

LOTASSA:

*Un puente entre la genómica
y las pasturas del siglo XXI*



Contrato N° 517617





LOTASSA:

*Un puente entre la genómica
y las pasturas del siglo XXI*



© Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA).2010

El Instituto promueve el uso justo de este documento. Se solicita que sea citado apropiadamente cuando corresponda

Esta publicación también está disponible en formato electrónico (PDF) en el sitio Web institucional en <http://www.iica.int>

Coordinación editorial: Juan Sanjuán, Monica Rebuffo

Corrección de estilo: Juan Sanjuán y Monica Rebuffo

Diagramado. Esteban Grille

Diseño de portada: Esteban Grille

Impresión: Imprenta Boscana

LOTASSA: un puente entre la genómica y las pasturas del siglo XXI / PROCISUR -- Montevideo: IICA, 2010.

71 p., 18,7 x 26,5 cm

ISBN 978-92-9248-294-7

1. Recursos genéticos 2. Plantas forrajeras 3. Pastizales 4. Lotus 5. Lotus japonicus 6. Uruguay 7. Brasil 8. Chile 9. España 10. Portugal 11. Europa I. IICA II. Título

AGRIS

DEWEY

F30

581.15

Montevideo, Uruguay - 2010

Presentación

Como cierre del proyecto **LOTus Adaptation and Sustainability in South America – LOTASSA**, se realizó la siguiente publicación síntesis que recoge los resultados más relevantes generados durante su ejecución. La naturaleza de un proyecto como este, que estuvo integrado por 14 instituciones de Europa y del Cono Sur de América, amerita una sostenida difusión de sus resultados a todo nivel, tanto para que usuarios de distintos ámbitos puedan aprovechar los avances generados, como también para que grupos interdisciplinarios de investigadores generen nuevos proyectos sobre la base del avance científico y tecnológico alcanzado con LOTASSA.

Otro aspecto importante de esta publicación es divulgar una metodología de trabajo de alto valor científico y orientada a la solución de problemas y vacíos de conocimientos de impacto en grandes zonas consideradas marginales en los países del Cono Sur de América Latina. La concentración de recursos de investigación y de capacidades científicas en zonas con limitaciones es una necesidad imperiosa para los próximos años en esta región. Consideramos que en ese tema LOTASSA ha sido un proyecto pionero y esperamos que la difusión de sus resultados sea valorada por los tomadores de decisiones al momento de la asignación de recursos.

Hasta ahora la mayor cantidad de recursos para investigación, tanto pública como privada, como es lógico se ha concentrado en zonas de alto potencial y de gran impacto productivo, social y económico. Pero hoy, con la creciente demanda alimentaria y escasez de territorios de alto potencial productivo, cobra una mayor relevancia la focalización de proyectos en zonas con limitaciones, para ir gradualmente generando innovaciones tecnológicas que transformen estas áreas consideradas marginales en nuevos recursos productivos sustentables para la creciente demanda alimentaria mundial.

El Programa Cooperativo para el Desarrollo Tecnológico Agroalimentario y Agroindustrial del Cono Sur – PROCISUR, desde sus inicios ha venido promoviendo el uso sustentable de los recursos naturales. Esperamos que esta publicación sea de utilidad para toda la región, y al mismo tiempo sirva de estímulo a los equipos técnicos que han hecho este valioso aporte, para que continúen en la búsqueda de nuevos conocimientos y formas de difusión en beneficio de los agricultores y de nuestros recursos naturales.

Emilio Ruz

Secretario Ejecutivo
PROCISUR

Contenido

| | |
|---|-----------|
| Introducción | 7 |
| Capítulo 1. Colecciones y bases de datos asociadas | 11 |
| 1.1. Introducción | 11 |
| 1.2. La colección vegetal de LOTASSA | 11 |
| 1.3. La base de datos de <i>Lotus</i> | 12 |
| 1.4. Colección de rizobios de <i>Lotus</i> y base de datos asociada..... | 13 |
| Capítulo 2. Especies modelo de <i>Lotus</i> | 17 |
| 2.1. Introducción | 17 |
| 2.1. Ecotipos de <i>Lotus japonicus</i> y especies de <i>Lotus</i> vinculadas..... | 17 |
| 2.3. Líneas recombinantes endocriadas (RILs) y QTLs..... | 18 |
| 2.4. Marcadores de ADN: Sintenia..... | 19 |
| 2.5. Marcadores de ADN para las especies de <i>Lotus</i> | 20 |
| 2.6. Mutantes y genes de <i>Lotus japonicus</i> | 21 |
| 2.7. Aplicación biotecnológica de genes sensibles al estrés abiótico en <i>Lotus japonicus</i> | 21 |
| Capítulo 3. Investigaciones sobre déficit hídrico en <i>Lotus</i> | 25 |
| 3.1. Introducción | 25 |
| 3.2. Selección de poblaciones de <i>Lotus</i> spp. tolerantes a sequía en Chile | 25 |
| 3.3. Selección de poblaciones tolerantes a sequía en Uruguay..... | 26 |
| 3.4. Comparación de la respuesta a sequía entre plantas modelo y plantas cultivadas..... | 27 |
| 3.5. Medidas de eficiencia en el uso del agua..... | 27 |
| 3.6. Alteraciones de la fotosíntesis durante la sequía..... | 29 |
| 3.7. Acumulación de prolina en respuesta a estrés hídrico..... | 30 |
| 3.8. Cambios en el transcriptoma y metaboloma durante el estrés hídrico en <i>Lotus</i> | 31 |
| Capítulo 4. Respuestas al estrés salino en <i>Lotus</i> spp. | 37 |
| 4.1. Introducción | 37 |
| 4.2. Defensas enzimáticas antioxidantes | 38 |
| 4.3. Acumulación de prolina y poliaminas | 39 |
| 4.4. Genómica comparativa funcional de aclimatación a la sal en especies de <i>Lotus</i> modelo y cultivadas..... | 41 |
| 4.5. Conclusiones..... | 43 |
| Capítulo 5. Estrés por pH ácido y por aluminio | 47 |
| 5.1. Introducción | 49 |

| | |
|--|-----------|
| 5.2. Alteraciones metabólicas en respuesta al Al..... | 49 |
| 5.3. Respuesta radicular al estrés por Al..... | 51 |
| 5.4. Comparación de la respuesta a Al entre plantas modelo y plantas cultivadas..... | 51 |
| 5.5. Selección de poblaciones de <i>Lotus corniculatus</i> tolerantes a estrés por Al en Brasil..... | 53 |
| 5.6. Selección de poblaciones tolerantes a Al en Chile..... | 54 |
| 5.7. Conclusiones..... | 55 |
| Capítulo 6. Fijación simbiótica de nitrógeno por <i>Lotus</i> | 57 |
| 6.1. Introducción | 57 |
| 6.2. Uruguay..... | 59 |
| 6.3. Brasil | 59 |
| 6.4. Argentina..... | 59 |
| 6.5. Chile..... | 60 |
| 6.6. España y Portugal..... | 60 |
| 6.7. Europa Central y del Norte..... | 60 |
| 6.8. Conclusiones finales..... | 60 |
| Capítulo 7. Publicaciones..... | 65 |
| Lista de investigadores..... | 69 |

Introducción

El proyecto LOTASSA surgió como una iniciativa de cooperación científico-tecnológica entre instituciones de Europa y Latinoamérica bajo los auspicios del VI Programa Marco de la Unión Europea. Tanto en su contenido como en su modelo de gestión, LOTASSA representó una excelente oportunidad para abordar investigaciones sobre leguminosas forrajeras para suelos marginales, problemática de gran impacto para la ganadería del Cono Sur de América Latina. En el proyecto participaron 16 grupos pertenecientes a 14 instituciones de 4 países del Cono Sur y 4 países europeos, y su coordinación corrió a cargo del Dr. Juan Sanjuán (CSIC, España), quien junto a la Ing. Mónica Rebuffo (INIA, Uruguay) fueron los responsables de la coordinación científica del mismo.

En este proyecto se aprovechó la estrecha relación entre las especies forrajeras de *Lotus* y la “planta modelo” *Lotus japonicus* para investigaciones genéticas y genómicas. Con esta estrategia se buscó desarrollar nuevos recursos genéticos específicos y herramientas biotecnológicas para asistir y acelerar el mejoramiento de genotipos que posean buena adaptación a ambientes con restricciones abióticas (sequía, salinidad, pH y toxicidad por Al). Al mismo tiempo se abordó la problemática de la fijación simbiótica de nitrógeno, mediante la identificación y selección de cepas bacterianas con alto potencial como inoculantes de praderas de *Lotus* adaptados a suelos con limitaciones abióticas.

Algunos de los resultados más relevantes obtenidos por LOTASSA han sido:

- Una colección de especies, genotipos e híbridos interespecíficos de *Lotus* caracterizados a nivel genético, bioquímico o fisiológico en su respuesta a estreses abióticos, incorporados a una bases de datos.
- Una colección con centenares de cepas de rizobios, procedentes de Europa y del Cono Sur, identificadas molecularmente a nivel taxonómico y caracterizadas para su interacción con el ambiente con especies forrajeras de *Lotus*, incorporadas a una base de datos de acceso público.
- Un conjunto de genes y otros marcadores genéticos identificados en *Lotus* y asociados con la respuesta adaptativa frente a estreses abióticos.
- La caracterización de una amplia variedad de respuestas metabólicas y fisiológicas de las especies de *Lotus*, identificadas y caracterizadas para la tolerancia a estreses abióticos.

Muchas de las herramientas y recursos biológicos desarrollados por el proyecto LOTASSA servirán para apoyar la obtención rápida y eficiente de futuras variedades vegetales, con alta productividad en suelos y ambientes marginales. Otras serán de utilidad para la producción de inoculantes de *Lotus* particularmente eficientes para la fijación de nitrógeno en tales ambientes degradados.

En esta publicación se detallan los resultados más relevantes de LOTASSA, que son presentados en forma de capítulos para facilitar su comprensión, así como un listado de todas las personas que han participado en el mismo.



Capítulo 1.

Colecciones y bases de
datos asociadas

Capítulo 1. Colecciones y bases de datos asociadas



1.1. Introducción

El género *Lotus* se ha usado históricamente en el Cono Sur para mejorar las pasturas. El objetivo de LOTASSA es contribuir a la sustentabilidad de las pasturas en la región a través de la generación de herramientas biotecnológicas y productos biológicos que permitan el desarrollo de mejores adaptaciones de las especies forrajeras de *Lotus corniculatus* L., *L. tenuis* Waldst. et Kit. (Sin. *L. glaber* Mill.), *L. uliginosus* Schkuhr (Sin. *L. pedunculatus* Cav.) y *L. subbiflorus* Lag. en suelos que sufren sequía, acidez o salinidad. El proyecto LOTASSA aprovechó la existencia de la especie modelo *Lotus japonicus* L. para desarrollar herramientas que permitan acelerar el mejoramiento genético de especies cultivadas. En paralelo, el proyecto trabajó en la identificación y caracterización de cepas de rizobios que garanticen una óptima fijación de N en dichos suelos, mejorando así la productividad, calidad y sustentabilidad de pasturas de *Lotus* en suelos marginales.

Un elemento fundamental para que la estrategia tuviese éxito fue lograr resultados comparables e intercambiables entre los grupos de investigación participantes, como un acercamiento para desarrollar herramientas útiles y aumentar el conocimiento en las diferentes disciplinas de investigación. Como cada grupo de investigación tiene sus propios métodos de trabajo, el Consorcio acordó compartir los materiales biológicos y los resultados obtenidos para prevenir las diferencias en el desarrollo y validación de la metodología de evaluación. De esta manera, todos los par-

ticipantes usaron los mismos materiales de planta y bacteria así como compartieron los métodos de investigación.

1.2. La colección vegetal de LOTASSA

La creación de la Colección LOTASSA empezó mucho antes que el Proyecto, con germoplasma que proporcionó la Univ. de Aarhus y multiplicó INIA Uruguay. La Colección empezó con 8 entradas (*L. japonicus* ecotipos Gifu y MG-20, *L. filicaulis* Durieu, *L. burttii* Borsos, 3 entradas de *L. corniculatus* y 1 entrada de *L. uliginosus* 2n; Tabla 1). Cuando fue necesario, los sets de semillas producidos según protocolos estándares de aislamiento se entregaron a la Colección LOTASSA en INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay. Por supuesto, este es un trabajo laborioso que requiere dedicación sin un retorno científico inmediato. Sin embargo, el conocimiento de los participantes de que la contribución de cada componente del Proyecto es necesaria para el bien común en el largo plazo aseguró que los participantes aceptaran este programa.

Al final del proyecto la colección LOTASSA incluía 886 entradas de especies de *Lotus* modelo y cultivadas, incluyendo 239 Líneas Recombinantes Endocriadas (RILs en inglés) de híbridos interespecíficos, 7 mutantes, 10 cultivares testigos y 24 poblaciones mejoradas de especies cultivadas. La colección estuvo activa durante toda la ejecución del Proyecto, con un total de de 1446 materiales intercambiados con los 15 laboratorios que llevaron a cabo investigación dentro de LOTASSA.

Tabla 1. Origen y tipo de germoplasma en la colección vegetal de LOTASSA

| Estatus de la colección | Especies modelo | | | | Especies cultivadas | | |
|-------------------------|-----------------|---------------|---------------|----------|---------------------|----------------------|----------|
| | Parentales | Híbridos GxLB | Híbridos LFxG | Mutantes | Testigos | Germoplasma mejorado | Híbridos |
| Colección inicial | 4 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 |
| Colección LOTASSA | 4 | 151 | 88 | 7 | 10 | 24 | 602 |
| Muestras intercambiadas | 101 | 799 | 246 | 47 | 75 | 8 | 170 |

La colección de especies cultivadas empezó con una selección de cultivares y poblaciones regionales que representan el germoplasma comúnmente usado en el Cono Sur para ser utilizado como testigos. Los primeros materiales fueron los cultivares de *L. corniculatus* cv. San Gabriel, Estanzuela Ganador, INIA Draco, *L. uliginosus* diploide LE 627 de INIA Uruguay, y más tarde la inclusión de *L. corniculatus* São Gabriel y UFRGS de Brasil, *L. tenuis* cv. Esmeralda de INTECH, Argentina y Lg 3 y Lg 8 de INIA Chile, *L. uliginosus* ecotipos Lu A y Lu 1 de INIA Chile, entre otros. El Consorcio desarrolló 24 poblaciones divergentes seleccionadas por su comportamiento frente a sequía, acidez o salinidad que se describen en los capítulos correspondientes.

Los pedidos de material por los participantes fueron realizados indicando por escrito el uso propuesto. Todos los materiales conservados son de libre acceso para los miembros de la red bajo MTA. Para otros, la colección de LOTASSA estará sólo disponible en base a MTA. La única condición exigida fue informar de los resultados que se recogen del germoplasma recibido en la Base de Datos de *Lotus*. Esto permite que el equipo de LOTASSA mejore nuestro conocimiento del material y su adaptabilidad a ambientes diferentes.

1.3. La base de datos de *Lotus*

La información se hizo disponible usando varias estrategias diferentes: reuniones del proyecto, publicando artículos e informes, organizando foros electrónicos y proporcionando

bases de datos de germoplasma de *Lotus* y de rizobio en el sitio web de LOTASSA (Figuras 1 y 2). En este contexto, la Base de Datos *Lotus* ha sido también una parte activa en la disseminación de la información y promoviendo su intercambio. Esta base de datos, que está exclusivamente disponible para los miembros del Proyecto en la actualidad, se desarrolló mediante el acuerdo de PROCISUR con la unidad de documentación de recursos genéticos de INTA Castelar, liderada por el Dr. Julio Tilleria (Argentina).

Los pasaportes de las bases de datos contienen información fenotípica colectada en forma individual y por grupos de investigación del Consorcio, aumentando rápidamente el valor potencial del germoplasma modelo y ofreciendo la oportunidad de explorar la información para mejorar las leguminosas forrajeras. La cantidad y calidad de información generadas por LOTASSA es transferida en su capacidad plena a través del desarrollo de esta base de datos, con una interfaz fácil de usar que se expande más allá del simple almacenamiento de información. La estructura de esta base de datos relacionada contiene un sistema para acceder a una búsqueda específica o a un rango de información que describe una accesión de germoplasma determinada. La utilización de la información fisiológica y genética ingresada por cada equipo de LOTASSA a través del sistema, proporcionará en el futuro cercano a otros usuarios el complemento de información más pleno posible de la Colección LOTASSA, con la información exacta para los testigos y accesiones mejoradas ca-

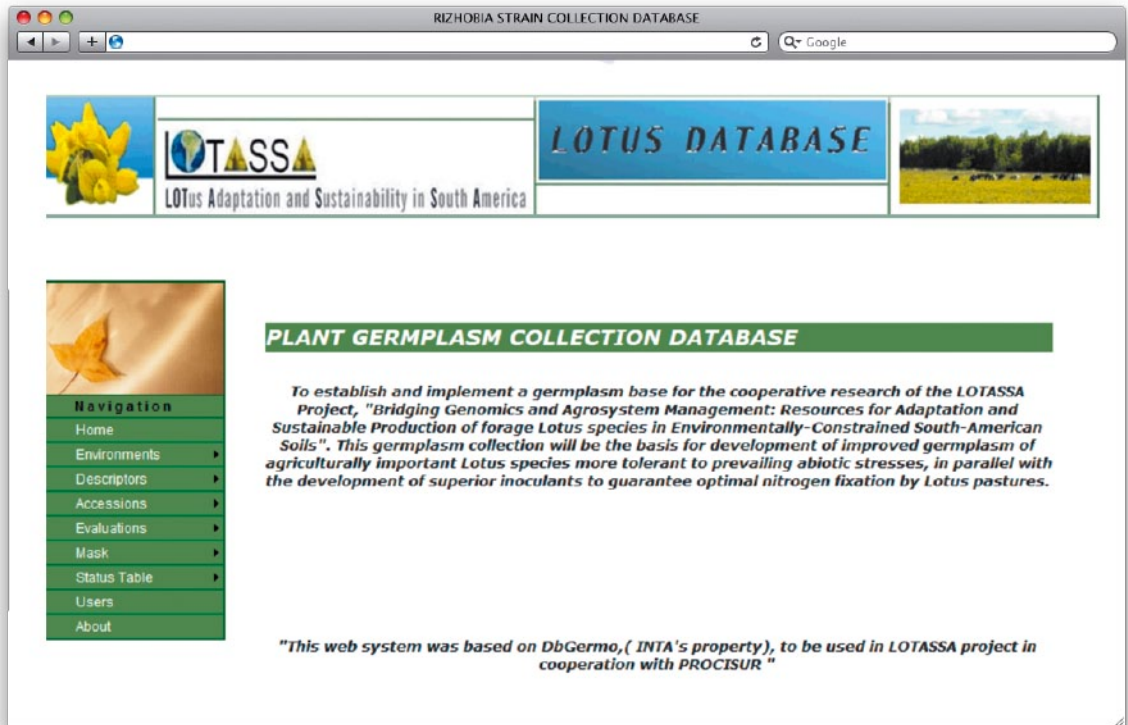


Figura 1. Página inicial de la Base de Datos de Lotus.

