4), 480-487.

Rogers, M. E., Noble, C. L. y Pederick, R. J. (1997). Identifying suitable temperate forage legume species for saline areas. *Aust. J. Exp. Agr.* 37, 639-645.

Rosso, B., Andrés, A., Lavandera, J. (2008). Colecciones de germoplasma de dos especies forrajeras para suelos marginales *Revista Argentina de Producción Animal* 28 (1), 421

Saha, M. C., Cooper, J. M., Rouf Mian, M. A., Chekhovskiy, K. y May, G. D. (2006). Tall fescue genomic SSR markers: development and transferability across multiple grass species. *Theor. Appl. Genet.* 113, 1449-1458.

SAS 9.1 (SAS Institute Inc., 1989)

Savo Sardaro, M. L., Atallah, M., Tavakol, E., Russi, L. y Porceddu, E. (2008). Diversity for AFLP and SSR in natural populations of *Lotus corniculatus* L. from Italy. *Crop Science* 48, 1080–1089.

Schachtman, D. P., Kelman, W. M. (1991). Potential for Lotus germplasm for the development of salt, aluminium and manganese tolerant pasture plants. *Australian Journal of Agricultural Research* 42, 139–149.

Schlatter, A. R., Glovagnoli, N., Ornella, L., Alvarez, P. (2002). Utilización de marcadores moleculares en programas de investigación y servicios. *Revista de tecnología Agropecuaria – INTA-Pergamino*.

Schultze-Kraft, R. (1990). Caracterización y evaluación preliminar de germoplasma de plantas forrajeras. *Diálogo XVIII-Introducción, conservación y evaluación de germoplasma forrajero en el Cono Sur*. IICA-PROCISUR, Montevideo, Uruguay, Ed. J.P. Puignau. pp. 319-326.

Seaney, R. R. and Henson, P. R. (1970). Birdsfoot trefoil. *Adv. Agron.* 22, 119-157.

Sevilla, G. H., Fernandez, O. N., Miñon, D. P. y Montes, L. (1996). Emergence and seedling survival of *Lotus tenuis* in *Festuca arundinacea* pastures. *J. Range Manage.* 49, 509-511.

Snaydon, R. (1984). Intraspecific variation and its taxonomic implications. In: *Systematics Association Special Volume N° 25, “Current Concepts in Plant Taxonomy”*. V. Hey Wood and D. Moore (eds.) . Academic Press, London and Orlando, pp. 203 – 217.

Squirrel, J., Hollingsworth, P. M., Woodhead, M. L., Russell, J., Lowe, A. J., Gibby, M., y Powell, W. (2003). How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants? *Molecular Ecology* 12, 1339-1348.

Stanfield, W.D. (1971). Genética. Teoría y 400 problemas resueltos. Serie Schaum, McGraw Hill, México. 405 pp.

Steiner, J. J. (1999). Birdsfoot trefoil origins and germoplasm diversity. En: Beuseulink, P. R. (Ed.) . Trefoil : The science and technology of the Lotus. Madison: The American Society of Agronomy, p. 81-96.

Stofella, S., Posse, G. y Collantes, M. (1998). Variabilidad fenotípica y genotípica de poblaciones de *Lotus tenuis* que habitan suelos con distinto pH. Ecología Austral. 8, 57-63.

Striker, G. G., Insausti, P., Grimoldi, A. A., Ploschuk, E. L., y Vasellati, V. (2005). Physiological and anatomical basis of differential tolerance to soil flooding of *Lotus corniculatus* L. and *Lotus glaber* Mill. Plant and Soil, 276(1-2), 301-311.

Taboada, M. A. y Lavado, R. S. (2009). Alteraciones de la fertilidad de los Suelos. El halomorfismo, la acidez, el hidromorfismo y las inundaciones. Ed. FAUBA.

Taiz, L. y Zeiger, E. (1998 ). Fisiología Vegetal , 2<sup>a</sup> ed . Sinauer Associates Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts.

Teakle, N. L., Real, D. y 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 Soil, 289, 369-383.

Teakle, N. L., Flowers, T. J., Real, D. y Colmer, T. D. (2007). *Lotus tenuis* tolerates the interactive effects of salinity and waterlogging by “excluding” Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> from the xylem. Journal of Experimental Botany 58 (8), 2169-2180.

Teakle, N. L., Snell, A., Real, D., Barrett-Lennard, E. G., Colmer, T. D. (2010). Variation in salinity tolerance, early shoot mass and shoot ion concentrations within *Lotus tenuis*: towards a perennial pasture legume for saline land. Crop and Pasture Science 61, 379–388.

Thillai Rajasekar, K., Perumal, P., Santhanam, P. (2005). Phytoplankton diversity in the Coleroon estuary, Southeast coast of India. *Journal of Marine Biological Association of India*, 47, 127-132.

