



ASOCIACIÓN DE LABORATORIOS
AGROPECUARIOS PRIVADOS

BOLETÍN TÉCNICO

Análisis cromosómico aplicado a la diferenciación de Lotus Tenuis y L. Corniculatus (FABACEAE)



(Izq) Ing. Agr. Adriana Inés Celotto^{1, 2} - (Der) Dra. Andrea Mariel Sanso^{1, 3}
(1) Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA - Tandil
(2) Laboratorio Horizonte - Tandil
(3) CONICET
E-mail: acelotto@arnet.com.ar

Palabras claves: Lotus tenuis, L. corniculatus, número cromosómico.

RESUMEN

En la región de la pampa deprimida, debido al déficit de leguminosas nativas de los pastizales naturales, Lotus tenuis Waldst & Kit. y L. corniculatus L. son utilizadas como especies forrajeras por sus buenas cualidades nutritivas y preferencia animal. Se trata de especies de gran interés agronómico, estrechamente relacionadas, con gran similitud fenotípica pero con distintas aptitudes forrajeras, ecológicas y valor económico.

Las semillas de estas especies de Lotus no manifiestan características macromorfológicas que permitan diferenciarlas. Tampoco pueden ambas especies identificarse tempranamente en forma concluyente, considerando las características morfológicas de las plántulas.

Nuestra investigación surge como respuesta a la necesidad de diferenciar estas dos especies en el estado de semilla o durante la germinación utilizando metodologías que resulten suficientemente rápidas, confiables, económicas y reproducibles. Para ello, se llevaron a cabo estudios cromosómicos.

Se lograron estandarizar las técnicas citogenéticas para estudiar cromosómicamente a L. tenuis ($2n = 12$) y a L. corniculatus ($2n = 24$). Los cultivares estudiados resultaron ser homogéneos en relación al número cromosómico aunque se encontraron algunos individuos con números diferentes.

El análisis de muestras provistas por laboratorios privados reveló que se distribuye bajo distintas denominaciones la misma especie. Suele comercializarse L. corniculatus bajo la denominación de L. tenuis.

El análisis cromosómico, brinda resultados rápidos, confiables y reproducibles para la diferenciación específica entre ambas especies. Las técnicas citogenéticas utilizadas podrían implementarse en laboratorios con un limitado equipamiento y un relativo bajo costo.

INTRODUCCIÓN

El género Lotus L. (familia Fabaceae) comprende alrededor de doscientas especies anuales o perennes, ampliamente distribuidas en todo el mundo. En la región de la pampa deprimida, debido al déficit de leguminosas nativas de los pastizales naturales, Lotus tenuis Waldst. & Kit. [= L. glaber Mill. (Kirkbride, 2006)] y Lotus corniculatus L. son utilizados como especies forrajeras por sus buenas cualidades nutritivas y preferencia animal (Lagler, 2003).

L. tenuis y L. corniculatus son dos especies estrechamente relacionadas y de gran interés agronómico, con gran similitud fenotípica pero con distintas aptitudes forrajeras ecológicas y valor económico. Presentan dificultades para ser identificadas en el estado de semilla o en el de plántula. Las semillas no manifiestan características macromorfológicas que permitan diferenciarlas. Normalmente, tampoco pueden ser identificadas tempranamente, en forma concluyente, mediante características morfológicas de las plántulas.

Se ha cuantificado en varios cultivares de L. corniculatus el peso de los mil granos, siendo el mismo muy variable (Montes, 1992). Incluso, los valores menores encontrados en esta especie son cercanos a los del L. tenuis, por lo que ésta no sería una característica confiable para diferenciarlos, especialmente en muestras de semilla conteniendo una mezcla de especies.

Si bien se han citado a las plántulas de L. tenuis con epicótilo y folíolos de la primera hoja glabros y a las de L. corniculatus con pelos blancos (Piergentili, 1969), existen variaciones de este carácter dentro de la misma especie, lo que impide una diferenciación concluyente (Lagler, 2003).

