



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS FÍSICO-QUÍMICAS Y NATURALES

Tesis para acceder al título de Doctor
en Ciencias Biológicas

**PRODUCCIÓN DEL FITOESTRÓGENO COUMESTROL EN ALFALFA
COMO RESPUESTA A LA INFECCIÓN POR EL COMPLEJO VIRAL DEL
ACHAPARRAMIENTO**

Biól. (MSc) Mercedes Pilar Silva

Director: PhD. Ing. Agr. Daniel H. Basigalup
Co-Director: Dra. Stella M. Chiacchiera

Río Cuarto, Diciembre 2019

COMISION ASESORA y JURADO

Dr. Ing. Agr. Enrique Iván Lucini

Dra. Elizabeth Agostini

Dr. Ing. Agr. Sergio Luis Lenardón

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Río Cuarto, 6 de diciembre de 2019

DEDICATORIA

a Daniel, mi compañero de viaje

a las tres luces que me acompañan en cada paso

a mis padres Irma y Augusto

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer especialmente a:

Mi Director de Tesis Daniel Basigalup y Codirectora Stella Chiacchiera, por su dedicación, enseñanzas y calidad humana con la cual acompañaron mi formación doctoral a lo largo de todos estos años.

A los miembros del Comité Asesor, por su dedicación y por su calidad técnica y humana con la cual acompañaron mi formación doctoral.

Al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria por impulsar y facilitar la realización de este estudio.

A María José Martínez y Valeria Moreno por facilitar las mediciones en los laboratorios (Calidad de Granos y Biotecnología) del INTA-Manfredi.

A Fabián Giolitti y Verónica Trucco por facilitar las mediciones en el laboratorio del CIAP-INTA.

A Stella Chiacchiera y FCEFQyN-UNRC por facilitar las mediciones en el laboratorio.

A la Escuela de Posgrado FCEFQyN-UNRC, por aceptarme como alumno y acompañarme en el proceso y al Tribunal evaluador.

A Carolina Díaz y a la cátedra de estadística de la Fac de Cs Agropecuarias.

A Mis compañeras de trabajo Roxana y Patricia por el apoyo incondicional.

A Eva por su dedicación y colaboración incondicional.

A Valeria, Ariel, Horacio, Flavio, Marcos y Claudio por su asistencia.

A Milena por sus aportes y amistad de tantos años.

A Bárbara, Gise P y Gise M por su colaboración.

A todos aquellos que me formaron técnica, ética y espiritualmente en estos años.

INDICE

INDICE DE TABLAS	VIII
INDICE DE FIGURAS	X
ABREVIATURAS	XII
RESUMEN	XIV
ABSTRACT	XV
RECURSOS FINANCIEROS PARA LA REALIZACIÓN DE LA TESIS.....	XVI
CAPÍTULO 1:	1
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1 La alfalfa en Argentina	4
1.2. Factores bióticos de estrés	6
1.3. Relación vector-virus-hospedador	7
1.4. Complejo viral del achaparramiento	10
1.5. Metabolismo secundario como respuesta de defensa de las plantas.....	12
1.6. Fitoestrógenos en pasturas	14
1.7. Fitoestrógenos: beneficios para la salud humana y su potencial económico.....	17
1.8. Relación entre CVA, producción de fitoestrógenos y efecto sobre el ganado.....	19
CAPÍTULO 2:	21
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	21
2.1. HIPÓTESIS	21
2.2. OBJETIVOS	22
2.2.1 Objetivo general	22
2.2.2. Objetivos específicos.....	22
CAPÍTULO 3	23
MATERIALES Y METODOS.....	23
Sección A: Material Vegetal (Objetivos específicos 1, 2, 3).....	23
3A. Desarrollo del material vegetal.....	23
3A.1 Desarrollo de plantas madres (PM).....	23
3A.1.1 Obtención de clones:	25
3A.1.2 Optimización del clonado.....	25
3A.1.3 Condición enfermedad (S y E)	26
3A.1.4. Genotipos desarrollados de los cultivares Monarca y Trafal	27

3A.1.5. Infección de clones a través de injertos (Condición E).....	27
3A.2. Detección del complejo viral del achaparramiento.....	31
3A.2.1 Ausencia / presencia del alfalfa mosaic virus (AMV) en plantas madres (PM) de los genotipos de los cultivares Monarca y Traful.	31
3A.2.2. Ausencia / presencia del alfalfa dwarf virus (ADV) en plantas madres (PM) de los genotipos de los cultivares Monarca y Traful.	33
3A.3. Determinación del fitoestrógeno coumestrol	36
3A.3.1. Preparación de la muestra.....	36
3A.3.2. Obtención de los extractos	36
3A.3.3 Condiciones cromatográficas	36
3A.3.4. Determinación del contenido de coumestrol (COU).....	37
3A.3.5. Efecto matriz del COU	39
3A.3.6. Cinética de degradación y prueba de Butil hidroxitolueno (BHT)	40
3A 4. Clonación simultánea de los genotipos de los cultivares Monarca y Traful en las condiciones de enfermedad (S y E).	41
Sección B: Evaluaciones en plantas (Objetivos específicos 4, 5, 6 y 7).....	43
3B.4 Ensayo en Invernadero: Diseño experimental.....	43
3B.5. Mediciones y Evaluaciones.....	45
3B.5.1 Caracteres morfológicos y fenológicos	45
3B.5.2. Evaluación de rendimiento y calidad forrajera (Objetivo específico 4).....	46
3B.5.3. Índice de Severidad del CVA por genotipo y su relación con el COU	46
3B.5.4. Correlación entre contenido del fitoestrógeno COU y las características morfológicas, fenológicas y productivas.....	51
3B.5.5. Evolución del contenido de COU en función del desarrollo de la enfermedad	51
3B.6 Análisis estadístico.....	52
CAPÍTULO 4	53
RESULTADOS	53
4. Ensayo en Invernadero: correspondiente a las dos tandas (t1 y t2) de evaluación.	53
4 1. Determinación del contenido de COU en Monarca y Traful para las dos condiciones de enfermedad (S y E)	55
4.1.1 Determinación preliminar (corte 1) de COU en las condiciones S y E.....	55
4.1.2 Contenido de COU en los cultivares Monarca y Traful bajos las dos condiciones de enfermedad (S y E) a lo largo de los 6 cortes de las tandas (t1 y t2) evaluadas.	56

4.1.3. Contenido de COU en los genotipos de Monarca y Trafal en las dos condiciones de enfermedad (S y E) para ambas tandas (t1 y t2) de evaluación.	57
4.2 Evaluación de las características productivas, morfológicas y fenológicas	59
4.2.1 Variable productiva: rendimiento de peso seco (PS).	59
4.2.2 Variable morfológica: altura total (HT)	61
4.2.3 Variable morfológica: número de Tallos (nT)	63
4.2.4 Variable morfológica: distancia media de entrenudos (dN).....	64
4.2.5. Variable de calidad forrajera: relación hoja / tallo (RHT)	66
4.2.6 Variable: estadio fenológico ponderado (EFP)	68
4.3 Índice de severidad por genotipo (ISG) y su relación con el COU, con las variables estudiadas y con la evolución de la enfermedad del CVA.....	69
4.3.1 Índice de severidad por genotipo (ISG):	69
4.3.2 Relación entre el ISG y el cambio de contenido de COU entre condiciones E y S ..	71
4.3.3 Correlación entre las diferencias del contenido de COU, de ISG y de características morfo-fenológicas y productivas de las condiciones S y E en cada cultivar	72
CAPITULO 5	79
DISCUSIÓN GENERAL	79
5.1 Contenido de COU en alfalfa cultivada en Argentina.	80
5.2 Respuesta de la planta de alfalfa a la infección viral: Producción de COU	81
5.3 Variables morfológicas, fenológicas y productivas:.....	83
5.4 Índice de severidad por genotipo (ISG) y su relación con el COU y con las variables morfo-fenológicas y productivas.....	85
CAPÍTULO 6	90
CONCLUSIONES GENERALES	90
NUEVOS INTERROGANTES QUE SURGEN DE ESTA TESIS.....	93
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	95

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Genotipos desarrollados correspondientes a los cultivares Monarca y Traful.....	27
Tabla 2. Valores de absorbancia en las plantas madres (PM) correspondientes a la condición S (libre de infección del CVA) para la detección del AMV a las 2 y 24h de incubación.	32
Tabla 3. Valores de absorbancia de las plantas madres (PM) en la condición enfermedad E en genotipos de los cultivares Monarca y Traful.....	33
Tabla 4: Condiciones cromatográficas del método de determinación de coumestrol.	37
Tabla 5: Fecha de corte de las tandas 1 y 2 de ensayo conducido en condiciones de invernadero.	54
Tabla 6: Genotipos desarrollados en los cultivares Monarca y Traful evaluados en las dos tandas (t1 y t2) del ensayo en condiciones de invernadero.	55
Tabla 7: Contenido de COU en genotipos de los cultivares Monarca y Traful determinado en dos condiciones de virosis (S y E) en el corte 1 de ambas tandas de evaluación (t1 y t2) evaluadas.	56
Tabla 8: Contenido de COU (en ppm) de cada genotipo de los cultivares Monarca y Traful en cada condición de enfermedad (S y E) y en ambas tandas de evaluación (t1 y t2). Se incluye el porcentaje de incremento (I %) de la variable entre las condiciones S y E.....	58
Tabla 9: Contenido de PS ($\text{g}\cdot\text{genotipo}^{-1}$) de cada genotipo de los cultivares Monarca y Traful en cada condición de enfermedad (S y E) y en ambas tandas de evaluación (t1 y t2). Se incluye el porcentaje de disminución (D %) de la variable entre las condiciones S y E.....	61
Tabla 10: Altura total (HT) en dos cultivares de alfalfa (Monarca y Traful) en dos condiciones de enfermedad (S y E) y en dos tandas de evaluación (t1 y t2).....	62
Tabla 11: Altura Total (HT), expresada en cm, de cada genotipo de los cultivares Monarca y Traful en cada condición de enfermedad (S y E) y en ambas tandas de evaluación (t1 y t2). Se incluye el porcentaje de disminución (D %) de la variable entre las condiciones S y E.....	62
Tabla 12: Número de tallos (nT) de cada genotipo de los cultivares Monarca y Traful en cada condición de enfermedad (S y E) y en ambas tandas de evaluación (t1 y t2). Se incluye el porcentaje de disminución (D %) de la variable entre las condiciones S y E.	64
Tabla 13: Distancia media de entrenudos (dN) de cada genotipo de los cultivares Monarca y Traful en cada condición de enfermedad (S y E) y en ambas tandas de evaluación (t1 y t2). Se incluye el porcentaje de disminución (D %) de la variable entre las condiciones S y E.....	66
Tabla 14: Relación hoja / tallo (RHT) de cada genotipo de los cultivares Monarca y Traful en cada condición de enfermedad (S y E) y en ambas tandas de evaluación (t1 y t2). Se incluye el porcentaje de incremento / disminución (I / D %) de la variable entre las condiciones S y E..	67
Tabla 15: Estadio fenológico ponderado (EFP) de cada genotipo de los cultivares Monarca y Traful en cada condición de enfermedad (S y E) y en ambas tandas (t1 y t2) de evaluación. Se incluye el porcentaje de incremento / disminución (I / D %) de la variable entre las condiciones S y E.	69
Tabla 16: Índice de severidad para cada genotipo (ISG) correspondiente a la condición E.	70

Tabla 17: Correlación lineal de Pearson (r) entre las diferencias promedio (valor en la condición S – valor en la condición E) de las variables para el cultivar Monarca.	73
Tabla 18: Correlación lineal de Pearson (r) entre las diferencias promedio (valor en la condición S – valor en la condición E) de las variables para el cultivar Trafal.	73
Tabla 19: Análisis de sendero para las variables ISG y COU en el cultivar Monarca.....	74
Tabla 20: Análisis de sendero para las variables ISG y COU en el cultivar Trafal	74

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mirada desde la ecología. Síntomas desde el mutualismo a la patogenicidad observados en el hospedante como consecuencia de la interacción planta-virus.....	8
Figura 2: Planta de alfalfa con síntomas del complejo viral del achaparramiento.....	11
Figura 3: Deformaciones en las hojas.	12
Figura 4: Similitud entre el coumestrol y estradiol	15
Figura 5: Estructura química de aglicona de isoflavona y sus respectivos glicósidos.	15
Figura 6: Estructura química de los principales coumestranos.....	16
Figura 7: Estructura química de los isoflavonoides. Daidzeina, Genisteina, Formononetina y Biochanina A.....	17
Figura 8: Degradación por los microorganismos del rumen del isoflavonoide formononetina a daidzeina y equol.....	19
Figura 9: Degradación por los microorganismos del rumen del isoflavonoide biochanina A a genisteina.....	20
Figura 10: Obtención de plantas madres y trasplante de plantas madres de los cultivares Monarca y Trafal.....	24
Figura 11: Obtención de clones de alfalfa a partir de plantas madres (PM) utilizando arena como sustrato de enraizamiento.	25
Figura 12: Optimización del clonado con vermiculita y perlita.....	26
Figura 13: Confirmación del rhabdovirus en la planta A25 como fuente de inóculo mediante la técnica RT-PCR.	28
Figura 14: Secuencia de injerto en planta madre libre de la enfermedad del CVA.	29
Figura 15: Planta de alfalfa injertada con síntomas visibles de CVA.....	30
Figura 16: Ausencia de fragmento 964 pb del ADV en los genotipos de PM desarrollados. ...	34
Figura 17: Confirmación del ADV en plantas injertadas y con los síntomas del CVA.	35
Figura 18: Confirmación del ADV en plantas injertadas y con síntomas del CVA.....	35
Figura 19: Curva de calibración de Coumestrol.....	38
Figura 20: Efecto matriz del fitoestrógeno COU.....	39
Figura 21: Cinética de degradación del COU y prueba de BHT del cultivar Monarca.....	40
Figura 22: Cinética de degradación del COU y prueba de BHT del cultivar Trafal.....	41
Figura 23: Optimización de trasplante con macetas de germinación y lombricompost y trasplante a macetas de 4L.....	42
Figura 24: Esquema del ensayo en invernadero. Disposición de las condiciones S y E en las mesadas y de las tandas t1 y t2.....	44
Figura 25: Relación entre los grados de severidad (ISG) y la variable nT.....	47
Figura 26: Relación entre los grados de severidad y el atributo PS g.genotipo ⁻¹ por planta.....	48
Figura 27: Grados de severidad identificados para el complejo viral del achaparramiento.....	49
Figura 28: Ubicación de las plantas en las mesadas del invernadero y vista general del ensayo	53

Figura 29: Contenido de COU en dos cultivares (Monarca y Trafal) y en dos condiciones (S y E), considerando los 6 cortes realizados en las tandas 1 y 2 evaluadas..	57
Figura 30. Efecto provocado por el CVA sobre el contenido medio de peso seco (PS expresado en $g \cdot genotipo^{-1}$) en dos cultivares de alfalfa (Monarca y Trafal) en dos condiciones de enfermedad (S y E) y en dos tandas de evaluación (t1 y t2).	60
Figura 31: Efecto del CVA sobre el número de tallos (nT) en dos cultivares (Monarca y Trafal) en dos condiciones de enfermedad (S y E)..	63
Figura 32: Efecto del CVA sobre la variable distancia media de entrenudos (dN) en dos cultivares (Monarca y Trafal), en dos condiciones de enfermedad (S y E) y en dos tandas (t1 y t2) de evaluación.	65
Figura 33: Efecto del CVA sobre la variable relación hoja/tallo (RHT) en dos cultivares (Monarca y Trafal) y en dos tandas (t1 y t2) de evaluación.	67
Figura 34: Efecto del CVA sobre el estadio fenológico ponderado (EFP) en dos condiciones	68
Figura 35: Índice de severidad por genotipo (ISG %) para los cultivares Monarca y Trafal. ..	70
Figura 36: Índice de severidad por genotipo en función del cambio en el contenido de COU generado por la infección viral (E-S ppm) para dos cultivares de alfalfa..	71
Figura 37: Índice de severidad por genotipo (ISG %) en función del contenido de Coumestrol (COU ppm) para los genotipos de los cultivares Monarca (M10, M11, M18, M23, M29, M36, M37) y Trafal (T141, T124, T140, T129, T112, T152).	72
Figura 38: Análisis de componentes principales en los cultivares de alfalfa (Monarca y Trafal) y bajo dos condiciones de enfermedad (S y E).	76
Figura 39: Análisis de componentes principales en genotipos de alfalfa de los cultivares Monarca y Trafal en dos condiciones de enfermedad (S y E).	77
Figura 40: Principales aportes que surgen del trabajo de tesis.	92

ABREVIATURAS

ADV= alfalfa dwarf virus
AEV-1= alfalfa enamovirus 1
ALCV-Arg= alfalfa leaf curl virus -Arg
AMV= alfalfa mosaic virus
ANA = ácido naftalenacético
BLRV= Bean leaf roll virus
COU= coumestrol
C°= grados centígrados
c= corte (fecha de evaluación)
cv= cultivar
cvs= cultivares
CVA= complejo viral del achaparramiento
cm=centímetro
dif-Prom= diferencia promedio
dN= distancia media de entre nudos.
E= Condición “E” (planta infectada con complejo viral del achaparramiento)
EE= error estándar
ELISA= *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, por sus siglas en inglés
EFP: estadio fenológico ponderado.
G= grados de severidad
HT = altura total de planta
h= hora
ISE= Índice de Severidad
ISG= Índice de Severidad por genotipo
L= Litro
LC= Límite de cuantificación
LD= Límite de detección
M= Monarca SP INTA
N= cantidad de tallos en ese estado
n= número
nN= número total de nudos
nT= número de tallos por conteo directo
PM= planta madre
Ppm= parte por millón
PS= peso seco
Ps-Hoja: peso en gramos de la fracción hoja por planta
Ps-Tallo: peso en gramos de la fracción tallos por planta;
Prom: valor promedio
p/v= peso/volumen
RHT= relación hoja / tallo
S= planta sana (sin la infección del complejo viral del achaparramiento)
ST= suma térmica
T= Traful PV INTA
TE=testigo enfermo

TS=testigo sano

máx: máxima

mín: mínima

t1= tanda 1

t2= tanda 2

v/v= volumen/volumen

W=watts

Ø= Diámetro

RESUMEN

Las plantas de alfalfa responden a diferentes factores de estrés estimulando la producción de dos tipos principales de compuestos: los coumestranos y los isoflavonoides. Los primeros presentan mayor importancia por su potencial actividad estrogénica en los animales que consumen alfalfa. Asimismo, los niveles de estos compuestos se pueden incrementar en los tejidos vegetales cuando se encuentran infectados por diferentes patógenos. El objetivo de esta tesis fue analizar la producción del fitoestrógeno coumestrol (COU) en plantas de alfalfa como respuesta a la infección del complejo viral del achaparramiento (CVA) y su relación con los síntomas provocados por el mismo. Para ello, se trabajó con clones de genotipos de los cultivares (*cvs*) de alfalfa: Monarca SP INTA (M10, M11, M18, M23, M29, M36 y M37) y Trafal PV INTA (T112, T124, T129, T140, T141 y T152) y en dos condiciones de enfermedad: S: sano (sin infección viral) y E: enfermo (co-infección del alfalfa mosaic virus y alfalfa dwarf virus). El contenido de COU total (aglicona + COU conjugado) se extrajo en medio ácido y se determinó a través de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Además, se evaluó el efecto de la virosis sobre varias características morfológicas, fenológicas y productivas y sobre el índice de severidad por genotipo (ISG) en seis cortes realizados a los 380 grados-día de suma térmica. Se detectó COU constitutivo (basal) en la condición S en la mayoría de los genotipos de ambos *cvs*, con valores que fueron desde el límite de cuantificación (LC: 0,48 ppm) hasta los 1210 ppm. Según el contenido basal de COU, los genotipos se clasificaron en los siguientes niveles: no detectable (< 0,48 ppm), bajo (0,48-500 ppm), medio (501-950 ppm) y alto (\geq 951 ppm). La infección con el CVA se correlacionó directamente con el aumento en el contenido de COU en la mayoría de los genotipos, independientemente del cultivar al que pertenecieran, con incrementos del 14% al 28% en algunos casos. Esto constituye una información inédita para el cultivo de alfalfa en Argentina. A nivel de genotipos individuales de ambos cultivares, el CVA disminuyó el peso seco, la altura total de las plantas, el número de tallos y la distancia media de entrenudos; tendió a retrasar el desarrollo fenológico; y aumentó la relación hoja/tallo, sin que esto signifique necesariamente una mejora de la calidad forrajera. Los genotipos M10, M37 y T140 se mostraron más susceptibles al CVA, mientras que los genotipos T112, T124 y T129 mostraron una mayor tolerancia. Como ya se señaló, la virosis estimuló la producción de COU, aunque no todos los genotipos fueron capaces de incrementar significativamente su concentración. En algunos genotipos de Monarca, incrementos de COU mayores a 100 ppm se vieron acompañados por disminuciones en las estimaciones de ISG. También se observó que aquellos genotipos que mostraron valores de COU constitutivo de medio a alto exhibieron menores niveles de daño del CVA, lo que ratificaría el efecto “protector” de este fitoestrógeno frente a situaciones de estrés. La alta variabilidad entre los genotipos de alfalfa evaluados respecto de su producción de COU como reacción a la infección con el CVA, alienta las posibilidades de generar variedades resistentes al CVA y a otros factores de estrés a través de la selección y el entrecruzamiento de genotipos superiores.

Palabras claves: alfalfa, fitoestrógeno, coumestrol, alfalfa mosaic virus, alfalfa dwarf virus.

ABSTRACT

Alfalfa plants respond to different stress factors by increasing the production of two main groups of compounds: coumestrans and isoflavonoids. The first ones are more important because of their potential estrogenic activity for the animals that consume stressed alfalfa plants, particularly the ones affected by different pathogens. The objective of this thesis was to analyze the production of coumestrol (COU) in alfalfa plants as a response to the infection with the dwarf/enation virus complex (CVA) and its relationship with the symptoms of the disease. Cloned genotypes of two alfalfa cultivars, Monarca SP INTA (genotypes M10, M11, M18, M23, M29, M36 y M37) and Trafal PV INTA (genotypes T112, T124, T129, T140, T141 y T152), were assessed under two disease conditions: non-infected (S) and infected (E) with both alfalfa mosaic virus y alfalfa dwarf virus. Total COU content (aglycone + conjugated COU) was extracted in an acidic media and quantified by high resolution liquid chromatography (HPLC). On every clone, virus effect on several morphological traits, phenology, forage yield, and disease severity index (ISG) was estimated over six cuts. Cuts were performed every time plants reached 380°C-day. Constitutive o basal COU (no infection) was determined in the vast majority of genotypes regardless cultivar of origin, with values that ranged from below the quantification level (0,48 ppm) to 1,210 ppm. According to their constitutive COU content, genotypes were classified as non-detectable (<0,48 ppm), low (0,48 to 500 ppm), medium (501-950 ppm) and high (\geq 951 ppm). CVA infection increased COU production in most of the clones of both cultivars, reaching increments of 14% to 28% in some cases. There is no record of this type of information in Argentina. In comparison to the same clones in the S condition, CVA not only decreased DM production (yield), plant height, number of stems and internode distance, but also delayed maturity (stage of development) and increased leaf/stem ratio. The latter does not necessarily mean an increase on forage quality. Genotypes M10, M37 and T140 were more susceptible to the virus complex, while genotypes T112, T124 and T129 were more tolerant. CVA stimulated COU production, even though not all the genotypes were able to do to a significant level. In some Monarca genotypes, increases of COU > 100 ppm were corresponded with decreases in the disease severity index. Genotypes with medium to high constitutive COU levels showed a trend to be less affected by the CVA, and thus supporting the putative “protective” effect to this phytoestrogen before stress situations. The high variability among genotypes for COU stimulation as a reaction to the virus complex, encourages the potential for developing CVA resistant varieties –and/or other stress factors- through selection and intercrossing of superior individuals.

Keywords: alfalfa, phytoestrogen, coumestrol, alfalfa mosaic virus, alfalfa dwarf virus.

RECURSOS FINANCIEROS PARA LA REALIZACIÓN DE LA TESIS.

Programa de capacitación y perfeccionamiento resolución 1029/2012. INTA.

CAPÍTULO 1:

INTRODUCCIÓN GENERAL

La alfalfa es la planta forrajera más antigua e importante a nivel mundial. Perteneció a la familia de las leguminosas (Fabaceae), siendo originaria de Asia Menor, Cáucaso meridional, Irán y tierras altas del Turkmenistán. El nombre común "alfalfa" se refiere a la especie principal *Medicago sativa* subsp. *sativa*, pero también puede aludir a *M. sativa* subsp. *falcata* y *M. sativa* subsp. *x varia* (un híbrido entre subsp. *sativa* y subsp. *falcata*) que está estrechamente relacionada con la morfología de *M. sativa* (Li y Brummer, 2012; Shi *et al.*, 2017). La alfalfa es un cultivo perenne, de flores perfectas y fecundación preponderantemente alógama, favorecida por mecanismos de autoesterilidad y autoincompatibilidad. Posee una extraordinaria variabilidad genética, enriquecida por la introgresión de las especies que conforman el «complejo *Medicago sativa*», lo que le otorga una gran capacidad de adaptación a las más diversas condiciones de suelo, clima y manejo (Basigalup, 2007; Li y Brummer, 2012; Annicchiarico, 2015a; Shi *et al.*, 2017). Considerando su estructura genética, la alfalfa se define como polimórfica, con 8 cromosomas como número básico ($x = 8$) y con formas diploides ($2n = 2x = 16$) y tetraploides ($2n = 4x = 32$). La naturaleza autotetraploide de la alfalfa cultivada tiene implicancias en su mejoramiento, dada la compleja herencia de sus caracteres (Flajoulot *et al.*, 2005; Basigalup, 2007; Bouton, 2012; Li y Brummer, 2012; Annicchiarico, 2015a). Los procesos de selección se complican debido a la formación en la meiosis de gametos diploides, que impiden la libre asociación entre todos los alelos en la primera generación de síntesis. La población que se obtiene de un cruzamiento alcanza el equilibrio luego de la cuarta generación de apareamientos al azar, por lo que es necesario manejar un gran número de individuos por población para tener todos los genotipos posibles; aun así, las segregaciones extremas se producen con frecuencias tan bajas que es sumamente factible perderlas durante los procesos de multiplicación (Maynar y Martínez Martínez, 1985; Flajoulot *et al.*, 2005; Basigalup, 2007; Herrmann *et al.*, 2010; Annicchiarico, 2015a).

La herencia de la alfalfa se caracteriza por altos niveles de polimorfismo dentro y entre poblaciones, siendo mayor la variabilidad intrapoblacional que entre poblaciones (Flajoulot *et al.*, 2005; Basigalup, 2007; Nagl, *et al.* 2011; Annicchiarico *et al.*, 2015b). En alfalfa, la mayoría de los nuevos cultivares son poblaciones sintéticas, generadas por el cruzamiento de individuos superiores, formando poblaciones heterogéneas de individuos heterocigotos (Flajoulot *et al.*, 2005; Bouton, 2012; Ahsyee *et al.*, 2013; Qiang, *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2018). Cuando la selección involucra a más de 100 individuos, los sintéticos se denominan de base amplia, nominación que comenzó a emplearse a partir de los años 70's y que busca generar la máxima heterocigosidad para las interacciones intra-alélicas (Bouton, 2012). Cuando el sintético involucra a unos pocos individuos o genotipos se denomina de base angosta. En todos los casos, los análisis de diversidad genética y estructura poblacional son importantes para conocer la pureza genética de la semilla, el manejo de germoplasma y la identificación y diferenciación de cultivares. En la actualidad, la implementación de herramientas moleculares agiliza el proceso de selección de genotipos superiores en relación a los métodos convencionales (Flajoulot, *et al.*, 2005; Bouton, 2012; Ahsyee *et al.*, 2013; Qiang *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2018).

Otra característica importante de la alfalfa es la imposibilidad práctica de obtener “líneas puras” a través del desarrollo de líneas endocriadas para la obtención de híbridos, derivada de su alta sensibilidad a la endogamia. La obtención de variedades de alto rendimiento se logra inter cruzando progenitores no endocriados ni relacionados (Flajoulot *et al.*, 2005; Basigalup, 2007; Arolfo *et al.*, 2011; Bouton, 2012; Li y Brummer, 2012; Annicchiarico, 2015a). Herrmann *et al.* (2010) señalan que 40 genotipos es una cantidad óptima para representar la mayor parte de la diversidad genética presente en una población de alfalfa, mientras que 20 genotipos permiten diferenciar a dos poblaciones. Asimismo, los autores indican que 10 genotipos por población es un número limitado para encontrar diferencias entre dos poblaciones y se corre el riesgo de excluir alelos raros presentes en una o ambas poblaciones. Sin embargo, en un estudio en el cual no se pretende estimar la diversidad genética, el número de genotipos por población a evaluar debería ser el resultante de la combinación entre los costos del ensayo, una cantidad razonable de trabajo y la fiabilidad del conjunto de datos.

A nivel mundial, los programas de mejoramiento de alfalfa se orientaron principalmente hacia la resistencia a enfermedades, el valor nutritivo del forraje y la adaptación a las diferentes condiciones ambientales (temperatura, suelo, precipitaciones, etc.) (Flajoulot *et al.*, 2005; Basigalup, 2007; Li y Brummer, 2012; Bouton, 2012; Shi, *et al.*, 2017). Para mejorar el nivel de resistencia a plagas (enfermedades e insectos dañinos), la metodología es identificar y seleccionar las plantas individuales de una población que posean genes de resistencia. Luego, a través de un proceso de selección fenotípica recurrente, esas plantas son interpolinizadas a fin de cosechar la semilla que dará origen a una nueva población con una frecuencia mayor de plantas resistentes, incrementando la frecuencia de alelos resistentes con cada ciclo de selección. El empleo de un número de plantas lo suficientemente grande es fundamental para minimizar la futura pérdida de vigor por endocría. Una consecuencia de la herencia autotetraploide en alfalfa es que cuando la resistencia está condicionada por un solo gen dominante, la rapidez de la respuesta a la selección dependerá de la frecuencia inicial del gen en cuestión (Flajoulot *et al.*, 2005; Basigalup, 2007; Li y Brummer, 2012). Por el contrario, si el carácter a mejorar está condicionado por un gen recesivo, se deben seleccionar sólo los genotipos deseables, dado que la inclusión de genotipos indeseables (“escapes”) puede retrasar notoriamente el progreso de la selección (Basigalup y Odorizzi, 2011). Otra ventaja comparativa de la especie, desde el punto de vista de la evaluación de genotipos, es la facilidad de clonar individuos a partir del enraizamiento de trozos de tallo, utilizando comúnmente arena o vermiculita como sustrato para el enraizamiento. El uso de sustancias promotoras del crecimiento radical no siempre es necesario para la obtención de buenos resultados; por el contrario, la elección de tallos sanos, vigorosos y en activo crecimiento, resulta un factor crítico para conseguir altos porcentajes de enraizamiento. En un programa de mejoramiento, la clonación puede facilitar la evaluación de genotipos para algunos caracteres cuantitativos aunque presenta un costo alto y una gran demanda de trabajo adicional (Basigalup, 2007; Annicchiarico, 2015a). La clonación de individuos también es una herramienta que permitiría valorar la respuesta individual de cada genotipo frente a alguna condición de estrés o enfermedad.

1.1 La alfalfa en Argentina

La alfalfa (*Medicago sativa* L.) es la especie forrajera más importante de la Argentina y es utilizada como un alimento básico en la producción ganadera (Basigalup y Rossaningo, 2007). Tiene un área de siembra que durante la campaña 2018 se estimó en 3,2 millones de ha, de las cuales 60% son de cultivos puros y 40% de mezclas con gramíneas templadas (Basigalup *et al.*, 2018a). Mientras que los primeros son destinados básicamente a la producción de leche bovina y heno, las mezclas son utilizadas preferentemente para la producción de carne bovina. La alfalfa conocida, como la “reina de los forrajes”, se destaca por sus altos rendimientos de materia seca y contenido de proteínas que le confieren una excelente calidad forrajera. A nivel ecológico presenta gran adaptabilidad a diversas condiciones ambientales, además de la capacidad para la fijación de nitrógeno atmosférico a través de su asociación con bacterias (rizobios) que forman nódulos en las raíces (Flajoulot *et al.*, 2005; Basigalup, 2007; Bouton, 2012; Shi *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2018). Otro de los usos de la alfalfa es en la dieta humana, sea en forma de “brotes de alfalfa” para ensalada como suplementos nutricionales o extractos, entre otros (Bouton, 2012; Kumar *et al.*, 2018). Además, la alfalfa posee componentes bioactivos como los fitoestrógenos que según cómo, cuánto y quién los consuma pueden ejercer su función como agonistas o antagonistas, una dualidad entre el riesgo-beneficio de su consumo (Cortés *et al.*, 2016; Butkute *et al.*, 2018). En la Región Pampeana, donde la alfalfa representa el 58% de las forrajeras, el cultivo se realiza casi exclusivamente en secano. En la Provincia de Buenos Aires, se produce mayormente en pasturas polifíticas (en consociación con gramíneas anuales o perennes), mientras que en la Provincia de Córdoba se produce mayormente en pasturas monolíticas (puras) (Basigalup, 2018b). En cuanto al destino de la producción, unas 850.000 ha fueron cortadas durante el 2017 para henificación, ya sea como fardos, rollos o megafardos (Basigalup, 2016; Basigalup *et al.*, 2018a). El comercio mundial de heno de alfalfa creció a lo largo de la última década, alcanzando en 2017 los 6.1 millones de toneladas; en ese contexto, la contribución de Argentina fue sólo de 0,7%. Si bien éste último conforma una contribución marginal, el país está gradualmente mejorando sus precios de exportación y disminuyendo la brecha con los principales países exportadores. Tanto la producción de rollos, sistema que lidera el formato de conservación de la alfalfa, como el de los megafardos, permiten disponer de una oferta de forraje estable en calidad y cantidad con altos niveles de proteína y fibra digestible a lo largo del tiempo (Urrets Zavalía, 2018). Lamentablemente, en el mercado

doméstico la calidad comercializada es todavía de media a baja, principalmente porque la evaluación se basa en criterios organolépticos subjetivos como color, presencia de hojas, olor, etc., en lugar de criterios objetivos, como el contenido de materia seca, proteína cruda, valor nutritivo relativo, proporción de fibra y digestibilidad de la materia seca. (Basigalup *et al.*, 2018a).

Un evento significativo para la producción de heno de alfalfa fue la creación de la Cámara Argentina de la Alfalfa (CAA) en 2017, institución privada que busca nuclear a los productores de heno, pellets y cubos de todo el país. Sus principales objetivos son promover el cultivo, definir las mejores prácticas de manejo, establecer la trazabilidad del sistema y generar productos de más alta y más uniforme calidad tanto para el mercado interno como para el internacional, promoviendo un protocolo de toma de muestras y de análisis en laboratorios calificados. Asimismo, en base a la sólida demanda de Asia y Oriente Medio, Argentina tiene la oportunidad de incrementar la producción de heno de alfalfa de alta calidad e incorporar productos de mayor valor agregado. De este modo los estándares internacionales mejorarían la calidad del mercado interno, favoreciendo subsecuentemente a la cadena de producción ganadera de Argentina. Además, es necesario definir estrategias de diversificación de la producción, maximizando las capacidades geográficas y beneficiando el desarrollo de otras zonas productoras en Argentina, como Santiago del Estero y Patagonia (Antuña, 2017; Basigalup *et al.*, 2018a). La innovación de procesos industriales, como la construcción de plantas de desecación, y la ampliación de la oferta de la alfalfa como componente base en dietas para animales (vacas, ovejas, cerdos y aves de corral) impulsa nuevos desafíos para el cultivo de alfalfa. Por otra parte, la producción de leche se dirige hacia modelos de producción a gran escala, donde el pastoreo se reemplaza progresivamente por sistemas de confinamiento, y el heno de alfalfa pasaría a ser proporcionados por terceros, promoviendo la necesidad de alimentos de alfalfa de mayor calidad (Basigalup *et al.*, 2018a). A lo largo de la cadena de producción, sea cual fuere la forma de producción o consumo, lo relevante es que el cultivo de alfalfa se encuentre libre de enfermedades y presente una alta calidad, sea resaltando sus componentes nutricionales, disminuyendo -si los hubiera- los componentes anti-nutricionales y/o promoviendo el agregado de valor de los compuestos bioactivos presentes en el forraje.

