

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *LOTUS* MEDIANTE MARCADORES
MOLECULARES**

por

**Juan CIBILS MONTES
Juan Manuel LORENZO DELGADO**

**TESIS presentada como uno de
los requisitos para obtener el
título de Ingeniero Agrónomo.**

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2018**

Tesis aprobada por:

Director:

Dr. Santiago Signorelli

Dr. Jorge Monza

Fecha: 1º. de marzo de 2018

Autores:

Juan Cibils

Juan Manuel Lorenzo

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a los profesores Jorge Monza y Santiago Signorelli encargados de este trabajo por la ayuda y paciencia brindada en todo el proceso.

A todo el equipo de trabajo del Laboratorio de Bioquímica.

Al Ing. Agr. Ariel Asuaga por la problemática planteada y por la disponibilidad de recibir nuestras consultas en todo el proceso.

Al Ing. Agr. Daniel Bayce, Director de INASE por abrirnos las puertas del instituto y ponernos en comunicación con los encargados de todas las áreas.

A Belén, Faustina y a nuestras familias por acompañarnos y ayudarnos en todo lo que pudieron en el correr del trabajo.

Y por último a la Facultad de Agronomía por ser una institución en donde pudimos desarrollar nuestra carrera acompañados de tantos amigos y enseñanzas profesionales que nos llevaremos para siempre.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VI
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	2
2.1 <u>IMPORTANCIA DEL GÉNERO LOTUS</u>	2
2.2 <u>CARACTERÍSTICAS AGRONÓMICAS</u>	3
2.3 <u>IDENTIFICACIÓN DE ESPECIE DE LOTUS</u>	4
2.3.1 <u>Caracterización morfológica de la semilla</u>	4
2.3.2 <u>Identificación por caracteres morfológicos</u>	4
2.3.2.1 <u>Lotus corniculatus</u>	5
2.3.2.2 <u>Lotus uliginosus</u>	5
2.3.2.3 <u>Lotus tenuis</u>	6
2.3.3 <u>Identificación a través del tamaño del genoma por</u> <u>Citometría de Flujo (CF)</u>	6
2.3.4 <u>Identificación con marcadores moleculares</u>	7
2.4 <u>CRITERIO PARA EL MUESTREO DE SEMILLAS</u>	9
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	11
3.1 <u>MATERIAL VEGETAL</u>	11
3.2 <u>CULTIVO DE PLANTAS</u>	11
3.2.1 <u>Medio para crecimiento de plantas</u>	11
3.2.2 <u>Esterilización de semillas y germinación de semillas</u>	11
3.3 <u>EXTRACCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE ADN</u>	11
3.3.1 <u>Cebadores</u>	12
3.3.2 <u>Reacción de amplificación</u>	13
3.4 <u>RESOLUCIÓN EN GELES DE LOS FRAGMENTOS</u> <u>AMPLIFICADOS</u>	13
3.4.1 <u>Electroferesis en gel de agarosa</u>	13
3.4.2 <u>Electroferesis en gel de poliacridamida</u>	14

3.5 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	15
4. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	16
4.1 SELECCIÓN DE CEBADORES PARA DIFERENCIAR ESPECIES.....	16
5. <u>CONCLUSIONES</u>	20
6. <u>RESUMEN</u>	21
7. <u>SUMMARY</u>	22
8. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	23

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Cantidad de semillas de <i>Lotus</i> comercializadas en Uruguay	3
2. Resumen de las características morfológicas de especies de <i>Lotus</i>	5
3. Cebadores	12
4. Etapas de la amplificación por PCR.....	13
5. Componentes de gel de poliacrilamida.....	14
Figura No.	
1. Citometría de flujo de híbridos interespecíficos de <i>Lotus</i> respecto a sus parentales	7
2. Ciclo de amplificación de ADN mediante PCR.....	8
3. Perfiles de productos de amplificación resueltos en gel de agarosa.....	16
4. Perfiles de productos de amplificación resueltos en gel de poliacrilamida....	18

1. INTRODUCCIÓN

El presente trabajo se realiza tomando en cuenta la problemática planteada por el Ingeniero Agrónomo Asuaga¹, acerca de la dificultad que supone diferenciar visualmente las semillas de *Lotus corniculatus*, *L. uliginosus* Schkuhr (sinónimo *L. pedunculatus* Cav.) y *L. tenuis* Waldst et Kid. (sinónimo *L. glaber* Willd.), que son similares. Una vez instalado el cultivo las diferencias morfológicas son observables a partir de los tres meses.

Actualmente se cuenta con formas rápidas y precisas para determinar a qué especie o cultivo corresponde una planta de pocos días, y el costo se hace cada vez más accesible. Una de esas técnicas es la citometría de flujo, basada en la utilización de luz láser, que permite estimar la cantidad de ADN y fue usada para diferenciar híbridos interespecíficos de *L. uliginosus* x *L. corniculatus* (Castillo, 2012b). Otra forma es mediante el uso de marcadores moleculares, como los microsatélites, que son secuencias abundantes repetidas en el genoma, locus específicas y polimórficas codominantes que dan información precisa (Allem et al., 2011).

En la comercialización de semillas hay que asegurar que la especie y variedad que se vende corresponda con la que se indica en la etiqueta, dado que esto implica una determinada pureza genética. Por otra parte, es posible registrar mezclas de especies, y para comprobarlo se debe poder cuantificar sus proporciones. En síntesis, los beneficios son asegurar la pureza varietal o las proporciones de una mezcla registrada.

En este sentido es que se propuso como objetivo seleccionar marcadores moleculares para poder diferenciar rápidamente las tres especies en tiempo entre 3 y 5 días. Para esto se usaron marcadores moleculares específicos de *Lotus* (Castillo, 2012b) y el ADN se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction).

¹Arsuaga, A. 2015. Com. personal.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 IMPORTANCIA DEL GÉNERO *LOTUS*

De acuerdo a datos de MGAP. DIEA, citados por Boschi et al. (2016), en Uruguay el 17 % del área agropecuaria representa pasturas mejoradas. Entre ellas, 3 % corresponde a verdes anuales, el 5 % a campos con su tapiz natural mejorado y el 9 % a praderas plurianuales o permanentes.