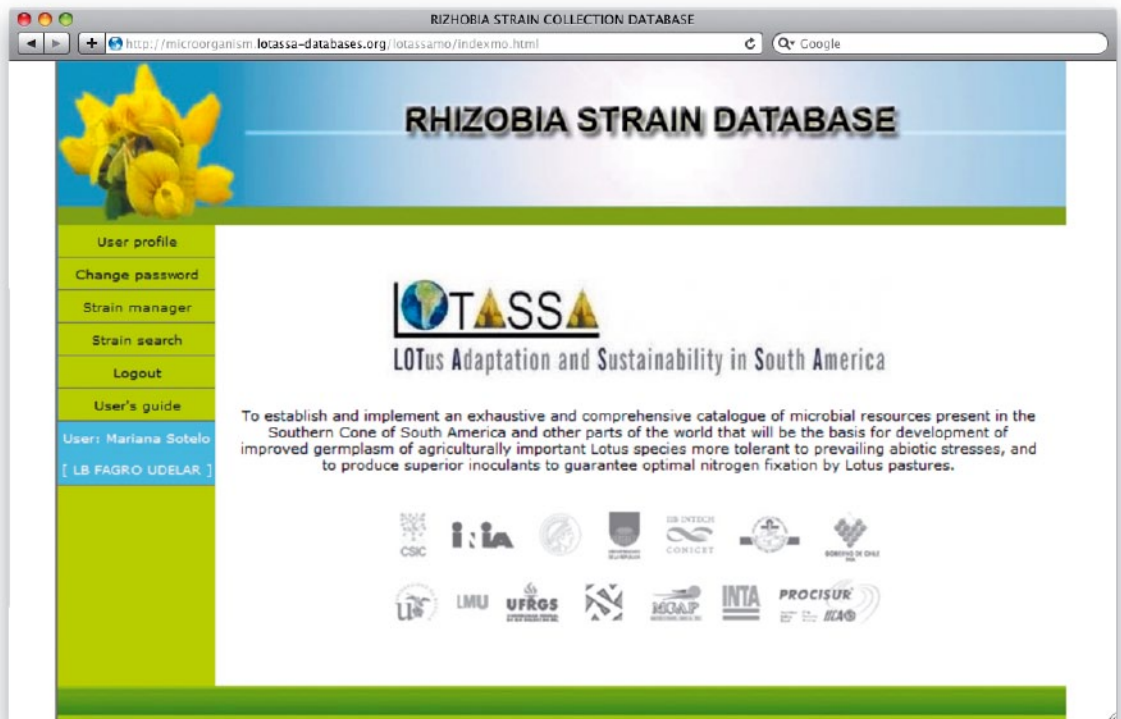


Figura 2. Página principal de la base de datos de rizobio.

racterizados para los estreses por acidez, salinidad y sequía.

1.4. Colección de rizobios de *Lotus* y base de datos asociada

Durante el proyecto LOTASSA se habilitó un catálogo exhaustivo y comprensivo de recursos microbianos presentes en el Cono Sur de América y otras partes del mundo. Ésa será la base para el desarrollo de germoplasma mejorado de especies de *Lotus* de importancia agrícola más tolerantes a los estreses abióticos prevalentes, y para producir inoculantes superiores que garanticen la fijación de nitrógeno óptima de las pasturas de *Lotus* en tales condiciones ambientales desfavorables.

La ubicación de la colección de germoplasma de *Lotus*-rizobio se estableció en el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Uruguay. El laboratorio estará a cargo del mantenimiento y distribución de la colección de rizobios.

Se implementó una base de datos en la Web para la colección de rizobios en el dominio registrado <http://microorganism.LOTASSA-databases.org>.

Todos los medios para organizar el funcionamiento del banco de datos de rizobios fueron contratados para garantizar los necesarios niveles de seguridad así como el respaldo de información. Esta aplicación también podría usarse en otros proyectos con cualquier colección de rizobios de otras especies de leguminosas.

Considerando que la aplicación podría habilitarse en servidores online que usan plataformas libres de licencia, la siguiente tecnología se usó en su desarrollo: el idioma de programación: Java; la base de datos: MySQL. Los requisitos de la instalación son: la Plataforma de Java (versión 1.6 o superior); la aplicación de servidor WEB Apache Tomcat (versión 4.1 o superior).

En esta base de datos se ingresaron los datos completos de muchos de los rizobios colectados durante la fase experimental de este proyecto, aproximadamente 295 cepas y contiene todos los elementos necesarios que le hacen una herramienta útil por compartir los resultados experimentales entre los participantes del proyecto y en el futuro con otros científicos.



Capítulo 2.

Especies modelo de *Lotus*

Capítulo 2. Especies modelo de *Lotus*



2.1. Introducción

Las leguminosas juegan un papel crítico en los ecosistemas naturales, agricultura, y agro-silvicultura dónde su habilidad para establecer simbiosis fijadoras de nitrógeno con bacterias comúnmente denominados rizobios, las hace colonizadores eficaces en ambientes bajos en nitrógeno. La fijación simbiótica de nitrógeno tiene lugar dentro de los nódulos en raíces o tallos de la leguminosa y aprox. 90% de las especies de leguminosas examinadas forman nódulos fijadores de nitrógeno. La fijación simbiótica de nitrógeno en los cultivos de leguminosas reduce la necesidad de fertilizante y mejora la fertilidad de la tierra a través de la rotación de los cultivos e interseembra. Además, las semillas y el forraje de las leguminosas tienen en general un contenido más alto de proteína que las no-leguminosas, y esto las hace cultivos proteicos deseables. Una importante proporción de los átomos de nitrógeno en los organismos vivientes realmente ha entrado en la cadena alimenticia a través de la fijación simbiótica de nitrógeno.

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh, la primera planta modelo establecida, no entra en simbiosis con microorganismos que fijan nitrógeno ni con los hongos de micorrizas que asimilan fósforo. Por consiguiente se seleccionaron dos especies como leguminosas modelo: *Lotus japonicus*, el cual desarrolla nódulos determinados como la soja y el frijol, y *Medicago truncatula* Gaertn que desarrolla nódulos indeterminados como el guisante y la alfalfa. Estas especies tienen genomas diploides pequeños (alrededor de 450 mbp), son au-

togámicas con amplia producción de semilla, pueden transformarse con *Agrobacterium* y son más pequeñas que la mayoría de las leguminosas agrícolas como la soja, guisante o alfalfa. Por consiguiente, son fáciles de usar en el laboratorio y convenientes para estudios genéticos moleculares. Una fracción sustancial del genoma de *Lotus* (aprox. 93% del espacio génico) ha sido secuenciado. También ha sido determinada la secuencia del genoma del microsimbionte *Mesorhizobium loti* Jarvis <http://www.kazusa.or.jp/lotus/index.html>

2.2. Ecotipos de *Lotus japonicus* y especies de *Lotus* vinculadas

L. japonicus ecotipo Gifu, colectado en un banco del río en la prefectura de Gifu en la isla principal de Japón, se ha usado para muchos experimentos y para crear poblaciones mutantes a partir de cultivo de tejidos y con varios sistemas de mutagénesis.

L. japonicus ecotipo MG-20 (Miyakojima) es originario de una de las islas del sur de Japón. Este genotipo se usa para la secuenciación del genoma y para desarrollar el mapa genético de *L. japonicus* MG-20 x *L. japonicus* Gifu. Dentro de los ecotipos, *L. japonicus* MG-20 tiene un nivel relativamente alto de polimorfismo comparado con el ecotipo Gifu. Se han desarrollado más de 800 marcadores microsatélites a partir de las secuencias TAC o BAC. Todos los sets de primers de microsatélites han sido desarrollados para que puedan usarse en las mismas condiciones de PCR, con temperatura de alineamiento de 55°C.

Un total 91 ecotipos de todas las regiones de Japón pueden obtenerse a través de Legume-Base <http://www.shigen.nig.ac.jp/bean/lotus-japonicus/wildStrainListAction.do>. Por ejemplo, han sido utilizados para encontrar resistencia a nematodos en varias líneas. Grant y co-autores demostraron que varias especies diploides de *Lotus* pueden cruzarse con *L. japonicus* y tener descendencia fértil. Ésta es otra fuente importante de variación fenotípica y genética.

Uno de los mejores materiales de cruzamiento resultó ser una accesión de *L. filicaulis* originaria de Argelia. *L. filicaulis* y *L. japonicus* Gifu muestran muchas diferencias fenotípicas y alto nivel de polimorfismo a nivel de ADN (AFLP, SSR). El desarrollo de la población F2 y las generaciones siguientes fue difícil debido al bajo cuajado de la semilla. El alto nivel de polimorfismo en esta cruce se utilizó en el clonado del gen de hipernodulación *Har1* y para el gen *Nfr5* del receptor del factor Nod. Ahora el número de marcadores SSR de *L. japonicus* MG-20 x *L. japonicus* Gifu es tan alto que este cruzamiento siempre se usa para el mapeo y clonación genética, a menos que el fenotipo de MG-20 difiera de Gifu para una característica de interés de tal modo que se haga difícil el mapeo.

El mapa genético de *L. filicaulis* x *L. japonicus* Gifu mostró el mismo orden de marcadores (co-linearidad) que el mapa de *L. japonicus* MG-20 x *L. japonicus* Gifu aunque con variaciones en las distancias cM en algunas de las regiones. Por tanto, ambos tipos de cruzamientos son útiles para la asignación de marcadores y ordenamiento de secuencias en el genoma de *L. japonicus*.

Lotus burttii es originario de Pakistán. Es un buen padre para cruzar con *L. japonicus* dado que tiene mejor cuajado de semilla, más corto tiempo entre generaciones y tiene menos regiones cromosómicas con segregación distorsionada que *L. filicaulis* x *L. japonicus* Gifu. *L. krylovii* Schischk parece ser tan cercano a *L. japonicus* como *L. burttii* y más cercano que *L. filicaulis*. La Universidad de Aarhus ha obtenido una población F2 de *L. japonicus* Gifu x *L. krylovii*. Esta

población también podría usarse por el mapeo de varias características fenotípicas.

La relación evolutiva entre diferentes especies de *Lotus* ha sido determinada en base a la filogenia del nrITS. Como parte de la colaboración en LOTASSA, la Universidad de Aarhus ha investigado el nivel de polimorfismo mediante la secuenciación de 17 clones cDNA de *L. tenuis* aislados por INIA/UACH en Chile. Estos cDNAs representan genes que se expresan diferencialmente durante el estrés por sequía en nódulos radiculares de *L. tenuis*. La información de las respectivas secuencias proporciona una indicación del nivel de polimorfismo entre *L. japonicus* y *L. tenuis*. La identidad de secuencias en las regiones codificadas de estos genes en *L. tenuis* y *L. japonicus* es superior al 95%, mostrando cuán estrechamente relacionadas están estas especies de *Lotus*. De nuevo, ésto enfatiza la utilidad de la información genética obtenida en la especie modelo *L. japonicus* para los estudios en otras especies cultivadas de *Lotus* como *L. tenuis*.

2.3. Líneas recombinantes endocriadas (RILs) y QTLs

Las poblaciones F2 de distintas cruces se desarrollaron para obtener líneas recombinantes endocriadas (generación F8) donde las líneas son fundamentalmente homocigotas. Con ello, los resultados del mapeo pueden compartirse entre laboratorios y los experimentos pueden repetirse en material genéticamente idéntico.

Para la caracterización de loci asociados a caracteres cuantitativos (QTLs), la Universidad de Aarhus ha desarrollado dos tipos de RILs. El número de líneas en la población de mapeo que ha alcanzado F8 es 116 para las RILs de *L. filicaulis* x *L. japonicus* Gifu. Un total de 175 RILs de *L. japonicus* Gifu x *L. burttii* han alcanzado la generación F8. Además, Kazusa DNA Research Institute ha desarrollado RILs de *L. japonicus* Gifu x *L. japonicus* MG-20, los cuales están disponibles a través de Legume-Base. <http://www.shigen.nig.ac.jp/bean/lotus-japonicus/top/top.jsp>. En esta población se

han registrado y mapeado varios caracteres agrícolas.

RILs de *L. filicaulis* x *L. japonicus* Gifu

El número total de marcadores disponibles para mapear se ha incrementado hasta 222, principalmente microsátélites. El tanteo de marcadores se hizo en la Univ. Aarhus. Los datos del mapeo pueden obtenerse de N. Sandal nns@mb.au.dk.

RILs de *L. japonicus* Gifu x *L. burttii*

Un total de 175 RILs de *L. japonicus* Gifu x *L. burttii* ha alcanzado la generación F8. Se extrajo ADN de 169 de estas líneas y se realizó un tanteo de microsátélites con la colaboración de Brachmann y Parniske, Ludwig-Maximilians-Universität, Munich, Alemania y Sato y Tabata, Kazusa DNA Research Institute, Japón. El número total de marcadores registrados con posición conocida en el mapa genético es de 102 marcadores uniformemente distribuidos en los cromosomas. Esta densidad proporciona una buena base para el mapeo de QTLs. La información del mapeo se puede obtener de N. Sandal nns@mb.au.dk. Están registrándose continuamente marcadores de microsátélite adicionales.

En el futuro estas líneas, así como las RILs de *L. filicaulis* x *L. japonicus* Gifu también estarán disponibles al público a través de LegumeBase en Japón <http://www.shigen.nig.ac.jp/bean/lotusjaponicus/top/top.jsp> donde las RILs de *L. japonicus* Gifu x *L. japonicus* MG-20 ya pueden obtenerse

La información de mapeo de las RILs de *L. japonicus* Gifu x *L. japonicus* MG-20 está disponibles en el sitio web del Kazusa DNA Research Institute. Estos tres tipos de RILs se usan ahora para analizar, por ejemplo, el desarrollo de la simbiosis con varios rizobios, respuestas a estreses por sequía, pH y NaCl (LOTASSA) y contenido de metales. Se pueden apreciar diferencias importantes entre los padres.

La cepa de *R. leguminosarum* DZL produce un factor Nod que, comparado con el factor Nod normal de *R. leguminosarum*, contiene

un residuo extra de acetilfucosa que también se encuentra en el factor de Nod del simbionte habitual de *L. japonicus*, *Mesorhizobium loti*. La cepa de *R. leguminosarum* DZL produce nódulos Fix- en *L. japonicus* Gifu pero no induce nódulos en *L. filicaulis*. Por consiguiente, fue posible utilizar las RILs correspondientes para mapear esta característica en la porción inferior del cromosoma 2, en una región que contiene el gen del receptor del factor Nod *Nfr5*. Un estudio más detallado de la Universidad de Aarhus demostró que un aminoácido específico del dominio LysM de *Nfr5* es muy importante para el reconocimiento de la cepa de *R. leguminosarum* DZL, basado en la diferencia en nodulación entre *L. japonicus* y *L. filicaulis*.

La respuesta de crecimiento durante el estrés por NaCl en diferentes RILs de *L. filicaulis* x *L. japonicus* Gifu fue determinada por M. Melchiorre y colaboradores de IFFIVE-INTA, Argentina. La Universidad de Aarhus utilizó el programa "QTL Cartographer" para buscar QTLs basado en datos fenotípicos (la longitud y longitud relativa) y de mapeo. QTLs significativos se encontraron en los cromosomas 1, 3 y 5.

2.4. Marcadores de ADN: Sintenia

Una de las ideas detrás del concepto de leguminosa modelo es el aprovechar la sintenia entre especies modelo y cultivadas, para acelerar el aislamiento y la caracterización de genes de importancia en leguminosas cultivadas menos caracterizadas. Esta estrategia requiere que las regiones de los genomas respectivos contengan los mismos genes en aproximadamente el mismo orden en modelos y cultivadas. En el proyecto de anclaje de leguminosas, la Univ. de Aarhus ha identificado varios genes con copia única en leguminosas basados en secuencias EST de la soja, *Medicago truncatula* y *L. japonicus*. Un criterio para la selección de un gen como candidato a marcador de anclaje en leguminosas (marcador Leg) es que se trate de un gen con una sola copia en *Arabidopsis*. Tales genes son ideales para el análisis de genes de homólogos/ortólogos de diferentes leguminosas y determinar así el nivel de sintenia.

Usando marcadores Leg, la Universidad de Aarhus ha anclado loci etiquetados que cubren 758 cM del mapa genético del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y un set de 99 loci compartidos que hacen posible comparar éste con el mapa genético de *Lotus*. Los once grupos de ligamiento de frijol tenían regiones no interrumpidas con al menos dos marcadores que también muestran ligamiento en el genoma de *Lotus*, y en varios de los grupos de ligamiento de frijol la sintenia se expande al grupo completo. En PvLG7 los nueve marcadores Leg con una posición conocida en el mapa de ligamiento genético de *Lotus* se ubican en LjLG5. En PvLG11 once de los doce marcadores de LjLG3, y en PvLG2 once de veinte marcadores corresponden a LjLG4, mientras que los restantes nueve marcadores a LjLG2. En general, todos los marcadores de anclaje de leguminosas revelaron una conservación amplia (macrosintenia) entre frijol y *Lotus*. Esto está de acuerdo con datos de secuencias de los genomas de *Lotus japonicus* y *Medicago truncatula*, que muestran diez áreas con extensa sintenia cubriendo buena parte de los genomas completos de estas especies. Además, la estrategia de anclaje de leguminosas se ha usado para buscar sintenia en una leguminosa filogenéticamente distante como el maní (*Arachis hypogaea* L.). En este caso también se pudo mostrar sintenia entre las especies de *Arachis*, *Lotus* y *M. truncatula*, aunque menos pronunciada que con frijol.

Con ello, parece claro que la sintenia puede usarse como una herramienta analítica en los aspectos científicos y prácticos de investigación en leguminosas. La información genómica disponible para *Lotus*, *Medicago* y soja puede ser de utilidad para el mapeo genético y aislamiento de genes en otras leguminosas. Recientemente se utilizó el mapeo comparativo para identificar el locus génico de la resistencia a una enfermedad en frijol y el gen de resistencia a virus Rsv4 en la soja. Además, los genes para características básicas, al igual que los genes simbióticos, serán más fáciles de aislar en las leguminosas modelo y posteriormente en especies cultivadas para su aplicación en programas de mejoramiento genético.

2.5. Marcadores de ADN para las especies de *Lotus*

Marcadores de Microsatélites en las especies de *Lotus* de LOTASSA

Los microsatélites consisten principalmente en repeticiones de di o trinucleótidos, se localizan preferentemente en regiones no codificantes y el número de copias cambia rápidamente durante la evolución. En condiciones estándar de PCR, 78 de los marcadores microsatélite desarrollados de *L. japonicus* Gifu x *L. japonicus* MG-20 se han probado en ADN de *L. corniculatus*, *L. tenuis*, *L. uliginosus* y *L. subbiflorus* (Figura 3). En muchos casos se obtuvieron productos de amplificación en estas especies. Este tipo de marcadores moleculares son potencialmente útiles para el mejoramiento genético de especies de *Lotus* usadas en agricultura. Se conoce la posición de estos microsatélites en el mapa genético de *L. japonicus*. En total, varios centenares de marcadores microsatélites se han desarrollado por Kazusa DNA Research Institute y se han mapeado en posiciones específicas en el genoma de *Lotus*.

Puesto que existe sintenia entre *L. japonicus*, frijol común y *M. truncatula* e incluso con leguminosas más distantes filogenéticamente como el maní, es muy probable que exista un alto grado de sintenia entre especies de *Lotus*. Por tanto, se espera que los marcadores que están ligados en *L. japonicus* también lo estén en la mayoría de las otras especies de *Lotus*.

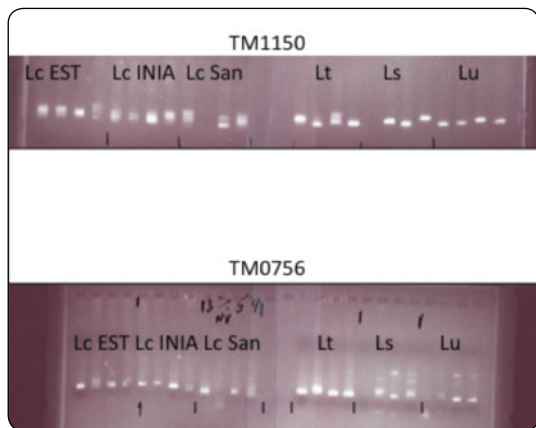


Figura 3. Marcadores microsatélite de *L. japonicus* (TM1150 y TM0756) probados en plantas individuales de *L. corniculatus* (Lc), *L. tenuis* (Lt), *L. subbiflorus* (Ls) y *L. uliginosus* (Lu).

Conclusión sobre los marcadores microsatélite

La mayoría de los marcadores microsatélite de *L. japonicus* amplifican bien en *L. corniculatus* y *L. tenuis* y algunos de ellos amplifican bien en *L. uliginosus* y *L. subbiflorus*. Este análisis confirma que *L. japonicus* es más cercano a *L. burttii* y *L. filicaulis* seguidos por *L. corniculatus* y *L. tenuis* y finalmente *L. subbiflorus* y *L. uliginosus*.

El nivel de polimorfismos es alto entre las líneas de mejoramiento genético e incluso dentro de las líneas mejoradas. Algunos de estos marcadores podrían usarse por consiguiente en mejoramiento genético. Además, estos marcadores son útiles para analizar los cruzamientos entre diferentes especies y líneas de *Lotus*.

Marcadores moleculares para verificar cruzamientos entre *L. uliginosus* y *L. japonicus*

A partir de la comparación de secuencias génicas de *Lotus uliginosus* disponibles en NCBI con las de *Lotus japonicus*, se desarrolló un marcador que dio un producto que es 12 bp más grande en *L. uliginosus* que en *L. japonicus*. Como este marcador fue desarrollado a partir de secuencias conocidas en ambas especies, se comporta mejor que la mayoría de los marcadores desarrollados sólo del conocimiento de la secuencia de *L. japonicus* como los marcadores microsatélites.