El número cromosómico, reportado por distintos autores extranjeros es mayoritariamente $2n=4x=24$ para L. corniculatus (Blaise & Cartier, 1982; Lemmi & Negri, 1994; O'Donoghue & al., 1990) y $2n=2x=12$ para L. tenuis. (Baltisberger, 1990; Lövkvist & Hultgård, 1999). Sin embargo, hay citas de $2n=12$ para L. corniculatus (Kumari & Bir, 1990) y de $2n=24$ para L. tenuis (Yan, & al., 1989). Si bien L. corniculatus es generalmente conocida como especie tetraploide (Beuselinck & Grant, 1995; Grant, 1991), se han reportado poblaciones diploides de la misma (Grant, 1995).

Nuestra investigación surge como respuesta a la necesidad de diferenciar estas dos especies en el estado de semilla o durante la germinación utilizando metodologías que resulten suficientemente rápidas, confiables, económicas y reproducibles.

Los objetivos fueron comprobar si los números cromosómicos y los niveles de ploidía, reportados por distintos autores extranjeros, $2n=4x=24$ para L. corniculatus y $2n=2x=12$ para L. tenuis, se corresponden con los de cultivares y poblaciones naturalizadas en Argentina y determinar si distintos cultivares de ambas especies son homogéneos en cuanto al número cromosómico. Fue necesario poner a punto las técnicas conocidas de citogenética vegetal para que se adecuen al estudio de ambas especies, en cuanto a condiciones de pretratamiento, fijación y tinción.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron semillas de ambas especies provenientes de cultivares registrados por semilleros o entidades oficiales en el Instituto Nacional de Semillas (INASE), *L. tenuis* Pampa INTA, *L. tenuis* Tresur Chajá KWS, *L. tenuis* Esmeralda Gentos, *L. corniculatus* Kontakt KWS, *L. corniculatus* Gladiador Gentos, y de poblaciones de productores que llevan a analizar muestras de las mismas a laboratorios pertenecientes a la Asociación de Laboratorios Agropecuarios Privados (ALAP).

El recuento y análisis de los cromosomas mitóticos fue realizado en células meristemáticas de ápices de raicillas obtenidas a partir de semillas en germinación. Se ensayaron distintos pretratamientos en raíces de 2-3 mm de longitud:

- solución acuosa de 2 mM 8- hidroxiquinoleína.
- frío (4° C), únicamente en agua.
- colchicina al 0,05%.
- Debido a que los mejores resultados se obtuvieron utilizando colchicina, este pretratamiento fue el elegido.

Posteriormente al pretratamiento, las raíces fueron enjuagadas en agua y fijadas en una solución mezcla de etanol: ácido acético glacial (3:1). Para ser conservadas a 4-5 °C, se las cambió a una solución de alcohol 70 %.

Se realizó una hidrólisis en ácido clorhídrico (HCl) 5N y enjuagues en agua destilada para detener la hidrólisis. La coloración se hizo mediante hematoxilina propiónica al 2% utilizando en ocasiones citrato férrico como mordiente.

Los preparados se realizaron por aplastamiento, se sellaron para su conservación y se observaron al microscopio óptico. De algunos de ellos se obtuvieron fotomicrografías.

RESULTADOS

En la figura 1 se muestran fotomicrografías de cromosomas pertenecientes a algunos de los materiales estudiados.

Los cultivares *L. tenuis* Pampa INTA, *L. tenuis* Tresur Chajá KWS y *L. tenuis* Esmeralda Gentos, presentaron entre un 96 y un 99 % de individuos con $2n = 12$. Por otro lado, *L. corniculatus* Kontakt KWS y *L. corniculatus* Gladiador Gentos exhibieron entre un 98 y un 99 % de individuos con $2n = 24$. En muestras de *L. tenuis* se hallaron individuos que no presentaron alguno de los dos números esperados, sino un $2n=18$

El análisis de muestras provistas por laboratorios privados bajo la denominación *L. tenuis* reveló que la mayoría de los individuos (aproximadamente un 80 %) poseía un $2n = 24$.