Según datos del Censo general agropecuario de 2011, en Uruguay se siembran alrededor de 500.000 ha con diferentes especies del género *Lotus*, que se incorporaron para su uso en sistemas ganaderos, agrícola-ganaderos y lecheros (Castillo, 2012b). Leguminosas de este género se encuentran difundidas en el Uruguay y en la región, lo que indica la buena adaptación de algunas de sus especies a las condiciones climáticas y edáficas.

Según Castillo (2012b) hace unos años se creía que el género *Lotus* era conveniente solo para suelos pobres y ácidos, y no se usaba en sistemas de producción intensiva de forraje con altos insumos, donde el género *Trifolium* era el más apropiado. Sin embargo, la necesidad de aplicar sistemas sostenibles de producción de forraje que implicaban menores cantidades de insumos, en especial de fertilizantes, hizo que el género *Lotus* fuera una alternativa forrajera de valor por sus atributos agronómicos y nutricionales.

La importancia agronómica de *L. corniculatus* es reconocida, y la introducción accidental y programada de otras especies del género (*L. angustissimus*, *L.*, *L. subbiflorus* Lag, *L. tenuis* y *L. uliginosus*) permitió que estas especies compongan un germoplasma con posibilidades de adaptación y éxito en ambientes de la región donde se dan estreses edáficos, que para los géneros *Trifolium* y *Medicago* pueden ser limitantes (Bullard y Crawford, 1995).

Así, el género *Lotus* puede contribuir al desarrollo de la ganadería en la región porque, por un lado, aumenta la disponibilidad del forraje estacional del campo natural de 7 a 18 kg de materia seca (MS) por ha⁻¹x día⁻¹ en invierno y de 15 a 31 kg de MS por ha⁻¹x día⁻¹ en primavera. Por otro lado, eleva el contenido de proteína cruda de 9 a 18%, y mejora la sostenibilidad de sistemas de producción animal económicamente competitivos (Bullard y Crawford, 1995). Además, las especies del género *Lotus* tienen como ventaja la cualidad de tener cantidades suficientes de taninos condensados que evitan el meteorismo.

En nuestro país, la cantidad de semillas de las tres especies de género comercializadas anualmente en el año 2016, según los datos brindados por el

Instituto Nacional de Semillas (INASE, 2017), se presentan en el Cuadro No. 1. La última actualización de estos datos fue el 24 de julio de 2017.

Cuadro No. 1. Cantidad de semillas de *Lotus* comercializadas en Uruguay en 2016.

Espece	Semilla comercializada (kg)
<i>L. corniculatus</i>	1.107.615
<i>L. tenuis</i>	141.204
<i>L. uliginosus</i>	19.593

2.2 CARACTERÍSTICAS AGRONÓMICAS DE *L. corniculatus*, *L. tenuis* y *L. uliginosus*

L. corniculatus, originario de zonas mediterráneas de Europa y África fue introducido al Uruguay en los años 60. Esta especie, perenne, alógama de ciclo estival, es la más distribuida entre los *Lotus* y hay poblaciones naturalizadas en diferentes regiones como Norteamérica y Sudamérica (García de los Santos et al., citados por Castillo, 2012b). Se usa en regiones con veranos secos y marcada estacionalidad, como en Nueva Zelanda (Barry et al., 2003) y en Uruguay, donde demostró sus ventajas (Ayala y Carámbula, 2009).

L. uliginosus es otra especie estival usada en el mejoramiento de praderas. Es perenne, alógama, con crecimiento vegetativo variable, de porte más o menos erecto y desarrolla rizomas que funcionan como órganos de reserva y propagación. Los rizomas hacen que la dispersión sea menos dependiente de la semilla para la resiembra (Wen et al., 2002) y contribuyen con la persistencia y el aumento de la producción de forraje al incrementar el número de plantas muertas a causa de la sequía, enfermedades de raíz y corona (Li y Beuselinck, 1996).

L. tenuis es una especie perenne de ciclo primavero-estivo-otoñal, de origen mediterráneo. El sistema radicular pivotante, es más superficial que *L. corniculatus*, lo que la hace menos resistente a la sequía. Presenta crecimiento

a partir de la corona y buen potencial de producción de semillas pero alto porcentaje de semillas duras en sus lotes. Soporta altas temperaturas estivales y presenta menos enfermedades que *L. corniculatus* (Ayala y Carámbula, 2009).

2.3 IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *LOTUS*

2.3.1 Caracterización morfológica de la semilla

Varios autores han tratado de establecer diferencias morfológicas y anatómicas de las semillas y plántulas, a fin de utilizar dichos caracteres en la diferenciación de las especies en mezclas de semillas. Arambarri y Colares (1993) determinaron el tamaño y el peso de las semillas de *L. corniculatus* y *L. tenuis* y concluyeron que *L. corniculatus* presenta valores promedio de tamaño y peso de las semillas mayores, la amplia variación existente en los valores extremos no permite distinguir las dos especies en una mezcla de semillas. Las características relativas a la forma de las semillas y a su anatomía tampoco permitieron distinguirlas.

De acuerdo a Murcia et al. (2015), la diferenciación de la semilla mediante la observación de la morfología de la región hilar de las semillas no logró cumplir el objetivo.

Como conclusión de este trabajo se obtuvo que los caracteres útiles para diferenciar y establecer proporciones de las especies a partir de muestras de semillas fueron: el recuento cromosómico y la pubescencia en el epicótilo y del folíolo central.

En ese trabajo se estaban estudiando dos especies con distinto número cromosómico, por lo tanto es válido. En esta tesis se propone estudiar tres especies de las cuales dos tienen igual número de cromosomas, por lo tanto esta técnica queda descartada.

Las técnicas de la pubescencia en el epicotilo y del foliolo central también quedan descartadas por no ser exactas.

2.3.2 Identificación por caracteres morfológicos

Al contrario de lo que sucede con otras leguminosas, en el género *Lotus* la primera hoja que emerge entre los cotiledones es trifoliada, lo que permite diferenciarla de otras leguminosas como tréboles y alfalfas, en las cuales la primera hoja que emerge de los cotiledones es unifoliada.

En el estado de plántula las diferencias entre las especies en estudio son mínimas o nulas, por lo que es mejor realizar la distinción en una etapa más avanzada del desarrollo de la planta.

En el Cuadro No. 2 se resumen algunas características por las cuales se pueden diferenciar las distintas especies.

