



Foto: Lucía Meneses

HACIA UN LOTUS MÁS PERSISTENTE: el papel de la resistencia a enfermedades en el mejoramiento genético

Ing. Agr. MSc. Lucía Meneses¹,
Ing. Agr. Juan Pedro Martínez¹,
Ing. Agr. PhD Rafael Reyno²

¹Gentos Uruguay
²Área Mejoramiento Genético Vegetal y Biotecnología;
Área Pasturas y Forrajes - INIA

La persistencia vegetativa en *Lotus corniculatus* constituye un desafío para los sistemas pastoriles del Uruguay, debido principalmente a la incidencia de enfermedades de raíz y corona. En este contexto, y en el marco del convenio INIA-Gentos, se desarrolló un programa de mejoramiento genético que incorporó la evaluación sanitaria *in vitro* como herramienta complementaria, con el fin de identificar germoplasmas más resistentes y mejorar su persistencia a campo.

UNA ALIANZA PARA MEJORAR LA PERSISTENCIA DEL LOTUS

El género *Lotus* constituye un componente fundamental en la diversificación forrajera de los sistemas pastoriles del Uruguay. Sin embargo, al igual que otras leguminosas forrajeras, su persistencia vegetativa se ve afectada por múltiples factores, siendo esta una característica muy importante a mejorar. Para revertir esta situación, en 2018, INIA y Gentos establecieron un convenio para el mejoramiento genético del *Lotus*, enfocado en incrementar la persistencia vegetativa.

Entre los factores que comprometen esta persistencia se encuentran las enfermedades de raíz y corona, causadas por un complejo de patógenos. *Fusarium oxysporum* es el más prevalente (Altier y Groth, 2005) y puede infectar plántulas en estadios muy tempranos, aunque los síntomas de decaimiento y muerte suelen manifestarse más tarde, acelerándose bajo condiciones de estrés (altas temperaturas, déficit hídrico, defoliaciones frecuentes).

Otro grupo de patógenos relevantes lo constituyen especies del género *Pythium*, asociado a

enfermedades de implantación. Son patógenos oportunistas favorecidos por exceso de humedad y bajas temperaturas de suelo, que provocan pudrición de semillas, necrosis de raíces y debilitamiento de plántulas (*damping-off*). Están presentes en los suelos uruguayos (Pérez *et al.*, 2001) y comprenden especies con distinta capacidad de generar daño (Abreo *et al.*, 2017).

En este contexto, el programa de mejoramiento genético de Lotus incorporó la caracterización sanitaria como línea estratégica, adoptando un enfoque de screening *in vitro* (Altier y Thies, 1995).

¿CÓMO EVALUAMOS LA RESISTENCIA DEL GERMOPLASMA?

En el programa de mejoramiento INIA-Gentos, la selección de germoplasma de Lotus se ha realizado siempre en condiciones de campo e incorporando el pastoreo como factor fundamental, priorizando la persistencia vegetativa como criterio principal. Una vez identificadas las líneas más promisorias, se incorporó una etapa complementaria de evaluación sanitaria *in vitro* frente a patógenos asociados a problemas de persistencia, con el fin de caracterizar su comportamiento y aportar información para futuros ciclos de selección.

En este artículo se presentan exclusivamente los resultados correspondientes al primer ciclo de selección, integrado por las líneas experimentales C1-24 y C1-9, comparadas con el testigo susceptible San Gabriel (*L. corniculatus*).

Las cepas utilizadas provinieron de la colección de INIA Las Brujas, que habían sido identificadas a nivel de especie mediante estudios previos (Altier y Groth, 2005; Abreo *et al.*, 2017).

- En *Fusarium*, todos los aislamientos correspondieron a *F. oxysporum*, evaluándose nueve cepas en una prueba de agresividad *in vitro*.

- En *Pythium*, se trabajó con cinco aislamientos pertenecientes a tres especies: ILB 317 (*Pythium ultimum* var. *ultimum*); ILB 313 y ILB 316 (*Pythium cryptoirregulare*); ILB 323 y ILB 328 (*Pythium sylvaticum*)

En todos los casos se utilizó la metodología *in vitro* basada en Altier y Thies (1995), registrando:

1 - Índice de severidad (ASI): escala 1-5 (1 = planta sana, 5 = semilla podrida). (Figura 1).

