

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA

RELACIÓN ENTRE PRODUCCIÓN DE SEMILLA  
Y COMPONENTES DE RENDIMIENTO EN  
VARIETADES CRIOLLAS DE *Lotus corniculatus* L.  
EN URUGUAY

por

María José CUITIÑO de VEGA

TESIS presentada como uno de los  
requisitos para obtener el título en  
*Magister* en Ciencias Agrarias  
opción Ciencias Vegetales

MONTEVIDEO  
URUGUAY  
Marzo 2012

Tesis aprobada por el tribunal integrado por Ing. Agr. PhD Omar Borsani, Ing. Agr. PhD Clara Pritsch, e Ing. Agr. M.Sc Carlos Rossi, el día 21 de marzo de 2012. Autora: Ing. Agr. María José Cuitiño de Vega. Directora Ing. Agr. M.Phil Mónica Rebuffo.

## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar con palabras mi agradecimiento a todas aquellas personas que de una u otra forma hicieron que este trabajo fuera posible.

En primer lugar a mi familia por su apoyo incondicional. A mis padres, Luis y Angélica por haberme enseñado a ser tenaz, perseverante y a dar siempre lo máximo de mi misma para lograr mis objetivos. A mis hermanos, Fernando e Ignacio por estar y acompañarme siempre. A mi esposo, Juan Daniel por ser mi cable a tierra y un apoyo fundamental en mi vida. A mi hija Valentina por ser el mejor regalo que me ha dado Dios hasta el momento y la razón por la cual respiro.

A la Ing. Agr. Mónica Rebuffo por su confianza, enseñanza y colaboración en la elaboración de este trabajo.

Al Ing. Agr. Omar Borsani por el asesoramiento y orientación para guiarme en las distintas etapas del trabajo.

Al Ing. Agr. Rodrigo Zarza por haber cosechado el ensayo a campo junto con el personal de Pasturas Omar Barolín, José Rivoir, Dinorah Rey, José Rey, y a Viviana Vidal por su colaboración en la preparación de las fotografías de las vainas y medición de las mismas.

A la Ing. Agr. Rosario Alzugaray y al personal de Entomología que llevó a cabo la evaluación del daño de la Avispita (*Bruchophagus platypterus* L.).

A Mónica Cadenazzi por la orientación en el análisis estadístico de la información.

A Lic. Graciela Vila y la Sra. Alejandra Díaz por su entera disposición y colaboración en la búsqueda bibliográfica.

A la Dirección del Instituto de Investigación Agropecuaria INIA La Estanzuela por permitir mi capacitación y brindarme los materiales necesarios para tal fin.

## TABLA DE CONTENIDO

Página

PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
RESUMEN.....	VII
SUMMARY.....	VIII
1. <b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. <b>IMPORTANCIA DEL USO DE LAS LEGUMINOSAS</b> .....	1
1.1.1. <b>Especies cultivadas del género <i>Lotus</i></b> .....	1
1.1.2. <b>Fortalezas y debilidades en la producción de semillas: <i>Lotus corniculatus</i> L.</b> .....	2
1.2. <b>BREVE DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA Y DESARROLLO REPRODUCTIVO DE <i>Lotus corniculatus</i> L.</b> .....	4
1.2.1. <b>Inducción floral</b> .....	5
1.2.2. <b>Floración y agentes polinizadores</b> .....	6
1.2.3. <b>Producción de semilla</b> .....	7
1.2.4. <b>Componentes de rendimiento de semilla en <i>Lotus</i></b> .....	13
1.2.5. <b>Daño de insectos en la producción de semillas</b> .....	17
1.3. <b>USO DE SEMILLA DE <i>Lotus corniculatus</i></b> .....	19
1.4. <b>UTILIZACIÓN DE GERMOPLASMA EN MEJORAMIENTO GENÉTICO DE <i>Lotus corniculatus</i> L.</b> .....	20
1.4.1. <b>Desafíos del mejoramiento genético</b> .....	20
1.4.2. <b>Importancia del germoplasma</b> .....	22
1.4.3. <b>Utilización de germoplasma adaptado</b> .....	26
1.4.4. <b>Colecta de variedades criollas como recurso de germoplasma vegetal</b> .....	28
2. <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	36
2.1. <b>DISEÑO EXPERIMENTAL</b> .....	37
2.2. <b>INFORMACIÓN CLIMÁTICA</b> .....	37
2.3. <b>DETERMINACIONES REALIZADAS</b> .....	38
2.4. <b>RECOPILACIÓN DE IMÁGENES DIGITALES</b> .....	40

2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	42
3. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u> .....	43
3.1. PRODUCTIVIDAD GENERAL.....	43
3.2. COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO DE LOS CULTIVARES	
TESTIGOS.....	45
3.2.1. <u>Producción de semilla</u> .....	45
3.2.2. <u>Producción de biomasa</u> .....	48
3.3. COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO DE LAS VARIEDADES	
CRIOLLAS.....	50
3.3.1. <u>Relación entre producción de forraje y semilla</u> .....	50
3.3.2. <u>Clasificación productiva de las variedades criollas</u> <u>mediante el análisis multivariado de factores entre semilla y</u> <u>forraje</u> .....	53
3.4. COMPONENTES DE RENDIMIENTO DE SEMILLA.....	57
3.4.1. <u>Comparación varietal de los testigos</u> .....	58
3.4.2. <u>Componentes de rendimiento de semilla de las</u> <u>variedades criollas</u> .....	62
3.4.2.1. Correlaciones entre componentes de rendimiento.....	62
3.4.2.2. Relación entre longitud de vaina y número de semillas.....	70
3.4.2.3. Relación entre producción de semilla y daño por <i>Bruchophagus platypterus</i> L.(avispita) .....	74
3.4.3. <u>Clasificación de las variedades criollas mediante el</u> <u>análisis multivariado de factores para rendimiento de semilla</u> <u>y componentes de rendimiento</u> .....	76
3.4.4. <u>Identificación de germoplasma destacado en</u> <u>producción de semilla</u> .....	79
4. <u>CONCLUSIONES</u> .....	84
5. <u>BIBLIOGRAFÍA</u> .....	86
6. <u>ANEXOS</u> .....	99

## RESUMEN

La expansión del monocultivo de soja en Uruguay ha provocado cambios especialmente en la tradicional cosecha ocasional de semilla. Esta práctica reiterada podría haber generado diferencias en producción y/o adaptación de los materiales manejados por los productores. Los cultivares de *Lotus corniculatus* L. presentan una brecha entre el rendimiento potencial de semilla y los promedios obtenidos por los productores a campo. Un total de 100 variedades criollas (VC) y 4 cultivares testigos (San Gabriel, INIA Draco, Estanzuela Ganador y Rigel) se instalaron en siembra directa en microparcelas el 24 julio de 2006, a 12 kg/ha, en un diseño de bloques incompletos con 2 repeticiones. Las determinaciones fueron: (a) rendimiento de semilla (kg/ha), biomasa (kgMS/ha) en C1= 13/1/2007; C2= 12/3/2007; C3=4/1/2008; C4 =10/3/2008; (b) componentes de rendimiento de semilla en C1 y determinación de daño de las semilla por avispa (*Bruchophagus platypterus* L.), (c) longitud de vainas en C1 (ASSESS). El objetivo general fue identificar VC más productivas en producción de semilla y biomasa en comparación con el cultivar que le dio origen e identificar componentes de rendimiento de semilla que faciliten la selección por producción de semilla. Se identificaron VC con similar producción de semilla que E. Ganador (506 kg/ha; VC 64, 123 y 212) y otras que superaron a Rigel en persistencia (VC 83, 240, 186 y 213) mientras que VC 200 combina buenos rendimientos de semilla y persistencia; de especial interés y potencial impacto para la mejora genética de la especie. El mejor parámetro de selección indirecta por producción de semilla fue la densidad de umbelas estimada en C1 ( $r = 0,9$ ;  $P < 0,001$ ). El daño de avispa no estuvo asociado al rendimiento de semilla.

**Palabras claves:** leguminosas forrajeras, origen genético, *Bruchophagus platypterus* L.

## SUMMARY

### RELATIONSHIP BETWEEN SEED PRODUCTION AND SEED YIELD COMPONENTS OF LANDRACES TO *Lotus corniculatus* L. IN URUGUAY

The expansion of soy monocultures in Uruguay has led to changes especially in the traditional occasional seed crop. This practice could have generated consistent differences in production and / or adaptation of materials handled by producers. The cultivars of *Lotus corniculatus* L. have a gap between the potential seed yield and the averages obtained by farmers. A total of 100 landraces (VC) and four control cultivars (San Gabriel, INIA Draco, Estanzuela Ganador and Rigel) were sown without tillage in microplots on 24 July 2006 to 12 kg / ha, in an incomplete block design with 2 replications. The findings were: (a) seed yield (kg/ha), biomass (kg DM/ ha) in C1 = 13/1/2007; C2 = 12/3/2007; C3 = 4/1/2008, C4 = 10/ 3/2008, (b) seed yield components in C1 and determination of damage caused by the seed wasp (*Bruchophagus platypterus* L.), (c) length of pod in C1 (ASSESS). The main objective was to identify more productive VC seed production and biomass compared with the cultivar of origin and identify seed yield components that facilitate the selection of seed production. VC were identified with similar seed production of E. Ganador (506 kg / ha, VC 64, 123 and 212) and others that surpassed Rigel in persistence (VC 83, 240, 186 and 213) while VC 200 combines good seed yield and persistence of especial interest and potential impact for breeding of the species. The best indirect selection parameter seed production was estimated density of umbels C1 ( $r = 0,9$ ;  $P < 0,001$ ). The wasp damage was not associated with seed yield.

**Key words:** forage legumes, genetic origin, *Bruchophagus platypterus* L.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. IMPORTANCIA DEL USO DE LAS LEGUMINOSAS

Las leguminosas templadas han sido un componente importante de los sistemas pastoriles sustentables debido a la fijación simbiótica de nitrógeno que provee de una fuente de nitrógeno renovable a las praderas y cultivos en rotaciones agrícolas. *Lotus corniculatus* L. ha sido la leguminosa predominante durante cuatro décadas, cultivándose extensivamente en Uruguay a partir de 1950 (Henry 1952, MGAP 2001, Rebuffo *et al.* 2006). Las especies cultivadas del género *Lotus* han demostrado su capacidad para adaptarse a los suelos de la región, fundamentalmente en aquellos con restricciones abióticas como lo son acidez, alcalinidad y bajos niveles de fósforo disponible (Ayala y Carámbula 2009).

#### 1.1.1. Especies cultivadas del género *Lotus*

El género *Lotus* es un gran grupo polimórfico, de amplia distribución que comprende 200 especies entre anuales y perennes aproximadamente, de las cuales solamente tres especies se utilizan en forma extensiva en la ganadería a nivel mundial. (Whyte *et al.* 1953, Grant 1965).

- ✓ *Lotus corniculatus* L. (birdsfoot trefoil)
- ✓ *Lotus tenuis* Waldst. & Kit. = sinónimo *L. glaber* Mill. (narrowleaf trefoil)
- ✓ *Lotus uliginosus* Schk. = sinónimo *L. pedunculatus* Cav.; (big trefoil)

Estas especies cultivadas del género *Lotus* son originarias de praderas templadas de Eurasia y Norte de África. Actualmente se distribuye por el noreste y el oeste central de Estados Unidos (cerca de 1 millón de ha

cultivadas), el sureste de Canadá (200.000 ha cultivadas) y al sur de Latinoamérica (Uruguay, 200.000-250.000 hectáreas/año sembradas de ésta leguminosa (Asuaga 1994, Blumenthal y McGraw 1999).

### **1.1.2. Fortalezas y debilidades en la producción de semillas: *Lotus corniculatus* L.**

*Lotus corniculatus* L. es la especie más difundida en la región por ser una especie perenne y sus características de adaptabilidad, alto valor nutritivo (proteína y digestibilidad altos por períodos más prolongados), por su contenido de taninos (no causa meteorismo en el ganado) y producción de biomasa estival (Seaney y Henson 1970, Beuselinck y Grant 1995, Sareen 2004). Sin embargo a pesar de ser una especie perenne presenta problemas de persistencia (interacción factores bióticos-abióticos que determinan el estrés acumulativo de las plantas) causado por un complejo de enfermedades (Altier 1997, English 1999), las cuales han sido abordadas por INIA desde 1984, estudiando patologías y posteriormente impactos agronómicos (Altier 1997). Formoso (1996) determinó que manejos frecuentes de pastoreo (10 cm) reducen la producción de biomasa respecto a un manejo normal (20 cm) como consecuencia del agotamiento de reservas y menor sobrevivencia de las plantas. Además, las diferencias en producción de semilla se incrementan a medida que nos referimos a fechas de cierres más tardías. El estrés hídrico afecta de forma considerable el proceso de resiembra de lotus (García y Steiner, 1999). Los factores climáticos que parecen afectar más el crecimiento y persistencia de las leguminosas en el Uruguay son los déficit y excesos hídricos y las altas temperaturas (García y Steiner, 1999). En situaciones de déficit hídrico, y cuando la transpiración es mayor que la absorción de agua, se produce el estrés, que afecta la fisiología y el crecimiento de las plantas.

La calidad de la semilla de lotus afecta el establecimiento posterior del cultivo, evidenciándose en el poder germinativo como en el vigor inicial de las plántulas. El momento de instalación del semillero influirá en el tipo de semilla que es conveniente usar, ya que si este tiene lugar temprano en el otoño sería adecuado emplear semilla del año anterior, o elevar la densidad debido a que la especie presenta elevados porcentajes de semilla dura, su poder germinativo será bajo (Carámbula 1981). Cabe resaltar el pobre vigor inicial de las plántulas de lotus por lo de referirse a siembras asociadas es preferible que se trate de especies poco agresivas ya sean éstas gramíneas o leguminosas (Carámbula 1981, Davies y Bell 1957). Si bien históricamente se instaló en forma asociada en Uruguay alcanzando un stand de plantas adecuado, es sabido que, cuando el cultivo se destina a semillero, la producción de semilla del primer año se verá afectada producto de su retrasada recuperación luego del retiro del cultivo protector (García *et al.* 1991); acentuado lo anterior por las temperaturas altas y baja disponibilidad de agua en el suelo en pleno verano que conlleva a mayores riesgos de baja producción y/o pérdida de semilla previa cosecha (Barnes y McGraw 1989).

La alta adopción a nivel internacional como nacional de lotus determina que sea a su vez la especie más estudiada, con diversas investigaciones en producción de semilla: componentes de rendimientos (Albrechtsen *et al.* 1966, Li y Hill 1989a), potenciales de rendimiento (Sareen 2004), polinización (Morse 1958, Peterson 1991) efecto de la distribución espacial de las plantas (McGraw y Beuselink 1987, McGraw *et al.* 1986), el proceso de maduración de las semillas (Pieroni 1994, Anderson 1955), la incidencia de la sequía (García-Díaz y Steiner 1999, 2000a y b ) y revisiones tales como Seaney y Henson (1970), Fairey (1994), Fairey y Smith (1999), Carámbula (1981, 1984), Ayala y Carámbula (2009).

Así también se han realizado algunas investigaciones en *L. uliginosus* tendientes a conocer densidad y espaciamiento adecuados para producción

de semilla (Hare 1984, Hare y Lucas 1984), el uso de reguladores de crecimiento (Tabora y Hill 1992), uso de herbicidas en el control de malezas (Hare 1992). En cambio en *L. tenuis* las investigaciones en producción de semilla han sido muy escasas a nulas. Sin embargo, no se ha explorado en profundidad si existe variabilidad genética en los componentes de rendimiento de semilla o materiales superiores a nivel regional en estas especies que puedan influir en un cambio en la producción nacional de semillas.

## **1.2. BREVE DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA Y DESARROLLO REPRODUCTIVO DE *Lotus corniculatus* L.**

*Lotus* es una especie perenne generalmente con la base leñosa, de longitud variable hasta los 40 cm, aunque suele alcanzar una altura de 20 cm por su porte decumbente y rastrero. Luego de su primer año de crecimiento desarrolla la corona de la que nacen axilarmente las ramificaciones y de donde surge una raíz pivotante. Presenta hojas sésiles pentafoliadas alternas, que alcanzan una longitud nunca superior a los 17 mm, con una forma ovoidea. El pedúnculo en el que se inserta la inflorescencia en umbela simple compuesta de 4 a 8 flores de coloración variable, es de origen axilar (Seaney y Henson 1970, Frame *et al.* 1998). El fruto es una legumbre (vaina) de dehiscencia longitudinal, de menos de 4 mm de grosor. Tiene la forma característica de una pata de pájaro (carácter del cual toma su nombre común en inglés: "birdsfoot trefoil"). La legumbre contiene de 10 a 30 semillas, con alto grado de dehiscencia en la madurez, retorciéndose en forma de espiral, especialmente cuando su humedad es inferior al 40% (Seaney y Henson 1970, Anderson 1955, Carámbula 1984, Frame *et al.* 1998). Su semilla es redonda de 1 a 1.5 mm de diámetro, de color marrón a veces punteadas de 1kg entre 800.000 a 900.000 semillas.

### **1.2.1. Inducción floral**

Los cultivares de *Lotus* que usualmente se cultivan en EE.UU. y Canadá tienen latencia y responden a días largos, requiriendo aproximadamente un fotoperiodo de 16 horas para completar la inducción floral, aunque puede ser reducida bajo fotoperiodos menores (Grant y Marten 1985, Beuselinck y McGraw 1988, Beuselinck 1997 citado por Ayala y Carámbula 2009). Estas condiciones se encuentran en la franja comprendida entre las latitudes 40° y 50 °N en EE.UU. las cuales son muy apropiadas para la producción de semillas. Dichos autores citan que mientras a latitudes mayores a 50 °N el lotus florece muy bien, la estación de crecimiento es breve para que el cultivo logre cumplir su ciclo; a latitudes menores a 40°N, no se registra una buena floración siendo los rendimientos de semilla bajos y de inferior calidad (McGraw *et al.* 1986). En plantas de fotoperiodo corto la concentración de nitrógeno varía, siendo 50 % menos en pecíolo, hoja y tallo comparado con las mismas en estado reproductivo (Jofee 1958). Bajo estas condiciones, en estudios realizados en Petroria (Sud África), existió mayor ocurrencia de inflorescencias anormales, siendo las temperaturas nocturnas altas las responsables de dicha ocurrencia por falta de energía, menor número de inflorescencias/planta y flores/inflorescencia. Jofee (1958) por su parte cita que con un rango entre 16-18 hs de luz durante el día el número de inflorescencias aumenta. Por tanto, variaciones en la cantidad de horas luz e intensidad (8.5 hs exposición diaria), son responsables de las diferencias significativas entre plantas evaluadas a campo y en invernáculo (Jofee 1958). Determinaciones del efecto de la temperatura en invernáculo sobre la producción de flores totales fueron llevadas a cabo por Jofee (1958), donde al comparar temperaturas diurnas de 21 y 27°C durante 18 hs, siendo la nocturna de 18°C en 2 invernáculos, se evidenció una tendencia a aumentar la producción de flores normales cuando la temperatura era de 21°C, pero dichas diferencias no fueron significativas. Beuselinck y McGraw (1988) manifiestan que la

selección de materiales con requerimientos de fotoperiodo corto es necesaria para el desarrollo de plantas de floración temprana cuando aún las temperaturas son frías, resultando así en mayor éxito reproductivo (Barnes y McGraw 1989). Finalmente cabe destacar que los cultivares utilizados en Uruguay corresponden al tipo Europeo, de floración temprana.

### **1.2.2. Floración y agentes polinizadores**

Tomé y Johnson (1945) hacen referencia que en general muchas plantas de *L. corniculatus* presentan alto grado de autoesterilidad, ya que no producen o producen poca semilla por autogamia, siendo el grado de autoincompatibilidad variable (Seaney y Henson 1970, Fairey 1994); por ende es necesaria la presencia de polinizadores para la formación de semilla.

La fertilización tiene lugar 24-48 hs después de la polinización, mientras que de los 20-70 óvulos/flor sólo el 40 % alcanza a producir semilla (20 % de los óvulos por ovario se convierte en semilla madura, siendo el promedio de semillas por vaina igual a 19 (Hansen 1953, Seaney y Henson 1970). Cabe resaltar que los óvulos dentro de cada flor no maduran simultáneamente, por lo que dentro de un ovario se encuentran óvulos que varían en el período de desarrollo (Seaney y Henson 1970). Luego de ocurrida la fecundación la flor permanece abierta 4-5 días mientras de lo contrario el período se extiende a 10 días. Las flores deben ser visitadas en varias oportunidades si el objetivo es lograr un cuajado eficiente. Miller y Amos (1956), citado por Carámbula (1981), sostienen que la mayoría de las flores de lotus producen el mismo número de semillas independientemente del número de visitas de insectos. Sin embargo, otros investigadores opinan que el número de semillas por fruto es tanto mayor cuanto mayor sea el número de visitas efectuadas por los polinizadores (Morse 1958, Bader y Anderson 1962 citados por Carámbula 1981). Esto es debido a que los

distintos genotipos presentan diferentes grados de compatibilidad (Miller 1969 citado por Carámbula 1981).

La presencia de agentes polinizadores es indispensable, al igual que en otras leguminosas, por tratarse de una alógama de polinización entomófila. Las flores de lotus son muy atractivas para los insectos polinizadores especialmente las “abejas melíferas”, siendo las recolectoras de polen las que promueven mayor producción de semilla/vaina que las de néctar (Carámbula 1981), debido en parte a que la extracción de polen es más sencilla que la de néctar. Las inflorescencias producidas más temprano producen mayor número de vainas por umbela y mayor número de semillas por vaina en comparación con las tardías, lo cual puede ser un efecto de las temperaturas (Anderson 1955) o de la eficiencia de la polinización al aumentar el número de especies en floración con el avance de la primavera. La obtención de altos rendimientos de semilla requieren de 12-25 visitas/flor, siendo el polinizador más efectivo *Apis mellífera* (Fairey 1994); ejemplo de ello queda demostrado al comparar los rendimientos sin y con colmenas (69 kg/ha vs 610 kg/ha respectivamente). Es destacar que tanto la densidad de las colmenas, así como el manejo de su alimentación y de la cámara de cría, inciden directamente en los resultados esperados, y podrían ser la explicación para la baja producción de semillas obtenida en Uruguay (García *et al.* 1991).

### **1.2.3. Producción de semilla**

La producción de semillas de plantas forrajeras a nivel nacional ha presentado un desarrollo sostenido en los últimos 20 años, acompañando el incremento del área de praderas y mejoramientos extensivos sembrados. Desde la década del 60 Uruguay pasó de importador neto a autoabastecerse y generar en algunas especies saldos exportables en cantidades crecientes, situación que ha tendido a revertirse en la última década. A excepción de

lotus, para la que Uruguay es un tradicional exportador de semilla, se importa semilla de muchas especies forrajeras, tanto de cultivares introducidos como nacionales que se multiplican en otros países que producen semilla a menor precio. En la última década se incrementó la importación de semilla de especies forrajeras debido al desplazamiento del área con rotaciones agrícola-ganaderas donde se ubicaban los productores de semilla (García *et al.* 1991) por el monocultivo de soja y el hecho de que los rendimientos de los semilleros de leguminosas forrajeras en Uruguay son bajos (García *et al.* 1991) y por lo tanto menos rentables que la soja.

El crecimiento desmedido del monocultivo agrícola ha producido un desplazamiento de las especies forrajeras hacia suelos más marginales. La competitividad y globalización de los mercados requiere dinamizar el proceso productivo de manera económica y sostenible, adquiriendo así relevancia la adecuación de la base forrajera. Por ende disponer de cultivares forrajeros adaptados a distintos ambientes y sistemas de producción, impacta decisivamente en la productividad y/o persistencia de cada componente de la cadena forrajera. Restricciones ambientales tales como sequía, acidez, etc., limitan la producción de las leguminosas forrajeras afectando todo el ciclo de vida de éstas, a pesar de la adaptación de las principales leguminosas naturalizadas a suelos poco fértiles (Seaney y Henson 1970). Es así que las poblaciones de especies forrajeras naturalizadas uruguayas pueden presentar una diversidad genética generada por procesos de selección natural que interesa caracterizar fisiológica y morfológicamente. La diversidad de ambiente en los predios de los productores (diversos estreses bióticos y abióticos, pastoreo, etc) podrían generar diversidad en los componentes de rendimiento de lotus, una especie alógama con amplia variabilidad.

Si bien desde el punto de vista morfológico lotus tiene la capacidad para producir grandes cantidades de semillas (Miller y Amos 1965), existe

una brecha importante entre el rendimiento potencial de semilla y los rendimientos promedios obtenidos por los productores a campo (Sandha *et al.* 1977, Seaney and Henson 1970, García *et al.* 1991). Esto se debe a que se trata de especies de floración indeterminada, alta dehiscencia de las vainas, baja supervivencia del stand de planta, y principalmente a la variabilidad de ambientes de producción, diferencias genéticas de los materiales utilizados y dificultades prácticas que reducen la posibilidad de hacer generalizaciones o recomendaciones estándares para el manejo del cultivo (Fairey 1994, Fairey y Smith 1999, Artola 2004).

La combinación de floración indefinida y maduración de vainas dificultan la elección momento de cosecha. La primera cosecha presenta un mayor rendimiento indicado por un incremento en todos los componentes de rendimiento: mayor número de vainas, mayor número de semillas/vainas y mayor peso de 1000 semillas (Costa y Panizza 1997). Wiggans *et al.* (1956) observó en ensayos en Nueva York que la semilla madura 7-10 días antes de que ocurra su dehiscencia. La coloración de vainas presenta un rango de color de verde brillante a marrón claro, una evaluación práctica que ayuda a definir el momento cosecha. En EE.UU. la dehiscencia es causa de pérdidas en la cosecha de 14-18 % (McGraw y Beuselinck 1983), favorecida por las temperaturas altas de la época y humedad relativa baja (40 %), mientras que alcanzan sólo un 2 % cuando la HR es del orden del 50 % aún cuando el 93 % de las vainas tengan coloraciones del marrón claro al negro (Anderson 1955). Se debe cosechar con 70-85 % vainas maduras para no incrementar las pérdidas de semilla. También influye las diferencias genéticas entre cultivares.

Una de las grandes limitantes al momento de cosecha es que el cultivo permanece verde, lo cual dificulta la cosecha directa y aumenta las pérdidas (10-25 % en relación al empleo de desecantes; Obrador (1966) y Kopriva (1976), citados por Berrutti y Grauert 1994). Una ventaja de esta tecnología

es que el peso de 1000 semillas no parece verse afectado ni por el empleo de desecantes ni por los momentos de aplicación de éstos, dosis o tipo de producto, observándose mejoras en el vigor de la semilla.

El potencial de rendimiento de semilla en lotus ha sido estimado en 1200 kg/ha, aunque los promedios obtenidos a nivel mundial se encuentran por debajo de 200 kg/ha. En Estados Unidos se obtienen en promedio entre 50 a 170 kg/ha de semilla (Sandha *et al.* 1977, Seaney y Henson 1970, Fairey y Smith 1999), siendo en Ontario el promedio obtenido igual a 110 kg/ha con un potencial de producción de 750 kg/ha y un 85 % de pérdidas por dehiscencia (Winch *et al.* 1985, citado por Sareen 2004). En Argentina los valores oscilan entre 25 a 150 kg/ha (Mazzanti *et al.* 1988), en tanto en Uruguay se citan rendimientos promedios de 120 a 150 kg/ha (García *et al.* 1991). Sin embargo rendimientos de 632, 468 y 499 kg/ha fueron obtenidos en La Estanzuela (Colonia, Uruguay) por Rebollo y Duhalde (1987), mediante 3 manejos de defoliación (sin corte, con corte el 20 de setiembre o el 10 de noviembre, respectivamente) y los mejores productores reportan promedios máximos de 210 Kg/ha (rango 70-650 kg/ha de semilla; García *et al.* 1991). Estas diferencias entre la media de rendimientos efectivos de semilleros y los máximos alcanzados a nivel experimental reflejan la complejidad de factores que inciden en la reducción de producción.