1.2. Factores bióticos de estrés

Como se mencionó anteriormente, la naturaleza perenne de la alfalfa la expone a la presión de numerosos agentes abióticos (salinidad, acidez, sequía, anegamiento, etc.) y bióticos (herbívoros, microorganismos y plantas que tienen un efecto negativo sobre la producción agrícola) (Bouton, 2012; Ryalls *et al.*, 2013; Odorizzi, 2015; Shi *et al.*, 2017). De estos últimos, las plagas que atacan a la alfalfa involucran a más 100 de especies de insectos. En Argentina, entre 80 y 90% del daño a la alfalfa es provocado por cuatro grupos de insectos: orugas defoliadoras, orugas cortadoras, gorgojos y pulgones (Aragón e Imwinkelried, 2007; Imwinkelried *et al.*, 2013). Los “pulgones” o “áfidos” (Hemiptera: Aphididae) son las plagas de alfalfa de mayor importancia a nivel mundial, pudiendo mencionar especialmente al “pulgón manchado de la alfalfa” (*Therioaphis trifolii*), al “pulgón azul” (*Acyrtosiphon kondoi* Shinji), al “pulgón verde de la alfalfa” (*A. pisum* Harris) y al “pulgón negro” (*Aphis craccivora* Koch). Los áfidos poseen una alta tasa reproductiva (varias generaciones superpuestas por año), lo que les permite expandirse rápidamente en condiciones óptimas, facilitada además por la existencia de reproducción asexual (partenogénesis) (Ryalls *et al.*, 2013; Imwinkelried *et al.*, 2013). Investigaciones recientes simulan escenarios de ecosistemas futuros aumentando el dióxido de carbono atmosférico y la temperatura (solos y en combinación), registrando los efectos de estos factores sobre la nodulación y el crecimiento de las plantas de alfalfa, y sobre la abundancia y el éxito de la colonización del pulgón verde (Ryalls *et al.*, 2017; Johnson *et al.*, 2018). Estos trabajos concluyen que es fundamental estudiar las respuestas a estos cambios para prever el funcionamiento de los ecosistemas futuros y mantener la productividad de las leguminosas, teniendo en cuenta que los insectos herbívoros representan el 25% de las especies del planeta. Las formas tradicionales de control de pulgones en alfalfa son el uso de cultivares resistentes y la aplicación de insecticidas. No obstante, estos últimos aumentan los costos de producción y tienen efectos ambientales negativos. Además, los pulgones poseen la capacidad de superar la resistencia de la planta huésped y desarrollar resistencia a los insecticidas a través de la evolución de nuevos biotipos de pulgones o razas huésped (Ryalls *et al.*, 2013). La emergencia de áfidos resistentes a las aplicaciones de insecticidas limita las opciones de manejo a los productores de alfalfa. En este sentido, Ryalls *et al.* (2013) apuntan a investigar la biología de los áfidos de la alfalfa para desarrollar estrategias alternativas, como el control biológico. Este permitiría el manejo de estas plagas maximizando la seguridad y el desarrollo sostenible del

cultivo de alfalfa, así como también identificar cultivares resistentes para disminuir el uso de insecticidas. Estimaciones indican que los pulgones de la alfalfa provocan pérdidas de alrededor del 25%, reduciendo la calidad y cantidad de la alfalfa producida. Otro efecto negativo de los pulgones es la capacidad de transmitir virus a las plantas (Ryalls *et al.*, 2013; Imwinkelried *et al.*, 2013; Alexander, *et al.*, 2014; Mauck, 2016; Roossinck, 2015; Chesnais *et al.*, 2019), además de la inoculación de toxinas, crecimiento secundario de hongos, ingestión directa de nutrientes de las plantas y excreción de la ligamaza (líquido azucarado secretado por los pulgones durante la alimentación con la savia) (Ryalls *et al.*, 2013). Cabe aclarar que los pulgones no son los únicos que transmiten virus a las plantas; esto también pueden hacerlo artrópodos herbívoros, nematodos y hongos fitófagos. No obstante, los áfidos (Aphididae) y las moscas blancas (Aleyrodidae: *Trialeurodes vaporariorum*) tienen la capacidad de transmitir el mayor número de especies de virus. La mayoría de las virosis se transmiten activamente por vectores a plantas sanas en cuestión de segundos, horas o días (Gergerich y Dolja, 2006; Roossinck, 2015). Algunos virus se transmiten a partir de plantas infectadas cuando éstas son propagadas vegetativamente, como por ejemplo a través de tubérculos o injertos. Además, puede haber transmisión “vertical” a partir de semillas o polen de plantas infectadas, siendo esta característica importante para la supervivencia invernal de los virus (Gergerich y Dolja, 2006).

1.3. Relación vector-virus-hospedador

Se han registrado más de 2.000 especies de virus, muchas de los cuales causan enfermedades importantes en diversas especies de las plantas cultivadas que son utilizadas por los humanos para alimento y / o fibra (Whitfield *et al.*, 2015). Roossinck (2015) hace referencia a investigaciones en metagenómica sobre biodiversidad de virus de plantas, revelando la abundancia de los virus vegetales, incluso en las plantas silvestres, desde los trópicos a la Antártida, considerando que ninguna planta es una isla y que en las interacciones se incluyen a virus, hongos, bacterias, insectos y otras especies vegetales. Los virus pueden afectar a las plantas tanto de manera positiva como negativa. Aunque la mayoría de los estudios en virología se centraron en virus patógenos, una mirada más amplia revela interacciones más complejas y estables, especialmente en las comunidades de plantas silvestres. Según Roossinck (2015), los virus son considerados como simbiosistas, definidos como actores de una asociación entre dos

entidades disímiles que viven en una relación íntima de una con la otra. Los simbiosntes caen en un continuo de relaciones que van desde el mutualismo a la patogenicidad, y los virus pueden moverse entre las opciones de estos estilos de vida según las condiciones ambientales de la planta hospedadora anfitriona (Roossinck, 2015; Figura 1).

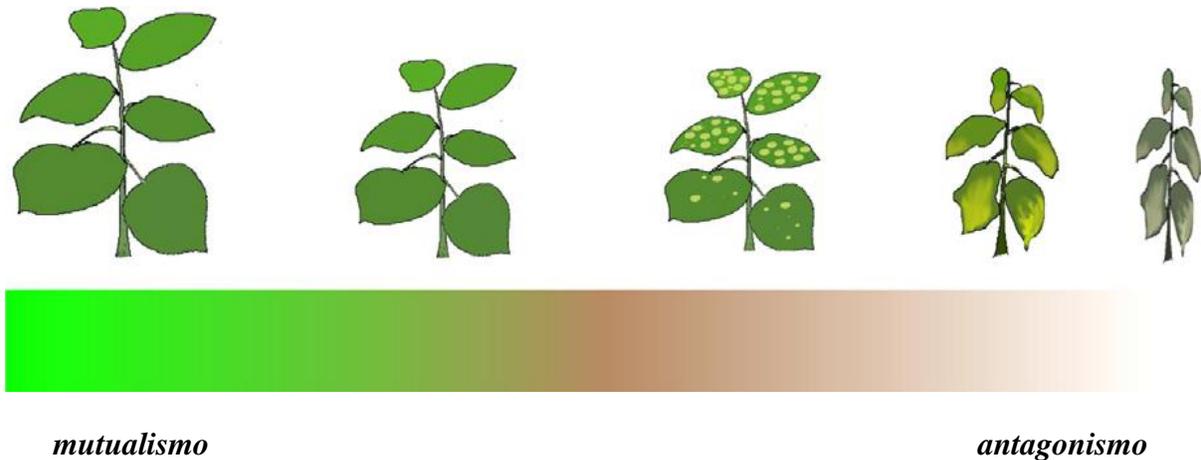


Figura 1: Mirada desde la ecología. Síntomas desde el mutualismo a la patogenicidad observados en el hospedante como consecuencia de la interacción planta-virus. Tomado y modificado de Roossinck (2015).

Las plantas silvestres albergan una amplia diversidad de virus, algunos de los cuales son capaces de pasar a los cultivos agrícolas. Esta frontera entre las comunidades silvestres y las agrícolas representa una interfaz agroecológica, que puede estar poblada con plantas de cultivo, malezas de sistemas de cultivos y plantas que no son de cultivos y que varían de origen exótico a nativo (Alexander *et al.*, 2014). La mayor parte del conocimiento sobre las interacciones planta-virus proviene de virus que infectan un pequeño subconjunto de especies de plantas (plantas de cultivo y anuales), que prevalecen en plantaciones de baja diversidad (monocultivos) y que tienen fenotipos muy marcados (síntomas; efectos negativos sobre el rendimiento). Las plantas perennes pueden tener interacciones fundamentalmente diferentes con los virus debido a su estilo de vida más larga, ciclos entre períodos de inactividad y crecimiento, y un mayor potencial para adquirir más de un virus (coinfecciones) en múltiples estaciones (Alexander *et al.*, 2014). Sin embargo, existe la necesidad de profundizar en la infección viral, cómo afecta la aptitud de las plantas individuales y la dinámica de las poblaciones de plantas. Por otro lado, los

virus pueden alterar la forma en que las plantas hospedadoras interactúan con otros organismos. Por ejemplo, las virosis pueden cambiar los fenotipos de las plantas hospedadoras influyendo en la entrada de los vectores como consecuencia de alteraciones de las señales visuales o de olor que intervienen en la orientación del vector a las plantas (reclutamiento), las señales de calidad o palatabilidad que median el comportamiento de la alimentación (adquisición del virus) y los efectos sobre el movimiento del vector infectado hacia hospedadores susceptibles (transmisión de virus). Los virus circulan y/o se replican en sus vectores y además pueden diferenciar los cambios en el fenotipo de la planta proporcionando a los vectores la capacidad de discriminar entre plantas sanas e infectadas, favoreciendo de este modo una mayor propagación del virus (Mauck *et al.*, 2014; Mauck, 2016; Mauck *et al.*, 2016).

Las enfermedades causadas por virus se han investigado mayormente en las plantas cultivadas, revelando alteraciones fisiológicas que pueden causar, entre otras, disminución de fotosíntesis; alteraciones en el metabolismo de carbohidratos; cambios en la regulación hormonal, el control del ciclo celular y el transporte del virus; modificaciones en las proteínas; etc. (Almási, *et al.*, 2001; Culver y Padmanabhan, 2007). Está bien establecido que los reguladores del crecimiento (*i.e.* hormonas vegetales) desempeñan un rol importante en varios aspectos de la infección de virus y en las enfermedades causadas por éstos (Collum y Culver, 2016). Los virus son capaces de modificar la síntesis y la actividad de algunas hormonas en la planta, principalmente aquellas relacionadas con las defensas, permitiendo así la infección y movimiento exitoso en la planta. Se han documentado diferentes interacciones específicas entre el hospedador y los virus, pudiendo nombrar entre ellas: incrementos en la señalización de auxinas, alteraciones de la respuesta a etileno; inhibición de la síntesis y/o señalización de giberelinas; alteraciones en la respuesta del ácido salicílico y del ácido jasmónico. A su vez, los cambios en las fitohormonas se asociaron con el desarrollo de síntomas de la enfermedad; acumulación viral; movimiento sistémico viral; anulación de la formación de callosa, lo que facilita la transmisión del virus a través de los insectos vectores; mayor beneficio de alimentación de los insectos vectores; mayor susceptibilidad y mayor replicación viral (Collum y Culver, 2016). Estos trabajos se enfocaron en estudiar los efectos de los virus sobre la química de las plantas y el comportamiento del vector en hospedadores de cultivos genéticamente homogéneos y/o en invernadero bajo condiciones controladas. En este sentido, como ya se ha

expresado anteriormente los cultivares de alfalfa -si bien comparten características fenotípicas comunes- son poblaciones de individuos genéticamente distintos. Este hecho, hace que sea posible observar diferente sintomatología (morfológicas, químicas, etc.) al evaluar estos individuos genéticamente diferentes.

Una consecuencia común de la infección por virus es la reducción en la tasa de crecimiento de la planta hospedadora, característica que se refleja en la alta frecuencia de referencias bibliográficas al "enanismo" o "retraso del crecimiento" (Alexander *et al.*, 2014). En estos casos, la susceptibilidad o resistencia a los virus en las especies y cultivares vegetales está determinada principalmente por el genotipo del hospedante. Las plantas poseen diferentes mecanismos para prevenir la infección viral, como impedir la producción de uno o más de los factores requeridos para la reproducción del virus y su dispersión en el hospedante. Otras formas de defensas incluyen la detección y destrucción de células infectadas con el virus a través de la activación de genes de resistencia específicos en la planta, siendo usualmente efectivos solamente contra un virus en particular (Gergerich y Dolja, 2006). Todos estos procesos en su conjunto producen una variedad de síntomas y efectos severos sobre el crecimiento y la productividad vegetal (Goodman *et al.*, 1986; Hull, 2002; Pallas y García, 2011; Al-Shahwan *et al.*, 2017). Diversos estudios (Jones, 2004; Hooks y Fereres, 2006; Schreinemachers *et al.*, 2015; Collum y Culver 2016; Akhter *et al.*, 2019) demuestran que los pulgones y los virus ocasionan daños de variada magnitud en los cultivos agrícolas, incluyendo a la alfalfa, atentando contra la utilidad, la calidad y la persistencia del cultivo.

1.4. Complejo viral del achaparramiento

Desde el año 2010, los alfalfares argentinos se han visto afectados por una virosis inédita que ocasiona daños de considerable magnitud (Lenardon *et al.*, 2010; Odorizzi *et al.*, 2017). Estimaciones preliminares (Lenardon *et al.*, 2010) indicaron que dicha enfermedad presenta una amplia distribución geográfica en el país con presencia en las provincias de La Pampa, Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe, Santiago del Estero, San Juan y Mendoza. Las plantas recolectadas en la zona central de Argentina revelaron que esta nueva virosis era producida por una co-infección del *alfalfa mosaic virus* (AMV) (Trucco *et al.*, 2014) y el *alfalfa dwarf virus* (ADV) (Bejerman

et al., 2011; Bejerman *et al.*, 2015). De acuerdo a datos obtenidos de la provincia de La Pampa, donde se evaluaron 20 lotes de alfalfa en producción, la enfermedad presentó una prevalencia del 90%. A diferencia de las plantas sanas (S) o asintomáticas, las plantas enfermas o infectadas (E) con este complejo viral del achaparramiento (CVA) presentan acortamiento de entrenudos, con la consecuente disminución de la altura de la planta, clorosis y amarillamiento de la lámina foliar producido por AMV (Lenardon *et al.*, 2010) (Figura 2). Además, las hojas muestran arrugamiento, epinastia y engrosamiento de las nervaduras del lado abaxial de los folíolos, lo que origina enaciones de variado tipo (aisladas, “en rosario” y “uña de gato”) y formaciones tipo papilas de distintos tamaños (Figura 3).



Figura 2: Planta de alfalfa con síntomas del complejo viral del achaparramiento. a: vista de la planta entera; b: amarillamiento y deformaciones de las hojas.

Durante la década de 1970, se informó la presencia de una virosis que ocasionaba abultamientos (enaciones o *enations*) en las nervaduras de las hojas, achaparramiento de la planta, atrofia de los tejidos y enrulamiento de hojas en Francia (Alliot y Signoret, 1972; Leclant *et al.*, 1973) y en España (Rodríguez Sardiña y Novales Lafarga, 1973). En un trabajo desarrollado en Arabia Saudita, Cook y Wilton (1984) identificaron al “pulgón negro” (*Aphis craccivora* Koch.) como el vector responsable de la transmisión de la enfermedad, hecho que fue confirmado posteriormente por Delgado Enguita y Calvo (1992). En Francia, Roumagnac *et al.* (2015) observaron plantas de alfalfa con enrollamiento de hojas y concluyeron que estos síntomas

eran ocasionados por el *alfalfa leaf curl virus* (ALCV) y que el “pulgón negro” era el vector de transmisión del virus.

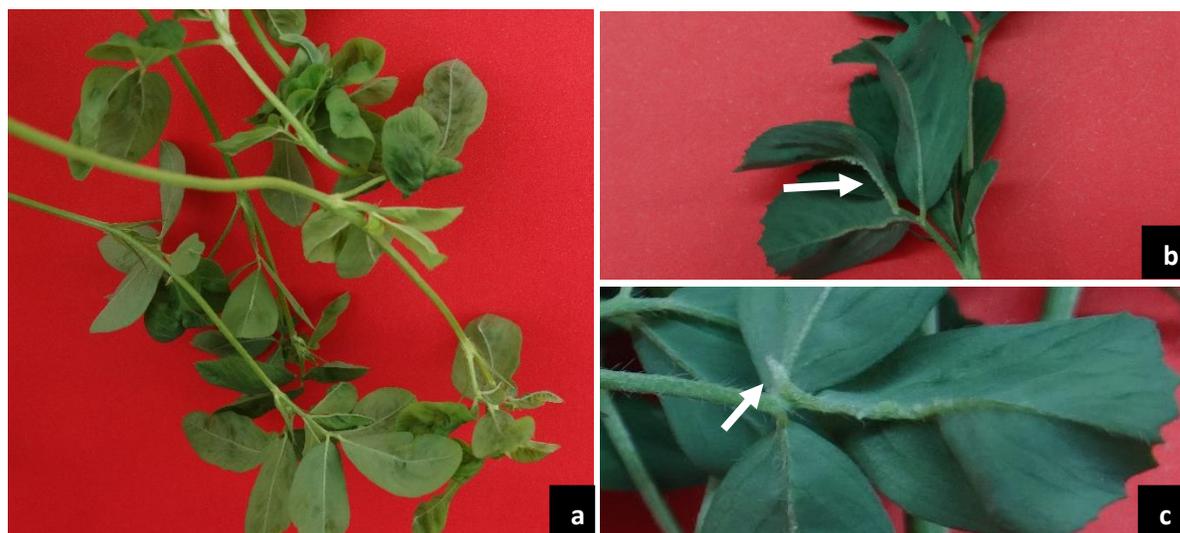


Figura 3: Deformaciones en las hojas. a: epinasta y engrosamiento de las nervaduras en el parte abaxial de los folíolos; b: enaciones; c: formaciones tipo papilas.

Estudios posteriores hechos en Argentina (2010-2017), ampliaron la zona de muestreo a las provincias de Catamarca, Chaco, Entre Ríos, Jujuy, La Rioja, Neuquén, Río Negro, Salta, San Luis, y Tucumán (Trucco *et al.*, 2018). El relevamiento determinó que las plantas con síntomas del CVA, además de estar infectadas con AMV y ADV, poseían también el *bean leaf roll virus* - BLRV (Trucco *et al.*, 2016), el alfalfa enamovirus 1 (AEV-1), el *alfalfa leaf curl virus* (ALCV-Arg) (Bejerman *et al.*, 2018), el medicago sativa *alfapartitivirus 1* (MsAPV1) y medicago sativa *alfapartitivirus 2* (MsAPV2) (Bejerman *et al.*, 2019). Los autores indican que las plantas con síntomas podían estar infectadas con distintas combinaciones virales, aunque la más prevalente era la combinación AMV y ALCV-Arg (Trucco *et al.*, 2017). Es de destacar que el ALCV fue el último virus identificado en alfalfas argentinas (Bejerman *et al.*, 2018).

1.5. Metabolismo secundario como respuesta de defensa de las plantas.

Como se mencionó anteriormente, las plantas poseen diversos mecanismos de defensa, siendo uno de ellos la síntesis de compuestos químicos de bajo peso molecular (metabolitos secundarios), que pueden incrementar sus niveles o bien ser sintetizados *de novo* como respuesta de algún tipo de estrés (Wink, 1988; 2003; 2013; 2018; Bennett y Wallsgrove, 1994;

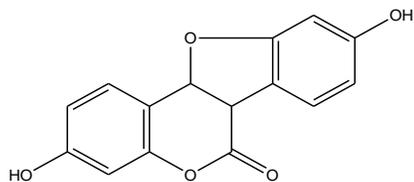
Mazid *et al.*, 2011; Rafinska *et al.*, 2017). Los metabolitos secundarios son a menudo sintetizados estratégicamente y almacenados en células y tejidos adyacentes a la infección. Estas moléculas juegan un importante rol en el mecanismo de defensa de la planta contra patógenos, como así también en las funciones de atracción de animales para la polinización o la dispersión de semillas, funciones metabólicas, etc. (Pierik *et al.*, 2014; Wink, 2018). Dentro de la gran diversidad de metabolitos secundarios se encuentran los flavonoides, isoflavonoides, fenilpropanoides, alcaloides, glucosinolatos, terpenos y cumestranos. Estos compuestos pueden presentar una serie de modificaciones químicas (hidroxilación, metilación, esterificación, glicosilación, entre otras), dando como resultado una gran variedad de perfiles metabólicos con diversas funciones (Wink, 1988; 2013; Girardi *et al.*, 2014; Lelario *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2018). Dichos perfiles muestran una amplia variabilidad entre especies, cultivares, genotipos, poblaciones y dentro de los diferentes órganos de la planta y en las distintas etapas del desarrollo ontogénico (Wink, 1988; 2003; 2013; Girardi *et al.*, 2014; Lelario *et al.*, 2018). Además, estos metabolitos pueden diferir en su toxicidad y actividad biológica, aunque puedan ser químicamente similares o estar relacionados. A los microorganismos patógenos, insectos y/o vertebrados herbívoros, les resulta más difícil infectar o alimentarse de una población de plantas que individualmente contienen mezclas diferentes de estos compuestos, que de una población con una mezcla homogénea en donde los individuos o las especies contienen solo un tipo de molécula de toxina (Wink, 1988; 2018; Sepúlveda-Jiménez, 2004; Mazid *et al.*, 2011). Considerando la variabilidad de compuestos químicos que presentan los metabolitos secundarios, y asumiendo que estos compuestos contribuyen a la protección de las plantas contra microorganismos y herbívoros, los metabolitos secundarios deberían ser tenidos en cuenta al momento de seleccionar plantas resistentes dentro de los cultivos.

Sin embargo, en las especies cultivadas se desarrollan variedades maximizando los rendimientos en combinación con una óptima calidad, resistencia a patógenos, a herbívoros y a factores de estrés ambiental. Los procesos de domesticación no favorecieron los mecanismos de protección original, por ejemplo la acumulación de metabolitos secundarios (Wink, 1988). Si los metabolitos secundarios le otorgan resistencia a la planta pero no son palatables o son tóxicos para el consumo humano, estos compuestos pueden eliminarse de los alimentos procesados por distintos métodos como la cocción, el descascarado u otros. Muchos de los fenoles y terpenos confieren resistencia a microorganismos e insectos y usualmente no son tóxicos para los humanos (Wink,

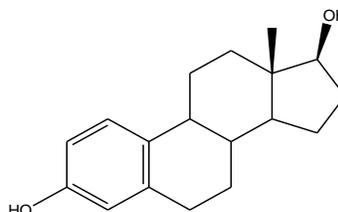
1988). Actualmente, desde la perspectiva de la farmacología evolutiva, los metabolitos secundarios representan una fascinante biblioteca de compuestos bioactivos con una amplia actividad en células humanas, bacterias, hongos, virus y parásitos. Algunos de estos compuestos pueden ser específicos para una o para un número limitado de moléculas blancas, como los alcaloides y los glucósidos cardíacos. No obstante, la mayoría de los metabolitos secundarios presentes en los extractos utilizados en la medicina herbal o “fitomedicina”, como los fenólicos y los terpenoides, son agentes *multi-target* que modulan la actividad de proteínas, ácidos nucleicos y biomembranas de una manera menos específica (Wink, 2015). Numerosas investigaciones realizadas en Australia, EE UU. y México, entre otros países, demostraron en especies forrajeras la presencia de metabolitos secundarios con actividad estrogénica, tanto en animales como en humanos (Hanson *et al.*, 1965; Hall, 1984; Murkies *et al.*, 1998; Perez-Rivero *et al.*, 2007; Njåstad *et al.*, 2014; Reed, 2016). Por lo contrario, en Argentina la información en referencia a compuestos con actividad fitoestrogénica presentes en la alfalfa es prácticamente escasa o nula.

1.6. Fitoestrógenos en pasturas

La importancia de los fitoestrógenos en las plantas forrajeras reside en su semejanza con la hormona sexual estradiol de los mamíferos. En la Figura 4 se puede observar la similitud estructural del estradiol y el fitoestrógeno Coumestrol (COU). De hecho, alrededor de 1960 se observó que animales alimentados con plantas pertenecientes a los géneros *Medicago spp.* y *Trifolium spp.* mostraban efectos estrogénicos, como infertilidad y mastitis en vacas y ovejas (Livingston *et al.*, 1961; Francis y Millington 1965; Hanson *et al.*, 1965; Oldfield *et al.*, 1966; Bickoff *et al.*, 1969; Howarth, 1988). Estudios posteriores indicaron que vacas alimentadas con alfalfa que contenía altas concentraciones de COU manifestaban un síndrome estrogénico caracterizado por abortos repetidos, endometriosis, quistes ováricos e inflamación y agrandamiento uterino (Romero *et al.*, 1997; Muñoz Mendoza *et al.*, 2002; Pérez-Rivero *et al.*, 2007; Lenis Sanin *et al.*, 2010). Adicionalmente, numerosas investigaciones indican que dietas ricas en fitoestrógenos, o extractos de estos compuestos, son beneficiosos para la salud humana (Murkies *et al.*, 1998; Haya *et al.*, 2002; Leyva *et al.*, 2011; Rodríguez *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2016; Wink, 2018).



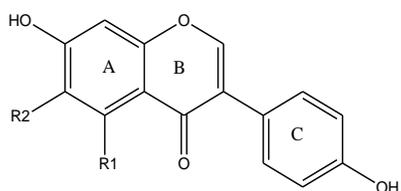
Coumestrol



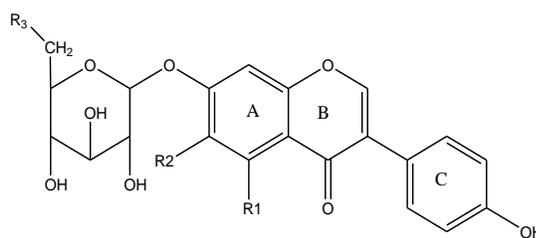
Estradiol

Figura 4: Similitud entre el coumestrol y estradiol

En las plantas, estos compuestos se encuentran mayoritariamente como glicósidos, y en muy baja proporción en su forma libre “aglicona”, siendo esta molécula la forma biológicamente activa (Yada, 1984; Franke, *et al.*, 1994; Wang, 2002; Martin *et al.*, 2006; Höjer, 2012; Taujenis *et al.*, 2016). Las concentraciones de estos compuestos en las plantas varían en función de fluctuaciones de temperatura, irradiación, sequía y otros factores ambientales; estas variaciones pueden ocasionar una mayor actividad estrogénica en los animales que consumen estas plantas. Los primeros métodos utilizados para la detección y cuantificación de estos compuestos involucraban la extracción con solventes como el etanol y el éter sulfúrico, normalmente usados para la purificación de lípidos y otros compuestos. En las plantas de alfalfa, este sistema de solventes descrito por Livingston *et al.* (1961) y Oldfield *et al.* (1966), permite detectar los fitoestrógenos en su forma libre (aglicona), pero no los fitoestrógenos unidos a los glúcidos (Figura 5).



Aglicona de isoflavona



Glicósido

Figura 5: Estructura química de aglicona de isoflavona y sus respectivos glicósidos. (Mendoza Meza *et al.*, 2015).

Posteriores modificaciones en el sistema de solventes de extracción y purificación permitieron realizar la hidrólisis del glicósido en medio ácido, y de esta forma cuantificar la

totalidad de los fitoestrógenos presentes en las plantas (Bickoff *et al.*, 1969; Yada, 1984; Pettersson y Kiessling, 1984; Martin *et al.*, 2006). En alfalfa, diferentes factores de estrés estimulan la producción de dos tipos principales de fitoestrógenos: los coumestranos y los isoflavonoides (Figuras 6 y 7), atribuyéndose a los primeros mayor importancia por su potencial actividad estrogénica en los animales que consumen estas plantas (Bickoff *et al.*, 1969; Jones y Ferris, 2001; Barbetti, 2007; Lenis Sanin *et al.*, 2010; Reed, 2016). Dentro de este grupo de compuestos se destacan el COU y el 4-methoxy coumestrol (Figura 6), si bien la cuantificación de este último -que es metabolizado a COU- está limitada por la falta de disponibilidad del estándar analítico (Fields *et al.*, 2018).

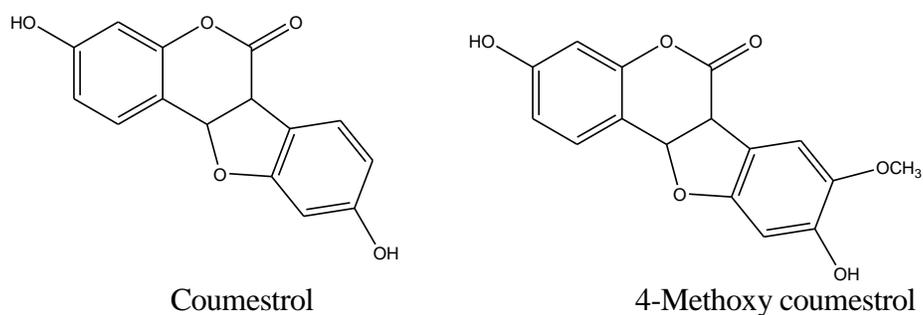


Figura 6: Estructura química de los principales coumestranos

Los restantes compuestos estrogénicos (isoflavonoides) producidos en alfalfa son daidzeína, genisteína y sus precursores formononetina y biochanina A, respectivamente (Figura 7) (Pettersson, y Kiessling, 1984; Franke *et al.*, 1994; Seguin *et al.*, 2004; Manzur, 2005; Gryniewicz *et al.*, 2005; Leuner *et al.*, 2013; Butkute *et al.*, 2018). Sin embargo las concentraciones de estos isoflavonoides en los forrajes no son relevantes comparado con el COU, ya que éste no sólo presenta la mayor actividad estrogénica entre los fitoestrógenos, sino que aún a niveles tan bajos como 25 ppm de materia seca afecta el ciclo reproductivo de las ovejas (Bickoff *et al.*, 1969; Hall, 1984; Barbetti, 2007; Reed, 2016; Fields *et al.*, 2018). Asimismo, los niveles de este fitoestrógeno se pueden continuar incrementando en los tejidos vegetales cuando las plantas se encuentran infectadas con patógenos foliares, como es el caso del hongo del género *Phoma* y del virus del mosaico de la alfalfa (AMV: por sus siglas en inglés) (Sherwood *et al.*, 1970; Jones y Ferris, 2001; Barbetti, 2007; Fields *et al.*, 2018). En Argentina la bibliografía al

respecto es insuficiente y no se encuentra información sobre lo que sucede en cultivares de alfalfa infectados por virosis mixtas, y menos aún comparaciones entre plantas sanas y enfermas.

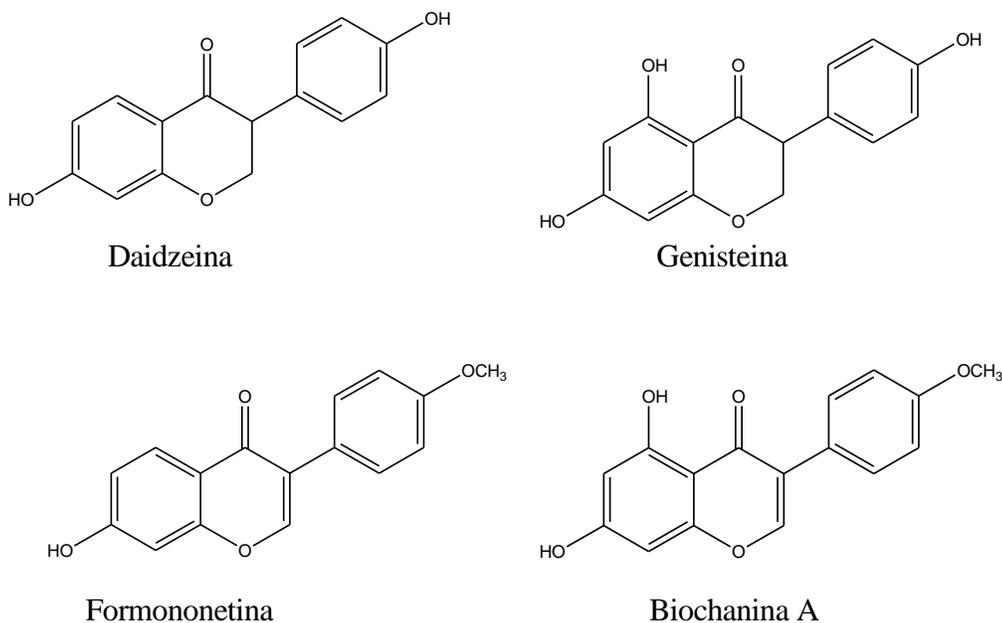


Figura 7: Estructura química de los isoflavonoides. Daidzeina, Genisteina, Formononetina y Biochanina A.

1.7. Fitoestrógenos: beneficios para la salud humana y su potencial económico.

Los isoflavonoides y los cumestranos, junto con los lignanos, forman las tres principales familias de fitoestrógenos presentes en plantas y semillas (Dweck, 2006). Una de las primeras publicaciones en relación a estrógenos fue realizada en 1926 por Allen Doisy posteriormente, numerosas investigaciones con bioensayos hallaron cientos de plantas con actividad estrogénica o compuestos activos con dicha propiedad. A partir de los años 40's los fitoestrógenos alcanzaron importancia biológica y económica, debido al brote producido en ovejas que mostraban infertilidad al consumir pasturas ricas en tréboles al oeste de Australia (Francis y Millington, 1965). Más tarde, se identificaron fitoestrógenos en orina de primates y en 1982 en humanos (Murkies *et. al.* 1998). Diferentes estudios epidemiológicos, especialmente en Japón y otros países asiáticos, sugirieron que dietas ricas en fitoestrógenos se asocian con un bajo riesgo de ciertas enfermedades (Murkies *et. al.* 1998), principalmente cardiovasculares,

osteoporosis y algunos cánceres hormona-dependientes como los de mama, endometrio, próstata, colon (Murkies *et al.*, 1998; Leyva *et al.*, 2011; Rodríguez *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2016; Wink, 2018). Asimismo, diferentes estudios indican que las mujeres asiáticas presentan síntomas menopáusicos menores que las occidentales, y que esto estaría asociado a la alta proporción de fitoestrógenos en sus dietas (Haya, *et al.*, 2002; López Luengo, 2010). Numerosas investigaciones sostienen que ciertos alimentos, además de tener beneficios nutricionales aceptados, se pueden comportar como “alimentos funcionales”, modulando funciones corporales u orgánicas específicas y mejorando el estado de salud o reduciendo el riesgo de padecer alguna enfermedad (Diplock *et al.*, 1999). Los alimentos funcionales deben permanecer como tales y no en formatos propios de los fármacos, pudiendo ser un alimento natural, un alimento al que se le ha añadido un determinado componente o un alimento en el que la biodisponibilidad de uno o más de sus componentes ha sido modificada (Diplock *et al.*, 1999). Estudios realizados en 1998 en la población coreana, estimaron el consumo de isoflavonoides y coumestrol en dietas a base, soja, tofu y brotes de soja. Los resultados evidenciaron que algunos grupos etarios –como los niños– registraban niveles de fitoestrógenos excesivamente altos (Surh, *et al.*, 2006). Asimismo, Adler *et al.*, (2014) confirmaron que la leche bovina proveniente de pastizales que contienen trébol rojo tiene una mayor concentración de isoflavonas, especialmente el equol, en comparación de aquellas que provienen de pasturas con otra composición botánica. Por otro lado, el uso de brotes de alfalfa en la alimentación animal podría representar una alternativa para transferir compuestos bioactivos a los productos pecuarios y, a su vez, a los humanos, mejorando así la calidad y la seguridad de los alimentos destinados al consumo humano y animal (Mattioli *et al.*, 2016). Existen otros procedimientos para obtener estos compuestos, como extractos vegetales, cultivo de células vegetales, callos y suspensiones celulares, que proporcionan una plataforma valiosa para la producción de metabolitos secundarios de interés comercial. Las células cultivadas en suspensión facilitan la homogeneidad de la población celular *in vitro*, gran disponibilidad de material, alta tasa de crecimiento celular y una buena reproducibilidad de las condiciones (Amer, 2018). Diversos estudios indican que algunas especies de *Medicago* poseen un excelente potencial como fuente de estos compuestos bioactivos (Rodríguez *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2013; Rafinska *et al.*, 2017; Barreira *et al.*, 2015).