Cuadro No. 2. Resumen de características morfológicas de especies de *Lotus*.

Característica	<i>L. corniculatus</i>	<i>L. uliginosus</i>	<i>L. tenuis</i>
Hipocótilo	Verde	Verde	Rosado
Epicótilo	Verde y glabro	Verde y glabro	Verde y glabro
Habito de crecimiento	Aisladas y erectas	Postradas en vegetativo y semierectos en floración Estolones y rizomas	Semipostradas a semierectas
Folíolos	Obovado-lanceolados	Anchos obovados	Lineal-lanceolados
Color	Verde claro	Verde intenso Tallos con tonalidades rojizas	Verde azulado

Fuente: Ayala y Carámbula (2009).

2.3.2.1 *Lotus corniculatus*

Esta especie está caracterizada por su color verde claro y sus plantas aisladas y erectas. Además, presenta foliolos obovado-lanceolados, anchos de por lo menos la mitad de su largo; a menudo glabros. La principal característica de la plántula es el epicótilo verde y glabro e hipocótilo verde (Ayala y Carámbula, 2009).

2.3.2.2 *Lotus uliginosus*

Este es de color verde intenso y sus plantas se caracterizan por ser postradas en estado vegetativo, con tallos aéreos semierectos en floración. Sus foliolos son anchos y obovados con posible presencia de pelos en el envés o en los bordes. Posee tallos con tonalidades rojizas en la inserción de las hojas y en su parte basal. Las plantas adultas presentan estolones y rizomas (Ayala y Carámbula, 2009).

2.3.2.3 *Lotus tenuis*

El *L. tenuis* es de color verde azulado con plantas semipostradas y semierectas en la floración. Los foliolos son lineal-lanceolados, angostos, de tres a cuatro veces más largos que anchos. Los tallos se ven algo débiles con entrenudos relativamente largos. La plántula posee un epicótilo verde y glabro e hipocótilo rosado (Ayala y Carámbula, 2009)

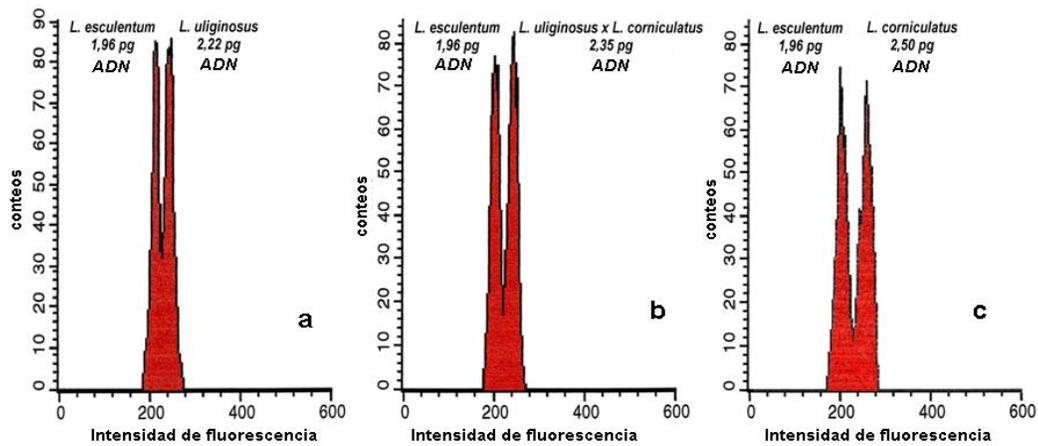
2.3.3 Identificación a través del tamaño del genoma por Citometría de Flujo (CF)

La citometría de flujo (CF) es una tecnología basada en la utilización de luz láser, que permite analizar un gran número de muestras en poco tiempo con un alto nivel de repetitividad. La técnica se basa en la emisión de fluorescencia del ADN, que es directamente proporcional a su cantidad. Para determinar el contenido de ADN se usan fluorocromos como el idoduro de propidio, y en función de la fluorescencia emitida se puede cuantificar y establecer la ploidía respecto a poblaciones control.

En los citómetros, las células suspendidas en un fluido pasan por un tubo fino sobre el que incide un rayo de luz láser. La luz transmitida y dispersada por el pasaje de las células se recoge por dispositivos de detección,

que permiten inferir la cantidad de ADN (Longobardi, 2013) y así diferenciar especies o cultivares con diferente cantidad.

Castillo et al. (2012a) pudieron diferenciar mediante CF a los híbridos interespecíficos de *L. uliginosus* x *L. corniculatus* y *L. corniculatus* x *L. uliginosus* de los parentales, *L. uliginosus* 4X y *L. corniculatus* 4X. El contenido de ADN los parentales tuvieron valores extremos respecto a los híbridos (Figura No. 1).



(a) *L. uliginosus* con 2,22 pg de ADN, (b) híbrido de *L. uliginosus* x *L. corniculatus* con 2,35 pg de ADN y (c) *L. corniculatus* con 2,50 pg de ADN.

Figura No. 1. Citometría de flujo de híbridos interespecíficos de *Lotus* respecto a sus parentales.

Fuente: Castillo (2012b).