2.6. Mutantes y genes de *Lotus japonicus*

Mutantes simbióticos con fenotipo Nod⁻

Se han aislado y caracterizado varias clases de mutantes no nodulantes de *L. japonicus*, carentes de alguna de las respuestas fisiológicas y celulares características, o que están impedidos en las rutas tempranas de transducción de señales necesarias para la organogénesis del nódulo. La percepción del factor Nod bacteriano es mediada por el dominio LysM de los receptores NFR1 y NFR5, y ambos receptores son necesarios para que la planta huésped comience las respuestas fisiológicas y celulares esenciales para la organogénesis e infección del nódulo. La Univ. Aarhus ha demostrado que los dominios LysM de los receptores de factor Nod NFR1 y NFR5 son determinantes de la especificidad del huésped a través del reconocimiento del lipoquito-oligosacárido. Es más, la transferencia de los receptores de *L.*

japonicus a *M. truncatula* es capaz de ampliar el rango del huésped de esta última para incluir *M. loti*. Usando la cepa de *Rhizobium leguminosarum* DZL que sintetiza un factor Nod acetil fucosilato que puede ser percibido por *L. japonicus* pero no por *L. filicaulis*, se demostró que el dominio LysM2 de NFR5 está involucrado en el reconocimiento del factor Nod y que la substitución de un solo aminoácido puede alterar dicho reconocimiento.

L. japonicus es eficazmente nodulado por cepas de *Mesorhizobium loti* pero no por *Bradyrhizobium* sp. NZP2309. Por el contrario, *L. uliginosus* es nodulado eficientemente por NZP2309, pero no por *M. loti*. En colaboración con la Universidad de Copenhague y Carlsberg Research Center, Dinamarca, la Universidad de Aarhus ha determinado la estructura de factor Nod producido por *Bradyrhizobium* sp. NZP2309. Este factor Nod contiene un grupo carbamoil adicional comparado con los factores Nod sintetizados por las cepas de *Mesorhizobium loti* normales. Aunque los dominios LysM de los receptores del factor Nod (NFR1 y NFR5) de *L. japonicus* y *L. uliginosus* contienen diferencias de aminoácidos, los resultados utilizando plantas transgénicas demuestran que las diferencias en las secuencias de aminoácidos de los receptores del factor Nod no son responsables de la diferencia en el fenotipo de nodulación de las dos cepas de rizobio.

2.7. Aplicación biotecnológica de genes sensibles al estrés abiótico en *Lotus japonicus*

La Universidad de Munich investigó la posible aplicación de genes reguladores conocidos para desarrollar genotipos de *Lotus* con tolerancia superior a estrés abiótico. Varios genes importantes, principalmente identificados en *Arabidopsis thaliana*, están involucrados en la regulación de la tolerancia a estrés. La mayoría de los genes identificados son reguladores positivos de la respuesta al estrés abiótico. La expresión ectópica de estos genes en otras especies o su sobreexpresión puede conllevar a un incremento de la resistencia a estreses abióticos. Por el contrario, mutaciones en reguladores negativos pueden llevar a un comportamiento más resistente bajo condiciones de estrés abiótico. En *A. thaliana* se han aislados algunos genes reguladores

cuyas mutaciones benefician a la planta bajo ciertas situaciones. DREB1C es un factor de transcripción de tipo DRE. Se ha sugerido que DREB1C funcione como un regulador negativo de la respuesta a estreses salino, sequía y heladas. MYB60, un factor de transcripción R2R3 que pertenece a la superfamilia de MYB, está involucrado en el movimiento estomático. Mutantes con el gen *Myb60* bloqueado son más tolerantes al desecamiento. Por su parte, CBL1 es una proteína tipo B calcineurina, sensoras de calcio, y un regulador central de respuestas al estrés abiótico en *A. thaliana*. Basado en la sobreexpresión y análisis de plantas mutantes, se ha sugerido que CBL1 es un regulador positivo de respuestas a salinidad y sequía y un regulador negativo de la respuesta a frío en las plantas.

Por consiguiente, la Univ. de Munich escogió MYB60, DREB1C y CBL1 como candidatos para los acercamientos biotecnológicos en *Lotus*. En colaboración con Shusei Sato y Satoshi Tabata (Kazusa DNA Research Institute, Japón) se obtuvo la secuencia genómica completa de los hipotéticos ortólogos en *Lotus japonicus*. Se utilizó la metodología TILLING (Targeting Induced Local Lesion In Genomes) para cribar una población de *L. japonicus* mutagenizada con EMS (etilmetanosulfonato) e identificar plantas que portasen mutaciones en los genes de interés, en el John Innes Institute, Norwich, Reino Unido. Este método puede generar un rango de alelos mutantes

que pueden proporcionar heterogeneidad de fenotipos y una visión interna de la funcionalidad del gen.

Se identificaron nueve plantas con mutaciones en *DREB1C*. Cuatro de las plantas contenían mutaciones silenciosas mientras que las otras cinco llevaban mutaciones antisentido (Tabla 2). La serie alélica posee por tanto cierta potencialidad para ofrecer diversidad de fenotipos, algunos de los más interesantes podrían ser verificados a campo. Se obtuvieron tres plantas con mutaciones *MYB60*; dos de ellas tienen mutación antisentido. El TILLING en *CBL1* identificó cinco líneas con mutaciones en este gen. Cuatro de las líneas portaban mutaciones silenciosas y una quinta planta contenía una mutación antisentido.

Los fenotipos bajo condiciones de estrés serán estudiados en plantas homocigotas para cada mutación. La mayoría de los estudios en respuestas a estrés abiótico se han hecho en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Los resultados que saldrán de nuestros estudios pueden apoyar la importancia de genes candidatos, previamente identificados en las plantas modelo, en las especies agrónomicamente importantes de *Lotus* con el objetivo de facilitar el mejoramiento genético y la selección de genotipos de *Lotus* más resistente a restricciones ambientales.

Tabla 2. Líneas de *Lotus japonicus* con mutaciones en genes de estrés abiótico identificados a través de TILLING. HET; heterocigota, HOM; homocigota

| Gen | Nombre de la planta | HET/HOM | Cambio en la mutación | Antisentido | Características adicionales |
|--------|---------------------|---------|-----------------------|-------------|---------------------------------------|
| dreb1C | 1811-1 | HET | G/A | D75N | Baja producción de semilla |
| dreb1C | 1222-1 | HOM | G/A | D121N | |
| dreb1C | 1396-1 | HET | C/T | A69V | Muy baja producción de semilla |
| dreb1C | 1145-1 | HET | C/T | A69V | Baja producción de semilla y solo HET |
| dreb1C | 1202-1 | HET | C/T | L52F | Sin germinación |
| myb60 | 728-1 | HET | C/T | P283S | Baja tasa de sobrevivencia |
| myb60 | 1158-1 | HOM | C/T | P284S | |
| cbl1 | 2100-1 | HOM | C/T | S140L | |



Capítulo 3.

Investigaciones sobre déficit
hídrico en *Lotus*

Capítulo 3. Investigaciones sobre déficit hídrico en *Lotus*



3.1. Introducción

Uno de los objetivos principales de los mejoradores de plantas para las regiones agrícolas y ganaderas de Sudamérica es la identificación de caracteres bioquímicos y fisiológicos que pueden contribuir a incrementar el rendimiento de las leguminosas forrajeras bajo condiciones medioambientales adversas. Entre dichas leguminosas forrajeras destacan diferentes especies de *Lotus*, principalmente *L. corniculatus*, *L. tenuis* y *L. uliginosus*, que son ampliamente utilizadas para mejorar el rendimiento de los pastizales. Dichas especies han sido elegidas precisamente por su capacidad para adaptarse al estrés abiótico ante diferentes situaciones medioambientales, tales como la alta salinidad, la acidez y la sequía. En particular, la sequía constituye uno de los problemas más frecuentes que afectan a la productividad y persistencia de las diferentes especies de *Lotus* que se utilizan para la producción de forraje.

Los programas de mejora de *Lotus* pueden verse enormemente facilitados por la utilización de especies modelo tales como *L. japonicus* (ecotipos Gifu y MG-20), *L. filicaulis*, y *L. burttii*, dados los recientes avances que se han producido en el desarrollo de nuevas herramientas genómicas y de genómica funcional. La información que puede obtenerse en las plantas modelo, puede así transferirse también a las plantas cultivadas.

Presentamos aquí un resumen de los resultados generados en el proyecto LOTASSA relativos a la selección de poblaciones tolerantes

a sequía de *Lotus* y al análisis de marcadores fisiológicos y moleculares de estrés hídrico en estas plantas.

3.2. Selección de poblaciones de *Lotus* spp. tolerantes a sequía en Chile

El *Lotus* de hoja angosta, *Lotus tenuis*, está naturalizado en Chile central, principalmente en la zona de suelos arcillosos donde se cultiva arroz. INIA Chile caracterizó once poblaciones de esta especie colectadas en 1998 y 1999 entre los 33° y 38° de latitud sur, donde crece en forma natural, bajo condiciones de invernadero y a diferentes niveles de humedad disponible en el suelo (HD). Se hizo un experimento para plantas adultas y otro para plantas jóvenes en un estado temprano de desarrollo.

En las plantas adultas, la tasa relativa de elongación de los tallos (TRET), la producción de materia seca (MS), el contenido relativo de agua y el área foliar específica mostraron una reducción significativa en el tratamiento con la mayor restricción de humedad (10% HD). El índice de sensibilidad a la sequía presentó una amplia variación, desde 0,49 a 1,34 (Figura 4), y se correlacionó negativamente con la producción de MS bajo condiciones de estrés hídrico (10% HD). En las plantas jóvenes la TRET aumentó más de 100% cuando al HD se aumentó de 10 a 100%. Se concluyó que la población de *L. tenuis* número 4 (colectada en San Javier, 35°39'28" S) fue la más tolerante a la sequía y la número 14

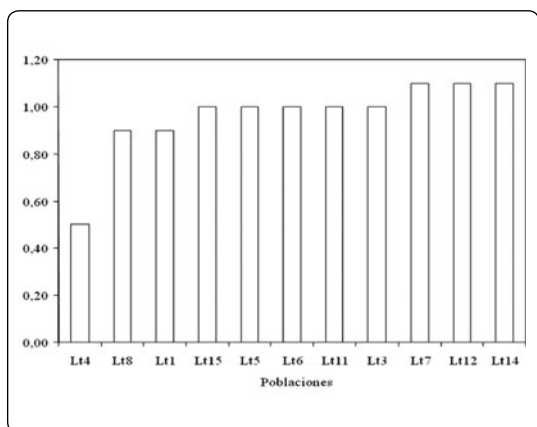


Figura 4. Índice de sensibilidad a la sequía de once poblaciones de *Lotus tenuis* naturalizadas en Chile.

(colectada en Melipilla, 33°39'58" S) la más sensible sequía.

3.3. Selección de poblaciones tolerantes a sequía en Uruguay

INIA Uruguay ha examinado una serie de plántulas de *Lotus corniculatus* (Lc) cv. San Gabriel y INIA Draco y *Lotus uliginosus* (Lu) cv. LE627, cada uno consistente de más de 1800 plantas, mediante experimentos de tolerancia a estrés hídrico y diversidad morfológica de raíces llevados a cabo en invernadero en condiciones de estrés hídrico (40% de capacidad de campo). Se seleccionaron una serie de plantas contrastantes en base al rendimiento del cultivo bajo la situación de estrés hídrico, integrando una población sensible (Lc-C1S) y otra tolerante (Lc-C1T). 50 plantas seleccionadas como tolerantes produjeron un 92% más de forraje que 43 plantas identificadas como sensibles. Análogamente, 56 plantas seleccionadas como población sensible (Lu-C1S) produjeron menos de la mitad comparadas con las plantas tolerantes seleccionadas (Lu-C1T). Algunas de estas poblaciones están disponibles en la colección de LOTASSA.

Se han registrado también las características radiculares de todas las plantas después de

la tercera ronda de evaluación de los plántulas de *L. corniculatus* y *L. uliginosus* bajo estrés hídrico. Para ello se utilizó como principal parámetro de selección la presencia ó ausencia de raíces laterales fibrosas (>1 mm diámetro) en el sistema radicular hasta una profundidad de 4 cm, obteniéndose 42 y 39 plantas que se denominaron “raíz pivotante” (Lc-C1TR) y raíz ramificada (Lc-C1BR), con una media de 1,14 y 5,82 raíces laterales por planta respectivamente. Se observaron pequeñas diferencias en el número de raíces laterales fibrosas en *L. uliginosus*, con 31 y 46 plantas seleccionadas para Lu-C1TR y Lu-C1BR, respectivamente. Igualmente se seleccionaron 34 plantas con alta densidad de raíces pequeñas para una polinización cruzada, que constituyó una tercera población de Lu en estudio (Lu-C1VR).

Cuatro poblaciones divergentes de *L. corniculatus* y *L. uliginosus* seleccionadas por producción de forraje bajo estrés hídrico, junto con otras 5 poblaciones con diferentes características de raíces, han sido además utilizadas para posteriores experimentos de campo (Figura 5a). La especie más tolerante (*L. corniculatus*) fue más productiva que *L. uliginosus* durante la primera sequía intensa del verano (cosechas de Nov-08, Dic-08, Feb-09). Estas evaluaciones mostraron que la selección fenotípica de “raíz pivotante” proporcionaba los resultados más consistentes para ambas especies en condiciones de sequía a campo (Figura 5b). Hasta la fecha, un ciclo de selección masal de forraje bajo estrés hídrico no ha generado cambios de la producción de forraje en condiciones de campo. Dado que desde el establecimiento del experimento en adelante, la sequía imperante fue entre moderada y severa, es probable que se trate de condiciones donde la selección de raíz pivotante haga factible una exploración de agua disponible a mayor profundidad, que a través de otros tipos de sistemas radiculares.



Figura 5a. Diferencias sustanciales en producción de forraje en las selecciones llevadas a cabo con *L. corniculatus* y *L. uliginosus* en Diciembre 2008 en INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay.



Figura 5b. Imágenes de *L. uliginosus* (superior) y *L. corniculatus* (inferior) mostrando la selección "tap root" (izquierda) comparada con cultivares control (derecha).

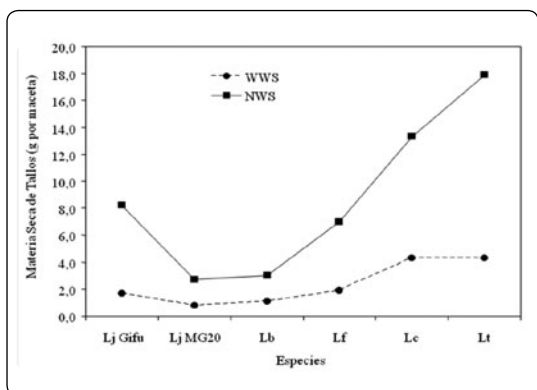


Figura 6. Producción de materia seca de plantas de *Lotus* spp. cultivadas y plantas modelo, bajo dos niveles de disponibilidad de agua en el suelo: con estrés hídrico (WWS) y sin estrés hídrico (NWS). Lj, *Lotus japonicus*; Lb, *Lotus burttii*; Lf, *Lotus filicaulis*; Lc, *Lotus corniculatus*; Lt, *Lotus tenuis*.

3.4. Comparación de la respuesta a sequía entre plantas modelo y plantas cultivadas

También INIA Chile comparó las especies cultivadas (*L. corniculatus*, *L. uliginosus* y *L. tenuis*) con las especies modelo (*L. japonicus* Gifu y MG-20, *L. burttii* y *L. filicaulis*) bajo dos niveles de disponibilidad hídrica. Todos los caracteres medidos fueron afectados significativamente por la disponibilidad de agua y mostraron diferencias significativas entre poblaciones. *L. corniculatus* y *L. tenuis* mostraron los más altos valores de acumulación de materia seca bajo estrés hídrico (Figura 6), y, por lo tanto, estas serían las especies más tolerantes a la sequía. *L. burttii* y *L. japonicus* MG-20, fueron las especies más sensibles. *L. corniculatus* presentó los valores más altos de conductancia estomática y los potenciales hídricos más elevados, lo cual podría significar que la especie posee mecanismos de ajuste osmótico que permitirían a las plantas mantener la tasa de transpiración con una alta tensión de agua en sus tejidos.

Además, las plantas de *L. japonicus* Gifu y MG-20, *L. filicaulis* y *L. burttii* fueron fenotípicamente caracterizadas en invernadero para tolerancia a la sequía y morfología radicular, junto con *L. corniculatus* San Gabriel, *L. corniculatus* INIA Draco y *L. uliginosus* LE627 bajo 4 regímenes diferentes de agua (100%, 80%, 60%, 40% de la capacidad de campo). La tasa de crecimiento de *L. japonicus* y *L. burttii* fue lenta, mientras *L. filicaulis* fue más cercano a las especies cultivadas, tanto en términos de desarrollo foliar como radicular. No hubo identificación conclusiva de genotipos tolerantes o sensibles, ni "tap-root" versus "branched-root" con las especies modelo.

3.5. Medidas de eficiencia en el uso del agua

La eficiencia en el uso del agua (EUA) es un parámetro fisiológico que ha suministrado información útil sobre tolerancia al déficit hídrico en varias especies tales como arroz, trigo, sorgo, cebada y guisante. De ahí que pueda utilizarse este parámetro como marcador

funcional del déficit hídrico para programas de mejora vegetal, a la par que se obtiene una mejor comprensión de la respuesta de la planta a la sequía. Considerando que la producción de materia seca vegetal está principalmente relacionada con la disponibilidad de suelo en el agua, es posible la búsqueda de nuevos genotipos para tolerancia sobre la base de un mayor EUA, dado que EUA es la relación entre la materia seca vegetal acumulada y el agua transpirada. Este parámetro puede analizarse mediante un método gravimétrico, donde se pesa el agua consumida y se refiere a la biomasa total al final del ensayo, o bien puede estimarse mediante discriminación isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$.

Las diferentes especies modelo y cultivadas de *Lotus* mostraron marcadas diferencias la EUA cuando las plantas se sometieron a condiciones de déficit hídrico (a valores del 50% o menores de la capacidad de campo) (Figura 7).

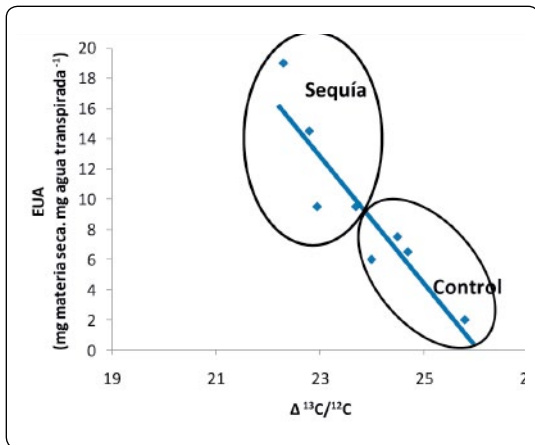


Figura 7. Relación entre $\Delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ y EUA para diferentes genotipos bajo condiciones de riego normal (control) y sequía.

EUA está a su vez relacionado con la capacidad de la planta para abrir y cerrar los estomas, un parámetro denominado conductancia estomática (CE) que puede ser medido con un porómetro. *L. corniculatus* cv. San Gabriel mostró mayor CE que los dos ecotipos Gifu y MG-20 de la especie modelo *L. japonicus* sin restricciones de agua, lo que podría repercutir en la mayor producción de biomasa observada para la especie cultivada. Igualmente, *L.*

corniculatus presenta un mayor cierre estomático en respuesta al déficit hídrico, lo que significa que esta especie controla mejor la pérdida de agua. Sin embargo, se ha comprobado que la medida de CE en *Lotus* tiene problemas de reproducibilidad, lo que significa que este parámetro no puede utilizarse como un buen marcador de tolerancia a la sequía para el mejoramiento en *Lotus*, si bien constituye un buen complemento para el estudio y comprensión de los datos de EUA.

EUA puede estimarse mediante discriminación isotópica (relación $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$), en base a la propiedad de la RUBISCO de discriminar ^{12}C frente a ^{13}C . Los resultados del análisis de EUA cuantificados mediante $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ han permitido establecer una graduación de las especies y cultivares del género *Lotus* tal y como se ilustra en la Figura 8.