2 - Porcentaje de plantas resistentes, considerando como resistentes las categorías 1 y 2 en relación con el total germinable en el control.



Figura 1 - Categorías de severidad empleadas para el cálculo de ASI en semillas y plántulas de distintos germoplasmas de Lotus inoculados con *Pythium* spp. y *Fusarium oxysporum*.

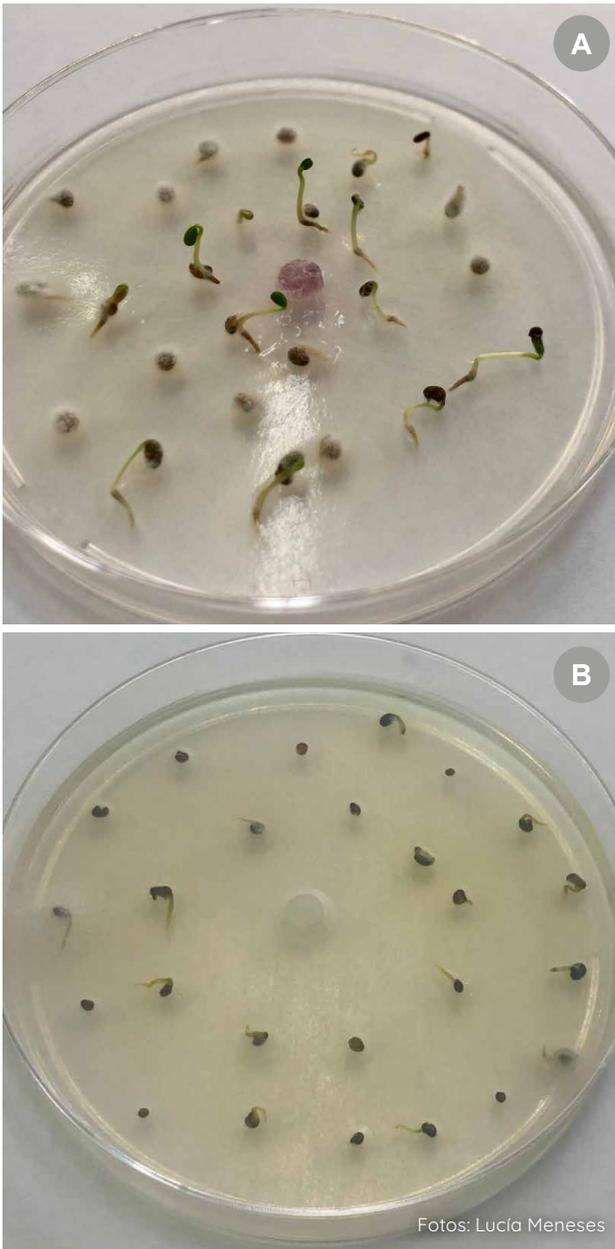


Figura 2 - Placas de Petri con semillas de Lotus en ensayos *in vitro*. a) Medio de cultivo inoculado con *Fusarium oxysporum*. b) Medio de cultivo inoculado con *Pythium* spp.

¿POR QUÉ USAR ESTA TÉCNICA?

La técnica de *screening in vitro* que utilizamos consiste en colocar las semillas de Lotus sobre placas de Petri con medio de cultivo inoculado con el patógeno (*Fusarium* o *Pythium*), y compararlas con placas control sin inoculación (Figura 2). Esta metodología, además de ser sencilla, rápida y reproducible, tiene fundamentos sólidos que justifican su aplicación en programas de mejoramiento genético:

1 - Simula condiciones críticas del establecimiento:

El sistema *in vitro* permite detectar si un germoplasma es susceptible justo en esa etapa crítica.

2 - Ofrece control ambiental total:

Al eliminar factores como clima, tipo de suelo o competencia entre plantas, se puede observar la respuesta real de cada línea frente al patógeno, sin interferencias externas.

3 - Permite evaluar muchas líneas en poco tiempo:

Es una herramienta eficiente para filtrar rápidamente materiales susceptibles.

4 - Refleja diferencias genéticas reales:

Al usar cepas con agresividad conocida y controles adecuados, se identifican diferencias genuinas entre líneas.

RESULTADOS *Fusarium oxysporum*

La prueba de agresividad con nueve aislamientos mostró amplia variabilidad en agresividad y en la respuesta de los germoplasmas (Figura 3).