El rendimiento de semilla máximo obtenido a nivel experimental para INIA Draco para cierres de mediados de setiembre fue de 650 kg/ha (Rebollo y Duhalde 1987) mientras que San Gabriel (cultivar de uso público), presenta un rendimiento medio que oscila entre 85 y 150 kg/ha a nivel de predios (García *et al.* 1991), el cual contrasta con el rendimiento potencial de 1340 kg/ha citado por Pieroni y Laverack (1992). En este contexto, Turkington y Franco (1980), Miller *et al.* (1965), Seaney y Henson (1970) en EE.UU han estimado rendimientos potenciales que oscilan de 500 a más de 1000 kg/ha de semilla para la especie. Por otra parte, en Uruguay Costa y Panizza

(1997), determinaron rendimientos máximos de 464 y 326 kg/ha a fines de diciembre y 1º semana de enero respectivamente para San Gabriel cuando es sembrado a una densidad de 10 kg/ha a nivel nacional. Dicho autor cita que los rendimientos promedios de 3 años de siembras a diferentes distancias entre líneas para este cultivar de uso público no difieren estadísticamente (276 vs 324 kg/ha de semilla para 0,19 y 0,38 m respectivamente); salvo en el caso que nos refiramos a distancias superiores a 0,57 m; situación esta que se asemeja a las condiciones de siembra al voleo (179 vs 158 kg/ha de semilla respectivamente). En contraste, Rebollo y Duhalde (1987), obtuvieron rendimientos promedios de 582 kg/ha de semilla limpia en cosechas de enero para San Gabriel en La Estanzuela. Los potenciales de rendimiento en cosechas de segunda para cierres tardíos son inferiores a los cierres tempranos (García *et al.* 1991) y los riesgos de dehiscencia de vainas y desgrane son máximos como consecuencia del incremento de temperatura. A su vez, generalmente los cierres tardíos originan curvas de floración y semillazón más concentradas (Formoso 2011).

Las zonas de mayor producción a nivel mundial corresponden al Norte y centro de Estados Unidos, Sur y centro de Canadá, Nueva Zelanda, Europa Central y Sudamérica. En nuestra región se cultiva principalmente en Uruguay, Argentina y Brasil. En Argentina la zona de producción de semilla se encuentra concentrada principalmente en la provincia de Entre Ríos y Buenos Aires. Debido a la naturaleza de la especie, su producción de semilla se caracteriza, además de la distribución de fotosintatos al proceso reproductivo, por una maduración despareja, el aborto de flores y vainas (Stephenson 1981, citado por Fairey 1994), por el alto porcentaje de dehiscencia de sus vainas que se acentúa con las condiciones climáticas; todos factores que conducen invariablemente a rendimientos más bajos de semilla (Ayala y Carámbula 2009, Sareen 2004). Por ende es primordial la determinación correcta del período óptimo de cosecha, que tienda a minimizar las pérdidas y obtener semillas de alto valor agronómico.

McDonald (1946, citado por Ayala y Carámbula 2009), en un estudio exhaustivo de los rendimientos obtenidos en lotus determinaron que aquellos materiales postrados son más difíciles de cosechar que los de porte erecto. A su vez el manejo de la defoliación previa a floración normalmente afecta una serie de características relacionadas con la producción de semillas (Rebollo y Duhalde 1987). Cierres muy prematuros con condiciones climáticas muy favorables, así como muy tardíos con condiciones adversas, van en detrimento de la producción de semilla; el primero por el exceso de forraje que provoca vuelco y deficiente polinización ya que los tallos reproductivos quedan tapados por la acumulación de forraje ascendiendo las pérdidas hasta un 50 % (Carámbula 1981); mientras que en el segundo por el desarrollo limitado (Rebollo y Duhalde 1987). Carámbula (1981) manifiesta que el momento del pastoreo incide en la distribución de vainas en la planta. En pastoreos muy frecuentes o con último corte tardío las vainas se presentan en el estrato superior, siendo el desgrane máximo a temperatura alta y exposición directa a los rayos solares. A su vez el rendimiento de semilla varía de acuerdo a la posición de las vainas en el tallo, presentando las de la base mayor rendimiento que las del extremo de éste.

El momento apropiado para la cosecha es antes de la etapa del marrón, ya que en ese período la semilla ha alcanzado un buen poder germinativo, completo almacenamiento de reservas y el peligro de dehiscencia es insignificante (Winch y McDonald 1961). Finalmente es de destacar que las semillas de las vainas abiertas naturalmente con la dehiscencia presentan mayor porcentaje de semillas duras, debido al proceso de escarificación que realizan las máquinas al momento de la cosecha (Anderson 1955).

#### 1.2.4. Componentes de rendimiento de semilla en Lotus

El rendimiento de semilla lo integran diferentes componentes que se pueden expresar en la siguiente fórmula (Figura 1):

$$\text{Rendimiento semilla}^{(5)} = \text{P1000 s}^{(1)*} \times \text{N}^{\circ} \text{ sem/vaina}^{(2)*} \times \text{Vainas/umbela}^{(3)*} \times \text{Umbelas/m}^2^{(4)} \pm (\text{error estándar})$$

García-Díaz y Steiner (2000a) determinaron que la densidad de umbelas es el componente que incide en mayor medida. A su vez esta última está compuesta por el número de vainas por umbela. El número de semillas por vaina y finalmente el peso de 1000 semillas componen el rendimiento.

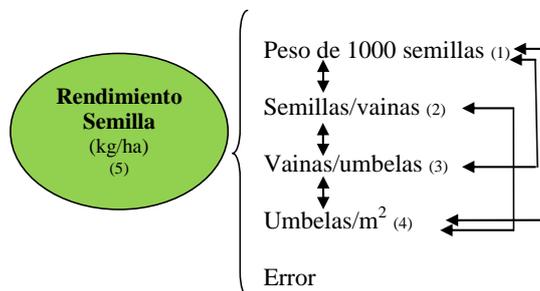


Figura 1. Representación gráfica de las relaciones entre componentes de rendimiento de semilla de *Lotus corniculatus* L. (García-Díaz y Steiner 2000 a)

Mientras el rendimiento de semilla cambia con numerosos factores, algunos componentes de rendimiento presentan un comportamiento más estable. El peso de 1000 semillas, el rendimiento de semilla/umbela, y la proporción de semilla viable, no presentaron diferencias entre los distintos estados de maduración de las vainas (color verde oscuro, verde agua, marrón claro, marrón oscuro; Anderson 1955). Sin embargo, Carámbula (1981) menciona que el peso de 1000 semillas es máximo en las primeras

etapas de maduración, disminuyendo luego como consecuencia de la pérdida de agua en tanto la semilla alcanza su madurez.

Dentro de los componentes del rendimiento de semillas, el de mayor incidencia es la densidad de inflorescencias por unidad de superficie, y en menor medida la fertilidad de la floración y el tamaño de semilla. Numerosos autores citan que el número de inflorescencias a menudo determinan el rendimiento de semilla (Albrechtsen *et al.* 1966, Li y Hill 1988, 1989a, McGraw *et al.* 1986, Pankiw *et al.* 1977, Stephenson 1984). Más aún, este componente de rendimiento ha sido usado como un indicador predictivo del momento óptimo de cosecha (Hare y Lucas 1984, Li y Hill 1989a). Este componente está determinado por el número de inflorescencias/planta y la densidad de plantas (García-Díaz y Steiner 2000 a). Estos componentes se ven afectados indirectamente por variables de manejo de defoliación como lo es la fecha de cierre o frecuencia de pastoreos. En segundo lugar, la combinación del número de flores/m<sup>2</sup> y el porcentaje de fertilidad determinarán la proporción de envainamiento (número de frutos/m<sup>2</sup>), y luego de ocurrida la fertilización, el porcentaje de cuajado determinado por la polinización y la proporción de abortos (número de semillas/fruto) y finalmente, las diferencias en el rendimiento estarán dadas por el peso de 1000 semillas (Formoso 1996). Este autor determinó este ranking de importancia de los componentes del rendimiento mediante diferentes frecuencias de defoliación. Manejos frecuentes de pastoreo (10 cm) ocasionan reducciones del orden del 50 % en la producción de biomasa (850 vs 1600 tallos generados/m<sup>2</sup>) respecto a un manejo normal (20 cm), siendo las diferencias en producción de semilla crecientes a medida que nos referimos a fechas de cierres más tardías.

Rebollo y Duhalde (1987) determinaron en Uruguay que el número de flores/m<sup>2</sup> promedio para 3 tipos de manejo (sin cortes, 1 corte setiembre o en noviembre), fue de 917, 777 y 1020 flores/m<sup>2</sup> para cada manejo

respectivamente. Estos autores observaron el pico de floración el 21 de diciembre con un total de 3600 flores/m<sup>2</sup> con el corte tardío, mientras que la defoliación temprana alcanzó 2000 flores/m<sup>2</sup>, cuyo pico de floración fue el 14 de diciembre. En contraste, Costa y Panizza (1997) establecieron que los tallos formados temprano presentan mayor número de inflorescencias que aquellos formados tardíamente. En EE.UU. Anderson (1955), Li y Hill (1989b) determinaron que las inflorescencias tempranas tenían mayor rendimiento que las tardías, siendo éste el determinante de las diferencias en rendimiento alcanzados. En este aspecto el rango de floración generado para San Gabriel mediante el manejo de defoliaciones por Costa y Panizza (1997) osciló del 18 de diciembre 1996 al 11 de enero del siguiente año.

Beuselinck y McGraw (1988) determinaron que el número de días de floración a madurez de las vainas generalmente decrecía desde las fechas de floración tempranas a las tardías, al avanzar el verano. Anderson (1955) registró que un período de maduración más corto resulta en un menor tiempo de llenado de semillas.

Formoso (2011) estudió durante la primavera 1998-1999 (abundantes precipitaciones) la incidencia de diferentes regímenes hídricos en el rendimiento de semilla así como en la densidad de vainas para la primera y segunda cosecha. En dicha evaluación determinó que el agua adicional administrada al tratamiento regado fue suficiente para deprimir significativamente ( $P < 0,05$ ) la población de vainas en ambas cosechas, con detrimentos más acentuados en el rendimiento de semillas para la segunda cosecha.

La densidad de vainas por unidad de superficie puede ser mayor en condiciones de riego que en seco (2257 vs 3276 vainas/m<sup>2</sup>, respectivamente; Formoso 2011), aún cuando bajo las últimas condiciones se podrían lograr resultados más satisfactorios que bajo condiciones de

riego (García-Díaz y Steiner 2000a). Esto se basa en los resultados observados por García-Díaz and Steiner (2000 a), donde incrementos en la evapotranspiración del cultivo (ETc) se traducen en reducciones en la densidad de umbelas ( $r = -0,53$ ;  $P < 0,005$ ). No obstante, el riego afecta positivamente la producción de biomasa ( $r = 0,92$ ). A su vez, el número de vainas/umbelas estuvo negativamente correlacionada con el rendimiento de semilla ( $r = -0,75$ ), lo cual sugiere que incrementos en el número de vainas por umbela implicaría desventajas en el número de semillas producidas por cada vaina. Lo anterior implica que el lotus no es capaz de soportar la fertilización de la totalidad de los óvulos. Por otra parte las plantas bajo estrés leve, el período de floración se ve extendido, decreciendo la densidad de umbelas y el número de semillas por vaina, mientras que los demás componentes de rendimiento no se vieron afectados por el riego (García-Díaz y Steiner 2000<sup>a</sup>).

Herramientas matemáticas han sido empleadas para crear modelos que dan una descripción de la interacción de los componentes. Las herramientas utilizadas comúnmente son evaluaciones visuales y/o mediciones detalladas (Contreras-Medina *et al.* 2009), aunque se utilizan para algunos parámetros otras herramientas electrónicas como la evaluación de imágenes. Cada herramienta tiene sus propias ventajas y desventajas. La naturaleza del problema y las necesidades de cada mejorador determinará la herramienta matemática que se utilizará y las variables a incluir en el modelo. Esta metodología se ha desarrollado para el estudio de dinámica de las enfermedades en plantas, aunque su uso se ha extendido a diversos campos de investigación analítica. De Souza *et al.* (2005) utilizó el programa de evaluación ASSESS (Lamari 2002) en sus determinaciones de daño de roya en soja. Esos valores medios y el porcentaje de área afectada se empleó para estimar la densidad de infección (uredias por hoja).

En el presente estudio el aporte de esta metodología podría ser valioso en términos de lograr información con exactitud y de forma más ágil. El método de analizador de imágenes empleado (ASSESS), en la identificación de los componentes de rendimiento de semilla que faciliten la selección por este carácter, será testado para corroborar si es una herramienta eficiente a emplearse en mejoramiento genético, fácil, segura y precisa. Debido a que la determinación manual del número de semillas por vaina es algo engorroso, se pretende evidenciar la asociación o no de ésta con la longitud de vaina obtenida por un analizador de imágenes. Lo anterior se justifica en la medida que puede ser un parámetro indirecto de selección muy rápido para mejoramiento, por tratarse de plántulas de una especie alógama que requiere de una amplia población, además de que las determinaciones manuales insumirían más tiempo y mano de obra.

#### **1.2.5. Daño de insectos en la producción de semillas**

El daño de insectos causa pérdidas tanto de forraje como en rendimiento de semilla (Neunzing and Gyrisco 1955 citados por Seaney y Henson 1970). Dentro de los insectos que dañan la semilla, McDaniel y Boe (1991) citan a Fedoseeva (1958) quien basándose en trabajos propios y de compatriotas rusos, Kolobova (1950), Nikol'skaya (1932), reconoció lo que denominó "el complejo *B. gibbus*" conformado por 3 especies bien reconocidas por su diferente bionomía y caracteres morfológicos: *B. gibbus* (Boheman), específico de semillas del género *Trifolium*, *B. roddi* (Gussakovskiy) que vive en semillas de alfalfa y *B. platypterus* (Walker) que prefiere semillas del género *Lotus*. Esta última especie aparece en la bibliografía citada bajo el nombre de *B. kolobovae* (Fedoseeva), que es un sinónimo reciente de *B. platypterus*. Dicha denominación fue en honor a A.N. Kolobova por sus aportes en la identificación de las especies de *Bruchophagus*.

El género *Bruchophagus* fue denominado erróneamente por Ashmed en 1888, quien supuso que las especies incluidas se desarrollaban como parasitoides de larvas de coleópteros del género *Bruchus*. Sin embargo estos se comportan como fitófagos (De Santis *et al.* 1979), continuando con la denominación de acuerdo a lo establecido en el art. 18<sup>a</sup> del Código Internacional de Nomenclatura Zoológica. Entre ellos se destaca *Bruchophagus platypterus* (Hymenóptera, Eurytomidae), que causa pérdidas directas en la producción de semilla. La hembra adulta ovipone dentro de la semilla en formación, 5-10 días luego de la polinización, alimentándose la larva del óvulo maduro, llegando en muchas áreas a causar pérdidas superiores al 50 % (Neunzing 1957, citado por Seaney y Henson 1970). En INIA La Estanzuela (Colonia, Uruguay), Alzugaray (2003) observó daños puntuales superiores al 20 %, causados por *B. platypterus* siendo éstos normalmente menores al 10 %.

La presencia de otros insectos que parasitan a la larva de *B. platypterus* disminuyen la población por parasitismo. En tal sentido *Bruchophagus* siempre va acompañado de insectos del género *Tetrastichus* (De Santis *et al.* 1979). Ambas especies pasan el invierno en la semilla en estado de larva, emergiendo los adultos en la primavera siguiente mediante una perforación que realiza con su aparato bucal lo que debe ser tenido en cuenta en los programas de control pues coincide con el estado de floración del hospedante. El principal parasitoide está identificado como *Tetrastichus bruchophagi* (Hymenoptera calcidoideo de la familia Eulophidae; Gahan 1913, Alzugaray 1991), quien también ataca a *B. roddi* y *B. gibbus*. De Santis (1977) reportó que desde Uruguay recibió otro himenóptero calcidoideo de la familia Torymidae (*Liodontomerus perplexus* (Gahan 1914). La población de parasitoides fue monitoreada, siendo la relación de parasitoides/semilla 10/1 promedio en Uruguay (Alzugaray 2003); mientras que Neunzig (1957 citado por Seaney y Henson 1970) en USA determinó un promedio de 8,9% de destrucción de la plaga por dicho enemigo natural.

Batiste (1967) observó que las hembras del parásito se encuentran en mayor proporción que los machos, con una relación de sexos de 43.6/1 debido a que la forma usual de reproducción de la especie es por partenogénesis, lo cual contribuye a la eficiencia como parásito.

El daño en general no es advertido por el productor en primera instancia por el tamaño reducido del insecto y por su hábito activo y en segundo lugar pues los granos atacados si bien suelen ser de mayor tamaño, son de menor peso y caen junto con los residuos de cosecha. Además, siempre existen diferentes estadios de desarrollo, por lo que si controlamos los adultos, las larvas en desarrollo serán las responsables de la siguiente generación (Rebollo y Duhalde 1987). La principal herramienta contra la plaga es la lucha biológica. Sin embargo una desventaja de ésta está determinada por la diapausa de los parásitos muy similar a la de sus hospedantes pero con un tiempo de retraso al final de la estación, momento en el cual algunos individuos de la población del parásito fracasarían en la entrada al estado de diapausa. El control por otras vías ofrece ciertas dificultades, como ser la destrucción de polinizadores y otros insectos benéficos al emplear insecticidas sistémicos dado que no son lo suficientemente traslocados hacia la semilla (Arretz y Martínez 1977, citado por De Santis *et al.* 1980). Se recomienda la destrucción y quema de los residuos de cosecha, destrucción de plantas "voluntarias" en flor, enterrar las semillas infestadas pero el método más eficaz consiste en sembrar semillas sanas. Para ello se debe fumigar la semilla luego de su limpieza en las plantas clasificadoras (De Santis *et al.* 1980).

### **1.3. USO DE SEMILLA DE *Lotus corniculatus***

La alta adopción de lotus determina que sea la especie con mayor volumen de cosecha de semilla en Uruguay. A nivel nacional el empleo de semilla de lotus es el más importante en las leguminosas forrajeras, especie

predominante en el género *Lotus* (Cuadro 1). En el período 2002 a 2009 el consumo de semilla fluctuó entre valores mínimos de 261147 kg en 2009, cuando la producción se redujo significativamente por una prolongada sequía, hasta un pico máximo de 3.212.805 kg en el año 2007 (INASE 2008). En este último año en particular, sólo el 3% (18.025 kg) de la semilla fue importada. La exportación semilla de lotus realizada en ese mismo año representó 1.706.474 dólares americanos. En años anteriores la exportación fue inferior (621.408 dólares promedio 2000 a 2005 y 1.421.271 dólares en 2006) pero siempre representó una cifra mayor que la semilla importada. Estas cifras indican la importancia del género y especialmente la especie en el contexto de Uruguay.

Cuadro 1. Uso de semillas de leguminosas forrajeras (kg) en Uruguay para una secuencia de años (2002-2009)

ESPECIE	AÑOS							
	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
<i>Lotus corniculatus</i> L.	1.733.233	1.848.280	2.677.479	1.821.258	2.555.810	3.212.805	1.127.956	261.147
<i>Lotus subbiflorus</i>	112.386	56.82	212.054	109.405	56.788	98.136	31.163	48.95
<i>Lotus tenuis</i>	26.993	741	134.302	54.178	74.392	86.505	100.14	0
<i>Lotus Uliginosus</i>	662	99.694	49.247	53.219	8.208	56.12	6.424	3.006
<i>Medicago Sativa</i>	143.612	232.083	255.978	233.705	288.632	250.683	387.607	492.063
<i>Trifolium Aljandrinum</i>	178.919	58.01	79.308	53.897	52.796	55.034	10.669	261.992
<i>Trifolium pratense</i> L.	951.241	950.506	1.397.929	992.828	1.195.199	1.325.320	730.947	849.902
<i>Trifolium repens</i>	489.97	686.92	937.468	768.715	950.142	1.005.670	696.825	463.176
<i>Trifolium vesiculosum</i>	917	1.45	1.425	1.1	1.025	4.175	0	0

## 1.4. UTILIZACIÓN DE GERMOPLASMA EN MEJORAMIENTO GENÉTICO DE *Lotus corniculatus*

### 1.4.1. Desafíos del mejoramiento genético

Si bien desde el punto de vista morfológico lotus tiene la capacidad para producir grandes cantidades de semillas (Miller y Amos 1965), existe una gran brecha entre el rendimiento potencial de semilla y los rendimientos promedios obtenidos por los productores a campo (García y Steiner 1999).

Existen varios factores de manejo como también genéticos que inciden para que ese potencial no llegue a concretarse y mediante mejoramiento genético se intenta levantar esas limitantes. La investigación de INIA reciente en lotus está orientada a obtener cultivares con alta producción de semilla que se adapten a las condiciones ambientales de Uruguay, ya que los aspectos de manejo de semillero han sido ampliamente estudiados y esclarecidos, existiendo una vasta información bibliográfica al respecto a nivel nacional e internacional. Algunas citas como ser Carámbula (1981), Formoso (2011), Ríos y Formoso (2005), son de destacar en temas tales como fecha de cierre relacionado con la intensidad y frecuencia de cortes, control de malezas mediante herbicidas adecuados para cada situación disposición espacial del stand de plantas, al igual que parámetros para definir el momento óptimo de cosecha (Pankiw *et al.* 1977, McGraw y Beuselinck 1987).

Aspectos cruciales en el éxito del mejoramiento genético para aumentar la producción de semilla es la caracterización de las relaciones entre los componentes de rendimiento y producción de semilla total, persiguiendo identificar parámetros de selección indirectos que permitan seleccionar fácil y rápidamente los mejores materiales al primer año de evaluación para disminuir la duración de los ciclos de selección.

La asignatura pendiente en relación al objetivo de mejoramiento genético es lograr un material que minimice las pérdidas de semilla a cosecha. Características tales como bajos porcentajes de dehiscencia de vainas han sido reportadas a nivel regional para el cultivar El Boyero INTA (Peacock y Wilsie 1957, citado por Carámbula 1981). De esta forma, con menor proporción de dehiscencia se podría optimizar el momento de cosecha que contribuiría a minimizar las mismas. Sin embargo, esta característica es difícil de evaluar con precisión, ya que se encuentra afectada en gran medida por las condiciones climáticas. Alternativamente,

mediante mejoramiento genético una forma de incrementar la producción de semilla sería modificar los componentes de rendimiento que se reconocen con mayor relevancia en la producción total, como es la densidad de inflorescencias e incrementos en la persistencia de las plantas. En este sentido, una forma de incrementar la persistencia y la densidad de inflorescencias, es seleccionando materiales rizomatosos en los cuales los manejos de defoliación y persistencia favorecen el incremento de la densidad de tallos por planta a partir del segundo año (Li y Beuselinck 1996, Beuselinck *et al.* 2005).

Finalmente, se destaca el daño de la semilla ocasionado por insectos, ya que a pesar de existir enemigos naturales que parasitan las larvas impidiendo el ciclo, la población de los primeros es tan numerosa que la incidencia es de gran relevancia. Más aún si consideramos que su control químico no es viable puesto que coincide con el período de floración y por ende con el momento de pecoreo y colecta de néctar de las flores por parte de los agentes polinizadores (Alzugaray 2004). La presencia de taninos en diferentes órganos de la planta podrían influir en el nivel de daño (Gebrehiwot *et al.* 2002).

#### **1.4.2. Importancia del germoplasma**

La semilla, órgano reproductivo de la gran mayoría de las plantas superiores, desempeña una función fundamental en la renovación, persistencia, dispersión de las poblaciones de plantas hacia otros hábitat, conservación del germoplasma vegetal y la recuperación de especies valiosas sobreexplotadas. La dispersión de éstas en las plantas, ocurre en forma pasiva producto de las estructuras modificadas (alas, pelos, etc.), activas como la dehiscencia en lotus y con frecuencia auxiliada por agentes externos como el viento, el agua y los animales que se encargan de diseminar las semillas. La latencia, así como la dispersión; son

características importantes que presentan las semillas en lo que respecta a la conservación del germoplasma, ya que le proporciona mayores oportunidades de sobrevivencia frente a factores externos desfavorables ya sean climáticos así como de manejo.

Harlan (1971) introducen el concepto de preservación de los recursos genéticos, pues definiendo el acervo genético e identificados las prioridades de conservación, se establecen las bases para evaluar el grado de erosión y enfatizar esfuerzos para mantener la diversidad genética. Dicha conservación puede ser *in situ* o *ex situ*. Es posible el almacenamiento de semillas vivas por largos períodos en frío y bajo contenido de humedad, asegurándose así la preservación de especies y cultivares de plantas valiosas. La mayoría de las plantas cultivadas incluyendo lotus son conservadas como colecciones de semilla *ex situ* en bancos de germoplasma, disponibles para los científicos y fitomejoradores. Aunque ésta no es una actividad exclusiva de la preservación de las especies domesticadas, en las especies nativas, por su diversidad, la conservación *ex situ* limita las posibilidades de conservación de su alta variabilidad genética.

La conservación *in situ*, que implica el mantenimiento de las poblaciones en su hábitat natural, deja de lado las ya mencionadas deficiencias del método *ex situ*. Otra ventaja del mantenimiento de las especies agrícolas *in situ* es que conserva una gran variedad de organismos que contribuyen a la biodiversidad mundial, además que dicho esfuerzo puede servir a múltiples sectores como la gestión de mejoramiento de cultivos y conservaciones de los recursos naturales del suelo (Plucknett y Horne 1992, Brush 1991, Altieri y Merrick 1987).

Una conservación efectiva de los recursos genéticos requiere de la integración de ambas estrategias de conservación: *in situ* y *ex situ*. En el

género *Lotus* ambas están bien implementadas, pero con interacción o coordinación limitada entre las agencias involucradas. Al igual que en la mayoría de los cultivos, el mayor énfasis se ha puesto sobre la conservación *ex situ* de los recursos genéticos del género *Lotus* en el acervo genético primario.

Los bancos de semillas *ex situ* de diferentes especies varían en duración, de temporales a persistentes; determinado ello por factores fisiológicos innatos y por las condiciones ambientales del lugar. Una revisión extensa realizada por Barton (1961) constata que semillas de trigo, cebada y chícharo fueron encontradas supuestamente viables en tumbas egipcias y otros casos de longevidad extrema de semillas de plantas cultivadas. Investigaciones sobre semillas encontradas en sitios arqueológicos o en edificios antiguos, formando parte de adobes o en recipientes de barro, son más convincentes, como el caso de algunos adobes de edificios coloniales de California y norte de México (Barton 1961, Priestley 1986).

La reserva genética primaria incluye una amplia gama de germoplasma que varía desde cultivares altamente avanzados, razas seleccionadas regionalmente, variedades locales producto del monocultivo endémicas y ecotipos naturalizados. Poblaciones adaptadas selectivamente son la segunda categoría dentro del primer pool de genes y una importante fuente de germoplasma para el desarrollo de cultivares en los EE.UU. (Rumbaugh 1991). Varios informes sugirieron que la base genética de esta categoría puede ser relativamente estrecha en lotus en los EE.UU. Beuselinck *et al.* (1984) rastrearon la ascendencia de los 10 cultivares más comúnmente cultivados de lotus en dicho país correspondiendo a tres o cuatro accesiones introducidas. Steiner y Poklemba (1994) clasificaron la diversidad geográfica del germoplasma de lotus en series usando un marcador proteico. Sin embargo, el germoplasma puede ser clasificado basándose en semejanzas en cinco grandes grupos, donde el 79%

aproximadamente de los cultivares y plantas introducidas de América y Europa pueden agruparse en dos clases.

Las variedades criollas adaptadas que evolucionaron desde poblaciones nativas encontradas en pasturas naturales manejadas durante años por generaciones de campesinos comprende el tercer componente del primer pool de genes de especies de lotus cultivadas. La mayoría de los cultivos de campo se han convertido en materiales muy diferentes de sus especies silvestres a través de un proceso de domesticación que ha seleccionado para su adaptación a las condiciones de cultivo (Harlan 1975). La domesticación es producto de adaptación a las condiciones agronómicas ambientales, que pueden ser más similares al hábitat natural que a los típicos monocultivos (Harlan, 1983).