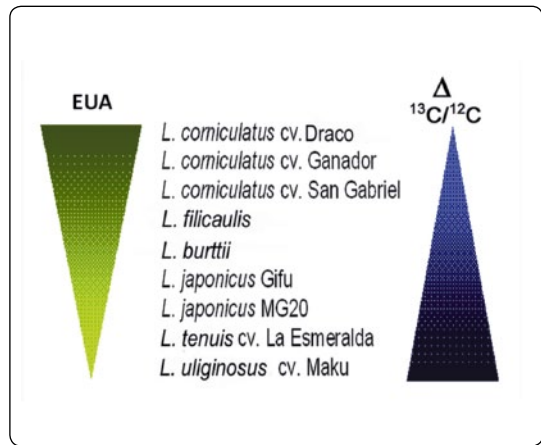


Figura 8. Ranking de los diferentes genotipos de *Lotus* spp. en función de la EUA y $\Delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (de mayor EUA en la parte superior a menor EUA en la inferior).

Interesantemente, *L. corniculatus* cv. INIA Draco, un genotipo caracterizado por su alta persistencia en condiciones de campo, mostró la mejor EUA determinada mediante esta metodología, en contraste con *L. uliginosus* cv. Grasslands Maku, que muestra en condiciones de campo una rápida deshidratación y decaimiento. En este último caso, el desarrollo de rizomas es probablemente la estrategia mejor para sobrevivir a los periodos de sequía,

dado que dicho tejido permite a las plantas rebrotar una vez que ha cesado la sequía.

Los estudios con diferentes especies de *Lotus* validan pues la técnica de la discriminación isotópica ($\Delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) como el mejor parámetro para establecer diferencias fisiológicas entre genotipos en relación con la eficiencia en el uso del agua entre condiciones de riego normal y sequía.

3.6. Alteraciones de la fotosíntesis durante la sequía

La medida de la funcionalidad del fotosistema II (PSII) mediante fluorescencia de la clorofila es un parámetro típico que ha suministrado información sobre el déficit hídrico en distintas especies tales como espinaca, *Arabidopsis* y *Stypha*. La emisión de fluorescencia de la clorofila es fácilmente cuantificable mediante el uso de equipos portátiles, y puede suministrar información cuantitativa y cualitativa sobre la fotosíntesis de las plantas, que permita evaluar el estado fisiológico de las mismas.

En *L. corniculatus* y *L. japonicus* el análisis del PSII a través de la relación F_v/F_m , ha podido sólo utilizarse como marcador funcional de la respuesta a déficit hídrico cuando se trataban las plantas a temperaturas en torno a 40°C simultáneamente a la imposición del déficit hídrico. En ambas especies pudo detectarse una disminución de dicha relación F_v/F_m (Figura 6). Esta condición de estrés es similar a la que ocurre a campo en los periodos de verano, por lo que pensamos que F_v/F_m puede ser utilizada como marcador funcional del estrés. Por otra parte, las plantas de *Lotus uliginosus*, que resultaron las más sensibles al estrés hídrico, mostraron una disminución del 50% de la relación F_v/F_m después de 7 días de déficit hídrico. Este resultado indica un daño sustancial producido sobre los fotosistemas a raíz de la sequía, que era claramente acompañado de síntomas de marchitez de las plantas. La estabilidad del PSII bajo déficit hídrico en este género es, por consiguiente, un tópico interesante para ser estudiado en detalle, dado que

parecen existir distintos mecanismos de protección en función de las especies analizadas.

La termoluminiscencia de clorofilas (TL) y la termoluminiscencia a altas temperaturas (HTL) han demostrado ser técnicas muy valiosas para

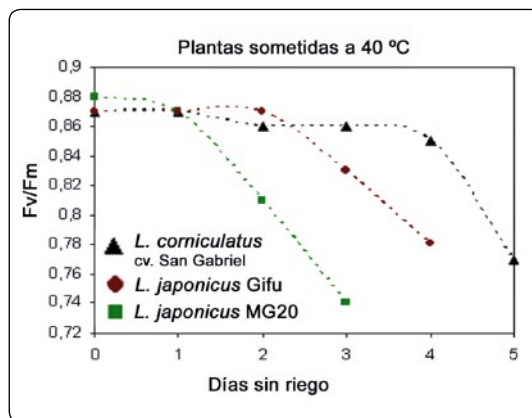


Figura 9. Cambios de la relación F_v/F_m asociados con la sequía en *L. corniculatus* y *L. japonicus*.

el análisis de la fotosíntesis en la respuesta a estrés de *Lotus*. Se ha apreciado una singularidad en las bandas de TL características de *Lotus japonicus* Gifu que muestra una relación AG/B elevada en condiciones control, indicativa de un elevado nivel de poder asimilatorio fotosintético es esta planta, posiblemente relacionado con el hecho de que esta planta asimila nitrato mayoritariamente en las raíces. Este patrón de bandas AG y B, se ve fuertemente alterado por el estrés, constituyendo así otro parámetro de fotosíntesis relacionado con la sequía en esta planta. Por otra parte, se observó también una intensa banda de HTL que indica la existencia de alta peroxidación lipídica en *Lotus*.

No se observaron cambios con tendencias claras en *Lotus japonicus* en lo que respecta a la fotorrespiración en respuesta al estrés hídrico. Algunas enzimas del ciclo fotorrespiratorio C_2 se ven incrementadas y otras disminuidas, a la par que no se aprecian cambios notables en la tasa de fotorrespiración ni en los niveles de los aminoácidos implicados en el metabolismo fotorrespiratorio.

3.7. Acumulación de prolina en respuesta a estrés hídrico

La acumulación de prolina mediante síntesis *de novo* constituye una respuesta común a diferentes tipos de estrés en una amplia variedad de organismos. Así, se han asignado múltiples funciones protectoras para la prolina, que pueden explicar esta común respuesta al estrés: osmolito compatible; reserva C-N para recuperación después de la sequía; protector frente a especies reactivas de oxígeno - principalmente eliminación de radicales hidroxilo; protector de macromoléculas y membranas; componente de proteínas importantes para el estrés; homeostasis celular; regulación del potencial redox; control de la expresión genética, etc.

En *Lotus*, tanto las especies modelo (*L. japonicus*, *L. burttii* y *L. filicaulis*) como las de interés agronómico (*L. corniculatus*, *L. tenuis* y *L. uliginosus*) acumulan prolina en respuesta a la sequía, observándose además una estrecha correlación entre la concentración de prolina acumulada y el déficit hídrico. De ahí que la prolina constituya un marcador muy interesante de estrés hídrico en *Lotus*. La acumulación de prolina en estas especies comienza incluso en estadios tempranos tras la imposición del estrés hídrico, cuando la variación en el contenido de agua en los tejidos es aún escasa. Una disminución del 10% en el contenido relativo de agua es suficiente para desencadenar la acumulación de prolina en los tejidos. Por consiguiente, en *Lotus* puede considerarse la prolina como un indicador temprano y sensible de la situación de estrés hídrico, si bien el papel exacto de la prolina en relación con

la sensibilidad-tolerancia al estrés, no ha sido aún definido con exactitud. Se ha comprobado que el contenido en prolina se ve afectado por la fuente de nitrógeno aplicada a la solución nutritiva, dado que cuando se cultivan las plantas de *L. corniculatus* y *L. japonicus* con amonio, el nivel de prolina acumulada es al menos el doble que cuando las plantas se cultivan con nitrato. Por otra parte, el uso de mutantes de *L. japonicus* Gifu deficientes en glutamina sintetasa, ha permitido investigar las diferentes vías de síntesis de prolina en respuesta al estrés hídrico. Estos mutantes están alterados en distintas mutaciones puntuales recesivas de herencia mendeliana, que anulan por completo la actividad glutamina sintetasa plastídica codificada por el gen *Gln2*. La menor acumulación de prolina detectada en los mutantes, se ve asociada a una menor capacidad de rehidratación de los mismos, pero no genera ningún efecto en la tasa de pérdida de agua de los mutantes durante el estrés. En consecuencia, estos resultados cuestionan el papel de la prolina como osmolito compatible y sugieren un papel para dicho metabolito relacionado con la recuperación de la planta después del estrés hídrico. Además, se ha detectado una importante alteración del metabolismo de la prolina en las plantas mutantes, sugiriendo pues un control por los niveles de prolina de su propio metabolismo. Adicionalmente, la carencia de actividad glutamina sintetasa plastídica hace que los mutantes sean incapaces de reasimilar el amonio fotorrespiratorio que se libera en las mitocondrias como resultado del ciclo fotorrespiratorio C-N, razón por la que estos mutantes muestran un fenotipo de sensibilidad a aire (fotorrespiratorio) muy manifiesto (Figura 10).



Figura 10. Mutantes de glutamina sintetasa con fenotipo sensible a aire usados en esta investigación. Plantas mutantes con fenotipo sano en una atmósfera enriquecida con CO₂ (fotorrespiración suprimida) pero que muestra síntomas de clorosis y necrosis cuando se transfiere a condiciones de aire común (fotorrespiración activada).

Los resultados de la Univ. de Sevilla muestran que la glutamina sintetasa plastídica está claramente implicada en la respuesta al estrés hídrico, existiendo una clara interconexión entre la asimilación de nitrógeno, la fotorrespiración y el estrés hídrico, confirmando así la hipótesis establecida al comienzo del proyecto. Se han detectado asimismo cambios importantes en el transcriptoma de las plantas mutantes (cf. apartado siguiente), incluyendo muchos genes de respuesta al estrés y de la fotosíntesis.

3.8. Cambios en el transcriptoma y metaboloma durante el estrés hídrico en *Lotus*

Se han empleado nuevas herramientas de genómica funcional para completar los conocimientos y definición de posibles marcadores moleculares de la respuesta al estrés hídrico en *Lotus*. Para este propósito, se han utilizado una serie de chips de DNA (affychips de Affymetrix®) para examinar el transcriptoma de las plantas de *Lotus* en estrés hídrico (Figura 11).

Tales chips de DNA incluyen un total de 48,000 sondas oligonucleotídicas para la mayoría de los genes que es conocido que

se expresan en *L. japonicus* Gifu, y se han hibridado con RNA extraído de hojas de plantas sometidas a estrés hídrico con un contenido relativo de agua (CRA) en torno al 65%, junto con el de las plantas control, lo que permite determinar por comparación los genes cuya expresión se ve afectada por la sequía. 3950 sondas resultaron ser moduladas por la sequía, utilizando una tasa de identificación de falsos positivos (FDR) inferior al 5% ($p < 0.05$). De ellos, 2064 eran inducidos por el estrés, mientras 1886 eran reprimidos. Entre los genes inducidos se encontraron los responsables de varias proteínas abundantes en fases tardías de la embriogénesis (LEA), lo que confirmaba la validez de los resultados obtenidos, dado que es bien conocido que dicha familia de proteínas guarda relación con la tolerancia al estrés hídrico, aunque su papel no se conoce con exactitud. Otros genes también inducidos fueron los genes del metabolismo redox como isomerasas de disulfuros en proteínas, glutatión transferasa y varias oxidoreductasas, indicando que el estrés hídrico en *Lotus* está asociado con el estrés oxidativo. Las diferentes sondas moduladas por el estrés hídrico han sido analizadas por diferentes tipos de agrupamientos mediante



Figura 11. Uso de affychips (Affymetrix®) para estudios del transcriptoma en estrés hídrico. La imagen de la izquierda muestra uno de los affychips utilizados. La imagen de la derecha muestra el proceso de marcar para el análisis de la transcriptómica.

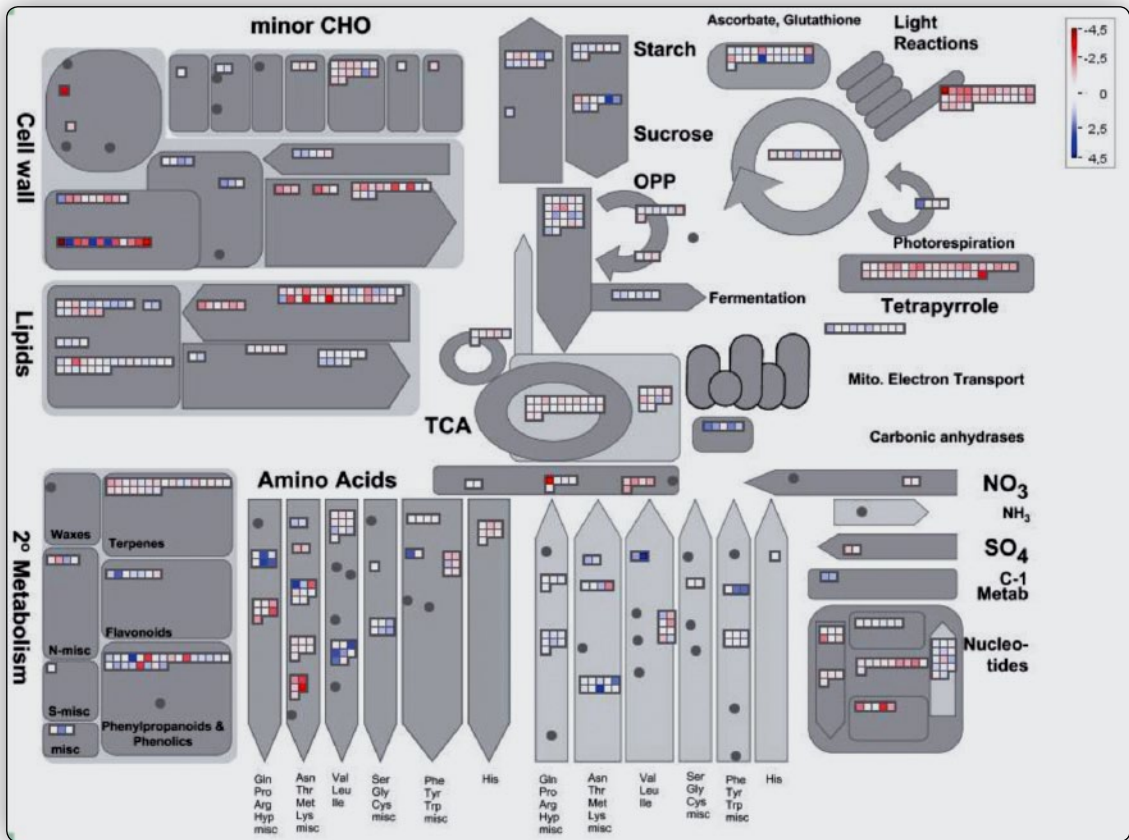


Figura 12. Representación Mapman de las principales vías metabólicas afectadas por la sequía en *L. japonicus* Gifu. Cada cuadrado corresponde con un gen particular afectado, según se deduce del análisis transcriptómico llevado a cabo. Se indican en azul ó rojo, respectivamente, los aumentos o disminuciones encontrados en los niveles de expresión, de acuerdo con la barra adyacente.

aplicaciones informáticas adecuadas, como por ejemplo la que se ilustra en la Figura 12 en base a las vías metabólicas afectadas.

Como puede observarse en la Figura 12, los genes de la fotosíntesis fueron vías metabólicas grandemente afectadas por la sequía, confirmando así los resultados anteriormente descritos sobre fluorescencia de clorofila y termoluminiscencia. Tanto la fotosíntesis como la fotorrespiración fueron vías reprimidas durante el estrés. Por el contrario, la sequía estimuló la transcripción de las vías de síntesis de etileno, ABA y ácido jasmónico. Tales sondas, son así marcadores de estrés hídrico en *L. japonicus* Gifu, y también resultaron alteradas, aunque en distinto grado, en los mutantes deficientes en glutamina sintetasa que se mencionaron anteriormente.

Otros resultados del proyecto LOTASSA muestran los cambios detectados en los perfiles metabólicos de diferentes especies de *Lotus*, en respuesta a la sequía, haciendo uso para ello de las facilidades de GC-MS disponibles. Con el objetivo de examinar los mecanismos metabólicos de adaptación de las leguminosas frente al déficit hídrico, que permitan posteriormente identificar posibles características de mejora de las mismas, se desarrollaron estudios en primer lugar con una leguminosa modelo tal como *L. japonicus* Gifu a distintas dosis de estrés y análisis de los posibles cambios metabólicos relacionados con la dosis. Igualmente, se sometieron las diferentes especies de *Lotus* descritas anteriormente, a estrés hídrico a largo plazo, para comparar sus diferentes tipos de respuestas de aclimatación al estrés. En general se ha observado un cierto

grado de conservación de los cambios cualitativos inducidos por sequía, pero también interesantes diferencias entre las especies más tolerantes y sensibles de *Lotus*. Desde el punto de vista cuantitativo, algunos metabolitos en concreto ilustran muy bien que los cambios cuantitativos inducidos por la sequía son bastante específicos para cada genotipo. También se ha realizado un estudio comparativo de los cambios metabólicos de las diferentes

especies de *Lotus* bajo aclimatación al estrés hídrico y salino, con el objeto de identificar posibles marcadores comunes y diferenciales para ambos. Interesantemente, algunas de las moléculas que se habían identificado anteriormente en *L. japonicus* como sin respuesta o disminuidas en estrés salino, resultaron estimuladas en estrés hídrico, mientras otras que respondían a la sal, no resultaron modificadas en estrés hídrico.



Capítulo 4.

Respuestas al estrés salino
en *Lotus* spp.

Capítulo 4. Respuestas al estrés salino en *Lotus* spp.



4.1. Introducción

La salinidad en el suelo y el agua de riego es un problema ambiental y un obstáculo importante para la producción de cultivos. En la actualidad, cerca del 20% de las tierras cultivadas del mundo se ve afectada por la salinidad, lo que resulta en la pérdida de hasta el 50% de la producción agrícola. El estrés salino tiene ambos efectos, osmóticos y tóxicos, sobre las plantas, perjudicando el crecimiento, la homeostasis de iones, la fotosíntesis y la fijación de nitrógeno. La contribución relativa de estos dos efectos en la disminución del rendimiento general de la planta varía con la intensidad y la duración del estrés salino, así como con la especie vegetal, cultivar y tejido considerados.

En el proyecto LOTASSA, las especies de *Lotus* modelo y cultivadas fueron evaluadas bajo protocolos de salinización a corto y largo plazo y analizando diferentes etapas ontogénicas.

Se evaluaron los osmolitos “tradicionales” utilizados para describir el “estado de estrés salino” en glicófitas. Además, se analizaron los cambios inducidos por la sal en la anatomía de la hoja y tallo de las especies de *Lotus* modelo y cultivadas (Figura 13a y 13b).

Se realizó una evaluación de los niveles tisulares de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y su regulación. Este análisis se incluyó debido a que diversos estudios describen que el estrés oxidativo generado por la salinidad puede modular algunos efectos tóxicos originados por NaCl. Así, en condiciones óptimas de crecimiento, las defensas antioxidantes son capaces de hacer frente a ROS, mientras que en plantas expuestas a la salinidad y otros tipos de condiciones de estrés, la capacidad antioxidante pueden ser sobrepasada por ROS. Un control estricto de las concentraciones de ROS por los antioxidantes es fundamental

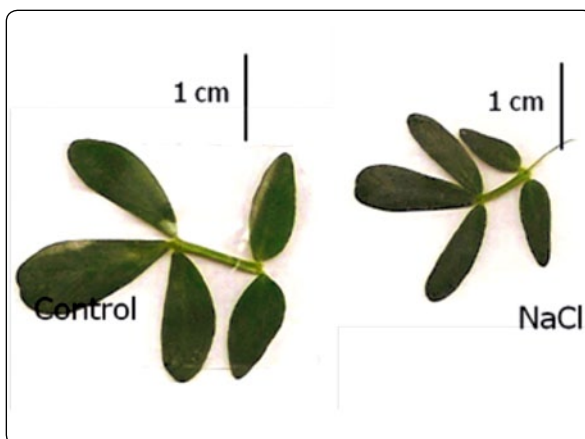


Figura 13a. Tamaño de los folíolos de *Lotus tenuis* con NaCl y condiciones control.

