

MEJORAMIENTO GENÉTICO DE *Melilotus Albus*

TOMÁS, M. A.^{1*}; IACOPINI, M. L.¹; DE MARCO, N.²; GIORDANO, M.³; CARDAMONE, L.³;
PILATTI, V.³

¹INTA EEA Rafaela. Ruta 34 km 227, Rafaela, Santa Fe, Argentina;

²Asesor privado-Pasante;

³Becaria CONICET

* Autor de contacto: tomas.maria@inta.gob.ar

INTRODUCCIÓN

El género *Melilotus* comprende varias especies, algunas de las cuales son conocidas como trébol de olor. En particular, *M. albus* o trébol de flor blanca y *M. officinalis*, de flor amarilla, son a veces incluidas como variantes de la misma especie aunque varios autores afirman que son genéticamente incompatibles.

Pertenece a la familia de las leguminosas, las plantas de *Melilotus* son erectas, más o menos ramificadas y pueden alcanzar 1,5 m de altura. Muestran adaptación a un amplio rango de ambientes y son en general tolerantes a suelos alcalinos o salinos pero no soportan la sombra.

Los tréboles de olor fueron introducidos desde el centro de Europa y el Tíbet. Ingresaron a América del norte alrededor del año 1670 aunque no claramente identificados. Se utilizaban para estabilizar suelos muy erosionados y también como melífero pero su cultivo se incrementó notablemente al descubrirse su aptitud forrajera para ganado doméstico, especialmente en áreas con bajo potencial productivo.

En Argentina, las especies de *Melilotus* fueron introducidas en varias ocasiones, pero los eventos no quedaron debidamente registrados. Por su gran rusticidad, se esparcieron espontáneamente llegando a naturalizarse en varias regiones donde es posible encontrarlas en los bordes de las rutas (Rosso, 2014). *Melilotus albus* es la especie más difundida y su semilla se comercializa, muchas veces sin denominación. Sin embargo, están disponibles en el mercado cultivares obtenidos producto del mejoramiento genético en Argentina y algunos programas se están llevando a cabo en la actualidad en varios centros del INTA y algunas universidades, como así también en empresas privadas.

La inclusión del género *Melilotus* en la cadena forrajera se realiza habitualmente en consociaciones con gramíneas, ya sea templadas o subtropicales, a las que agrega tenor proteico sin perjudicar la producción total de forraje (Bruno y col. 1983). En sistemas lecheros, el melilotus es utilizado en rotaciones con sorgo y en asociación con alfalfa. En líneas generales, el melilotus es empleado en situaciones limitantes para el cultivo de alfalfa, ya sea por condiciones de anegamiento o salinidad o por déficit de nutrientes. Sus ventajas destacadas son su alta producción y fácil resiembra y el aumento de valor nutritivo a la especie acompañante.

Desde INTA se ha propiciado el mejoramiento genético de *M. albus* por considerarse una especie clave para los sistemas ganaderos de zonas con limitantes, dada su amplia distribución en el territorio nacional y por su capacidad de adaptación a múltiples ambientes. Especialmente en sistemas lecheros, las plantas de *Melilotus* pueden aportar forraje de calidad a la salida del invierno, aumentando el contenido proteico cuando se utiliza con gramíneas rústicas que en general

contribuyen con volumen. En esta revisión, se resumen los esfuerzos en el mejoramiento genético de *M. albus* de INTA con énfasis en los trabajos realizados en la EEA Rafaela.

PASOS PREVIOS AL MEJORAMIENTO GENÉTICO

Los genes que están disponibles para su manipulación a través del mejoramiento genético convencional son aquellos que las especies acumulan a lo largo de su historia evolutiva, y eso incluye la adaptación a condiciones diversas. Para comenzar un programa de mejoramiento es necesario contar con germoplasma con un cierto grado de variabilidad genética. Dicho germoplasma suele estar disponible para los mejoradores en diversas fuentes, por ejemplo, los bancos de germoplasma, ya sea nacionales o del extranjero. En Argentina, el INTA cuenta con un Banco Activo de Germoplasma organizado a partir de 1994 que se encarga de la conservación de los recursos fitogenéticos de las especies de interés para la producción forrajera entre las que se encuentra *M. albus* (Rosso, 2014). De las entradas ingresadas a este banco algunas corresponden a poblaciones colectadas (localmente adaptadas) mientras que otras fueron recibidas de instituciones de todo el mundo. Además, el INTA cuenta con una colección de 344 entradas de *M. officinalis* y *M. albus* provenientes de una colección recibida desde el USDA (a través del Dr. Burson) en el banco de germoplasma EEA Guillermo Covas del INTA en Anguil, La Pampa. Las mismas fueron catalogadas de acuerdo a su origen y a otras características morfológicas que tienen que ver con la forma de los folíolos, el porte de la planta, la longitud de tallos y entrenudos, el ciclo y la floración (Traverso y col., 2005).