Dada la historia de los cultivos de las leguminosas forrajeras el tamaño relativo del pool de variedades locales puede ser más pequeño que los ecotipos de germoplasma naturalizado. MacDonald (1946) reportó que la primera mención válida de lotus en la literatura botánica fue en el siglo 16, sin embargo el valor agronómico del género no fue reconocido hasta la mitad del siglo 17. A inicios del siglo 19, la semilla de lotus estuvo disponible comercialmente por una compañía de Londres, Inglaterra. A fines del mismo siglo los agrónomos de Europa recomendaban la inclusión de lotus en mezclas de praderas para semilleros (MacDonald 1946).

El uso agronómico relativamente reciente del lotus sugiere que, a diferencia de la mayoría de las especies de cultivos de grano extensivos, el mayor componente de la reserva genética primaria de especies de leguminosas forrajeras son las poblaciones endémicas y naturalizadas no cultivadas de las tres principales especies (Wiersema *et al.* 1990).

### **1.4.3. Utilización de germoplasma adaptado**

El uso y mantenimiento de variedades criollas es una práctica común y que data desde la época de los indígenas en cultivos de grano. El método de selección de los agricultores es variable, siendo el factor común la comercialización de los excedentes de producción (Schachl 1981 citado por Zeven 2000).

En general, se carece de conocimiento detallado del tipo de material genético que se está manipulando a nivel de agricultores e incluso éstos no son conscientes de la selección conservadora tradicional, de la variabilidad genética que se cuenta y tampoco de la erosión genética por malas prácticas de manejo. A nivel científico, históricamente las actividades de exploración y la introducción de plantas para generar colecciones de germoplasma han sido para evaluación y uso de los fitomejoradores. Desde las colectas de Vavilov hasta la revolución verde en la década de 1960, el ímpetu de la exploración y conservación apuntaban a salvaguardar las variedades criollas en amenaza de desplazamiento como resultado de la aceptación generalizada de variedades de mayor rendimiento (Cohen *et al.* 1990). En 1970, la erosión continua y las consecuencias de la vulnerabilidad genética de las variedades modernas proporcionan un mayor impulso a la conservación de especies cultivadas y también especies silvestres emparentadas (Fairey y Smith, 1999).

Existen escasos registros disponibles y suficientemente descriptos sobre la sustitución de semillas, así como en el mantenimiento tradicional de cría, de las variedades criollas por los productores (Zeven 2000). En algunas especies como el maíz, el lino, el lúpulo y la alfalfa se encuentran referencias breves a la aplicación de los métodos de multiplicación y de mantenimiento

(Roesslgh y Schaars 1996, Bagavathiannan *et al.* 2010 citados por Zeven 2000). En el siglo XIX no se manifestó la necesidad de describir estos métodos, quizás, porque fueron consideradas obvios o de poca relevancia. La mayoría de los científicos no son conscientes de esta carencia, debido a que la cría de mantenimiento es poco frecuente. Fruwirth (1930) citado por Zeven (2000), fue el primero en prestar atención a la cría de mantenimiento de las variedades locales.

Frankel y Soulé (1981) indicaron que para los cultivos hortícolas se cuenta con mayor información, no así para los cultivos extensivos. Un ejemplo es el cultivo de mayor importancia, el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), que todavía se produce a partir de semillas conservadas domésticamente (Zeven 2000). En contraposición, hay poca información disponible sobre los criterios de selección y los métodos de multiplicación de trigo duro en Chipre. Para *Trifolium pratense* L. a pesar de ser la tercer especie forrajera más importante de Europa, hay información limitada sobre la biodiversidad y la estructura genética de las variedades locales y las poblaciones naturales que se desarrollaron en Italia (Pagnotta *et al.* 2011). Sin embargo, se destaca la riqueza de la variación disponible del germoplasma italiano para el mejoramiento genético de trébol rojo.

En el caso particular de las especies de *Lotus*, desafortunadamente se dispone de información limitada del estado de conservación *in situ*. En Bulgaria se está llevando a cabo investigaciones para desarrollar las reservas *in situ* de las especies de leguminosas nativas forrajeras, incluido lotus (Guteva *et al.* 1993). A nivel mundial, existen 10 colecciones de lotus con más de 150 accesiones. La mayoría de ellas fueron descritas por Betencourt *et al.* (1992), siendo la colección de Nueva Zelanda la más relevante por su tamaño (3970 accesiones con mayoría de especies cultivadas) y en segundo lugar la colección australiana.

En Uruguay, existen 3 bancos de germoplasma comprendiendo 6202 accesiones totales y 354 especies representadas. Desde 1930 a 1960 se realizaron introducciones y evaluaciones de muchas leguminosas forrajeras para la región suroeste del país. Las leguminosas exitosas desarrolladas durante dicho período fueron el trébol blanco, trébol rojo, alfalfa y *L. corniculatus*. En el período de 1960 a 1970 se inició un Proyecto de evaluación de leguminosas para ser sembradas en el campo nativo para las otras regiones del país. Desde 1980 a 1995 INIA liberó cultivares mejorados genéticamente de trébol blanco, trébol rojo y lotus, que generalmente provenían de introducciones adaptadas a la región.

#### **1.4.4. Colecta de variedades criollas como recurso de germoplasma vegetal**

Existen algunos conceptos básicos en la conservación *ex situ* de germoplasma. Las colectas deben de ser representativas, comprendiendo el mayor número posible de plantas individuales. No obstante, se debe conservar algo de la variabilidad que se encuentra en la población de una localidad (30 o más individuos, siempre y cuando dichos individuos sean producto de reproducción sexual y no clonal). Mayor número de individuos y áreas de recolección más amplias permiten una mejor representación de la potencial variabilidad.

Las colectas deben buscar un equilibrio entre la conservación *ex situ* e *in situ*. La recolección de semillas de plantas anuales o perennes de corta vida no debe comprender más de 20% de la cosecha local total, pues de otra manera podría afectarse su posibilidad futura de sobrevivencia. Esto es particularmente importante para las especies con baja frecuencia o plantas raras, con potencial reproductivo reducido o en plantas en vías de extinción.

La adaptación evolutiva con el medio ambiente específico, luego de someterse a presiones de selección naturales y/o antrópicas, puede explicar la mayoría de las variaciones observadas en el tipo de planta y los rasgos adaptativos encontrados (Pagnotta *et al.* 2011). Por ejemplo, Nichols *et al.* (2009) demostraron que la época de floración adecuada es crucial para la adaptación del trébol subterráneo en Australia. En este caso, la selección natural actúa para alcanzar el tiempo de floración temprana en un ambiente de escasas precipitaciones, mientras que floraciones más tardías se favorecen en ambientes con lluvias más abundantes. A su vez, los factores que intervienen en el proceso de selección natural pueden verse influidos por el manejo del pastoreo. Ejemplo de ello es la selección por entrenudos largos en especies estoloníferas, cuya importancia ecológica puede radicar en la posibilidad de alcanzar una mayor dispersión lejos de la planta madre.

Las determinaciones realizadas por Nichols *et al.* (2009) le permitieron identificar los genotipos considerados “adaptados” después de sólo tres estaciones del año. Sin embargo, el grado de adaptabilidad se incrementa con el aumento de la homogeneidad. Por lo tanto, el éxito del método de selección de genotipos adaptados depende de: (1) los padres que contienen genes para los caracteres deseables; (2) sitios representativos de ambientes de destino, y (3) manejo experimental representativo de las prácticas de manejo típicas llevadas a cabo por los productores. La principal desventaja es que el criador tiene un control limitado sobre la dirección de selección. No obstante, posibilitaría imponer tratamientos en las poblaciones para seleccionar individuos resistentes o tolerantes a las plagas, enfermedades o herbicidas o en particular a las prácticas de gestión agrícola; limitaciones del suelo tales como la salinidad, el anegamiento, pH bajo o pobre estado nutricional.

Pollas (1992, citado por Nichols *et al.* 2009) sugiere que los agricultores siembran diversas mezclas de genotipos segregantes. Sin embargo, en el

sur de Australia, la mayoría de las pasturas de trébol subterráneo se han sembrado como monocultivo. La siembra de genotipos mezcla le confieren mayor diversidad, y conduce a un potencial de estabilidad de producción y una productividad media mayor a largo plazo. La presión de selección natural sobre una mezcla de genotipos diferentes en varios caracteres agronómicos de importancia, resultará en genotipos con mayor capacidad de contrarrestar la distribución irregular localizada y las variaciones estacionales en comparación con un genotipo puro. El concepto de versatilidad de las mezclas de genotipos podría tener una particular aplicación para ayudar a responder a los escenarios previstos del cambio climático el cambio y al aumento de la variabilidad climática. No obstante, mientras que el uso de mezclas genéticamente diversas pueden ser ecológicamente acertado, se encuentra en desacuerdo con los actuales intereses bien definidos de la industria de semillas, que en general tiende al monocultivos con buenos y bien definidos caracteres de rendimiento.

Estudios llevados a cabo por Pagnotta *et al.* (2011) confirman la relación entre la proximidad geográfica de los sitios de recolección con la similitud morfofisiológica, mientras que no guardan relación con la estructura molecular de las poblaciones. Similares resultados fueron obtenidos por Steiner y García de los Santos (2001) quienes concluyeron que no hubo asociación entre los sitios de recolección de los genotipos con la distancia genética, pero la similitud ecológica estuvo relacionada con las similitudes genéticas. Los genotipos fueron relacionados con características ecológicas de los sitios de recolección similares, encontrándose en amplias regiones geográficas que incluyen la cuenca del Mediterráneo, sureste y norte de Europa y Asia menor. La similitud entre la genética y la clasificación ecológica sugiere que el germoplasma adaptado a hábitats similares, aunque geográficamente distantes, han adquirido fenotipos similares.

La utilidad de la combinación de las características genéticas (RAPD), morfológicas y ecológicas revela una amplia variación de combinaciones entre los genotipos de lotus, que no sería evidente con cualquier parámetro de medición único, y por lo tanto, podría proporcionar una comprensión más completa de la diversidad en el lotus así como de colecciones de germoplasma de otras especies. En trébol rojo (Kölliker *et al.* 2003, Dias *et al.* 2008), al igual que en otros tréboles como trébol blanco (Kölliker *et al.* 2001), se carece de información sobre la relación entre la proximidad geográfica y similitud molecular de las poblaciones. Los indicios de similitud molecular podría tener implicancias en las actividades de recolección y conservación de germoplasma, incluido el establecimiento de los centros de germoplasma. Se destaca así la importancia del medio ambiente como el principal determinante de la evolución de las principales características de interés para los criadores, y de la diversificación de germoplasma.

La biotecnología y especialmente; los marcadores moleculares como los AFLP, podrían ser utilizados como una herramienta útil para evaluar la diversidad genética dentro y entre las accesiones, identificar duplicaciones y posibles genotipos fuera de tipo (accidental mezcla de semillas de poblaciones diferentes, el flujo de genes en el sitio original, el control de la calidad de aislación en la polinización durante el rejuvenecimiento de germoplasma). Dicha información, sumado a las características morfofisiológicas, permitiría el uso más eficiente de las colecciones de germoplasma más eficiente identificando las accesiones que mejor contribuyen a la diversidad genética de una colección (concepto de colección núcleo; Gilbert *et al.* 1999, Kölliker *et al.* 2003).

A nivel nacional, se cuenta con una colección de germoplasma adaptado o variedades criollas (VC) que podría indicarse como importante en lo que respecta a las principales leguminosas forrajeras perennes (alfalfa, trébol rojo y lotus) con varios años de multiplicación por parte de los

productores (Cuadro 2). La importancia histórica del lotus se aprecia en la proporción de accesiones de leguminosas perennes almacenadas en USDA-GRIN, donde el 60% de las muestras corresponden a esta especie (Rebuffo *et al.* 2005).

Aunque el valor de los recursos genéticos adaptados es reconocido, hasta el momento existe un apoyo limitado a la colecta y caracterización de leguminosas forrajeras naturalizadas con buena adaptación a los suelos y las condiciones climáticas de la región, que propendan a crear nuevos cultivares con mayor persistencia. La multiplicación de semilla propia por parte de productores tradicionales de sistemas agrícola-ganaderos ha generado poblaciones naturalizadas adaptadas al pastoreo (Rebuffo *et al.* 2005). Aún cuando estas poblaciones constituyen un recurso genético privilegiado para identificar caracteres de alto valor adaptativo, el riesgo de erosión genética ha aumentado recientemente en Uruguay. Los cambios progresivos en la estructura rural con la disminución del número de predios, la especialización productiva con la disminución de la multiplicación de semilla propia, la inclusión de la forestación en suelos no forestales, la extensión del monocultivo de soja y la homogenización de los ambientes impuestos por las modificaciones de los ecosistemas agrícolas han contribuido a la sustitución de las poblaciones naturalizadas por nuevos cultivares más uniformes, nacionales o importadas (Rebuffo y Abadie 2001, Rebuffo *et al.* 2005).

El enfoque de mejoramiento genético de lotus en INIA Uruguay se orientó a la introducción y evaluación de germoplasma regional. El éxito de esta estrategia se refleja en la alta adopción de los cultivares locales de lotus (San Gabriel, Estanzuela Ganador, INIA Draco). Teniendo en cuenta la alta proporción de uso propio en lotus y otras leguminosas perennes, PROCISUR e INIA Uruguay, en un esfuerzo por salvaguardar las poblaciones criollas de la erosión genética, financiaron en 1999 la primera

colecta de material generado por los predios más tradicionales con multiplicación propia, que se conservan en la Unidad de Recursos Genéticos de INIA (Rebuffo *et al.* 2005). Esta visión valoriza los Bancos Nacionales, ya que permite complementar estrategias de conservación *ex situ* ligada al mantenimiento de poblaciones naturalizadas donde han evolucionado (Swanson y Goeschl 1999).

Cuadro 2. Número de variedades criollas de leguminosas forrajeras perennes colectadas en 1999/00 en Uruguay, agrupadas por años de multiplicación propia y expresado como proporción dentro de especie (Fuente: Rebuffo *et al.* 2005)

<b>Años de multiplicación</b>	<i>Lotus corniculatus</i>	<i>Trifolium pratense</i>	Medicago sativa
<2	2	16	5
2 a 10	61	65	50
más 10	37	19	45
Nº accesiones	79	31	20

El acervo genético para lotus alcanzó un total de 100 VC conservadas en el banco de germoplasma en INIA Uruguay, ya que se sumaron 21 muestras más, producto de una colecta financiada por FONTAGRO en el período 2007/08. La información de pasaporte incluye información de manejo agronómico, años de multiplicación propia, origen genético, etc. (Rebuffo *et al.* 2005, Rebuffo *et al.* 2007). La mayoría de las VC corresponden a poblaciones derivadas de San Gabriel, el cultivar más antiguo que se multiplica en Uruguay (Cuadro 3), aunque 39% de los productores desconoce el cultivar de origen.

Cuadro 3. Número de variedades criollas (VC) de *Lotus corniculatus* L agrupadas por origen genético (Adaptado de: Rebuffo *et al.* 2007)

<b>Origen</b>	<b>Nº Total</b>
San Gabriel	56
Estanzuela Ganador	5
Desconocido	39
<b>Total</b>	<b>100</b>

La obtención de materiales genéticos superiores en rendimiento y/o resistencia a factores adversos (biológicos o químicos) es uno de los componentes fundamentales de la sostenibilidad de cualquier sistema de producción (Francis 1990). Las formas cultivadas son fuentes sumamente importantes de variación genética para el mejoramiento genético de pasturas (Charmet *et al.* 1997). Por tal motivo es importante realizar esfuerzos por coleccionar y conservar tanto *in situ* como *ex situ* el acervo genético para evitar se incremente aún más la erosión genética, además de realizar la caracterización de las colecciones para que se incorporen a los programas de mejora.

Producto del crecimiento desmedido de la agricultura, se ha producido un desplazamiento de las especies forrajeras hacia suelos más marginales. Este cambio en la última década refiere a la fuerte expansión al monocultivo de soja y el hecho de que los rendimientos de los semilleros de leguminosas forrajeras en Uruguay son bajos (García *et al.* 1991) y por lo tanto menos rentables que la soja. La competitividad y globalización de los mercados requiere dinamizar el proceso productivo de manera económica y sostenible, adquiriendo así relevancia la adecuación de la base forrajera. Por ende disponer de cultivares forrajeros adaptados a distintos ambientes y sistemas de producción, impacta decisivamente en la productividad y/o persistencia de cada componente de la cadena forrajera. Es así que la caracterización fisiológica y morfológica de poblaciones naturalizadas uruguayas permite determinar la diversidad genética generada por procesos de selección natural que ocurren en los predios de los productores (diversos estreses bióticos y abióticos, pastoreo, etc) en los componentes de rendimiento de semilla de lotus a fin de contar con estrategias sostenibles de mejoramiento genético.

El objetivo general de este trabajo es identificar genotipos más productivos en producción de semilla, en base a una caracterización de

materiales obtenidos de productores. Los objetivos específicos en orden de importancia son los siguientes: a) identificar VC con mayor rendimiento de semilla y/o persistencia que el cultivar de origen; b) Identificar componentes de rendimiento de semilla que faciliten la selección por este carácter (parámetros de selección indirectos para selección de semilla). Como objetivo secundario de este trabajo se propone identificar el grado de asociación de las VC con los materiales que definieron los productores como el material original, y su ranking en cuanto a producción de semilla (kg/ha) y persistencia, respecto a los nuevos cultivares liberados por INIA. Sería de interés poder identificar materiales que combinen buena producción de forraje con rendimiento de semilla. Considerando el acervo de materiales, es importante resaltar la posibilidad de la existencia de variabilidad en la producción de semilla entre los diferentes genotipos.

La caracterización de las VC repicadas en cada ambiente durante varios años por los productores respecto a los cultivares que le dieron origen, es de gran relevancia dado que las variedades criollas (VC) generadas podrían ser el germoplasma que conduzca a generar cultivares forrajeros adaptados a distintos ambientes y sistemas de producción.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

La caracterización de producción de semilla y forraje se realizó en ensayos a campo en la rotación de la Unidad de Ganadería Intensiva de INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay. El experimento fue instalado el 24 julio de 2006 en siembra directa con una sembradora experimental Wintersteiger (Figura 2). La densidad de siembra empleada fue 12 kg/ha, con corrección por germinación.



Figura 2. Siembra del ensayo de microparcelas de *Lotus corniculatus* L. (Fotografía de Omar Barolín y José Rivoir 2006; INIA La Estanzuela)

La base genética corresponde a 100 materiales colectados en 1999-2000 y 2006 que fueron repicados por productores durante una serie de años en sus predios. Los mismos podrían presentar adaptación al suelo donde se cultivaron, al manejo que realizó el productor o a las condiciones climáticas de la zona, y 4 cultivares comerciales (San Gabriel, INIA Draco, Estanzuela Ganador y Rigel) utilizados como testigos de producción conocida. En los años 1999-2000 participaron dinámicamente 132 productores, donando más de 130 muestras de leguminosas forrajeras, 79 de las cuales corresponden a lotus (Cuadro 1; Rebuffo *et al.* 2005). En el 2006 se le sumaron 21 muestras más de lotus producto de la colecta financiada por FONTAGRO, siendo el origen genético declarado por los productores el detallado en el Cuadro 2.

## 2.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental empleado fue de 13 bloques incompletos balanceados al azar (látices), con 2 repeticiones, siendo la unidad experimental cada microparcela de 4 surcos de 2 m de longitud distanciados a 0,17 m (considerada en su totalidad para la evaluación de biomasa; Figura 3).



Figura 3. Fotografía general de las microparcels de variedades criollas de *Lotus corniculatus* L. en primavera del primer año (Fotografía de Rodrigo Zarza; INIA La Estanzuela)

## 2.2. INFORMACIÓN CLIMÁTICA

Las variables consideradas durante el período donde ocurrieron las determinaciones y su relación con el promedio histórico fueron: precipitaciones, ETc de Penman y temperatura (Figura 4, Cuadro 4).

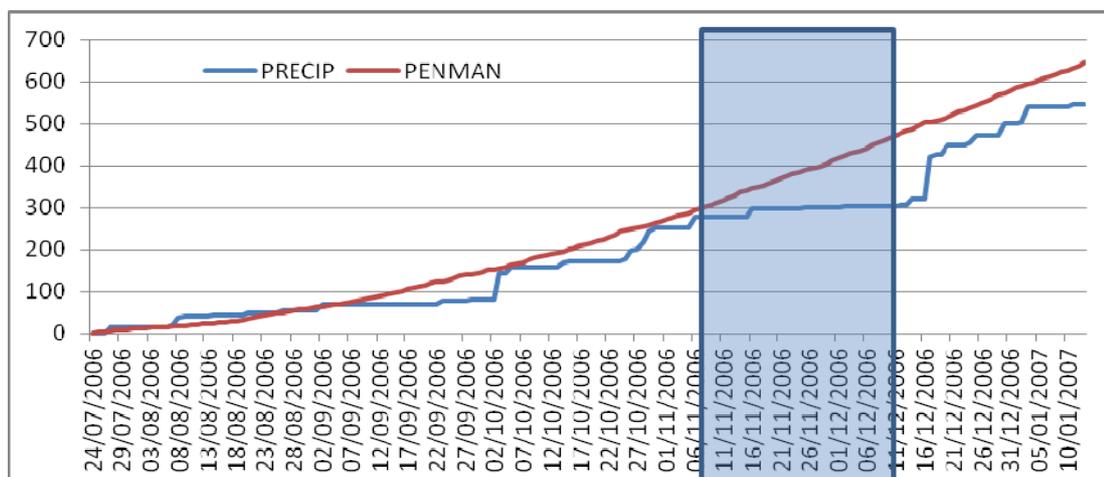


Figura 4. Precipitaciones ocurridas durante el año 2006-2007 en relación a la Evapotranspiración de Penman en La Estanzuela, Colonia, Uruguay.

Cuadro 4. Precipitaciones (mm), evapotranspiración potencial (ETp) de Penman-Monteith y temperatura del aire (°C) ocurridas durante el año 2006-2007 y promedio histórico en INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay.

Variable		Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Setiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	
Promedio 1980-2009	Temp. Aire La Estanzuela (°C)	Máxima	28,9	27,6	26,1	22	18,6	14,9	16,8	18,2	21,1	24	27,4	
		Mínima	17,7	17,3	16	12,6	9,4	6,9	6,4	7,2	8,4	11,3	13,6	16,1
		Promedio	23,8	22,4	21	17,3	14	10,9	10,3	12	13,3	16,2	18,8	21,7
	Lluvia acumulada Colonia (mm/mes)	Total	101,3	102,2	134	110,6	89,5	67,9	65,3	76,7	72,8	111,6	112,6	100,8
2006	Tempratura (°C)	Promedio	22,7	22,1	19,2	17,1	12,5	11,7	13	14,1	14,3	17,1	16	22,8
		Máxima	27,8	27,4	24	22,6	17,7	16,5	17,2	21,3	21,2	19,9	19,5	26,2
		Mínima	17,8	17,4	14,7	12,4	8,3	8,1	9,2	9,5	7,5	13,7	9,5	18
	Etp (Penman (mm/mes)	Total	161,4	133,3	99,7	72,2	40,2	24	41,3	66	105	111	123	96
Lluvia (mm/mes)	Total	200,3	155,4	117,4	22,8	15,4	266,1	38,8	39,7	24,8	170,9	49,6	199,2	
2007	Tempratura (°C)	Promedio	22,2	23,2	20,4	18,3	11,1	9,2	9	10,5	19,6	18,9	24	21,2
		Máxima	27,7	29,1	24,8	22,5	15,9	15,7	17,2	16,1	28,5	23,2	32,7	24,5
		Mínima	16,4	18	16,3	13,82	7	5,4	3,8	6,2	12,2	13,7	16,7	17,2
	Etp (Penman (mm/mes)	Total	168	135,5	94,3	67,6	39,5	18	27	69	198	153	210	171
Lluvia (mm/mes)	Total	65	110,6	426,9	147,5	105	40,6	2,4	79,4	99,1	237,8	35,6	28,9	

### 2.3. DETERMINACIONES REALIZADAS

La determinación del inicio, media y plena floración fueron basados en observaciones realizadas 2 veces a la semana mediante apreciación visual de la formación de los primeros primordios florales. Las evaluaciones de biomasa (kg MS/ha), fueron realizadas cuando el testigo San Gabriel alcanzaba 20 cm de altura de planta aproximadamente y con al menos una por estación mediante cosecha total de la parcela (altura de corte 4 cm, ancho de corte 0,53 m) con una cortadora de césped rotativa y posterior

conversión en kg/ha. Las muestras de forraje verde fueron desecadas en estufa a 60 °C hasta peso constante para obtener el contenido de materia seca.

Las determinaciones de semilla fueron: rendimiento de semilla y sus componentes en 4 momentos de cosecha (C1 = 13/1/2007; C2 = 12/3/2007; C3 = 4/1/2008; C4 = 10/3/2008). En cada período de cosecha de semilla, tuvo lugar el muestreo de 25 umbelas maduras al azar por parcela previo a la cosecha (Figura 5), para la determinación de componentes de rendimiento (número de vainas/umbela, número de semillas/vaina, tamaño de semilla) y daño de semilla causado por avispa (*Bruchophagus platypterus* L.). Las mediciones de longitudes de vainas, ancho y número de vainas se realizaron con el Programa de imágenes- ASSESS. Cabe resaltar que se escogió C1 para la determinación del potencial de rendimiento de semilla y los componentes de rendimiento por contar con un stand de plantas adecuado, y así evitar la incidencia de otros factores como la persistencia.



Figura 5. Muestreo de umbelas previo al momento de la cosecha (Fotografía de Rodrigo Zarza, INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay)

Las umbelas muestreadas fueron conservadas en bolsas de papel con la identificación correspondiente en frío (5 °C), para evitar la dehiscencia de las vainas.

## 2.4. RECOPIACIÓN DE IMÁGENES DIGITALES

Se procedió al registro fotográfico de las umbelas para la posterior determinación del tamaño de vainas mediante el analizador de imágenes (longitud de vainas, nº vainas, ASSESS; Figura 6).

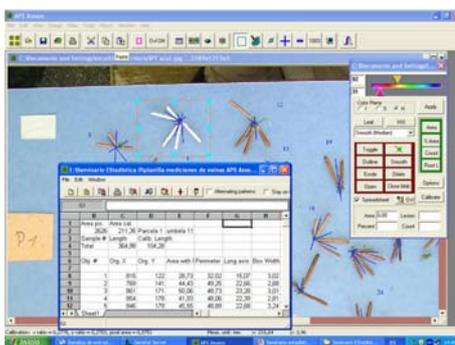


Figura 6. Registro fotográfico y evaluaciones de longitud, ancho, y área de vainas de variedades criollas de *Lotus corniculatus* (Fotografía de Viviana Vidal, INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay)

Las imágenes digitales fueron tomadas después de preparar las 25 umbelas colectadas en el muestreo de modo de lograr quitar las impurezas y folíolos, además de evitar superposiciones y/o sombras que fueran a interferir en las mediciones posteriores. Las imágenes fueron obtenidas utilizando una cámara digital (Olympus D-580 Zoom), en modo de enfoque macro y con un primer plano filtro. La distancia desde la cámara a las umbelas se fijó en 54 cm mediante el empleo de un trípode, colocándose una escala milimetrada (30 x 20 mm) necesaria para la calibración de dicho analizador. Las imágenes se almacenaron en formato JPEG. Este formato utiliza un algoritmo de compresión que reduce el tamaño del archivo de la imagen sin degradar la calidad de imagen (tamaño de 300 KB).