1.8. Relación entre CVA, producción de fitoestrógenos y efecto sobre el ganado

El perjuicio originado por el CVA no sólo se limita a la disminución de la vida útil del alfalfar y a las pérdidas de rendimiento y de calidad forrajera, sino que además puede disparar la aparición de factores anti-calidad, como los fitoestrógenos. Según la dosis consumida por los animales, los fitoestrógenos pueden actuar como agonistas, caso en el que los materiales estrogénicos son conocidos por originar ganancia de peso y mayor eficiencia de conversión del alimento consumido, o como antagonistas, causando efectos negativos sobre la eficiencia reproductiva del animal al unirse a los receptores de membrana del estradiol (ER α y β) de los mamíferos (Reed, 2016). El COU en particular tiene una afinidad similar al receptor ER β y una menor afinidad al ER α (Pérez-Rivero *et al.*, 2007; Lenis Sanin *et al.*, 2010). Una vez ingeridos los fitoestrógenos por el animal, los isoflavonoides en particular, son metabolizados por los microorganismos del rumen, convirtiendo la formononetina y la daidzeina en equol (Figura 8), una isoflavona con actividad estrogénica.

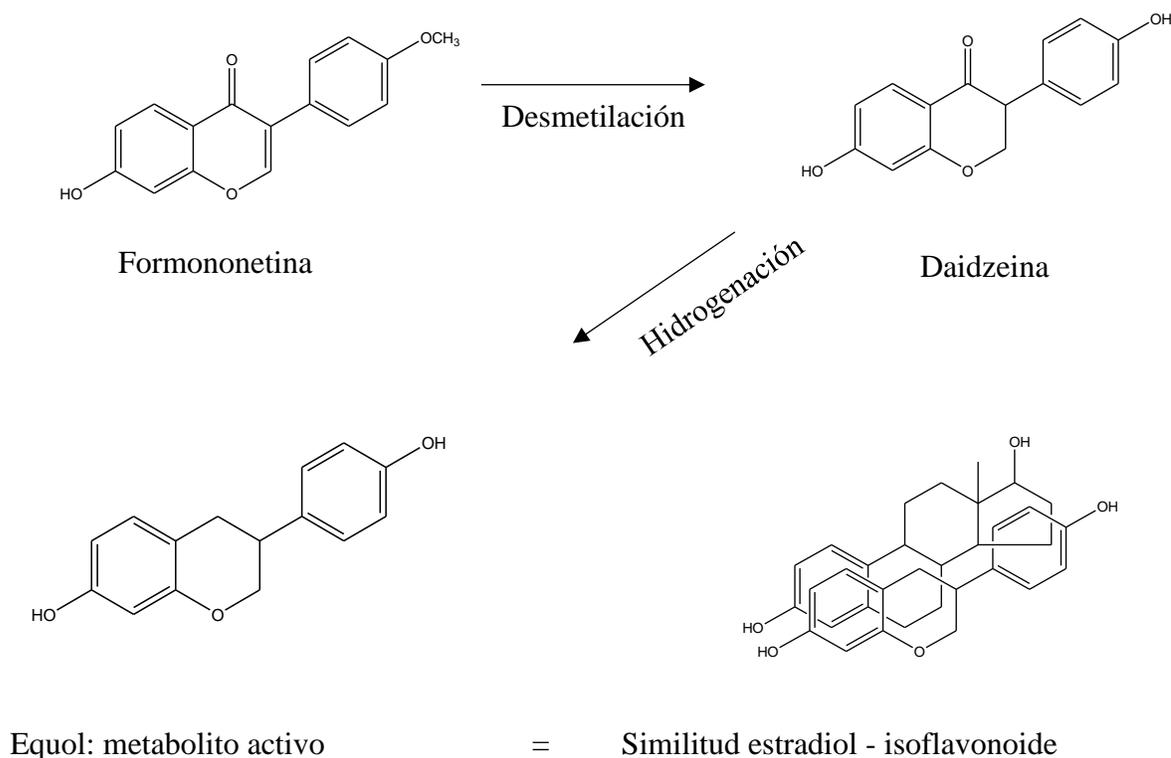


Figura 8: Degradación por los microorganismos del rumen del isoflavonoide formononetina a daidzeina y equol.

Además, la biochanina A en genisteína (Figura 9), que *a posteriori* pueden ser degradadas en sustancias no estrogénicas, como el 4-ethylphenol (Pace *et al.*, 2011; Retana-Márquez *et al.*, 2012; Adler *et al.*, 2014; Fields *et al.*, 2018). Una característica a tener en cuenta es que los coumestranos persisten en los forrajes conservados (henos, ensilados, harinas y pellets), pudiendo contener niveles elevados de COU si proceden de cultivos con niveles apreciables de enfermedades foliares o ataques de áfidos, además del tipo de cultivar y la madurez de la planta, entre otros factores (Cantero Bonilla, 1993; Moravcová *et al.*, 2004; Reed, 2016).

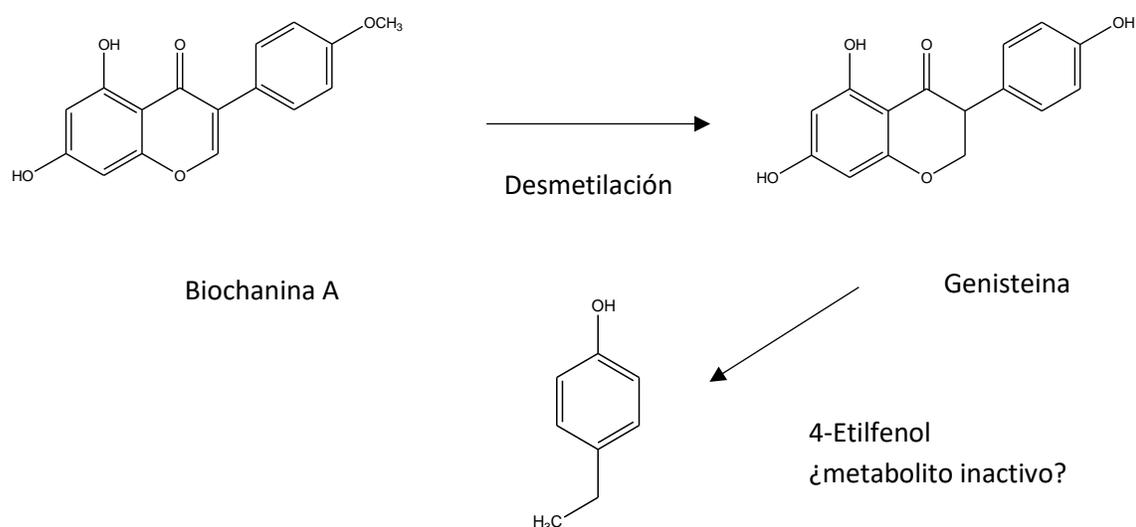


Figura 9: Degradación por los microorganismos del rumen del isoflavonoide biochanina A a genisteina.

El estudio realizado por Moravcová *et al.* (2004) indica que la mayor parte del contenido inicial de COU, si bien disminuye luego de 50 días de ensilaje, puede persistir en pequeñas concentraciones aún a los 150 días desde la confección del silo. Conocer si este compuesto está presente en la alfalfa cultivada de Argentina, así como comprender su comportamiento, permitiría realizar un manejo adecuado a nivel de cultivar, forma de consumo y/o almacenamiento para minimizar los efectos adversos provocados por los fitoestrógenos en el ganado.

CAPÍTULO 2:

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS

El complejo viral del achaparramiento de la alfalfa (CVA) estimula la producción de coumestrol (COU) y su concentración en la planta atenúa los síntomas de severidad producidos por la enfermedad.

2.2. OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo general

Analizar la producción de coumestrol en plantas de alfalfa como respuesta a la infección del complejo viral del achaparramiento (CVA) y su relación con los síntomas provocados por la enfermedad.

2.2.2. Objetivos específicos

1. Desarrollar genotipos de alfalfa bajo dos condiciones: sanos (S) y enfermos (E) a través de la infección con el CVA.
2. Determinar la presencia/ausencia del AMV y el ADV bajos dos condiciones de enfermedad (S y E).
3. Determinar el contenido del fitoestrógeno COU en dos cultivares de alfalfa (tolerante putativo y susceptible) y bajo las dos condiciones de enfermedad (S y E).
4. Evaluar las características morfológicas y productivas en plantas de los dos cultivares de alfalfa bajo las dos condiciones de enfermedad (S y E).
5. Determinar el índice de severidad en plantas de alfalfa infectadas con el CVA y relacionarlo con el contenido de COU.
6. Evaluar la correlación entre el fitoestrógeno COU y las características morfológicas y productivas en plantas de los dos cultivares de alfalfa bajo las dos condiciones de enfermedad (S y E)
7. Estudiar la evolución del contenido del fitoestrógeno COU en función del desarrollo de la enfermedad en los dos cultivares de alfalfa (tolerante putativo y susceptible).

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y METODOS

Con el objetivo de simplificar la lectura, los materiales y métodos de los experimentos se presentaran en dos secciones: Sección A) incluye el desarrollo de material vegetal a evaluar, la detección del AMV y ADV, detección y cuantificación del COU y clonación simultánea; y Sección B) comprende el ensayo en invernadero con sus respectivas evaluaciones.

Sección A: Material Vegetal (Objetivos específicos 1, 2, 3)

3A. Desarrollo del material vegetal

3A.1 Desarrollo de plantas madres (PM)

Relacionado con el objetivo específico 1, se obtuvieron las plantas (genotipos) madres (PM) de los dos cultivares utilizados con el fin de desarrollar luego para cada genotipo las dos condiciones de enfermedad: sanos (S) y enfermos (E).

En este trabajo de tesis se propuso en primera instancia el desarrollo de 80 genotipos de cada cultivar en sus dos condiciones S y E, número estimado suficiente para representar adecuadamente el comportamiento de cada cultivar. No obstante, las múltiples complicaciones prácticas de infraestructura que se produjeron a poco de comenzado el estudio, y que impidieron el mantenimiento adecuado del número estipulado de genotipos debido a inconvenientes metodológicos, muerte de material y alargamiento de los plazos estipulados, además de las posteriores restricciones presupuestarias para las determinaciones de laboratorio, obligaron a reducir el número de genotipos a utilizar en cada cultivar (ver 3A1.2.). En consecuencia, se debió trabajar con 10 genotipos de Monarca SP INTA y 9 genotipos de Trafal PV INTA.

En virtud de lo expuesto, se sembraron tres semillas por maceta plástica (0,1 L 6 cm Ø) hasta completar el número de macetas de cada cultivar en enero de 2013. Una vez establecidas, se procedió a ralea el material dejando una plántula (genotipo) en cada maceta. Las macetas

contenían suelo esterilizado en autoclave a 1 atm de presión durante 2 h. Cada maceta se identificó con un número y con la inicial M (numeración de 1 a 80) y T (numeración de 101 a 180) según correspondiera al cultivar Monarca SP INTA (Monarca SP INTA, 1989) y Traful PV INTA (Traful PV INTA, 2011), respectivamente. Una vez que las PM alcanzaron el tamaño y vigor adecuado se inició el trasplante a macetas de 3 litros (Figura 10).



Figura 10: Obtención de plantas madres y trasplante de plantas madres de los cultivares Monarca y Traful. a) plántulas a trasplantar. b) maceta lista para el trasplante, c) plantas madres trasplantadas d, e, y f) siembra de semillas en vasos plásticos.

En el invernadero, las PM se mantuvieron libres de insectos mediante el recubrimiento con tela antiáfida y se mantuvieron con un fotoperiodo de 16 horas de luz (luz natural suplementada con lámparas de sodio de 400 W, Philips Proelec) y temperaturas entre 13°C (noche) y 30°C (día).

3A.1.1 Obtención de clones:

Durante el invierno de 2013, y una vez que las PM alcanzaron los 30 cm de altura, se iniciaron las tareas de clonación de cada genotipo. Para la obtención de clones se cortaron secciones de tallos de ~7 cm de largo y se colocaron en bandejas plásticas de 20 x 30 cm con arena como sustrato de enraizamiento; una vez superados los dos meses (tiempo de enraizamiento), los esquejes se trasladaron a macetas con suelo estéril. Se obtuvieron entre 6 y 10 clones por genotipo (Figura 11).

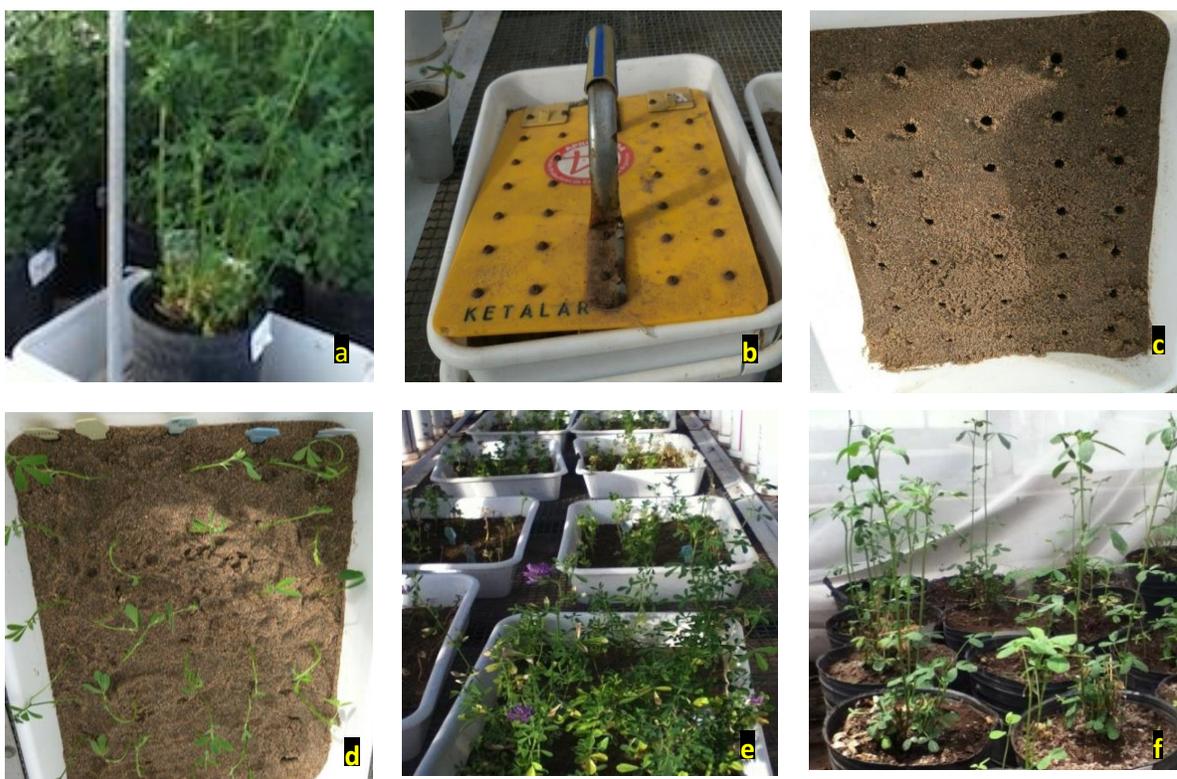


Figura 11: Obtención de clones de alfalfa a partir de plantas madres (PM) utilizando arena como sustrato de enraizamiento. a) planta madre; b) molde para ubicar los clones; c) bandeja con arena; d) clones de alfalfa recién plantados; e) clones luego de 2 meses; y f) clones tranplantados y establecidos.

3A.1.2 Optimización del clonado

Atentos al bajo número de clones obtenido en el cultivar Trafal, se decidió -en julio de 2014- modificar la técnica de clonación, utilizando como sustrato de enraizamiento una mezcla de vermiculita y perlita (50% v/v) y empleando la hormona de enraizamiento ácido naftalenacético (ANA). En consecuencia, el nudo inferior de cada tallo (de los dos presentes en

cada esqueje), una vez eliminadas las hojas, se embebió en ANA al 50% v/v durante 1 minuto (Figura 12). Esta modificación permitió aumentar el porcentaje de supervivencia de los clones del cultivar Trafal. Por su parte, los genotipos del cultivar Monarca no presentaron mayores inconvenientes para el clonado bajo la técnica explicitada en el punto anterior.

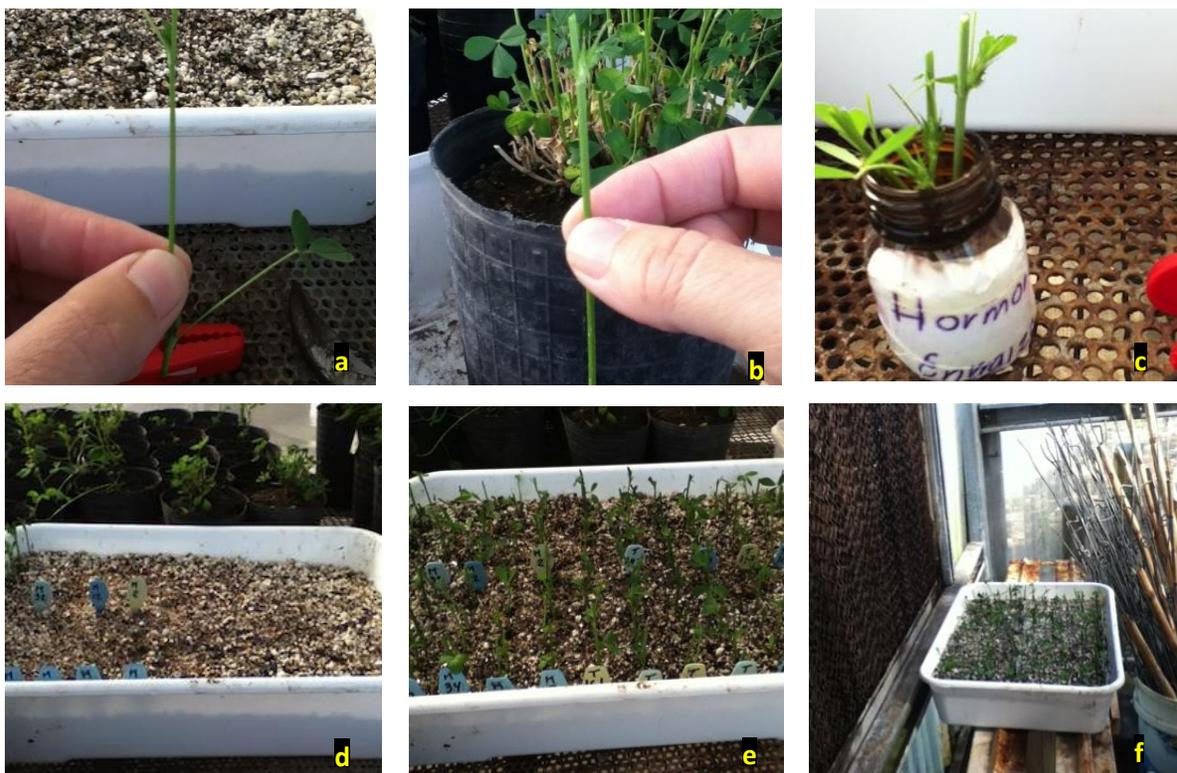


Figura 12: Optimización del clonado con vermiculita y perlita. a) sección de tallo con dos nudos. b) nudo superior. c) clones sumergidos en hormona de enraizamiento. d) bandeja de clonación. e) bandeja con clones terminada y f) ubicación de los clones cerca del panel refrigerante durante la época estival.

3A.1.3 Condición enfermedad (S y E)

Los clones de cada genotipo se dividieron en dos grupos para crear las dos condiciones de enfermedad: S (sano) y E (enfermo). La condición S se logró manteniendo libre de infección viral a los clones dentro de estructuras protegidas con tela antiáfida. Por su parte, la condición E se obtuvo infectando los clones con el complejo viral (CVA) a través injertos con material infectado por el CVA. A partir de allí, los clones en cada condición fueron mantenidos bajo tela antiáfida para impedir la acción de los vectores de la enfermedad y en condiciones controladas de invernadero.

Durante el período diciembre 2013/marzo 2014 se perdieron en la condición E alrededor de 75 genotipos del cultivar Traful y 40 de Monarca, debido a un incontrolable estrés por calor que se produjo durante ese período estival, favorecido por la imposibilidad técnica de mantener la temperatura dentro de los límites prefijados. En la mayoría de esos días la temperatura máxima superó los 40°C, muy por encima del máximo de 35°C estimado para la alfalfa. En ese contexto, y como ya fuera expresado, se debió reducir el número de genotipos con los que se llevó a cabo el estudio: 10 de Monarca y 9 de Traful. Si bien de acuerdo con Herrmann *et al.* (2010), con este número reducido podrían perderse algunos caracteres o alelos raros de la población, se estimó que igualmente constituía un tamaño aceptable para los objetivos de esta tesis, especialmente si se considera que este número se multiplica por repetición, condición enfermedad y cultivar, lo que llevó a un total de 684 unidades observacionales para los seis cortes propuestos. Esta reducción en la población experimental fue sugerida, discutida y aprobada oportunamente por el comité asesor de tesis.

3A.1.4. Genotipos desarrollados de los cultivares Monarca y Traful

En la Tabla 1 se muestran los genotipos desarrollados correspondientes a cada uno de los dos cultivares usados en este estudio: Monarca SP INTA (susceptible en condiciones de campo) y Traful PV INTA (tolerante putativo en condiciones de campo) (V. Arolfo, INTA Manfredi, *comunicación personal*).

Tabla 1: Genotipos desarrollados correspondientes a los cultivares Monarca y Traful

Genotipo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Monarca	M10	M11	M12	M16	M18	M23	M29	M36	M37	M49
Traful	T112	T124	T128	T129	T140	T141	T148	T150	T152	--

M: Monarca SP INTA; T: Traful PV INTA.

3A.1.5. Infección de clones a través de injertos (Condición E)

Para la condición E, a principios del 2014, se seleccionó una planta infectada con el CVA denominada A 25, la cual se clonó a fin de aumentar la cantidad de material a injertar. En este material no sólo se observaron síntomas del CVA sino que además se detectaron los virus AMV

y ADV (Figura 13). Una vez que los tallos de la planta A25 alcanzaron el vigor y tamaño adecuados se utilizaron para infectar a las plantas madres de la condición E a través de la realización de injertos.



Figura 13: Confirmación del rhabdovirus en la planta A25 como fuente de inóculo mediante la técnica RT-PCR. Ppm: Patrón de peso molecular. TS: Testigo sano. TE: testigo enfermo (planta A25).

Los injertos se realizaron con segmentos de la planta infectada de 1 a 1,5 cm de largo aproximadamente. Para obtener el segmento de planta infectada, se cortó con bisturí la parte inferior en forma de bisel, cuidando de incluir un nudo y una hoja preferentemente en la parte superior del segmento. Posteriormente, se seleccionaron los tallos de las plantas sanas que se iban a injertar, con la precaución de que el diámetro sea igual o mayor al del segmento a injertar. Sobre los tallos seleccionados se realizó un corte longitudinal a la altura de un nudo (eliminando las hojas del mismo) y posteriormente se dispuso el segmento a injertar dentro del corte realizado, envolviéndolo con parafilm (Papel Parafilm M) (Figura 14).



Figura 14: Secuencia de injerto en planta madre libre de la enfermedad del CVA. a) Planta Madre a injertar; b) segmento de la planta A25 (fuente de inoculo); c) eliminación de folíolos en el segmento; d y e) corte en bisel; f) selección de tallo a injertar y eliminación del folíolo; g y h) corte longitudinal en la inserción del folíolo; i) ubicación del segmento en el corte longitudinal del tallo seleccionado; j y k) injerto envuelto con parafilm; y l) plantas injertadas cubiertas con bolsas plásticas transparentes.

Se realizaron entre 4 y 5 injertos por planta. Luego, los tallos injertados se enlazaron a una caña y se ralearon los tallos no injertados, eliminando inclusive los nudos que se encontraban por encima del injerto. Finalmente, cada planta se cubrió con una bolsa plástica transparente y se regó para evitar la deshidratación. Las plantas injertadas se mantuvieron en un cuarto a 25°C con luz natural durante cuatro días. Al término del cuarto día se levantaron las bolsas para facilitar la aclimatación de las plantas, y luego de 4 h las bolsas se retiraron completamente. Las plantas se trasladaron finalmente al invernadero. Los primeros síntomas de la infección del CVA comenzaron a distinguirse visualmente dentro de los dos meses posteriores a la realización del injerto (Figura 15). Los genotipos que no mostraron síntomas luego de este período, se volvieron a injertar con objeto de efectivizar la infección, registrando las fechas de cada procedimiento. La infección a través de los injertos tuvo una efectividad mayor al 70% cuando se realizan 4 o 5 injertos por planta en la mayoría de los genotipos; sin embargo hubo genotipos como el T144 (genotipo no incluido en el ensayo), al que se le realizaron injertos más de cinco veces, con un promedio de 4 tallos por planta, y no mostró los síntomas del CVA. Probablemente estos genotipos poseían un alto grado de resistencia a la virosis.

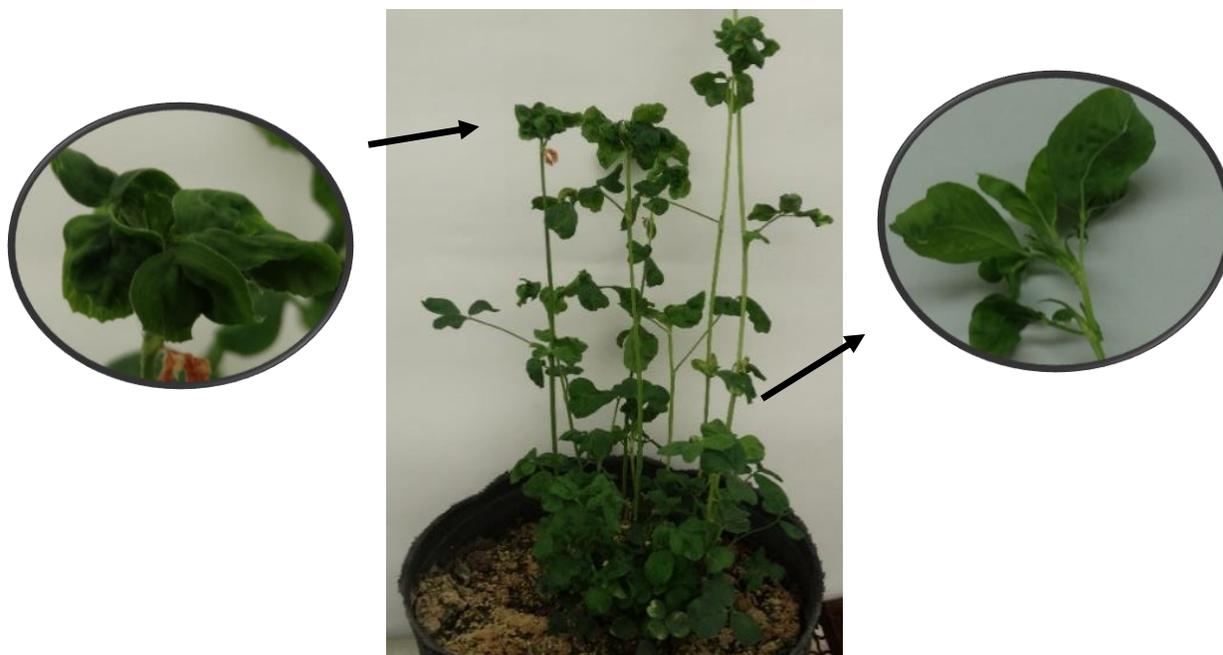


Figura 15: Planta de alfalfa injertada con síntomas visibles de CVA. Centro: Planta de alfalfa perteneciente la condición E en la cual se observan los primeros síntomas del CVA. círculo izquierdo y derecho: detalle de hojas con sintomas visibles del CVA.

3A.2. Detección del complejo viral del achaparramiento

La detección del CVA (Objetivo específico 2) en las plantas madres (PM), tanto en la condición S (sana/ausencia) como en la condición E (enferma / presencia), se realizó a través de la técnica ELISA para el AMV y de la técnica RT-PCR para el ADV.

3A.2.1 Ausencia / presencia del alfalfa mosaic virus (AMV) en plantas madres (PM) de los genotipos de los cultivares Monarca y Trafal.

La técnica ELISA se utilizó para la determinar la ausencia / presencia del AMV usando como soporte de las pruebas placas Immunoplate MaxiSorp® (NuncTm USA) con 96 celdas fondo plano. Para realizar la prueba se pesaron 0,2 g de material liofilizado y se maceraron en morteros ~ 1/ 2,5 (p/v) con tampón cobertura (carbonato/bicarbonato) pH 9,6. Se sembraron 100 µl de cada muestra en placa y se dejó toda la noche a 4°C. Cada placa se lavó manualmente tres veces, con lavados cada 3 min, con tampón fosfato y Tween (PBS-T). Luego se adicionaron 100 µl por celdilla del antisuero (As) crudo al AMV (IPAVE-CIAP-INTA), diluido 1/1000 (el As fue previamente absorbido toda la noche con planta sana 1/30 para minimizar reacciones inespecíficas). La placa se incubó por 3 h a 37°C y se repitió el lavado con PBS-T. Posteriormente se adicionaron a cada celdilla 100 µl del As conjugado de cabra anti-conejo (BIO-RAD) diluido 1/3000 y se llevaron las placas a incubar durante 2 h. Nuevamente, se repitieron los pasos de lavado con PBS-T. A continuación, se adicionó el sustrato para la fosfatasa alcalina y se midió a una longitud de onda de 405 nm en lector de placas de ELISA hasta que los positivos superaron el punto de absorbancia. Por cada placa se sembraron dos controles negativos de alfalfas sanas (TS) y un control positivo de alfalfa enferma (TE). Como blanco se empleó tampón de cobertura. Las celdillas libres se ocuparon con controles tanto positivos como negativos.

Ausencia del AMV, condición S: La prueba ELISA en las PM de ambos cultivares (10 genotipos de Monarca y 9 genotipos de Trafal) fue negativa en todos casos (Tabla 2). La no detección del virus analizado equivale a decir que los valores de absorbancia obtenidos para todos los genotipos fueron inferiores o similares a los del testigo sano, que provenía de una

planta de alfalfa probadamente sana. Los valores de absorbancia en los controles positivos fueron mayores a 0,1, con un rango de 0,1 a 0,13, indicando presencia de virus, aunque no presentaron una marcada diferencia respecto de los genotipos sanos. Por lo tanto, para re-confirmar los valores negativos de las PM correspondientes a la condición S, se extendieron los tiempos de incubación respecto del tiempo establecido en el protocolo original y se realizaron lecturas adicionales a las 17, 18, 20, 22 y 24 h. Aún bajo estas condiciones, no se observaron cambios en los valores de absorbancia para los genotipos de las PM correspondientes a la condición S de ambos cultivares, confirmando que se encontraban libres del AMV. Por el contrario, los valores de los controles positivos (TE: Testigo E; IPAWE-CIAP-INTA) fueron aumentando a medida que aumentaron los tiempos de incubación, alcanzando valores cercanos a 1 a las 24hs.

Tabla 2. Valores de absorbancia en las plantas madres (PM) correspondientes a la condición S (libre de infección del CVA) para la detección del AMV a las 2 y 24h de incubación.

cv Monarca	S_2h	S_24h	cv Trafal	S_2h	S_24h
M10	-0,025	-0,039	T112	-0,016	-0,036
M11	-0,020	-0,021	T124	-0,020	-0,051
M12	-0,020	-0,028	T128	-0,009	-0,008
M16	-0,020	-0,029	T129	0,011	-0,019
M18	0,019	-0,022	T140	0,017	-0,004
M23	-0,022	-0,025	T141	-0,022	-0,017
M29	-0,022	-0,049	T148	-0,019	-0,030
M36	-0,019	-0,028	T150	-0,020	-0,024
M37	-0,019	-0,031	T152	-0,012	-0,012
M49	-0,023	-0,031	-----		

Referencias: cv: cultivar; S: tratamiento libre de la infección del complejo viral del achaparramiento (CVA) h: hora; se considera detección positiva a valores de absorbancia > 0,1.

Presencia del AMV, condición E: Las pruebas para la detección del AMV en PM de la condición E fueron positivos para los genotipos estudiados, confirmando que los injertos realizados para infectar las plantas fueron exitosos (Tabla 3). Los valores de absorbancia obtenidos para estas PM en condición enfermedad E fueron entre 0,9 y 1,44, cercanos al control positivo del TE. Complementariamente, los valores de absorbancia para el control negativo (TS: testigo sano) fueron del orden de 0,007, descartando posibles errores en el procedimiento.

Tabla 3. Valores de absorbancia de las plantas madres (PM) en la condición enfermedad E en genotipos de los cultivares Monarca y Trafal.

PME Monarca	Absorbancia	PME Trafal	Absorbancia
M10	0,915	T112	0,926
M11	1,453	T124	1,366
M12	0,894	T128	0,833
M16	1,174	T129	1,342
M18	0,894	T140	1,453
M23	1,130	T141	0,901
M29	1,471	T148	1,225
M36	1,245	T150	0,833
M37	1,238	T152	1,385
M49	1,342	--	--

PME: planta madre enferma; AMV: se considera detección positiva a valores de absorbancia > 0,1; AMV: alfalfa mosaic virus.

3A.2.2. Ausencia / presencia del alfalfa dwarf virus (ADV) en plantas madres (PM) de los genotipos de los cultivares Monarca y Trafal.

La ausencia / presencia del ADV se realizó a través de la técnica de RT- PCR a partir de hojas. El material verde se almacenó a -70° C hasta su uso. Para realizar la extracción de ácidos nucleicos, se pesaron entre 50 y 100 mg de folíolos y se extrajo el ARN total por medio del método fenólico con TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), siguiendo la metodología propuesta por Chomczynski y Sacchi (1987). La calidad y cantidad de ARN se analizó utilizando un espectrofotómetro (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Tanto para las reacciones de RT (*reverse transcriptase*) como PCR (*polymerase chain reaction*) se emplearon los oligonucleótidos *forward* 5'-GGCATCCTATGGTCAATAGC-3' y *reverse* 5'-TGACCAGTGAAAGATGACG-3'. Este par de cebadores amplifica un segmento de 964 pares de bases (pb) del gen de la polimerasa L del ADV. La síntesis de ADN complementario (ADNc) mediante RT se realizó empleando ~500ng de ARN total, 2,5 µl de *Buffer 5X* (AMV *reverse transcriptase reaction buffer*-Promega), 0,5 µl de cada oligonucleótido (2,5 µM) y 12 unidades de la transcriptasa reversa AMV (Promega, Madison, USA) en un volumen final de 12,5 µL e incubación en termociclador durante 1 h a 42°C. La amplificación del fragmento se realizó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando 2 µl de ADNc, 2,5 µl de *Buffer 5X* (*Green Go Taq Reaction Buffer*), 0,1 mM de cada oligonucleótido, 0,2 mM

desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) y ADN polimerasa GoTaq (Promega) en un volumen final de 12,5 µl. Las condiciones de ciclado fueron: un paso de desnaturalización de 4 min a 94°C, seguido por 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 52°C y 1 min a 72°C, y un paso de extensión final de 10 min a 72°C empleando un termociclador Gene Amp System 9700 (Applied Biosystems). Los resultados se visualizaron siguiendo protocolos estándares de electroforesis horizontal para geles de agarosa al 2% (Whatman 11.14), tinción con Gel Red™ (Biotum Inc., EUA) y observación con luz UV (Digitalizador BioRad Universal Hood II).