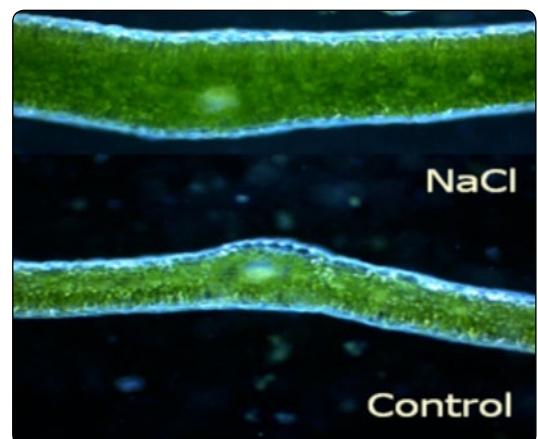


Figura 13b. Lámina del folíolo

para prevenir el daño oxidativo en las células, al mismo tiempo que permite que ROS puedan realizar funciones útiles como moléculas señalizadoras. Al mismo tiempo, la salinidad aumenta la acumulación de osmolitos (poliaminas, prolina, etc) en glicófitas y hay una gran cantidad de investigaciones que indican que la tolerancia se correlaciona bien con altos niveles tisulares en las plantas. Sin embargo, la respuesta a la salinidad incluye no sólo una fina regulación de los niveles de ROS, sino también la exclusión de iones, la retención de iones y tolerancia de los tejidos a las sales acumuladas, un estricto control del ajuste homeostático y osmótico del agua, cambios en el crecimiento y el desarrollo, y una amplia gama de cambios de productos bioquímicos y moleculares acompañantes.

4.2. Defensas enzimáticas antioxidantes

Las defensas antioxidantes de las plantas incluyen la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX) y las cuatro enzimas del ciclo ascorbato-glutatión: ascorbato peroxidasa (APX), monodehidroascorbato reductasa, deshidroascorbato reductasa (DR) y glutatión reductasa (GR) (Figura 14).

Este ciclo está impulsado por el ascorbato y glutatión, los cuales son importantes compuestos redox. En leguminosas como *L. japonicus*, el

tiol-tripéptido homoglutatión, que es un homólogo estructural del glutatión, puede reemplazar por completo el glutatión. Para tener una visión más profunda de la función protectora de los antioxidantes durante el estrés salino, las plantas de *L. japonicus* se evaluaron en virtud de dos protocolos de salinización: uno sólo causando efectos osmóticos (S1) y el otro teniendo también efectos tóxicos debido a la acumulación de Na^+ (S2). A continuación, se midieron varios marcadores fisiológicos y bioquímicos relacionados con estrés salino, así como la expresión de más de 20 genes que codifican las enzimas antioxidantes. Bajo estas condiciones experimentales, los potenciales de agua de las hojas de plantas S1 y S2, fueron ligeramente inferiores a los de las plantas control, indicando que la salinidad provocó un estrés hídrico moderado.

Los niveles de transcritos de los genes SOD aumentaron en hojas de plantas S1. Curiosamente, los transcritos de GPX1 y GPX6, que supuestamente codifican isoformas cloroplásticas de GPX, subieron en las hojas de las plantas expuestas a los dos tratamientos salinos. Por el contrario, no pudo detectarse ningún cambio en los niveles de ARNm de GPX en las raíces. Las concentraciones de ascorbato y homoglutatión también se determinaron en las plantas estresadas por sal. El contenido de ascorbato total en hojas y raíces no se afectó con los tratamientos de sal. Asimismo, los

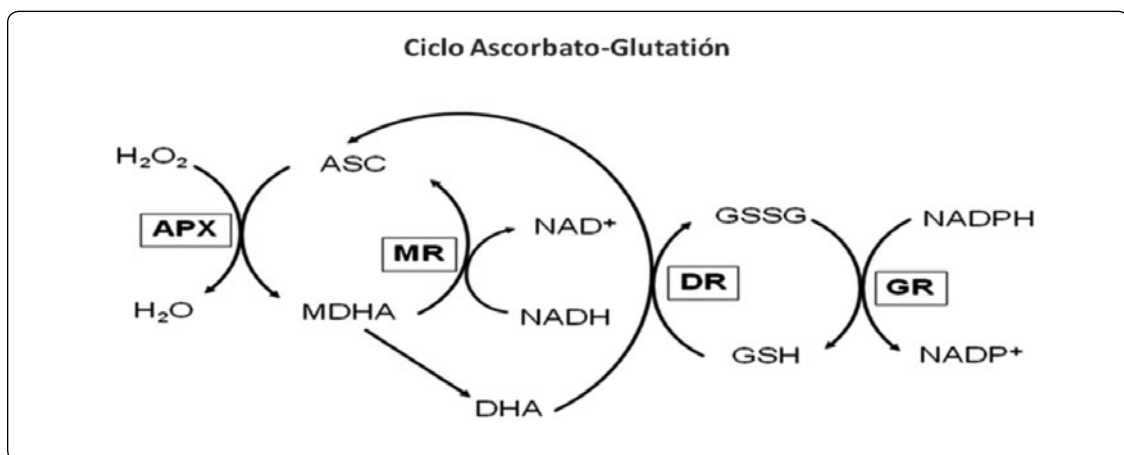


Figura 14. Ciclo Ascorbato-Glutatión.

estados redox del ascorbato y homoglutación (ambos en forma reducida) se mantuvieron sin cambios en las hojas y raíces. Los resultados generales obtenidos por el Laboratorio de la Estación Experimental de Aula Dei (CSIC-España) sugieren que *L. japonicus* es más tolerante a la sal que otras leguminosas, lo cual puede atribuirse a la capacidad de la planta para evitar que el Na⁺ llegue al tallo y para activar defensas antioxidantes.

Además, el grupo IFFIVE (INTA-Argentina) estudió cuatro genotipos, *L. japonicus* ecotipos MG-20 y *L. burttii* y *L. filicaulis*, usando dos niveles de NaCl (50 y 150 mM) aplicado por aclimatación hasta 28 o 60 días, y evaluando el crecimiento y parámetros relacionados, tales como la fotosíntesis, los iones, el contenido relativo de agua, el daño oxidativo y las respuestas del sistema antioxidante. Las respuestas de crecimiento en los cuatro genotipos de *Lotus* variaron según la etapa de desarrollo de las plantas. *L. japonicus* MG-20 apareció como un genotipo tolerante a la sal, sobre todo cuando el estrés se produjo durante la etapa joven de la planta. La capacidad de *L. japonicus* MG-20 para mantener el crecimiento bajo estrés salino correlacionó con un incremento de las actividades SOD y GR. El tratamiento moderado de 50 mM de sal aplicado a este ecotipo en ensayos de corto o largo plazo no afectó la producción de biomasa ni la fotosíntesis.

Por otra parte, se obtuvieron genotipos transgénicos de *L. japonicus* MG-20 que sobreexpresan Mn-superóxido dismutasa (SOD-T) o glutatión reductasa (T-GR). Estas líneas transgénicas mostraron actividades SOD y GR superiores al genotipo silvestre en condiciones control. Del mismo modo, las plantas T-GR también mostraron una mayor contenido de glutatión reducido. La peroxidación lipídica aumentó bajo 150 mM de NaCl en las líneas transgénicas y no transgénicas, pero el genotipo silvestre mostró valores más altos. Las plantas T-GR mostraron significativamente mayor contenido relativo de agua bajo estrés salino; sin embargo, las plantas T-SOD tenían un uso

mucho más eficiente del agua, lo que sugiere efectos pleiotrópicos debido a la sobreexpresión de enzimas antioxidantes que afectan al metabolismo del agua. Por otro lado, el número y peso de nódulos fueron mayores en T-SOD con el tratamiento de menos de 50 mM, mientras que a 150 mM las plantas T-GR mostraron valores mucho más altos, con diferencias significativas respecto a las líneas T-SOD y silvestre. La fijación del nitrógeno también fue más alta en las líneas transgénicas con 50 mM de sal. Por último, se observó una correlación positiva de la producción apoplástica de ROS en las raíces con el crecimiento de la planta y la nodulación en el genotipo silvestre. Aunque la producción apoplástica de ROS en las raíces transgénicas fue inferior al tipo silvestre bajo la condición control, las plantas transgénicas mantuvieron cierta producción de ROS con 150 mM de NaCl, algo que resultó abolido en el tipo silvestre.

4.3. Acumulación de prolina y poliaminas

La salinidad incrementó los niveles de prolina en todas las especies (modelo y cultivadas) de *Lotus*, y además se observaron diferencias significativas en la acumulación de prolina entre ecotipos de *L. japonicus*. De la misma manera, 24 variedades/accesiones de *L. tenuis* colectadas por INTA Pergamino en la Cuenca del Salado, Argentina (Figura 15), presentaron un incremento de los niveles de este aminoácido



Figura 15. Sitios de colecta de *Lotus tenuis* en la Provincia de Buenos Aires, Argentina.

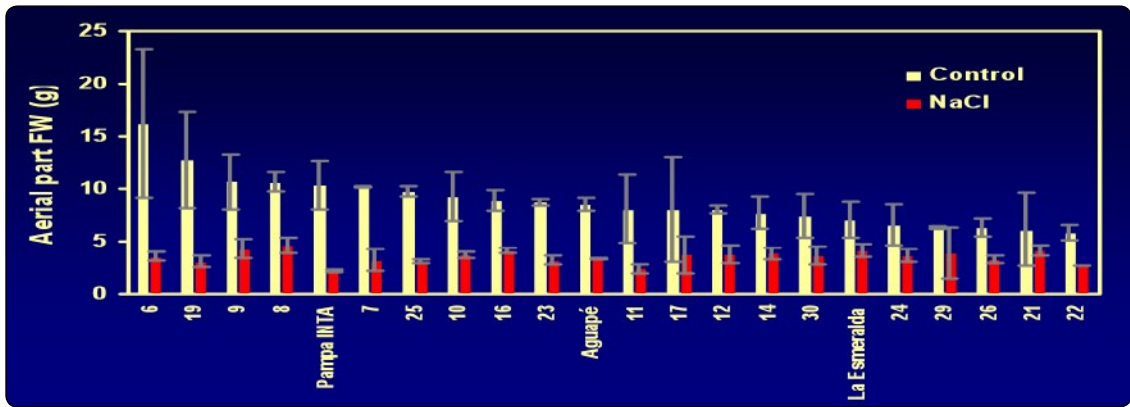


Figura 16. Crecimiento de accesiones/cultivares de *Lotus tenuis* con y sin NaCl.

en medios salinos, y las diferencias entre ellos fueron evidentes, tanto bajo condiciones control como de estrés. Estas accesiones fueron previamente clasificadas como “tolerantes” o “sensibles” tras comparar su crecimiento relativo bajo condiciones control o estrés salino en presencia de 150 mM ClNa (Figura 16).

Una manifestación típica de los cambios en la concentración de Na^+ tisulares y las alteraciones morfológicas observadas simultáneamente en las diferentes accesiones bajo estrés salino se muestra en las Figuras 17a, 17b y 18.

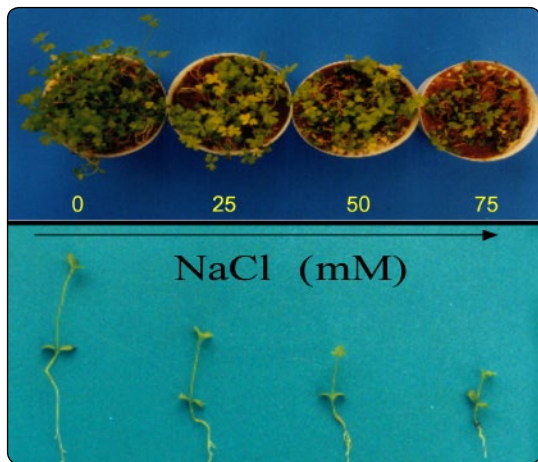


Figura 18. Reducción del crecimiento de *Lotus tenuis* con el incremento de la concentración de NaCl

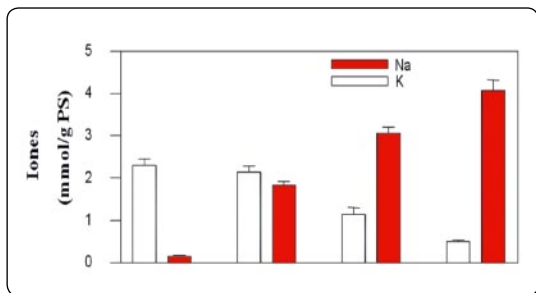


Figura 17a. Concentración iónica de accesiones/cultivares de *Lotus tenuis* con y sin NaCl.

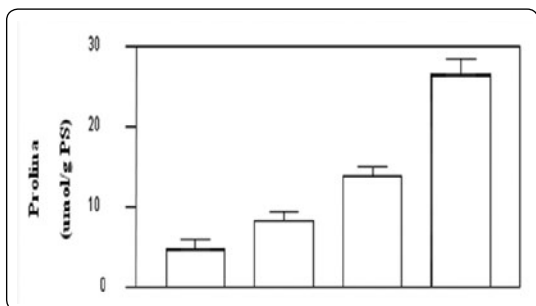


Figura 17b. Incremento de la concentración de prolina con la presencia de NaCl.

Bajo las mismas condiciones experimentales, los cambios en la acumulación de poliaminas libres asociados a estrés salino se evaluaron en varias accesiones de *L. tenuis* y especie modelo, observándose como regla general, una disminución en la relación espermidina/espermina (spd/spm; figura 19). No se observaron cambios en las concentraciones de putrescina debidos a la salinidad.

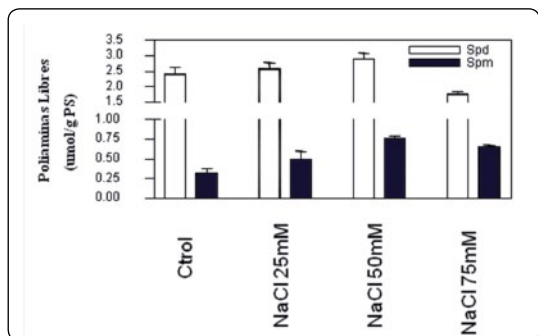


Figura 19. Reducción en la acumulación de poliaminas libres con NaCl

No obstante, tras analizar y comparar diferentes estados ontogénicos y diferentes protocolos experimentales, no se pudo establecer una correlación clara entre los cambios inducidos por sal en los niveles de prolina y poliaminas de accesiones de *L. tenuis*, lo que sugiere que estos parámetros no serían útiles como marcadores bioquímicos de la tolerancia a sal.

4.4. Genómica comparativa funcional de aclimatación a la sal en especies de *Lotus* modelo y cultivadas

Teniendo en cuenta que en la investigación vegetal y el mejoramiento genético se están realizando esfuerzos para identificar genes y procesos que intervienen en las respuestas al estrés salino y producir nuevas variedades de cultivos con mayor tolerancia a la sal, el grupo de Fisiología Molecular de Plantas del Instituto Max Planck del consorcio LOTASSA, realizó un estudio de genómica funcional comparativo de tres especies modelos y tres especies forrajeras del género *Lotus*, en representación de los genotipos más sensibles y tolerantes. La tolerancia relativa a la sal de los siete genotipos de *Lotus* (incluyendo *L. japonicus* ecotipos MG-20 y Gifu) se determinó en dos experimentos independientes que sometieron a las plantas a aumentos escalonados a largo plazo en el nivel de NaCl, hasta una concentración letal de 300 mM NaCl. Se observaron diferencias significativas entre los diferentes genotipos, dado que los más sensibles a NaCl empezaron a morir a los pocos días de llegar a 300 mM de NaCl en la solución de riego al día 28, mientras que las plantas de los más tolerantes no empezaron a morir hasta después del día 60 (Figura 20).

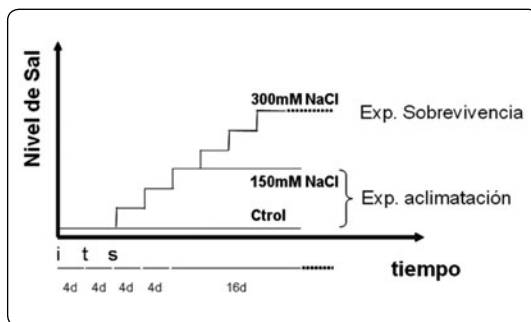


Figura 20. Reducción en la sobrevivencia al aumentar la concentración de NaCl y tiempo

Bajo estas condiciones experimentales, se definió la “dosis letal 50” (DL50) como el número de días en que más del 50% de las plantas habían muerto. La tolerancia relativa observada fue: *L. glaber* > *L. burttii* > *L. japonicus* ecotipo MG-20 > *L. filicaulis* > *L. japonicus* ecotipo Gifu ~ *L. uliginosus* ~ *L. corniculatus*. Curiosamente, la diferencia en la tolerancia entre los dos genotipos de *L. japonicus* fue de la misma magnitud que la existente entre la mayoría de los otros pares sensible-tolerante.

El segundo régimen de tratamiento de sal (150 mM NaCl) fue aplicado para facilitar la comparación de las respuestas de aclimatación a la sal entre las diferentes especies bajo condiciones fisiológicamente válidas (Figura 21).



Figura 21. Bandejas de *Lotus japonicus* creciendo en medios con diferentes niveles de NaCl.

En estos experimentos, las concentraciones de Na^+ y Cl^- en el tallo aumentaron dramáticamente en todos los genotipos en respuesta al tratamiento, mientras que la concentración de K^+ cambió menos en las especies modelos que en las forrajeras. Otra observación interesante fue que la acumulación de sal en los genotipos aclimatados al estrés mostraron una correlación lineal negativa con la DL50 en la salinidad letal, con un mejor coeficiente de correlación para los niveles de Cl^- que para Na^+ . Estos resultados están en consonancia con las anteriores observaciones fisiológicas que demuestra que las glicófitas más tolerantes presentan una disminución de la acumulación de sal en comparación con las sensibles.

Reforzando la importancia crítica del protocolo de salinización y el estado ontogénico, se determinaron cambios en los macro y micronutrientes inducidos en los experimentos de aclimatación a dosis de sal subletales mediante ICP-AES y analizados por ANOVA. Estas evaluaciones pusieron de manifiesto la variabilidad, a nivel nutricional, entre los genotipos de *Lotus* en respuesta al estrés salino. Los resultados sugieren que los aspectos nutricionales bajo salinidad se alteraron de manera diferencial entre los genotipos más sensibles y tolerantes, independientemente de si se trataba de especies modelo o forrajeras.

En general, los datos mostraron una razonable similitud entre las respuestas en las especies modelo y las cultivadas en relación a su rango de tolerancia, la acumulación de sal, los cambios inducidos en el crecimiento y la variación del contenido de nutrientes.

Para comparar las respuestas transcripcionales del genoma al estrés salino de los diferen-

tes genotipos, el grupo de Max Planck realizó experimentos de aclimatación a concentraciones sub-letales de NaCl y los analizó utilizando Affymetrix GeneChip® *Lotus* Genome Array. Del total de genes sondeados, más del 50% mostraron cambios significativos en el nivel de transcritos en al menos un genotipo durante la aclimatación a la sal. Curiosamente, los niveles de transcripción de menos del 1% fueron alterados significativamente en los siete genotipos, y los transcritos, tanto los positivos como negativamente regulados, compartidos por los genotipos sensibles y tolerantes incluyeron un conjunto de genes que ya se sabía que intervienen en las respuestas de las plantas al estrés. Los resultados obtenidos sugieren que tanto diferencias cualitativas como cuantitativas a nivel transcripcional están implicadas en la tolerancia a la sal.