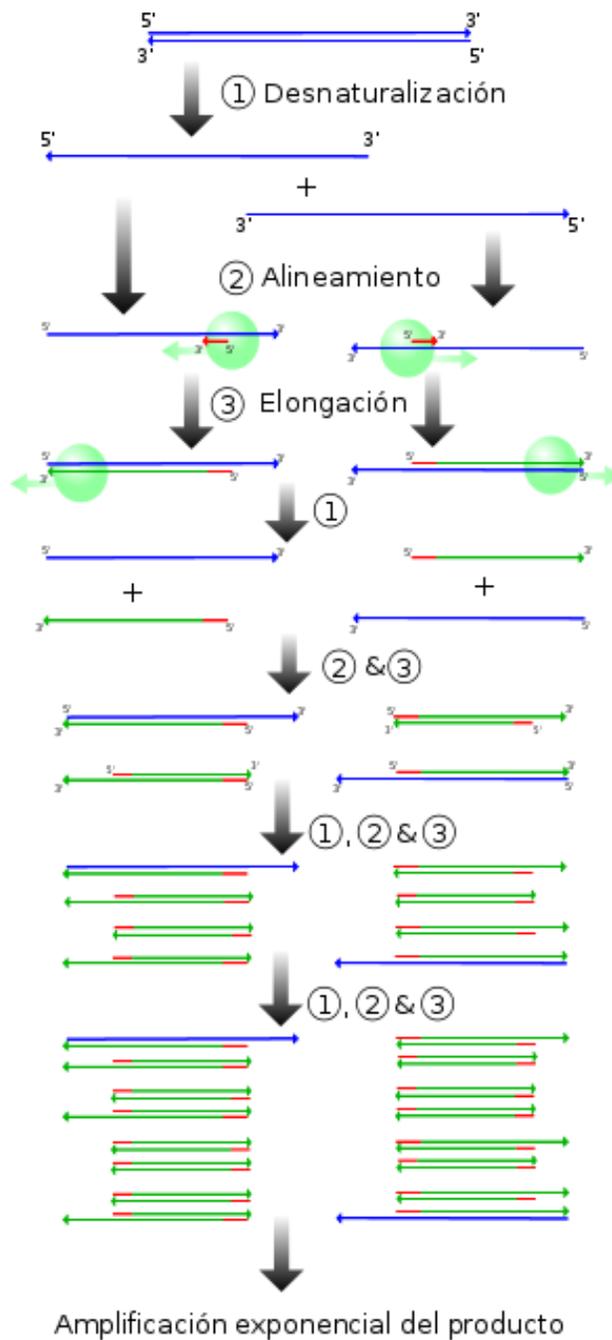
2.3.4 Identificación con marcadores moleculares

Entre los diferentes marcadores moleculares que existen para identificar vegetales se pueden usar proteínas de reserva de semillas, isoenzimas, fragmentos de ADN amplificados al azar (RAPD), polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) y microsatélites (SSR). Los SSR son secuencias repetidas en tándem de 1 a 5 pb abundantes en el genoma locus específicas, polimórficas y codominantes (Castillo, 2012b).

Los microsatélites son marcadores muy reproducibles dentro de la misma especie y se pueden transferir a otras especies y géneros (Castillo, 2012b). Estos autores encontraron variabilidad entre individuos del mismo cultivar con el uso de marcadores SSR desarrollados para otras especies, entre

ellas la leguminosa modelo *L. japonicus*. De esos marcadores, ocho cebadores son usados en esta tesis para diferenciar las especies problema.

Los cebadores se usan para amplificar secuencias de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Esta técnica permite obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular. La PCR se basa en la propiedad de la ADN polimerasa para replicar hebras de ADN, y en separar las hebra desnaturalizándolas. Un esquema del proceso se resume en la Figura No. 2.



(1) Desnaturalización, (2) alineamiento, (3) extensión o elongación.

Figura No. 2. Ciclo de amplificación de ADN mediante PCR.
Fuente: Wikipedia (2008).

Como puede observarse en la Figura No. 2, la PCR tiene tres pasos los cuales se describen a continuación:

1. Desnaturalización. Se conseguiría elevando la temperatura del tubo de reacción hasta 95°C, durante, por ejemplo, un minuto (este tiempo puede variar entre ½ minuto y 2 minutos).
2. Alineamiento. Se desciende la temperatura hasta una que puede oscilar entre 40 °C y 60 °C (dependiendo de diversos parámetros). La duración de este paso puede oscilar entre ½ y dos minutos.
3. Extensión o elongación. Se vuelve a aumentar la temperatura hasta los 72°C y se deja actuar a la Taq polimerasa durante uno ó dos minutos.

Estos tres pasos constituyen un ciclo. La repetición de este ciclo unas 35 veces, por ejemplo, permite obtener como resultado de un experimento de amplificación, millones de copias del fragmento de interés.

2.4 CRITERIO PARA EL MUESTREO DE SEMILLAS

Para muestrear semillas se toma una muestra representativa de un lote de semillas con el fin de estudiar su calidad. El objetivo del muestreo es obtener una muestra de tamaño adecuado para realizar los análisis y que la misma sea una representación del lote.

Una forma de garantizar la calidad de la semilla que se va a utilizar es determinar el porcentaje de germinación, pureza y el contenido de humedad de las semillas antes de la siembra. Para ello, se deben realizar un análisis de calidad de la semilla en el laboratorio, que implica una forma sistemática en la toma de muestras. Los muestreos son realizados por personal habilitado que los realizan en los lotes siguiendo las reglas establecidas por ISTA (International Seed Testing Association). Las reglas ISTA brindan la información adecuada y detallada para la obtención de una muestra representativa del lote y es la metodología definida en las normas de semillas de Uruguay.

Sin embargo, en ocasiones, el muestreo se lleva a cabo de manera incorrecta por diversos motivos. La tarea puede ser llevada a cabo por personal no idóneo, no disponer del equipamiento adecuado y fundamentalmente desconocer las intensidades de muestreo. En estos casos la muestra extraída no es lo suficientemente representativa del lote (INASE).²

² Bayce, D. 2017. Com. personal.

Al entrevistar al Ing. Agr. Bayce², plantea que lo realizado en los laboratorios de INASE es un estudio de la presencia o ausencia de *Lotus*. En el primer caso mencionado, se procede a nombrar como *Lotus sp.* a todas las especies presentes, sin diferenciar entre ellas. Una vez obtenida la muestra diferenciada como *Lotus sp.* no se obtiene el porcentaje de las distintas especies de *Lotus* presentes en la muestra.

En el muestreo de *Lotus* surge la dificultad de no poder diferenciar a simple vista *L. tenuis* de *L. corniculatus*. Por lo tanto, para identificar estas dos especies se debe esperar que la plántula crezca y diferenciarlas morfológicamente, o usar otras estrategias que permitan una identificación más precisa y rápida.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

Como material vegetal se usó *Lotus corniculatus* 'INIA Draco', *Lotus uliginosus* 'Grassland Maku' y *Lotus tenuis* 'Chajá' suministrados por la Ing. Agr. Rebuffo, INIA La Estanzuela, Colonia.

3.2 CULTIVOS DE PLANTAS

3.2.1 Medio para crecimiento de plantas

Las semillas crecieron en medio MS (Murashige y Skoog,1962). Se solidificó con agar 0,7 % (p/v) y se esterilizó en autoclave.