Traverso, J. E., y von der Pahlen, A. (1982). Variabilidad en *Bromus auleticus* (Trin ex Ness). INTA.

Turesson, G. (1922). La respuesta genotípica de las especies de plantas en el hábitat. *Hereditas* 3 (3), 211-350.

Tyler, B. F., Chorlton, K. H., Thomas, I. D. (1987). Chapter 1: Collection and field sampling techniques for forage. In *Collection, Characterization and Utilization of Genetic Resources of Temperate Forage Grass and Clover*. IBPGR, Roma. pp. 3-10.

Udovenko, G. V. (1977). Resistencia de las plantas cultivadas a la salinidad. Editorial Kolos, Leningrado. 215 pp.

Van Valen, L. (1965). Morphological variation and width of ecological niche. *American Naturalist*, pp. 377-390.

Vignolio, O. R., Maceira, N. O. y Fernández, O. N. (1994). Efectos del anegamiento en invierno y verano sobre el crecimiento y la supervivencia de *Lotus tenuis* y *Lotus corniculatus*. *Ecología Austral*. 4, 19-28

Vignolio, O. R., Maceira, N. O., y Fernández, O. N. (1996). Efectos del anegamiento sobre la reproducción de *Lotus tenuis* y *Lotus corniculatus*. *Rev. Arg. Prod. Anim*, 16(3), 267-278.

Vignolio, O. R., Fernández, O. N. and Maceira, N. O. (2002). Biomass allocation to vegetative and reproductive organs in *Lotus glaber* and *L. corniculatus* (Fabaceae). *Aust. J. Bot.* 50, 75-82.

Vignolio, O. R. y Fernández, O. N. (2003). Identificación de especies herbáceas establecidas en heces de vacunos. XXIX Jornadas Argentinas de Botánica San Luis. XV Reunión anual de la Sociedad Botánica de Chile. Vol. 38. pp. 202.

Vignolio, O. R. y Fernández, O. N. (2006). Especies herbáceas de los pastizales de la Pampa Deprimida encontradas en heces de liebre Europea (*Lemus capensis*). Rev. Arg. Prod. Anim. 26(1), 31-38.

Wang, Z., Hopkins, A. y Mian, R. (2001). Forage and turf grass biotechnology. Critical Reviews in Plant Science, 20(6), 573-619.

Wang, W., Vinocur, B., Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. Planta, 218(1), 1-14.

Watson, L., y Dallwitz, M. J. (1992). The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. Version: 2013. *Lotus corniculatus*, *L. tenuis* and *L. pedunculatus* (as *L. major*): Eng. Bot. 368–370, 1864. <http://delta-intkey.com>.

Wright, S. (1951). The genetic structure of populations. Ann. Eugen. 15, 323 – 354.

Yamaguchi, T. y Blumwald, E. (2005). Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. Trends Plant Sci. 10, 616–620.

Zamolinski, A. (2000). Experiencia en recuperación de suelos salinizados. EEA INTA General Villegas. Publicación Técnica N° 31.

Zane, L., Bargelloni, L. y Partanello, T. (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. Molecular Ecology 11, 1-16.

## RESUMEN

La creciente expansión agrícola en áreas no tradicionales, ocupadas históricamente por la explotación ganadera, crea la necesidad de incrementar la producción de especies forrajeras adaptadas a condiciones edáficas cada vez más estresantes. Entre las especies de mayor relevancia en dichos ambientes marginales se destaca *Lotus tenuis* Waldst. et Kit, una leguminosa naturalizada en los campos bajos de la Pampa Deprimida Argentina, que coloniza los bajos salinos alcalinos y es muy valorada por su aporte a la oferta forrajera de los sistemas ganaderos de la región.

El objetivo general del presente trabajo fue determinar la variabilidad genética a nivel morfo-fisiológico y molecular entre familias de medios hermanos (FMH) de *Lotus tenuis* tolerantes a salinidad.

El estudio se realizó cubriendo diferentes etapas: una etapa de invernáculo, un estudio a campo en suelo sódico bajo un diseño DBCA con 3 repeticiones y una etapa de laboratorio en la que se realizó la caracterización molecular. En las dos primeras etapas, se evaluaron 7 FMH provenientes del programa de mejoramiento de forrajeras INTA Pergamino que habían sido estudiadas previamente en fases de germinación y crecimiento vegetativo temprano en hidroponía. En la tercera etapa se evaluaron 5 FMH que habían mostrado un comportamiento contrastante en el estudio a campo.