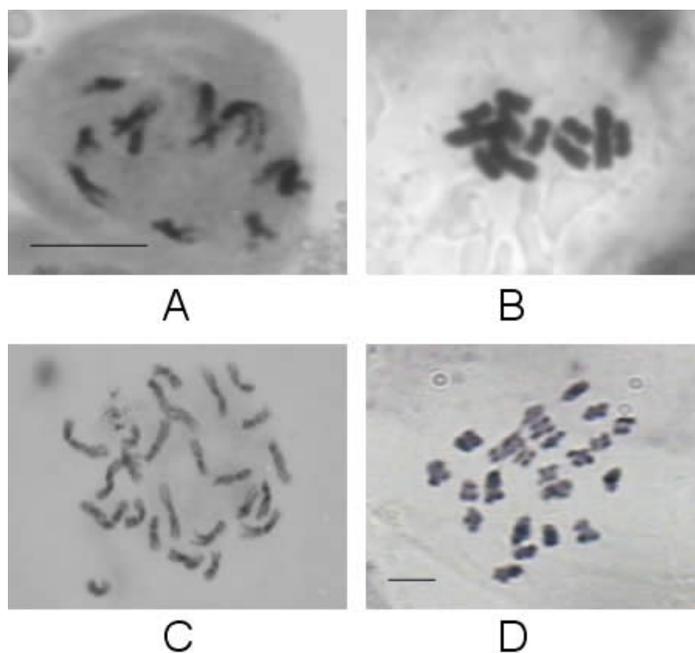


Figura 1.- Cromosomas mitóticos.

A-B *Lotus tenuis*, $2n=12$;

C-D *Lotus corniculatus*, $2n=24$.

Todas las fotomicrografías obtenidas con 1000 X. Barras = 10 μ m. A-C, y D con el mismo aumento.

DISCUSIÓN

Los datos obtenidos en este estudio a partir de los cultivares Gladiador de Gentos y Kontakt de KWS confirman el número cromosómico $2n=4x=24$ para *L. corniculatus* (Blaise & Cartier, 1982; Lemmi & Negri, 1994; O' Donoghue & al., 1990). Aquellos obtenidos a partir de Pampa INTA, Esmeralda de Gentos y Tresur Chajá concuerdan con un $2n=2x=12$ para *L. tenuis*, número citado previamente por algunos autores como Baltisberger (1990) y Lövkvist & Hultgård (1999).

Los cultivares estudiados resultaron ser casi homogéneos en relación al número cromosómico, aunque se encontraron algunos pocos individuos con números diferentes.

Se han ensayado otras técnicas y propuestos otros tipos de caracteres para la diferenciación de estas especies. En base a estudios isoenzimáticos de folíolos Esteves & al. (1996) reportaron que ambas especies poseían patrones electroforéticos similares excepto para la enzima peroxidasa. Pallares & al. (2000), en base a estudios de proteínas seminales, encontraron algunas diferencias en los perfiles electroforéticos de ambas especies. Sin embargo, muchas de estas diferencias en relación a las bandas fueron cuantitativas y no cualitativas. Kade & al. (1997) pudieron identificar *L. corniculatus* por la presencia de quercetina-3-O-xilosida en muestras de semillas de *L. tenuis* mediante un test de flavonoides.

Los métodos previamente enumerados requieren de más tiempo para ser llevados a cabo y los resultados, en la mayoría de ellos, no permiten de manera totalmente concluyente diferenciar ambas especies. En contraste, el análisis cromosómico permite, con certeza y rapidez, la diferenciación específica entre *L. tenuis* y *L. corniculatus*.

CONCLUSIONES

Mediante los estudios realizados se logró estandarizar técnicas citogenéticas para obtener resultados rápidos, confiables y reproducibles en ambas especies de *Lotus*, *L. tenuis* y *L. corniculatus*. Las mismas podrían ser implementadas en todos los laboratorios acreditados por el INASE con un limitado equipamiento y un relativo bajo costo, por lo que su transferencia al sector productivo es muy posible.