Para el estudio y la cuantificación de la variabilidad genética se han utilizado diferentes marcadores, ya sea morfológicos, bioquímicos y/o moleculares. Estos diferentes enfoques han mostrado amplia diversidad genética tanto entre especies del género *Melilotus* como entre ecotipos o poblaciones dentro de especies (Winton y col., 2007; Aboel-Atta, 2009). Respecto a las colecciones con las que se cuentan de Argentina, Ré y colaboradores (2014) reportaron una amplia variabilidad en los ecotipos colectados a partir de poblaciones naturalizadas en los caracteres relacionados con la eficiencia en el establecimiento al estadio de plántula como también en caracteres de importancia agronómica de la planta adulta como biomasa, proporción de hoja y retraso de la floración que permite mantener la calidad de la pastura por más tiempo. Además, estos estudios determinaron valores relativamente altos del grado de determinación genética que indicaría que gran parte de la variación fenotípica observada es atribuible a la variación genética. Resultados similares fueron obtenidos comparando familias de medios hermanos crecidos en ambientes homogéneos donde la mayor parte de la variación fenotípica observada fue explicada por la variación genética (Guercio y col., 2014; Varea y col., 2014).

A partir de una colección de materiales naturalizados que fueron colectados en diferentes condiciones ambientales, se inició un estudio de la variabilidad genética contenida en dicha colección, con el propósito de cuantificarla y sentar las bases para un programa de mejoramiento genético. Para ello, se realizaron análisis de diferentes marcadores moleculares sobre el conjunto de 8 poblaciones de la colección de INTA más una accesión selecta de la FCA de la Universidad Nacional del Litoral que resultaron igualmente informativos. Los resultados alentaron el inicio de un programa de mejoramiento de la especie, dado que se demostró la existencia de amplia variación

genética útil para realizar la selección. Se determinó que más del 80% de la variación se encuentra dentro de los ecotipos, lo que coincide con el modo de reproducción alógama de la especie (Rivero y col., 2015)

Por otra parte, y dado que *M. albus* se comenzó por la caracterización de ecotipos respecto a la tolerancia a la salinidad a fin de detectar variabilidad para ser utilizada en procesos de selección. Tomando como punto de partida una colección de 9 ecotipos naturalizados de *M. albus* se encontraron diferencias entre poblaciones en el poder germinativo de las semillas frente a condiciones crecientes de salinidad (De Marco y col., 2014). Estos estudios mostraron no sólo que las semillas de *M. albus* son capaces de germinar hasta concentraciones de 250 mM de NaCl (que se corresponde aproximadamente a 25 dS.m⁻¹), sino también que gran parte de esa capacidad estaba regulada por genes por lo que sería factible aumentar esa característica luego de un proceso de selección. Asimismo, cuando dichas poblaciones fueron evaluadas en su respuesta al estado de plántulas, se encontraron diferencias en la producción de biomasa aérea y radical y en otros caracteres morfológicos tanto en condiciones nativas como frente al agregado de concentraciones crecientes de sal cuando crecían en hidroponía. Estos estudios demostraron además que la capacidad de mantener el crecimiento en una condición salina, es decir, el grado de tolerancia, fue diferente entre poblaciones, destacándose algunos materiales con mayor tolerancia que a la vez tuvieron alto crecimiento en un medio no salino (Insaurralde y col., 2014). De forma complementaria, el análisis conjunto de los marcadores moleculares anteriormente citados con los marcadores funcionales, permitió discriminar grupos de poblaciones que se diferenciaron por su tolerancia a la salinidad (Tomás y col., 2015) asegurándose que esa diferenciación tendría base genética por lo que constituirían la base para iniciar programas de mejora respecto de esta característica.

OBJETIVOS DEL PLAN DE MEJORAMIENTO GENÉTICO

Basado en las mismas poblaciones de la colección de INTA se inició en 2011 un programa de mejoramiento en *M. albus* con el objetivo de aumentar la producción y calidad de forraje a través del incremento en la relación hoja: tallo y retrasar la floración para prolongar el periodo de utilización de la pastura, dado que la calidad de la misma disminuye notablemente por el engrosamiento de los tallos que se produce cuando la planta comienza a producir flores. Este plan se coordina entre 4 estaciones experimentales del INTA a fin de obtener un producto que resulte apto para un amplio rango de condiciones ambientales. De este emprendimiento participan las experimentales de Manfredi (Córdoba), Pergamino (Buenos Aires), Rafaela (Santa Fe) y Concepción del Uruguay (Entre Ríos).

Después del primer ciclo de selección se eligieron poblaciones por su mejor producción de forraje y mejor relación hoja: tallo. Las evaluaciones se realizaron posteriormente sobre planta aislada, teniendo en cuenta la fecha de floración, se seleccionaron las plantas de ciclo más largo en cada sitio. A partir de las plantas seleccionadas en cada localidad se sembraron familias de medios hermanos en todos los sitios. Este proceso se repitió dos veces (años consecutivos). Resultados preliminares confirmaron la existencia de una gran interacción genotipo x ambiente, lo que indicaría que los diferentes materiales elegidos hasta el momento tendrían un comportamiento diferente de

acuerdo al lugar donde crecen (Ré y col., 2016). En este momento se están llevando a cabo ensayos en stand denso en todas las localidades a fin de determinar el potencial productivo de cada selecta y ya en las etapas terminales del proceso de mejoramiento, avizorando la pronta obtención de nuevos cultivares.

CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS

El germoplasma de *M. albus*, obtenido en zonas con diferencias climáticas y edáficas, se ha caracterizado mediante indicadores genéticos, morfológicos, y productivos. Dicho material fue sometido a reiterados procesos de selección a fin de obtener líneas mejoradas en su nivel de producción, relación hoja: tallo y duración de ciclo (atraso de la floración para mayor período de aprovechamiento). El material disponible fue evaluado en relación a su tolerancia a la salinidad, en etapa de germinación y estado de plántula con niveles crecientes de contenido de NaCl. De estos ensayos se han obtenido materiales promisorios para la obtención de material mejorado en dicha característica.

De forma complementaria, se encuentra en marcha un estudio para caracterizar la respuesta de los materiales disponibles en función de su tolerancia al estrés mixto (salinidad-alcalinidad).

En síntesis, la posibilidad de contar con un material mejorado de *M. albus*, adaptado a las condiciones agro-ecológicas de la zona centro de Santa Fe permitirá maximizar el aprovechamiento de esta pastura que potencialmente puede incrementar el valor nutritivo de gramíneas forrajeras subtropicales que son muy productivas en suelos con limitantes. La incorporación de *Melilotus* complementaríala cadena forrajera con forraje de calidad a la salida del invierno, un momento que resulta crítico en el tipo de sistemas planteados.

BIBLIOGRAFÍA

- Aboel-Atta, A. 2009. Isozymes, RAPD and ISSR variation in *Melilotus indica* (L.) AIL and *M. siculus* (Turra) B. G. Jacks. (Leguminosae). Academic Journal of Plant Sciences 2: 113-118.
- Bruno, O.; Fossatti, J. y Quaino, O. 1983. Incorporación de trébol de olor blanco en grama rhodes. P. animal 10, 333-341. R.A.
- De Marco, N.; Tomás, M. A.; Iacopini, M. L. y De Battista, J. P. 2014. Germinación de diferentes ecotipos de *Melilotus albus* y su respuesta al estrés salino. Congreso de la Red Argentina de Salinidad. Chascomús.
- Guercio, A.; Varea, I.; Elustondo, L. y Andrés, A. 2014. Variabilidad genética en producción de biomasa de poblaciones naturalizadas de *Melilotus albus*. 37° Congreso de la Asociación Argentina de Producción Animal, Buenos Aires, Argentina, AAPA.
- Insaurralde, L.; Tomás, M. A.; Iacopini, M. L.; De Marco, N.; Cardamone, L.; Giordano, M. C. y De Battista, J. P. 2014. Respuesta a la salinidad en plántulas de poblaciones de *Melilotus albus* creciendo en hidroponía. Simposio de Recursos Genéticos. 37° Congreso AAPA.
- Ré, A. E.; Pinget, A. D.; Igarzábal, M. F. y De Battista, J. P. 2014. Variabilidad intra e inter poblacional entre ecotipos de *Melilotus albus*. 37° Congreso de la Asociación Argentina de Producción Animal, Buenos Aires, Argentina, AAPA.
- Ré, A.; Arolfo, V.; Tomás, M. A.; Lavandera, J.; Odorizzi, A.; Acuña, A. y Lifschitz, M. 2016. Interacción genotipo x ambiente en familias de medios hermanos de *Melilotus albus*. Aceptado para el 39° Congreso AAPA.
- Rivero, M.; Tomas, P. y Tomás, M. A. 2015. Assessment of genetic diversity in *Melilotus albus* germplasm using ISSR and SSR markers. 5th International Symposium of Forage Breeding. Buenos Aires, October.

- Rosso, B. 2014. Conservación de los recursos genéticos de las especies forrajeras en el Banco Activo de la EEA-INTA Pergamino. 37° Congreso de la Asociación Argentina de Producción Animal, Buenos Aires, Argentina.
- Tomás, M. A.; Rivero, M.; Tomas, P. y Iacopini, M. L. 2015. Salinity tolerance and molecular markers simultaneously used to characterize populations of *Melilotus albus*. 5th International Symposium of Forage Breeding. Buenos Aires.
- Traverso, J.; Babinec, F. y Troiani, H. 2005. Caracterización y agrupación de entradas por compatibilidad de caracteres fenotípicos en el género *Melilotus*. Publicación técnica. INTA. Anguil, La Pampa, INTA, EEA Anguil "Ing. Agr. Guillermo Covas": 16.
- Varea, I.; Guercio, A.; Elustondo, L. y Andrés, A. 2014. Efecto del año en caracteres de producción de biomasa de poblaciones naturalizadas de *Melilotus albus* Desr. 37° Congreso de la Asociación Argentina de Producción Animal, Buenos Aires, Argentina, AAPA.
- Winton, L. M.; Krohn, A. L. y Conn, J. S. 2007. Microsatellite markers for the invasive plant species white sweetclover (*Melilotus alba*) and yellow sweetclover (*Melilotus officinalis*). Molecular Ecology Notes 7: 1296-1298.