Los ensayos realizados en este trabajo sobre *Lotus tenuis* permitieron detectar variabilidad genética para todos los caracteres morfo-fisiológicos evaluados a campo; y variabilidad entre y dentro de las FMH, en el estudio molecular. No se encontraron diferencias entre la variabilidad de frecuencias alélicas en familias consideradas tolerantes y susceptibles luego del estudio a campo.

La caracterización morfo-fisiológica y molecular de las familias de medios hermanos de *Lotus tenuis* tolerantes a salinidad, estudiadas en condiciones experimentales cercanas a las condiciones

reales de uso de la especie, permitió validar resultados obtenidos en condiciones de hidroponia, y detectar elevada variabilidad genética para aplicar selección.

## ANEXOS

RIII	2	7	5	3	4	8	1	6
RII	4	6	8	7	1	3	5	2
RI	1	2	3	4	5	6	7	8

1: Testigo; 2: FMH 447; 3: FMH 490; 4: FMH 685; 5: FMH 691; 6: FMH 1193; 7: FMH 1897; 8: FMH 2241

**Esquema 1.** Diseño a campo en bloques completamente aleatorizados de las familias evaluadas.



**Figura 1A.** Plántulas que luego fueron utilizadas como material fresco para la extracción de ADN.



**Figura 2A.** Planta de *Lotus tenuis* en el ensayo a campo

Planta	FMH	TM0046	TM0203	TM00208	TM0212	TM0083	BM1397	PRS612
1	447	aa	af	df	bg	af	kn	aa
2	447	aa	aa	aa	bi	an	jn	ah
3	447	dk	af	dd	be	fn	km	ac
4	447	ac	ei	cc	kk	bh	gl	jj
5	447	ad	be	dd	be	ff	km	ac
6	447	ah	ee	cc	bg	ce	gk	af
7	447	ad	dd	dd	ik	ff	il	gj
8	447	aa	dd	dd	bg	fo	kk	af
9	447	ad	ee	ad	gj	fo	ff	fi
10	447	ac	ee	bb	bg	be	gk	af
11	490	ad	af	ad	fh	ce	jj	dg
12	490	fi	eh	dd	bb	ee	ch	dg
13	490	gg	af	aa	ee	ef	ee	cc
14	490	el	ee	ad	dd	bc	jn	bb
15	490	bg	eg	ad	bf	eg	ee	ae
16	490	ag	af	aa	be	gp	dd	ac
17	490	af	af	ad	eh	fn	cc	cg
18	490	af	dd	ad	ej	pp	ff	cj
19	490	ai	eg	dd	bg	en	cj	
20	490	aa	af	dd	bb	co		cj
21	490	af	af	ag	ei	cd	el	ch
22	1193	dd	af	ac	bg	eo	kk	aa
23	1193	ad	dd	dd	bb	bf	gg	ff
24	1193	dd	dd	bh	bb	bb	gg	af
25	1193	ak	dd	ad	bg	af	gg	af
26	1193	af	af	cc	bb	bf	gk	af
27	1193	cg	ff	ac	dd	af	bg	af
28	1193	cc	af	bb	bb	bb		af
29	1193	ff	ee	bb	bg	be	gk	fg
30	1193	dd	aa	bb	bb	ee	hh	cf
31	1193	ac	ee	dd	bg	bf		af
32	1193	af	ee	ac	bg	bo		ac
33	691	dg	bk	ad	ab	ci	gg	
34	691	dg	ej	ad	ad	cc	gg	
35	691	dg	ag	aa	ee	ei	bf	

Para el análisis molecular de la varianza, *cluster* jerárquico y análisis de coordenadas principales se descartó el microsatélite PRS612 y las plantas 20, 28, 31 y 32.

**Cuadro 1A.** Datos genotípicos de cada planta evaluada. Cada locus corresponde a una columna y cada letra representa un alelo diferente para dicho locus.

Planta	FMH	TM0046	TM0203	TM00208	TM0212	TM0083	BM1397	PRS612
36	691	hk	ee	cc	bb	bq	jl	
37	691	ae	ej	cc	gg	bc	ac	
38	691	df	bd	aa	bb	or	hh	
39	691	gj	ee	dd	bb	de	hh	
40	691	ee	bf	ad	be	dq	hj	
41	691	aj	cg	ee	ee	cl	ij	
42	691	aj	ee	cc	bb	cc	hl	
43	691	gj	eg	ad	bb			
44	691	aj	ej	ad	ii	dj	ll	
45	691			dd		cj		
46	691	aj	ee	dd	cc	cd	dd	
47	691	ee	af	dd	bb	cj	ij	
48	691	gg	ak	cc	cc	dj	hh	
49	691	gg	be	cc	ci	br	kk	
50	691	gg	dd	cc		dj		
51	691	ag		aa		fj		
52	1897	ee	eh	bb	cd	cg	mm	
53	1897	dd	aa	cc	de	gk	mm	
54	1897	ek	af	gg	dd	bg	hh	
55	1897	de	ee	aa	di	gm	ee	
56	1897	dh	ae	cc	dd	ce	kk	
57	1897	dd	ae	cc	bd	ck	ej	
58	1897	dj	eh	ac	bb	ef	jl	
59	1897	dd	ad	cc				
60	1897	dd	dd		cc	cd	ff	
61	1897		ee			cg		
62	1897		dd	ff	cc	ce		
63	1897	ee	ee	af		gp		
64	1897	ee	eh	bb	de	gh		
65	1897	ae	ee	gg	dd			
66	1897	ee	dd		cc	cd		
67	1897	ee	dd		cc			
68	1897	dd	af	bb	cc	cg		
69	1897		dd	cc	cc	bf		