Muestras provistas por laboratorios pertenecientes a ALAP, revelaron que se distribuye bajo distintas denominaciones la misma especie. En ocasiones, se comercializa *L. corniculatus* (de menor valor comercial) o semillas mezcladas de ambas especies por *L. tenuis*. Esto perjudica al productor que pretende adquirir *L. tenuis* con un alto porcentaje de pureza varietal. Como se ha citado en la introducción, si bien ambas especies son fenotípicamente muy similares, poseen distintas aptitudes forrajeras, ecológicas y valor económico.

BIBLIOGRAFIA

- Baltisberger, M. 1990. Numeri cromosomici per la flora Italiana. *Informatore Botanico Italiano* 22: 1208-1230.
- Beuselink, P.R. & Grant, W. F. 1995. Birdsfoot trefoil. In *Forages*. Vol. 1. An introduction to grassland agriculture. 5th. Ed. Edited by R. F. Barnes, D. A. Miller and C. J. Nelson. Iowa State, University Press, Ames, Iowa, pp. 237-248.
- Blaise, S. & Cartier, D. 1982. Notes caryologiques à propos de quelques espèces récoltées dans l'Apennin central. *Informatore Botanico Italiano* 14.
- Esteves, P.; Kade, M; Dizeo, C. & Casi, O.H. 1996. Variabilidad isoenzimática en dos especies del género *Lotus*. XXI Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. Resúmenes: 392-393.
- Grant, W.F. 1991. Chromosomal evolution and aneuploidy in *Lotus*. In *Chromosome engineering in plant genetics: genetics, breeding, evolution*. Part B. Edited by T. Tsuchiya and P. K. Gupta. Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam. The Netherlands. Pp. 429- 447.
- Grant, W.F. 1995. A chromosome atlas and interspecific- intergeneric index for *Lotus* and *Tetragonolobus* (Fabaceae). *Canadian Journal of Botany* 73: 1787-1809.
- Kade, M.; Wagner, M.L.; Strittmatter, C.D.; Ricco, R.A. & Gurni, A.A. 1997. Identification of *Lotus tenuis* and *L. corniculatus* seed by flavonols. *Seed Sciences and Technology* 25: 585-587.
- Kirkbride, J.H. 2006. The scientific name of narrow-leaf trefoil. *Crop Breeding & Genetic Notes*: 2169-2170.
- Kumari, S. & Bir, S.S. 1990. Karyomorphological evolution in Papilionaceae. *Journal of Cytology and Genetics* 25: 33-35.
- Lagler, J.C. 2003. *Lotus*: Un género que no acaba en dos especies. *Revista Forrajes & Granos* 62: 72-76.
- Lemmi, G. & Negri, V. 1994. Research on 2n pollen production in *Lotus tenuis* at I.M.G.V. of Perugia University. *Lotus Newsletter* 25: 12-14.
- Lövkvist, B. & Hultgård, U-M. 1999. Chromosome numbers in south Swedish vascular plants. *Opera Botanica* 137: 142.
- Montes, L. 1992. Morphological and agronomical characterization of *Lotus corniculatus*. *Lotus Newsletter* 23:6-8.
- O' Donoghue, L.S.; Raelson, J.V. & Grant, W.F. 1990. A morphological study of interspecific hybrids in the genus *Lotus* (Fabaceae). *Canadian Journal of Botany* 68: 803-812.
- Pallares, I.; Ferrari, L. & Ritta, M. 2000. Discrimination between seed storage proteins of *Lotus glaber* and *L. corniculatus* by P.A.G.E. *Seed Science and Tecnology* 28(3): 769-777.
- Piergentili, D. 1969. Plántulas de Trifolias y Loteas forrajeras cultivadas y naturalizadas en la provincia de Buenos Aires. *Revista de la Facultad de Agronomía* 45: 93-132.
- Yan, G.X.; Zhang, S.Z.; Yan, J.F.; Fu, X.Q. & Wang, L.Y. 1989. Chromosome numbers and geographical distribution of 68 species of forage plants. *Grassland of China* 4: 53-60.

[IMPRIMIR]