Se emplearon diferentes técnicas para perfeccionar la definición de los elementos de la imagen, como ser líneas para limitar las vainas adyacentes en toda su longitud o superpuestas; eliminación de impurezas en la cartulina

de fondo (sépalos, etc) copiando el color de la misma y pintándolas encima entre otras. Las umbelas se numeraron en orden correlativo en las imágenes digitales para facilitar la identificación de la medición. El programa analizador de imagen en primera se calibró con la escala milimetrada seleccionada, y las variables a medir se expresaron en mm y se almacenaron en una hoja de cálculo formato Excel 7.0. La calibración del equipo en el espectro de coloración fue 151-31, color plane (leaf = H), dado que el equipo se basa en diferencias colorimétricas. En las 208 imágenes recogidas se determinaron las siguientes variables: tamaño de vaina (longitud y ancho de vainas en mm), número de vainas/umbela, perímetro, y área total/vaina. La evaluación se realizó por diferencias colorimétricas ejecutando la aplicación para que la planilla de cálculo aparezca la información detallada.

La determinación de semillas/vaina y la evaluación de daño de avisquita (*Bruchophagus platypterus* L., clasificándose las mismas en sanas, chuzas semillas vanas o arrugadas, agujereadas y parasitadas con enemigos naturales), se realizó manualmente bajo lupa (Figura 7). El rendimiento de semilla producto del muestreo para componentes y daño de avisquita se sumó al obtenido de la cosecha parcelaria para obtener el rendimiento total de semilla y estimar el rendimiento total/ha.



Figura 7. Determinación de componentes de rendimiento de semilla mediante la clasificación de semillas sanas, chuzas, agujereadas, vainas/umbela, enemigos naturales, bajo lupa en variedades criollas de *Lotus corniculatus* L. (Evaluación por Alicia González y Pablo Calistro, Entomología, INIA La Estanzuela)

## **2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Una vez culminada esta etapa se procedió al análisis estadístico (ANOVA, S.A.S) de la información recabada para cada variable. Cuando lo indicaban los residuos se procedió a la transformación de los datos mediante el uso de la raíz cuadrada y estandarización de los datos para a posterior realizar el análisis de REML. Se estimó la diferencia mínima significativa (DMS, 5%) de la comparación de medias y análisis multivariado (componentes principales), de modo de lograr media 0 y varianza 1.

Las variables que requirieron de transformación fueron longitud mínima de vaina, número de semilla mínima/vaina, daño de insecto, realizándose en éste último finalmente una transformación inversa para expresarlo en %; para su contrastación con la bibliografía citada en la revisión.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. PRODUCTIVIDAD GENERAL

Los mayores rendimientos, tanto de semilla como forraje, se lograron en C1 (Cosecha1= enero 2007; Cuadro 5), producto de la acumulación de forraje desde la siembra.

En el segundo año las mejores cosechas de semilla se alcanzaron también con cierres tempranos en la primavera, aunque la producción media bajó a 53% con respecto al primer año (C3, enero 2008). Las segundas cosechas representaron solo 12% y 23% de C1 para C2 y C4, respectivamente, comportamiento característico en la producción de semilla de lotus en Uruguay (Rebollo y Duhalde 1987, Formoso 2006, Coscia y Surraco 1982). Por el contrario, los rendimientos de forraje en el segundo año fueron extremadamente bajos en comparación con C1 (11% y 6% para C3 y C4, respectivamente), comportamiento muy diferente al esperable para el segundo año en la especie (Díaz-Lago *et al.* 1996). El forraje en C2 representó 38% de C1, disminución previsible en veranos secos (Díaz-Lago *et al.* 1996).

Cuadro 5. Producción de semilla (kg/ha) y forraje (kg MS/ha) de los cultivares testigos , promedio general del ensayo y desvíos estimados de la diferencia para las cuatro cosechas

Cultivares	SEMILLA (kg/ha)				FORRAJE (kg MS/ha)			
	enero 07	marzo 07	enero 08	marzo 08	enero 07	marzo 07	enero 08	marzo 08
San Gabriel	316,1	25,5	154,4	65,3	14048	5764	1229	842,1
E. Ganador	506,3	33,9	163,5	43,3	12277	4525	1646	890
INIA Draco	317,5	33,9	106,6	50,5	11754	4317	903	639,7
Rigel	345,5	34,7	192,8	147,2	11537	5057	1450	1071,1
Promedio general ensayo	362,9	42,8	192,2	82,7	11838	4446	1329	657
Desvío estándar de la diferencia	89,2	21,9	89,1	47,1	1392	837	262	314,2

Los resultados en producción de semilla eran predecibles, ya que Formoso (2006), Coscia y Surraco (1982) recomiendan suspender el pastoreo en setiembre para obtener buenas cosechas de semilla como

forma de aprovechar el potencial de crecimiento primaveral. Por el contrario, las cosechas de marzo producen menores rendimientos debido a las altas temperaturas y déficit hídrico que determinan cultivos de escasa altura y acumulación de forraje al estado de madurez (Figura 4), como también producto de la combinación de la acumulación de biomasa y la disminución del fotoperíodo que afecta a los materiales de floración temprana empleados en Uruguay.

Rebollo y Duhalde (1987) demostraron descensos promedio desde 305 kg/ha de semilla para todo el periodo de evaluación sin corte de primavera, hasta 247 y 197 kg/ha con cierre en setiembre o cierre en noviembre, respectivamente. Cierres muy tardíos con condiciones adversas, como las segundas cosechas estivales, van en detrimento del rendimiento de semilla al limitar el desarrollo vegetativo. Normalmente en la primavera del segundo año las raíces de lotus comienzan a presentar problemas sanitarios (infecciones de *Fusarium* sp.), acentuados por las condiciones climáticas (altas temperaturas y días secos, estrés hídrico), que provocan disminuciones en la población de plantas (Altier y Kinkel 2005; Formoso 2011).

Los rendimientos de semilla logrados en este ensayo pueden ser considerados altos logrados en este ensayo en comparación con los rendimientos comerciales (García *et al.* 1991b) podrían estar sobreestimados por el efecto borde de las microparcels. Otro elemento fue el momento óptimo de cosecha y el manejo de las muestras mediante cosecha manual que evitan en su conjunto menores pérdidas que a nivel comercial. A pesar de ello, el objetivo del experimento ha sido cumplido, ya que el diseño experimental permite la comparación relativa de un alto número de VC y cultivares testigos.

La floración indeterminada sumado a la dehiscencia de las vainas característico de la especie provocan la escasa recuperación de semillas formadas cuando se desarrollan flores tempranas y tardías en el mismo cultivo, especialmente en las segundas cosechas donde el fotoperíodo es más corto (febrero-marzo; Rebollo y Duhalde 1987). Sin embargo no ocurrió lo anterior por realizarse la cosecha manualmente y a tiempo.

La senescencia de las plantas comenzó el primer año con un importante raleo en el segundo verano. Como consecuencia de condiciones climáticas adversas extremas (Anexo 1) y la ausencia de riego instalado no fue posible continuar con la investigación en el tercer año, tanto por la alta variabilidad en los materiales individuales, como en el ensayo en general. De acuerdo a lo establecido por García *et al.* (1999), bajo situaciones de déficit hídrico se produce un estrés, que afecta la fisiología y el crecimiento de las plantas.

## **3.2. COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO DE LOS CULTIVARES TESTIGOS**

### **3.2.1. Producción de semilla**

En el primer año de evaluación, si bien las densidades poblacionales fueron similares entre tratamientos, los rendimientos de semilla en C1 y C2 presentan una gran dispersión, con un amplísimo rango en C1 (Figura 8), determinando este comportamiento una baja correlación no significativa ( $r=0,02$ ) entre estas variables (Anexo 2). Los cultivares testigos tuvieron una performance intermedia respecto al conjunto de VC en C1 (Cuadro 5), a excepción de Estanduela Ganador, que demostró una alta producción. El rendimiento de 316,1 kg/ha alcanzado por San Gabriel en este experimento, aunque representa un tercio del potencial del cultivar (Formoso 2011), es similar al obtenido en la primera cosecha sin cortes por Rebollo y Duhalde

(1987). Los rendimientos de semilla en C2 fueron bajos y también dispersos, a pesar de los rendimientos de forraje nada despreciables para el período estival (Cuadro 5; Figura 8). Estos bajos valores están probablemente vinculados a que todos los cultivares locales son de floración temprana y tienden a florecer más rápidamente en el verano que en la primavera (Rebollo y Duhalde 1987). Es decir, dichas leguminosas producen altos volúmenes de forraje, priorizando la biomasa en relación a la floración. Otros factores corresponden a las restricciones climáticas del período de verano, particularmente el estrés hídrico, que tienen un efecto negativo en la producción de semilla de todas las especies forrajeras (Martiniello y Teixeira da Silva 2011; García-Díaz y Steiner 2000 a).

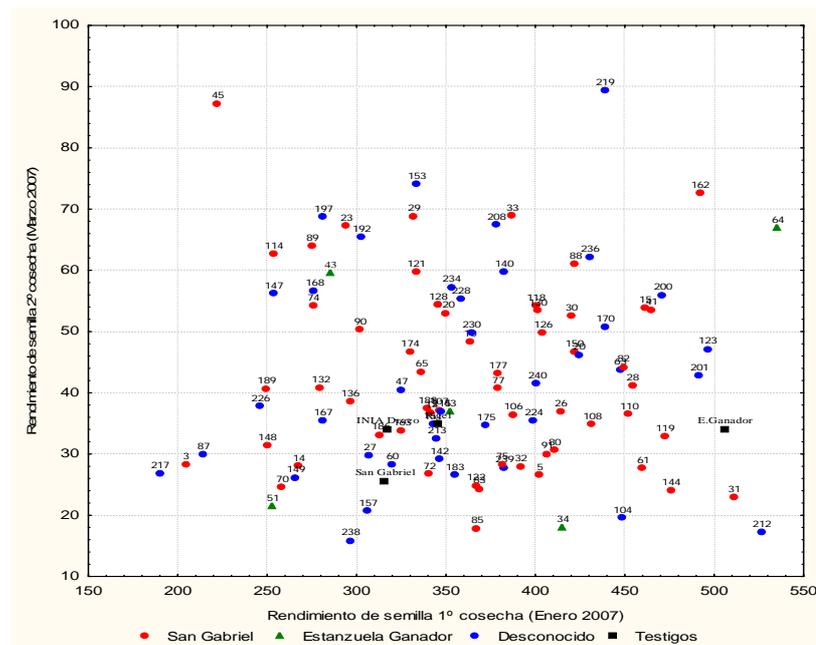


Figura 8. Relación entre rendimiento de semilla (kg/ha) de la primera (enero 2007) y segunda cosecha (marzo 2007) para las variedades criollas de *Lotus corniculatus* L. según origen genético y cultivares testigos

En el segundo año las relaciones cambian en la producción de semilla, con una alta asociación ( $P < 0,001$ ; Anexo 2) entre C3 y C4 (Figura 9). En los testigos San Gabriel y Estanduela Ganador se evidencia aún más claramente dicha variación de ranking en producción de semilla, pues



### **3.2.2. Producción de biomasa**

La producción de forraje en C1 presenta una relación positiva (Anexo 2;  $P < 0,05$ ) aunque baja con C2 (Figura 10). En C1 se destacó San Gabriel entre los cultivares testigos con el mayor producción, mientras que Estanzuela Ganador, INIA Draco y Rigel se ajustaron a la media (Cuadro 5;  $P < 0,05$ ). En contraste, estos rendimientos de primer año fueron superiores a los alcanzados por San Gabriel en la Evaluación Nacional de Cultivares Forrajeros correspondientes al mismo año de siembra (9666 kg MS/ha; Castro 2007), sin diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) con INIA Draco y Rigel. La explicación parcial del mayor rendimiento logrado en este experimento podría deberse a 2 razones, en primer lugar la potencial sobre-estimación por efecto borde debido a la cosecha de toda el área de las microparcels, y en segundo lugar que la evaluación de biomasa representa la producción acumulada desde la siembra tardía de julio de 2006 (Azambuja 1965, Gardner *et al.* 1968), mientras que Castro (2007) realizó 4 cortes de evaluación en el ensayo instalado temprano en el mismo año (10 de marzo de 2006).

No obstante, al igual que en producción de semilla, en el segundo año las relaciones cambian, con una alta asociación ( $P < 0,001$ ) entre forraje de C3 y C4 (Figura 11). El comportamiento de San Gabriel fue similar ( $P < 0,05$ ) a INIA Draco, Estanzuela Ganador y Rigel para ambas cosechas (Figuras 10 y 11). En contraposición, se observa la tendencia a una mayor persistencia de Rigel (50 % cobertura de parcela vs 15-30% para los demás cultivares en C3), especialmente durante el período de mayor estrés hídrico, comportamiento similar al determinado por Castro (2008) para el mismo año de siembra. En este contexto, INIA Draco y Estanzuela Ganador se diferenciaron de Rigel en C3, con 38% menor rendimiento y 13% más que éste, respectivamente. Las diferencias en comportamiento relativo entre primer y segundo año probablemente sean el resultado de una menor

reducción de la población de plantas de Rigel por su menor incidencia de podredumbres radiculares (Altier y Kinkel 2005, Formoso 1993, Altier *et al.* 2000) y especialmente la interacción con el aumento del estrés hídrico (Anexo 1). Ello se aprecia claramente al observar la información recabada por Castro (2009) en el experimento de comparación varietal sembrado en INIA La Estanzuela en el mismo año. Los rendimientos de biomasa alcanzados fueron extremadamente bajos al tercer año de evaluación consecuencia de un pobre stand de plantas sobrevivientes producto de la sequía imperante durante el año 2008 (550, 799 y 816 kg MS/ha para San Gabriel, Rigel e INIA Draco respectivamente, Castro 2009).

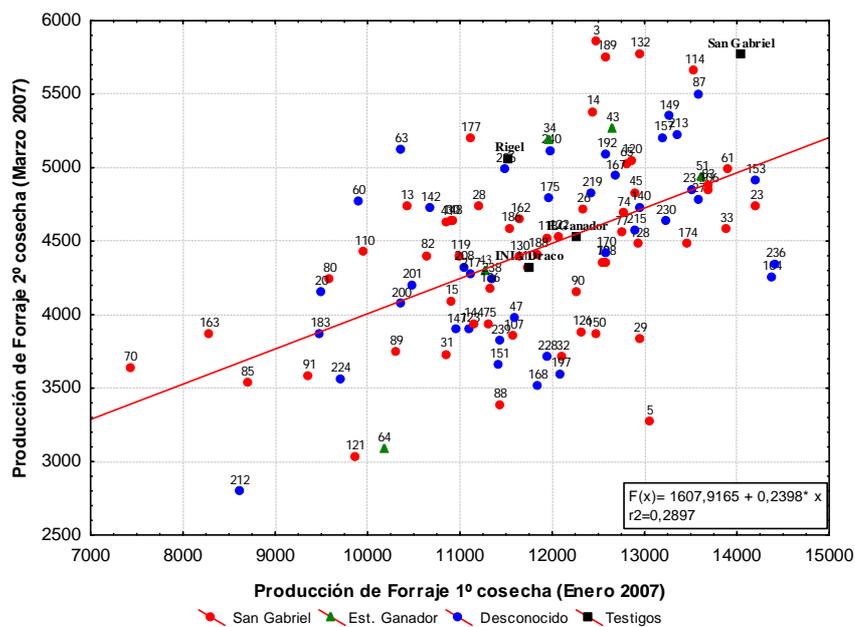


Figura 10. Relación entre rendimiento de forraje (kg MS/ha) en la primera y segunda cosecha (enero y marzo 2007) para las variedades criollas de *Lotus corniculatus* L. según origen genético y cultivares testigos

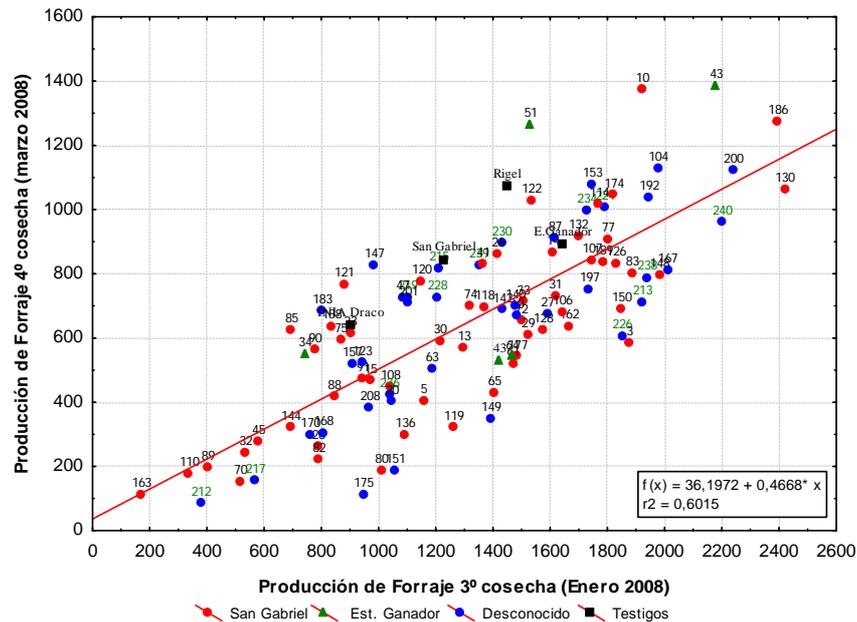


Figura 11. Relación entre rendimiento de forraje (kg MS/ha) en la tercera y cuarta cosecha (enero y marzo 2008) para las variedades criollas de *Lotus corniculatus* L. según origen genético y cultivares testigos

### 3.3. COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO DE LAS VARIEDADES CRIOLLAS

#### 3.3.1. Relación entre producción de forraje y semilla

La asociación entre las variables de producción de semilla y forraje se aprecia en el estudio de correlaciones (Anexo 2). Las correlaciones significativas más altas expresadas al primer año son la producción de forraje de C1 y C2 ( $r= 0,54$ ). En el segundo año la relación entre rendimiento de forraje y semilla de C3 ( $r= 0,83$ ), la asociación entre semilla y forraje de C4 ( $r= 0,69$ ) y finalmente entre forraje de C3 y C4 ( $r=0,78$ ), son todas relaciones que implican la incidencia del factor persistencia. Rebollo y Duhalde (1987) observaron rendimientos de biomasa a la cosecha del orden de 8966 kg MS/ha, 9633 y 5833 kg MS/ha para los 3 manejos de defoliación (sin corte, con cierre en setiembre y cierre en noviembre, respectivamente).

Sin embargo, es importante resaltar que las diferencias registradas por estos autores en rendimiento fueron provocadas por medidas de manejo (defoliación) a diferencia del presente ensayo que se debieron a expresiones fenotípicas que reflejan diferencias genotípicas varietales.

La relación entre producción de semilla y rendimiento de forraje en C1 denota una gran dispersión, con una asociación negativa muy baja entre ambos parámetros (Anexo 3;  $r=-0,22$ ;  $P<0,05$ ). Para la variable biomasa se ubican las VC 212, 163 y 217 dentro del estrato inferior en C1 y C3, lo que indica su estabilidad aunque con bajas producciones (Figuras 10 y 11). A diferencia de las VC 163 y 217, la VC 212 combina pobre comportamiento en biomasa con alto rendimiento de semilla en C1 (Anexo 3), excepción que confirma la variabilidad existente en productividad entre las VC colectadas en Uruguay. Más aún, la variabilidad existente en las VC se aprecia en el cambio de ranking considerando el rendimiento de semilla en C1 (Cuadro 6) y C3 (Cuadro 7), con total cambio de las VC que integran los estratos inferiores y superiores. Sin embargo, en el conjunto de valores de las VC se registró una alta asociación entre producción de semilla y forraje en C3 (Anexo 4), reflejo de marcadas diferencias en persistencia que no están asociadas a los rendimientos del primer año (Anexo 5).

Cuadro 6. Rendimiento de semilla (kg/ha) y forraje (kg MS/ha) al primer año ordenadas por el ranking de las 4 variedades criollas superiores e inferiores al testigo San Gabriel ( $P<0,05$ ) por producción de semilla en la primer cosecha (enero 2007)

RANKING	Variedad criolla	Semilla (kg/ha)		Forraje (kg MS/ha)		
		Enero	Marzo	Enero	Marzo	
ALTAS	1	64	535,7*	66,9	10181*	3085
	2	212	526,6*	17,2	6616*	2794
	3	31	511,2*	22,9	10860*	3726
	4	123	496,4*	47,1	11111*	3899
TESTIGO	T1	San Gabriel	316,1	25,5	14048	5764
BAJAS	97	45	222,4	87,1	11584	4826
	98	87	214,4	29,9	10921*	5496
	99	3	204,6	28,2	13593	5852
	100	217	190,1	26,8	13544	4272
Promedio general ensayo			362,9	42,8	11838	4446
Desvío estándar de la diferencia			89,2	21,9	1392	837

Cuadro 7. Rendimiento de semilla (kg/ha) y forraje (kg MS/ha) al segundo año ordenadas por el ranking de las 4 variedades criollas superiores e inferiores respecto al testigo San Gabriel ( $P < 0,05$ ) por producción de semilla en tercer cosecha (enero 2008)

RANKING		Variedad criolla	Semilla (kg/ha)		Forraje (kg MS/ha)	
			Enero 08	Marzo 08	Enero 08	Marzo 08
ALTAS	1	83	402,2	126,41	1888	802,1
	2	240	381,6	184,3	2202	960,1
	3	186	365,6	144,05	2397	1272,6
	4	213	347,6	42,02	1923	709,6
TESTIGO	T1	San Gabriel	154,4	65,33	1229	842,1
BAJAS	97	163	10,6	37,86	172	111,7
	98	110	39,6	44,09	338	176
	99	70	42,2	43,81	518	150,8
	100	217	43	5,07	570	155
Promedio general ensayo			192,2	82,7	1329	657
Desvío estándar de la diferencia			89,1	47,1	262	314,2

Estos resultados en producción de semilla presentan similares tendencias que las observadas con la producción de forraje al comparar C1 y C4 (Figura 12, Anexo 6). Esta aparente contradicción de asociación entre rendimiento de semilla y producción de biomasa en dos cosechas diferentes, indica que el rendimiento de semilla está directamente asociado al desarrollo vegetativo y sobrevivencia del stand de plantas en este conjunto de materiales en el segundo año (Anexo 4), mientras que en C1 estos parámetros son independientes (Anexo 3). Normalmente las plantas de primer año presentan floraciones más extendidas que las de segundo año y éstas más que el tercero (Formoso, 2011). Siembras más tardías alargan el período de floración y el pico máximo se ubica más hacia el verano. Es decir, para una misma fecha de cierre, a medida que la edad de la pastura se incrementa, el pico de floración se anticipa, siendo la floración más concentrada. Los rendimientos de semilla determinados por Formoso (2011), decrecen a medida que la pastura presenta más años de implantada, lo cual se concuerda a la tendencia observada en el experimento, situación ésta a verificarse con mayor cúmulo de años de evaluación. Al segundo año, tanto el rendimiento de forraje (Figura 11) como

la producción de semilla (Figura 9) se ven afectados por la persistencia del stand de plantas lo cual produce detrimentos en ambas variables siendo explícita la asociación lineal entre ambas en la C3 (Anexo 4).

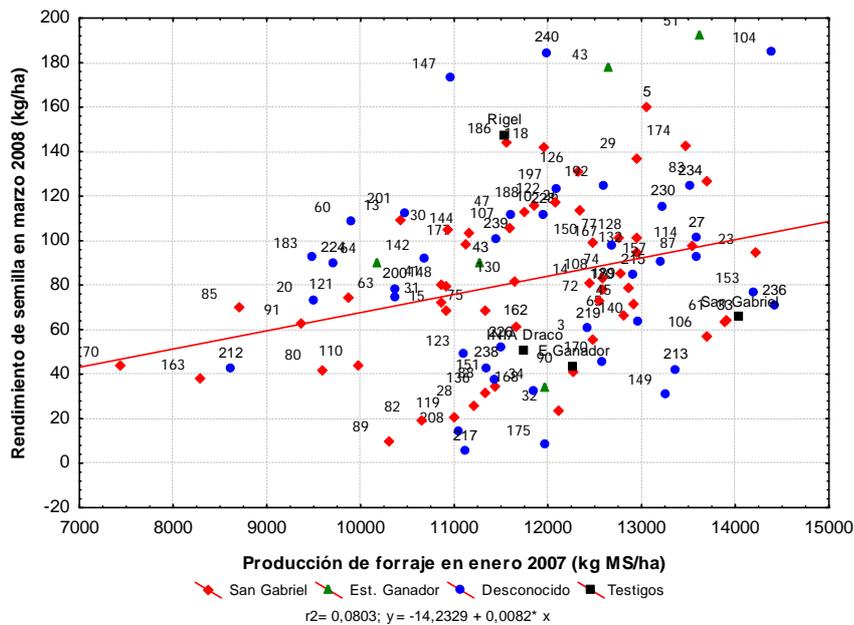


Figura 12. Relación entre producción de forraje (kg MS/ha) de la primer y cuarta cosecha (enero 2007 y marzo de 2008 respectivamente) de las variedades criollas de *Lotus corniculatus* L. según origen genético y cultivares testigos

### **3.3.2. Clasificación productiva de las variedades criollas mediante el análisis multivariado de factores entre semilla y forraje**

El análisis de componentes principales desarrollado por Pearson (1901) utiliza una transformación ortogonal para convertir el conjunto de variables posiblemente correlacionadas en variables no correlacionadas que se denominan componentes principales (Statística 7.1). Esta técnica estadística que integra las variables de producción de forraje y semilla explicó el 74% de la varianza total (Anexo 7). El componente principal 1 (CP1), que explicó la mayor proporción de la varianza (44%), está determinado notoriamente por la persistencia: rendimiento de semilla en C3, producción de forraje en C3 y C4 (Figura 13; Formoso 1993); aunque en

forma indirecta, Formoso (2011) relacionó la producción de forraje en el segundo y tercer año con la densidad de plantas en un estudio de densidades de siembra.

En contraste, el CP2 (17% de la variación total) está determinado por el rendimiento de semilla en C1; y finalmente el tercer factor se encuentra representado por semilla en C2. Los vectores señalan las variables que presentan diferencias significativas (Anexo 8), estableciéndose las asociaciones por los ángulos formados por dichos vectores, interpretados en términos de correlaciones entre variables. La gran magnitud de los vectores de rendimiento de semilla y forraje en C3 y C4, indican una alta contribución de cada variable, así como los ángulos que forman, menores a 90°, indican que están fuertemente relacionados. En contraste los vectores de rendimiento de semilla en C1 y C3 manifiestan ausencia de asociación (ángulo 90 °).

El posicionamiento de los cultivares producto del mejoramiento por persistencia a campo es opuesto para ambos parámetros. El cultivar INIA Draco originado con dos ciclos de selección (VC y E. Ganador) se ubicó opuesto a las variables de forraje del segundo año, mientras que Rigel se vinculó con estas variables, reflejando probablemente el efecto de dos ciclos más de selección por persistencia sobre el mismo germoplasma que originó a INIA Draco (Figura 13). En contraposición, INIA Draco y Rigel demostraron mayor persistencia en la comparación varietal del mismo año de siembra realizada por Castro (2007, 2008, 2009). En relación a la producción de semilla en C1, estos cultivares se ubicaron opuestos al factor o independiente. Si bien el programa de mejoramiento genético contempló en el índice de selección la producción de semilla de las plantas elites, estos resultados demuestran que el énfasis realizado en mejorar la variable persistencia productiva condujo a un aumento del forraje con la edad de la pastura con una probable reducción en el potencial de producción de

semilla (C1) cuando se compara la información de Estanzuela Ganador, material parental, con el último producto del mejoramiento genético (Rigel). La conjunción del mejoramiento genético de la producción de forraje y semilla es importante para las especies que no se propagan vegetativamente (Falcinelli, 1999), aunque la alta producción de forraje no siempre es compatible con la producción de semilla. Clones seleccionados por alta producción de forraje son generalmente pobres productores de semilla y viceversa, por lo tanto puede ser necesario llegar a un compromiso entre altos rendimientos de forraje y rendimientos de semilla satisfactorios (Sleper y Phoehلمان, 2006); criterios utilizados en el mejoramiento genético de leguminosas forrajeras de INIA La Estanzuela.