3.2.2 Esterilización de semillas y germinación de semillas

Las semillas se esterilizaron superficialmente por inmersión en alcohol 96°GL durante 1 min, un lavado con agua estéril, luego 2 min en NaClO 4 % (v/v) y varios lavados con agua estéril. Las semillas se dejaron en agua estéril durante 3 h antes de ser transferidas a placas de Petri que contenían agar-agua 0,7 % estéril, donde germinaron a 25 °C durante dos días a temperatura y luz constante.

3.3. EXTRACCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE ADN

El ADN de las plántulas de dos días se extrajo siguiendo el protocolo de Ferreira y Grattapaglia (1996), modificado. A diez plantas se agregan 600 µL de buffer de extracción consistente en: 200 µL Tris pH 7.5, 250 µL NaCl, 25 µL EDTA pH 8.0, 0,5 % SOS. Las muestras se maceraron, se agitó con vortex 30 segundos y se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 minutos. Se transfirieron 600 µL del sobrante a un microtubo con 600 µL de isopropanol, se agitó con vortex y se dejó en freezer (-20°C) durante 5 minutos. Se centrifugó a 14.000 rpm, a 4°C durante 10 minutos y se agregaron 600 µL de etanol 75 % al precipitado. Se agitó en vortex y se centrifugó a 14.000 rpm, a 4°C durante 5 minutos y el precipitado se resuspendió en 30 µL de H₂O mq con pipeta. La concentración se determinó en 2 µL de la muestra en un Nanodrop, y el ADN se almacenó a una temperatura de – 20°C.

3.3.1 Cebadores

Para amplificar el ADN de las tres especies de *Lotus* se usaron los cebadores ensayados por Castillo (2012b) en *L. corniculatus* y *L. uliginosus* que figuran en el Cuadro No. 3.

Cuadro No. 3. Cebadores.

Cebador	Secuencia (5'→3')	Temp. media (C°)	Cromosoma	Producto esperado (pb)
TM0304-fw	CGTTCTCTGGGAAGTTATGAC	52,8	2	127-115
TM0304-rv	ATTTGTTGTGTGCACTCAGG	53,7		
TM1335-fw	ATTAGACCACCACGGGCTGC	60	4	153 – 155
TM1335-rv	CCAAAGTTACTCAATGTAGCG	51,4		
TM0360-fw	CATGCTTGGAATGTTACTGC	52,1	2	113 - 95
TM0360-rv	GTGTATTGGATGTTATGGGG	50,6		
TM0127-fw	CACATTGCGTTTGAACTCG	52,9	3	131 - 119
TM0127-rv	GGTTCTGCTCAGCTTCGGTG	58,5		
TM0197-fw	CATTCACATGTCATTGGACC	51,6	4	121 - 119
TM0197-rv	TTAGATCGAGTTCGAGGGAG	53,1		
TM0142-fw	CACATACACATTTGCCGAAG	52	3	140 - 132
TM0142-rv	CGCTTGCAGTGATTCTAACC	54		
TM0744-fw	CCCAGTGTTACATTACAGAGC	53,1	5	111 - 138
TM0744-rv	TTGTTCTGAAAATCCAGGTC	50,3		
TM0756-fw	GCACCTACCAAATAAACAGC	51,8	6	128 - 143
TM0756-rv	CTCCATTGAACGCCTTGAC	56,3		

Se indica el cromosoma del microsatélite y el tamaño en kb del producto de amplificación esperado en *L. japonicus* MG20/B129, según la base de datos.

Fuente: Castillo (2012b).

3.3.2 Reacción de amplificación

Las reacciones de amplificación se llevaron adelante en un volumen final de 50 uL compuesto por:

H₂O mq 35 µL
Buffer 10X 5 µL
MgCl₂ 3 µL
dNTP 1µL
Cebador A 2 µL
Cebador B 2 µL
ADN 1 µL.
Taq 1 µL.

3.3.2 Condiciones de amplificación por PCR

Cuadro No. 4. Etapas de la amplificación de PCR

Paso	Temperatura (C°)	Tiempo	Numero de ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 min	1
Desnaturalización	95	30 s	35
Alineamiento	54		
Extensión	72		
Extensión final	72	10 min	1

En cuanto a las condiciones de la PCR, la temperatura de alineamiento se definió en 54 °C; se utilizó esta temperatura en base a las temperaturas medias de los cebadores con los que se trabajaron después de un proceso de optimización.

3.4 RESOLUCIÓN EN GELES DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS

3.4.1 Electroforesis en gel de agarosa

Los fragmentos de amplificación se resolvieron en geles de agarosa 2,5 % (p/v) siguiendo el protocolo de Sambrook, Russel (2001). Se usó buffer TAE 1X y para un gel de 100 mL se agregó 1,5 µl de GoodView. En un pocillo del gel se cargaron 4 uL del marcador de peso molecular (marca).

3.4.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida

Para hacer el gel de poliacrilamida (8 %) se utilizaron los compuestos descritos en el Cuadro No. 5. Se utilizó acrilamida al 30 %, la cual está compuesta por 29,1 g de acrilamida y 0,9 g N, N'-metilen bis-acrilamida. El TBE 5x está compuesto por 1,1 M Tris, 900 µL borato y 25 µL EDTA a pH 8,3. La solución de persulfato de amonio de amonio al 10 % (PSA) en agua se preparó en el momento.

La mezcla se realizó de acuerdo a lo descrito en el Cuadro No. 5.

Cuadro No. 5. Componentes del gel de poliacrilamida

% Acrilamida	8
Acrilamida (mL)	1,35
H ₂ O (mL)	2,27
TBE 5x (mL)	1
TEMED (uL)	5
PSA (uL)	33,3

El procedimiento para la preparación de los geles consta de, en primer lugar, armar el cassette para geles en placa de 1,5 mm de espesor; luego se colocaron 0,3 mL de agua sobre la superficie superior del gel antes de que polimerice. A continuación se agregó el stacking gel en el cassette pero previamente se debió haber retirado el agua y secado el gel, y se colocó el peine. Seguidamente se colocó el gel en una cuba de electroforesis BioRad Mini Protean II, se llenaron los compartimientos de la cuba con buffer de corrida TBE 0,5x (110 µL Tris, 90 µL borato, 2,5 µL EDTA a pH 8,3) y se cargaron los pocillos con las muestras de ADN.