Ausencia del ADV, condición S: Con material de las PM correspondientes a la condición S se conformaron pooles de genotipos, teniendo en cuenta el número inicial de individuos por cultivar (n=80). Se adoptó esta metodología por su rapidez y bajo costo, según el siguiente criterio de interpretación: si en el gel se identificaba un pool con el fragmento amplificado, el análisis RT-PCR se volvía a realizar en forma individual para cada genotipo que conformaba ese pool. Los pooles contenían cantidades equitativas de material liofilizado de cada genotipo hasta reunir 50 mg de cada pool. Inmediatamente después de mezclarse el material en cada uno se realizó la reacción de RT-PCR. La técnica RT-PCR indicó que la totalidad de las PM correspondientes al tratamiento S estuvieron libres de la infección del ADV (Figura 16).

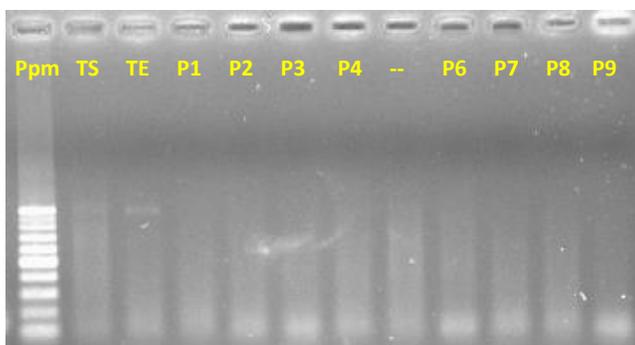


Figura 16: Ausencia de fragmento 964 pb del ADV en los genotipos de PM desarrollados.

Ppm: patron de peso molecular. TS : testigo sano; TE: testigo enfermo (planta A 25) ; Pooles de genotipos: P1) M10, M12, M18; P2) M11, M23; P3) M29. P4) M36, M37; P6) T112, T124; P7) T128, T129, T140; P8) T141, T152 P9) T148, T150. Cada pool se formó con 5 genotipos teniendo en cuenta el número inicial de individuos por cultivar (n=80), únicamente se nombran los genotipos incluidos en el ensayo en invernadero.

Además, se detectó la presencia del fragmento de ADN de 964 pb del gen de la polimerasa L del ADV en la planta A25 (fuente de inóculo), confirmando la infección con el ADV. Por el contrario, y como se esperaba, el fragmento del virus no se detectó en el mismo testigo sano usado anteriormente para la detección del AMV.

Presencia del ADV, condición E: El fragmento de ADN de 964 pb del gen de la polimerasa L del ADV fue positivo en los genotipos M10, M11, M18, M23, M29, M36, M37 de Monarca y el T112, T124, T129, T140, T141, T152 de Trafal, indicando la presencia del virus. Por otro lado, en los genotipos M12, M16, M49, T128 y T148 no se detectó el fragmento de ADN del ADV, si bien las plantas presentaban todos los síntomas del CVA (Figura 17 y 18).

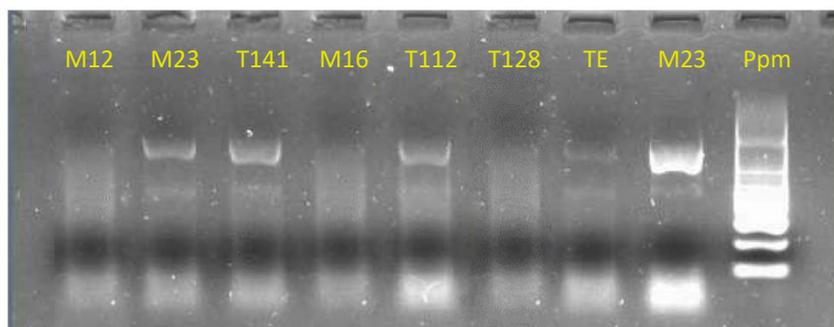


Figura 17: Confirmación del ADV en plantas injertadas y con los síntomas del CVA.

TE: testigo enfermo, ADNc correspondiente a extracciones anteriores positivas. Ppm: patrón de peso molecular; ADV: alfalfa drawf virus.

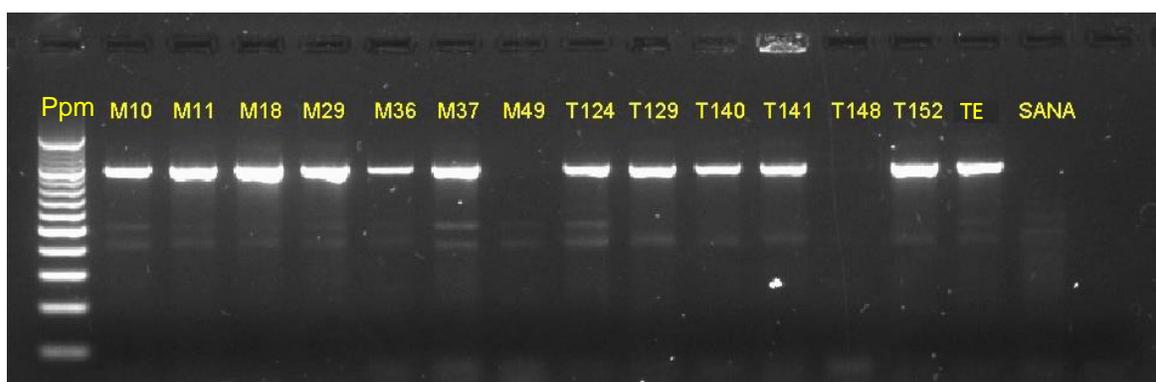


Figura 18: Confirmación del ADV en plantas injertadas y con síntomas del CVA. TE: testigo enfermo ADNc correspondiente a extracciones anteriores positivas; Ppm: patrón de peso molecular; ADV: alfalfa drawf virus; Sana: testigo sano.

3A.3. Determinación del fitoestrógeno coumestrol

La determinación del contenido de coumestrol (objetivo específico 3) se llevó a cabo mediante HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), siguiendo la metodología descrita por Martin *et al.*, (2006), aunque con las modificaciones que se detallan a continuación:

3A.3.1. Preparación de la muestra

Las muestras de alfalfa obtenidas de los ensayos en invernadero se secaron en estufa a 45°C durante 72 horas. Posteriormente, se molieron en dos etapas: la primera con un molinillo Arcano Modelo FW 100, a fin de reducir los fragmentos de material; y la segunda con un molinillo ciclón marca FOSS modelo Cyclotec 1093. Las muestras molidas se conservaron a -20°C hasta el momento de las extracciones y determinaciones por HPLC.

3A.3.2. Obtención de los extractos

De cada muestra molida se pesaron 0,5 g y se le agregaron 8 ml de alcohol etílico (EtOH) y 2 ml de HCl (3,5M). La mezcla se colocó en tubos falcón y se calentó a 83°C durante 30 minutos; posteriormente, se sonicó por 10 minutos y se centrifugó a 2000 rpm por 5 minutos. Del líquido sobrenadante se tomaron 0,5 ml y se agregaron 0,5 ml de agua y 0,5 ml de MeOH (ambos calidad HPLC), luego se centrifugaron a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C. Previo a la inyección al HPLC, los sobrenadantes se filtraron con filtro de 0,22 µm.

3A.3.3 Condiciones cromatográficas

Las determinaciones cromatográficas para el análisis del fitoestrógeno COU se realizaron en el laboratorio de calidad de granos del INTA-Manfredi, utilizando un cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC Agilent 1100 series). La detección del COU (Sigma-Aldrich) se realizó con un detector de arreglo de diodos (DAD) (serie G1315B) a una longitud de onda (λ) de 260 nm, acoplado a un detector de fluorescencia (serie G1321A), con

una longitud de onda λ de excitación a 340 nm y λ de emisión a 437 nm. La adquisición y procesamiento de datos se realizó con el software ChemStation. Para la separación de los compuestos se utilizó una columna Zorbax Eclipse XDB C18 (4,6 x 250 mm, 5 μ m de tamaño de partícula) y guarda-columna (4,6 x 12,5 mm). La elución se llevó a cabo con un flujo de 0,8 ml/min, con el siguiente sistema de solventes: A= Agua HAc 1% y B: ACN/MeoH 1:1 con 1% HAc. La separación de los analitos se realizó con el programa de gradiente mostrado en la Tabla 4.

Tabla 4: Condiciones cromatográficas del método de determinación de coumestrol.

Minuto	0	1:00	1:10	5	25	28	42	44	46
Solvente B (%)	20	20	45	45	67	100	100	20	20

Solvente B: ACN/MeoH 1:1 con 1% HAc. En todos los casos se utilizaron gradientes lineales

3A.3.4. Determinación del contenido de coumestrol (COU)

De acuerdo con la ley de Lambert-Beer (LLB), se estimó el valor de ϵ para corroborar la respuesta lineal de la concentración de COU.

$$A = \epsilon * c * D$$

donde: A = Absorbancia; ϵ = Coeficiente molar de extinción; C = Concentración molar y D = Paso óptico (en cm).

Se preparó una solución madre de 1,2mg/ml de COU en dimetilsulfóxido (DMSO) y el estándar de COU fue provisto por Sigma - Aldrich (CAS 479-13-0). A partir de esa solución se tomó una alícuota de 100 μ l, se llevó a sequedad con N₂ y se re-suspendió en 5 ml de Acetonitrilo Grado HPLC (ACN). Paralelamente, se prepararon soluciones patrones de concentraciones: 1,8x10⁻⁵, 2,5x10⁻⁵, 4,5x10⁻⁵ y 8,9x10⁻⁵ M, respectivamente. Se midió la absorbancia de dichas soluciones en un espectrofotómetro (PG Instruments T60) a $\lambda = 339$ nm, utilizando como blanco ACN (grado HPLC). Se graficó la curva de calibración (Figura 19a), comprobando el cumplimiento de la LLB. La pendiente de la curva de calibración se usó para calcular la absorptividad molar, asumiendo como verdadera la masa informada por el proveedor del COU, considerando como margen de error aceptable del 13% con el valor teórico informado en

bibliografía. El valor teórico de absorptividad molar se utilizó para futuras determinaciones de la concentración de COU en las soluciones madres.

Posteriormente, se preparó una solución de COU en etanol a una concentración de 243,4 ppm. A partir de esta solución se prepararon de los siguientes patrones: 0,48; 0,97; 4,9; 9,7 y 14,6 ppm. Se realizaron dos inyecciones por cada nivel a lo largo del día y en diferentes días. Para la cuantificación del COU se utilizó el método del estándar externo cuya curva de calibración se muestra en la Figura 19b. Se evaluó la respuesta lineal en el equipo de HPLC y se estimó el coeficiente de determinación (R^2), utilizando como nivel de aceptación $R^2 > 0,99$. La curva de calibración se repitió a lo largo del tiempo para comprobar la respuesta del equipo.

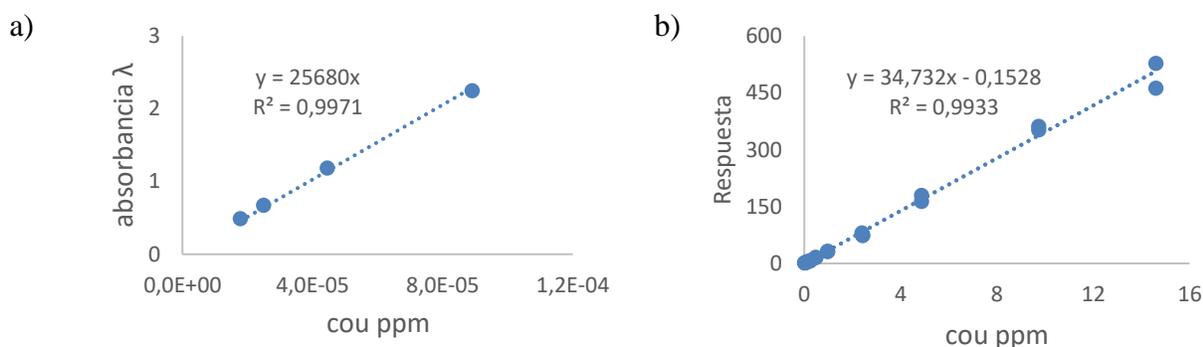


Figura 19: Curva de calibración de Coumestrol. a) Eje X: concentración del COU $\mu\text{g/ml}$; Eje Y: absorbancia del COU medida a $\lambda = 339\text{nm}$. b): concentración de COU. Eje X: concentración de COU en ppm y Eje Y: respuesta obtenida en el HPLC a $\lambda = 260\text{nm}$

Se calculó la precisión en el equipo de HPLC a partir de la concentración 0,48 $\mu\text{g/ml}$ evaluando en $n=10$ oportunidades la respuesta en el detector DAD, obteniendo un CV de 1,8 en el mismo momento y en diferentes días. Además, se calculó el Límite de Detección y Límite de Cuantificación de la técnica. El límite de Detección (LD) es el valor que, expresado como 3 veces el Desvío Estándar (DE), define la concentración mínima que puede distinguirse del ruido de base con un nivel de aceptación del 95%. El valor estimado fue de $\text{LD} = 0,24\text{ ppm}$. El límite de Cuantificación (LC) se expresa como 6 veces el DE, y el valor estimado fue de $\text{LC} = 0,42\text{ ppm}$.

3A.3.5. Efecto matriz del COU

Para corroborar que los componentes distintos al COU presentes en las muestras de las plantas de alfalfa no interfieran sobre las mediciones del contenido de COU, se realizó la siguiente prueba de efecto matriz: se seleccionó el genotipo T152 en la condición E, al que se le agregó 20 ppm del estándar COU. Luego de mantenerlo en la oscuridad durante 12 h, se procedió a la extracción de los fitoestrógenos -según las condiciones descriptas anteriormente- y su consecuente inyección en el HPLC. Este genotipo se seleccionó debido al escaso contenido de COU que presentó en ambas condiciones S y E en las pruebas realizadas anteriormente, donde el valor de COU fue mayor al LD pero menor al LC. En una primera instancia se inyectó la muestra concentrada, obteniendo una recuperación superior al 90% del estándar. Posteriormente, se trabajó con dos diluciones: 1:1 y 1:3 y se obtuvo una recuperación entre 110 y 120% (COU inyectado + la cantidad presente en la muestra respectivamente, Figura 20).

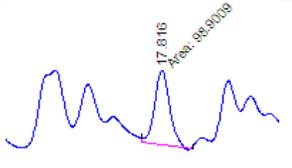
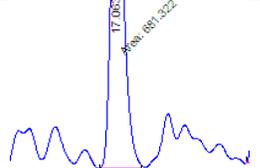
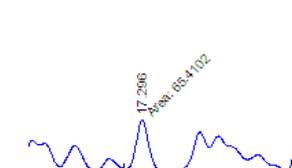
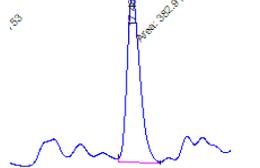
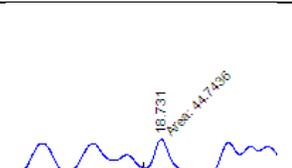
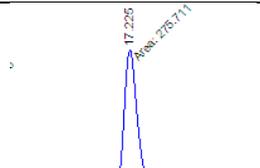
Dilución	Muestra sin fortificar ¹	Muestra fortificada	Recuperación
sin dilución			>92%
1:1 muestra + agua HPLC			110%
1:3 muestra + agua HPLC + MeOH HPLC			120%

Figura 20: Efecto matriz del fitoestrógeno COU. ¹muestra con bajo contenido de COU, la concentración se encuentra por debajo del límite de cuantificación, Línea fucsia delimita el área bajo la curva del COU.

La dilución 1:3 se tomó como procedimiento de rutina para este estudio por dos razones: favoreció la máxima recuperación del analito y preservó mejor la columna cromatográfica, al no inyectar muestras concentradas en el equipo de HPLC. Es importante señalar que en cada corrida cromatográfica se verificó la presencia del COU con el detector de fluorescencia, ya que este compuesto presenta dicha propiedad.

3A.3.6. Cinética de degradación y prueba de Butil hidroxitolueno (BHT)

Este ensayo se realizó para determinar el tiempo de degradación del COU en las muestras, luego de finalizado el proceso de extracción de las mismas. Para ello, se seleccionó un genotipo de cada cultivar (M y T) con presencia de COU, que se extrajo según la técnica habitual, aunque con una modificación: el agregado de antioxidante BHT al 0,05%. Esto se hizo con el objetivo de evaluar si este compuesto detiene o reduce el proceso de degradación del COU. Los resultados se exhiben en las Figuras 21 y 22.

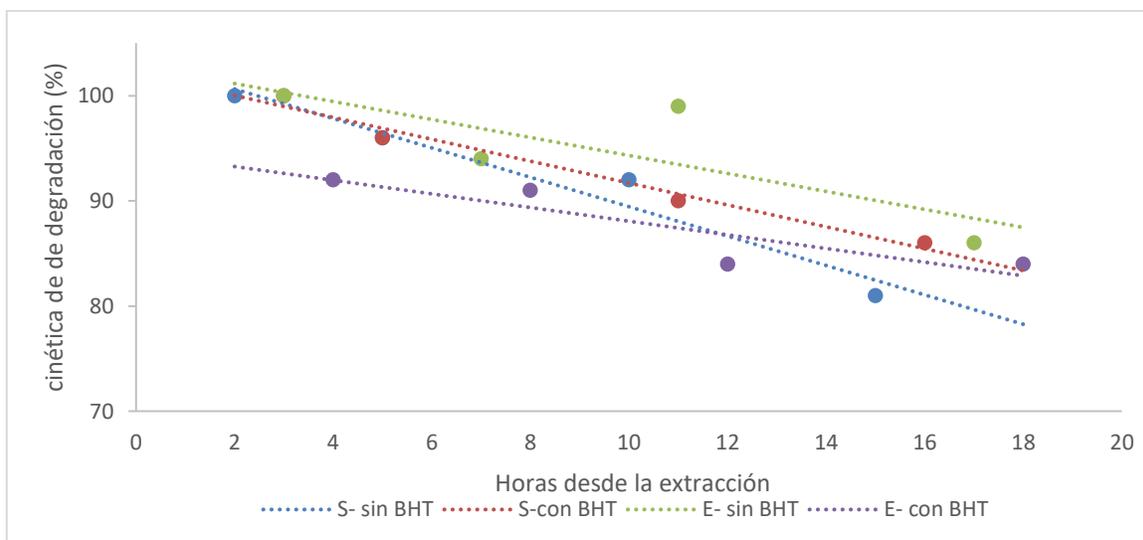


Figura 21 Cinética de degradación del COU y prueba de BHT del cultivar. Monarca. S: sano; E enfermo; BHT: butil hidroxitolueno.

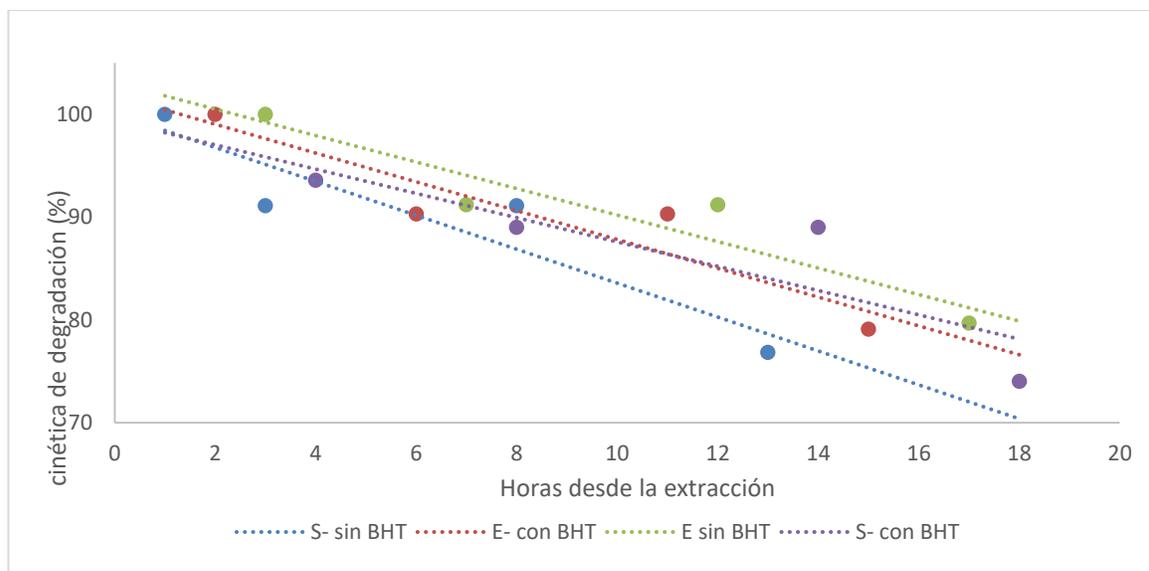


Figura 22: Cinética de degradación del COU y prueba de BHT del cultivar Trafal. S: sano; E enfermo; BHT: butil hidroxitolueno.

Luego del proceso de extracción (con y sin BHT) y para cada condición de enfermedad (S y E), se procedió a inyectar cada muestra en el equipo de HPLC. La duración de cada corrida en total (incluyendo el tiempo de infección) fue de 55 minutos y el orden de inyección fue el siguiente: S sin BHT; S con BHT; E sin BHT y E con BHT. Las muestras se inyectaron cada 4 h aproximadamente. Se observó que hasta las 12 h de finalizada la extracción, se produjo una pérdida del 10% de COU; mientras que pasadas las 18 h, esa pérdida se ubicó entre el 20 y el 25%. Asimismo, se concluyó que la incorporación de BHT al 0,05% no previno la degradación del COU. Basados en los resultados obtenidos, se decidió reducir la cantidad de muestras a realizar por día, considerando que se pueden analizar en el equipo de HPLC muestras extraídas hasta con 12 horas de anticipación.

3A 4. Clonación simultánea de los genotipos de los cultivares Monarca y Trafal en las condiciones de enfermedad (S y E).

La clonación del material vegetal en las dos condiciones de enfermedad (S y E) se realizó en el invernadero de Biotecnología INTA- Manfredi, según las condiciones descritas (Objetivos específicos 3, 4, 5, 6 y 7). Una vez enraizados, los clones se trasplantaron a macetas de 0,5 L. No obstante, se observó que ciertos genotipos generaron raíces con mayor facilidad que otros, como

fue el caso de T141 y M49. Por el contrario, otros genotipos demandaron un tiempo mayor para el enraizamiento (algunos más de dos meses), mientras que otros, como T144 y T117, no lograron generar el número de clones necesarios para el ensayo en invernadero y, por este motivo, fueron descartados del estudio. En general, cuando se trasladaron a una maceta intermedia (0,5L), los genotipos que no enraizaban rápidamente presentaron una tasa baja de supervivencia (Figura 23a). En atención a que esta metodología no fue eficiente para la obtención de todos los clones necesarios de cada genotipo para las respectivas condiciones (S y E), se resolvió repetir la clonación realizando un trasplante intermedio. Es decir que los clones que presentaron raíces se trasladaron a bandejas de germinación utilizando como sustrato lombricompost y perlita, lo que favoreció por un lado una mayor tasa de supervivencia de clones (Figura 23b y c) y por el otro permitió completar la cantidad necesaria de tres clones de cada genotipo en cada condición (S y E) que requería el ensayo hasta el trasplante definitivo (Figuras 23d, e, f).



Figura 23: Optimización de trasplante con macetas de germinación y lombricompost y trasplante a macetas de 4L. a) pérdida de clones luego del trasplante. b) clones listos para trasplantar. c) trasplante de clones en bandeja de germinación. d) clon para trasplante. e) maceta de 4L. f) ensayo en corte avanzado

Se destaca que la finalidad fue producir 10 (diez) clones de cada genotipo y para cada

condición; sin embargo, algunos genotipos presentaron grandes dificultades de supervivencia en esta etapa, como el T117 que resultó muy susceptible a la enfermedad del CVA. Alcanzado el número de clones necesarios de cada genotipo, los clones se trasplantaron a las macetas definitivas de 4L debidamente etiquetadas.

Sección B: Evaluaciones en plantas (Objetivos específicos 4, 5, 6 y 7)

3B.4 Ensayo en Invernadero: Diseño experimental

El ensayo se llevó a cabo en el invernadero de Biotecnología de la Estación Experimental (EEA) INTA Manfredi (Córdoba), ubicada a los 31° 49' 12" de Latitud Sur y 63° 46' 00" Longitud Oeste y a 292 m.s.n.m. Las plantas se mantuvieron, como se indicó anteriormente, bajo condiciones de invernadero, con un fotoperíodo de 16/8 horas de luz/oscuridad (luz natural suplementada con lámparas de sodio de 400 W, Philips Proelec y temperaturas entre 13° C (noche) y 30°C (día). El ensayo se mantuvo libre de infestaciones de los insectos vectores de la virosis por medio de tela antiáfida y pulverizaciones regulares con insecticidas. A fin de mantener la humedad necesaria, las macetas se regaron periódicamente según necesidad, evitando cualquier tipo de estrés hídrico. Todas las evaluaciones en plantas se realizaron en condiciones de invernadero. Debido a restricciones tanto en el número de las unidades experimentales, conforme ya fuera explicado previamente, como en la mecánica de aplicación de los tratamientos, el ensayo se realizó en dos tandas de genotipos, que se denominaron tanda 1 (t1) y tanda 2 (t2). Esta secuencia permitió manipular una cantidad de plantas adecuadas para el cuidado, mantenimiento y posterior evaluación. Cada tanda estuvo conformada por un máximo de 5 genotipos (plantas individuales) de cada cultivar, con sus respectivos clones (repeticiones n=3) y en cada una de las condiciones S y E. El ensayo se condujo bajo un diseño experimental de parcelas divididas, considerando la mesada con cada condición de enfermedad como parcela principal con dos niveles: planta sana (S) y planta infectada con el CVA (E). Se condujeron dos mesadas por cada condición (S y E) (Figura 24). Dentro de cada mesada, como sub-parcelas se ubicaron los genotipos de los cultivares Monarca (M) y Trafal (T), según un arreglo completamente aleatorizado, con tres repeticiones para cada condición. Con el propósito de evaluar la evolución

en el tiempo de las condiciones (S y E) y sus correspondientes interacciones con el *pool* de genotipos de cada cultivar, se incorporó el concepto de modelos lineales mixtos de datos longitudinales y medidas repetidas, que contempló también la existencia de las diferentes tandas a lo largo del ensayo.

Adicionalmente, y a efectos de considerar la posible fuente de variación que suponen las diferentes tandas en las que se condujo el experimento, se introdujeron genotipos testigo durante todo el ensayo, esto es genotipos que se repitieron en ambas tandas de cada cultivar. La presencia de estos testigos permitió modelar los efectos sistemáticos de las mesadas (identificadas como A, B, C y D) en las que se ubicaron las unidades experimentales. Se consideró como unidad observacional al “clon” y como unidad experimental a la maceta.

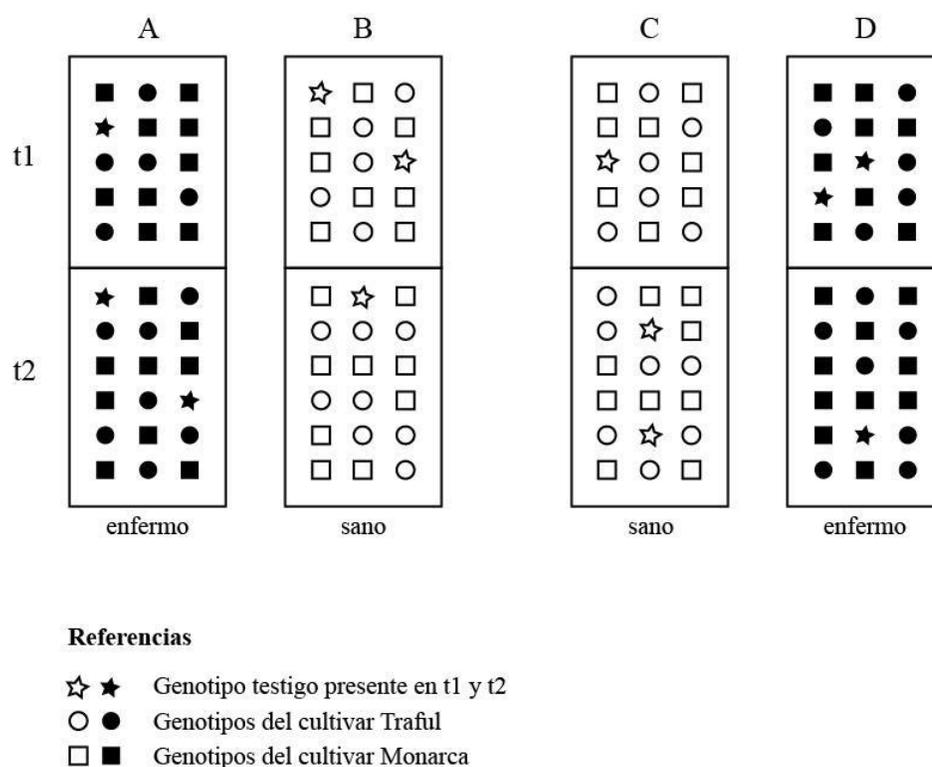


Figura 24: Esquema del ensayo en invernadero. Disposición de las condiciones S y E en las mesadas y de las tandas t1 y t2.

3B.5. Mediciones y Evaluaciones

En las plantas se realizaron mediciones de caracteres morfológicos, fenológicos y de rendimiento de forraje, como así también evaluaciones de la intensidad de la enfermedad a través de una escala numérica que se utilizó para estimar el índice de severidad de la virosis. Cada medición se hizo seis veces (n=6). Los cortes comenzaron cuando las plantas alcanzaron la suma térmica acumulada de 380° Grados Días (GD) (Spada, com. pers., 2013¹), calculada a través de la fórmula:

$$ST = \Sigma[(T_{\text{máx}} + T_{\text{mín}})/2 - (T_b)]$$

siendo:

ST: suma térmica

Σ : sumatoria de la temperatura media diaria menos la T_b

$T_{\text{máx}}$: Temperatura máxima

$T_{\text{mín}}$: Temperatura mínima

T_b : Temperatura base de crecimiento de alfalfa (5°C)

Los datos de temperatura fueron registrados con un data logger Easy log USB cada 30mín.

3B.5.1 Caracteres morfológicos y fenológicos

Los caracteres morfológicos y fenológicos evaluados (Objetivo específico 4) fueron:

a- Sobre la totalidad de la planta (maceta individual):

- Altura de planta (HT), medida en cm desde el suelo hasta el ápice del tallo más largo
- Número de tallos (nT), por conteo directo
- Estadio Fenológico Ponderado (EFP) para cada maceta (clon). Se determinó el estadio de desarrollo de madurez correspondiente a cada tallo según los estados descriptos por Rodríguez y Spada (2007) con modificaciones, considerando al estadio 0, 1 y 2 como 1, y luego prosiguiendo hasta el estadio 5. Se registró de cada

¹ Ing. Agr. (MSc). Investigadora retirada de producción y utilización de pasturas. E.E.A. Manfredi INTA.

maceta la cantidad de tallos comprendidos entre los estadios de 1 (vegetativo) a 5 (floración temprana) y se calculó EFP mediante la fórmula descrita por Spada *et al.*, (2007).

$$\Sigma[(S_m \cdot N)/C_{tm}]$$

donde

S_m = estadio de madurez

N = cantidad de tallos en ese estado

C_{tm} = total de tallos de la maceta

b- Sobre el tallo de mayor longitud de la planta:

- Número total de nudos (nN), por conteo directo.
- Distancia media de entrenudos (dN), expresada en cm y calculada mediante la relación HT/nN .

3B.5.2. Evaluación de rendimiento y calidad forrajera (Objetivo específico 4)

El rendimiento de forraje en materia seca (PS) por planta se midió en cada uno de los cortes de evaluación. Para ello, se cortó todo el forraje a una altura de 5 cm desde la base de la planta. El forraje se pesó primero en verde y luego se secó en estufa a 55° C hasta peso constante, determinando así el peso seco (PS) expresado en g materia seca genotipo⁻¹. La relación hoja/tallo (RHT) se midió separando en la muestra seca las fracciones hoja y tallo, pesando luego cada fracción. Los pecíolos, estípulas, yemas y flores se incluyeron en la fracción hoja, mientras que los racimos florales se incluyeron en la fracción tallo. Posteriormente, todo el material seco (hojas y tallos) fue conservado a -20°C para la posterior determinación del fitoestrógeno COU.

3B.5.3. Índice de Severidad del CVA por genotipo y su relación con el COU

El índice de severidad de la enfermedad (Objetivo específico 5) se evaluó adaptando la escala cualitativa de la metodología desarrollada por Odorizzi *et al.*, (2017), aunque con modificaciones. Para ello, se consideró el tipo de afectación en los tallos, folíolos y nervaduras

de los folíolos por planta. También se realizó un ajuste en la definición de los grados en relación a los síntomas por amarillamiento, debido a que en invernadero estos síntomas suelen ser más leves que en condiciones de campo. Además, se agregó el grado 4 de severidad para diferenciar aquellas plantas en las cuales se observaron todas las características del grado 3, pero sin el deterioro generalizado expresado en la escala original. La incorporación del grado 4 (G4) se validó en cada uno de los cortes realizados ($n=6$) a través de los atributos número de tallos (nT) y $Ps\ g.genotipo^{-1}$, considerando a cada clon (maceta) individual sin discriminar o identificar a qué genotipo pertenecía. Para ello se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) y se encontró que aquellos clones que presentaron mayor disminución ($P=0,001$) en el número de tallos se relacionaron con los grados de severidad más avanzados (G3 y G4) (Figura 25) en ambos cultivares. Igualmente, el atributo $PS\ g.genotipo^{-1}$ disminuyó con el aumento de los síntomas del CVA para cada cultivar y se relacionó con los grados de severidad más avanzados (G3 y G4), con diferencias significativas ($P<0,01$; $P<0,001$) para Monarca y Trafal respectivamente (Figura 26).

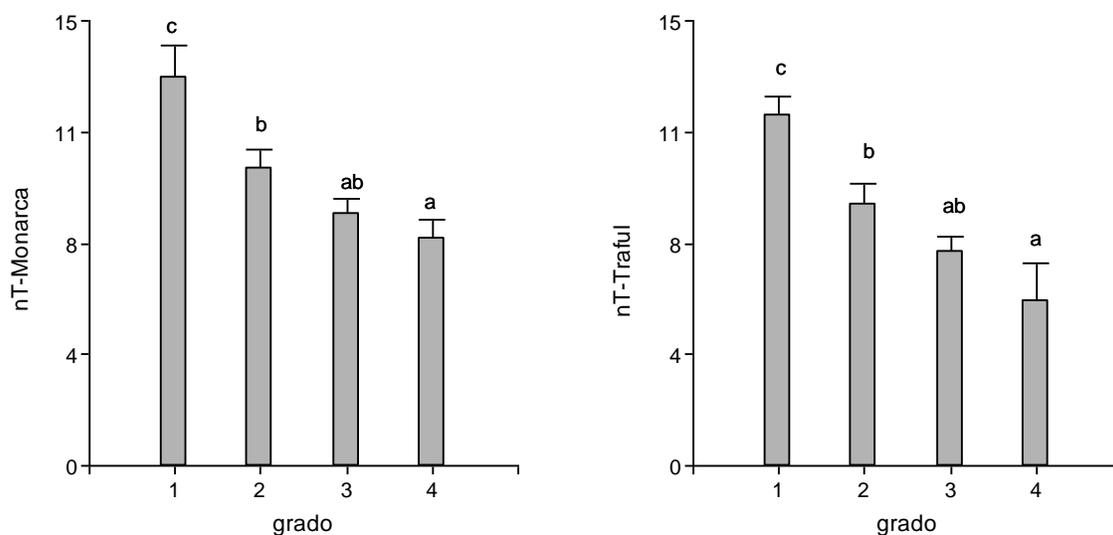


Figura 25: Relación entre los grados de severidad (ISG) y la variable nT. Cada barra representa el valor promedio de número de tallos (nT) para cada cultivar. Grado: grado de severidad. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (LSD, $P<0,05$).