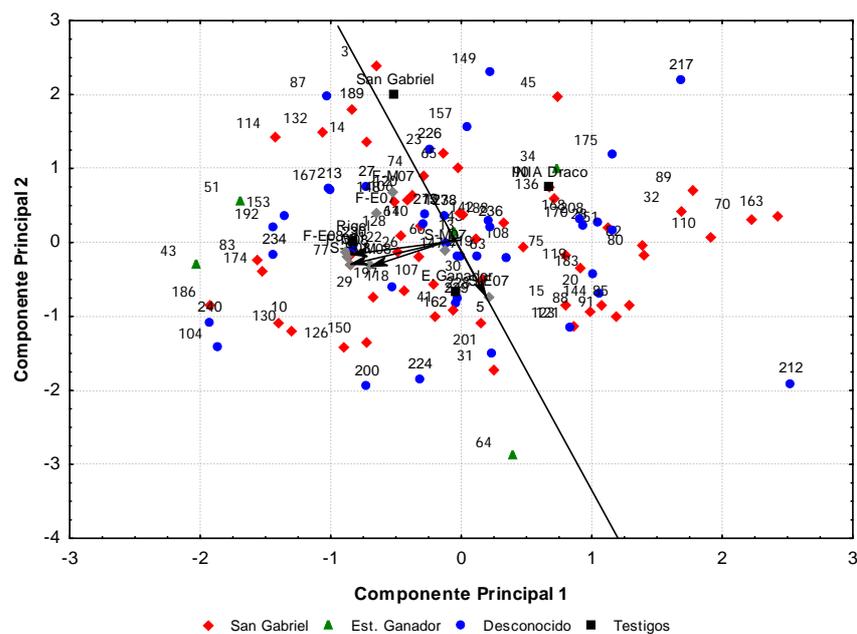


Figura 13. Dispersión gráfica de 100 variedades criollas de *Lotus corniculatus* que se encuentran identificadas según origen genético y 4 cultivares testigos en función de los 2 primeros componentes principales sobre 8 variables de rendimiento de semilla y forraje (Líneas prolongadas indican vectores significativos,  $P < 0,05$ )

La ubicación relativa de los testigos en función de su posicionamiento en el análisis de componentes principales (Figura 13) refleja su comportamiento productivo (Cuadro 5). San Gabriel está asociado con la

producción de forraje inicial (C1 y C2), Estanduela Ganador con el rendimiento de semilla en C1, mientras que Rigel, marca claramente la superioridad en persistencia respecto a los demás cultivares testigos (biomasa y semilla en C3 y C4).

La dispersión de las VC observada en estos factores del análisis de CP en comparación con los cultivares testigos probablemente refleja una mayor variabilidad genética, que podría ser un insumo primordial y potencial a emplearse en la selección de un programa de mejoramiento genético tanto desde el punto de vista de producción de semilla como persistencia. Sin embargo, es necesario reunir la información de la repetición de este experimento realizada en los siguientes años (2007, 2008 y 2009), para establecer cuáles características son consistentes o dependientes de las variables climáticas. En este experimento las VC 64, 31 y 212 lograron rendimientos de semilla en C1 similares a Estanduela Ganador, superando 500 kg/ha, mientras que las VC 45, 219 y 153 lograron distinguirse con rendimientos de semilla en C2 (87,1 y 89,3 kg/ha, respectivamente; Cuadro 6). En contraste, las VC 43, 186, 240, 104 corresponden a materiales destacados en persistencia, con lucidos valores en las variables de forraje y semilla en C3 y C4 (Figura 13, Cuadro 7).

Diferencias amplias en el comportamiento de las VC se registraron en productividad asociadas a persistencia (Figuras 9; Cuadro 7), que no se vincularon con el rendimiento de la primera cosecha (Anexo 5 y Anexo 6),

La maduración del lotus es generalmente desuniforme lo que implica que sea imposible cosechar la totalidad de la semilla producida. La desuniformidad y dehiscencia son los principales factores que explican la brecha existente respecto al rendimiento potencial a escala comercial (Carámbula, 1981, Seaney y Henson, 1970). Aunque en el conjunto de cosechas del ensayo se registró una gran dispersión en la producción de

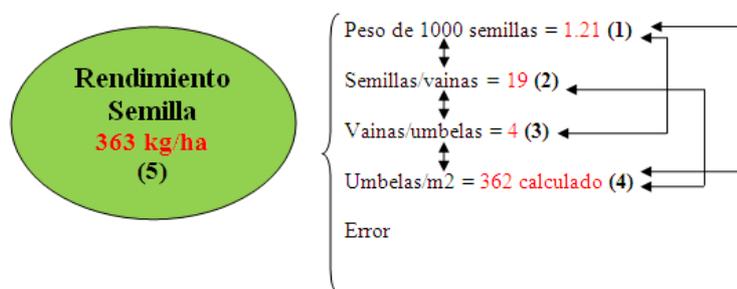
semilla de las VC, la misma no se explica por diferencias en dehiscencia o en pérdida de semilla, ya que la cosecha manual se realizó en tiempo y forma para evitar estos efectos confundidos. Además, la implantación de las VC y los cultivares testigos fue uniforme, disminuyendo las posibilidades de encontrar asociaciones positivas entre producción de forraje y semilla en la primera cosecha que enmascaren diferencias en densidad de plantas. Pritsch y Rosell (1973, citado por Formoso 2011), registraron los mayores rendimientos de semilla (600 kg/ha) para la densidad de siembra más alta evaluada (9 kg/ha de semilla), mientras que Formoso (2011) determinó que cambios en la densidad de siembra desde 5 a 15 kg/ha no generaron diferencias en los rendimientos de semilla iniciales. El método de siembra en líneas utilizado en el presente estudio posibilita una mejor uniformidad de floración y polinización (Formoso, 2011). En contraposición, los mejores resultados en la producción de biomasa al primer año se obtuvieron con las mayores densidades de siembra, mientras que en el transcurso de los años los menores valores de materia seca se lograron con las densidades más bajas (Formoso, 2011).

En este contexto, en las cosechas del segundo año comienzan a pesar otros factores como la persistencia, que podrían confundir la interpretación de la información desde el punto de vista del potencial de producción de semilla. Por lo tanto, para el estudio del comportamiento de las VC en los componentes de rendimiento de semilla se escogió la primer cosecha correspondiente a enero 2007 ya que en ese momento es cuando se expresó el potencial de las VC.

### **3.4. COMPONENTES DE RENDIMIENTO DE SEMILLA**

El rendimiento de semilla se encuentra determinado por componentes claramente definidos: el número de umbelas/m<sup>2</sup> (densidad), el número de vainas/umbela (tamaño de la umbela), el número de semillas/vaina (tamaño

de vaina) y finalmente por el peso de la semilla (g/1000 semillas, Figura 14; referido a García-Díaz y Steiner 2000 a).



\* Señalados en rojo = valores reales del ensayo

Figura 14. Diagrama de componentes de rendimiento de semilla para el rendimiento promedio general del experimento de la primera cosecha (enero 2007). Adaptado de García-Díaz y Steiner (2000 a)

### 3.4.1. Comparación varietal de los testigos

El rendimiento potencial estimado para la especie del orden de 1200 kg/ha de semilla (Lorenzetti 1993, Formoso 2006) dista mucho del promedio obtenido en la primera cosecha del presente ensayo y también de los rendimientos máximos obtenidos por los productores semilleristas a nivel nacional (García *et al.* 1991). Formoso (2006) determinó un máximo experimental alcanzado a nivel nacional del orden de 960 kg/ha.

Estanzuela Ganador logró mayor rendimiento de semilla ( $P < 0,001$ ) que San Gabriel, lo que se explica en parte por un 40% mayor densidad de inflorescencias ( $P < 0,05$ ; Cuadro 8) y en menor medida por el mayor peso de semilla (5 %). En este ensayo en particular la densidad de inflorescencias se estimó a partir del rendimiento total y los componentes determinados, correspondiendo a una densidad promedio de 363 umbelas/m<sup>2</sup> (Cuadro 8), lo cual se aproxima a lo citado por Lorenzetti (1993; 400 inflorescencias/m<sup>2</sup>) para San Gabriel. Rebollo y Duhalde (1987), determinaron que el número de

flores/m<sup>2</sup> promedio para San Gabriel fue de 917, 777 y 1020 flores/m<sup>2</sup> para 3 tipos de manejo (sin cortes, cierre en setiembre o cierre en noviembre, respectivamente). Considerando que generalmente la especie tiene 4-5 flores/inflorescencia (Frame *et al.* 1998), y que siempre hay pérdidas durante la polinización y cuajado (Seaney y Henson 1970), la densidad de vainas/umbelas y el número de umbelas para todos los testigos y especialmente para Estanzuela Ganador (Cuadro 8) probablemente sean reflejo de la excelente floración y cuajado del experimento para la C1 (Figura 3).

Las diferencias en densidad de inflorescencias entre cultivares no necesariamente se asociaron para este experimento con el momento de formación de tallos como lo determinaron Costa y Panizza (1997) mediante diferentes manejos del tapiz. Estanzuela Ganador, que logró mayor densidad de inflorescencias ( $P < 0,001$ ) que San Gabriel, presentó plena floración 2 días más temprano, mientras que INIA Draco tuvo menores densidades de umbelas aunque el momento de floración fue similar a Estanzuela Ganador. Aunque un período de maduración más corto resulta en un menor tiempo de llenado de semillas (Anderson 1955), el menor rendimiento de Rigel o INIA Draco no estarían determinados por diferencias en el momento de la floración (Cuadro 8).

Cuadro 8. Fecha de floración (días desde la siembra a plena floración), producción de semilla (kg/ha), forraje (kg MS/ha), índice de cosecha (%) y componentes de rendimiento de semilla de los cultivares testigos, promedio general del ensayo y desvíos del experimento para la primer cosecha

Cultivares	Días a plena floración	Semilla Enero 2007 (kg/ha)	Umbelas /m <sup>2</sup>	Número vainas /umbela	Número semillas /vainas	P1000 semillas (g)	Forraje Enero 2007 (kg MS/ha)	Índice de Cosecha
E.Ganador	131	506	496	4,61	18	1,24	12277	3,96
INIA Draco	131	318	308	4,58	19	1,18	11754	2,63
Rigel	133	346	376	4,32	19	1,14	11537	2,91
S. Gabriel	133	316	354	3,98	15	1,18	14048	2,20
Promedio general ensayo	133	363	363	4,45	19	1,21	11838	3,03
Desvío estándar	4,6	89	83	0,21	1,6	0,04	1417	0,80

Si bien los rendimientos de semilla obtenidos en el ensayo distan mucho del potencial de la especie, el tamaño de semillas promedio obtenido concuerda con lo establecido por Lorenzetti (1993) para la especie (Cuadro 8). No obstante, Lorenzetti (1993) y Seaney y Henson (1970), observaron que solamente el 40% de un rango entre 20-70 óvulos por vaina son convertidos en semilla. El rango de peso de 1000 semillas entre los cultivares testigo fue estrecho (1,14 a 1,24 g). Estanzuela Ganador, el cultivar testigo con más alto rendimiento, presentó el tamaño de semillas y el número de vainas por umbela más alto (Cuadro 8).

Por otra parte, si bien el rendimiento de semilla se encuentra estrechamente relacionado con la densidad de umbelas, no manifiesta la misma relación con rendimiento de forraje (Anexos 10 y 4). McGraw *et al.* (1986) señalan que mediante la relación estática entre rendimiento de semilla/m<sup>2</sup>, rendimiento de forraje/m<sup>2</sup>, e índice de cosecha ( $IC = \text{semilla} / (\text{forraje} + \text{semilla}) * 100$ ), no se puede dilucidar las relaciones de dinámica de crecimiento que contribuyen al rendimiento. Sin embargo, el IC si puede ser de utilidad y pertinente como análisis adicional de los componentes de rendimiento. En este sentido, McGraw *et al.* (1986), determinaron que el IC disminuyó a medida que aumentó la densidad de plantas, observándose que el incremento en rendimiento de semilla es menor que los incrementos en el rendimiento de forraje. El tamaño de parcela si bien no fue el adecuado para producción de semilla, responde a fundamentos prácticos, pues de lo contrario se debería partir de áreas de evaluación muy extensas ya que podrían incrementar la variabilidad ambiental en el experimento. A lo anterior se le suma la escasa cantidad de semilla disponible dado que se trata de un material único y valioso; contándose con una pequeña muestra conservada en el Banco de Germoplasma de INIA La Estanzuela. Ello puede explicar en parte los bajos rendimientos logrados. El componente del rendimiento afectado por la densidad fue el número de umbelas/planta, mientras que el IC se mantenía

casi constante. Al realizar el cálculo del IC para C1 se observa que Estanduela Ganador está 31% por encima del promedio del experimento y que superó en 80% a San Gabriel ( $P < 0,05$ ; Cuadro 8). La partición de nutrientes en Estanduela Ganador no se orientó a la producción de biomasa, ya que presentó el mayor IC, producto del alto rendimiento de semillas alcanzado mediante la mayor densidad de umbelas, mayor tamaño de vainas y el mayor peso de semillas con un valor de biomasa intermedio. En contraste, San Gabriel, con el menor rendimiento de semilla, tiene una densidad de umbelas media, bajo número de vainas/umbela, muy bajo número de semillas/vaina y peso de 1000 semillas intermedio, con muy alto rendimiento de forraje. Las diferencias observadas entre los cultivares testigos que dieron origen a las VC (San Gabriel y E. Ganador) tienen una amplia variabilidad en la mayoría de las características evaluadas.

Los IC para San Gabriel, INIA Draco y Rigel nos demuestran menor producción de semilla respecto a la biomasa, en comparación con el IC de 10% determinado por Lorenzetti (1993) para el rendimiento potencial de 1200 kg/ha. Los IC se redujeron a un tercio en la C2 (96%) como consecuencia de la baja producción de semilla. Los IC del segundo año alcanzaron los valores indicados por Lorenzetti (1993); producto de un marcado descenso en el desarrollo vegetativo como consecuencia de la sequía las C3 y C4 lograron IC de 12,6 y 11,7%, respectivamente. Considerando el rendimiento de forraje reportado por Castro (2007, 2008, 2009) para estos cultivares y el rendimiento máximo alcanzado por semilleristas (García *et al.* 1991), la relación no es favorable para alcanzar un alto IC en Uruguay.

### **3.4.2. Componentes de rendimiento de semilla de las variedades criollas**

#### **3.4.2.1. Correlaciones entre componentes de rendimiento**

El grado de asociación entre el rendimiento de semilla y los componentes, tal como es indicado por los vectores en la Figura 16, se estableció mediante correlaciones, identificándose parámetros relacionados ( $P < 0,05$ ; Anexo 9). El componente con mayor vinculación al rendimiento de semilla fue la densidad de inflorescencias y vainas, y en menor medida el tamaño de la semilla (Anexo 9). La densidad de umbelas y vainas presentó una correlación alta y positiva ( $r = 0,9$  y  $0,91$ ; respectivamente) con rendimiento de semilla (Figura 16) por lo que, al igual que en la evaluación del efecto de manejos de fechas de cierre (Formoso 2011), debería ser el principal parámetro a evaluarse en un programa de mejoramiento genético. Estos resultados coinciden con Albrechtsen *et al.* (1966), Li and Hill (1988, 1989a), McGraw *et al.* (1986), Mos (1983), Pankiw *et al.* (1977), Stephenson (1984), García-Díaz y Steiner (2000 a); quienes establecieron que la densidad de umbelas es el componente de mayor incidencia en la determinación del rendimiento a lograr. Li y Hill (1989b), registraron una correlación de 97%, aún mayor que la observada en el presente estudio. Además, Hare y Lucas (1984), Li y Hill (1988); han usado a este componente como un indicador predictivo para establecer el momento óptimo de cosecha en primera instancia, mientras que la coloración de las vainas sería un segundo factor a utilizar como guía. Similares recomendaciones fueron establecidas para el cultivar de *Lotus uliginosus* Grasslands Maku por Hare y Lucas (1984). Aun cuando el alto rendimiento de semilla de Estanzuela Ganador se explica mayoritariamente por la densidad de umbelas, las VC originadas en este cultivar se distribuyeron en todo el espectro de rendimientos y densidades, al igual que las VC provenientes de San Gabriel.

De la misma forma, no se observó una distribución diferente en función de los años de multiplicación propia de las VC (Anexo 10).

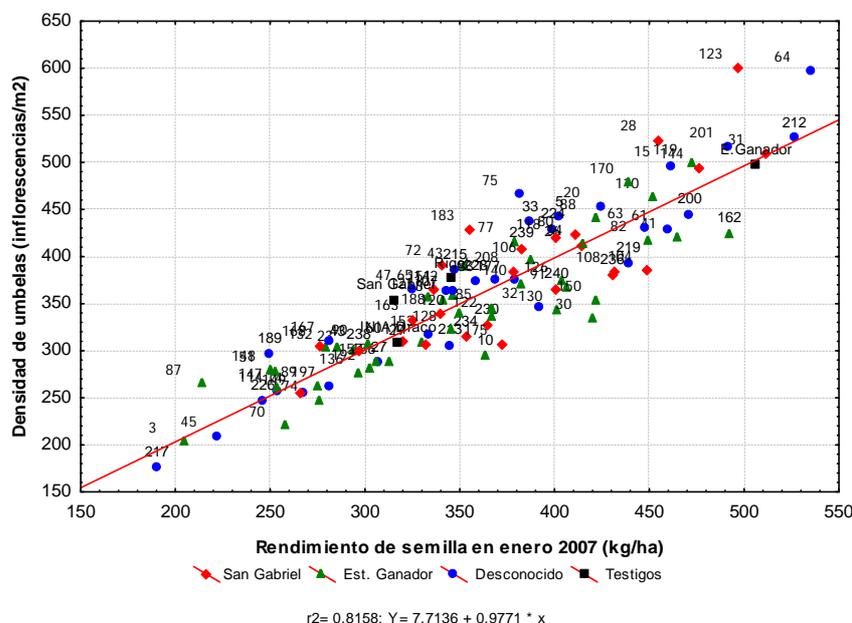


Figura 15. Relación entre rendimiento de semilla (kg/ha) y densidad de inflorescencias (n° umbelas /m<sup>2</sup>) para la primera cosecha de variedades criollas de *Lotus corniculatus* L. según origen genético y cultivares testigos

Cuadro 9. Fecha de floración (días a plena floración), rendimiento de semilla (kg/ha) y sus componentes, producción de forraje (kg MS/ha) e índice de cosecha (%) en la primera cosecha (enero 2007) de *Lotus corniculatus* L., promedio general y desvío estándar ordenadas en función del ranking de las variedades criollas superiores e inferiores al testigo San Gabriel (señalados con fondo naranja y amarillo claro, respectivamente; P<0,05) por producción de semilla en la primer cosecha

RANKING	Materiales	Días a plena floración	Semilla Enero 2007 (kg/ha)	Umbelas /m <sup>2</sup>	Número vainas /umbela	Número semillas /vainas	P1000 semillas (g)	Forraje Enero 2007 (kg MS/ha)	Índice de Cosecha
ALTAS	1 VC 64	126	535,7	597	4,42	17	1,23	10181	5,00
	2 VC 212	131	526,6	526	4,29	19	1,22	6616	7,38
	3 VC 31	126	511,2	509	4,68	18	1,22	10860	4,49
	4 VC 123	128	496,4	600	4,23	15	1,26	11111	4,27
TESTIGO	T1 S. Gabriel	133	316,1	354	3,98	15	1,18	14048	2,20
BAJAS	97 VC 45	138	222,4	209	4,40	20	1,16	11584	1,88
	98 VC 87	135	214,4	266	4,47	16	1,12	10921	1,92
	99 VC 3	136	204,6	204	4,52	19	1,17	13593	1,45
	100 VC 217	129	190,1	175	4,55	21	1,17	13544	1,38
Promedio general ensayo		133	362,9	363	4,45	19	1,21	11838	3,03
Desvío estándar		4,6	89	83	0,21	1,6	0,04	1417	0,80

El incremento en el estrés hídrico y particularmente su relación con el momento de floración probablemente contribuyeron a aumentar las

diferencias entre VC (Figura 4, Anexo 1). Las VC que florecen antes, aunque la diferencia en rango y en fecha promedio de floraciones no fue muy grande, en general produjeron mayores rendimientos. En contraste, las floraciones tardías redundaron en detrimentos respecto a la cosecha de semilla porque concentraron su floración en un período con mayor estrés hídrico, ya que durante el período de floración la precipitación fue de 43,1 mm mientras que la evapotranspiración acumulada (función de Penman) fue 167,4 mm. Costa y Panizza (1997), establecieron que los tallos de San Gabriel formados temprano presentan mayor número de inflorescencias que aquellos formados tardíamente, siendo este el determinante de las diferencias alcanzadas por Rebollo y Duhalde (1987) mediante diferentes manejos del tapiz. Cortes tardíos generalmente retrasan la floración y provocan disminuciones de rendimiento (Rebollo y Duhalde 1987) aunque el pico de floración se retrasó solo 7 días entre el cierre de setiembre y noviembre, aumentando la densidad de floración. Similares resultados han sido obtenidos en EE.UU. por Anderson (1955) y Li y Hill (1989b) con mayor rendimiento de inflorescencias tempranas que las tardías. Entre los factores determinantes de las diferencias en rendimiento alcanzados se encuentra la influencia de factores ambientales en la acumulación de carbohidratos en los órganos de almacenamiento (raíz y corona) para su posterior uso en la fase reproductiva, especialmente en el éxito del cuajado (Nelson y Smith 1967).

En este aspecto, el rango de floración generado para un mismo cultivar mediante el manejo de defoliaciones por Costa y Panizza (1997) osciló del 18 de diciembre 1996 al 11 de enero del siguiente año. En esta investigación que comprende un conjunto de materiales diferentes, aunque con orígenes genéticos mayoritariamente similares (San Gabriel, Estanzuela Ganador), además de tratarse de la primera cosecha con un único manejo previo, la floración se inició con un mes de antelación (14 noviembre al 15 de diciembre del 2006) que la información generada para la especie por Costa y Paniza (1997) que corresponde a 125 y 128 días pos-siembra. En

contraposición la floración plena se dispersó más (8 al 15 de diciembre de 2006) lo que se corresponde a 149 y 156 días desde la siembra. Comparando la diferencia en días de floración (clasificada en inicio, media y plena floración) entre VC tempranas y tardías (25 vs 29 días respectivamente desde inicio a plena floración), las potenciales diferencias en densidad de inflorescencias no necesariamente se asociaron para este experimento con el momento de formación de tallos como lo determinó Costa y Panizza (1997) mediante diferentes manejos del tapiz. Sin embargo, las VC que lograron mayor rendimiento de semilla ( $r=-0,41$ ;  $P<0,001$ ; Anexo 10) y densidad de inflorescencias ( $r=-0,43$ ;  $P<0,001$ ) fueron las que presentaron un período de floración ligeramente más acotado (14 noviembre al 8 de diciembre), mientras que para las de menores densidades de umbelas éste fue más amplio (17/11 al 15/12/2006). Beuselinck y McGraw (1988), determinaron que el número de días de floración a madurez de las vainas generalmente decrecía desde las fechas de floración tempranas a las tardías, al avanzar el verano. Un período de maduración más corto resulta en un menor tiempo de llenado de semillas (Anderson 1955), lo que parcialmente explica las disminuciones en el peso de semillas observadas en las VC que florecieron más tarde (Cuadro 9). A lo anterior se le suma que el período de floración más extendido coincide con un período de incremento del estrés hídrico (Cuadro 4), lo cual podría explicar en parte la disminución de rendimiento en VC con floración más tardía o extendida en el presente estudio. La información anteriormente citada, junto con la evidencia de que hay una relación aunque baja, entre rendimiento de semilla y fecha de floración, indica la necesidad de realizar repeticiones de las evaluaciones en siembras sucesivas que permitan discriminar entre el efecto genotipo y el efecto año. En contraposición, no se observó similar relación entre la fecha de floración y la producción de forraje ( $r= 0,19$ ; ns).

Por otra parte, si bien el rendimiento de semilla se encuentra estrechamente relacionado con la densidad de umbelas, éste no manifiesta

la misma relación con rendimiento de forraje (Anexos 10 y 11). La influencia del incremento del estrés hídrico podría haber influido en mayor medida en la producción de semilla disminuyendo la densidad de umbelas que llegaron a maduración, mientras que la acumulación de forraje se desarrolló durante toda la primavera y por lo tanto se observa como una variable independiente del momento de floración. Esta dicotomía probablemente refleja características diferenciales entre VC en la densidad y altura de tallos que en última instancia son los principales componentes del rendimiento de forraje, mientras que la densidad de umbelas podría reflejar diferencias en uniformidad de floración, además de potenciales diferencias entre VC en el número de umbelas por tallo, variable que no fue determinada en este experimento. Costa y Panizza (1997), observaron 2 picos de floración en Uruguay (el primero con mayores rendimientos en diciembre compuesto de 48,1; 35,2 y 16,7% de vainas maduras, inmaduras y abiertas respectivamente; y el segundo en enero donde la clasificación fue de 38,5; 35,6 y 28,6% por orden de aparición. Stephenson (1984), reportó que sólo un tercio de las flores produce vainas maduras y 3 de 5 vainas pueden abortar. Esto concuerda con lo observado por Li y Hill (1988), quienes determinaron que el número de flores declina con el tiempo, además de no encontrarse correlacionado significativamente con el rendimiento de semilla. La proporción de abortos florales, si bien no se midió en este estudio, seguramente fue inferior a la indicada por Stephenson (1984), ya que se superaron las 4 vainas por inflorescencia, un valor más que satisfactorio para la especie (Formoso 2011). No obstante ello, características tales como el hábito de los materiales puede presentar consecuencias a nivel de rendimientos de semilla, pues de acuerdo con lo citado por varios autores; plantas más erectas favorecerían la polinización, reducirían las probabilidades de vuelco de los materiales, mejorando las reservas de fotosintatos en los tejidos radiculares (Li y Hill 1989a). Al respecto, valores similares de rendimiento de semilla a este experimento fueron reportados por Li y Hill (1989a).

A su vez, la producción de semilla se asocia positivamente con el peso de 1000 semillas, contribuyendo las diferencias alcanzadas entre las VC mejores y peores en rendimiento de semilla ( $r= 0,38$ ;  $P<0,001$ ; Cuadro 6). Las VC con mejores y peores tamaños de semilla (Cuadro 10) no coinciden con las VC de mayor y menor producción de semilla (Cuadro 9). Al no existir una asociación alta entre rendimiento y peso de 1000 semillas ( $r= 0,38$ ; Anexo 12.) como la existente con densidad de umbelas, las VC cuyo tamaño de semillas fueron más altos y bajos (1,34 y 1,08 g, respectivamente) no correspondieron con aquellas que lograron los mejores o peores rendimientos de semilla (Anexo 10; Cuadro 10). Lo anterior puede deberse a que la partición de carbohidratos se orientó a alcanzar la fase reproductiva, ya sea mediante cambios en la densidad de umbelas o en el tamaño de semillas (Martiniello y Teixeira da Silva 2011); sin que necesariamente tengan la misma combinación o respuesta en todos los materiales. Aunque no se han realizado estudios tan detallados con producción de semilla de *Lotus corniculatus* (Nelson y Smith 1967), en alfalfa la concentración de carbohidratos en los órganos de almacenamiento (raíz y corona) presenta una asociación positiva con producción de semilla, número de semillas por tallo y proporción de cuajado (Dobrenz y Massengale 1966).

Finalmente, el origen genético y los años de multiplicación en el predio no marcaron un patrón de comportamiento, ya que las diferentes categorías se distribuyen en todo el rango de las variables (Anexo 10). Especialmente en el origen genético, aunque 5 productores manifestaron el origen de las VC repicadas en sus establecimientos como Estanzuela Ganador, solo una VC con muchos años de multiplicación propia tiene el mismo rendimiento destacado que el cultivar de origen (Anexo 10).