Por último se realizó la tinción de plata según Heukeshoven y Dernick (1985) modificada. Para comenzar se coloca el gel en un recipiente limpio, en este se fijan las proteínas incubando en 30 % etanol, 10 % ácido acético glacial aproximadamente en un volumen de 50 mL, siempre con agua mQ. Luego de 30 minutos se incuba el gel con la misma solución de fijación fresca y se incuba por más de 2,5 horas. Posteriormente se neutraliza el gel con tres enjuagues de 50 mL de agua mQ.

Seguidamente el gel es reducido, incubándolo en una solución reductora durante 15 minutos, la cual se prepara con 0,5 g de ferrocianuro potásico y 0,8 g de tiosulfato de sodio para 50 mL de agua mQ.

Luego el gel debe ser enjuagado varias veces con agua mQ. El siguiente paso es incubar el gel limpio con 0,1 % de nitrato de plata durante 30 minutos en total oscuridad. Una vez terminada la incubación se debe descartar el nitrato de plata en un frasco y precipitarla con NaCl concentrado.

Durante el paso anterior se debe ir preparando el revelador y la solución stop. Esta solución es preparada con 2,23 g de carbonato de sodio (0,3 M Na_2CO_3), 30 uL de formaldehído y 60 mL de agua mQ.

A posteriori se agregan 40 mL de solución de revelado al gel, se agita suavemente y se descarta el precipitado que se forma por fuera del gel. Luego se agregan 25 mL restantes de solución de revelado y se agita suavemente hasta encontrar la tinción deseada.

Para finalizar se descarta la solución reveladora y se agregan los 50 mL de la solución stop (ácido acético al 3 %).

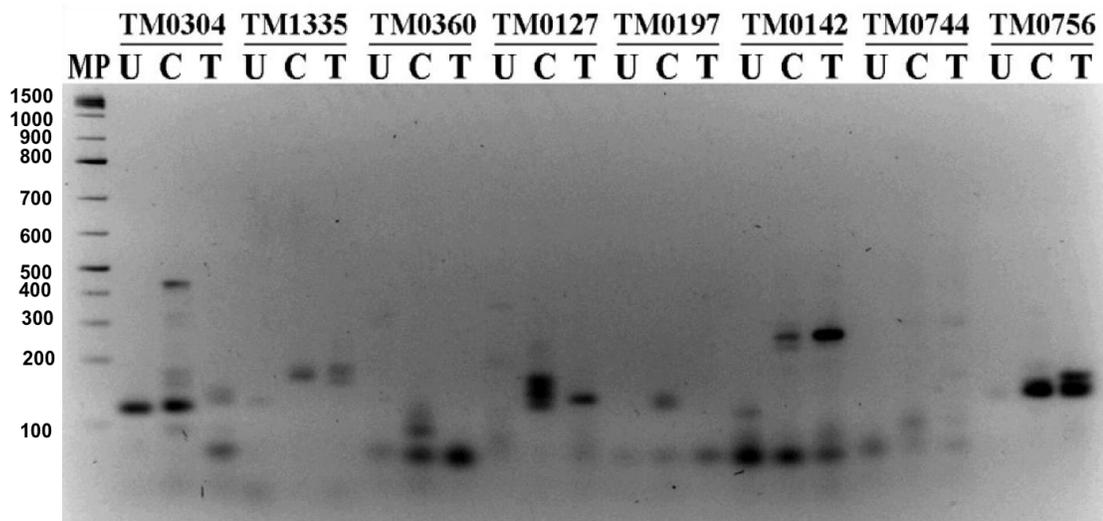
3.5 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se germinaron semillas y se tomaron grupos de diez de cada especie para realizar la extracción de ADN y su amplificación con los diferentes cebadores. Esta amplificación se repitió al menos dos veces. Finalmente se realizó otra PCR combinando los dos cebadores que generaron el mejor perfil.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 SELECCIÓN DE CEBADORES PARA DIFERENCIAR ESPECIES

Con el fin de contar con un marcador molecular que permita diferenciar plantulas de *L. uliginosus*, *L. corniculatus* y *L. tenuis* de 2 días, se realizó un ensayo que consistió en amplificar el ADN de cada especie con ocho cebadores (TM 304, TM 1335, TM 0360, TM 0127, TM 0197, TM 0142, TM 0744 y TM 0726). Los patrones generados por esos cebadores en las tres especies se muestran en un mismo gel (Figura No. 3).