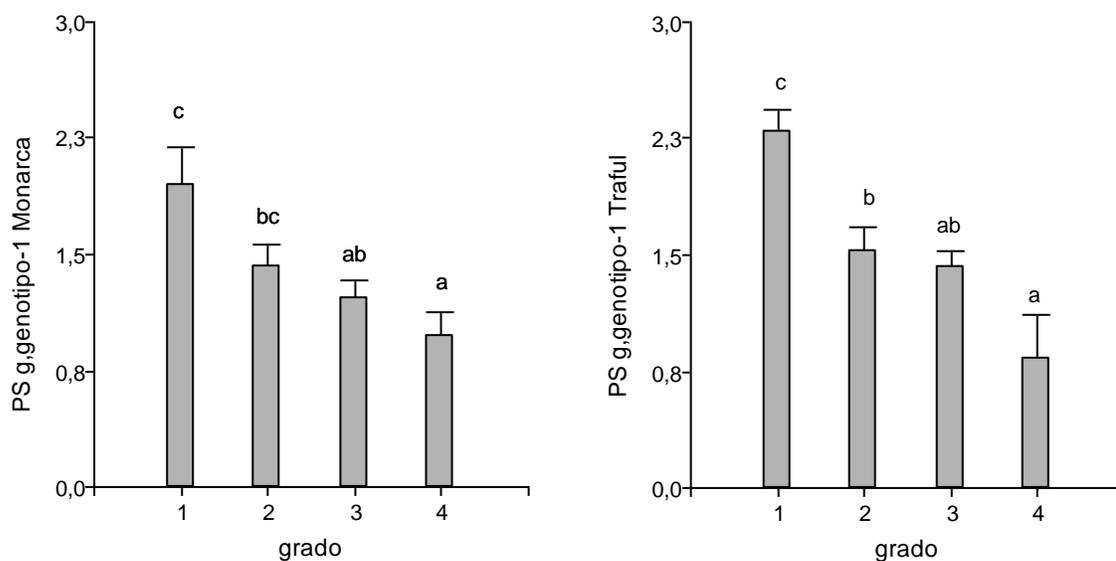


Figura 26: Relación entre los grados de severidad y el atributo PS g.genotipo⁻¹ por planta. Cada barra representa el PS g. de materia seca genotipo⁻¹ por planta individual (clon= maceta) de los cultivares Monarca y Trafal. grado: grado de severidad. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0,05$).

En base a lo expuesto anteriormente, los genotipos de la condición E de los cultivares Monarca y Trafal se clasificaron según una escala visual de 0 a 4, que se detallada a continuación y se ilustra en la Figura 27.

Grado 0: sin síntomas

Grado 1: Tallos normales, hojas con enrulamiento incipiente, folíolos de tamaño levemente reducido y sin o con leve cambio de coloración. Engrosamiento incipiente de nervaduras.

Grado 2: Tallos normales o con acortamiento leve de entrenudos. Hojas con enrulamiento evidente, folíolos de tamaño reducido, con o sin cambio evidente de coloración. Engrosamiento incipiente de nervaduras, con o sin presencia de alteraciones.

Grado 3: Tallos con acortamiento severos, reducción de entrenudos, hojas arrelladas generalizadas, folíolos de tamaño marcadamente reducido, mosaico, con o sin amarillamiento del borde del folíolo y alteraciones en las nervaduras con engrosamientos prominentes, enaciones, uña de gato, etc.



Figura 27: Grados de severidad identificados para el complejo viral del achaparramiento.
G: grado de severidad; G0 a G4 progresión de la enfermedad.

Grado 4: Marcado deterioro de la planta, disminución del número de tallos por planta y acortamiento severo de los mismos, evidente reducción de entrenudos, disminución del número de hojas, exhibiendo las presentes un arpeollado generalizado, folíolos de tamaño marcadamente reducido, mosaico, con o sin amarillamiento del borde del folíolo y alteraciones en las nervaduras con engrosamientos prominentes, enaciones, uña de gato, etc.

Con los grados obtenidos se calculó el índice de severidad para cada genotipo (ISG), definido como la sumatoria de evaluaciones (cortes) del mismo genotipo en cada grado de severidad, multiplicado por el grado y dividido por el número de cortes realizados a dicho genotipo multiplicado por el máximo grado por cien.

$$ISG = \sum_{i=0}^4 \left(\frac{G_i \times N^{\circ} \text{ de plantas del genotipo en el grado } i}{n^{\circ} \text{ de cortes realizados a cada genotipo } \times 4} \right) \times 100$$

donde: G_i = grados de severidad; $i = 0$ a 4 .

Para relacionar el ISG con el COU, se construyó una variable denominada cambio de contenido de COU entre las dos condiciones (E - S). Esta variable, representada como: COU (E - S), se calculó como la sumatoria de las diferencias acumuladas de E - S de cada genotipo (clones), dividido el número de cortes realizados ($n=6$). La variable COU (E-S) permitió obtener valores de COU (valores positivos) de cada genotipo a lo largo de las evaluaciones (tandas 1 y 2) y relacionado con el ISG.

$$COU (E - S) = \sum_{i=1}^3 \frac{(COU \text{ del genotipo } i \text{ } j \text{ } (E - S))}{n^{\circ} \text{ de cortes } (n = 6) \text{ realizados a cada genotipo}}$$

donde:

S= condición S (sana)

E= condición E (infectada con el CVA)

i j = clon i de cada genotipo evaluado en el corte j

3B.5.4. Correlación entre contenido del fitoestrógeno COU y las características morfológicas, fenológicas y productivas

Se realizó el análisis de correlación, a nivel de cultivar, entre: el COU, los síntomas del CVA (medido a través de ISG) y las características morfológicas, fenológicas y productivas (Objetivo específico 6). Para ello, se empleó el mismo procedimiento que en el punto anterior, es decir se construyó la variable diferencia promedio, pero entre las condiciones S y E (S-E) para cada una de las variables estudiadas: dif-PS, dif-HT, dif-dN, dif-nT, dif-RHT y dif-EFP, incluyendo a dif-COU (S-E). En ese contexto, la nueva variable dif-(S-E) se calculó como la sumatoria de las diferencias acumuladas S-E de cada genotipo (clones), dividido el número de cortes realizados (n=6) a ese genotipo, de acuerdo a la siguiente ecuación.

$$dif (S - E) = \sum_{i=1}^3 \frac{(Variables\ del\ genotipo\ ij\ (S - E))}{n^{\circ}\ de\ cortes\ (n = 6)\ realizados\ a\ cada\ genotipo}$$

donde:

Variables= PS; HT; dN; nT; RHT; EFP

S= condición S

E= condición E

i j= clon i de cada genotipo desarrollado en el corte j

3B.5.5. Evolución del contenido de COU en función del desarrollo de la enfermedad

Para analizar la evolución del contenido de COU en función del desarrollo de la enfermedad se exploró la variabilidad a nivel cultivar y a nivel genotipo en ambas condiciones (S y E) en relación a los atributos medidos (Objetivo específico 7). A nivel cultivar se exploró la variabilidad de Monarca (susceptible) y Trafal (tolerante putativo) en las condiciones S y E respecto del contenido de COU, del ISG y en función de las variables morfológicas, fenológicas y productivas medidas (PS, HT, dN, nT, RHT, EFP). A nivel genotipo se evaluó el comportamiento de cada genotipo en la condición S y E respecto del contenido de COU, del ISG y en relación a las variables mencionadas anteriormente.

3B.6 Análisis estadístico

Para el análisis de los datos se aplicaron Modelos lineales generales mixtos, identificando las diferentes fuentes de variación descritas para el ensayo y las mediciones sobre la misma unidad experimental repetidas a lo largo del tiempo (West *et al.*, 2007). El proceso de construcción del modelo lineal general mixto se correspondió con la *Top-Down Strategy* sugerida por Verveke y Molembehg (2000). Se seleccionaron dos modelos: el primero a nivel poblacional -cultivar- contempló como efectos fijos a enfermedad, cultivar y cortes y como efectos aleatorios a mesada, genotipo, maceta. El segundo a nivel genotipo contempló como efectos fijos a genotipo y enfermedad y como efecto aleatorio a mesada y maceta. La estructura de la matriz de covarianza de los residuos UN (*unstructured*) explicó de manera más eficiente los datos observados. Además, se tuvo en cuenta la posible variabilidad intra-sujeto, asumiendo a las unidades observacionales (clon) como sujeto específico a lo largo del ensayo y obteniendo la correlaciones en el tiempo que generaron las mediciones repetidas (n= 6 cortes).

El modelo seleccionado fue el más parsimonioso, utilizando los Criterios de Bondad de Ajuste para Modelos Mixtos -denominados: AIC, AICC, -2log likelihood- que se obtuvieron a partir del método REML con PROC MIXED del software estadístico Infostat (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

Simultáneamente se incorporaron procedimientos de Análisis Exploratorios, Análisis Multivariados, Análisis de Correlación, Análisis de Sendero y Análisis de Componentes Principales. Las diferencias entre tratamientos se evaluaron con la prueba de comparación múltiple de medias DGC (Di Rienzo *et al.*, 2002) ($\alpha = 0,05$). Además el análisis de la varianza (ANOVA) se utilizó para evaluar las variables nT, PS g.genotipos⁻¹ con $\alpha = 0,05$ (LSD de Fisher).

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

4. Ensayo en Invernadero: correspondiente a las dos tandas (t1 y t2) de evaluación.

Como se indicara anteriormente, el ensayo en invernadero se realizó en dos tandas de evaluación (t1 y t2). En cada tanda se realizaron 6 cortes con sus correspondientes evaluaciones (n=6). Los genotipos, con sus repeticiones (clones), se ubicaron en las cuatro mesadas: A y D (condición E) y C y B (condición S) (Figura 28).



Figura 28: Ubicación de las plantas en las mesadas del invernadero y vista general del ensayo

Una vez que las plantas alcanzaron el 10 % de floración por primera vez, se cortaron (c0) para uniformar el desarrollo del material a efectos de iniciar el ensayo. A partir de allí el inicio del conteo de suma térmica hasta los $380^{\circ}\text{C}/\text{día}^{-1}$. En alfalfa, la acumulación térmica entre los 300 y los $400^{\circ}\text{C}/\text{día}^{-1}$ permite compatibilizar la producción y calidad nutritiva del forraje (Sardiña, 2018). En la Tabla 5 se indican las fechas de corte dentro de cada tanda de las evaluaciones. Las evaluaciones (cortes) de la tanda 1 comenzaron a mediados de septiembre de 2015, registrando una sumatoria térmica promedio de $15,6^{\circ}\text{C}/\text{día}^{-1}$ en el corte 1 y finalizando en enero de 2016 con $20^{\circ}\text{C}/\text{día}^{-1}$ en el corte 6. Por su parte, las evaluaciones de la tanda 2 comenzaron en enero de 2016, registrando una sumatoria térmica promedio de $21,1^{\circ}\text{C}/\text{día}^{-1}$ en el corte 1, y

finalizaron en julio de 2016 con un promedio de $15,5^{\circ}\text{C}/\text{día}^{-1}$ en el corte 6 (Tabla 5). Los datos generados en cada tanda se analizaron por separado.

Tabla 5: Fecha de corte de las tandas 1 y 2 de ensayo conducido en condiciones de invernadero.

Tanda	Corte	Fecha	Mín °C	Máx °C	ST °C
1	0 ¹	20/08/2015	13,3	26,0	13,5
1	1	14/09/2015	15,0	26,1	15,6
1	2	12/10/2015	14,1	28,0	16,2
1	3	04/11/2015	14,0	28,6	16,4
1	4	25/11/2015	15,5	32,7	19,1
1	5	15/12/2015	17,2	33,1	20,1
1	6	05/1/2016	18,1	32,5	20,3
2	0 ¹	05/01/2016	18,1	32,5	20,3
2	1	25/01/2016	20,0	32,3	21,1
2	2	15/02/2016	19,8	31,8	20,5
2	3	08/03/2016	18,4	30,3	19,4
2	4	29/03/2016	16,4	30,0	18,2
2	5	26/04/2016	17,0	24,5	15,8
2	6 ²	15/06/2016	17,4	23,1	15,3

¹ corte de emparejamiento (corte que no se incluyó en el análisis estadísticos. ² fecha de corte que reemplaza al 21/05/2016, por inconvenientes en el invernadero se descartó el análisis estadístico. ST: suma térmica promedio de cada corte.

En la Tabla 6 se detallan los genotipos de cada cultivar (Monarca y Trafal) desarrollados para cada tanda. En la tanda 2 se incluyeron como testigos los genotipos M49, T141 y T148 que habían sido evaluados en la tanda 1. Por otro lado, los genotipos M12, M16, M49 del cultivar Monarca y T128, T148 y T150 del cultivar Trafal, si bien se evaluaron en los atributos morfológicos, fenológicos y productivos en cada uno de los seis cortes, debieron ser excluidos posteriormente del análisis de los resultados por no haberse detectado el ADV en la condición E (en varias determinaciones), conforme se había estipulado para el objetivo específico 2. Este comportamiento resultó muy llamativo dado que todos ellos presentaban las alteraciones morfológicas compatibles con la sintomatología descrita por Lenardon *et al.*, (2010). Los genotipos que cumplieron con la detección de la infección de ambos virus (AMV y ADV) fueron siete en Monarca y seis en Trafal.

Tabla 6: Genotipos desarrollados en los cultivares Monarca y Trafal evaluados en las dos tandas (t1 y t2) del ensayo en condiciones de invernadero.

Cultivar	t1	t2
Monarca	M12 ²	M10
	M16 ²	M11
	M18	M29
	M23	M36
	M49 ^{1;2}	M37
	--	M49 ^{1;2}
Trafal	T112	T124
	T129	T128 ²
	T141 ¹	T140
	T148 ^{1;2}	T141 ¹
	T150 ²	T148 ^{1;2}
	----	T152

¹genotipos testigos: genotipos que se repiten en las dos tandas. ² genotipos excluidos del análisis de los resultados por falta de confirmación del ADV (alfalfa drawf virus).

4.1. Determinación del contenido de COU en Monarca y Trafal para las dos condiciones de enfermedad (S y E)

Para el análisis de COU en el corte 1 y en los seis cortes (c=6) se aplicaron los modelos lineales generales mixtos descritos en el punto 3B.6 Análisis estadísticos.

4.1.1 Determinación preliminar (corte 1) de COU en las condiciones S y E

La presencia del fitoestrógeno coumestrol en los dos cultivares de alfalfa y en las dos condiciones de enfermedad (S y E) (Objetivo específico 3), se evaluó -en primera instancia- en el primer corte (c1), confirmando su presencia en todos los casos (Tabla 7). Se observó una gran variabilidad entre genotipos de los dos cultivares, con valores de contenido de COU que fueron de 160 ± 100 ppm a 1210 ± 100 ppm en el cv Monarca y con valores menores al límite de cuantificación de la técnica ($<LC=0,48$ ppm) a 1000 ppm para el cv Trafal. No hubo interacción ($P>0,05$) entre cultivar y condición enfermedad (S y E) en las dos tandas de evaluación (t1 y t2) (Tabla 7). Tanto en t1 como en t2, el contenido de COU en ambos cultivares en la condición E tendió a aumentar respecto de S, aunque sin diferencias significativas (Tabla 7). Asimismo,

entre los cultivares no hubo diferencias significativas en el contenido de COU en ninguna de las condiciones (Tabla 7).

Tabla 7: Contenido de COU en genotipos de los cultivares Monarca y Traful determinado en dos condiciones de virosis (S y E) en el corte 1 de ambas tandas de evaluación (t1 y t2) evaluadas.

Trat	Cultivar	t1 COU-ppm					t2 COU-ppm				
		n	Medias	EE	Mín.	Máx.	n	Medias	EE	Mín.	Máx.
S	Monarca	6	570 ± 190 ^a		300	820	15	490 ± 100 ^a		160	1100
S	Traful	9	560 ± 150 ^a		<LC	990	12	470 ± 120 ^a		<LC	790
E	Monarca	6	620 ± 180 ^a		410	770	15	640 ± 100 ^a		330	1210
E	Traful	9	570 ± 150 ^a		<LC	980	12	600 ± 120 ^a		<LC	1000
t1	<i>P</i> -valor	cultivar x condición enfermedad (S y E)					0,906 ^{ns}				
t2	<i>P</i> -valor	cultivar x condición enfermedad (S y E)					0,913 ^{ns}				

Genotipos evaluados en t1: M18 y M23 (Monarca) y T112, T129 y T141 (Traful). Genotipos evaluados en t2: M10, M11, M29, M36 y M37 (Monarca) y T124, T140, T141 y T152 (Traful). Trat: condición enfermedad. n: número de plantas evaluadas en cada condición (S y E); Medias: contenido de Coumestrol expresado en parte por millón (COU ppm) estimadas por el modelo. EE: Se indica el error estándar. Mín: Mínimo. Máx: Máximo. S: planta sana. E: planta infectada con el complejo viral del achaparramiento. <LC: Límite de cuantificación 0,48 ppm. ^{ns}: no significativo. Letras minúsculas distintas en la misma columna indican diferencias entre cultivares y tratamientos (S y E) (DGC, $P < 0,05$).

4.1.2 Contenido de COU en los cultivares Monarca y Traful bajos las dos condiciones de enfermedad (S y E) a lo largo de los 6 cortes de las tandas (t1 y t2) evaluadas.

Cuando se analizaron todos los cortes (n=6), las determinaciones promedio del contenido de COU fueron similares a los descriptos para el corte 1, es decir que no hubo interacción ($P > 0,05$) entre cultivares y condiciones de enfermedad (S y E) en ambas tandas (Figura 29). A pesar de ello, el contenido de COU en Monarca para la condición E (670 ± 180 ppm) fue levemente mayor (15%) que en la condición S: 570 ± 100 ppm, aunque sin diferencias significativas. Por el contrario, los contenidos de COU en Traful se mantuvieron similares en ambas condiciones (S y E): 540 ± 150 y 550 ± 150 ppm, respectivamente ($P = 0,802$; Figura 29). Asimismo, en t2 y a pesar de que la interacción no fue significativa $P = 0,996$; Figura 29), el contenido de COU en la condición E tendió a aumentar respecto de S en ambos cultivares: 680 ± 100 vs 630 ± 100 ppm en Monarca y 600 ± 110 vs 540 ± 110 en Traful.

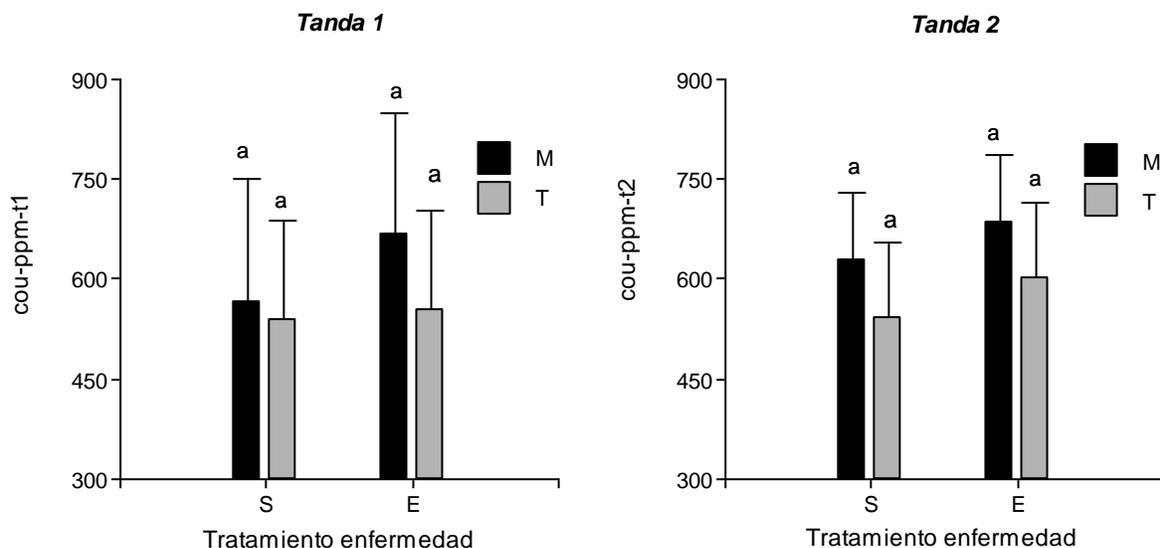


Figura 29: Contenido de COU en dos cultivares (Monarca y Trafal) y en dos condiciones (S y E), considerando los 6 cortes realizados en las tandas 1 y 2 evaluadas. Cada barra representa el valor promedio de contenido de COU de los genotipos evaluados en los 6 cortes en cada tanda, en cultivares: Monarca (M) y Trafal (T) y en las condiciones de enfermedad (S: planta sana; E: planta infectada con el complejo viral del achaparramiento CVA). Se indica el error estándar. Genotipos evaluados en t1 (M18 y M23 y T112, T129 y T141) y genotipos evaluados en t2 (M10, M11, M29, M36 y M37 y T124, T140, T141 y T152), en cada tanda (t) de evaluación (t1 y t2). COU-ppm: contenido de COU en parte por millón. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (DGC, $P < 0,05$).

4.1.3. Contenido de COU en los genotipos de Monarca y Trafal en las dos condiciones de enfermedad (S y E) para ambas tandas (t1 y t2) de evaluación.

Las determinaciones de COU en cada genotipo evaluado de los cultivares Monarca y Trafal a los largo de los seis cortes de cada tanda de evaluación y para cada condición de enfermedad (S y E), se resumen en la Tabla 8.

En la condición E, el contenido de COU aumentó respecto de S en la mayoría de los genotipos. La prueba de contraste indicó que sólo el genotipo M18 del cv Monarca y los genotipos T124 y T140 del cv Trafal presentaron diferencias significativas para los 6 cortes realizados respecto de sus mismos clones no infectados ($P < 0,05$; Tabla 8), siendo esos incrementos de 28, 11 y 14%, respectivamente. Igualmente el genotipo M36 incrementó en E su contenido de COU en 15% respecto de S, pero sin diferencias significativas ($P = 0,06$) (Tabla 8). Asimismo, los genotipos M11 y T129 presentaron elevados contenidos de COU constitutivo, aunque sin diferencias entre E y S. Por otro lado, los genotipos T112 y T152, en los 6 cortes

evaluados, no registraron cantidades de COU cuantificables, vale decir que la concentración de COU, en caso que hubiera estado, en estos casos se encontraba por debajo del límite de cuantificación (<LC) de la técnica ($P>0,05$; Tabla 8). Además, se observó que el contenido de COU en el genotipo T141 (genotipo presente en t1 y t2), no presentó incrementos significativos de COU en ambas tandas ($P>0,05$; Tabla 8).

Tabla 8: Contenido de COU (en ppm) de cada genotipo de los cultivares Monarca y Trafal en cada condición de enfermedad (S y E) y en ambas tandas de evaluación (t1 y t2). Se incluye el porcentaje de incremento (I %) de la variable entre las condiciones S y E.

Tanda	Genotipo	n	COUppm_S	E.E.	n	COUppm_E	E.E.	P-valor	I %
1	M18	18	360 ± 30		18	500 ± 30		0,001	28
1	M23	18	770 ± 30		16	800 ± 30		0,436	<5
1	T112	18	<LC		18	<LC			
1	T129	18	942 ± 30		18	930 ± 30		0,754	-
1	T141	18	720 ± 30		18	720 ± 30		0,989	-
2	M10	18	390 ± 30		15	350 ± 30		0,420	-
2	M11	17	1100 ± 30		17	1140 ± 30		0,351	<5
2	M29	18	740 ± 30		18	810 ± 30		0,110	<10
2	M36	18	460 ± 30		17	540 ± 30		0,060	15
2	M37	17	480 ± 30		18	520 ± 30		0,275	<10
2	T124	17	750 ± 30		17	850 ± 30		0,029	11
2	T140	18	650 ± 30		18	860 ± 30		0,017	14
2	T141	17	750 ± 30		16	780 ± 30		0,431	<5
2	T152	18	<LC		18	<LC			

n: número de plantas evaluadas para cada genotipo en los 6 cortes realizados. S: sano sin el CVA. E: infectado con el complejo viral del achaparramiento (CVA). M: Monarca. T: Trafal. COU-ppm: contenido de coumestrol expresado en parte por millón. EE: error estándar. P-valor: Para cada genotipo se realizó la prueba de contraste (DGC, $P<0,05$); I %: incremento; -: no hay I. <5: I menor a 5 %; T141: genotipo presente en t1 y en t2. <LC: Límite de cuantificación.

Los resultados obtenidos sugieren que cada genotipo, independientemente del cultivar de pertenencia, presentó un nivel de COU constitutivo y que, a partir de allí, la infección con el CVA promovió la producción de este metabolito secundario en la mayoría de los genotipos estudiados; en algunos casos, esas diferencias fueron significativas a lo largo de los 6 cortes analizados. Asimismo, se apreció que los genotipos presentaron diferentes concentraciones de COU, a punto tal que se los agrupó como: contenido no detectable (< a 0,48 ppm); contenido

bajo (0,48-500 ppm); contenido medio (500-950 ppm); y contenido alto (>950 ppm). A la vez, algunos de estos genotipos mostraron capacidad para estimular y/o elevar el contenido de COU en la condición E (infección del CVA). Los resultados obtenidos en esta primera parte experimental sugieren que la síntesis de COU está fuertemente incentivada por la infección del CVA.

4.2 Evaluación de las características productivas, morfológicas y fenológicas

A continuación se describen los resultados correspondientes a las dos tandas (t1 y t2) de evaluación de las variables: PS, HT nT, dN, RHT y EFP (objetivo específico 4) para cada cultivar (Monarca y Traful) en cada condición de enfermedad (S y E) y considerando los 6 cortes realizados (n=6). Para el análisis de estas variables se aplicaron los modelos lineales generales mixtos descritos en el punto 3B.6 Análisis estadísticos.

4.2.1 Variable productiva: rendimiento de peso seco (PS).

Para PS hubo interacción significativa ($P=0,028$) entre cultivares y condición enfermedad en t1. La infección con el CVA (E) provocó una disminución del 40% en el PS del cv Monarca, con valores de PS de $2,90 \pm 0,20$ y $1,80 \pm 0,20$ g genotipo⁻¹ para S y E, respectivamente. La disminución en Traful no fue tan marcada, con reducción de 14% en PS en E ($2,30 \pm 0,20$ g.genotipo⁻¹) respecto de S ($2,70 \pm 0,20$ g.genotipo⁻¹) con diferencias significativas ($P=0,028$) (Figura 30). Sin embargo, en t2 no hubo interacción ($P=0,07$) para PS entre cultivares y condición enfermedad (Figura 30). A pesar de ello, en la condición E los genotipos tendieron a reducir el PS respecto de S en ambos cultivares. De todos modos, la alta variabilidad intra varietal y el escaso número de genotipos analizados no permitieron detectar diferencias significativas en esta tanda de evaluación (t2).

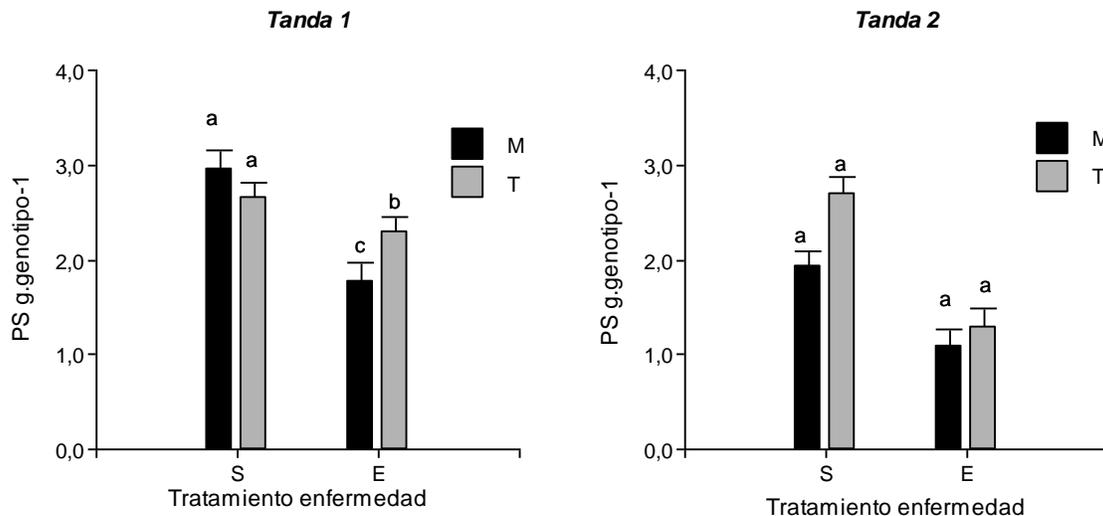


Figura 30. Efecto provocado por el CVA sobre el contenido medio de peso seco (PS expresado en g.genotipo⁻¹) en dos cultivares de alfalfa (Monarca y Trafal) en dos condiciones de enfermedad (S y E) y en dos tandas de evaluación (t1 y t2). Cada barra representa el valor promedio de 6 cortes de los genotipos evaluados en cada tanda por cultivar Monarca (M) y Trafal (T) y condición enfermedad S y E. S: planta sana; E: planta infectada con el CVA. Se indica el error estándar. Genotipos evaluados en t1: M18 y M23 y T112, T129 y T141. Genotipos evaluados en t2: M10, M11, M29, M36 y M37 y T124, T140, T141 y T152. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos $P < 0,05$. (DGC, $P < 0,05$).

A nivel genotipo se aprecia que, en general, los valores de PS en la condición E fueron menores que en la condición S, alcanzando niveles de significancia ($P < 0,05$) en la mayoría de los casos. Los genotipos M18, T124 y T140, que mostraron incrementos significativos en el contenido de COU en la condición E respecto de S, también presentaron pérdidas significativas de PS en la condición E, con valores de 30%, 38% y 67% respecto de S (Tabla 9). Esto fue más notorio en algunos genotipos del cv Monarca, donde la condición E provocó una marcada reducción del PS en relación a la condición S en M10 y M23, con pérdidas de 84 y 48% respectivamente y una reducción de PS en M37, que llegó a 45% en E respecto de S, pero no alcanzó niveles de significancia ($P = 0,085$). En el cv Trafal, la infección también provocó pérdidas significativas ($P < 0,05$) en el PS respecto de la condición S en los genotipos T141 (t1 y t2) y T152, con valores de 36%, 51% y 61%, respectivamente. Por otro lado, la infección no afectó ($P > 0,05$) el PS de los genotipos T112, T129 y M29, lo que podría sugerir algún grado de tolerancia al CVA en estos materiales (Tabla 9).

Tabla 9: Contenido de PS (g.genotipo⁻¹) de cada genotipo de los cultivares Monarca y Trafal en cada condición de enfermedad (S y E) y en ambas tandas de evaluación (t1 y t2). Se incluye el porcentaje de disminución (D %) de la variable entre las condiciones S y E.

Tanda	Genotipo	n	PS_S	E.E.	N	PS_E	E.E.	P-valor	D %
1	M18	18	2,83 ± 0,30		18	1,99 ± 0,20		0,042	30
1	M23	18	2,77 ± 0,30		15	1,43 ± 0,20		0,003	48
1	T112	18	2,56 ± 0,30		18	2,29 ± 0,20		0,494	11
1	T129	18	2,54 ± 0,30		18	2,63 ± 0,20		0,805	-
1	T141	18	2,69 ± 0,30		18	1,72 ± 0,20		0,020	36
2	M10	18	1,99 ± 0,30		15	0,32 ± 0,30		0,045	84
2	M11	18	2,12 ± 0,30		17	1,48 ± 0,30		0,131	30
2	M29	18	1,76 ± 0,30		18	1,71 ± 0,30		0,907	<5
2	M36	18	1,31 ± 0,30		17	1,02 ± 0,30		0,477	22
2	M37	18	1,63 ± 0,30		18	0,89 ± 0,30		0,085	45
2	T124	17	2,58 ± 0,30		18	1,61 ± 0,30		0,026	38
2	T140	18	3,19 ± 0,30		17	1,06 ± 0,30		0,001	67
2	T141	17	1,72 ± 0,30		16	0,84 ± 0,30		0,043	51
2	T152	18	2,36 ± 0,30		18	0,91 ± 0,30		0,001	61

n: número de plantas analizadas por corte y condición (S y E); PS: contenido promedio de peso seco (PS) expresado en g.genotipo⁻¹; EE: error estándar; S: planta sana; E: planta infectada con el complejo viral del achaparramiento; 1: tanda; 2: tanda 2. P-valor: Para cada genotipo se realizó la prueba de contraste (DGC, $P < 0,05$); -: no hay disminución; T141: genotipo presente en t1 y en t2.

4.2.2 Variable morfológica: altura total (HT)

Bajo condiciones de campo, la infección del CVA provoca en general una disminución de la altura de planta (HT), que se traduce en un aspecto achaparrado de las mismas. Sin embargo en el ensayo hecho en invernadero no hubo interacción significativa (Tabla 10) sobre este atributo evaluando cvs (Monarca y Trafal) y condición enfermedad (S y E) tanto en t1 ($P=0,952$) y en t2 ($P=0,580$). La HT en ambas tandas de evaluación presentó un alto coeficiente de variación (entre 17 y 26%) dentro de cada cultivar y las condiciones evaluadas S y E (Tabla 10). La altura de planta (HT) se midió para cada genotipo en cada condición de enfermedad (S y E) y en los 6 cortes de cada tanda de evaluación (t1 y t2). Los resultados se ofrecen en la Tabla 11.

Tabla 10: Altura total (HT) en dos cultivares de alfalfa (Monarca y Traful) en dos condiciones de enfermedad (S y E) y en dos tandas de evaluación (t1 y t2).

Tanda	Condición	cultivar	n	HT (cm)	CV	Mín	Máx	
1	S	M	36	52,2	21,9	34	85	
1	E	M	32	48,1	19,9	28	76	
1	S	T	54	55,6	17,7	40	87	
1	E	T	54	51,8	16,8	37	73	
2	S	M	90	47,3	22	23	76	
2	E	M	89	37,7	25,8	15	69	
2	S	T	71	54,8	18,2	26	80	
2	E	T	71	43,7	23,5	16	62	
t1	<i>P</i> -valor	cultivar x condición enfermedad (S y E)				0,952 ^{ns}		
t2	<i>P</i> -valor	cultivar x condición enfermedad (S y E)				0,580 ^{ns}		

HT: altura total; CV: coeficiente de variación; Mín: mínimo; Máx: máximo. Monarca (M) y Traful (T) y condición enfermedad S y E. S: planta sana; E: planta infectada con el CVA. Genotipos evaluados en t1: M18, M23 y T112, T129 y T141. Genotipos evaluados en t2: M10, M11, M29, M36, M37, T124, T140, T141 y T152. ^{ns}: $P > 0,05$.

Tabla 11: Altura Total (HT), expresada en cm, de cada genotipo de los cultivares Monarca y Traful en cada condición de enfermedad (S y E) y en ambas tandas de evaluación (t1 y t2). Se incluye el porcentaje de disminución (D %) de la variable entre las condiciones S y E.

Tanda	Genotipo	n	HT_S	E.E.	N	HT_E	E.E.	<i>P</i> - valor	D %
1	M18	18	46,4 ± 3,7		18	43,1 ± 3,7		0,544	<10
1	M23	18	57,5 ± 3,7		15	53,2 ± 4,0		0,437	<10
1	T112	18	60,0 ± 3,7		18	57,1 ± 3,7		0,873	-
1	T129	18	54,2 ± 3,7		18	50,9 ± 3,7		0,541	<10
1	T141	18	53,4 ± 3,7		18	47,0 ± 3,7		0,243	<15
2	M10	18	47,9 ± 2,5		18	32,2 ± 2,5		0,001	33
2	M11	18	45,8 ± 2,5		18	40,2 ± 2,5		0,124	<15
2	M29	18	46,4 ± 2,5		18	41,6 ± 2,5		0,192	<15
2	M36	18	43,3 ± 2,5		17	38,6 ± 2,6		0,202	<15
2	M37	18	51,6 ± 2,5		18	36,9 ± 2,5		0,001	19
2	T124	18	54,6 ± 2,5		18	46,6 ± 2,5		0,031	15
2	T140	18	56,5 ± 2,5		18	45,0 ± 2,5		0,002	20
2	T141	17	48,6 ± 2,6		17	39,5 ± 2,6		0,019	19
2	T152	18	61,6 ± 2,5		18	45,9 ± 2,5		0,001	26

n: número de plantas analizadas genotipo y condición (S y E); S: planta sana. E: planta infectada con el complejo viral del achaparramiento; HT: valor medio de altura total expresada en centímetro. EE: error estándar. t1: tanda. t2: tanda 2. *P*-valor: Para cada genotipo se realizó la prueba de contraste (DGC, $P < 0,05$); --: no hay disminución; <: disminución menor a 10%; 15%; T141: genotipo presente en t1 y en t2.