Cuadro 10. Rendimiento de semilla (kg/ha) y componentes, producción de forraje (kg MS/ha) e índice de cosecha (%) para la primer cosecha (enero 2007) ordenadas por ranking de cultivares testigo y las variedades criollas de *Lotus corniculatus* L. superiores e inferiores al testigo San Gabriel (señalados con fondo naranja y amarillo claro, respectivamente;  $P < 0,05$ ) por peso de 1000 semillas (g)

RANKING	Material	P1000 semillas (g)	Semilla Enero 2007 (kg/ha)	Número vainas/umbela	Número semillas/vainas	Umbelas/m <sup>2</sup> (densidad)	Forraje enero 2007 (kgMS/ha)	Índice de cosecha	
ALTAS por P1000	1	VC 85	1,33	367,5	4,27	19,31	344,4	8701	4,05
	2	VC 82	1,304	449,2	4,457	18,488	417,1	10653	4,04
	3	VC 174	1,28	329,9	4,171	20,06	308,2	13470	2,39
	4	VC 77	1,289	379,2	4,678	15,08	415,4	12754	2,88
TESTIGOS	T1	E. Ganador	1,24	506,3	4,607	18	496	12277	3,96
	T2	INIA Draco	1,18	317,5	4,579	19	308	11754	2,63
	T3	Rigel	1,14	345,5	4,317	19	376	11537	2,9
	T4	S. Gabriel	1,18	316,1	4,982	15	354	14048	2,2
BAJAS por P1000	1	VC107	1,089	346,2	4,311	20,01	358,5	11584	2,9
	2	VC148	1,107	250,1	3,951	20,4	279,3	10921	2,2
	3	VC87	1,121	214,4	4,774	15,99	264,6	13593	1,55
	4	VC114	1,12	253,8	4,639	19,11	257	13544	1,83

Al analizar la relación entre producción de semilla y forraje se observa que las VC pertenecientes al estrato alto de producción que se diferenciaron ( $P < 0,05$ ) de San Gabriel presentaron mayores IC que las VC de baja producción lo cual se denota en los rendimientos de semilla logrados (Cuadro 7). Se destaca Estanzuela Ganador dentro de los cultivares testigos con un alto rendimiento de semilla en C1 aunque no existen VC con mayores IC como los VC 212 (IC= 7,4) que combine una producción de semilla similar a Ganador con la mitad de forraje y un IC similar a las VC de alta producción de semilla. Estanzuela Ganador y las VC de alta producción presentaron plena floración temprana, aspecto que podría haber beneficiado su comportamiento (Figura 4). Los IC para San Gabriel, INIA Draco y Rigel por debajo del promedio del experimento y muy bajos en relación al IC determinado por Lorenzetti (1993) para la especie, nos demuestran mayor producción de biomasa respecto a la de semilla. Esto indica que en el acervo de materiales colectados es probable que exista la variabilidad suficiente y superior respecto a los cultivares comerciales hoy disponible en el mercado en potencial de producción de semilla, como para ser considerado en un plan de selección si las características identificadas son consistentes en diferentes ambientes. McGraw *et al.* (1986), estudiaron la asociación del

estrés impuesto por la competencia de la densidad de siembra. La disminución de la densidad de umbelas es probablemente el resultado de una reducción en el número de sitios disponibles para el desarrollo de la umbela. A mayores densidades de siembra, las plantas se hicieron más pequeñas, con menor cantidad de tallos, menos hojas axilares y por ende menos sitios para el desarrollo de las umbelas respecto de las plantas más grandes. Así, la tensión debido a la competencia parecía afectar la reproducción en mayor medida que al crecimiento vegetativo.

Una relación negativa ( $P < 0,05$ ) se observó entre el número de semillas por vaina y la densidad de vainas ( $r = -0,4$  Anexo 9). En comparación, McGraw *et al.* (1986) estudiando la asociación del estrés impuesto por la competencia poblacional, determinaron diferencias leves en las relaciones cuantitativas de densidad para todos los componentes, y además no observaron interacción entre localidad, cultivar y densidad de siembra para rendimiento de forraje, umbelas/planta, vainas/umbela, tamaño de semillas e IC. Dichos autores determinaron que un mínimo de 30 plantas/m<sup>2</sup> son requeridas para lograr el máximo de rendimiento de forraje ( $r = 0,99$ ), mientras que para lograr el óptimo de rendimiento de semilla se necesita una población mínima de 20 pl/m<sup>2</sup> ( $r = 0,74$ ), densidad que se superó en este experimento pues logró en promedio 65 pl/m<sup>2</sup>. La disminución de las semillas/vaina es probablemente el resultado de una reducción en la disponibilidad de nutrientes frente al incremento de la densidad de umbelas, ya que la tensión debido a la competencia parecía afectar el crecimiento de la reproducción en mayor medida que al crecimiento vegetativo (McGraw y Marten, 1986). El empleo de bajas densidades es especialmente importante para incrementar la tasa de multiplicación de nuevos cultivares donde la disponibilidad de semillas es un recurso limitado. Cabe resaltar que las densidades anteriormente citadas para EE.UU. son inferiores a las empleadas a nivel de predio en Uruguay, lo cual es importante y destacable a nivel experimental fundamentalmente.

### 3.4.2.2. Relación entre longitud de vaina y número de semillas

En el campo se observaron diferencias en el tamaño de las vainas entre diferentes VC, tanto por la longitud de las vainas como por la uniformidad, característica que podría estar vinculada al número de semillas por vaina. Al relacionar entre sí los parámetros estadísticos de las variables evaluados en las vainas (medias, máximos, mínimos y desvíos de longitud de vainas y número de semillas/vaina) se evidenciaron que dichas correlaciones no son altas y pocas superan el 50 % (Cuadro 11). Se observó una asociación entre la media del largo de vaina y el número de semillas/vaina ( $P < 0,05$ ); por ende el largo de vaina podría ser un parámetro indirecto de selección a emplearse en mejoramiento genético para el componente de número de semillas/vaina (Cuadro 11;  $r = 0,46$ ).

Cuadro 11. Correlaciones de parámetros estadísticos (mínimo, promedio, máximo y desvío estándar) entre longitud de vaina (mm) y número de semillas/vaina

Variable		Longitud de vaina (mm)				Nº de semilla			
		Mínima	Máxima	Promedio	D.estándar	Mínima	Máxima	Promedio	D.estándar
Longitud de vaina (mm)	Mínima	1,00							
	Máxima	0,13	1,00						
	Promedio	0,44	0,66	1,00					
	D.estándar	-0,28	0,66	0,32	1,00				
Nº de semilla	Mínima	0,07	0,03	0,00	-0,12	1,00			
	Máxima	-0,04	0,24	0,26	0,30	-0,11	1,00		
	Promedio	0,08	0,32	0,46	0,16	0,38	0,47	1,00	
	D.estándar	-0,09	0,26	0,27	0,44	-0,29	0,60	0,40	1,00

\*Señalados en rojo diferencias significativas ( $P < 0,05$ )

Cabe destacar que para evaluar la longitud de las vainas se empleó una herramienta de imágenes digitales, la cual resultó ser de gran utilidad, eficiencia y agilidad. No obstante, es importante realizar una buena calibración de la técnica y una adecuada preparación de las muestras para obtener información precisa. Esta técnica permitió comparar la media y desvío para longitud de vaina, evidenciando que no estaban asociadas

( $r=0,12$ ; Figura 16). Existe una amplia dispersión, observando VC con altos rendimientos de semilla que tienen largos de vaina promedios en torno a 26-27 mm, mientras que otras miden 22 mm. En algunas VC se observó una mayor uniformidad intrapoblacional expresada en valores bajos de desvíos (Figura 16). Se registraron longitudes máximas que oscilaron de 31,59 a 42,66 mientras que las mínimas rondaron entre 3,07 a 3,8 mm, reflejando problemas de polinización y/o abortos en etapas tempranas (Lorenzetti 1993, Formoso 2011), ya que estas vainas eran normales en apariencia, sin atrofiadas debidas a enfermedades, traumatismos mecánicos o daño por chinche. La VC 219 fue la que presentó la longitud de vaina mínima más baja (3,07 mm) y uniforme (bajo desvío), mientras que la VC 121 alcanzó 42,66 mm de largo máximo con alta variabilidad (desvío alto). La longitud máxima al igual que la uniformidad en el tamaño de vainas no se asoció con el rendimiento de semilla ( $r= -0,06$  y  $r= -0,11$  ns), ya que este parámetro fue determinado fundamentalmente por la densidad de umbelas. Sin embargo, algunas VC con alta producción de semilla, como VC 212, también presentaron vainas más largas y uniformes.

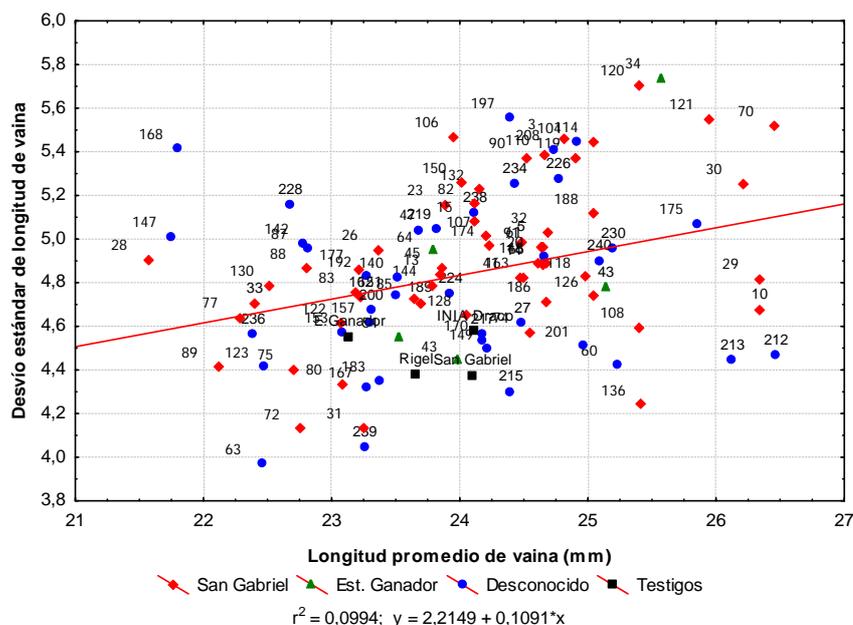


Figura 16. Relación entre longitud promedio de vaina (mm) y su desvío estándar para las variedades criollas de *Lotus corniculatus* L. y testigos comerciales.

Relacionando los desvíos de longitud de vaina y el número de semillas; VC 212 y 31 de alta producción de semilla fueron más uniformes (desvío estándar de 4,4 y 4,1 mm respectivamente), mientras que la VC 3, de baja producción de semilla es más variable. A su vez si bien ninguna de las VC más contrastantes (Cuadro 12 ranking de desvíos y longitud) se diferencia estadísticamente del testigo San Gabriel, si se observan diferencias entre ellas. Ejemplo de ello la constituyen las VC 72 y 212, logrando las segundas mayores rendimientos de semilla lo que estuvo determinado por presentar mayor número de semillas por vaina que la primera.

El número de semillas entre VC oscila de 12 a 24 semillas/vaina con una media de 18 semillas/vaina, cuyos pesos de 1000 semillas presentan un rango de 1,07 a 1,31 g, lo cual concuerda con lo citado por Frame *et al.* (1998), para la especie. Carámbula (1984), indica un rango 10 - 30 semillas/vaina con cierres de setiembre y octubre. En las segundas cosechas, producto de las floraciones de verano o bajo deficiencias hídricas, el número de semillas por vaina disminuye a valores de 10 a 12 (Formoso, 2011). Las VC de mayor producción de semilla alcanzaron también el mayor tamaño de semilla (Cuadro 9). Considerando la correlación existente entre longitud de vaina y número de semillas/vaina podemos decir que la VC 219 presentó la mayor amplitud intrapoblacional para longitud de vaina, siendo su longitud mínima promedio la más baja del total de materiales. En contraste, la VC 72, si bien presentó similar número de inflorescencias, alcanzó menor rendimiento de semilla, en parte por su menor número de semillas por vaina (Cuadro 11 y 12). Esta VC fue quien alcanzó menor longitud máxima de vaina, en contraste de la VC 121 quien presentó la mayor longitud máxima de vaina. Pieroni y Laverack (1992), reportaron largos máximos de vaina de 27 mm al caracterizar una población de variedades criollas con amplia variabilidad, colectando vainas cada 3- 4 días según estado de maduración (coloración), con condiciones de humedad

superior al 63 %. Las pérdidas por dehiscencia máximas encontradas en dicho experimento fueron 9,7 % en contraste a los resultados obtenidos por Anderson (1955), con similares condiciones ambientales (2%).

Cuadro 12. Rendimiento de semilla (kg/ha), umbelas/m<sup>2</sup>, longitudes de vainas (mínima, máxima y promedio en mm) de las variedades criollas más variables (mayor rango de longitudes de vainas) según años de multiplicación propia (antigüedad)

Variedad Criolla (VC)	Semilla Enero 2007 (kg/ha)	umbelas /m <sup>2</sup>	Número vainas/umbela	Número semillas/vainas	long. Vaina máxima	Long. Vaina mínima	Longitud vaina promedio (mm)	Desvío de longitud vaina	Antigüedad
219	439	392,5	5	21	35,55	3,07	23,7	5,041	3
72	391	391,1	4	16	31,59	3,487	22,8	4,13	1
San Gabriel	316,1	316,1	5	15	34,71	3,523	24,1	4,371	4
<b>E. Ganador</b>	<b>506,3</b>	<b>496,5</b>	<b>5</b>	<b>18</b>	<b>33,94</b>	<b>3,406</b>	<b>23,1</b>	<b>4,415</b>	<b>4</b>
INIA Draco	317,5	308	5	19	34,91	3,561	24,1	4,55	4
Rigel	345,5	376,2	4	19	33,71	3,372	23,7	4,576	4
<b>123</b>	<b>496,4</b>	<b>600</b>	<b>4</b>	<b>15</b>	<b>31,91</b>	<b>3,338</b>	<b>22,5</b>	<b>4,377</b>	<b>1</b>
<b>31</b>	<b>511,2</b>	<b>509</b>	<b>5</b>	<b>18</b>	<b>31,75</b>	<b>3,61</b>	<b>23,2</b>	<b>4,133</b>	<b>1</b>
<b>212</b>	<b>526,6</b>	<b>525,6</b>	<b>4</b>	<b>19</b>	<b>39,37</b>	<b>3,719</b>	<b>26,5</b>	<b>4,465</b>	<b>3</b>
<b>64</b>	<b>535,7</b>	<b>597,1</b>	<b>4</b>	<b>17</b>	<b>35,97</b>	<b>3,557</b>	<b>23,8</b>	<b>4,945</b>	<b>3</b>

En contraposición, se encuentra la VC 123 quien manifestó diferencias significativas en rendimiento de semilla respecto al testigo San Gabriel (Cuadro 7). Salvando las diferencias estadísticas, considerando los rendimientos la VC 219 (largo de vaina más corta, no se diferencia del testigo) sólo rindió 57 kg/ha menos que el extremo inferior de las superiores al testigo (VC 123 = 496,4 kg/ha semilla; rango de los materiales superiores a SG entre 496,4 y 535,7 kg/ha). Al comparar los rendimientos de las VC en la C1 se verifica una gran brecha entre genotipos (190,1 – 535,7 kg/ha; Cuadro 7). Los rendimientos alcanzados por las VC superiores representan 3 veces más que la media de producción obtenida a nivel nacional por los productores semilleros (120-150 kg/ha; García *et al.* 1991; Artola 2004). A nivel experimental, resultados similares fueron recabados por Rebollo y Duhalde (1987), quienes estimaron rendimientos potenciales máximos mediante diferentes manejos de defoliación en La Estanzuela (497- 467- 632

kg/ha para 1 corte en noviembre, en setiembre, y testigo sin corte respectivamente).

### **3.4.2.3. Relación entre producción de semilla y daño por *Bruchophagus platypterus* L. (avispa)**

La producción de semilla de lotus no solo está condicionada por su densidad de floración y eficiencia de cuajado (Rebollo y Duhalde 1987) sino que hay numerosos insectos que reducen la expresión de su potencial por daño directo a la semilla. En este estudio se caracterizaron algunos parámetros correspondientes a la clasificación de semilla (semilla sana, chuza, agujereada por avispa, etc.). Este último parámetro, así como la determinación de tamaño de vaina (área y ancho), no se lograron vincular con el número de semillas sanas por vaina (Cuadro 14). En C1 no se registró una asociación entre rendimiento de semilla y daño de avispa ni se pudo vincular con origen genético (Figura 20). La información recabada fue de gran relevancia, ya que de ella se desprende que los cultivares liberados por INIA están por debajo del promedio de las VC colectadas respecto a producción de semilla. No se observó asociación con origen genético para ninguna de las variables estudiadas al igual que con los años de multiplicación de las VC por los productores. No obstante, existen VC superiores a SG en lo que respecta a daño de avispa que no se diferencian estadísticamente de éste en rendimiento de semilla, y viceversa VC con una proporción de daño que no se diferencia estadísticamente del testigo (SG).

El rango de nivel de daño oscila entre 8,04-38,95 %, presentando San Gabriel 14,48 % de daño de avispa (promedio = 21%; Figura 20). Si bien estos resultados superan los observados en INIA La Estanzuela por Alzugaray (2003) en Uruguay, existen investigadores internacionales que citan daños superiores a 50 % (Neunzing 1957, citado por Seaney y Henson, 1970).



Las VC con mayores rendimientos se ubican con un rango de floración más amplio, no afectándose por el nivel de daño de insecto (Figura 17), incluyendo el testigo Estanzuela Ganador, con alta producción de semilla, floración intermedia y daño cercano al promedio lo que podría significar algún grado de escape a los picos poblacionales de *Bruchophagus* (Alzugaray 2003).

Al observar las correlaciones se confirma lo explícito en forma gráfica entre ambas variables, la falta de asociación entre número de semilla y daño de avispa (Cuadro 13).

Cuadro 13. Correlaciones entre parámetros estadísticos del número de semillas/vaina, rendimiento de semilla y daño de *Bruchophagus platypterus* L. en las variedades criollas y cultivares testigo de *Lotus corniculatus* para la primera cosecha (marzo 2007)

Variables	Nº Sem min/vaina	Nº Sem máx./vaina	Nº Sem prom/vaina	Nº Sem Dest/vaina	Rend. Semilla Ene 07	% Daño avispa
Nº Sem min /vaina	1					
Nº Sem máx./vaina	-0,11	1				
Nº Sem prom/vaina	0,38	0,47	1			
Nº Sem Dest/vaina	-0,29	0,6	0,4	1		
Rend.Semilla ene 07	0,18	-0,05	-0,02	-0,12	1	
% Daño avispa	-0,1	0,11	0,04	0,13	-0,11	1

\*Señalados en rojo diferencias significativas

### 3.4.3. Clasificación de las variedades criollas mediante el análisis de componentes principales de factores para rendimiento de semilla y componentes de rendimiento

El análisis de componentes principales de los componentes de rendimiento en C1 explica 60 % de la varianza total (Anexo 14). Al igual que las investigaciones realizadas por García-Díaz y Steiner (2000 a) en EE.UU., McGraw *et al.* (1986) y Formoso (2011) en Uruguay para diferentes medidas de manejo agronómico, se observó la asociación alta y positiva entre

inflorescencias/m<sup>2</sup> o vainas/m<sup>2</sup> y rendimiento de semilla (representada por la magnitud de los vectores en CP1 el cual representa el 34 % de la variación total) y en menor medida por tamaño de semilla (peso 1000 semillas; Anexo 13). El CP2 está determinado por el número de semillas por vaina y la longitud de éstas (18 % de la varianza total). A su vez se verifica la asociación negativa determinada por los días a plena floración con densidad de vainas y por ende también con el rendimiento de semilla, indicado por el ángulo que forman los vectores (Figura 18).

En su conjunto se evidencia una amplia dispersión (Figura 18). Dentro del grupo de VC de alta producción, VC 123, VC 64 y VC 212 lograron un 81 % de superioridad promedio en la densidad de inflorescencias que el cultivar San Gabriel (Cuadro 12). Lo anterior, sumado al número de semillas/vaina (19 vs 15 para VC 123 y 212 respectivamente) y las diferencias en IC (42,1 % mayor VC 212 respecto a la VC 123, Cuadro 9), fueron las variables que determinaron el posicionamiento observado en el análisis de componentes principales; además de la relación negativa entre rendimiento de semilla y fecha de floración que podría ser consecuencia del incremento en el estrés hídrico durante el periodo de floración (Figura 4). Los comentarios precedentes se fundamentan a partir de muestreos realizados por Formoso (2011), quien determinó el efecto del estrés hídrico en la producción de biomasa y semilla, donde el manejo de cortes impuesto posibilitó que las plantas solamente alcanzaran la etapa de vainas inmaduras frente a sequías severas. En consecuencia, las VC con menor producción de semilla se asociaron positivamente con fechas de floración más tardías, pues en general presentaron 4 días más a plena floración que las de mayor rendimiento de semilla).

Esas diferencias entre las VC son de gran relevancia y un insumo muy valioso para el mejoramiento genético, del cual éste se basará una vez verificada la estabilidad de las VC para cumplir con los objetivos perseguidos

por el Programa en pasturas. De esta forma, partiendo de una plataforma base se podrían levantar a mediano y largo plazo las limitantes en producción de semilla que presentan los cultivares disponibles en Uruguay, con el objetivo de mejorar y alcanzar nuevos cultivares que combinen buen rendimiento de semilla y persistencia.

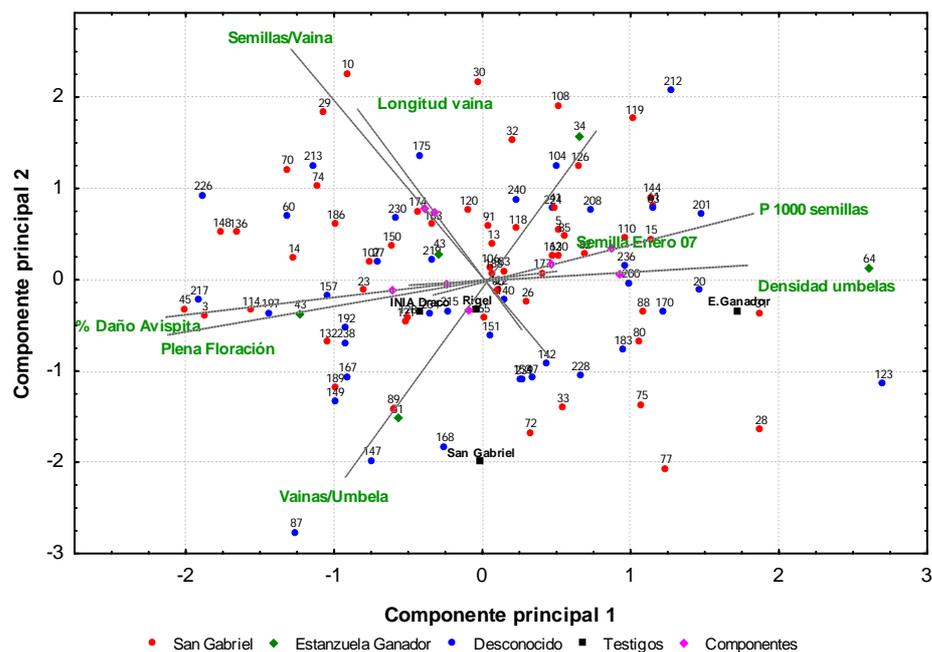


Figura 18. Componentes principales para componentes de rendimiento de semilla de *Lotus corniculatus* L., rendimiento de semilla (kg/ha) y % de daño de *Bruchophagus platypterus* L. (avispa) para la primer cosecha según origen genético

A excepción de Estanzuela Ganador, los cultivares testigos no se vincularon con las variables de rendimiento de semilla, densidad de umbelas y tamaño de semillas (Figura 18). Rigel e INIA Draco presentaron una posición intermedia respecto a la totalidad de las VC, mientras que San Gabriel se ubicó también como un material con performance en producción de semilla intermedia pero con menor tamaño de vainas (largo y número de semillas). Estanzuela Ganador es el único cultivar testigo que se destacó en la producción de semilla de C1, agrupándose con las VC de mayor densidad de umbelas, tamaño de semilla y mejor rendimiento de semilla; en contraste,

las VC de menor producción se ubican en el extremo contrario a la densidad de umbelas. Es importante resaltar que los nuevos materiales liberados por INIA (Rigel e INIA Draco) si bien presentan en su base genética a Estanduela Ganador presentaron una performance intermedia en producción de semilla en ésta instancia. Los estudios sobre producción de semilla en Uruguay se han concentrado en variables de manejo agronómico utilizando generalmente al cultivar San Gabriel. Formoso (2011) determinó diferencias a favor de INIA Draco vs San Gabriel respecto a la producción de semilla (10 %), la evolución de flores (25 %) y número de vainas maduras (18 %) aproximadamente en la primera cosecha para cierres de mediados de setiembre. Dichas determinaciones superan en un 90 % a los rendimientos de semilla obtenidos en este experimento para ambos cultivares, lo que permite confrontar la información generada en el presente estudio sobre diferencias varietales en relación a componentes de producción de semillas con la información generada a nivel local.

Finalmente cabe resaltar que el estudio de los componentes principales no permitió diferenciar grupos de VC asociados a origen genético o años de multiplicación propia en las características evaluadas, ya sea por productividad, componentes de rendimiento de semilla, daño de insecto. Es probable que los cultivares de origen tengan estrecha variabilidad (Beuselinck y Grant 1995).

#### **3.4.4. Identificación de germoplasma destacado en producción de semilla**

El aspecto más relevante del análisis de componentes principales fue detectar de forma gráfica y práctica si los lineamientos que presenta el Programa de Mejoramiento Genético de *Lotus corniculatus* en INIA hasta el momento coincide con la propia selección natural en lo que respecta a las VC más productivas en rendimiento de semilla.

Observando la comparación de los cultivares tradicionales (San Gabriel y Estanduela Ganador) con los cultivares originados en el programa de mejoramiento genético de INIA se aprecia el avance paulatino del mejoramiento genético para las variables asociadas con persistencia. Los nuevos materiales liberados por INIA y disponibles en el mercado de Uruguay (INIA Draco y Rigel), priorizaron la variable persistencia ya que fueron seleccionados por producción de forraje y persistencia a campo. El programa de mejoramiento contempló la producción de semilla durante la selección sin ser el carácter prioritario, lo que ha logrado sostener una producción de semilla intermedia incorporando persistencia.

La selección natural así como la introgresión de poblaciones locales determinaron el desarrollo de ecotipos localmente adaptados y variedades criollas de los productores con aumentos en la adaptación al igual que en la variabilidad intra-específica (Rebuffo y Abadie 2001, Olmos 2001, Rebuffo *et al.* 2005). Los cultivares locales San Gabriel y Estanduela Ganador se destacan de la mayoría de los cultivares americanos de *L. corniculatus* en Uruguay, rindiendo el doble de forraje (García *et al.* 1988, Castro 2008, 2009). La utilización de VC en el mejoramiento genético ha permitido desarrollar un nuevo cultivar de *L. corniculatus* INIA Draco, que produce 10% más forraje que San Gabriel, la variedad tradicional de uso público (Rebuffo y Altier 1997, Castro 2008, 2009).

Las diferencias observadas en este experimento en la alta producción de semilla inicial de Estanduela Ganador (Figura 12), deben verificarse en nuevos experimentos; la verificación de este ranking indicaría que se ha retrocedido en el potencial de producción de semilla con el proceso de mejoramiento genético por persistencia promedio del experimento. Como fue mencionado con anterioridad, la base genética de ambos materiales (Rigel e INIA Draco) está compuesta entre otros por Estanduela Ganador, un material

que se encuentra mejor posicionado que los anteriores en relación a las variables de producción de semilla (vainas/m<sup>2</sup>, P1000 semillas), siendo su principal limitante la persistencia.