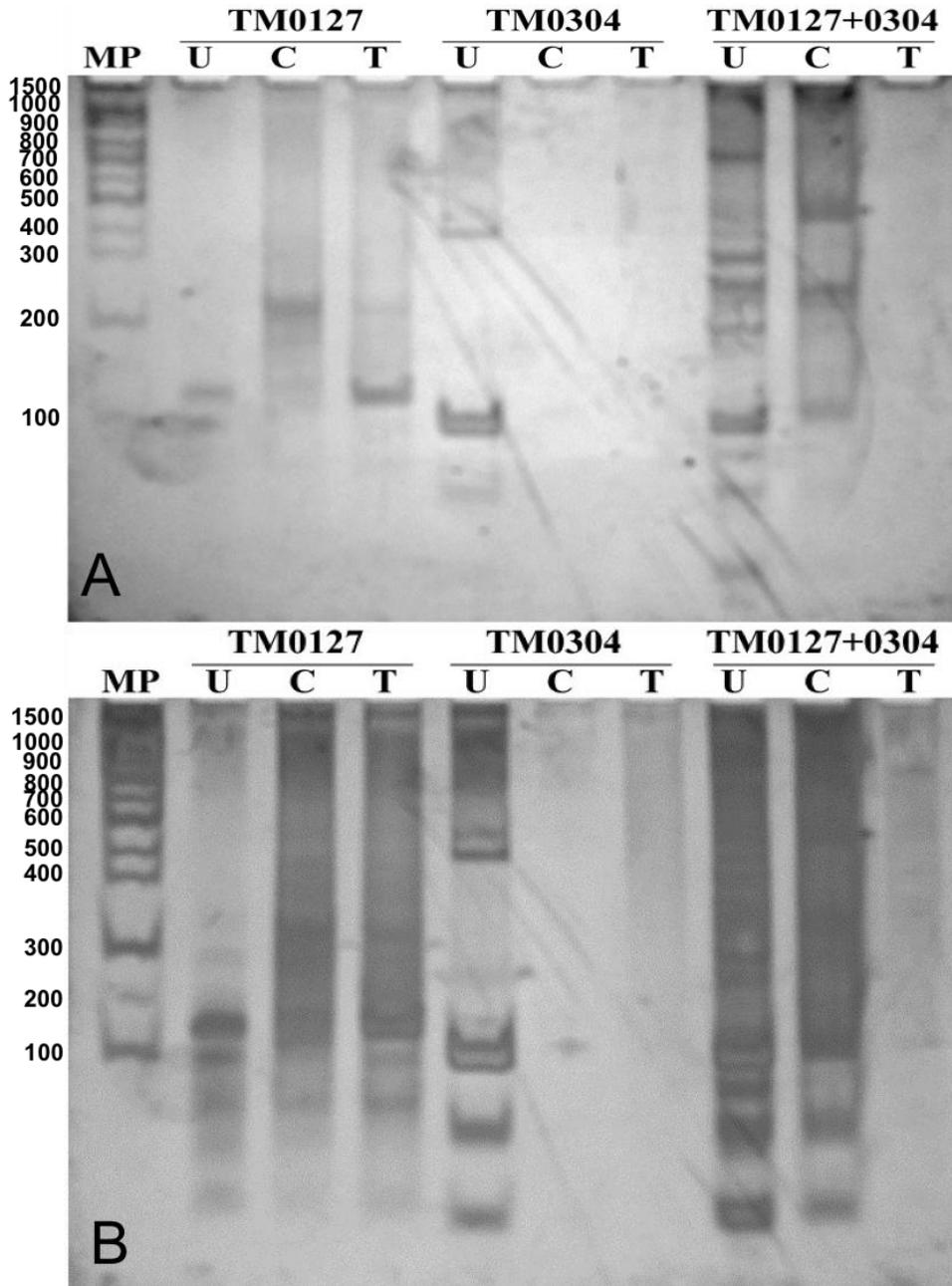
U, *L. uliginosus*; C, *L. corniculatus* y T, *L. tenuis*. Los 8 cebadores ensayados (TM) figuran encima de cada especie. MP marcador de peso molecular.

Figura No. 3. Perfiles de productos de amplificación resueltos en gel de agarosa.

En la Figura No. 3 se puede observar como en gel de agarosa los cebadores TM 0304, TM1335 y TM0127 generan en las tres especies patrones que permiten diferenciarlas entre sí. Los marcadores TM 360, TM 197 y TM 744 generan patrones que permiten diferenciar a *L. corniculatus* de *L. uliginosus* y *L. tenuis*, pero no a *L. uliginosus* de *L. tenuis*. Finalmente, TM 0142 y TM 0756 generan patrones que permiten diferenciar a *L. uliginosus* de *L. corniculatus* y *L. tenuis*, pero no a estos dos últimos.

Dado que la diferenciación de especies por este método es visual, hay que seleccionar el marcador que permita identificarlas con precisión, para lo

que también se requiere resolver los patrones en un gel que facilite la visualización. Por esa razón, los productos de amplificación se resolvieron además en geles de pliacrilamida, que se tiñeron con plata. Esta técnica mejoró notoriamente la resolución de los patrones y facilitó la interpretación de los resultados. En la Figura No. 4 A y B se muestran los patrones generados en las tres especies con los cebadores TM 127 y TM 304, y ambos marcadores juntos resueltos en gel de poliacrilamida teñidos con dos tiempos de incubación al nitrato de plata.



U, *L. uliginosus*; C, *L. corniculatus* y T, *L. tenuis*. Los cebadores ensayados (TM) figuran encima de cada especie. MP marcador de peso molecular.

Figura No. 4. Perfiles de productos de amplificación resueltos en gel de poliacrilamida.

La metodología utilizada para la diferenciación de las especies problema tiene ventajas respecto a otras técnicas porque genera resultados objetivos. Las estrategias utilizadas antes para la diferenciación de estas especies necesitan mayor tiempo que la determinación mediante la aproximación taxonómica. La CF puede ser más sencilla que el uso de marcadores, dado que la técnica implicada es más sencilla. La cantidad de ADN de *L. uliginosus* y *L. corniculatus* puede ser diferenciada por esta técnica (Castillo et al., 2012a), pero estos autores no estimaron *L. tenuis* por la misma.

El problema planteado para esta tesis fue la contaminación por semillas de diferentes especies en bolsas de semillas certificadas como pura. La caracterización taxonómica para poder diferenciar a estas especies requiere de un tiempo que, según sea en condiciones controladas o en campo, puede ser entre uno y dos meses. Sin embargo, con el uso de marcadores las tres especies se pueden diferenciar en tres días, con alto grado de precisión.

La dificultad que plantea este método es el costo del análisis para la cantidad de semillas que se deben manipular individualmente para que la muestra sea representativa de una bolsa de semilla certificada. Un lote puede tener como máximo hasta 10.000 Kg.

Como dificultad para determinar la pureza de lote surge de la cantidad de semillas que se requiere analizar para obtener una muestra representativa. En *Lotus* es necesario analizar una muestra de 3 gramos cada 100 kilos. De esta forma, como el peso de 1000 semillas es aproximadamente 0,8 gramos, es necesario analizar unas 4000 semillas, lo que hace a este análisis y a la CF poco factibles de aplicar. Tampoco es sencillo el análisis basado en caracteres morfológicos.

Una posibilidad es analizar muestras complejas (pool) con un número de semillas adecuado, para que, de aparecer una contaminación con otra especie, se distinga el patrón. De esta forma el número de muestras bajaría y de aparecer una submuestra contaminada se deberían analizar grupos menores.

La CF no debe ser descartada, dado que la manipulación es menor que la amplificación de ADN y resolución de geles.

5. CONCLUSIONES

Mediante el uso de dos marcadores moleculares desarrollados para *L. japonicus* (TM 0127 y TM 0304) se pueden diferenciar las especies *L. uliginosus*, *L. corniculatus* y *L. tenuis* para analizar semillas en un tiempo de tres días de forma confiable.

Si bien esta técnica es válida para diferenciar semillas de las distintas especies de *Lotus* descritas, en futuros estudios se debe determinar el mayor número de semillas por pool que permita determinar contaminación por 1 semilla, y así determinar el número de PCR a realizar para evaluar las 4.000 semillas. Con el fin de obtener el límite de detección que técnica descrita es capaz de ser confiable.