Los genotipos T124 y T140, que mostraron incrementos significativos en el contenido de COU en la condición E respecto de S, también manifestaron en E reducciones significativas ($P<0,05$) de HT respecto de S, con valores de disminución del 15% y 20%, respectivamente (Tabla 10). La HT también se vio afectada ($P<0,05$) en la condición E en los genotipos T141 (sólo en t2) y T152. De manera similar, la infección del CVA provocó reducciones ($P<0,05$) de la HT en M10 y M37 del orden del 33% y 19%, respectivamente, en relación a la condición S. Sin embargo, estos genotipos habían mostrado bajos niveles de COU (350-500 ppm), sin diferencias entre las condiciones de enfermedad.

4.2.3 Variable morfológica: número de Tallos (nT)

No hubo interacción ($P>0,05$) entre cultivares y condición enfermedad en ninguna de las dos tandas de evaluación (considerando los 6 cortes) para nT (Figura 31).

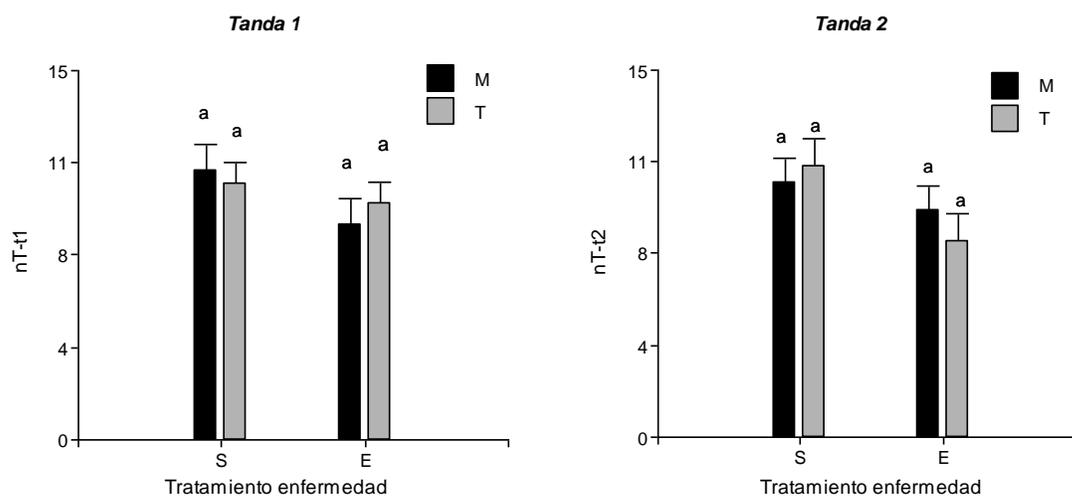


Figura 31: Efecto del CVA sobre el número de tallos (nT) en dos cultivares (Monarca y Trafal) en dos condiciones de enfermedad (S y E). Cada barra representa el valor promedio de 6 cortes de los genotipos evaluados en cada tanda por cultivar Monarca (M) y Trafal (T) y condición enfermedad S y E. S: planta sana; E: planta infectada con el CVA. Se indica el error estándar. Genotipos evaluados en t1: M18 y M23 y T112, T129 y T141. Genotipos evaluados en t2: M10, M11, M29, M36 y M37 y T124, T140, T141 y T152. Letras iguales indican diferencias no significativas (DGC, $P>0,05$).

En la Tabla 12 se muestran los valores promedio (6 cortes) de la variable nT de cada genotipo para cada tanda de evaluación (t1 y t2) y en cada condición de enfermedad. Los

genotipos T124 y T140, que habían exhibido incrementos significativos en el contenido de COU en la condición E respecto de S, también manifestaron reducciones significativas ($P<0,05$) en el número de tallos bajo la condición E, con valores medios de 21% y 38% inferiores al nT de los mismos genotipos en la condición S. También la infección con el CVA originó reducciones del 33% y 55% ($P<0,05$) en los genotipos M23 y M10, respectivamente; no obstante, estos genotipos no habían mostrado incrementos significativos en el contenido de COU en la condición E respecto de S.

Tabla 12: Número de tallos (nT) de cada genotipo de los cultivares Monarca y Trafal en cada condición de enfermedad (S y E) y en ambas tandas de evaluación (t1 y t2). Se incluye el porcentaje de disminución (D %) de la variable entre las condiciones S y E.

Tanda	Genotipo	n	nT_S	E.E.	N	nT_E	E.E.	P-valor	D %
1	M18	18	11,4	± 1,1	18	10,1	± 1,1	0,439	<15
1	M23	18	10,0	± 1,1	15	6,7	± 1,2	0,055	33
1	T112	18	12,3	± 1,1	18	10,8	± 1,1	0,345	<15
1	T129	18	8,8	± 1,1	18	9,8	± 1,1	0,555	<15
1	T141	18	8,8	± 1,1	18	7,2	± 1,1	0,316	18
2	M10	18	10,8	± 1,1	18	4,9	± 1,1	0,001	55
2	M11	18	9,0	± 1,1	18	8,0	± 1,1	0,469	<15
2	M29	18	13,7	± 1,1	18	14,0	± 1,1	0,874	<15
2	M36	18	10,0	± 1,1	17	10,8	± 1,1	0,586	<15
2	M37	18	7,3	± 1,1	18	7,4	± 1,1	0,949	<15
2	T124	18	14,7	± 1,1	16	11,6	± 1,1	0,040	21
2	T140	18	10,8	± 1,1	18	6,8	± 1,1	0,010	38
2	T141	17	7,4	± 1,1	18	5,9	± 1,1	0,328	20
2	T152	18	7,3	± 1,1	18	6,2	± 1,1	0,472	15

n: número de plantas analizadas por corte y condición (S y E). S: planta sana. E: planta infectada con el complejo viral del achaparramiento. nT: valor promedio de número de tallos por conteo directo. E.E.: error estándar. t1: tanda. t2: tanda 2. P-valor: Para cada genotipo se realizó la prueba de contraste (DGC, $P<0,05$). T141: genotipo presente en t1 y en t2. --: no hay disminución; <10: disminución menor a 10 por ciento.

4.2.4 Variable morfológica: distancia media de entrenudos (dN).

La distancia de entrenudos (dN), estimada por la relación entre HT y número de nudos (nN), no se vio afectada ($P>0,05$) por la infección con el CVA, respecto de la condición S, en ninguno de los dos cultivares ni tandas de evaluación considerando los 6 cortes (Figura 32).

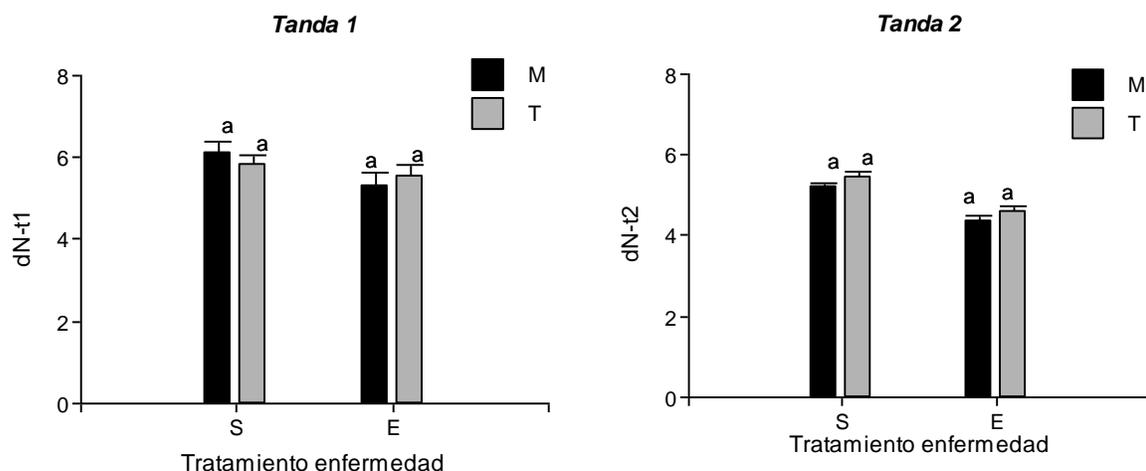


Figura 32: Efecto del CVA sobre la variable distancia media de entrenudos (dN) en dos cultivares (Monarca y Trafal), en dos condiciones de enfermedad (S y E) y en dos tandas (t1 y t2) de evaluación. Cada barra representa el valor promedio de 6 cortes de los genotipos evaluados en cada tanda por cultivar Monarca (M) y Trafal (T) y condición enfermedad S y E. S: planta sana; E: planta infectada con el CVA. Se indica el error estándar. Genotipos evaluados en t1: M18 y M23 y T112, T129 y T141. Genotipos evaluados en t2: M10, M11, M29, M36 y M37 y T124, T140, T141 y T152. Letras iguales indican diferencias no significativas (DGC, $P > 0,05$).

Sin embargo, a nivel de genotipos individuales, se observaron algunas disminuciones interesantes en cuanto a la dN entre las condiciones S y E (Tabla 13). En este contexto, los genotipos M18 y T140, que mostraron incrementos significativos en el contenido de COU en la condición E respecto de S, también presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en dN, con reducciones de 15% y 13% entre E y S, respectivamente. En igual sentido, los genotipos de Monarca M23, M10, M11 y M37 en la condición E disminuyeron la dN en comparación con la condición S en 13%, 17%, 21% y 20%, respectivamente. Comportamiento similar exhibieron los genotipos T141 (t1 y t2) y T152 de Trafal (Tabla 13). En otros casos, las disminuciones fueron más leves, del orden del 10%, aunque sin diferencias significativas, como en los genotipos M29 y M36 de Monarca; o bien inexistentes, como en el caso de los genotipos T112, T124 y T129 de Trafal (Tabla 13). Lo exhibido por estos tres últimos podría tener relación con la mayor tolerancia al CVA que manifestó Trafal en condiciones de campo, como ya fuera señalado anteriormente.

Tabla 13: Distancia media de entrenudos (dN) de cada genotipo de los cultivares Monarca y Trafal en cada condición de enfermedad (S y E) y en ambas tandas de evaluación (t1 y t2). Se incluye el porcentaje de disminución (D %) de la variable entre las condiciones S y E.

Tanda	Genotipo	n	dN_S	E.E.	n	dN_E	E.E.	P- valor	D (%)
1	M18	18	5,59	± 0,23	18	4,59	± 0,33	0,007	15
1	M23	17	6,82	± 0,23	16	5,28	± 0,23	0,001	13
1	T112	18	5,52	± 0,24	18	5,61	± 0,23	0,802	-
1	T129	18	5,72	± 0,23	18	5,66	± 0,23	0,887	-
1	T141	18	5,49	± 0,23	18	4,79	± 0,23	0,048	11
2	M10	18	4,73	± 0,20	18	3,91	± 0,20	0,006	17
2	M11	18	4,82	± 0,20	18	3,79	± 0,20	0,001	21
2	M29	18	4,90	± 0,20	18	4,46	± 0,20	0,125	<10
2	M36	18	4,65	± 0,20	18	4,14	± 0,20	0,083	11
2	M37	18	5,53	± 0,20	18	4,42	± 0,20	0,001	20
2	T124	18	4,98	± 0,20	18	4,54	± 0,20	0,132	<10
2	T140	18	5,04	± 0,20	18	4,38	± 0,20	0,026	13
2	T141	17	4,76	± 0,21	18	4,05	± 0,20	0,020	15
2	T152	18	5,77	± 0,20	18	4,49	± 0,20	0,001	22

n: número de plantas analizadas por corte y condición (S y E). S: planta sana. E: planta infectada con el complejo viral del achaparramiento. dN: Distancia media de entrenudos. E.E.: error estándar. t1: tanda. t2: tanda 2. P-valor: Para cada genotipo se realizó la prueba de contraste (DGC, $P < 0,05$); T141: genotipo presente en t1 y en t2. D %: disminución. --: no hay disminución. <10: disminución menor a 10 por ciento.

4.2.5. Variable de calidad forrajera: relación hoja / tallo (RHT)

La relación hoja/tallo (RHT) no registró interacción entre cultivares y condición enfermedad (S y E), tanto en t1 ($P=0,746$) como en t2 ($P=0,163$) (Figura 33). De la Figura 34 se infiere que, el CVA no afectó la media de RHT en ninguno de los dos cultivares. Sin embargo, cuando se analiza el comportamiento de cada genotipo en particular (Tabla 14), se aprecian algunas diferencias interesantes.

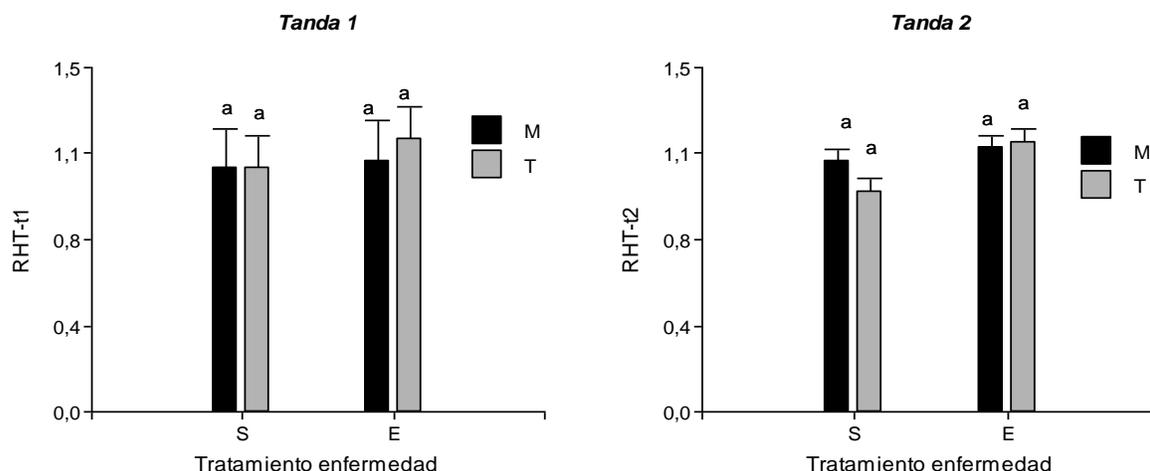


Figura 33: Efecto del CVA sobre la variable relación hoja/tallo (RHT) en dos cultivares (Monarca y Trafal) y en dos tandas (t1 y t2) de evaluación. Cada barra representa el valor promedio de 6 cortes de los genotipos evaluados en cada tanda por cultivar Monarca (M) y Trafal (T) y condición enfermedad. S: planta sana; E: planta infectada con el CVA. Se indica el error estándar. Genotipos en t1: M18 y M23 y T112, T129 y T141. Genotipos en t2: M10, M11, M29, M36 y M37 y T124, T140, T141 y T152. Letras iguales indican diferencias no significativas (DGC, $P > 0,05$).

Tabla 14: Relación hoja / tallo (RHT) de cada genotipo de los cultivares Monarca y Trafal en cada condición de enfermedad (S y E) y en ambas tandas de evaluación (t1 y t2). Se incluye el porcentaje de incremento / disminución (I / D %) de la variable entre las condiciones S y E.

Tanda	Genotipo	n	RHT_S	E.E.	n	RHT_E	E.E.	P-valor	I / D (%)
1	M18	18	1,18 ± 0,09		18	1,5 ± 0,09		0,026	21
1	M23	18	0,85 ± 0,09		15	0,67 ± 0,10		0,191	-21
1	T112	18	0,81 ± 0,09		18	0,9 ± 0,09		0,486	10
1	T129	17	1,09 ± 0,10		18	1,35 ± 0,09		0,072	19
1	T141	18	1,15 ± 0,09		16	1,04 ± 0,09		0,387	-10
2	M10	18	1,07 ± 0,07		15	0,8 ± 0,08		0,014	-25
2	M11	18	1,09 ± 0,07		18	1,17 ± 0,07		0,458	<10
2	M29	18	1,25 ± 0,07		17	1,34 ± 0,08		0,395	<10
2	M36	18	0,97 ± 0,07		18	1,09 ± 0,07		0,237	11
2	M37	18	1,04 ± 0,07		18	1,12 ± 0,07		0,426	<10
2	T124	18	0,91 ± 0,07		18	1,13 ± 0,07		0,038	20
2	T140	18	1,04 ± 0,07		17	1,2 ± 0,08		0,134	13
2	T141	18	0,91 ± 0,07		17	1,12 ± 0,07		0,054	19
2	T152	18	0,82 ± 0,07		18	0,91 ± 0,07		0,382	10

n: número de plantas analizadas por corte y condición (S: planta sana y E: infectada con el CVA). RHT: Relación hoja/tallo de cada genotipo por tanda en los 6 cortes. E.E.: error estándar. t1: tanda. t2: tanda 2. P-valor: Para cada genotipo se realizó la prueba de contraste (DGC, $P < 0,05$); I %: incremento (valores positivos); D %: disminución (valores negativos) --: no hay I / D ; <10: disminución menor a 10 por ciento.

Por ejemplo, los genotipos M18 y T124 incrementaron ($P<0,05$) en cerca de 20% su RHT en la condición E respecto de S. Estos genotipos también habían mostrado incrementos significativos en el contenido de COU para la condición E en relación con la condición S. Por el contrario, en los genotipos M23 y M10 se observó una disminución de 21% ($P>0,05$) y 25% ($P<0,05$) en su RHT entre las condiciones E y S, respectivamente. Ambos genotipos no habían exhibido incrementos significativos en el contenido de COU cuando estaban infectados con el CVA.

4.2.6 Variable: estadio fenológico ponderado (EFP)

El análisis del estado de madurez (EFP) en cada cultivar, como promedio de todos los genotipos en cada cultivar y todos los cortes, no detectó interacción entre cultivares y condición enfermedad (S y E) tanto la tanda 1 ($P=0,269$) como en la tanda 2 ($P=0,066$) (Figura 34).

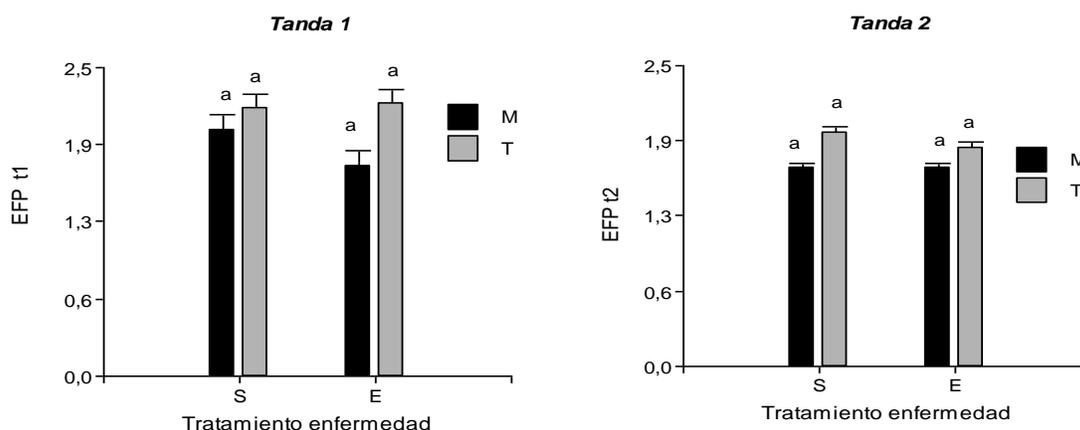


Figura 34: Efecto del CVA sobre el estadio fenológico ponderado (EFP) en dos condiciones de enfermedad (S y E) y en dos tandas (t1 y t2) de evaluación. Cada barra representa el valor promedio de 6 cortes de los genotipos evaluados en cada tanda por cultivar Monarca (M) y Trafal (T) y condición enfermedad S y E. S: planta sana; E: planta infectada con el CVA. Se indica el error estándar. Genotipos evaluados en t1: M18 y M23 y T112, T129 y T141. Genotipos evaluados en t2: M10, M11, M29, M36 y M37 y T124, T140, T141 y T152. Letras iguales indican diferencias no significativas (DGC, $P>0,05$).

No obstante, cuando se analizan los comportamientos de cada genotipo individual, se aprecian algunas diferencias en cuanto al efecto del CVA sobre el grado de madurez (Tabla 15). Por ejemplo, el genotipo T124 registró en su condición E un retraso en su desarrollo fenológico respecto de su condición S, con una reducción del 19% ($P<0,05$).

Tabla 15: Estadio fenológico ponderado (EFP) de cada genotipo de los cultivares Monarca y Trafal en cada condición de enfermedad (S y E) y en ambas tandas (t1 y t2) de evaluación. Se incluye el porcentaje de incremento / disminución (I / D %) de la variable entre las condiciones S y E.

Tanda	Genotipo	n	EFP_S	E.E.	n	EFP_E	E.E.	P-valor	I / D (%)
1	M18	18	1,94 ± 0,11		18	1,87 ± 0,11		0,636	<-10
1	M23	18	2,04 ± 0,11		15	1,71 ± 0,13		0,064	-16
1	T112	18	1,63 ± 0,11		18	1,91 ± 0,11		0,098	15
1	T129	18	2,32 ± 0,11		18	2,59 ± 0,11		0,100	10
1	T141	18	2,49 ± 0,11		17	2,19 ± 0,11		0,081	-12
2	M10	18	1,67 ± 0,09		18	1,57 ± 0,09		0,416	<-10
2	M11	17	1,66 ± 0,09		18	1,68 ± 0,09		0,900	-
2	M29	18	1,7 ± 0,09		18	1,61 ± 0,09		0,503	<-10
2	M36	18	1,65 ± 0,09		18	1,78 ± 0,09		0,284	<-10
2	M37	17	1,66 ± 0,09		18	1,56 ± 0,09		0,440	<-10
2	T124	18	1,87 ± 0,09		18	1,52 ± 0,09		0,008	-19
2	T140	18	1,99 ± 0,09		18	1,84 ± 0,09		0,227	<-10
2	T141	17	1,87 ± 0,09		18	1,68 ± 0,09		0,137	-10
2	T152	18	2,02 ± 0,09		18	1,95 ± 0,09		0,569	<-10

n: número de plantas analizadas por genotipo y condición S: planta sana. E: planta infectada con el CVA. EFP: estadio fenológico ponderado. E.E.: error estándar. P-valor: Para cada genotipo se realizó la prueba de contraste (DGC, $P < 0,05$). I %: incremento (valores positivos). D%: disminución (valores negativos) de EFP cada genotipo en E respecto de S. --: no hay disminución; <10: disminución menor a 10 por ciento.

Es oportuno recordar que T124 también había manifestado un incremento significativo en el contenido de COU para la condición E en relación a la condición S. Por otra parte, también en la Tabla 15 se observan retrasos en la madurez de la mayoría de los genotipos de ambos cultivares, aunque sin diferencias significativas ($P > 0,05$). Finalmente, la condición E provocó adelantos en la madurez de los genotipos T112 y T129, aunque sin alcanzar niveles significativos ($P > 0,05$).

4.3 Índice de severidad por genotipo (ISG) y su relación con el COU, con las variables estudiadas y con la evolución de la enfermedad del CVA.

4.3.1 Índice de severidad por genotipo (ISG):

La intensidad de la enfermedad causada por el CVA se estimó a través del ISG, variable que se calculó según la escala propuesta por Odorizzi *et al.*, (2017), aunque con las

modificaciones explicitadas en 3B.3.5 (Materiales y Métodos). Los resultados obtenidos para cada genotipo individual se resumen en la Tabla 16. Se aprecia claramente que los genotipos de Monarca exhibieron mayor daño por la enfermedad que los de Trafal, con valores promedio de ISG de 72% y 54%, respectivamente. Los valores promedio para cada cultivar se presentan en la Figura 35, donde se observan diferencias significativas ($P=0,036$) entre ambos, confirmando la mayor susceptibilidad de Monarca.

Tabla 16: Índice de severidad para cada genotipo (ISG) correspondiente a la condición E.

Monarca					Trafal				
Gen	n	ISG (%)	Mín	Máx	Gen	n	ISG (%)	Mín	Máx
M10	3	86,1 ± 5,0	79	96	T112	3	41,7 ± 4,8	20	33
M11	3	70,8 ± 8,3	62	88	T124	3	34,7 ± 5,5	28	29
M18	3	79,2 ± 4,8	71	88	T129	3	25,0 ± 0,0	0	25
M23	2	77,1 ± 2,1	75	79	T140	3	75,0 ± 4,8	11	67
M29	2	56,3 ± 2,1	54	58	T141	6	73,6 ± 2,3	8	67
M36	2	58,4 ± 8,4	50	67	T152	3	57,0 ± 5,0	15	50
M37	3	86,1 ± 1,4	83	88	-----				

ISG: valor medio del índice de severidad por genotipo expresado en porcentaje calculado en 6 cortes de evaluación en cada genotipo. Mín: Mínimo; Máx: Máximo; n: número de plantas evaluadas por genotipo; E: infectado por complejo viral del achaparramiento.

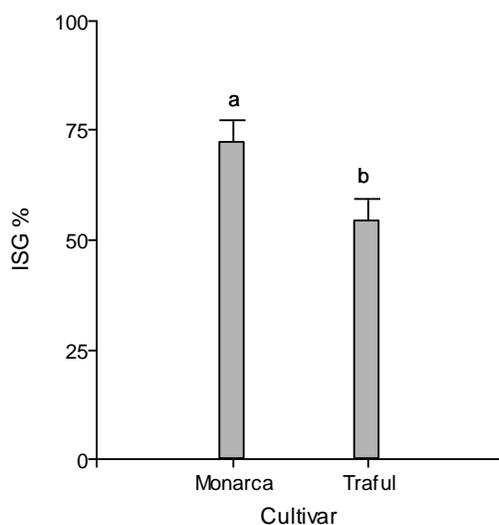


Figura 35: Índice de severidad por genotipo (ISG %) para los cultivares Monarca y Trafal. ISG: índice de severidad por genotipo expresado en porcentaje. Letras diferentes indican diferencias significativas entre cultivares ($P<0,05$).

4.3.2 Relación entre el ISG y el cambio de contenido de COU entre condiciones E y S

Como se indicó anteriormente, el índice de severidad por genotipo se relacionó con la variable incremento de contenido de COU (E-S), definida como la sumatoria de las diferencias acumuladas de E - S de cada genotipo (clones), dividido el número de cortes realizados (n=6).

La relación entre el cambio de contenido de COU (E-S) y el ISG se dio de manera diferente en cada cultivar (Figura 36). En Monarca, cuando se observan ISG máximos, los incrementos de COU (E-S) fueron cercanos a 100ppm, mientras que a diferencias menores o mayores a 100ppm de COU (E-S) los valores de ISG disminuyeron, advirtiendo una relación que se podría asemejar a una función de tipo “óptimo”. Por el contrario, en Trafal no se observó relación, sin embargo se aprecia una leve tendencia hacia el incremento del ISG a medida que aumentan las diferencias de contenido de COU entre E y S. De todos modos, debe tenerse en cuenta que en ambos casos los R^2 de la regresión no son significativos y no explican la mayor parte de esta relación ISG-cambio de contenido de COU, particularmente en el caso de Trafal.

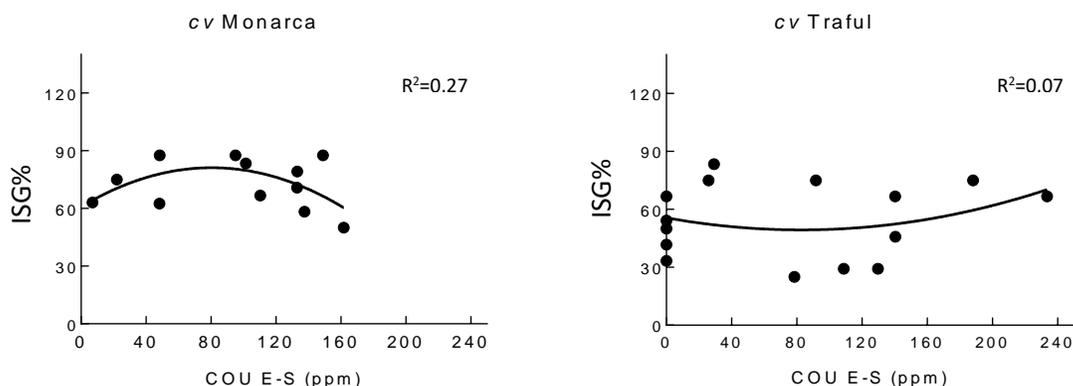


Figura 36: Índice de severidad por genotipo en función del cambio en el contenido de COU generado por la infección viral (E-S ppm) para dos cultivares de alfalfa. Se indica la ecuación de la recta para el cultivar Monarca ($P < 0,05$), para el cultivar Trafal ($P > 0,05$); COU (E-S) diferencias promedio de COU E-S; ISG%: índice de severidad por genotipo expresado en porcentaje; S: planta sana; E: planta infectada con el complejo viral del achaparramiento (CVA).

Teniendo en cuenta esto último, se juntaron todos los genotipos y se ajustaron dos funciones lineales entre el ISG y los valores de COU de cada genotipo en sus dos condiciones S y E (Figura 37). Las dos funciones detectadas presentaron pendientes distintas ($F_{(1,9)}=7,12$;

test de pendientes: $P=0,026$), conforme se muestra en la Figura 37. Del análisis de estos resultados se podría establecer un contenido “umbral” de COU a partir de la cual el ISG sería sensible al contenido de COU, independientemente de los genotipos. Los altos niveles de COU se podrían relacionar con menores ISG. La regresión lineal ajustada por separado permitió discriminar y establecer valores umbrales a partir de los cuales el contenido de COU tendría algún efecto sobre el ISG.

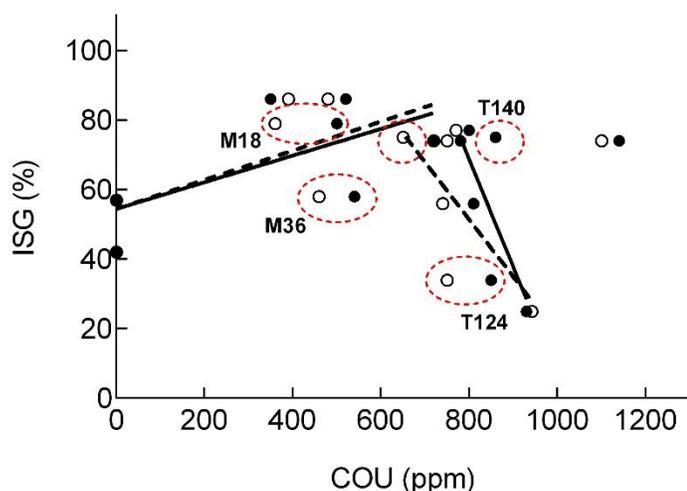


Figura 37: Índice de severidad por genotipo (ISG %) en función del contenido de Coumestrol (COU ppm) para los genotipos de los cultivares Monarca (M10, M11, M18, M23, M29, M36, M37) y Trafal (T141, T124, T140, T129, T112, T152). Círculos vacíos: contenido de COU en condición S; círculos llenos: contenido de COU en condición E. Los círculos punteados indican los genotipos que mostraron diferencias significativas ($P < 0,05$) en el contenido de COU entre condiciones S y E. Líneas rectas indican la regresión lineal entre las variables para las distintas condiciones. Ecuaciones ajustadas para los valores bajos ($>0,48$ a 500 ppm) y medios de COU (de 500 a 950 ppm): $Y = 0,0384X + 54,45$; $Y = -0,3093X + 316,1$, respectivamente. Test de pendientes entre ecuaciones: $F_{(1;9)}=7,12$; $P=0,026$.

4.3.3 Correlación entre las diferencias del contenido de COU, de ISG y de características morfo-fenológicas y productivas de las condiciones S y E en cada cultivar

A fin de observar la asociación entre las distintas variables que se estudiaron, se estimó para cada cultivar (Monarca y Trafal) la correlación lineal de Pearson (r) para las diferencias entre las condiciones sana (S) y enferma (E) de las variables morfológicas, fenológicas y productivas (dif-PS, dif-HT, dif-dN, dif-nT, dif-RHT y dif-EFP), el ISG y el contenido de COU

(dif-COU). Las matrices de correlación que se obtuvieron se presentan en las Tablas 17 (Monarca) y 18 (Trafal). En el caso de Monarca, a mayores síntomas del CVA (medido a través del ISG), mayor acortamiento de entrenudos (dif-dN), mayor pérdida de peso seco (dif-PS) y aumento en la síntesis de COU (dif-COU). A su vez, una mayor estimulación de COU (dif-COU), se relaciona con una mayor relación hoja/tallo (dif-RHT) y una mayor pérdida de peso seco (dif-PS). Por otro lado, en el caso de Trafal los mayores síntomas del CVA (ISG) se relacionan con mayores disminuciones en el número de tallos (dif-nT) y aumento de pérdida de peso seco (dif-PS). Al igual que en Monarca una mayor estimulación de COU (dif-COU) se relaciona con una mayor relación hoja/tallo.

Tabla 17: Correlación lineal de Pearson (r) entre las diferencias promedio (valor en la condición S – valor en la condición E) de las variables para el cultivar Monarca.

Variables	ISG	dif-nT	dif-EFP	dif- dN	dif-PS	dif-RHT	dif-COU
ISG	1	ns	ns	**	**	ns	*
dif-nT	0,38	1	ns	ns	**	*	ns
dif-EFP	0,35	0,32	1	ns	**	ns	ns
dif- dN	0,63	0,26	0,15	1	*	ns	ns
dif-PS	0,62	0,57	0,53	0,47	1	ns	*
dif-RHT	0,37	0,46	0,19	0,12	0,63	1	**
dif-COU	0,49	0,34	0,18	0,36	0,6	0,71	1

ISG: diferencia de índice de severidad; dif-nT: diferencia de número de tallos; dif-EFP: diferencia de estadio fenológico ponderado; dif-dN: diferencia de distancia media de entrenudos; dif-PS: diferencia de peso seco; dif-RHT: diferencia de relación hoja/tallo; dif-COU: diferencia de coumestrol. *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ns: $P > 0,05$.

Tabla 18: Correlación lineal de Pearson (r) entre las diferencias promedio (valor en la condición S – valor en la condición E) de las variables para el cultivar Trafal.

Trafal	ISG	dif- nT	dif-EFP	dif- dN	dif-PS	dif-RHT	dif-COU
ISG	1	*	ns	ns	*	ns	ns
dif- nT	0,46	1	ns	ns	**	ns	*
dif-EFP	0,33	0,14	1	ns	**	ns	*
dif- dN	0,34	0,26	0,23	1	**	ns	ns
dif-PS	0,44	0,64	0,57	0,61	1	ns	ns
dif-RHT	0,16	-0,01	-0,05	-0,11	0,09	1	**
dif-COU	-0,03	-0,42	-0,43	-0,16	-0,37	0,63	1

ISG: diferencia de índice de severidad; dif-nT: diferencia de número de tallos; dif-EFP: diferencia de estadio fenológico ponderado; dif-dN: diferencia de distancia media de entrenudos; dif-PS: diferencia de peso seco; dif-RHT: diferencia de relación hoja/tallo; dif-COU: diferencia de coumestrol. *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ns: $P > 0,05$.

Para explorar los resultados del análisis de correlación se realizó para cada cultivar un análisis de sendero (*path analysis*) con el fin de observar las posibles relaciones entre las

variables observadas y el resto de las variables (Tabla 19). Este análisis permitió identificar la contribución directa o indirecta que realizaron el conjunto de variables independientes (dif-nT, dif-EFP, dif-dN, dif-PS, dif-RHT y dif-COU) a la variabilidad de la respuesta (ISG y dif-COU). Los resultados para el cv Monarca se presentan en la Tabla 19. Se aprecia una asociación directa entre los síntomas de la enfermedad del CVA (ISG) y el aumento de síntesis de COU (dif-COU; $P=0,035$), así como un acortamiento de entrenudos (dif-dN; $P=0,012$) y pérdida de peso seco (dif-PS; $P=0,006$). A su vez, el incremento de síntesis de COU (dif-COU) se asoció de manera directa con una mayor relación hoja/tallo (dif-RHT; $P=0,002$), y de manera indirecta con la pérdida de peso seco (dif-PS; $P=0,011$). Los resultados del análisis de sendero para el cv Trafal se resumen en la Tabla 20, donde se observa que los síntomas de la enfermedad del CVA (ISG) se correlacionan directamente con la disminución del número de tallos (dif-nT; $P=0,034$), pero indirectamente con la pérdida de peso (dif-PS; $P=0,048$). El aumento de síntesis de COU (dif-COU) se asoció de manera directa con una mayor relación hoja/tallo (dif-RHT; $P=0,001$), pero lo hizo de manera indirecta con una menor pérdida de peso (dif-PS; $P=0,046$).