El rendimiento de semilla máximo obtenido a nivel experimental para INIA Draco y San Gabriel (cultivar de uso público) para cierres de mediados de setiembre fue de 650 y 610 kg/ha respectivamente (Rebollo y Duhalde 1987), mientras que García *et al.* (1993) determinaron que San Gabriel, presenta un rendimiento medio que oscila entre 85 y 150 kg/ha a nivel de predios. Lo anterior contrasta con el rendimiento potencial de la especie igual a 1340 kg/ha citado por Pieroni y Laverack (1992). Si bien en este experimento los rendimientos logrados superan el promedio nacional y concuerdan con los obtenidos por Costa y Panizza (1997), presentan el 34,6 % del rendimiento estimado potencial para la especie en el hemisferio norte (Turkington y Franco 1980, Miller y Amos 1965, Seaney y Henson 1970). Comparando los rendimientos de semilla logrados en la segunda cosecha se afirma lo citado por la bibliografía, donde los potenciales de rendimiento para cierres tardíos son inferiores a los cierres tempranos, cuando el estrés hídrico y los riesgos de dehiscencia de vainas y desgrane son máximos como consecuencia del incremento de temperatura (Formoso 2011). A su vez, generalmente los cierres tardíos originan curvas de floración y semillazón más concentradas y por lo tanto más dependientes de la variabilidad climática de verano en Uruguay.

La ventaja de INIA Draco y Rigel en producción de semilla radica fundamentalmente de las diferencias logradas al 2º año otorgadas tanto por su sistema radicular profundo que le confiere tolerancia frente al estrés hídrico, así como por su mayor persistencia. Si bien Rigel, presenta características similares a SG, tanto en producción de forraje como de semilla en el primer año, se destaca por alcanzar buenos rendimientos en el segundo e incluso al 3º año (Castro 2006, 2007, 2008), a pesar del extremo

déficit hídrico que ocurrió durante las dos cosechas del segundo año. Rigel produjo 2 y 3 veces más semilla que Draco en la tercera y cuarta cosecha, respectivamente, dejando en evidencia la persistencia del cultivar en condiciones climáticas extremas.

Estanzuela Ganador logró mayor rendimiento de semilla en C1, sin embargo, las VC derivadas de Estanzuela Ganador, aunque pocas, no presentaron el mismo comportamiento excepto VC64, ya que no se destacaron en la producción de semilla inicial. En este contexto, es necesario repetir el ensayo de forma tal de demostrar si ésta tendencia es consistente.

La integración en un análisis de componentes principales las variables de producción (forraje y semilla) y los componentes de rendimiento de semilla (explicando el 63 % de la varianza total, Figura 19), confirmó en parte lo citado con anterioridad. El CP1 estuvo asociado claramente a la persistencia (34 % de la varianza total) mientras que CP2 (26 % de la varianza total) representó al rendimiento de semilla en C1 y a la densidad de umbelas. El CP3 se asoció al tamaño de la semilla (número de semillas por vaina y longitud de vaina) explicando el 18 % de la varianza total.

Se observó el incremento en persistencia del cultivar Rigel, destacándose en producción de semilla Estanzuela Ganador en lo que refiere a los cultivares testigos, mientras que claramente se determinaron VC asociadas a cada uno de los componentes.

A futuro, dada la plataforma en que se encuentra el Programa de Mejoramiento, valiéndose de las diferencias ya sea en rendimiento de semilla así como de persistencia que se observó en las VC se deberá seleccionar por ejemplo la VC 200 ya que es un material que combina

ambas variables para ser incluido en el Programa de Mejoramiento Genético en pasturas de INIA.

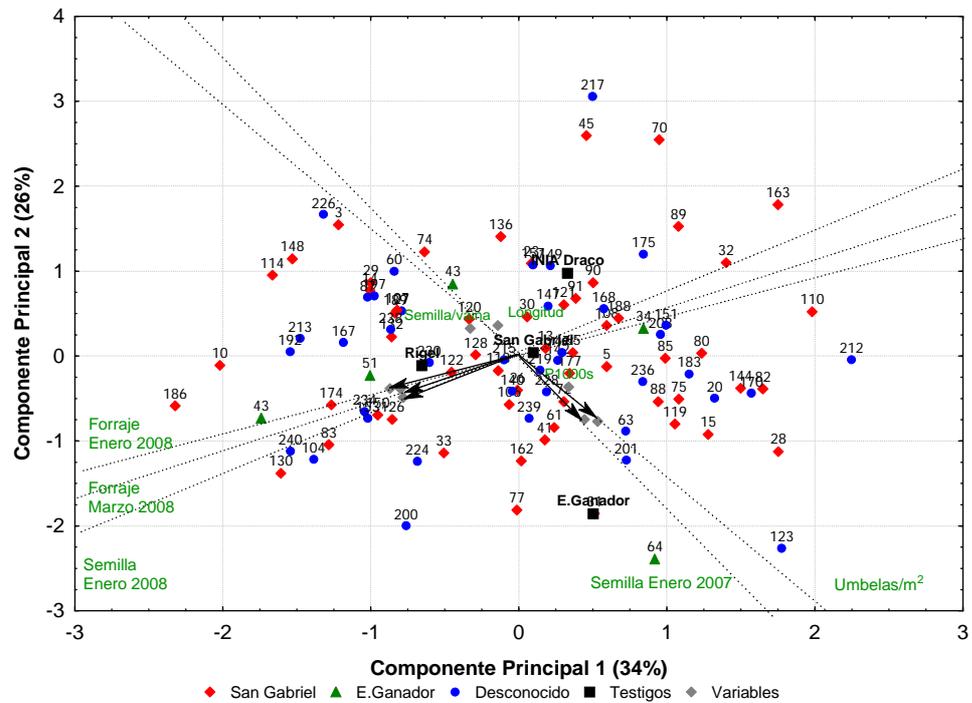


Figura 19. Representación de las variedades criollas identificadas por origen genético en función de los 2 primeros componentes principales. Identificadas con línea punteada se encuentran las variables significativas para cada componente

#### **4. CONCLUSIONES**

Los cultivares testigos presentaron diferente comportamiento, ya que Estanzuela Ganador se destacó en producción de semilla en C1, mientras que INIA Draco y particularmente Rigel se asociaron con variables productivas del segundo año vinculadas a persistencia. En contraste San Gabriel presentó valores intermedios para todas las variables evaluadas.

Si bien algunas VC presentaron mejores rendimientos de semilla que el testigo San Gabriel, éstas no se mantuvieron durante las diferentes cosechas, lo cual denota la variabilidad provocada por la persistencia sobre los parámetros de componentes de rendimiento de semilla. En este sentido, las VC destacadas en producción de semilla en C1 que se agruparon con Estanzuela Ganador (506 kg/ha) fueron VC 64, 212, 31 y 123; mientras que las más persistentes y superiores según el rendimiento de forraje y también semilla logrado en C3 fueron las VC 83, 240, 186 y 213.

La persistencia es un factor clave en la evaluación de la producción de semillas en ensayos que incluyen varios años.

La longitud promedio de vaina y el número de semillas promedio/vaina manifestaron una asociación positiva ( $r= 0,46$ ) lo que hace de este carácter un parámetro que puede disminuir los tiempos de selección.

La metodología de imágenes utilizada resultó ser una herramienta útil, eficiente y ágil para la evaluación del tamaño de vaina (longitud de vaina).

El daño de *Bruchophagus platypterus* L. (avispa) se constató como problema para la producción de semilla. Si bien no se observó asociación

entre producción de semilla y el daño de la avispa, las pérdidas por esta causa fueron en ciertos casos importantes.

El componente de rendimiento de semilla que explicó en mayor proporción el rendimiento fue la densidad de umbelas ( $\text{umbelas/m}^2$ ;  $r= 0,91$ ) y en segundo término el peso de semilla. El primer parámetro debe evaluarse con detalle en investigaciones futuras ya que puede indicar la orientación del mejoramiento genético.

El germoplasma en estudio presentó una amplia variabilidad genética lo que determinó que el estudio de los componentes principales no diferenciara grupos de VC por ninguna de las características evaluadas (productividad, componentes de rendimiento de semilla, daño de insecto; origen u años de multiplicación).

Cada una de las diferencias en producción observadas en este experimento para algunas VC en comparación con los cultivares testigo, ya sea en persistencia o rendimientos de semilla más cercanos al potencial, podrían emplearse como germoplasma a introducir en mejoramiento genético. A su vez, las diferencias entre cultivares testigo indican que el mejoramiento genético estuvo orientado hacia levantar las debilidades (persistencia) manteniendo las características deseables (producción de semilla).

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- Albrechtsen RS, Davis RL, Keim WF. 1966. Components of seed yield and associated characteristic in *Lotus corniculatus* L. *Crop Science*, 6: 355 – 358.
- Altier NA, Kinkel LL. 2005. Epidemiological studies on crown and root rot of birdsfoot trefoil in Uruguay. *Lotus Newsletter*, 35(1): 42 – 58.
- Altier NA, Ehlke NJ, Rebuffo M. 2000. Divergent selection for resistance to fusarium root rot in birdsfoot trefoil. *Crop Science*, 40: 670 – 675.
- Altier N. 1997. Enfermedades del *Lotus* en Uruguay. Serie Técnica 93. INIA La Estanzuela. 16 p.
- Altieri MA, Merrick LC. 1987. *In situ* conservation of crop genetic resources through maintenance of traditional farming systems. *Economical Botany*, 41(1): 86 – 96.
- Alzugaray R. 2004. Daños por insectos en la producción de semilla de leguminosas forrajeras; avispa, epinotia, apion, míridos. Hemisferio Sur, Montevideo, Uruguay. Vol. 1. 24 p.
- Alzugaray R. 2003. Insect pests damaging *Lotus corniculatus* L. flowers and seeds in Uruguay. *Lotus Newsletter*, 33: 11 – 18.
- Alzugaray R. 1991. Guía para el reconocimiento y manejo de insectos en pasturas. Boletín de Divulgación N° 10, INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay. 21 p.
- Anderson S. 1955. Development of Pods and seeds of Birdsfoot Trefoil, *Lotus corniculatus* L., as related to Maturity and to Seed Yields. *Agronomy Journal*, 47: 483 – 487.
- Artola A. 2004. *Lotus corniculatus* – Morfología, desarrollo y producción de semillas. *Ciencia.net*. <http://www.ciencia.net/>.
- Asuaga A. 1994. Use and production of *Lotus corniculatus* in Uruguay. En: Beuselinck PR, Roberts CA (Eds.). First International *Lotus* Symposium. St. Louis, Missouri, EE.UU. 22–24 March 1994. University Extension, University of Missouri, Columbia, Missouri, EE.UU. 134 – 141.
- Ayala W, Carámbula M. 2009. El valor agronómico del género *Lotus*. INIA, Montevideo, Uruguay. 424 p.

- Azambuja Centeno G. 1965. Comportamiento de variedades de trébol blanco (*Trifolium repens* L.) y de lotus (*Lotus corniculatus* L.) bajo distintas frecuencias de pastoreo en La Estanzuela, Uruguay. Tesis de Maestría. IICA. La Estanzuela, Colonia, Uruguay. 173 p.
- Bagavathiannan MV, Julier B, Barre P, Gulden RH, Van Acker R. 2010. Genetic diversity of feral alfalfa (*Medicago sativa* L.) populations occurring in Manitoba, Canada and comparison with alfalfa cultivars: an analysis using SSR markers and phenotypic traits. *Euphytica*, 173: 419 – 432.
- Barnes S, McGraw R. 1989. Birdsfoot Trefoil Pod and Seed Development Affected by Temperature. *Crop Science*, 29: 391 – 395.
- Barton LY. 1961. Seed preservation and longevity. Wiley Interscience, New York. 216 p.
- Batiste WC. 1967. Biology of the trefoil seed chalcid, *Bruchophagus kolobovae* Fedoseeva (Hymenoptera; Eurytomidae). *Hilgardia*, 38(12): 427 – 469.
- Berrutti A, Grauert C. 1994. Efecto de diferentes métodos de desecación sobre la producción de semillas de *Lotus corniculatus* L. cv Estanzuela Ganador y *Medicago sativa* L. cv Crioula. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 104 p.
- Betencourt E, Hazekamp T, Perri MC. 1992. Directory of Germplasm Collections. 7. Forages. Legumes, grasses, browse plants and others. International Board for Plant Genetic Resources. Roma, Italia. 356 p.
- Beuselinck P, Brummer E, Viands D, Asay K, Smith R, Steiner J, Brauer D. 2005. Genotype and Environment Affect Rhizome Growth of Birdsfoot Trefoil. *Crop Science*, 45(5): 1736 – 1740.
- Beuselinck PR, Grant WF. 1995. Birdsfoot trefoil. En: Barnes RF, Brown AH, Crwford DJ. (Eds.). Forages, An Introduction to Grassland Agriculture. Iowa State University Press, Ames, Iowa, EE.UU. 5<sup>th</sup> Ed. Vol 1. 237 – 348.
- Beuselinck P, McGraw R. 1988. Indeterminate Flowering and reproductive Success in Birdsfoot Trefoil. *Crop Science*, 28: 842 – 845.
- Beuselinck PR, Peters EJ, McGraw RL. 1984. Cultivar and management effects on stand persistence of birdsfoot trefoil. *Agronomy Journal*, 76: 287 – 322.

- Blumenthal MJ, McGraw RL. 1999. *Lotus* Adaptation, Use and Management. En: Beuselinck PR. (Ed.). *Trefoil: The Science and Technology of Lotus*. American Society of Agronomy and Crop Science Society of America, CSSA Special Publication No. 28, Madison, Wisconsin, EE.UU. 97 – 119.
- Brush SB. 1991. A farmer-based approach to conserving crop germplasm. *Economic Botany*, 45: 153 – 66.
- Carámbula M. 1984. Producción de semillas de plantas forrajeras. Editorial Hemisferio Sur, Montevideo, Uruguay. 518 p.
- Carámbula M. 1981. Producción y manejo de pasturas sembradas. Hemisferio Sur, Montevideo, Uruguay. 464 p.
- Castro M. 2009. *Lotus corniculatus*: cultivares evaluados en Uruguay durante 2008. En: Uruguay. Instituto Nacional de Semillas; Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. Resultados experimentales de la evaluación nacional de cultivares de especies forrajeras anuales, bianuales y perennes. Período 2008. INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay. 67 – 70.
- Castro M. 2008. *Lotus corniculatus*: cultivares evaluados en Uruguay durante 2007. En: Uruguay. Instituto Nacional de Semillas; Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. Resultados experimentales de la evaluación nacional de cultivares de especies forrajeras anuales, bianuales y perennes. Período 2007. INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay. 71 – 74.
- Castro M. 2007. Comportamiento de cultivares de *Lotus corniculatus* en Uruguay, evaluados en 2004, 2005 y 2006. En: Uruguay. Instituto Nacional de Semillas; Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. Resultados experimentales de la evaluación nacional de cultivares de especies forrajeras anuales, bianuales y perennes. Período 2006. INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay. 65 – 68.
- Castro M. 2006. Comportamiento de cultivares de *Lotus corniculatus* en Uruguay, evaluados 2005 y 2006. En: Uruguay. Instituto Nacional de Semillas; Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. Resultados experimentales de la evaluación nacional de cultivares de especies forrajeras anuales, bianuales y perennes. Período 2005. INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay. 38 - 41.

- Charmet G, Ravel C, Balfourier F. 1997. Phylogenetic analysis in the *Festuca-Lolium* complex using molecular markers and ITS rDNA. *Theoretical Applied Genetics*, 94: 1038 – 1046.
- Cohen JI, Williams JT, Plucknett DL, Shands H. 1990. *Ex Situ* Conservation of Plant Genetic Resources: Global Development and Environmental Concerns. *Science*, 253: 866 – 872.
- Contreras-Medina LM, Torres-Pacheco I, Guevara-González RG, Romero-Troncoso RJ, Terol-Villalobos IR, Osornio-Rios RA. 2009. Mathematical modeling tendencies in plant pathology. *African Journal of Biotechnology*, 8(25): 7399 – 7408.
- Coscia P, Surraco L. 1982. Comportamiento del *Lotus corniculatus* L. bajo tres manejos del pastoreo. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 146 p.
- Costa CE, Panizza A. 1997. Incidencia de tratamientos precosecha en los rendimientos de semilla de *Lotus corniculatus*. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 41 p.
- Davies RR, Bell SS. 1957. A comparison of Birdsfoot Trefoil-Bluegrass and Ladino Clover-Bluegrass for pasture. Response of lambs. *Agronomy Journal*, 49(8): 436 – 440.
- De Santis L, Loíacono MS, De Santis EM, Lagrange EB. 1980. Más observaciones sobre las avispitas que destruyen las semillas de la alfalfa y tréboles en la Republica Argentina y sus parasitoides. *Neotropica*, 26: 71 – 74.
- De Santis L, De Santis EM, Silva ML, de Merlo ZE. 1979. New observations on *Bruchophagus roddi* and confirmation of the occurrence of *Bruchophagus gibbus* in Argentina. *Dusenía*, 11(4): 183 – 188.
- De Santis L, 1977. Catálogo de los Himenópteros Argentinos de la Serie Parasítica, incluyendo Bethyloidea. Comisión de Investigación Científica, La Plata, Argentina. 204. CITADO en Avispita
- De Souza J, Vicentin IG, Formento AN. 2005. Asian soybean rust in Entre Ríos Province (Argentina): morphologic and pathometric characterization. Poster. Proceeding of the National Soybean Rust Symposium, November 14-16, 2005, Nashville, Tennessee, EE.UU. (<http://www.plantmanagementnetwork.org/infocenter/topic/soybeanrust/symposium/posters/8.pdf> )

- Dias PMB, Julier B, Sampoux JP, Barre P, Dall'Agnol M. 2008. Genetic diversity in red clover (*Trifolium pratense* L.) revealed by morphological and microsatellite (SSR) markers. *Euphytica*, 160(2):189 – 205.
- Díaz-Lago J., García J., Rebuffo M. 1996. Crecimiento de leguminosas en La Estanzuela. INIA *Serie Técnica* 71, 12p
- Dobrenz AK, Massengale MA. 1966. Change in Carbohydrates in Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Roots During the Period of Floral Initiation and Seed Development. *Crop Science*, 6(6): 604 – 607.
- English JT. 1999. Diseases of *Lotus*. En: Beuselinck PR. (Ed.). *Trefoil: The Science and Technology of Lotus*. American Society of Agronomy and Crop Science Society of America, CSSA Special Publication No. 28, Madison, Wisconsin, EE.UU. 121 – 131
- Fairey DT, Smith RR. 1999. Seed Production in birdsfoot trefoil. *Lotus Species*. In Beuselinck PR. (Ed.) *Trefoil: The Science and Technology of Lotus*. American Society of Agronomy and Crop Science Society of America, CSSA Special Publication N° 28, Madison, Wisconsin, EE.UU. 145 – 166.
- Fairey DT. 1994. Seed production in birdsfoot trefoil, *Lotus* spp.: A review of some limiting factors. En: Beuselinck PR, Roberts CA. (Eds.). *First International Lotus Symposium*, St. Louis, Missouri, EE.UU. 22–24 March 1994. University Extension, University of Missouri, Columbia, Missouri, EE.UU. 81 – 85.
- Falcinelli M. 1999. Temperate Forage Seed Production: Conventional and Potential Breeding Strategies. *Journal of New Seeds*, 1(1): 37 – 66.
- Fedoseeva LI. 1958. A survey of herbivorous species of *Bruchophagus* Ashm. (Hymenoptera, Chalcidoidea) in the USSR. *Zoologicheskii Zhurnal*, 37(9): 1345 – 1351.
- Formoso F. 2011. Producción de semilla de especies forrajeras. *Serie Técnica* N° 190. INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay. 139 p.
- Formoso F. 2006. Pasturas: aportes de la investigación que ayudan en la toma de decisiones. *Revista INIA* No. 6. INIA, Montevideo, Uruguay. 6 – 10.
- Formoso FA. 1996. Producción de semillas de especies forrajeras. En: Risso D, Berretta EJ, Morón A. (Eds.). *Producción y manejo de pasturas:*

- seminario técnico. 1995. Tacuarembó, Uruguay. INIA. Serie Técnica N° 80. 85 – 92.
- Formoso F. 1993. *Lotus corniculatus*. I. Performance forrajera y características agronómicas asociadas. INIA Serie Técnica N° 37. Hemisferio Sur SRL, Montevideo, Uruguay. 20 p.
- Frame J, Charlton JFL, Laidlaw AS. 1998. Temperate Forage Legumes. CAB International, Wallingford, Reino Unido. 327 p.
- Francis CA. 1990. Future dimensions of sustainable Agriculture. In Francis CA., Butler Flora C y Larry A.K. (eds) Sustainable Agricultura in Temperate zones. John Wiley and Sons. p 439-466.
- Frankel O, Soule M. 1981. Conservation and evolution. Cambridge University Press, Cambridge, Inglaterra.
- Gahan AB. 1914. Descriptions of new genera and species, with notes on parasitic Hymenoptera. Proceedings of the United States National Museum. 48.
- Gahan AB. 1913. New Hymenoptera from North America. Proceedings of the United States National Museum. 46.
- García-Díaz CA, Steiner JJ. 2000b. Birdsfoot Trefoil Seed Production: III. Seed Shatter and Optimal Harvest Time. Crop Science, 40: 457 – 462.
- García-Díaz CA, Steiner JJ. 2000a. Birdsfoot Trefoil Seed Production: II. Plant-Water Status on Reproductive Development and Seed Yield. Crop Science, 40: 449 – 456.
- García-Díaz CA, Steiner JJ. 1999. Birdsfoot Trefoil Seed Production: I. Crop-Water Requirements and Response to Irrigation. Crop Science, 39: 775 – 783.
- García J, Rebuffo M, Formoso F, Astor D. 1991. Producción de semillas forrajeras. Serie Técnica N° 2, INIA, Colonia, Uruguay. 40 p.
- García J, Rebuffo M, Astor D. 1988. Performance de variedades forrajeras en La Estanzuela. En: Variedades forrajeras II. Centro de Investigaciones Agrícolas "Alberto Boerger", La Estanzuela, Uruguay (CIAAB). Miscelánea 68, 1–15.
- Gardner L, Centeno G, De Lucia R, Albuquerque H. 1968. Comportamiento de once variedades de *Lotus corniculatus* en La Estanzuela. Centro

de Investigaciones Agrícolas “Dr. Alberto Boerger”, Colonia, Uruguay.  
Boletín Técnico N° 8. 23 p.

- Gilbert, JE, Lewis RV, Wilkinson MJ, Caligari PDS. 1999; Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections. *Theoretical and Applied Genetics*, 98(6-7): 1125 – 1131.
- Grant WF. 1965. A chromosome atlas and interspecific hybridization index for the genus *Lotus* (leguminosae). *Canadian Journal of Genetic Cytology*, 7: 457 – 471.
- Grant WF, Marten GC. 1985. Birdsfoot trefoil. En: Heath ME *et al.* (Eds.). *Forages: The science of grassland agriculture*. 4<sup>th</sup> Ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, EE.UU. 98 – 108
- Gebrehiwot L, Beuselinck PR, Roberts CA. 2002. Seasonal variations in condensed tannin concentration of three *Lotus* species. *Agronomy Journal*, 94: 1059 – 1065.
- Guteva Y, Angelova S, Peeva I, 1993. Conservation and use of wild forage legumes in Bulgaria. *Plant Genetic Resources Newsletter*, 96: 45 – 46.
- Greene SL. 1999. *Lotus* Genetic Resources: Maintaining Diversity through Conservation. En: Beuselinck PR. (Ed.). *Trefoil: The Science and Technology of Lotus*. American Society of Agronomy and Crop Science Society of America. CSSA Special Publication No. 28. Madison, Wisconsin, EE.UU. 61 – 80.
- Hansen HW. 1953. Developmental morphology of *Lotus corniculatus* L. *Iowa State College Journal of Science*, 27: 563 – 600.
- Hare MD. 1992. Inter- and cross-row cultivation, Atrazine application and band spraying effects on “Grasslands Maku” *Lotus* (*Lotus uliginosus* (Schk.)) seed production. *Journal of Applied Seed Production*, 10: 78 – 83.
- Hare MD. 1984. “Grasslands Maku” *Lotus* (*Lotus pedunculatus* (Cav.)) seed production: 2. Effect of row spacing and population density on seed yields. *Journal of Applied Seed Production*, 2: 65 – 68.
- Hare MD, Lucas RJ. 1984. “Grasslands Maku” *Lotus* (*Lotus pedunculatus* (Cav.)) seed production: 1. Development of Maku *Lotus* seed and determination of time of harvest for maximum seed yield. *Journal of Applied Seed Production*, 2: 58 – 64.

- Harlan JR. 1983. The scope for collection and improvement of forage plants. En: McIvor JG, Bray RA. (Eds.). Genetic resources of forage plants. CSIRO, Melbourne, Australia. 3 – 14.
- Harlan JR. 1975. Our vanishing genetic resources. *Science*, 188: 618 – 621.
- Harlan JR. 1971. Agricultural origins: Centers and noncenters. *Science*, 174: 468 – 474.
- Henry T. 1952. Leguminosas promisorias para las praderas uruguayas. *Archivo Fitotécnico del Uruguay*, 5: 157 – 160.
- INASE 2008. Importación semillas. [En línea]. 21 de setiembre 2010. [http://www.inia.org.uy/convenio\\_inase\\_inia/resultados](http://www.inia.org.uy/convenio_inase_inia/resultados)
- Jofee A. 1958. The effect of photoperiod and temperatura on the growth and flowering of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.). *South African Journal of Agricultural Science (Pretoria)*, 1(4): 435-450 pp
- Kölliker R, Hermann D, Boller B, Widmer F. 2003. Swiss Mattenklees landraces, a distinct and diverse genetic resource of red clover (*Trifolium pratense* L.). *Theoretical Applied Genetics*, 107: 306 – 315.
- Kölliker R, Boller B, Widmer F. 2001. Marker assisted polycross breeding to increase diversity and yield of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Euphytica*, 146: 55 – 65.
- Kolobova AN. 1950. The clover and lucerne races of the seed eater *Bruchophagus gibbus* Boh. (Hymenoptera, Eurytomidae). *Entomologicheskoe Obozrenie*, 31(1/2): 63 – 70.
- Lamari L. 2002. *Assess: Image analysis software for plant disease quantification*. APS Press, The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA. 119 p.
- Li Q, Beuselinck PR. 1996. Rhizomatous *Lotus corniculatus* L.: II. Morphology and anatomy. *Crop Science*, 36: 407 – 477.
- Li Q, Hill ML. 1989a. A study of flower development and seed yield components in birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.). *Journal of Applied Seed Production*, 7: 65 – 69.
- Li Q, Hill ML. 1989b. Seed development and dormancy characteristics in *Lotus corniculatus* L. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 32: 333 – 336

- Li Q, Hill ML. 1988. An examination of different shoot age groups and their contribution to the protracted flowering pattern in birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.). *Journal of Applied Seed Production*, 6: 54 – 62.
- Lorenzetti F. 1993. Achieving potential herbage seed yields in species of temperate regions. *Proceedings of the XVII International Grassland Congress*, Palmerston North, Nueva Zelanda. 1621 – 1628.
- MacDonald MA. 1946. Birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.). Its characteristics and potentialities as a forage legume. Cornell Agricultural Experimental Station. Memo 261. 182 p.
- Martiniello P, Teixeira da Silva JA. 2011. Physiological and Bioagronomical Aspects Involved in Growth and Yield Components of Cultivated Forage Species in Mediterranean Environments: A Review. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology*, 5 (Special Issue 2): 64 – 98.
- Mazzanti A, Montes L, Miñon D, Sarlengue H, Cheppi C. 1988 Utilización del *Lotus tenuis* en establecimientos ganaderos de la Pampa Deprimida: resultados de una encuesta. *Revista Argentina de Producción Animal*, 8(5): 357 – 376.
- McDaniel B, Boe A. 1991. Morphological differences in genitalia of *Bruchophagus* (Hymenoptera: Chalcidae) that infest alfalfa, red clover, and birdsfoot trefoil seeds (Hymenoptera: Eurytomidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 93: 125 – 135.
- McGraw RL, Beuselinck PR. 1987. Seeding rate effects on birdsfoot trefoil seed yields and plant population density. *Journal of Applied Seed Production*, 5: 41 – 44.
- McGraw RL, Beuselinck PR, Ingram KT. 1986. Plant population density effects on seed yield of birdsfoot trefoil. *Crop Science*, 78: 201 – 205.
- McGraw RL, Marten GC. 1986. Analysis of primary spring growth of four pasture legume species. *Agronomy Journal*, 78: 704
- McGraw RL, Beuselinck PR. 1983. Growth and seed yield characteristics of Birdsfoot trefoil. *Agronomy Journal*, 75: 443 – 446.
- MGAP (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca). 2001. Anuario Estadístico Agropecuario 2000. Dirección de Investigaciones Económicas Agropecuarias. Montevideo, Uruguay. 172 p.