En consecuencia, los cambios relativos en la expresión génica de muchos de los transcritos específicos de tolerancia o sensibilidad, no se

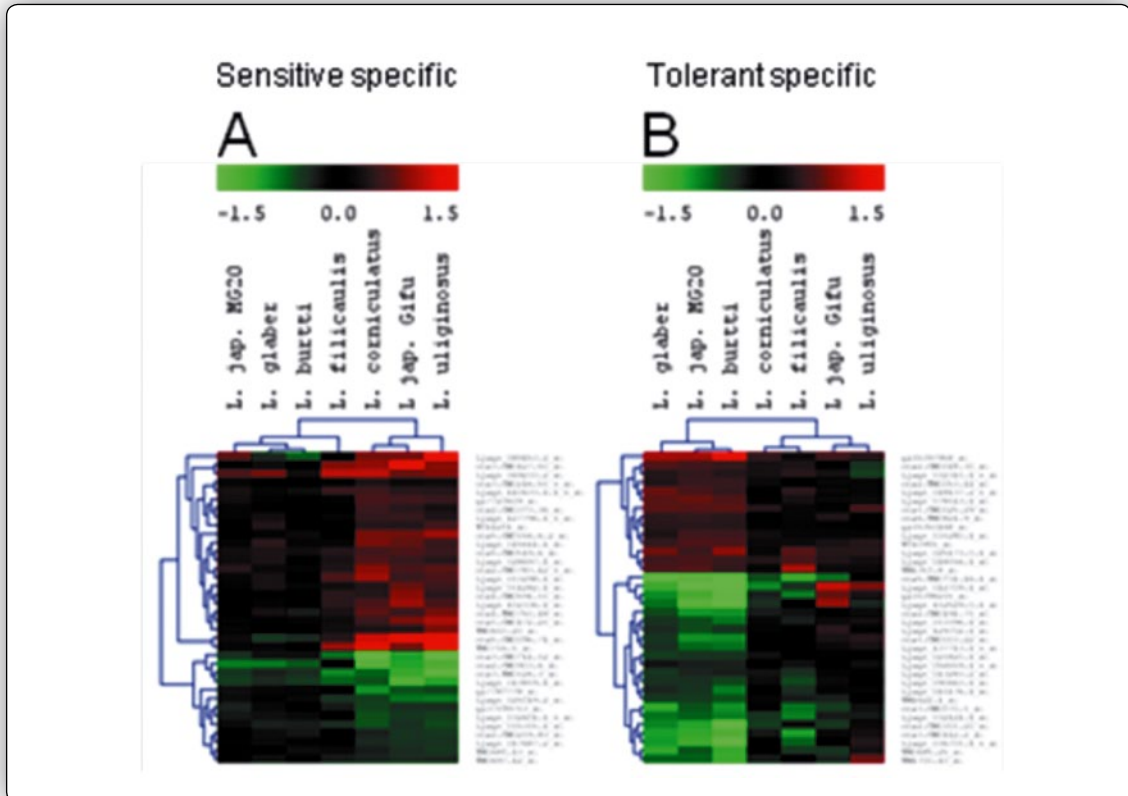


Figura 22. Análisis transcriptómico de plantas de *Lotus* en respuesta al estrés salino.

correlacionaron bien con la biomasa vegetal, sino con el contenido de iones de todos los genotipos bajo estrés, especialmente el Cl⁻. Además, los resultados de los análisis transcriptómicos indicaron que sólo una pequeña fracción de las respuestas transcripcionales al estrés salino se encuentra conservada entre los genotipos y especies de *Lotus*.

Al mismo tiempo, los fenotipos metabólicos de los ecotipos de *Lotus* sometidos a tratamiento subletales de sal se determinaron utilizando GC/EI-TOF-MS no dirigida. Se identificaron ciento tres analitos que representan tanto compuestos conocidos y desconocidos. Todos ellos estuvieron presentes en todos los genotipos y en los tres experimentos independientes. Muchos de los cambios en los niveles de metabolitos inducidos por NaCl fueron cualitativamente similares en algunos o todos los genotipos, aunque ciertos cambios metabólicos genotipo-específicos fueron también evidentes. Sin embargo, en general los metabolitos no mostraron buenos coeficientes de correlación con los iones o la biomasa bajo estrés, lo que refleja probablemente la variabilidad biológica inherente de las redes metabólicas y/o cambios cuantitativos distintivos entre

los genotipos de *Lotus*. En conjunto, los resultados del análisis metabolómico indicaron que algunas, pero no todas las respuestas del metabolismo primario al estrés salino se conservan entre las especies de *Lotus*, ya que las propiedades metabólicas generales mostraron tanto interacciones comunes como genotipo-específicas. La mayoría de los metabolitos que se acumularon en las plantas modelo bajo salinidad fueron específicos para un cierto genotipo o compartida con otros genotipos modelo, mientras que aquéllos que redujeron sus niveles eran mayoritariamente compartidos por varios genotipos.

4.5. Conclusiones

Los análisis comparativos fisiológicos, iónicos, transcriptómicos y metabolómicos de los genotipos de *Lotus* con estrés salino revelaron la existencia de respuestas a la salinidad conservadas y no conservadas dentro de este género. Además, los experimentos fisiológicos realizados por los grupos del consorcio LO-TASSA mostraron que las especies modelo son instrumentos adecuados para estudiar la aclimatación y la tolerancia a la sal en este género de leguminosas.



Capítulo 5.

Estrés por pH ácido y por
aluminio

Capítulo 5. Estrés por pH ácido y por aluminio



5.1. Introducción

La toxicidad de aluminio (Al) es una importante restricción para el rendimiento de cultivos en suelos ácidos. A valores de pH del suelo de 5 o menores, el Al es solubilizado en la solución del suelo, inhibiendo el crecimiento y función de la raíz. Las leguminosas forrajeras juegan un papel muy importante en la productividad de las pasturas cultivadas gracias a su capacidad para fijar nitrógeno y crecer en situaciones de pobreza de nutrientes. Las especies de *Lotus* tienen un buen potencial en la productividad de las pasturas, por su capacidad de crecer en suelos ligeramente ácidos y su moderada tolerancia al aluminio, manganeso y sodio. Estas especies son cultivadas en el norte y sur de América, Australia y algunos países europeos. *L. corniculatus* es sin duda la especie de mayor importancia agronómica y más amplia distribución geográfica.

5.2. Alteraciones metabólicas en respuesta al Al

Los efectos del Al sobre los genes antioxidantes y metabolitos en las raíces y hojas de *Lotus corniculatus* cv. INIA Draco, una leguminosa forrajera de interés agronómico que está relacionada con la leguminosa modelo *L. japonicus* fueron investigados. Para este propósito, las semillas se hicieron germinar y crecieron en placas de agar durante 9 días y después se transfirieron a cultivos hidropónicos conteniendo 200 μM CaCl_2 y 0, 10 or 20 μM AlCl_3 . Plantas cultivadas en presencia de 10 μM Al mostraron reducciones en el peso fresco del tallo, peso fresco de la raíz, área foliar y longitud de la raíz. Con 20 μM Al las disminuciones correspondientes fuer-

on 73%, 78%, 64% y 52%, respectivamente. Los niveles de expresión (mRNA) de treinta enzimas antioxidantes y dos transportadores de malato activados por Al (ALMT) fueron determinados en las raíces por PCR cuantitativa en tiempo real. El tratamiento de plantas con 10 μM Al durante 14 días causó un aumento de transcritos de la Fe-superóxido dismutasa citosólica y una reducción de la expresión de Fe-superóxido dismutasa plastídica. Se estudió también el perfil de metabolitos en raíces y hojas, mediante extractos derivatizados usando cromatografía de gases y espectrometría de masas. Este análisis mostró que el tratamiento con 10 o 20 μM Al aumentó los contenidos de algunos aminoácidos (asparagina, glicina), azúcares (glucosa, fructosa), polioles (pinitol) y los ácidos orgánicos (ácido succínico, ácido treónico, ácido 2-metilmálico, ácido 2-isopropilmálico) en las raíces. Algunos de estos metabolitos, como la asparagina y el ácido 2-isopropilmálico, aumentaron también en las hojas. En particular, los aumentos de 98% y 61% en el ácido 2-isopropilmálico en las raíces y hojas, respectivamente, con 20 μM Al puede reflejar la necesidad de la planta de sintetizar compuestos quelantes. Este ácido orgánico ha sido previamente descrito como secretado por células de levadura en respuesta a Al. Basado en estos estudios, se propone que el ácido 2-isopropilmálico es un importante ácido orgánico detoxificador de Al en *L. corniculatus*.

Se investigaron también otros mecanismos de desintoxicación de metales en *Lotus japonicus*. Uno de tales mecanismos involucra la quelación del metal por fitoquelatinas. Éstos son polipéptidos ricos en cisteína que ligan algunos metales con alta afinidad. Los

complejos resultantes de metal-fitoquelatina se guardan y degradan en las vacuolas, evitando así los efectos tóxicos de estos metales sobre el metabolismo celular. Las fitoquelatinas son sintetizadas por la enzima fitoquelatina sintetasa (PCS) usando el glutation como sustrato. Se estudió la síntesis de fitoquelatinas en las plantas después del tratamiento con cadmio (Cd) y otros metales como el Al. Tras el tratamiento con estos metales, las raíces sintetizaron cantidades elevadas de fitoquelatinas, indicando la presencia de genes PCS activos. Tres de estos genes (*LjPCS1*, *LjPCS2* y *LjPCS3*) fueron identificados y mapeados en el cromosoma 1 de *L. japonicus*. Los genes difieren en la composición exón-intrón y respuesta a Cd. La estructura y el análisis filogenético de los tres productos proteicos sugieren dos eventos secuenciales de duplicación génica durante la evolución de plantas vasculares. Se determinó que mientras *LjPCS1* es similar a otras proteínas PCS de plantas, *LjPCS2* y *LjPCS3* son poco comunes. Estas proteínas son mucho más pequeñas y sus respectivos mRNAs están sujetos a “splicing”

alternativo; no obstante, confrieron tolerancia a metales pesados cuando se expresaron en células de levadura. En particular, *LjPCS3* se activó por Al, mientras que *LjPCS1* no. Estos resultados revelan complejos mecanismos reguladores de expresión de PCS en los tejidos de leguminosas en respuesta a metales pesados y Al.

Algunos metales inducen estrés oxidativo en plantas por lo que se examinó el efecto de Al en glutation peroxidasas (GPXs) (Figura 23). Éstas son enzimas antioxidantes que catalizan la reducción de hidroperóxidos de fosfolípidos en las membranas biológicas y por consiguiente protegen del daño oxidativo. Seis genes GPX fueron identificados en *L. japonicus* y *L. corniculatus*. Se expusieron plantas de *L. corniculatus* a 20 μM Al durante 1-24 h. El tratamiento con Al disminuyó la expresión de todos los genes GPX, lo que sugiere que el efecto tóxico de este metal es en parte debido a una disminución en defensas antioxidantes que llevan a la peroxidación de lípidos de la membrana.

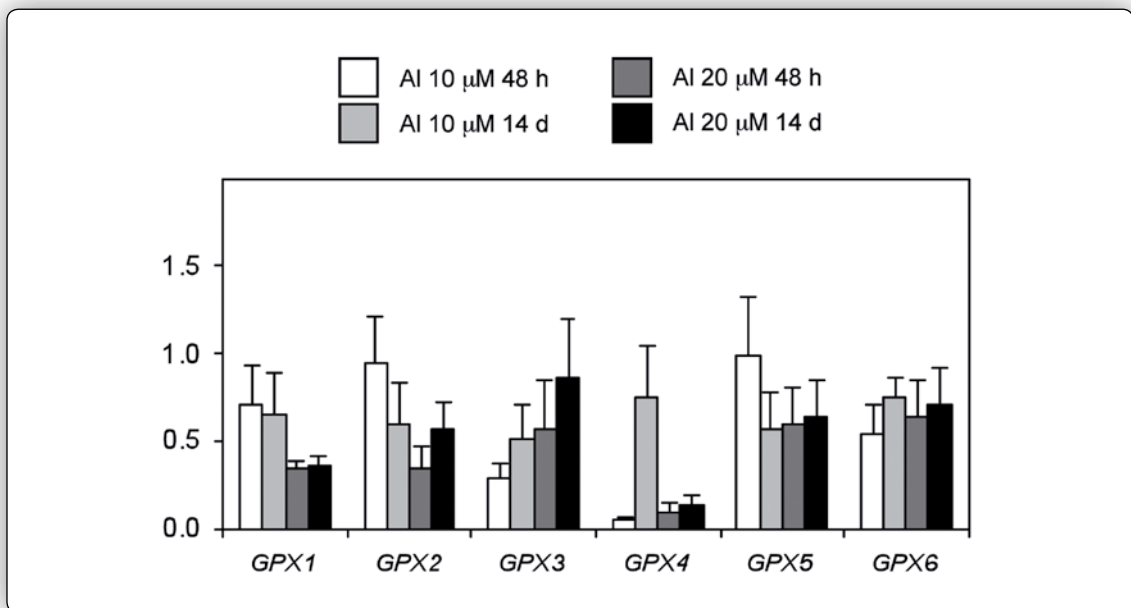


Figura 23. Efectos del aluminio sobre la expresión de genes que codifican glutatión peroxidasas (GPXs) en las raíces de *Lotus corniculatus*. Los valores de niveles de mRNA están normalizados en relación a los de ubiquitina y están expresados en relación a los de plantas control (sin tratar)

5.3. Respuesta radicular al estrés por Al

Mediante el uso de medidas electrofisiológicas es posible definir las fuerzas motrices de los iones en la membrana plasmática. El crecimiento y los potenciales de membrana (E_m) de varios cultivares de *Lotus corniculatus* agrícolamente importantes fueron medidos y se encontró una buena correlación entre ellos bajo estrés por Al (Botanický ústav SAV, Slovakia). La disminución de E_m fue provocada más por la disminución de difusión potencial (E_d) que por la parte activa del potencial generado por la actividad H^+ -ATPasa (Tabla 3). La caída de E_d bajo estrés por Al está acompañada por una pérdida significativamente más alta de K^+ en tejido radicular de los cultivares más sensibles. A partir de aquí, INIA Draco fue elegido para posteriores experimentos como el cultivar relativamente más sensible y UFRGS fue escogido como el más tolerante.

Dado que la elongación de la raíz está asociada con la actividad H^+ -ATPasa de la membrana plasmática, su actividad fue investigada durante el tratamiento con Al usando fusicoccina (FC), observándose un aumento del consumo de O_2 . El Al causó una ligera disminución del rango y velocidad de la hiperpolarización de la membrana en el cultivar UFRGS, mientras que en INIA Draco dicha inhibición fue mucho más alta. Estos resultados sugieren una mayor capacidad del cultivar UFRGS para mantener la función de

las bombas de ATP bajo estrés por Al que en el caso de cultivar INIA Draco. El cultivar UFRGS también mostró una tasa de consumo de O_2 significativamente más baja que INIA Draco.

Mediante microscopía óptica y electrónica se pudo observar un aumento de la vacuolización en las puntas de la raíz después del tratamiento a pH más bajo (pH=4.0), con vacuolas pequeñas especialmente en las capas centripetas de la raíz. El tratamiento con Al causó daños en células epidérmicas, que parecían desintegradas. Las células corticales estaban fuertemente vacuoladas cerca de la punta de la raíz. Debido al tratamiento con Al, fueron visibles unas enormes protuberancias de la pared celular y las células que carecían de tales modificaciones de la pared parecían más severamente dañadas, lo que sugiere su papel protector. Los experimentos mostraron que las respuestas al bajo pH así como al Al fueron similares en la planta modelo, *L. japonicus* Gifu y en la cultivada *L. corniculatus*, las diferencias entre cultivares fueron más bien cuantitativas. El daño en células epidérmicas y las primeras capas corticales fue más severo en el cultivar INIA Draco que en UFRGS (núcleo y todos los orgánulos citoplasmáticos desintegrados). En INIA Draco la lesión estructural se observó también en las células corticales más internas.

Tabla 3. Potencial de reposo (E_M) y potencial de difusión (E_D) después de 4 días de tratamiento a pH=5.5, pH=4.0 y pH=4.0 + 2 mm AlCl₃ (\pm SE, n=25).

| cultivar | pH=5.5 | | pH=4.0 | | pH=4.0 + 2mM Al | |
|--------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| | E_M | E_D | E_M | E_D | E_M | E_D |
| INIA Draco | 133.6 (\pm 1.2) | 72.5 (\pm 1.2) | 121.4 (\pm 1.6) | 68.0 (\pm 0.8) | 86.4 (\pm 1.6) | 31.4 (\pm 1.3) |
| Est. Ganador | 128.0 (\pm 1.2) | 72.5 (\pm 0.6) | 117.3 (\pm 1.1) | 68.9 (\pm 0.6) | 100.1 (\pm 0.7) | 49.8 (\pm 0.5) |
| San Gabriel | 125.6 (\pm 0.8) | 72.6 (\pm 0.8) | 113.0 (\pm 1.1) | 67.3 (\pm 0.9) | 101.8 (\pm 1.3) | 40.2 (\pm 1.2) |
| São Gabriel | 126.4 (\pm 1.5) | 72.6 (\pm 0.9) | 122.3 (\pm 1.0) | 70.3 (\pm 0.8) | 105.8 (\pm 1.2) | 50.8 (\pm 1.0) |
| UFRGS | 131.9 (\pm 2.4) | 72.2 (\pm 1.1) | 131.0 (\pm 1.2) | 72.0 (\pm 0.8) | 110.4 (\pm 1.8) | 54.4 (\pm 0.7) |



Figura 24. Caracterización del efecto del aluminio en especies de *Lotus* species con suelo



Figura 25. Caracterización del efecto del aluminio en especies de *Lotus* en medios hidropónicos con solución nutritiva

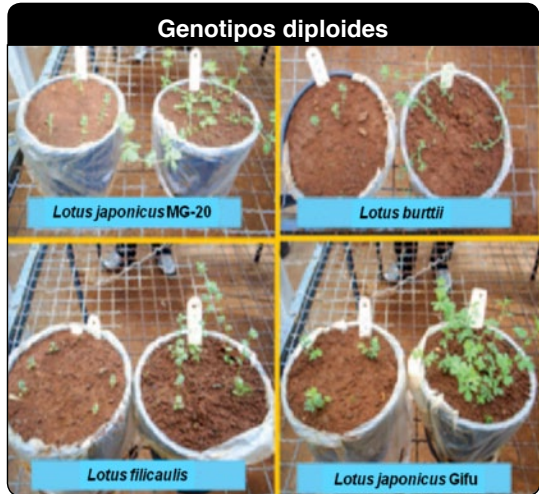


Figura 26. Efecto del aluminio en todas las especies modelo de *Lotus*.

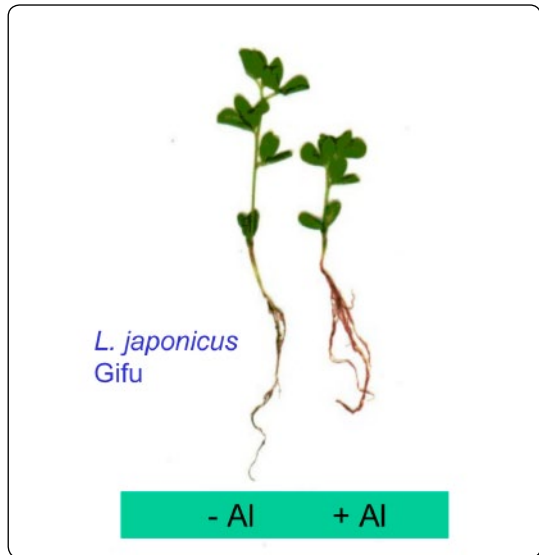


Figura 27. Efecto del aluminio en *L. japonicus* Gifu bajo condiciones de estrés y control.

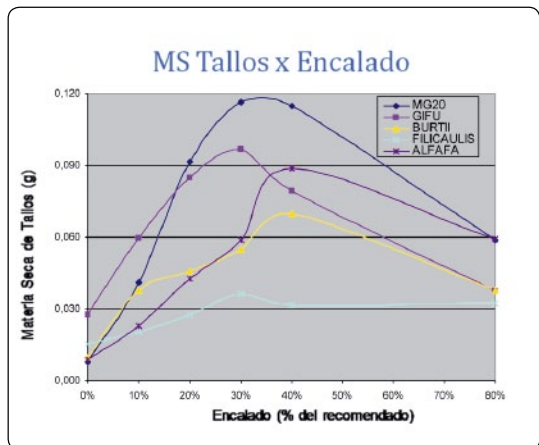


Figura 28. Comportamiento de las especies modelo de *Lotus* y alfalfa bajo niveles diferenciales de estrés por aluminio en suelo.

5.4. Comparación de la respuesta a Al entre plantas modelo y plantas cultivadas

La caracterización del germoplasma disponible (diploide y tetraploide) para la tolerancia a Al y la selección de poblaciones con un comportamiento mejor en suelos con una alta saturación de Al también fue realizada por UFRGS (Porto Alegre, Brazil). El primer paso fue la caracterización de especies de *Lotus* crecidas en suelo (Figura 24) y en cultivo hidropónico (Figura 25). La presencia de Al causó una reducción grande del crecimiento en todas las plantas (Figura 26). Entre las especies modelo, *L. japonicus* Gifu fue el mejor bajo las condiciones de estrés (Figuras 27 y 28).

Entre el germoplasma tetraploide las poblaciones UFRGS y São Gabriel presentaron el mejor comportamiento bajo condiciones de estrés, mientras la alfalfa, usada como testigo sensible, tenía un comportamiento muy pobre bajo estas condiciones, confirmando la intensidad del estrés por Al.