Tabla 19: Análisis de sendero para las variables ISG y COU en el cultivar Monarca

Var-indep	Var-dep: ISG			Var-indep	Var-dep: dif-COU		
	vía	r total	p-valor		vía	r total	p-valor
dif-COU	D	0,51	0,035*	dif-RHT	D	0,71	0,002**
dif-dN	D	0,59	0,012*	dif-nT			ns
dif-PS	D	0,63	0,006**	dif-EFP			ns
dif-EFP			ns	dif-dN			ns
dif-nT			ns	dif-PS	I	0,6	0,011*
dif-RHT			ns	-			

Var-dep: variable dependiente; Var-indep: variable independiente; D: vía de asociación directa; I: vía de asociación indirecta; r total: correlación total D+I; *: $P<0,05$; **: $P<0,01$; ns: $P>0,05$.

Tabla 20: Análisis de sendero para las variables ISG y COU en el cultivar Trafal

Var-indep	Var-dep: ISG			Var-indep	Var-dep: COU		
	vía	r total	p-valor		vía	r total	p-valor
dif-nT	D	0,46	0,034*	dif-RHT	D	0,63	0,001**
dif-RHT			ns	dif-nT			ns
dif-EFP			ns	dif-EFP			ns
dif-dN			ns	dif-dN			ns
dif-PS	I	0,44	0,048*	dif-PS	I	-0,44	0,046*
dif-COU			ns	-	-	-	-

Var-dep: variable dependiente; Var-indep: variable independiente; D: vía de asociación directa; I: vía de asociación indirecta; r total: correlación total; *: $p<0,05$; **: $p<0,01$; ns: $p>0,05$.

También se realizaron análisis multivariados de componentes principales (ACP) para explicar la variabilidad a nivel cultivar y a nivel genotipo.

Se construyeron dos *biplot*: mientras que el primero (Figura 38) explora la variabilidad entre las condiciones S y E en cada cultivar, el segundo (Figura 39) grafica la variabilidad de todos los genotipos en condiciones de enfermedad (S y E). Las variables utilizadas para este ACP fueron ISG, COU PS, nT, dN, RHT y EFP.

Del análisis de la Figura 38 se infiere que las tres primeras CP explican el 77% de la variabilidad total, discriminado en 38%, 23% y 16% para las CP1, CP2 y CP3, respectivamente. Analizando la CP1 (eje X), se aprecia que las variables de mayor peso hacia la derecha (correlación positiva) fueron PS, dN y nT (Figura 38a), mientras que hacia la izquierda la variable de mayor peso fue el ISG (correlación negativa), con valores de autovectores de 0,54, 0,48, 0,34 y -0,52, respectivamente. Vale decir que las variables PS, dN y nT respondieron de manera positiva en ausencia de la enfermedad, mientras que se correlacionaron negativamente con el ISG (variable asociada a la enfermedad del CVA). Por su parte, en la CP2 (eje Y), se observa que las variables RHT y COU presentan una asociación positiva entre ellas, con valores de autovectores de 0,67 y 0,59, respectivamente. En la CP 3, la variable EFP muestra una correlación positiva e inversa con la variable nT (correlación negativa), con valores de autovectores de 0,77 y -0,58 respectivamente (Figura 38b). En conjunto, las variables PS, dN, nT y EFP agruparon a la mayoría de los genotipos de Monarca-S y Trafal-S y a algunos genotipos de Trafal-E (círculo celeste, derecha). Por el contrario, la mayoría de los genotipos del cultivar Monarca-E, junto con algunos genotipos del cultivar Trafal E, se ubicaron en el cuadrante izquierdo y se asociaron a la variable ISG. Además, el *biplot* destaca que el cultivar Monarca-E mostró una mayor asociación con la variable ISG (círculo rojo, izquierda), mientras que el cultivar Trafal-E presentó una mayor variabilidad (dispersión) entre sus genotipos. El contenido de COU se asoció con sólo algunos genotipos de Monarca-E y Trafal-E, de una manera poco consistente.

El análisis del segundo *biplot* (Figura 39) indica que las tres primeras CP explicaron el 82% de la variabilidad total de los genotipos en sus dos condiciones (S y E), con el 41%, 24% y 17% para la CP1, CP2 y CP3, respectivamente.

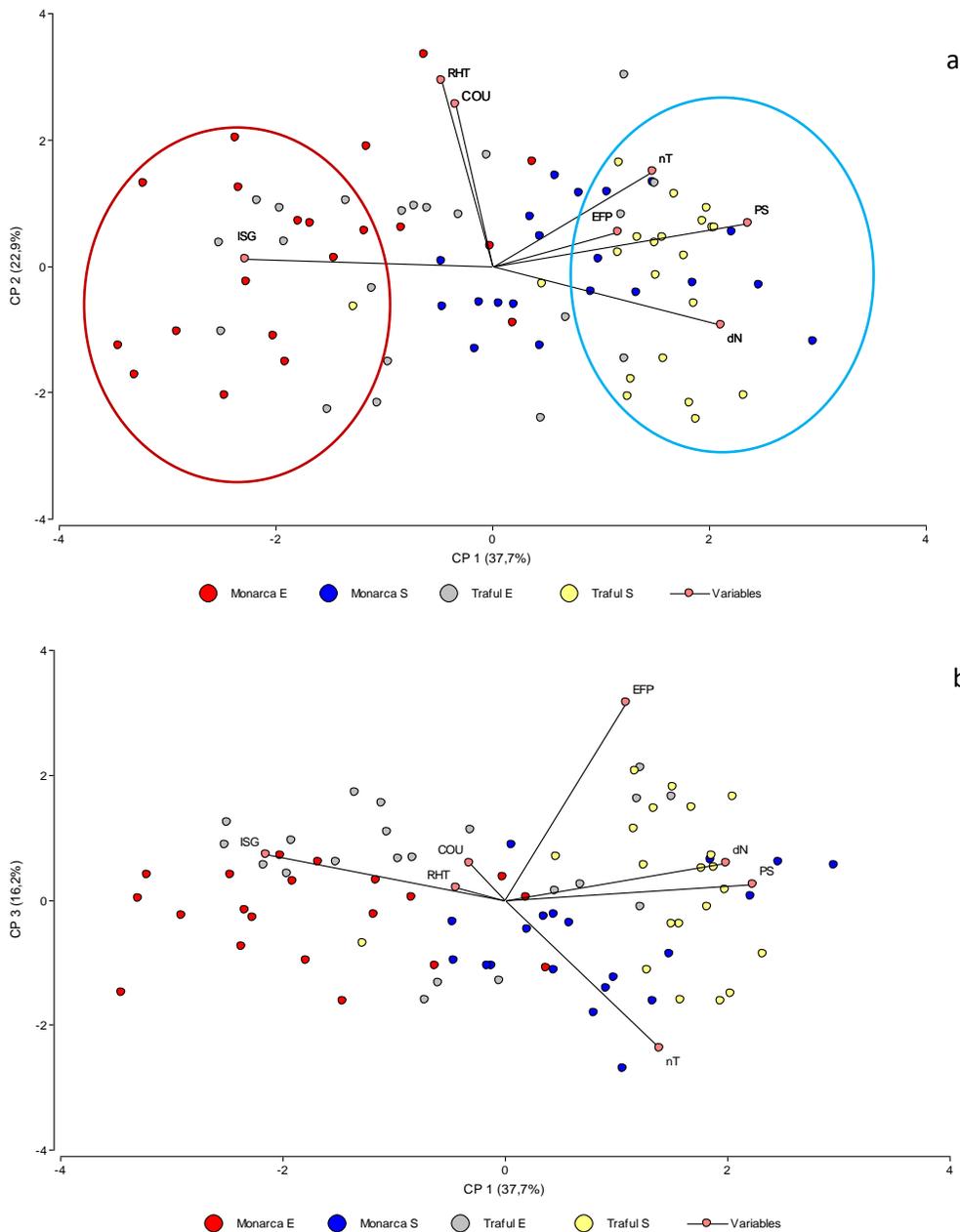


Figura 38: Análisis de componentes principales en los cultivares de alfalfa (Monarca y Trafal) y bajo dos condiciones de enfermedad (S y E). a- Análisis de componente principal CP1 y CP2. b- Análisis de componente principal CP1 y CP3. Componente principal (CP). Genotipos: en la condición S (S_{M10} , S_{M11} , S_{M18} , S_{M23} ; S_{M29} , S_{M36} , S_{M37} , S_{T112} , S_{T124} , S_{T129} , S_{T140} , S_{T141} y S_{T152}) y en la condición E (E_{M10} , E_{M11} , E_{M18} , E_{M23} ; E_{M29} , E_{M36} , E_{M37} , E_{T112} , E_{T124} , E_{T129} , E_{T140} , E_{T141} y E_{T152}) S: plantas libre de la infección del CVA; E: plantas infectadas con el complejo viral del achaparramiento; Variables: nT: número de tallos; dN: distancia media de entrenudos; PS: g.genotipo-1; RHT: relación hoja/tallo; EFP: estadio fenológico ponderado; ISG: índice de severidad genotipo.

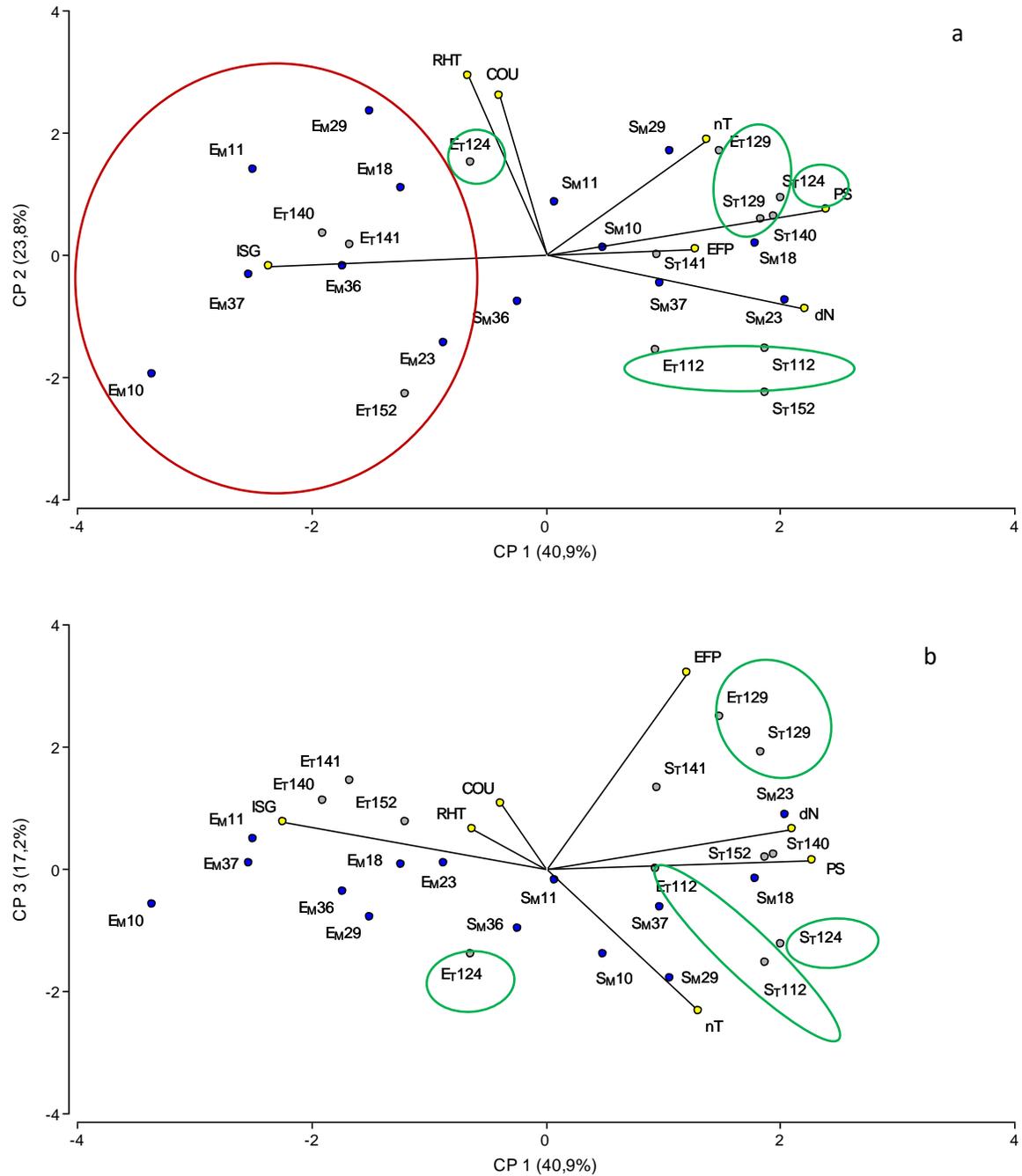


Figura 39: Análisis de componentes principales en genotipos de alfalfa de los cultivares Monarca y Trafal en dos condiciones de enfermedad (S y E) a- Análisis de componente principal CP1 y CP2. b- Análisis de componente principal CP1 y CP3. Componente principal (CP). Genotipos: en la condición S (SM10, SM11, SM18, SM23; SM29, SM36, SM37, ST112, ST124, ST129, ST140, ST141 y ST152) y en la condición E (EM10, EM11, EM18, EM23; EM29, EM36, EM37, ET112, ET124, ET129, ET140, ET141 y ET152) S: plantas libre de la infección del CVA; E: plantas infectadas con complejo viral del achaparramiento; Variables: nT: número de tallos; dN: distancia media de entrenudos; PS: Peso Seco g de materia seca; RHT: relación hoja/tallo; EFP: estadio fenológico ponderado; ISG: índice de severidad genotipo.

Analizando el eje x de la CP1 (Figura 39a), se aprecia que las variables de mayor peso hacia la derecha fueron PS, dN, y nT (correlación positiva), mientras que hacia la izquierda la variable de mayor peso fue el ISG (correlación negativa), con valores de autovectores de 0,53, 0,49, 0,31 y -0,52, respectivamente. Las variables PS, dN y nT se asociaron a la ausencia de la enfermedad; en cambio, la variable ISG se asoció con la enfermedad del CVA. Por su parte, en la CP2 (eje Y) se observa que las variables RHT y COU presentaron una asociación positiva entre ellas, con valores de autovectores de 0,65 y 0,58 respectivamente. En la CP 3, la variable EFP mostró una correlación positiva, mientras que la variable nT se correlacionó negativamente con EFP, con valores de autovectores de 0,76 y -0,49, respectivamente (Figura 39b).

En conjunto, las variables PS, dN, nT y EFP agruparon a la mayoría de los genotipos de Monarca-S, Trafal-S y algunos genotipos de Trafal-E, como el T112 y T129. Por el contrario, la variable ISG agrupó a la totalidad de los genotipos de Monarca en la condición-E (M10, M11, M18, M23; M29, M36, M37), que se ubican en todo el cuadrante izquierdo (superior e inferior), y algunos de Trafal (T140, T141 y T152) (círculo rojo). Por otro lado, en la CP2 se observa que los genotipos M29, T124 y T129 en la condición-E se asociaron con una RHT alta y mayor contenido de COU, al igual que el genotipo M29 (condición-S). En la CP3 se observa que el genotipo T129 en sus dos condiciones (S y E) se asoció con la variable EFP.

Finalmente, los genotipos T129 y T112 (círculos verdes) exhibieron una mayor estabilidad en las dos condiciones evaluadas (S y E). En ese contexto, mientras que el genotipo T129 se asoció a altos contenidos de COU, el genotipo T112 se correlacionó con bajos niveles de COU (cantidades <LC). Por otro lado, el genotipo T124 se asoció con altos valores de COU en ambas condiciones.

La discusión de los datos expuestos en este capítulo se desarrolla en el Capítulo 5 y las conclusiones de este trabajo de tesis se resumen en Capítulo 6.

CAPITULO 5

DISCUSIÓN GENERAL

Hasta el momento, no existían antecedentes de contenido de COU en alfalfa cultivada en Argentina y su relación con las enfermedades causadas por virosis mixtas. Los objetivos propuestos en esta tesis pretenden aportar información en este sentido. Para ello, en un principio, se debió poner a punto desde la obtención de los materiales vegetales (clones, detección de virus, trasplante y clonación simultánea) hasta la metodología analítica de extracción y cuantificación de COU por HPLC (Martin *et al.*, 2006; Ver sección 3A.3 de Materiales y Métodos). Adicionalmente, se ajustaron los criterios de estimación del daño causado por la virosis, modificando la metodología descrita por Odorizzi *et al.* (2017), a la que incorporó un cuarto grado de severidad (G4) (Ver sección 3B.5.3 de Materiales y Métodos), y relacionando la intensidad de la enfermedad con los caracteres morfológicos, fenológicos y productivos incluidos en este trabajo. Paralelamente, a fin de poder llevar a cabo los experimentos de esta tesis, se debieron realizar los injertos que permitieran reproducir de manera efectiva la enfermedad del complejo viral del achaparramiento (CVA), puntualmente la transmisión los virus ADV y AMV.

Una herramienta fundamental para el trabajo propuesto fue el desarrollo de clones, que permitieron generar para cada genotipo un material genético idéntico. Esto permitió evaluar el efecto del CVA en los genotipos infectados en comparación con el mismo material sin infección del CVA. De este modo, se pudo evaluar en ambas condiciones (sano y enfermo) la producción de coumestrol (COU) y los caracteres morfológicos, fenológicos y productivos definidos en esta tesis. Así, se eliminó la interferencia que podría haberse causado si el efecto del CVA se hubiera evaluado sobre un conjunto de plantas (distintos genotipos) de cada variedad utilizada. En alfalfa, esto es muy importante porque la variabilidad intrapoblacional (dentro de cada variedad) es normalmente más alta que la variedad interpoblacional (entre variedades).

En el trabajo se utilizaron dos cultivares de alfalfa que habían demostrado un comportamiento diferente en evaluaciones de campo hechas con anterioridad a esta tesis: Monarca SP INTA (susceptible en condiciones de campo) y Trafal PV INTA (tolerante putativo en condiciones de campo) (V. Arolfo, INTA Manfredi, *comunicación personal*). El empleo de

estos materiales contrastantes obedeció al hecho de querer estimar si el efecto del CVA sobre los caracteres propuestos, particularmente en el contenido de COU, seguía un patrón similar o si era afectado por la condición de tolerante o susceptible. Lamentablemente, los numerosos problemas que se suscitaron en las primeras etapas del trabajo, que obligaron a reducir el número de genotipos de cada cultivar originalmente propuesto, hicieron que la comparación *sensu strictu* entre cultivares se viera debilitada. Por ello, el efecto del CVA en esta tesis debería encuadrarse más bien a nivel de genotipos individuales y no tanto a nivel de cultivares.

En referencia al objetivo principal de esta tesis, se confirmó la presencia de COU en los genotipos de los dos cultivares analizados. En comparación con su contraparte sin infección (condición S), la infección con el CVA provocó un aumento variable, aunque significativo ($P < 0.05$), en el contenido de COU en algunos de los genotipos, independientemente de su pertenencia a un determinado cultivar. Esto posibilitó una clasificación de genotipos según su contenido de COU, lo que a su vez se relacionó también con la severidad de los síntomas. En este contexto, y como ya fuera señalado, el análisis de la variabilidad entre genotipos fue el criterio que se siguió mayormente para la discusión y la interpretación de los resultados.

5.1 Contenido de COU en alfalfa cultivada en Argentina.

Entre los genotipos de Monarca (susceptible), la variabilidad encontrada en el contenido de COU tuvo un rango que fue desde 160 ppm hasta 1210 ppm; mientras que entre los de Trafal (tolerante putativo) ese rango fue desde menos del límite de cuantificación ($LC = 0,42$ ppm) hasta valores cercanos a 1000 ppm (Tabla 7). Varios trabajos recopilados por Reed (2016) dan cuenta de la amplia variabilidad en el contenido de COU, desde 0 hasta 1050 ppm, para distintas especies del género *Medicago*. Esos valores están en línea con los encontrados y reportados en esta tesis.

Las fuentes de variabilidad encontradas en el contenido de COU que se mencionan en la bibliografía se pueden dividir en dos grandes grupos: a) aquellas relacionadas con las especies que se analizan, con las diferentes partes de la planta analizadas (hojas, brotes, tallos, planta entera) y con el estadio fenológico (Oldfield *et al.*, 1966; Sherwood, *et al.*, 1970; Franke *et al.*, 1994; Seguin *et al.*, 2004; Mattioli *et al.*, 2016; Jones y Ferris, 2001; Moravcová *et al.*, 2004;

Martin *et al.*, 2006; Barbetti, 2007; Fields *et al.*, 2018); y b) aquellas inherentes a las diferentes metodologías analíticas empleadas para la cuantificación, como por ejemplo el uso o no de la hidrólisis como metodología, que permite expresar la cuantificación total (glucósido-COU + COU libre) o sólo el COU-libre (aglicona) presente en la planta.

Uno de los primeros informes acerca de la presencia de COU-libre en alfalfa muestra contenidos que van desde 23 a 111 ppm (Oldfield *et al.*, 1966). Más recientemente, se han publicado valores de COU-libre de 143 a 396 ppm para distintos cultivares (Fields *et al.*, 2018). Cuando se comparan estas estimaciones con los resultados obtenidos en esta tesis, midiendo el COU-total, se hace evidente que la metodología de extracción y cuantificación impide establecer comparaciones válidas, ya que en un caso no se hidrolizan los compuestos (dando lugar a la cuantificación de COU-libre) y en otro sí (dando lugar a la cuantificación del COU-total). Esto último es lo utilizado en esta tesis y en otros trabajos (Francis y Millington, 1965; Yada, 1984; Franke *et al.*, 1994; Martin *et al.*, 2006).

El uso de una metodología u otra para cuantificar el COU puede tener implicancias en el uso del forraje por parte de animal. En el caso concreto de la alfalfa, sea para pastoreo directo o para la confección de reservas (fardos, rollos o megafardos), la técnica analítica debería ajustarse para obtener la cuantificación del COU-total, ya que –de lo contrario- los niveles de COU podrían verse subestimados en los casos en que las muestras no sean hidrolizadas. Esto podría tener consecuencias al momento de recomendar cultivares, dado que la capacidad de metabolizar el coumestrol difiere según el herbívoro que lo consume y, consecuentemente, el efecto que este fitoestrógeno podría tener sobre la fisiología del animal (Höjer, 2012; Njåstad *et al.*, 2014; Reed, 2016).

Por otro lado, debe también considerarse la propia fisiología de la planta en cuanto a su variación en el contenido de COU como potencial respuesta a las infecciones virales a las que comúnmente se producen en la alfalfa cultivada en Argentina. A continuación, se discuten algunas de estas consideraciones derivadas de los resultados obtenidos en esta tesis.

5.2 Respuesta de la planta de alfalfa a la infección viral: Producción de COU

En general, la infección (condición E) con el complejo viral del achaparramiento (CVA) provocó, respecto de la situación libre de la enfermedad (S), un aumento promedio no

significativo ($P>0,05$) de 8 y 15% en el contenido de COU en Traful y Monarca, respectivamente. Como fuera expresado oportunamente, la alta variabilidad dentro de cultivares que posee la alfalfa, unido al hecho del escaso número de genotipos de cada cultivar usado en este trabajo, probablemente impidieron la detección de diferencias significativas entre cultivares respecto del contenido promedio de COU entre las situaciones S y E. Sin embargo, el análisis a nivel de genotipos individuales permitió detectar diferencias en el contenido de COU como consecuencia de la infección con el CVA, probando que cada genotipo, independientemente del cultivar al que pertenezca, presenta un nivel de COU constitutivo (basal) y que a partir de allí responde de manera particular a la infección viral. Por ejemplo, los genotipos M11 y T129 presentaron a lo largo de todo el ensayo valores elevados de COU constitutivo, que no se incrementaron con la infección. Por su parte, en los genotipos T112 y T152 no se detectaron cantidades cuantificables de COU a lo largo de todo el ensayo en ninguna de las dos condiciones de enfermedad (S y E). Finalmente, un grupo de genotipos mostró incrementos significativos ante la infección del CVA como el genotipo M18 del cv Monarca y los genotipos T124 y T140 del cv Traful (28, 11 y 14%; Tabla 8). Esta variabilidad entre individuos de una misma población o cultivar se encontró también en otras especies de leguminosas como respuesta a la acción de otros patógenos, tales como hongos e infecciones virales simples (Barbetti, 2007; Jones y Ferris, 2001; Silva *et al.*, 2018).

Evaluaciones realizadas en otras variedades de alfalfa atacadas por los hongos *Ascochyta imperfecta*, *Cylindrocladium scoparium*, *Colletotrichum trifolii* y *Uromyces striatus* informaron acumulaciones de COU de hasta 500 ppm, valores asociados a las lesiones necróticas de las hojas infectadas (Sherwood *et al.*, 1970). Distintas especies del género *Medicago* mostraron un rango de concentraciones de COU de 114 a 1230 ppm entre genotipos que correlacionaron positivamente con la infección provocada por el hongo *Phoma medicaginis* (Barbetti, 2007). Igualmente, plantas de alfalfa crecidas en condiciones de invernadero inoculadas con el hongo *Stemphylium vesicarium* tuvieron valores promedio de COU de $169 \pm 25,1$ mg kg⁻¹, claramente mayor a la media del control (sin inocular) que llegó a $3,4 \pm 0,84$ mg kg⁻¹ (Fields *et al.*, 2018). Ensayos recientes en plantas de *Glycine max* (soja) de distintos cultivares encontraron distintas concentraciones de COU asociadas a diferentes niveles de tolerancia a los síntomas de la enfermedad del tizón de la hoja (CLB por sus siglas en inglés), enfermedad causada por el hongo

Cercospora cf. flagellaris. La resistencia parcial a este hongo estaría relacionada con la fuerte actividad antioxidante del COU (Silva *et al.*, 2018).

En lo que concierne específicamente a las infecciones virales en alfalfa, los primeros antecedentes que hay en la bibliografía se refieren al yellow mosaic virus (YMV), con determinaciones de COU de 29,5 ppm en plantas infectadas y de 19 ppm en plantas no infectadas (Hanson *et al.*, 1965). Estudios posteriores hechos con otros virus, como el alfalfa mosaic virus (AMV), no observaron acumulación de COU en hojas jóvenes en respuesta a esta virus (Sherwood *et al.*, 1970). Por el contrario, plantas de *Medicago polymorpha* infectadas por el AMV en condiciones de invernadero, mostraron incrementos en el contenido de COU (215 ppm) con respecto a las plantas sanas (33 ppm) (Jones y Ferris, 2001).

Por lo general, en los casos de enfermedades foliares causadas por hongos, la acumulación de COU se restringe principalmente a los sitios de las lesiones, a diferencia de la infección originada por el CVA, que abarca a la totalidad de planta y que, en consecuencia, la acumulación de COU -y por ende su acción antioxidante- se distribuye por toda la planta. En este contexto, cabría especular que aquellos genotipos de alfalfa que posean altas concentraciones constitutivas de COU, y/o que tengan la capacidad de responder a las infecciones virales u otros patógenos a través de un incremento en su producción de COU, tendrían una mayor nivel de tolerancia que aquellos genotipos que presentan bajas concentraciones basales de este fitoestrógeno y/o que no la incrementan frente al ataque de patógenos.

5.3 Variables morfológicas, fenológicas y productivas:

En esta sección se discutirá el efecto provocado por el CVA sobre las variables morfológicas, fenológicas y productivas en genotipos de los dos cultivares de alfalfa con características contrastantes que se emplearon en este trabajo de tesis: Monarca (susceptible) y Trafal (tolerante putativo) bajo las dos condiciones de infección propuestas (S = sin infección y E = con infección del CVA) y en las dos tandas (t1 y t2) de evaluación realizadas. Es importante resaltar que cada tanda se analizó por separado, atento a las diferentes condiciones en que se efectuaron cada una: t1 se realizó de agosto de 2015 a enero de 2016 y t2 se realizó de enero a julio de 2016. Si bien las estimaciones se desarrollaron en invernadero con ambiente

semicontrolado, las distintas fechas de evaluación condicionaron muy diferentes temperaturas externas que influyeron en el comportamiento de las plantas y determinaron distintos períodos entre cortes basados en las sumas térmicas (Tabla 5). Además, en el análisis estadístico se incorporaron las diferentes fuentes de variación a “tanda”, “mesada” y “maceta”.

En términos generales, la infección del CVA provocó en t1 disminuciones significativas en el peso seco (PS), del orden de 40% y 14% para el promedio de los genotipos de Monarca y Traful, respectivamente (Figura 30). En la t2, las disminuciones de PS fueron de 52% y 43 % para la media de los genotipos de Monarca y Traful, respectivamente (Figura 30). Resultados similares se estimaron en condiciones de campo para alfalfares atacados por el CVA en la Provincia de Córdoba, Argentina, con valores 54% de pérdida de rendimiento y con una incidencia de la virosis del 52% (Odorizzi *et al.*, 2017). Estas cifras surgieron de evaluar seis cultivares de alfalfa (Monarca SP INTA, Traful PV INTA, LPS8500, WL903, WL1058 y CW1010) de grado de reposo invernal (GRI) 8 a 10 en dos localidades (Manfredi y Santiago del Estero) durante tres temporadas.

Por otro lado, el CVA también impactó en las variables altura de planta (HT), número de tallos (nT), distancia de entrenudos (dN), relación hoja/tallo (RHT) y estadio fenológico ponderado (EFP). Comparando los valores promedio de los genotipos de cada cultivar entre las condiciones S y E de cada tanda de evaluación, se registraron disminuciones en HT, nT y dN del orden de 8% a 20%, 8% a 27% y 8% a 15%, respectivamente. No obstante, estas disminuciones no fueron estadísticamente significativas, probablemente debido a la gran variabilidad entre los genotipos. Desde un punto de vista biológico, estas reducciones se consideraron importantes y compatibles con los síntomas de achaparramiento que normalmente exhiben las plantas enfermas (Cook y Wilton, 1984; Lenardon *et al.*, 2010; Bejerman, *et al.*, 2011; Trucco, *et al.*, 2014; Samarfard, *et al.*, 2018). Por el contrario, la relación hoja/tallo (RHT) tendió a aumentar entre 5% y 18% (valores promedio de todos los genotipos) en la condición E respecto de S en ambos cultivares (Figura 33). De todos modos, este aumento en la RHT no se interpreta necesariamente como una mejora de la calidad forrajera, sino que se relacionaría con el acortamiento de los entrenudos (menor dN) en las plantas de alfalfa en la condición E que, a similitud de cantidad de hojas, condicionaría una RHT más alta. Por último, el estadio fenológico ponderado (EFP) presentó una disminución promedio en E respecto de S del orden

del 6% al 15%, aunque –como en las otras variables- con una alta variabilidad entre genotipos dentro de cada cultivar.

Como resumen de todo lo anterior, los resultados de este trabajo indican que el CVA afectó a todas las variables evaluadas. No obstante, las diferencias promedio entre cultivares no alcanzaron –en la gran mayoría de los casos- niveles de significancia, cosa que sí ocurrió a nivel de genotipos individuales. La no detección de diferencias entre los valores promedio de cada una de estas variables en ambos cultivares podría derivar de tres situaciones posibles: 1) los altos coeficientes de variabilidad intravarietal enmascararon las diferencias promedio entre las condiciones E y S en Monarca y Traful en cada variable; 2) el escaso número de genotipos evaluados en cada variedad no fue suficiente como para reflejar el comportamiento real de cada uno, introduciendo así un sesgo en las comparaciones fruto de la posible baja representatividad del material que se pudo estudiar; y 3) la clasificación putativa de Monarca como “susceptible” y de Traful como “tolerante”, proveniente de trabajos anteriores en condiciones de campo (V. Arolfo, *comunicación personal*), podría no ser totalmente ajustada a la situación real de cada cultivar frente al CVA. Las dos primeras hipótesis aparecen como las más probables (AEPV, 2011; Odorizzi *et al.*, 2017). Por otro lado, la detección de diferencias significativas a nivel de genotipos es muy importante en trabajos de selección para la obtención de variedades resistentes.

5.4 Índice de severidad por genotipo (ISG) y su relación con el COU y con las variables morfo-fenológicas y productivas.

La infección del CVA afectó a Monarca y Traful de manera diferente ($P < 0,05$), con valores de ISG de 72% y 54%, respectivamente (Figura 35). Estos resultados avalan lo señalado por Odorizzi *et al.* (2017), que informaron índices promedio de severidad para un período de tres años fue de 87% y 55% para Monarca y Traful, respectivamente.

Los resultados de esta tesis muestran que el efecto de la infección viral sobre el contenido de COU afectó de manera diferente el ISG por genotipo según el cultivar. Como se muestra en la Figura 36, el ISG para algunos genotipos del cv Monarca se atenuó con el cambio en el contenido de COU (E respecto a S). En este caso, la función de óptimo ajustada

para la relación entre ISG y el cambio en el contenido de COU (E-S) con la infección viral pone en evidencia que el efecto “protector” del COU depende de su contenido. Sin embargo, a fin de probar completamente este accionar frente a estrés biótico, se debería desafiar a las plantas también con otros organismos patogénicos, como hongos (Silva *et al.*, 2018).

Está bien documentado que, además de los incrementos por factores abióticos, la infección con patógenos fúngicos es uno de los factores más importantes en la estimulación de cumestranos en especies forrajeras de la familia de las leguminosas (Bickoff *et al.*, 1969; Hanson *et al.*, 1965; Sherwood *et al.*, 1970; Francis y Millinton, 1965; Barbetti, 2007; Fields *et al.*, 2018). Por el contrario, existen escasos registros de estimulación de COU por infecciones virales (Hanson *et al.*, 1965; Jones y Ferris, 2001). Generalmente, las infecciones producidas por hongos y virus se caracterizan a través de correlaciones y regresiones entre la severidad de la enfermedad y el contenido de COU, estimadas entre plantas o parcelas libres de síntomas y plantas o parcelas infectadas.

En este trabajo, el ISG se relacionó con las variables morfo-fenológico-productivas de distinta manera. En los genotipos de Monarca (Tabla 19), el ISG se correlacionó positiva y directamente con las diferencias entre las condiciones S y E (S-E) para las variables peso seco (dif-PS), distancia de entrenudos (dif-dN) y contenido de coumestrol (dif-COU). En el caso de Trafal (Tabla 20), el ISG mostró una correlación positiva y directa con la diferencia en el número de tallos (dif-nT) pero indirecta con peso seco (dif-PS). Por su parte, la diferencia de la relación hoja/tallo (dif-RHT) mostró una asociación positiva y directa con la diferencia del contenido de COU (dif-COU) en ambos cultivares.

El análisis de componentes principales (ACP) a nivel de cultivares asoció a los genotipos de Monarca con un mayor ISG. Los genotipos de Trafal se asociaron con valores promedio de ISG más bajos, aunque con una mayor dispersión en la distribución de los genotipos (Figura 38). El ACP a nivel de genotipos individuales identificó a los genotipos T112, T124 y T129 (Figura 39) como menos afectados por la enfermedad, según sus valores de ISG, PS, dN y RHT. Se aprecia que los genotipos T129 y T124 presentaron altos contenidos de COU constitutivo, si bien éste último tuvo la capacidad de aumentar su contenido de COU en presencia del CVA. Más desconcertante es el comportamiento del genotipo T112, que presentó un buen comportamiento frente a la infección pero que no registró cantidades cuantificables de COU,

tanto constitutivas como en presencia del CVA; en ese marco, cabría especular que la posible resistencia de este genotipo estaría condicionada por otro/s mecanismo/s de defensa de la planta. Por el contrario, el CVA afectó fuertemente a los genotipos M10, M23 y T152. Finalmente, los genotipos M36, M18 y T140 incrementaron sus contenidos de COU bajo condiciones de infección, aunque sólo los dos últimos en forma significativa.