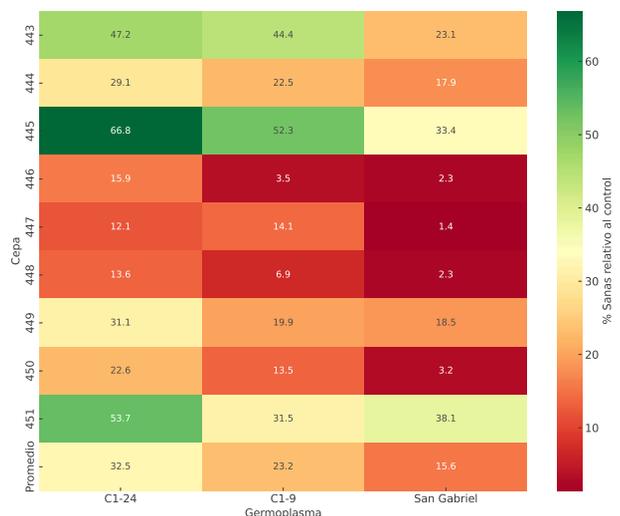


Figura 3 - Heatmap del test de agresividad con nueve cepas de *Fusarium oxysporum* sobre líneas experimentales y cultivar testigo de *Lotus corniculatus*. Los valores corresponden al porcentaje promedio de plantas resistentes (categorías 1 y 2) en cada combinación germoplasma por cepa. Colores claros indican mayor resistencia y colores oscuros mayor susceptibilidad. Se incluye una fila con el promedio de las cepas para cada germoplasma.

Las enfermedades de raíz y corona son una de las principales causas de la pérdida de persistencia vegetativa de *Lotus corniculatus* en Uruguay.

San Gabriel presentó consistentemente los valores más bajos de plantas sanas, confirmando su susceptibilidad, mientras que C1-9 y C1-24 evidenciaron mejor comportamiento. En particular, C1-24 registró porcentajes de resistencia significativamente mayores que San Gabriel en cinco de las nueve cepas evaluadas ($p \leq 0,034$), con diferencias de 16,3 % y 23,1 % superiores.

No se detectó interacción significativa germoplasma \times cepa ($p = 0,636$), aunque la cepa más agresiva redujo el porcentaje de plantas sanas de San Gabriel a aproximadamente el 2 %, mientras que una cepa de agresividad intermedia permitió diferenciar claramente entre líneas resistentes y susceptibles. A partir de estos resultados, se seleccionaron dos cepas representativas (una de agresividad alta 448 y otra intermedia 443) para los *screenings* posteriores (Figura 4).

valores de ASI y mayores porcentajes de plantas resistentes que el cultivar San Gabriel, confirmando su mejor comportamiento sanitario frente a este género (Figura 5).

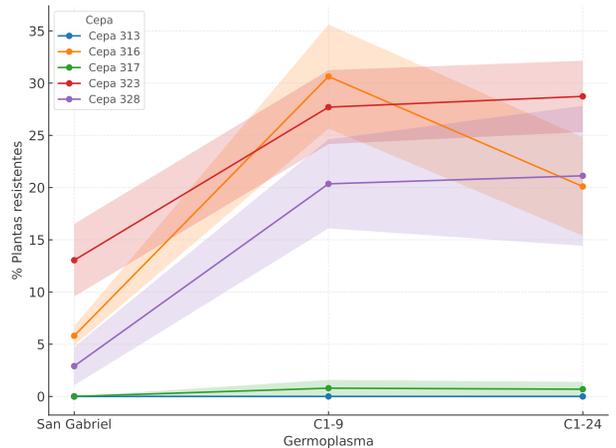


Figura 5 - Porcentaje de plantas resistentes por germoplasma de *Lotus corniculatus* frente a las diferentes cepas de *Pythium* evaluadas.

Comparando con trabajos anteriores, hubo coincidencias en la agresividad relativa de varias especies: la cepa 313 de *P. cryptoirregulare* fue la más virulenta en ambos estudios, y la 323 de *P. sylvaticum* la menos agresiva (Abreo *et al.*, 2017). En nuestro caso, la inclusión de cepas adicionales permitió detectar una notable variabilidad intraespecífica, especialmente en *P. cryptoirregulare*, donde la cepa 316 resultó menos virulenta que la 313, y en *P. sylvaticum*, donde la 328 presentó un comportamiento similar a 323 pero con mayor interacción con el germoplasma. En el caso de la cepa 317 (*P. ultimum*), los porcentajes de plantas resistentes la ubican próxima a la 313; sin embargo, los valores de ASI sugieren un nivel de virulencia intermedio, en concordancia con lo reportado previamente por Abreo *et al.* (2017).