Debido a que los experimentos con suelo son largos y tediosos (Figura 29), se desarrolló un método alternativo utilizando solución nutritiva mineral (Figura 30). Los resultados mostraron una importante reducción del crecimiento causado por Al y también confirmaron la respuesta diferencial (contrastante) entre genotipos tetraploides, con UFRGS (tolerante) e INIA DRACO (sensible). Por otro lado, se estudió también un conjunto de RILs (líneas recombinantes) obtenido tras cruzamientos entre especies de *Lotus* modelo, con el objetivo de acelerar el proceso del mejoramiento genético en las especies cultivadas. Aunque hubo una gran variabilidad entre las RILs para tolerancia a Al, se identificó un grupo de líneas que mostraron un mejor comportamiento que el padre más tolerante (*L. japonicus* Gifu), indicando la posibilidad de usarlas en el programa de mejoramiento.



Figura 29. Procedimiento para ajustar la concentración de aluminio en suelo

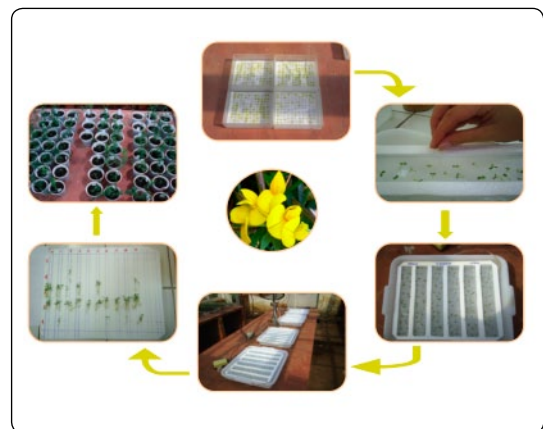


Figura 30. Procedimiento para la evaluación de tolerancia a aluminio con solución nutritiva



Figura 31. Caracterización de *Lotus corniculatus* por tipo de raíz en suelo



Figura 32. Procedimiento para el cruzamiento manual de fenotipos selectos

5.5. Selección de poblaciones de *Lotus corniculatus* tolerantes a estrés por Al en Brasil

Trás esta caracterización inicial, se inició la selección de poblaciones con respuestas contrastantes a Al, así como para diferentes morfologías de raíces (Figura 31). Por razones de tiempo se pudieron completar sólo dos ciclos de selección, en suelo y en cultivo hidropónico. Los resultados hasta ahora muestran una mejora en las poblaciones seleccionadas tanto cuando fueron evaluadas en suelo como en hidroponia. Las poblaciones seleccionadas se cruzaron (Figura 32) y deben probarse ahora bajo las condiciones reales de suelo, con el *Rhizobium* apropiado (seleccionado en otra parte del proyecto), para evaluar el progreso logrado. También se determinó la producción de ácidos orgánicos por los germoplasmas seleccionados, dado que este es uno de los mecanismos relacionado a la tolerancia de Al en las plantas. Los cultivares así como las correspondientes F1 de UFRGS, INIA Draco, San Gabriel-Uruguay y São Gabriel-Brasil fueron sometidas a una alta concentración de Al y se midió la exudación de ácido oxálico. Los resultados demostraron que de los tres ácidos orgánicos probados, el único que pudo ser cuantificado por cromatografía fue el oxálico. De todos los genotipos de *Lotus* evaluados, la población UFRGS exhibió una mayor exudación de ácido oxálico comparada con el resto. El papel protector del ácido oxálico frente al

Al ya se ha demostrado en otras especies y podría vincularse a la tolerancia observada en *L. corniculatus*. Esto será muy útil en la selección de materiales tolerantes así como para la explicación del mecanismo de la tolerancia a Al involucrado en *L. corniculatus*.

5.6. Selección de poblaciones tolerantes a Al en Chile

Otra especie estudiada por la Univ. Austral (Chile) fue *Lotus uliginosus* (Lu), el cual está naturalizado en Chile, principalmente en la zona sur dónde predominan los suelos ácidos. Veintiocho poblaciones de Lu, colectadas en diferentes agro-ecosistemas del sur de Chile fueron caracterizadas de acuerdo a su sensibilidad/tolerancia al estrés por Al en condiciones de campo, en suelos con 3 diferentes niveles de Al intercambiable para evaluar su comportamiento y seleccionar plantas sensibles y tolerantes a Al. Los criterios de selección fueron altura de la planta, número de hojas y número de ramificaciones por planta. Las plantas seleccionadas como tolerantes fueron aquellas con valores más altos en 0.5 y 1.0 cmol.kg⁻¹ de Al, y las sensibles aquellas con los índices más bajos en 0.5 cmol.kg⁻¹ de Al. Las plantas sensibles tenían en promedio un 67% menor altura, 40% menor número de hojas y 30% menor número de ramificaciones que las tolerantes. Las plantas seleccionadas se trasplantaron a una condición sin Al para continuar creciendo hasta la producción de semilla. Para ello fueron cultivadas separadamente y sometidas a polinización cruzada y controlada dentro de cada grupo de sensibilidad al Al. Además, las plantas se mantuvieron en crecimiento durante toda la estación y entonces cosechadas para evaluar su producción de materia seca (biomasa de tallos y raíces) como promedio de la población, longitud y densidad radicular y concentración de Al tanto en parte aérea como en raíces. Las poblaciones fueron clasificadas en cuatro categorías según su tolerancia o sensibilidad a Al. Estas poblaciones (dos tolerantes y dos sensibles) y las especies consideradas como plantas mode-

lo fue evaluadas en su comportamiento bajo cinco niveles de Al en solución a pH 4.2, en cultivo hidropónico. Los resultados sugieren mecanismos diferentes de adaptación y tolerancia al efecto fitotóxico del Al. Las poblaciones clasificadas como tolerantes en los ensayos de campo mantuvieron esta característica. *L. japonicus* ecotipo Gifu mostró una tolerancia mayor a la fitotoxicidad del Al comparado con las otras especies modelo. La biomasa aérea, la variable usada como parámetro de tolerancia o sensibilidad de las especies y poblaciones, disminuyó significativamente por encima de 180 $\mu\text{mol Al}$ en las poblaciones tolerantes. No obstante, en las poblaciones sensibles, la biomasa aérea disminuyó significativamente por encima de 100 $\mu\text{mol Al}$. La longitud de la raíz disminuyó marcadamente, mostrando la alta sensibilidad de este órgano a la exposición a altas concentraciones de Al.

Finalmente, se realizó otro experimento para caracterizar el comportamiento de poblaciones de *L. uliginosus* (dos sensibles, Sen1 y Sen2 y dos tolerantes, Tol1 y Tol2), seleccionadas previamente, comparadas con las especies modelo, *L. burttii* (Lb), *L. japonicus* (Lj), ecotipos MG-20 y Gifu, y *L. filicaulis* (Lf). Todas las especies fueron cultivadas bajo cinco niveles de Al, pH 4.2, en cámara de crecimiento. El rendimiento de materia seca de los tallos y raíces de todos los genotipos estudiados disminuyó proporcionalmente a la concentración de Al en solución. Sin embargo, la caída de rendimiento de materia seca fue diferente

dependiendo de las especies de *Lotus* o poblaciones de Lu. Lf, Lb, Lj MG-20 y Lu Sen1 fueron las más sensibles a la toxicidad del Al (100 $\mu\text{mol Al}$) y Gifu y Lu Sen2 quedaron en una posición intermedia. Los genotipos más tolerantes a la toxicidad del Al fueron las poblaciones de Lu seleccionadas Tol1 y Tol2, las cuales toleraron hasta 180 $\mu\text{mol Al}$. y mostraron una reducción significativa del rendimiento de materia seca sólo en el nivel de 300 $\mu\text{mol Al}$. Todas las especies de *Lotus* tenían altas concentraciones de Al en los tallos y acumularon aluminio en las raíces. Las especies más tolerantes acumularon más Al en las raíces sin disminuir la biomasa de los tallos.

5.7. Conclusiones

Se identificaron distintos efectos negativos del Al y la acidez en *Lotus*, tales como una marcada reducción del crecimiento de la raíz y la parte aérea, reducción de las defensas antioxidantes y un intenso daño de las células epidérmicas y corticales de la raíz. Además, se encontró que la acumulación y secreción de ciertos ácidos orgánicos como el oxálico o el isopropilmálico pueden representar respuestas importantes y ser considerados como marcadores de la tolerancia de *Lotus* a la acidez y el Al. La identificación y selección de genotipos con mayor tolerancia a Al en especies cultivadas de *Lotus* fue exitosa, si bien se necesitan estudios adicionales para confirmar este carácter en condiciones de campo.



Capítulo 6.

Fijación simbiótica de
nitrógeno por *Lotus*

Capítulo 6. Fijación simbiótica de nitrógeno por *Lotus*



6.1. Introducción

La incertidumbre o incluso la falta de información sobre la realidad de la fijación de nitrógeno por especies cultivadas de *Lotus* en algunos países de Sudamérica, convierte el objetivo de obtener inoculantes mejorados en un punto fundamental para el éxito de los *Lotus* forrajeros en suelos y ambientes limitantes. En algunos países como Uruguay, existe una larga tradición de uso de inoculantes para leguminosas, situación que no se da en otros países como Argentina, Brasil o Chile. En zonas con tradición de *Lotus* en pasturas, los suelos pueden contener cantidades importantes de rizobios específicos de estas especies. Sin embargo, en la mayoría de los casos se desconoce cual es la contribución real de estas bacterias nativas o naturalizadas a la fijación de nitrógeno por *Lotus* y por tanto a su productividad. Bajo condiciones óptimas, la inoculación puede resultar en incrementos de biomasa varias veces superiores a las pasturas no inoculadas, lo que evidencia el impacto agronómico, económico y ecológico de estas prácticas. No obstante, las condiciones particulares en cada caso pueden determinar que la inoculación resulte ineficaz. A menudo, la existencia de estreses ambientales condiciona la eficacia de la inoculación, lo que genera la necesidad de obtener inoculantes bacterianos particularmente adaptados a dichas condiciones. Los estreses de tipo abiótico afectan la viabilidad y per-

sistencia de los rizobios, además de al propio proceso de fijación simbiótica de nitrógeno.

Al comienzo de este proyecto, la información disponible sobre los rizobios simbiotes de *Lotus* se limitaba a que *Mesorhizobium loti* era el simbiote tipo de ciertas especies de *Lotus* como *L. tenuis*, *L. corniculatus* o *L. japonicus*, mientras que otros como *L. uliginosus* se asociaban con rizobios del género *Bradyrhizobium* que además habían sido muy poco estudiados. De hecho, los inoculantes comerciales disponibles en todo el mundo utilizaban bacterias de uno u otro tipo.

Uno de los objetivos de LOTASSA fue el establecimiento de una colección detallada de rizobios simbiotes de *Lotus* procedentes de cada uno de los países participantes, y la selección de cepas candidatas para la elaboración de inoculantes para *Lotus* forrajeros especialmente efectivos en suelos de baja fertilidad y con limitantes ambientales (acidez, salinidad, sequía).

La colección de LOTASSA (<http://microorganism.LOTASSA-databases.org/LOTASSA-mo/indexmo.html>), contiene más de 1.000 cepas de rizobios aislados de suelos estresados (por sequía, salinidad o acidez) de Argentina, Brasil, Chile y Uruguay, así como de varios países europeos. La mayoría de estos aislados han sido caracterizados a nivel genético y fenotípico, con énfasis particular en las características simbióticas y la tolerancia a estreses abióticos (Figura 33 y 34).



Figura 33. Procedimiento habitual para el aislamiento, análisis y conservación de rizobios de *Lotus*.



Figura 34. Página de acceso a la base de datos de rizobios de *Lotus*

6.2. Uruguay

L. corniculatus y *L. uliginosus* son tradicionalmente usados en Uruguay para la mejora de pasturas, inoculados con rizobios importados de Australia o Nueva Zelanda en los 60's, lo cual ha generado excelente beneficios económicos y ambientales. No obstante, estos inoculantes fueron evaluados solo para ciertos ambientes, sin considerar limitantes ambientales como el déficit hídrico, o la presencia de rizobios nativos o naturalizados, los cuales son muy competitivos para la nodulación pero a menudo poco eficientes en fijación de nitrógeno.

Trece lugares en el país, elegidos por su características como la sequia temporal, historia previa de cultivo de *Lotus*, o el uso previo de inoculantes de *Lotus*, fueron muestreados para aislar cerca de 300 cepas de nódulos de *L. corniculatus* o *L. uliginosus*. Se estimó una diversidad genética superior al 50% en base a los perfiles genómicos de estas cepas obtenidos mediante ERIC-PCR (Figura 35). Los estudios taxonómicos, basados principalmente en la secuencia del gen del ARNr 16S, mostraron que *L. corniculatus* es nodulado principalmente por especies del género *Mesorhizobium*: *M. loti*, *M. amorphae*, *M. taishanense*, and *M. septentrionale*, en tanto que *L. uliginosus* se asocia con bacterias del género *Bradyrhizobium*. Por lo general, los rizobios fueron muy específicos para cada *Lotus*. A partir de estudios simbióticos en invernadero, se encontró que varias de las cepas aisladas son tan o incluso más productivas que las actualmente recomendadas como inoculantes, lo cual está en proceso de evaluación en condiciones de campo.

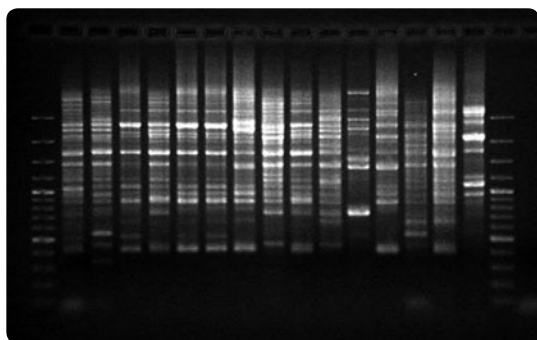


Figura 35. Ejemplo de análisis por PCR de las cepas de rizobios

6.3. Brasil

Se obtuvieron unos 600 aislados a partir de suelos de 40 lugares dispersos por el estado de Rio Grande del Sur, lo que incluía suelos con pH ácido a neutro. En muchos sitios no había rizobios de *Lotus* o éstos eran inefectivos. En cambio, se aislaron rizobios de *Lotus* incluso en algunos lugares sin historia previa de estas especies, lo que seguramente se explica por el hecho de que dichas bacterias también pueden nodular a la leguminosa nativa *Desmodium incanum*. La diversidad genética entre estos rizobios fue elevada y los resultados (aún preliminares) indican que pertenecen a al menos dos géneros diferentes, *Mesorhizobium* y *Bradyrhizobium*. Se estudió la eficacia simbiótica de los aislados con 4 especies de *Lotus*: *L. corniculatus*, *L. uliginosus*, *L. subbiflorus*, *L. tenuis*. Muchas de las nuevas cepas fueron más efectivas que las actualmente recomendadas, e incluso las plantas fueron más productivas que las fertilizadas con nitrógeno combinado. Además, varias de estas cepas mostraron alta tolerancia a acidez y niveles tóxicos de aluminio, lo que los califica como candidatos para inoculantes de *Lotus* en suelos ácidos. Algunos de ellos fueron incluso evaluados a nivel de campo.

6.4. Argentina

Utilizando *L. tenuis* como planta trampa, se obtuvieron 103 aislados procedentes de suelos tipo de la Cuenca del río Salado. La diversidad genética de estos rizobios fue muy elevada, y los estudios taxonómicos mostraron que *L. tenuis* en estos suelos puede ser nodulado por bacterias pertenecientes a 4 géneros distintos: *Mesorhizobium* (*M. ciceri*, *M. loti*, *M. tianshanense*, *M. amorphae*, *M. mediterraneum*) *Rhizobium* (*R. etli*, *R. gallicum*, *R. tropici*) *Agrobacterium* (*A. tumefaciens*) y *Aminobacter* (*A. aminovorans*). Con independencia de su filiación taxonómica, todos estos rizobios mostraron un estrecho rango de hospedador, capaces de nodular *L. tenuis* (y probablemente también *L. corniculatus*) pero no *L. uliginosus*. No en vano todos ellos poseen

genes simbióticos muy similares. Bajo condiciones de laboratorio, 19 cepas mostraron mayor eficiencia simbiótica que las cepas de referencia. Además, muchas de ellas son altamente tolerantes a salinidad y pH alcalino. De hecho, 18 cepas fueron catalogadas como potenciales candidatos a nuevos inoculantes para *L. tenuis* en la Cuenca del Salado, lo cual debe ser verificado mediante estudios a campo.

6.5. Chile

158 aislados procedentes de suelos de 15 localidades (desde la VI a la XIV región) de Chile fueron obtenidos a partir de *L. corniculatus*, *L. tenuis*, y *L. uliginosus*. Los pHs de estos suelos variaron entre 4.6 y 7.6. La diversidad genética basada en perfiles ERIC-PCR fue elevada. Estudios taxonómicos preliminares indicaron que las bacterias pertenecen a los géneros *Mesorhizobium* y *Bradyrhizobium*. Unos 70 aislados fueron ensayados para eficiencia simbiótica y tolerancia a acidez. Varias de las cepas fueron más productivas que la fertilización con N combinado, y algunas además fueron ácido-tolerantes. Ensayos a campo determinarán su eficacia en tales condiciones.

6.6. España y Portugal

Se recolectaron muestras de suelo y nódulos de varios puntos (en general afectados por salinidad o bien por metales pesados) de la Península Ibérica (España y Portugal) y las Islas Canarias, y se obtuvieron un total de 272 aislados simbiotes de diversas especies de *Lotus*. La identificación molecular de los mismos mostró la presencia de al menos 4 géneros bacterianos diferentes: *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Aminobacter*. Los bradyrizobios fueron encontrados en suelos de Portugal altamente contaminados y aislados de nódulos de *L. uliginosus* y *L. corniculatus*, fueron eficientes con la primera pero poco o nada eficientes con la segunda, y pertenecen a la especie *B. japonicum* o a *Bradyrhizobium* genospecie α . Además de *Lotus*, fueron también capaces de nodular *Lupinus*. Los mesorizobios fueron recupera-

dos de varios suelos de la península y las islas Canarias, y se adscribieron a varias especies: *Mesorhizobium tianshanense/tarimense*, *M. chacoense/albiziae*, *M. plurifarum*, *M. ciceri*, y a *M. alaghi*. Los sinorizobios (*Sinorhizobium meliloti*, *S. sahelii/S. kostiense* y *S. fredii*) aparecieron como simbiotes de *L. lancerottensis*, *L. sessilifolius* o *L. kunkelii* en las islas Canarias, algunas de estas especies es considerada en peligro de extinción. Algunos aislados, encontrados tanto en la península como en las islas, podrían estar relacionados con el género *Aminobacter*. La caracterización fenotípica mostró que los bradyrizobios son sensibles a salinidad y bien adaptados a pH 6. Los sinorizobios fueron muy tolerantes a sal y pH, pero malos simbiotes con *L. corniculatus* y *L. tenuis*. Sobre el 10% de los mesorizobios fueron al mismo tiempo tolerantes a sal y a pH entre 6 y 8, y eficientes con *L. corniculatus*. Un porcentaje significativo se comportaron como bacterias halófilas, mostrando mejor crecimiento y eficiencia simbiótica en presencia de altas concentraciones de sal.

6.7. Europa Central y del Norte

Se aislaron los rizobios simbiotes de 21 poblaciones naturales de *L. corniculatus* y *L. uliginosus* en Alemania, Suecia, Noruega, Austria e Italia. Se estudiaron 40 cepas, incluido su rango de hospedador. *L. uliginosus* fue normalmente nodulado por bacterias de los géneros *Bradyrhizobium* o *Rhodopseudomonas*, en tanto que *L. corniculatus* se asoció estrictamente con bacterias del tipo *Rhizobium* y *Mesorhizobium*.

6.8. Conclusiones finales

Los resultados de LOTASSA probablemente representan el estudio más amplio sobre simbiotes de *Lotus* a nivel mundial. Con una escala intercontinental, LOTASSA pudo descubrir la amplia y largamente inexplorada diversidad de rizobios de *Lotus* en muchos países y diversas situaciones medio ambientales. Incluso nosotros hemos quedado sorprendidos por esta enorme diversidad



Capítulo 7.

Publicaciones

Capítulo 7. Publicaciones



Año 2005

Márquez, A.J., Betti, M., García-Calderón, M., Pałove-Balang, P., Díaz, P., Monza, J. 2005. "Nitrate assimilation in *Lotus japonicus*". Journal of Experimental Botany 56:1729-1739.