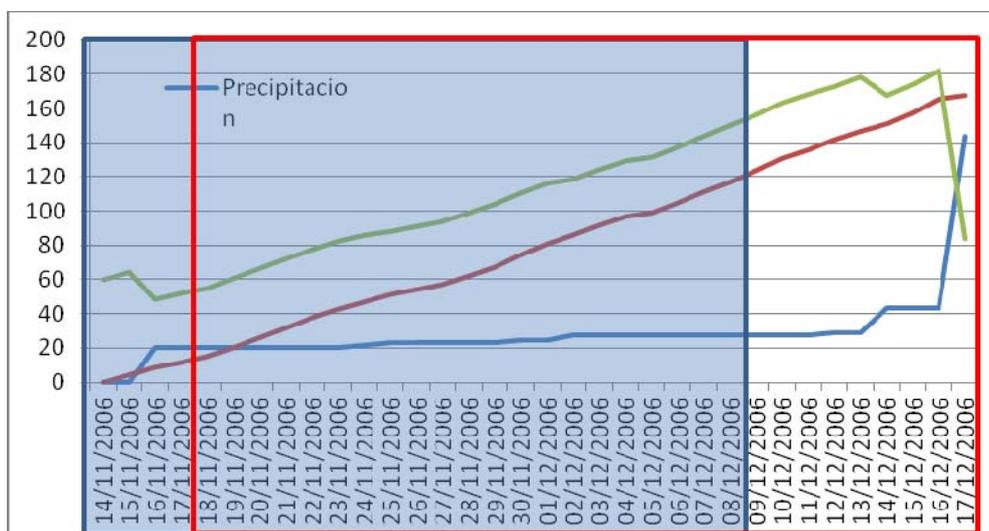
- Miller JD, Amos JM. 1965. Use of honeybees to pollinate trefoil in the greenhouse. *American Bee Journal*, 105: 50 – 51
- Morse RA. 1958. The polinitation of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.) in New York State. En: Arnold JW. (Ed.). *Proceedings 10th International Congress Entomology*, Montreal, Canada. June 1958. 951 – 953.
- Muttoni G. 2008. Evaluación bioquímica y fisiológica de poblaciones de *Lotus corniculatus* L. sensibles y tolerantes a sequía. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 81 p.
- Nelson CJ, Smith D. 1967. Growth of Birdsfoot and alfalfa. III Changes in Carbohydrates Reserves and Growth Analysis Under Field Conditions. *Crop Science*, 8(1): 25 – 28.
- Nichols PGH, Cocks PS, Francis CM. 2009. Evolution over 16 years in a bulk-hybrid population of subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.) at two contrasting sites in south-western Australia. *Euphytica*, 169: 31 – 48.
- Nikol'skaya MN. 1932. The clover seed chalcid and its parasites on lucerne in the USSR. *Zashchita Rasteniy*, Leningrado, Rusia, 1932(1): 107 – 111.
- Olmos F. 2001. Mejoramiento de pasturas con *Lotus* en la región noreste. Serie Técnica N° 124. INIA Tacuarembó, Uruguay. 48 p.
- Pagnotta M, Annicchiarico P, Farina A, Proietti S. 2011. Characterizing the molecular and morphophysiological diversity of Italian red clover. *Euphytica*, 179: 393 – 404.
- Pankiw P, Bonin SG, Lieverse JAC. 1977. Effects of row spacing and seeding rates on seed yield in red clover, alsike clover and birdsfoot trefoil. *Canadian Journal of Plant Science*, 57: 413 – 418.
- Pearson K. 1901. On Lines and Planes of Closest Fit to Systems of Points in Space. *Philosophical Magazine* 2(6): 559–572. <http://stat.smmu.edu.cn/history/pearson1901.pdf>.
- Peterson SS. 1991. Bionomics and management of the insect pest of birdsfoot trefoil seed production. Ph. D. Dissertaion, University of Wisconsin, Madison (Disc. Abst. AAC91). 22 – 190.

- Pieroni S. 1994 Factors affecting seed yield and quality in temperate forage legumes. Dissertation submitted in part of fulfillment for the Degree of M. Sc. En: Seed Technology
- Pieroni SJ, Laverack GK. 1992. Determination of harvest date in *Lotus corniculatus* by pod colour. *Journal of Applied Seed Production*. 12: 62 – 65.
- Plucknett DL, Horne ME. 1992. Conservation of genetic resources. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 42: 75 – 92.
- Priestley DA. 1986. Seed Ageing. Implications for seed storage and persistence in the soil. Ithaca. New York. Comstock Publishing Associates. 304 p.
- Rebollo J, Duhalde L. 1987. Evolución de la semillazón y características asociadas en *Lotus corniculatus*. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 59 p.
- Rebuffo M, Acuña H, Monza J, Ruz E, Acosta J, Condon F, Zarza R. 2007. LESIS-Leguminosas para Sistemas Sustentables. En: Avances de investigación en recursos genéticos en el Cono Sur II. PROCISUR, Montevideo, Uruguay. 195 – 203
- Rebuffo M, Bemhaja M, Risso D. 2006. Utilization of forage legumes in pastoral systems: state of art in Uruguay. *Lotus Newsletter*. 36: 22 – 33.
- Rebuffo M, Condon F, Cuitiño MJ. 2005. Participatory collection of forage species in Uruguay. En: O'Mara FP. (Ed.). XX International Grassland Congress: Offered Papers. Wageningen Academic Publishers. 61.
- Rebuffo M, Abadie N. 2001. Genetic resources for temperate areas: achievements and perspectives. Proceedings of the XIX International Grassland Congress. Sao Pedro, Sao Paulo, Brazil. 469 – 476.
- Rebuffo M, Altier N. 1997. Breeding for persistence in *Lotus corniculatus* L. Proceedings of The XVIII International Grassland Congress, Canada. ID 1881.
- Ríos A, Formoso F. 2005. Susceptibilidad y Control de Malezas en *Lotus (Lotus corniculatus)*. XVII Congreso Latinoamericano de Malezas, Varadero, Cuba. 273.
- Rumbaugh MD. 1991. Plant introductions: The foundation of North American forage legume cultivar development. En: Shands HL, Wiesner LE.

- (Eds.). Use of plant introductions in cultivar development, part 1. CSSA Special Publication. N° 17. CSSA, Madison, Wisconsin, EE.UU. 103 – 114.
- Sandha GS, Twamley BE, Christie BR. 1977. Analysis of quantitative variability for seed yield and related characters in *Lotus corniculatus* L. cv. Leo. *Euphytica*, 26(1): 113 – 122.
- Sareen S. 2004. Seed production potencial in Birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.). *Lotus Newsletter*, 34: 5 – 11.
- Seaney RR, Henson PR. 1970. Birdsfoot trefoil. *Advances in Agronomy*, 22: 1 – 30.
- Sleper DA, Phoehlmán JM. 2006. Breeding Cross-Pollinated Forage Crops. En: *Breeding field crops*. 5<sup>th</sup> edition. Brackwell Publishing. 335 – 362.
- Steiner J, Garcia de los Santos G. 2001. Adaptive Ecology of *Lotus corniculatus* L. Genotypes: I. Plant Morphology and RAPD Marker Characterizations. *Crop Science*, 41: 552 – 563.
- Steiner JJ, Greene SL. 1996. Proposed ecological descriptors and their utility for plant germplasm collections. *Crop Science*, 36: 439 – 451.
- Steiner JJ, Poklemba CJ. 1994. *Lotus corniculatus* classification by seed globulin polypeptides and relationships to accession pedigrees and geographic origin. *Crop Science*, 34: 255 – 260.
- Stephenson AG. 1984. The Regulation of Maternal Investment in an Indeterminate Flowering Plant (*Lotus corniculatus*). *Ecology*, 65(1): 113 – 121.
- Swanson T, Goeschl T. 1999 Optional genetic resources conservation: in situ and ex situ. En: Brush S. (Ed.). *Genes in the Field. On-Farm Conservation of Crop Genetic Diversity*. Lewis Publishers, Boca Ratón, Florida. 165 – 192.
- Tabora RS, Hill MJ. 1992. Effects of Paclobutrazol on “Grasslands Maku” *Lotus* (*Lotus uliginosus* (Schk.)). *Journal of Applied Seed Production*, 10: 52 – 57.
- Tome, AG, Johnson, IJ. 1945. Self and cross-fertility relationships in *Lotus corniculatus* and *Lotus tenuis*. *Journal of the American Society of Agronomy*. 37: 1011-1023

- Turkington R, Franko G. 1980. The Biology of Canadian Weeds. 41. *Lotus corniculatus* L. Canadian Journal of Plant Science, 60(3): 965 – 979.
- Walker F. 1834. Monographia *Chalciditum*. Entomological Magazine. 2.
- Whyte RO, Nilsson-Leissner G, Trumble HC. 1953. Legumes in agriculture. Agricultural Studies No. 21. FAO, Rome, Italia. 367 p.
- Wiersema JH, Kirkbride JHJr, Gunn CR. 1990. Legume (Fabaceae) Nomenclature USDA Germplasm System. Springfield, USDA. Technical Bulletin N° 1757. 572 p.
- Wiggans SC, Metcalfe DS, Thompson HE. 1956. The use of desiccants in harvesting birdsfoot trefoil for seed. Agronomy Journal, 48 (7): 281 – 284.
- Winch J, MacDonald H. 1961. Flower, pod and seed development relative to the timing of the seed harvest of Viking Birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*). Canadian Journal of Plant Science, 41: 523 – 532.
- Zeven A. 2000. Traditional maintenance breeding of landraces: 1. Data by crop. Euphytica, 116: 65 – 85.

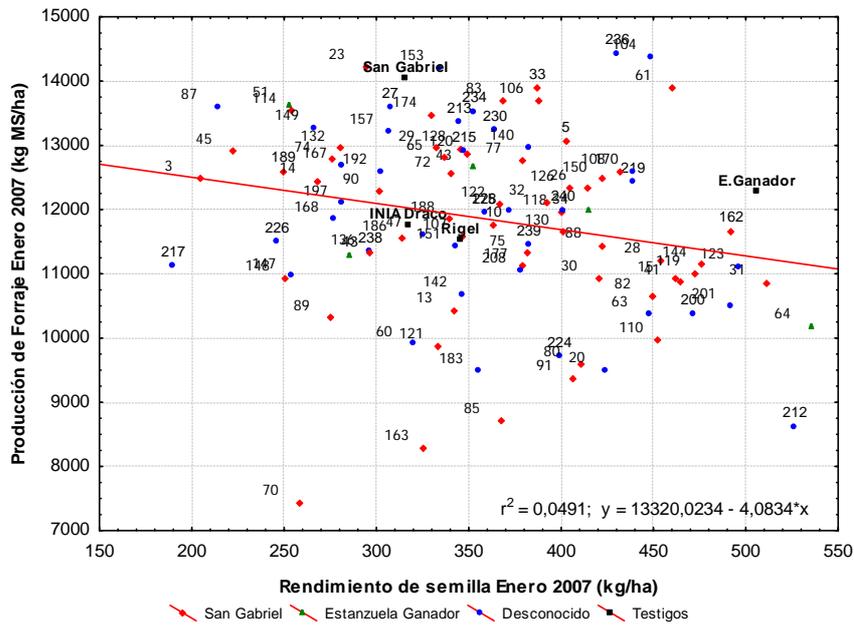
## 6. ANEXOS



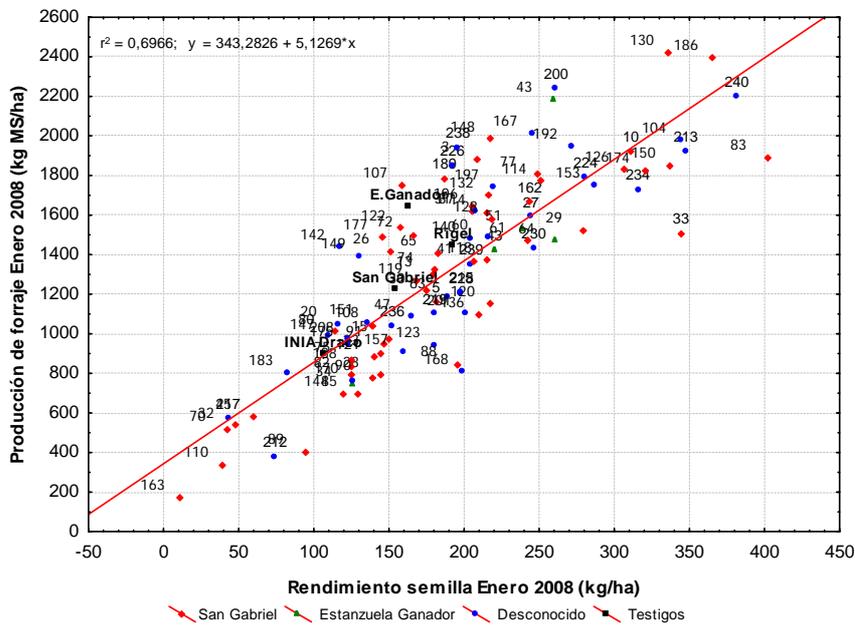
Anexo 1. Precipitaciones acumuladas (mm) desde la implantación hasta la cuarta cosecha (julio 2006 a marzo 2008) y la evapotranspiración potencias (ETp) de Pennan (mm) en La Estanzuela, Colonia, Uruguay.

Anexo 2. Correlaciones entre rendimiento de semilla (kg/ha) y producción de forraje (kg MS/ha) para las 4 cosechas (enero y marzo de 2007 y 2008) de variedades criollas de *Lotus corniculatus* L. y 4 cultivares testigos (Valores en negro no son significativos, rojo indican significancia al 5%, mientras que rojo intenso representa  $P < 0,001$ )

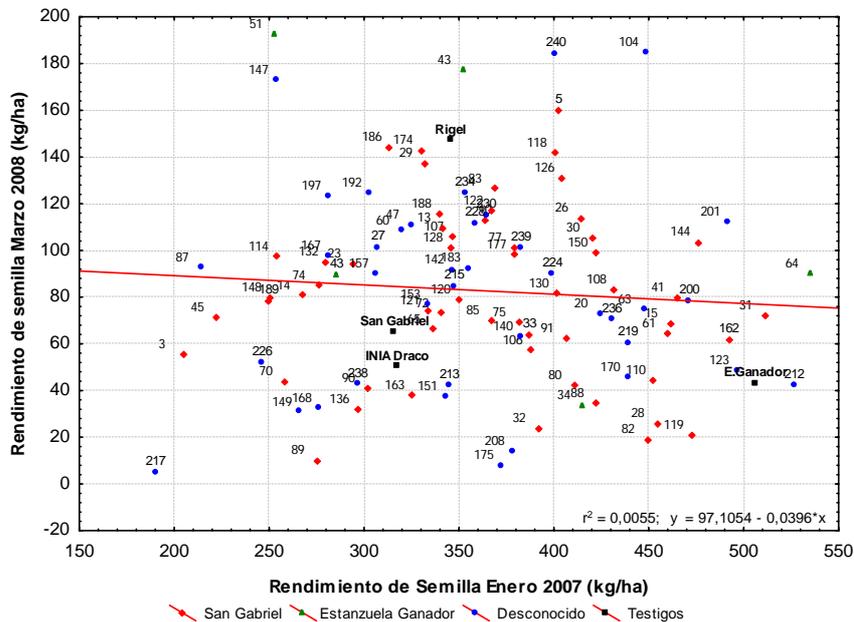
Correlations (Medias remi con factor 28novmod.sta)									
Casewise deletion of MD									
N=104									
Variable	Semilla enero 07	Forraje enero 07	Forraje marzo 07	Semilla marzo 07	Semilla enero 08	Forraje enero 08	Forraje marzo 08	Semilla marzo 08	
Semilla enero 07	1,00	-0,22	-0,35	0,02	0,05	-0,10	-0,12	-0,07	
Forraje enero 07	-0,22	1,00	0,54	0,18	0,47	0,42	0,39	0,28	
Forraje marzo 07	-0,35	0,54	1,00	-0,05	0,23	0,39	0,32	0,10	
Semilla marzo 07	0,02	0,18	-0,05	1,00	0,17	0,03	0,05	0,01	
Semilla enero 08	0,05	0,47	0,23	0,17	1,00	0,83	0,69	0,52	
Forraje enero 08	-0,10	0,42	0,39	0,03	0,83	1,00	0,78	0,51	
Forraje marzo 08	-0,12	0,39	0,32	0,05	0,69	0,78	1,00	0,69	
Semilla marzo 08	-0,07	0,28	0,10	0,01	0,52	0,51	0,69	1,00	



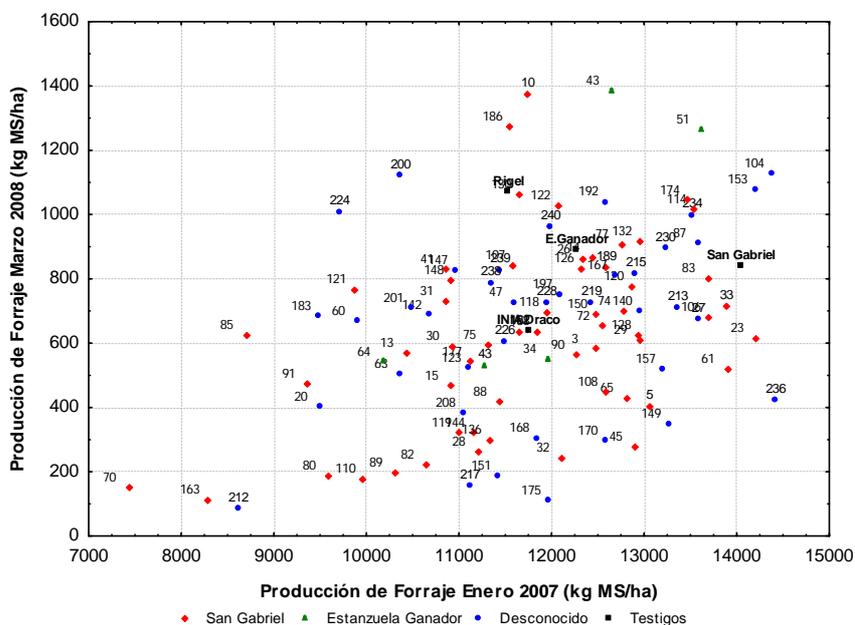
Anexo 3. Relación entre rendimiento de semilla (kg/ha) y producción de forraje (kg MS/ha) para la primera cosecha (Enero 2007) de variedades criollas de *Lotus corniculatus* L. agrupados por origen genético y cultivares testigos



Anexo 4. Relación entre rendimiento de semilla (kg/ha) y producción de forraje (kg MS/ha) en la tercera cosecha (enero 2008) de 100 variedades criollas de *Lotus corniculatus* L. agrupadas por origen genético y 4 cultivares testigos



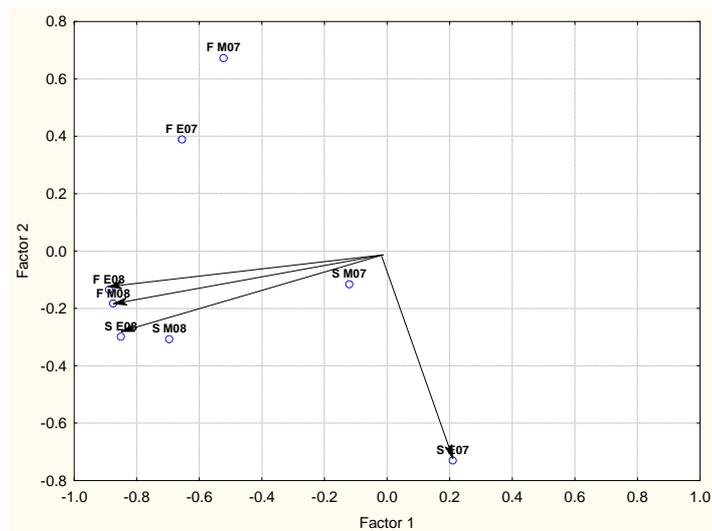
Anexo 5. Relación entre rendimiento de semilla (k/ha) de la primera (enero 2007) y cuarta cosecha (marzo 2008) para las 100 variedades criollas de *Lotus corniculatus* L. agrupadas por origen genético y 4 cultivares testigos



Anexo 6. Relación entre producción de forraje (kg MS/ha) de la primera (enero 2007) y cuarta cosecha (marzo 2008) para las 100 variedades criollas de *Lotus corniculatus* L. agrupadas por origen genético y 4 cultivares testigos

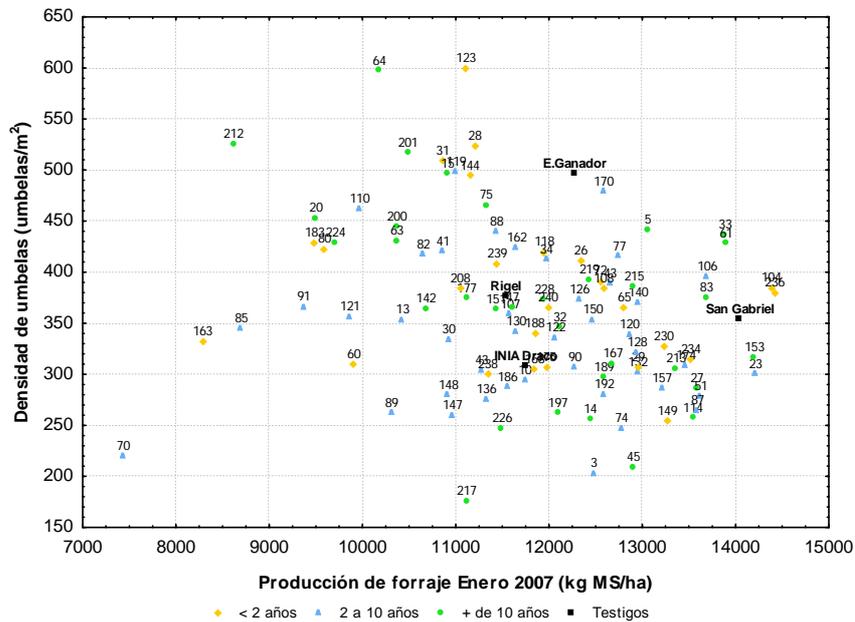
Anexo 7. Componentes principales: Explicación de la varianza para las variables producción de forraje y rendimiento de semilla para las 4 cosechas en el análisis de componentes principales (valores en rojo indican variables significativas,  $P < 0,05$ )

Variables	Componentes Principales		
	Factores ( $P > 0,70$ )		
	Factor 1	Factor 2	Factor 3
Semilla Enero 2007	0,210106	<b>-0,730309</b>	0,106729
Forraje Enero 2007	-0,65559	0,388828	0,308181
Semilla Marzo 2007	-0,120855	-0,115233	<b>0,933417</b>
Forraje Marzo 2007	-0,522447	0,673296	-0,017183
Semilla Enero 2008	<b>-0,850382</b>	-0,297479	0,100347
Forraje Enero 2008	<b>-0,888333</b>	-0,134375	-0,097232
Semilla Marzo 2008	-0,696046	-0,307401	-0,216345
Forraje Marzo 2008	<b>-0,875011</b>	-0,182721	-0,15065
Explicación Varianza	3,52391	1,385577	1,066954
Prp. Total	0,440489	0,173197	0,133369

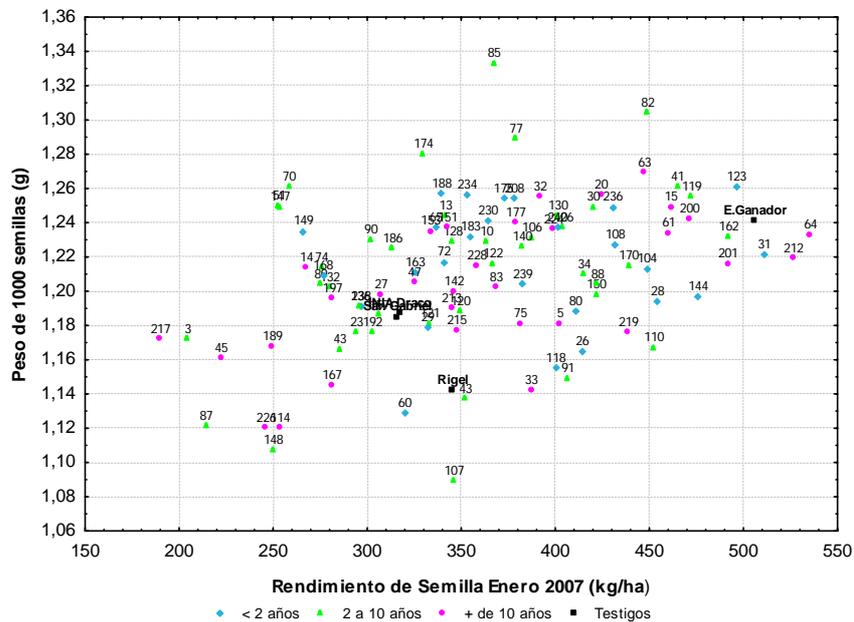


Anexo 8. Dispersión gráfica de las 8 variables de rendimiento de semilla y forraje en función de los 2 primeros componentes principales (Factor 1 y 2; flechas indican vectores significativos,  $P < 0,05$ )

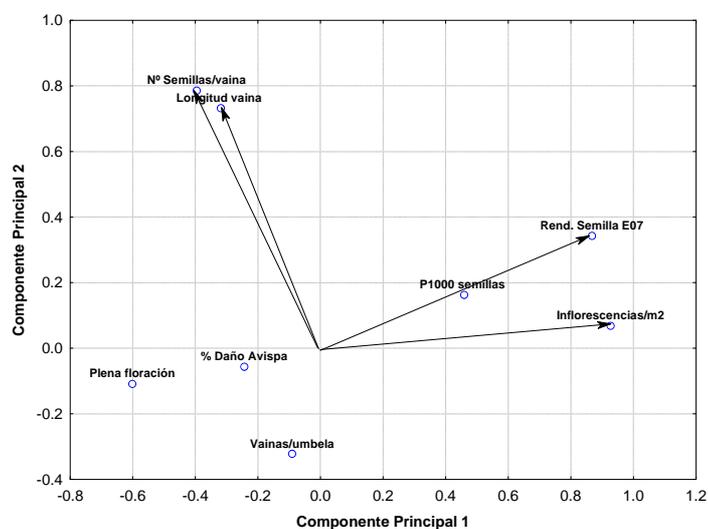




Anexo 11. Relación entre Producción de biomasa (kg MS/ha) y densidad de inflorescencias ( $n^{\circ}$  umbelas / $m^2$ ) para la primera cosecha (enero 2007) de variedades criollas de *Lotus corniculatus* L. agrupadas según años de multiplicación y 4 cultivares testigos



Anexo 12. Relación entre rendimiento de semilla (kg/ha) y peso de 1000 semillas (g) para la primera cosecha (enero 2007) de variedades criollas de *Lotus corniculatus* L. agrupadas según origen genético y 4 cultivares testigos



Anexo 13. Dispersión gráfica de las 8 variables de componentes de rendimiento de semilla, floración y daño de Bruchophagus en función de los 2 primeros componentes principales (Factor 1 y 2; flechas indican vectores significativos,  $P < 0,05$ )

Anexo 14. Componentes principales: Explicación de la varianza para los componentes de rendimiento de semilla en la primer cosecha,  $P < 0,05$ )

Eigenvalues (CP de comp componentes 20 dic.sta Extraction: Principal components				
Value	Eigenvalue	% Total variance	Cumulative Eigenvalue	Cumulative %
1	2,722665	34,03332	2,722665	34,03332
2	2,062071	25,77589	4,784737	59,80921
3	1,401309	17,51636	6,186046	77,32557