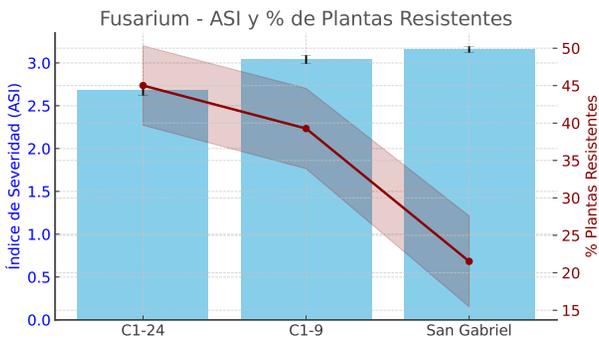


Figura 4 - Índice de severidad (ASI) y porcentaje de plantas resistentes promedio de los ensayos realizados en la segunda etapa con las cepas seleccionadas (443 y 448) por cultivar.

RESULTADOS *Pythium*

En los ensayos con *Pythium* se observaron diferencias significativas tanto entre cepas como entre germoplasmas y, en la mayoría de los casos, también una interacción significativa entre ambos factores ($p < 0,05$). Considerando el promedio de todas las cepas, las líneas experimentales de *Lotus corniculatus* C1-24 y C1-9 presentaron consistentemente menores

La evaluación temprana *in vitro* permite caracterizar y seleccionar germoplasma con mayor resistencia a enfermedades.

Estos resultados confirman que todas las cepas evaluadas son patógenas para *L. corniculatus*, pero que el grado de daño depende tanto de la agresividad del aislamiento como de la resistencia específica del germoplasma evaluado.

UN PASO CLAVE EN EL PROGRAMA DE MEJORAMIENTO

Los resultados fueron alentadores, ya que el nuevo germoplasma de *Lotus corniculatus* mostró mayor resistencia frente a varias cepas de *Pythium* y *Fusarium*. Esto refuerza su valor como base genética para mejorar la persistencia en los nuevos cultivares.

Estos avances consolidan la integración de herramientas de diagnóstico temprano en los programas de mejoramiento, permitiendo tomar decisiones más acertadas en la selección de materiales con mejor comportamiento sanitario y mayor persistencia a campo.

El primer ciclo de selección de un nuevo germoplasma mostró mejor comportamiento frente a *Fusarium oxysporum* y especies de *Pythium* que el cultivar San Gabriel.

La integración de herramientas de diagnóstico temprano fortalece el programa de mejoramiento genético de Lotus.

AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestro agradecimiento al equipo de Fitopatología de INIA La Estanzuela, en especial a Dahiana Bentos y Silvina Stewart, por su buena predisposición y la colaboración brindada durante los ensayos. También agradecemos a Eduardo Abreo, de INIA Las Brujas, por facilitarnos generosamente las cepas empleadas en este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

Abreo, E., Vaz Jauri, P., Núñez, L., Stewart, S., Mattos, N., Dini, B., & Altier, N. (2017). Pathogenicity of *Pythium* spp. obtained from agricultural soils and symptomatic legume seedlings in Uruguay. *Australasian Plant Disease Notes*, 12(1), 35. <https://doi.org/10.1007/s13314-017-0258-1>

Altier, N. A., & Groth, J. V. (2005). Characterization of aggressiveness and vegetative compatibility diversity of *Fusarium oxysporum* associated with crown and root rot of birdsfoot trefoil. *Lotus Newsletter*, 35(1), 59–74.

Altier NA., Thies JA. (1995). Identification of resistance to *Pythium* seed ling diseases in alfalfa using a culture plate method. *Plant Dis* 79: 341–346.

Pérez C, de la Fuente L, Arias A, Altier N. (2001). Uso de pseudomonas fluorescentes nativas para el control de enfermedades de implantación en *Lotus corniculatus* L. *Agrociencia* 5:41–47.



Foto: Lucía Meneses