6. RESUMEN

El problema planteado para este trabajo fue buscar una forma de diferenciar las semillas de *Lotus corniculatus*, *L. uliginosus* y *L. tenuis*. El uso de marcadores moleculares respecto a la identificación visual de caracteres morfológicos para diferenciar estas especies tiene como ventaja la precisión de la asignación. Se determinó que con los cebadores TM 0127 y TM 0304 se puede amplificar el ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y separados los fragmentos amplificados en gel, se pueden identificar las mencionadas especies. El uso de esta técnica requiere de menos tiempo que la diferenciación morfológica ya que en tres días se pueden obtener resultados individuales; pero la cantidad de semillas a analizar —cerca de 4.000 para 100 kg— hace que esta u otra técnica molecular, o la citometría de flujo sean de difícil instrumentación. Además, un número de muestras tan alto constituye una dificultad para la determinación clásica basada en la morfológica. El recurrir a muestras complejas sería una forma de disminuir el número original de muestras a analizar, pero debe ser analizada la estrategia para que los análisis estadísticos tengan la solidez requerida.

Palabras clave: *Lotus*; Reacción en cadena de la polimerasa; PCR; Semillas.

7. SUMMARY

The problem posed for this work was to find a way to differentiate *Lotus corniculatus*, *L. uliginosus* y *L. tenuis* seeds. The advantage of using molecular markers with regard to the visual identification of morphological features to differentiate these species is the accuracy of the assignment. It was determined that with the primers TM 0127 and TM 0304, it is possible to amplify the DNA by means of the polymerase chain reaction (PCR), and after the fragments are amplified in gel, the aforementioned species can be identified. The use of this technique requires less time than morphological differentiation since it is possible to obtain individual results in three days; but the amount of seeds required to analyze -about 4,000 for 100 kg- makes this and other molecular techniques, or flow cytometry, hard to implement. In addition, such a high number of samples results in difficulties to determine the classic determination based on morphological determination. Resorting to complex samples would be a way of reducing the original number of samples to analyze, but such strategy should be analyzed so that the statistical analyzes have the required soundness.

Keywords: *Lotus*; Polymerase chain reaction; PCR; Seeds.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Arambarri, A.; Colares, M. 1993. *Lotus corniculatus* and *L. tenuis* Waldst et Kit (leguminosae) anatomy of leaf. *Lotus Newsletter*. 24: 38-40.
2. Ayala, W.; Carámbula, M. 2009. El valor agronómico del genero *Lotus*. Montevideo, INIA. 392 p.
3. Barry, T.; Kemp, P.; Ramírez - Restrepo, C.; López Villalobos, N. 2003. Sheep production and agronomic performance of *Lotus corniculatus* under dryland farming. In: New Zealand Grassland Association Symposium (2003, Lincoln). Legumes for dryland pastures. Palmerston North, AGRICOM. pp. 109-116 (Grassland Research and Practice Series no. 11).
4. Boschi, F.; Latorre, P.; Saldanha, S.; J., M., Bentacur, O.; Moure, S. 2016. Importancia de las semillas duras en leguminosas forrajeras producidas en Uruguay. *Agrociencia (Uruguay)*. 20(2): 43-50.
5. Bullard, M.; Crawford, T. 1995. Productivity of *Lotus corniculatus* (bird's-foot trefoil) in the UK when grown under low-input conditions as spaced plants, monoculture swards or mixed swards. *Grass and Forage Science*. 50: 439-446.
6. Castillo, A.; Rebuffo, M.; Dalla Rizza, M.; Folle, G.; Santiñaque, F.; Borsani, O.; Monza, J. 2012a. Generation and Characterization of Interspecific Hybrids of *Lotus uliginosus* x *Lotus corniculatus*. *Crop Science*. 52: 1572-1582.
7. _____. 2012b. Generación de híbridos interespecíficos de *L. uliginosus* x *L. corniculatus* y evaluación de la respuesta a déficit hídrico . Tesis de Maestría. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 88 p.
8. Ferreira, M.; Grattapaglia, D. 1996. Introducao ao uso de marcadores moleculares em analise genetica. Brasília, EMBRAPA. Cenargem. 220 p.
9. Heukeshoven, J.; Dernick, R. 1985. Simplified method for dilver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis*. 6: 103-112.

10. INASE (Instituto Nacional de Semillas, UY). 2017. Cantidad de semilla comercializada. (en línea). Canelones. s.p. Consultado oct. 2017. Disponible en <http://www.inase.uy/Estadistica/>
11. Kirkbride, J. 1999. *Lotus* Systematics and Distribution in Trefoil. In: Beuselinck, P. R. ed. The Science and Technology *Lotus*. Beltsville, CSSA. pp. 1-20 (CSSA Especial Publication no. 28).
12. Li, B.; Beuselinck, P. 1996. Rhizomatous *Lotus corniculatus* L.: II. Morphology and anatomy of rhizomes. *Crop Science*. 36: 407-411.
13. Longobardi, A. 2013. Flow Cytometry First Principles. 2nd. ed. New York, Wiley-Liss. 296 p.
14. Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15(3): 473-497.
15. Murcia, M; Peretti, A; San Martino, S. 2015. Caracterización morfológica de semillas y plantulas de *Lotus tenuis* y *Lotus corniculatus* para diferenciar especies de muestras de semillas. *Revista Facultad de Agronomía (La Plata, Argentina)*. 114 (1): 38-43.
16. Sambrook, J.; Russel, D. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd. ed. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press. s.p.
17. Scott, D.; Charlton, J. 1983. Birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) as a potential dryland herbage legume in New Zealand. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association*. 44: 98-105.
18. Wen, L.; R. Kallenbach, J.; Williams, C.; Roberts, P.; Beuselinck, P.; Benedict., M. R. 2002. Performance of steers grazing rhizomatous and nonrhizomatous birdsfoot trefoil in pure stands and in tall fescue mixtures. *Journal of Animal Science*. 80: 1970-1976.
19. Wikipedia. 2008. Reacción en cadena de la polimerasa. (en línea). s.l. Consultado ene. 2018. Disponible en https://es.wikipedia.org/wiki/Reacci3n_en_cadena_de_la_polimera_sa