Año 2006

Betti, M., Arcondéguy, T., Márquez, A.J. 2006. "Molecular analysis of two mutants from *Lotus japonicus* deficient in plastidic glutamine synthetase: functional properties of purified GLN2 enzymes". Planta. 2006 Oct; 224(5):1068-1079. Epub 2006 May 10.

Sandal, N., Petersen, T.R., Murray, J., Ume-hara, Y., Karas, B., Yano, K., Kumagai, H., Yoshikawa, M., Saito, K., Hayashi, M., Murakami, Y., Wang, X., Hakoyama, T., Imaizumi-Anraku, H., Sato, S., Kato, T., Chen, W., Hossain, M.S., Shibata, S., Wang, T.L., Yokota, K., Larsen, K., Kanamori, N., Madsen, E., Radutoiu, S., Madsen, L.H., Radu, T.G., Krussell, L., Ooki, Y., Banba, M., Betti, M., Rispail, N., Skøt, L., Tuck, E., Perry, J., Yoshida, S., Vickers, K., Pike, J., Mulder, L., Charpentier, M., Müller, J., Ohtomo, R., Kojima, T., Ando, S., Marquez, A.J., Gresshoff, P.M., Harada, K., Webb, J., Hata, S., Suganuma, N., Kouchi, H., Kawasaki, S., Tabata, S., Hayashi, M., Parniske, M., Szczygłowski, K., Kawaguchi, M., Stougaard, J. 2006. "Genetics of Symbiosis in *Lotus japonicus*: Recombinant Inbred Lines, Comparative Genetic Maps and Map Position of 35 Symbiotic Loci". MPMI 17:80-91.

Año 2007

Escaray, F.J., Pesqueira, J., Pieckenstain, F.L., Carrasco, P., Ruiz, O.A. 2007. "Taninos condensados y antocianinas en el género *Lotus*: su relación con el estrés salino en especies forrajeras para zonas marginales". Innovación y Tecnología Agroalimentaria. (ITA España) 2:113-123.

Pałove-Balang, P., Mistrík, I. 2007. "Impact of low pH and aluminium on nitrogen uptake and metabolism in roots of *Lotus japonicus*". Biologia 62:715-719.

Radutoiu, S., Madsen, L.H., Madsen, E.B., Jurkiewicz, A., Fukai, E., Quistgaard, E.M.H., Albrektsen, A.S., James, E.K., Thirup, S., Stougaard, J. 2007. "LysM domains mediate lipochitin-oligosaccharide recognition and Nfr genes extend the symbiotic host range". The EMBO Journal 26(17):3923-3935.

Ramos, J., Clemente, M.R., Naya, L., Loscos, J., Pérez-Rontomé, C., Sato, S., Tabata, S., Becana, M. 2007. "Phytochelatase synthases of the model legume *Lotus japonicus*: a small multigene family with differential response to cadmium and alternatively spliced variants". Plant Physiology 143:1110-1118.

Rubio, M.C., Becana, M., Sato, S., James, E.K., Tabata, S., Spaink, H.P. 2007. "Characterization of genomic clones and expression analysis of the three types of superoxide dismutases during nodule development in *Lotus japonicus*". Molecular Plant-Microbe Interactions 20:262-275.

Sannazzaro, A., Echeverría, M., Albertó, E., Ruiz, O.A., Menéndez, A. 2007. "Modulation of polyamine balance in *Lotus glaber* by salinity and arbuscular mycorrhiza". *Plant Physiology and Biochemistry* 45(1):39-46.

Spörri, L. 2007. "Post-translational regulation of glutamine synthetase in *Lotus japonicus*: a role for Mg²⁺ and quaternary structure". Master Thesis. Facultad de Química, Universidad de Sevilla. Convenio Universidad de Sevilla (España) - Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (Suiza). 23 February 2007.

Año 2008

Echeverría, M., Scambato, A.A., Sannazzaro, A.I., Maiale, S., Ruiz, O.A., Menéndez, A.B. 2008. "Phenotypic plasticity with respect to salt stress response by *Lotus glaber*: the role of AM fungal and rhizobial symbionts". *Mycorrhiza* 18:317-329.

Hougaard, B.K., Madsen, L.H., Sandal, N., Moretzsohn, M.C., Fredslund, J., Schauser, L., Anna Nielsen, M., Rohde, T., Sato, S., Tabata, S., Bertioli, D.J., Stougaard, J. 2008. "Legume Anchor Markers Link Syntenic Regions Between *Phaseolus vulgaris*, *Lotus japonicus*, *Medicago truncatula* and *Arachis*". *Genetics* 179:2299-2312.

Loscos, J. 2008. "Metabolismo de ascorbato y tioles en leguminosas". PhD thesis published on-line.

Naya, L. 2008. "Respuesta fisiológica, bioquímica y molecular de las leguminosas a estreses abióticos". PhD thesis published on-line.

Minchin, F.R., James, E.K., Becana, M. 2008. "Oxygen diffusion, production of reactive oxygen and nitrogen species, and antioxidants in legume nodules". In *Leguminous Nitrogen-Fixing Symbioses* (Dilworth, M.J., James, E.K., Sprent, J.I., Newton, W.E., eds), chapter 11: pp 321-362, Springer Science

Ramos, J., Naya, L., Gay, M., Abián, J., Becana, M. 2008. "Functional characterization of an unusual phytochelatin synthase,

LjPCS3, of *Lotus japonicus*". *Plant Physiology* 148:536-545

Sanchez, D., Lippold, F., Redestig, H., Hannah, M., Erban, A., Kraemer, U., Kopka, J., Udvardi, M. 2008. "Integrative functional genomics of salt acclimation in the model legume *Lotus japonicus*". *Plant Journal* 53:973-987.

Sanchez, D.H., Redestig, H., Kraemer, U., Udvardi, M.K., Kopka, J. 2008. "Metabolome-ionome-biomass interactions: What can we learn about salt stress by multiparallel phenotyping?". *Plant Signaling and Behavior* 3(8):598-600

Sanchez, D.H., Siahpoosh, M.R., Roessner, U., Udvardi, M., Kopka, J. 2008. "Plant metabolomics reveals conserved and divergent metabolic responses to salinity". *Physiologia Plantarum* 132(2):209-219

Año 2009

Bertioli, D.J., Moretzsohn, M.C., Madsen, L.H., Sandal, N., Leal-Bertioli, S.C.M., Guimarães, P.M., Hougaard, B.K., Fredslund, J., Schauser, L., Nielsen, A.M., Sato, S., Tabata, S., Cannon, S.B., Stougaard, J. 2009. "An analysis of synteny of *Arachis* with *Lotus* and *Medicago* sheds new light on the structure, stability and evolution of legume genomes". *BMC Genomics* 10:45.

Estrella, M.J., Muñoz, S., Soto, M.J., Ruiz, O., Sanjuán, J. 2009. "Genetic diversity and host range of rhizobia nodulating *Lotus tenuis* in typical soils of the Salado River Basin (Argentina)". *Appl. Environ. Microbiology* 175: 1088-1098.

García-Calderón, M. 2009. "Consecuencias fisiológicas de la deficiencia en glutamina sintetasa plástica en plantas de *Lotus japonicus*". Ph.D.Thesis. University of Seville (Spain).

León-Barrios, M., Lorite, M.J., Donate-Correa, J., Sanjuán, J. 2009. "*Ensifer meliloti* bv. *lancerottense* establish nitrogen-fixing symbiosis with *Lotus* endemic to the Canary Islands and show distinctive symbiotic genoty-

pes and host range". Systematic and Applied Microbiology 32:413-420

Melchiorre, M., Quero, G., Parola, R., Racca, R., Trippi, V., Lascano, H.R. 2009. "Physiological characterization of four model *Lotus* diploid genotypes: *L. japonicus* (MG-20 and Gifu), *L. filicaulis*, and *L. burttii* under salt stress". Plant Science 177:618-628

Pavlovkin, J., Paľove-Balang, P., Kolarovič, L., Zelinová, V. 2009. "Growth and functional responses of different cultivars of *Lotus corniculatus* to aluminum and low pH stress". Journal of Plant Physiology 166:1479-1487.

Pesqueira, J. 2009. "Evaluación de poblaciones contrastantes de *Lotus tenuis* frente al estrés salino y su uso en la obtención de cultivares comerciales". Tesis Doctoral Universidad Politécnica de Valencia (España) de la Ing. Agrónoma Julieta Pesqueira. Aprobada Mayo 2009.

Ramos, J., Matamoros, M., Naya, L., James, E.K., Rouhier, N., Sato, S., Tabata, S., Becana, M. 2009. "The glutathione peroxidase gene family of *Lotus japonicus*: characterization of genomic clones, expression analyses and immunolocalization in legumes". New Phytologist 181:103-114. Epub. 2008 Sep 29

Rubio, M.C., Bustos-Sanmamed, P., Clemente, M.R., Becana, M. 2009. "Effects of salt stress on the expression of antioxidant genes and proteins in the model legume *Lotus japonicus*". New Phytologist 181:851-859

Sanchez, D.H., Szymanski, J., Erban, A., Udvardi M.K., Kopka, J. 2009. "Mining for robust transcriptional and metabolic responses to long-term salinity: a case study in a model legume". Invited review for Plant Cell and Environment. (DOI: 10.1111/j.1365-3040.2009.02047.x)

Svend, D., Laursen, B.S., Ornfelt, J.H., Jochimsen, B., Staerfeldt, H.H., Friis, C., Nielsen, K., Goffard, N., Besenbacher, S., Krusell, L., Sato, S., Tabata, S., Thøgersen, I.B., Enghild, J.J., Stougaard, J. 2009. "The proteome of seed de-

velopment in the model legume *Lotus japonicus*." Plant physiology 149(3):1325-40.

Zelinová, V., Huttová, J., Mistrík, I., Paľove-Balang, P., Tamás, L. 2009. "Impact of aluminum on phosphate uptake and acid phosphatase activity in root tips of *Lotus japonicas*." J. Plant Nutr. 32:1633-1641.

Año 2010

Acuña, H., Inostroza, L., Sánchez, M.P., Tapia, G. 2010. "Drought-tolerant naturalized populations of *Lotus tenuis* for constrained environments". Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Plant and Soil Science 60(2):174-181.

Bek, A.S., Sauer, J., Thygesen, M.B., Duus, J.Ø., Petersen, B.O., Thirup, S., James, E., Jensen, K.J., Stougaard, J., Radutoiu, S. 2010. "Improved Characterization of Nod Factors and Genetically Based Variation in LysM Receptor Domains Identify Amino Acids Expendable for Nod Factor Recognition in *Lotus* spp." Mol Plant Microbe Interact. 2010 Jan; 23(1):58-66.

Fontoura, R.A., Frizzo, M.L.S., Osório B.D., Tonon, B.C., Binz, A., da Silva, M.C., Camargo, F.A.O., Selbach, P.A., Sá, E.L.S. 2010. "Native Rhizobia from Rio Grande do Sul symbiotically efficient in *Lotus glaber* Mill." Ciência Rural - The Scientific Journal of the Agricultural Center - Federal University of Santa Maria, RS, Brazil (Accepted)

Frizzo, M.L.S., Machado, R.G., de Sá, E.L.S., Stroschein, M.R.D., Rieff, G.G. 2010. "Isolation and characterization of indigenous rhizobia, from soils of Rio Grande do Sul, symbionts in *Lotus uliginosus* Schkuhr." Revista Brasileira de Ciência do Solo, a scientific journal published by the Brazilian Society for Soil Science (SBCS)

Frizzo, M.L.S., Stroschein, M.R.D., de Sá, E.L.S., Machado, R.G., Rieff, G.G. 2010. "Selection of indigenous rhizobia from Rio Grande do Sul in bird's-foot trefoil (*Lotus corniculatus*).". Revista Brasileira de Ciência do

Solo, a scientific journal published by the Brazilian Society for Soil Science (SBCS).

Janke, A., Dall'Agnol, M., Santos, A.M. 2010. "Caracterização molecular de populações de *Lotus corniculatus* selecionadas para tolerância ao alumínio". (submitted)

Janke, A., Dall'Agnol, M., Santos, A.M., Bissani, C.B. 2010. "Seleção de populações de *Lotus corniculatus* L. com maior tolerância ao alumínio em solução nutritiva". Revista Brasileira de Zootecnia (accepted).

Lorite, M.J., Donate-Correa, J., Arco-Aguilar, M., Pérez-Galdona, R., Sanjuan, J., León-Barrios, M. 2010. "*Lotus* endemic to the Canary Islands are nodulated by diverse and novel rhizobial species and symbiotypes". Systematic and Applied Microbiology (accepted).

Lorite, M.J., Muñoz, S., Olivares, J., Soto, M.J., Sanjuán, J. 2010. "Characterization of strains unlike *Mesorhizobium loti* that nodulate *Lotus* in saline soils of Granada, Spain". Applied and Environmental Microbiology (accepted).

Lorite, M. J., Videria e Castro, I., Muñoz, S., Sanjuan, J. 2010. "Isolation and characterization of *Lotus* nodulating bradyrhizobia from Portuguese soils". Applied Environmental Microbiology (submitted).

Pałove-Balang, P., Mistrík, I. 2010. Effect of aluminum on nitrogen assimilation in roots of *Lotus japonicus* (submitted)

Santos, AM., Dall'Agnol, M., Janke, A., Bissani, C.A., Leão, M.L., Santos, L.C. 2010. "Construção e avaliação agrônômica de genótipos de *Lotus corniculatus* com respostas contrastantes ao Al tóxico". (submitted)

Santos, A.M., Dall'Agnol, M., Janke, A., Bissani, C.A., Santos, L.C., Leão, M.L. 2010. "Caracterização de espécies diplóides de *Lotus* em resposta à toxidez por alumínio". (submitted).

Santos, A.M., Dall'Agnol, M., Janke, A., Bortolini, F., Huber, K.C. 2010. "Análise da diversidade genética de *Lotus corniculatus* pelo uso de marcadores microsatélites". (submitted)

Santos, A.M., Dall'Agnol, M., Janke, A., Ramos, G.P., Zuanazzi, J.A., Vieira, F.V.C. 2010. "Root exudation of oxalic acid in *Lotus corniculatus* in response to aluminum toxicity". (submitted)

Stroschein, M.R.D., Wallau, M.O., de Sá, E.L.S., Binz, A., Dall'Agnol, M. 2010. Seleção a campo de rizóbios nativos para cornichão. Revista: Ciência Rural

Tapia, G., Morales, L., Inostroza, L., Acuña, H. 2010. "Molecular characterization of Ltchi7, a gene encoding a Class III endochitinase induced by drought stress in *Lotus* spp." Plant Biology (Accepted).

Tonon, B.C., Frizzo, M.S., Osório Filho, B.D., Fontoura, R.A., Giongo, A., Binz, A., Granada, C.E., de Sá, E.L.S. 2009. "Symbiotic compatibility of rhizobia with forage leguminous *Lotus corniculatus*." Ciência Rural - The Scientific Journal of the Agricultural Center - Federal University of Santa Maria, RS, Brazil.

Sainz, M., Diaz, P., Monza, J. and Borsani, O. 2010. "Heat stress results in loss of chloroplast Cu/Zn superoxide dismutase and increased damage to Photosystem II in combined drought-heat stressed *Lotus japonicus*". Physiologia Plantarum (accepted)

Lista de investigadores

Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Estación Experimental del Zaidin, Granada, España

Juan Sanjuán P.I. juan.sanjuana@eez.csic.es
José Olivares
María José Soto
María José Lorite
Socorro Muñoz
Rosa Frapolli

Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Estación Experimental de Aula Dei, Zaragoza, España

Manuel Becana P.I. becana@eead.csic.es
Manuel A. Matamoros
María C. Rubio
Carmen Pérez-Rontomé
Joaquín Navascués
María Rebeca Clemente

Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Estación Experimental INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay

Mónica Rebuffo P.I. mrebuffo@inia.org.uy
Federico Condón
María Bemhaja
Alicia Castillo
Alvaro Messa
Rodrigo Saldías
Andrés Vázquez

Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology (MPI-MP), Golm, Germany

Michael Udvardi P.I. mudvardi@noble.org
Joachim Kopka P.I. kopka@mpimp-golm.mpg.de
Lene Krusell
Vivien Bock
Nicole Gatzke
Alexander Lüdemann
Diego Sanchez

Universidad de la República, Facultad de Agronomía, Departamento de Biología Vegetal, Montevideo, Uruguay

Jorge Monza P.I. jmonza@fagro.edu.uy
Omar Borsani
Pedro Díaz
Pilar Irisarri
Mariana Sotelo
María Marta Sainz
Esteban Casaretto
Leticia Batista

Instituto de Investigaciones Biotecnológicas- Instituto Tecnológico de Chascomús (IIB-INTECH), Chascomús, Argentina

*Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET),
Universidad Nacional de San Martín (UNSAM), Buenos Aires, Argentina
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación
Experimental Pergamino, Argentina*

Oscar A Ruiz P.I. ruiz@intech.gov.ar
Fernando Pieckenstein
María Julia Estrella
Alicia Grassano
Patricia Uchiya
María Eugenia Etchepare
Analía Sannazzaro
Julieta Pesqueira
Francisco Escaray
Patricio Vertiz
Ana Menéndez
Adriana Andrés

University of Aarhus, Laboratory of Gene Expression, Aarhus, Denmark

Jens Stougaard P.I. stougaard@mb.au.dk
Niels Sandal
Simona Radutoiu
Lene Madsen

Anita S. Albrektsen
Birgit Kristine Hougaard
Jakob Fredslund
Leif Schauser
Svend Dam

**Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA),
Centro Regional Quilamapu, Chile**

*Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias,
Valdivia, Chile*

Hernan Acuña P.I. hacuna@inia.cl
Fernando Ortega
Rafael Galdames
Oscar Balocchi
Dante Pinochet
Luis Inostroza
Gerardo Tapia

**Universidad de Sevilla, Facultad de Química,
Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología
Molecular, Sevilla, España**

Antonio J. Márquez P.I. cabeza@us.es
Marco Betti
Francisco Galván
Margarita García Calderón
Guillermo Estivill Baena
Alfredo Credali

**Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU),
Institute for Genetics, München, Germany**

Martin Parniske P.I. parniske@lmu.de
Meritxell Antolin Llovera
Jasmin A. Gossmann
Martin Groth

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS),
Faculdade de Agronomia, Dep. Plantas Forrageiras e
Agrometeorologia (DPFA), Porto Alegre, Brasil**

Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, Brasil

Miguel Dall' Agnol P.I. migueld@ufrgs.br
Simone Meredith Scheffer-Basso
Carlos Nabinger
Luis Mauro G. da Rosa
Cerci Maria Carneiro

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
(UFRGS), Faculdade de Agronomia, Departamento
de Solos, Porto Alegre, Brasil**

Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (Fepagro), Porto Alegre, Brasil

Enilson Luiz Saccol de Sá P.I. enilson.sa@gmail.com
Benjamin Dias Osório Filho
Adriana Giongo
Marcos Stroschein
Marcio da Silva Silveira
Luciano Kayser Vargas
Flavio Anastacio de Oliveira Camargo
Pedro Alberto Selbach

**Slovak Academy of Sciences (SAS), Institute of
Botany (BU-SAV), Bratislava, Slovakia**

Igor Mistrík P.I. igor.mistrik@savba.sk
Peter Palove-Balang Peter.Palove-Balang@savba.sk
Milada Čiamporová
Ladislav Tamás
Ján Pavlovkin
Jana Huttova

**Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca,
Dirección General de Recursos Naturales Renova-
bles, Departamento de Microbiología de Suelos,
Montevideo, Uruguay**

Carlos Labandera P.I. clabandera@adinet.com.uy
Martín Jaurena
Karina Punske
María Mayans
Santiago Larghero

**Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
(INTA), Instituto de Fitopatología y Fisiología
Vegetal (IFFIVE), Córdoba, Argentina**

Roberto Racca P.I. rracca@correo.inta.gov.ar
Mariana Melchiorre
H. Ramiro Lascano
Victorio Trippi
Gastón Quero
Rodrigo Parola

**Programa Cooperativo para el Desarrollo Tecnoló-
gico Agroalimentario y Agroindustrial del Cono Sur
(PROCISUR), Montevideo, Uruguay**

Emilio Ruz Jerez P.I. sejecutiva@procisur.org.uy
Cecilia Gianoni
Gladys Fernández
Andrés de Sosa