Para el análisis molecular de la varianza, *cluster* jerárquico y análisis de coordenadas principales se descartó el microsatélite PRS612 y las plantas 43, 45, 50, 51, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69.

**Cuadro 1A (Continuación).** Datos genotípicos de cada planta evaluada. Cada locus corresponde a una columna y cada letra representa un alelo diferente para dicho locus

### Cuadros de Análisis de la Variancia para las variables estudiadas

#### **V0**

<b>F.V.</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>Pr &gt; F</b>
Modelo	7	20.27500000	2.89642857	5.82	<.0001
FMH	7	20.27500000	2.89642857	5.82	<.0001
Error	152	75.70000000	0.49802632		
Total	159	95.97500000			

#### **V1**

<b>F.V.</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>Pr &gt; F</b>
Modelo	9	76.4722222	8.4969136	9.30	<.0001
Bloque	2	19.10555556	9.55277778	10.46	<.0001
FMH	7	57.36666667	8.19523810	8.97	<.0001
Error	350	319.6500000	0.9132857		
Total	359	396.1222222			

#### **NTV1**

<b>F.V.</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>Pr &gt; F</b>
Modelo	9	199.302778	22.144753	3.27	0.0008
Bloque	2	86.3722222	43.1861111	6.37	0.0019
FMH	7	112.9305556	16.1329365	2.38	0.0217
Error	350	2371.227778	6.774937		
Total	359	2570.530556			

**D1**

<b>F.V.</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>Pr &gt; F</b>
Modelo	9	1523.55794	169.28422	5.57	<.0001
Bloque	2	182.799389	91.399694	3.01	0.0507
FMH	7	1340.758556	191.536937	6.30	<.0001
Error	350	10639.36994	30.39820		
Total	359	12162.92789			

**V2**

<b>F.V.</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>Pr &gt; F</b>
Modelo	9	28.8388889	3.2043210	7.65	<.0001
Bloque	2	2.31666667	1.15833333	2.76	0.0644
FMH	7	26.52222222	3.78888889	9.04	<.0001
Error	350	146.6611111	0.4190317		
Total	359	175.5000000			

**NTV2**

<b>F.V.</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>Pr &gt; F</b>
Modelo	9	5149.65323	572.18369	8.50	<.0001
Bloque	2	767.927442	383.963721	5.71	0.0037
FMH	7	4381.725784	625.960826	9.30	<.0001
Error	309	20789.68220	67.28052		
Total	318	25939.33542			

**D2**

<b>F.V.</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>Pr &gt; F</b>
Modelo	9	4422.37998	491.37555	8.28	<.0001
Bloque	2	873.619103	436.809551	7.36	0.0008
FMH	7	3548.760873	506.965839	8.55	<.0001
Error	293	17378.29686	59.31159		
Total	302	21800.67683			

**V3**

<b>F.V.</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>Pr &gt; F</b>
Modelo	8	12.24103106	1.53012888	2.03	0.0487
Bloque	1	0.20491803	0.20491803	0.27	0.6029
FMH	7	12.03611303	1.71944472	2.28	0.0326
Error	113	85.07864107	0.75290833		
Total	121	97.31967213			

**NTV3**

<b>F.V.</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>Pr &gt; F</b>
Modelo	8	26384.2871	3298.0359	3.74	0.0007
Bloque	1	0.81967	0.81967	0.00	0.9757
FMH	7	26383.46738	3769.06677	4.27	0.0003
Error	113	99756.3687	882.7997		
Total	121	126140.6557			

**D3**

<b>F.V.</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>Pr &gt; F</b>
Modelo	8	10241.54782	1280.19348	4.14	0.0002
Bloque	1	914.393443	914.393443	2.95	0.0884
FMH	7	9327.154381	1332.450626	4.31	0.0003
Error	113	34971.10791	309.47883		
Total	121	45212.65574			