Según lo expresado en la Sección 4.1.3 (Resultados), los genotipos se agruparon según las estimaciones de COU constitutivo (o basal) en concentraciones no detectables (< a 0,48 ppm), bajas (0,48-500 ppm), medias (500-950 ppm) y altas (>950 ppm). En presencia del CVA, no todos los genotipos fueron capaces de estimular / incrementar significativamente su producción de COU. Sin embargo, basado en los resultados de esta tesis, que muestran una tendencia general hacia una relación inversa entre nivel de daño y contenido COU (constitutivo e inducido), podría postularse la siguiente hipótesis: aquellos genotipos con alto contenido de COU constitutivo, gozarían de un mayor efecto “protector” frente a la infección; aquellos genotipos con concentraciones medias de COU constitutivo, manifestarían un cierto nivel de estimulación para una mayor producción de COU frente a la infección, traducido en una atenuación del daño de la enfermedad; finalmente, aquellos genotipos con bajo contenido de COU constitutivo, al no poseer ese efecto “protector” inicial ni manifestar un incremento considerable del metabolito frente a la virosis, serían los que sufrirían los mayores daños. Es importante resaltar que el COU no ejerce ningún efecto *per se* en detrimento del CVA sino que, por su efecto antioxidante, contribuye al mejor comportamiento de la planta frente a este y otros factores de estrés, tanto bióticos y abióticos.

El objetivo de esta tesis fue determinar el impacto del CVA en la producción de COU y otras variables y ver si esos efectos se daban o no de manera similar en un cultivar putativamente susceptible y otro putativamente tolerante. Los resultados mostraron que la infección con el CVA estimuló la síntesis de COU y afectó las variables morfo-feno-productivas evaluadas. También se observó que esos efectos se relacionaron en mayor medida con un fuerte componente individual (genotipo) que con una tendencia general de supuesta tolerancia o susceptibilidad de los cultivares. Esta conclusión es válida aún con las limitaciones de la falta de representatividad de los materiales estudiados, como ya fuera comentado más arriba.

El hecho de haber utilizado clones en lugar de distintas plantas individuales de cada variedad, permitió evaluar el impacto del CVA eliminando cualquier interferencia que podría haber originado la heterogénea composición genética de cada planta en una población. Es importante recordar que una variedad de alfalfa, a diferencia de la variedad de una especie autógena como la soja o el trigo, es en realidad un conjunto infinito de genotipos heterocigotas que comparten un cierto grado de uniformidad fenotípica. Esto último (uniformidad fenotípica) es consecuencia de la selección, que tiene por finalidad aumentar la frecuencia de alelos favorables para algunos caracteres de importancia. En este contexto, la alta variabilidad entre los genotipos que se manifestó en este trabajo de tesis respecto de la reacción frente al CVA es muy promisorio para futuros trabajos de selección en el desarrollo de variedades resistentes.

Asumiendo que el contenido y el incremento de COU le confiere un efecto “protector” (Silva *et al.*, 2018), y basados en los resultados de este trabajo de tesis en cuanto a la alta variabilidad en el comportamiento de los genotipos, se sugiere como metodología para la obtención de variedades de alfalfa resistentes al CVA lo siguiente: a) infección de un alto número de genotipos; b) estimación del contenido de COU en cada genotipo; c) selección de aquellos individuos que hayan exhibido los mayores niveles del fitoestrógeno coumestrol bajo esas condiciones de infección; y d) policruzamiento de los individuos seleccionados a fin de obtener poblaciones resultantes con mayor frecuencia de plantas capaces de sintetizar COU como forma de superar situaciones de estrés.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES GENERALES

El presente trabajo de tesis aporta información novedosa respecto de la producción del fitoestrógeno coumestrol (COU) como respuesta de las plantas de alfalfa a la infección del complejo viral del achaparramiento. Previo a esta tesis, no había información sobre el contenido de COU en el cultivo de alfalfa en Argentina. Otro de los aspectos destacados de este trabajo es la puesta a punto de la metodología para la cuantificación de COU en alfalfa, cuya presencia se determinó en los dos cultivares utilizados: Monarca SP INTA (susceptible) y Trafal PV INTA (tolerante putativo). La comparación de material genético idéntico (clones) sometido a dos condiciones de enfermedad (sin y con infección del CVA), permitió estimar con mayor precisión el efecto de la virosis sobre la estimulación del contenido de COU y sobre las características morfológicas, fenológicas y productivas de dichas plantas.

La presencia de COU se constató en la gran mayoría de los genotipos estudiados, tanto de Monarca como de Trafal, con valores que fueron desde el límite de cuantificación (LC: 0,48 ppm) hasta las 1210 ppm. También se comprobó la presencia de COU constitutivo -es decir sin infección del CVA- en la mayoría de genotipos de alfalfa evaluados; en algunos de ellos, las concentraciones fueron elevadas a lo largo de todo el ensayo. Por otra parte, también se hallaron genotipos del cultivar Trafal que no registraron cantidades cuantificables de COU a lo largo de todo el ensayo en ninguna de las dos condiciones propuestas (libre de infección y con infección del CVA). Otro aspecto relevante de este trabajo es que la infección con el CVA se correlaciona positivamente con el aumento en la síntesis de COU en la mayoría de los genotipos, independientemente del cultivar al que pertenecieran. En algunos casos, este incremento fue significativo, con valores del 14% al 28%, constituyendo una información inédita para los antecedentes de alfalfa en el país.

Otra conclusión importante de esta tesis es que la infección con el CVA afectó negativamente las características morfológicas, fenológicas y productivas de ambos cultivares. El efecto sobre la disminución en rendimiento de peso seco, altura total de las plantas, número

de tallos y distancia media de entrenudos y sobre el avance del estadio fenológico ponderado fue muy claro a nivel de genotipos individuales tanto de Monarca SP INTA como de Traful PV INTA. Por el contrario, la infección viral tendió a aumentar la relación hoja/tallo, sin que esto signifique necesariamente una mejora de la calidad forrajera. Estos resultados constituyen un aporte a la cuantificación de los síntomas provocados por el CVA que informaron otros autores (Odorizzi *et al.*, 2017).

A pesar del bajo número de genotipos de cada cultivar que se estudiaron -lo que sugiere una nota de cautela respecto de las inferencias que se puedan hacer a nivel poblacional-, las estimaciones del índice de severidad del CVA por genotipo (ISG) evidenciaron una mayor susceptibilidad del cv Monarca SP INTA en comparación con el cv Traful PV INTA. A su vez, dicho índice se relacionó en forma diferente con el contenido de COU de cada cultivar. Por ejemplo, el CVA provocó en algunos genotipos de Monarca incrementos en el contenido de COU, que se vio acompañado por una disminución en los valores de ISG, lo que avala el efecto “protector” que se atribuye al fitoestrógeno COU.

La alta variabilidad en la respuesta de los genotipos evaluados respecto de su contenido de COU como producto de su reacción a la infección con el CVA, alienta el potencial de generar variedades resistentes a la virosis y a otros factores de estrés a través de la selección y el entrecruzamiento de genotipos superiores.

La Figura 40 resume los principales aportes que surgen de este trabajo de tesis.

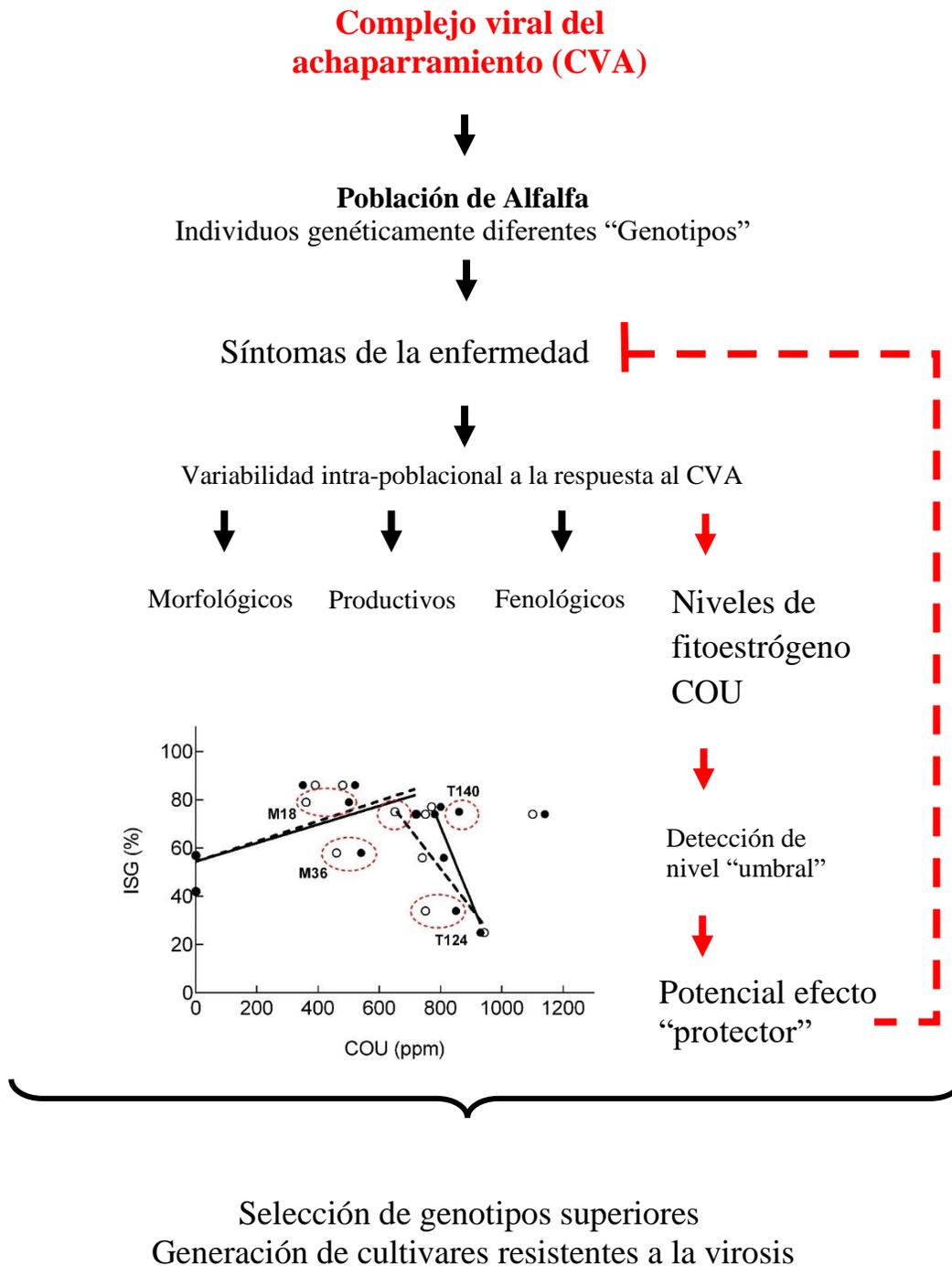


Figura 40: Principales aportes que surgen del trabajo de tesis. CVA complejo viral del achaparramiento. COU: coumestrol. ISG (%): índice de severidad por genotipo.

NUEVOS INTERROGANTES QUE SURGEN DE ESTA TESIS

A partir de los resultados experimentales de esta tesis, que demostraron la presencia de coumestrol (COU) en la alfalfa tanto como metabolito constitutivo como inducido por factores de estrés, surgen nuevas preguntas que ameritan futuras investigaciones.

En primer lugar, sería interesante explorar los contenidos de fitoestrógenos, como COU e isoflavonoides, en los principales cultivares de alfalfa de uso comercial en Argentina, teniendo en cuenta que la alfalfa conforma una porción importante de la dieta animal, ya sea en pastoreo directo o como forraje conservado. También sería conveniente ampliar esta búsqueda a otras leguminosas, como el trébol blanco (*Trifolium repens*), rojo (*Trifolium pratense*) y de olor (*Melilotus alba*). En todos estos materiales podría ser de utilidad determinar no sólo la presencia de COU, sino también de los isoflavonoides daidzeina, genisteina, biochanina A y formononetina. En segundo lugar, y sabiendo que el COU perdura en alfalfa conservada en pequeñas concentraciones dependiendo el cultivar aún a los 150 días de almacenamiento (Moravcová *et al.*, 2004), sería de interés analizar el contenido de fitoestrógenos (cumestranos e isoflavonoides) en heno o henolaje de alfalfa y conocer cuánto tiempo pueden perdurar en estas reservas forrajeras. En este contexto, sería conveniente además evaluar la dinámica de estos compuestos y cuáles de ellos se degradan a lo largo del tiempo.

La importancia de responder a los interrogantes anteriormente planteados radica en que, dependiendo el tipo de compuesto (cumestranos o isoflavonoides), los mamíferos que consumen estas pasturas pueden desarrollar el llamado “síndrome estrogénico”, dado que estos compuestos pueden unirse con mayor o menor afinidad al receptor de estrógeno que presentan los mamíferos. Los isoflavonoides biochanina A y formononetina son considerados de acción menos estrogénica que su forma original (genisteina y daidzeina), debido a que los grupos metoxy no son capaces de unirse eficientemente a los receptores estrogénicos en el animal; en consecuencia, el COU es el más potente de todos los fitoestrógenos, siendo el orden de potencia de los fitoestrógenos en relación al estradiol: estradiol >> coumestrol > equol =genisteina > biochanina A > daidzeina > formononetina (Dweck, 2006). De todos modos, el COU es 100 a 200 veces menos potente que el β 17-estradiol. Cabe recordar que algunos de estos compuestos pueden ser metabolizados una vez ingeridos. El conocimiento potencial que podría generarse a

partir de estas aproximaciones experimentales podría facilitar la toma de decisiones en cuanto a la necesidad de generar nuevos cultivares en función de contenidos de fitoestrógenos (cumestranos e isoflavonoides).

Otro aspecto relacionado a lo anterior es que la obtención de alimentos funcionales, con componentes bioactivos, puede verse beneficiada por los fitoestrógenos presentes en alfalfa, sea fresca o conservada (heno o henolaje). Luego de la ingestión de alfalfa por parte de vacas lecheras, estos compuestos pueden ser transferidos a la leche. En ese caso, conocer cuáles de esos fitoestrógenos y con qué concentración se transfirieron a la leche, así como determinar a partir de qué nivel de concentración se considera componente bioactivo, sería una información valiosa. Todo esto puede, a su vez, contribuir a la trazabilidad de los componentes que integran el alimento, mejorando así la calidad y la seguridad alimentaria, generando alimentos orientados a una clase de consumidores con requerimientos específicos. Los fitoestrógenos pueden competir con los estrógenos naturales y actuar como agentes protectores contra el cáncer, prevenir enfermedades cardiovasculares y aliviar los síntomas postmenopausia en la mujer. Conociendo la composición de fitoestrógenos presentes en los cultivares de alfalfa, se pueden desarrollar variedades con alto o bajo contenido de COU u otros compuestos, según los requerimientos de los consumidores.

Finalmente, cabría explorar con mayor profundidad el efecto protector del COU frente a los estreses de origen abiótico o biótico. Sobre esto último, el panorama debería ampliarse no sólo a las virosis –como el tema de esta tesis- sino también a otros patógenos, como hongos. En este marco, serían temas importantes de investigación las respuestas a algunas de estas preguntas: ¿se acumula COU en las plantas de alfalfa con lesiones provocadas por hongos?; aquellos genotipos infectados con hongos que acumulan COU, ¿presentan menores síntomas?; estos genotipos, ¿qué nivel de COU constitutivo presentan? También de forma más general, puede investigarse si los genotipos con alto contenido de COU constitutivo presentan una mayor actividad antioxidante que aquellos que tienen bajo COU constitutivo; o si es posible medir la actividad antioxidante en plantas de alfalfa con infecciones virales. Algunos de estos temas planteados registran antecedentes en soja (*Glycine max*), donde Silva *et al.* (2018) demostraron que algunos cultivares con distintas concentraciones de COU exhibieron diferentes niveles de tolerancia a los ataques de la enfermedad del tizón de la hoja (CLB por sus siglas en inglés) generada por el hongo *Cercospora cf. flagellaris*.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AEPV Proyecto Específico 21401. (2011). INTA. Identificación, producción de reactivos de diagnóstico, caracterización y análisis de la variabilidad del patógeno.
- Adler, S A., Purup, S., Hansen-Møller, J., Thuen, E., Gustavsson, A., Steinshamn, H. (2014). Phyto-oestrogens and their metabolites in milk produced on two pastures with different botanical compositions. *Livest. Sci.* 163: 62-68.
- Akhter, M. S., Akandab, A. M., Kobayashi, K., Jaing, R. K. B. Mandal. (2019). Plant virus diseases and their management in Bangladesh. *Crop Prot.* 118: 57-65.
- Alliot, B., Signoret, P. A. (1972). La “maladie à énéations de la luzerne”, une maladie nouvelle pour la France. *Phytopath Z.* 74: 69-73.
- Alexander, H. M.; Mauck K. E., Whitfield, A. E., Garrett, K. A., Malmstrom. C. M. (2014). Plant-virus interactions and the agro-ecological interface. *Eur. J. Plant Pathol.* 138: 529-547.
- Almási, A.; Harsányi, A., Gáborjányi, R.. (2001). Photosynthetic alterations of virus infected plants. *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* 36: 15-29.
- Al-Shahwan, I. M., Abdalla, O. A., Al-Saleh, M. A., Amer. M. A. (2017). Detection of new viruses in alfalfa, weeds and cultivated plants growing adjacent to alfalfa fields in Saudi Arabia, *Saudi J. Biol. Sci.* 24: 1336-1343
- Amer, A. (2018). Biotechnology approaches for in vitro production of flavonoids. *J. microbial. Biotech. Food Sci.* 7: 457-468.
- Annicchiarico, P. (2015a). Alfalfa forage yield and leaf / stem ratio: narrow-sense heritability, genetic correlation, and parent selection procedures. *Euphytica.* 205: 409-420.
- Annicchiarico, P., Nazzicari, N., Li, X., Wei, Y., Pecetti, L., Brummer, E. C. (2015b). Accuracy of genomic selection for alfalfa biomass yield in different reference populations. *BMC Genomics* 16: 1-13.
- Antuñá, J. C. (2017). El heno de alfalfa se posiciona en el mercado mundial. <http://intainforma.inta.gov.ar/?p=39707>. Consultado. 3/7/2018.
- Aragón, J., Imwinkelried, J. (2007). Manejo integrado de plagas de la alfalfa. En: El cultivo de la alfalfa en la Argentina. D. H. Basigalup (Ed.) Buenos Aires: INTA, Cap. 9, pp. 165-197.
- Ahsyee, R. S., Al-Sloge, O., Čalić, I., Branković, G., Zorić, M., Momirović, U., Vasiljević S., Šurlan-Momirović, G. (2013). Genetic diversity of alfalfa domesticated varietal populations from libyan genbank revealed by rapid markers *Arch. Biol. Sci.* 65: 595-602.

- Arolfo V., Odorizzi A., Basigalup D., Balzarini M. (2011). Validación de un método de selección para rendimiento en alfalfa basado en la depresión por endocría. *Agriscientia* 28: 13-19
- Barbetti, M. J. (2007). Resistance in Annual *Medicago* spp, to *Phoma medicaginis* and *Lentosphaerulina trifolli* and its relationship to induce production of a phytoestrogen. *Plant Dis.* 91: 239-244.
- Barreira, J C M., Visnevschi-necrasov, T., Nunes, E., Cunha, S C., Pereira, G., Oliveira, M B P P. (2015). *Medicago* spp. as potential sources of bioactive isoflavones: Characterization according to phylogenetic and phenologic factors. *Phytochemistry.* 116: 230-238.
- Basigalup, D. H. (2007). Mejoramiento genético y desarrollo de variedades. En: Basigalup, D., H., (Ed) *El Cultivo de la Alfalfa en la Argentina*. Ediciones INTA, Capítulo 5. pp, 81-108.
- Basigalup, D. H., Rossaningo, R. (2007). Panorama actual de la alfalfa en la Argentina, En: Basigalup, D. H. (Ed.) *El cultivo de la alfalfa en la Argentina*. Ediciones INTA. Capítulo 1. pp. 13-25.
- Basigalup, D. H., Odorizzi, A. S. (2011). Melhoramento genético da alfalfa. En: R. de P. Ferreira, Basigalup, D. H. Giéco, J. O. (Ed.) *Melhoramento genético da alfalfa*. Embrapa Pecuária Sudeste. São Carlos. Brasil. Cap. 9. pp. 227-259.
- Basigalup, D. (2016). Producción de heno de alfalfa en Argentina. www.todoalfalfa.com.ar/documentos/2017/Informe_Basigalup.doc. Consultado el junio de 2018.
- Basigalup, D., Giletta, M., Odorizzi, A., Arolfo, V., Sánchez, F., Urrets Zavalía, G. (2018a). An overview of alfalfa (*Medicago sativa* L.) Situation in argentina. Second world alfalfa congress. Global interaction for alfalfa innovation November 11-14, 2018. Córdoba, Argentina.
- Basigalup, D. (2018b) Alfalfa: la forrajera capa de enfrentar el déficit hídrico. <http://intainforma.inta.gov.ar/?p=42310>. Consultado el 15/03/2018.
- Bejerman, N., Nome, C., Giolitti, F., Kitajima, E., De Breuil, S., Pérez Fernández, J., Basigalup, D., Cornacchione, M., Lenardon, S. (2011). First report of a rhabdovirus infecting alfalfa in Argentina. *Plant Dis.* 95: 771-771.
- Bejerman, N., Giolitti, F., De Breuil, S., Trucco, V., Nome, C., Lenardon, S., Dietzgen, R. G. (2015). Complete genome sequence and integrated protein localization and interaction map for alfalfa dwarf virus, which combines properties of both cytoplasmic and nuclear plant rhabdoviruses. *Virology.* 483: 275-283.
- Bejerman, N., Giolitti, F., Trucco, V., De Breuil, S., Dietzgen, R. G., Lenardon, S. (2016). Complete genome sequence of a new enamovirus from Argentina infecting alfalfa plants showing dwarfism symptoms. *Arch. Virol.* 161: 2029-2032.

- Bejerman, N., Trucco, V., De Breuil, S., Rodriguez Pardina, P., Lenardon, S., Giolitti, F. (2018). Genome characterization of an Argentinean isolate of alfalfa leaf curl virus. *Arch. Virol.* 163: 799-803.
- Bejerman, N., Debat, H., Nome, C., Cabrera-Mederos, D., Trucco, V., de Breuil, S., Lenardon, S., Giolitti, F. (2019). Redefining the *Medicago sativa* alphapartitiviruses genome sequences. *Virus Research* 265: 156-161.
- Bennett, R., Wallsgrove, R. M. (1994). Tansley review N°72. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New phytol.* 127: 617-633.
- Bickoff, E.M. & Spencer, R. R., Witt, S. C. & Knuckles, B. E. (1969). "Studies on the chemical and biological properties of coumestrol and related compounds," Technical bulletins 171832, United States department of agriculture, economic research service.
- Bouton, J. H. (2012). Breeding lucerne for persistence. *Crop Pasture Sci.* 63: 95-106.
- Butkute, B.; Padarauskas, A.; Ceseviciene, J A, Taujenis, L., Norkeviciene. E. (2018). *Crop Pasture Sci.* 69: 1020-1030.
- Cantero Bonilla, Ma. A- (1993). *Efecto del pastoreo de alfalfa tierra de campos en secano, sobre aspectos fisiológicos y anatómicos del aparato reproductor de ovejas menachas.* Tesis Doctoral. Univ. Comput. Madrid. Fac. Vet Dep. *Patol. Anim.* II. 1–189p.
- Chesnais, Q.; Couty, A.; Uzest, M. Brault, B., Ameline A. (2019). Plant infection by two different viruses induce contrasting changes of vectors fitness and behavior. *Insect Sci.* 26: 86-96.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.
- Collum, T. D. y J. N. Culver. (2016). The impact of phytohormones on virus infection and disease. *Curr. Opin. Virol.* 17: 25-31.
- Cook, A. A., Wilton, A. C. (1984). Alfalfa enation virus in the Kingdom of Saudi Arabia. *FAO Plant Prot. Bull.* 32: 139-140.
- Cortés, A., León, J., Jiménez, F., Díaz, M., Villanueva, A, Guzmán, C. (2016). Alimentos funcionales, alfalfa y fitoestrógenos. *Revista Mutis* 6 (1): 28-40.
- Culver, J. N., Padmanabhan, M. S. (2007). Virus-induced disease: altering host physiology one interaction at a time. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45: 221-243.
- Delgado Enguita, I., Calvo, L. L. (1992). Incidencia de las virosis mosaico y “enations” en plantas aisladas de alfalfa. *Pastos* 22: 85-92.
- Diplock, A., Aggett, P., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E., Roberfroid, M. (1999). "Scientific concepts in functional foods in europe: Consensus document." *Br. J. Nutr.* 81:1-27.

- Di Rienzo, J. A., Guzmán A. W., Casanoves F. (2002). A multiple-comparisons method based on the distribution of the root node distance of a binary tree. *J.Agr. Biol. Environ. St.*7: 129-142.
- Dweck, A. C. (2006). Isoflavones, phytohormones and phytosterols. *J. Appl. Cosmetol.* 24:17-33.
- Flajoulot, S.; Ronfort, J.; Baudouin, P; Barre, P.; Huguet, T; Huyghe, C.; Julier, B. (2005). Genetic diversity among alfalfa (*Medicago sativa*) cultivars coming from a breeding program using SSR markers. *Theor. Appl. Genet.* 111: 1420-1429.
- Fields, R. L., Barrell, G. K., Gash, A., Zhao, J., Moot, J. D. (2018). Alfalfa coumestrol content in response to development stage, fungi, aphids, and cultivar. *Crop Ecol. Physiol.* 110: 910-921.
- Francis, C. M., Millington, A. J. (1965). Wether bioassay of annual pasture legumes IV. The oestrogenic activity of annual medic pastures. *Aust. J. Agric. Res.* 16: 927-935
- Franke, A. A., Custer, L. J., Cerna, C. M., Narala, K. (1994). Quantitation of phytoestrogens in legumes by HPLC. *J. Agric. food Chem.* 42: 1905-1913.
- Gergerich, R. C., Dolja. V. V. (2006). Introducción a los virus vegetales, el enemigo invisible. Trans. Giammaría, S. L. 2008. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2008-0122-01.
- Girardi, F. A., Tonial, F., Chini, S. O., Sobottka, A. A. M., Scheffer-Basso, S. M., Bertol, C. D. (2014). Phytochemical profile and antimicrobial properties of *Lotus spp.* (Fabaceae). *An. Acad. Bras. Cienc.* 86: 1295-1302.
- Goodman, R., Zoltan, K., Wood, K. (1986). The biochemistry and physiology of plant disease. Columbia. MO: Univ. MO Press. 433 pp.
- Grynkiewicz, G., Ksycińska, H., Ramza, J., Zagrodzka, J. (2005). Chromatographic quantification of isoflavones (why And how) *Acta Chromatogr.* 15: 31-65.
- Hanson, C. H., Loper, G. M., Kohler, G. O., Bickoff, E. M., Taylor, K. W., Kehr, W. R., Stanford, E. H. W., Dudley J., Pedersen, M. W., Sorensen, E. L., Carnahan, H. L., Wilsie, C. P. (1965). Variation in coumestrol content of alfalfa. as related to location, variety, cutting, year, stage of growth, and disease. *USDA Tech. Bull.* 1333. 72p.
- Hall, D.G. (1984). Coumestrol content of lucerne in new south wales. *Proc. Aust. Soc. Anim.* 15: 689p.
- Haya, J., Castelo-Branco, C., Pérez-Medina, T. (2002). Revisión de conjunto fitoestrógenos : conocimientos básicos y utilidad clínica. *Toko-Gin Pr.* 61: 337-362.
- Herrmann, D., Flajoulot, S., Julier, B. (2010). Sample size for diversity studies in tetraploid alfalfa (*Medicago sativa*) based on codominantly coded SSR markers. *Euphytica.* 171: 441-446.

- Höjer, A. (2012). *Phytoestrogens and fatty acids in forage and bovine milk*. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Sciences Pp:78.
- Hooks, C., Fereres, A. (2006). Protecting crops from non-persistently aphid-transmitted viruses: A review on the use of barrier plants as a management tool. *Virus Res.* 120: 1-16.
- Howarth, R. E. (1988). Antiquality Factors and Nonnutritive Chemical Components. In: Hanson. A. A. Barnes. D. K. and R. R. Hill. *Alfalfa and alfalfa improvement*. American Society of Agronomy. Inc. Crop Science Society of America. Inc. Soil science society of America. Inc. Publishers. Madison wisconsin. USA. Pp: 494-510.
- Hull, R. (2002). *Matthews' Plant Virology*. San Diego. CA: Academic. 1001 pp.
- Imwinkelried, J., Fava, F., Trumper, E. (2013). INTA- EEA, Manfredi. Pulgones (Hemiptera: Aphidoidea) <http://www.manualfitosanitario.com/InfoNews/INTA%20Pulgones%20de%20la%20alfalfa.pdf>. Consultado el 14 de Agosto de 2017.
- InfoStat, (2016). Versión 2016. Grupo Infostat/FCA. Universidad Nacional de Córdoba. Ed. Brujas, Córdoba, Argentina.
- Johnson, S. N., Ryalls J. M. W., Gherlenda A. N., Frew A., Hartley S. E. (2018). Benefits from below: Silicon supplementation maintains legume productivity under predicted climate change scenarios. *Front. Plant Sci.* 9: (202), 1-9.
- Jones, R. A. C., Ferris, D. G. (2001). Virus infection stimulates phyto-oestrogen production in pasture legume plants growing in grazed wards. *Ann. appl. Biol.* 138: 171-179.
- Jones, R. A. C. (2004). Using epidemiological information to develop effective integrated virus disease management strategies. *Virus Res.* 100: 5-30.
- Kumar T., Bao A.-K., Bao Z., Wang F., Gao L., Wang S.-M. (2018): The progress of genetic improvement in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Czech J. Genet Plant Breed.* 54: 41-51.
- Leclant, F., Alliot, B., Signoret, P. A. (1973). Transmission et epidemiologie de la maladie a enations de la luzerne. Premiers resultáis. *Ann. Phytopatol.* 5: 441-445.
- Lelario, F., Scrano, L., Franchi, S., Bonomo, M G, Salzano, G., Milan, S., Milella, L, Bufo, S A. (2018). Identification and antimicrobial activity of most representative secondary metabolites from different plant species. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 5: 1-12.
- Lenardon, S., Pérez Fernández J., Basigalup, D. (2010). INTA Informa. Descubren una nueva enfermedad en alfalfa. Disponible Mayo de 2018 en <http://intainforma.inta.gov.ar/?p=2693>
- Leuner, O., Havlik, J., Hummelova, J., Prokudina, E., Novy, P., Kokoska, L. (2013). Distribution of isoflavones and coumestrol in neglected tropical and subtropical legumes. *J. Sci. Food Agr.* 575-579.
- Lenis Sanin, Y. Y., Gutiérrez Gómez, M. T. G., Morales, A. M. T. (2010). Efectos de los fitoestrógenos en la reproducción animal. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín* 63: 5555- 5565.

- Leyva, E., Navarro-Tovar, G., Loredó-Carrillo, S. E., Santos Díaz, M. S. (2011). Biosíntesis y actividad biológica de fitoestrógenos y fitoesteroides. *Bol. Soc. Quím. Méx.* 5: 35-43.
- Livingston, A., Bickoff, E. M., Guggolz, J., Thompson, C. R. (1961). Alfalfa estrogens. Quantitative determination of coumestrol in fresh and dried alfalfa. *Anal. Chem.* 9: 135-137.
- Li, X., Brummer, E. C. (2012). Applied genetics and genomics in alfalfa breeding. *Agronomy* 2:40-61.
- López Luengo, M. T. 2010. Fitoestrógenos. *Eficacia y seguridad.* 29: 86-90.
- Lu, B. Li, M., Yin, R. (2016): Phytochemical content, health. Benefits and toxicology of common edible flowers: A review (2000-2015), *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 56 Supp 1:1 S130-S148.
- Manzur, M. (2005). *Contenido de isoflavonoides y sus conjugados en grano y sus conjugados en grano de soja: efecto del cultivar y de soja: efecto del cultivar y fecha de siembra.* Tesis de grado. Carrera de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas. Físicas y Naturales. UNC. Pp: 1-39.
- Martin, L M., Castilho, M., Silveira, M. (2006). Liquid chromatographic validation of a quantitation method for phytoestrogens biochanin-A, coumestrol, daidzein, formononetin and genistein in lucerne. *J. liq. Chromat.* 29: 2875-2884.
- Mattioli, Dal Bosco. S. A., Martino, M., Ruggeri, S., Marconi, O., Sileoni, V., Falcinelli, B., Castellini. C., Benincasa, P. (2016). Alfalfa and flax sprouts supplementation enriches the content of bioactive compounds and lowers the cholesterol in hen egg. *J. Funct. Foods* 22: 454-462.
- Mauck, K. E., Moraes, C. M. De, Mescher, M. C. (2014). Evidence of local adaptation in plant virus effects on host- Vector interactions. *Integr. Comp. Biol* 54: 193-209.
- Mauck, K. E. (2016). Variation in virus effects on host plant phenotypes and insect vector behavior: what can it teach us about virus evolution? *Curr. Opin. Virol.* 21: 114-123. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2016.09.002>
- Mauck K., De Moraes, C.M., Mescher, M. C. (2016). Effects of pathogens on sensory-mediated interactions between plants and insect vectors. *Curr. Opin. Plant Biol.* 32: 53-61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2016.09.002>
- Maynar, F. H., Martínez Martínez, A. (1985). Mejora genética de la producción forrajera de la alfalfa. Nuevas variedades para la meseta norte. Asociación de investigación para la mejora de la alfalfa. *Pastos.* 15: 21-40.
- Mazid, M., Khan, T. A., Mohammad, F. (2011). Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biol.Med.* 3 (2) Special Issue: 232-249.
- Mendoza Meza, D. L., Mercado, C. R., Ahumada Barraza C. (2015). Efecto de las isoflavonas de la soja en la salud ósea de adultos y niños. *Salud Uninorte.* Barranquilla (Col.). 31: 139-153.

- Monarca SP INTA. (1989). Legajo de Inscripción, RNC y RNPC. INASE, Argentina.
- Moravcová, J., Kleinová, T., Louč, R., Tyrolová, I., Dušek, M., Ce, M. (2004). Coumestrol content of alfalfa following ensilage. *Anim. Feed Sci. Technol.* 115: 159-167.
- Muñoz Mendoza, R., Murillo Medina, A. L., Pérez Gutiérrez, J. F., Córdova Izquierdo. A. (2002). Parámetros reproductivos en vacas holstein alimentadas con alfalfa alto en coumestrol. *Arch. Zoot.* 51: 373-376. Disponible en Julio de 2015: <http://redalyc.uaemex.mx>.
- Murkies, L., Wilcox, G., Davis, S. R. (1998). Clinical review 92: Phytoestrogens. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83: 297-303.
- Nagl, N; Taski-Ajdukovic, K; Barac, G; Baburski, A; Seccareccia, I; Milic, D; Katic, S, (2011). Estimation of the genetic diversity in tetraploid alfalfa populations based on RAPD markers for breeding purposes. *Int. J. Mol. Sci.* 12: 5449-5460.
- Njåstad, K. M., Adler, S. A., Hansen-Møller J., Thuen E., Gustavsson, A.-M., Steinshamn H. (2014). Gastrointestinal metabolism of phytoestrogens in lactating dairy cows fed silages with different botanical composition. *J. Dairy Sci.* 97: 7735-7750. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-8208>.
- Odorizzi, A. S. (2015). *Parámetros genéticos, rendimiento y calidad forrajera en alfalfas (Medicago sativa L.) extremadamente sin reposo con expresión variable del carácter multifoliolado obtenidas por selección fenotípica recurrente*. Tesis Doctoral. Doctor en Ciencias Agropecuarias. Esc. Para Graduados FCA. UNC.
- Odorizzi, A. S., Cornacchione, M., Arolfo, V., Basigalup, D. H., Mijoevich, M. L., Balzarini. M. (2017). Evaluación de la virosis del achaparramiento de la alfalfa (*Medicago sativa L.*) en dos ambientes contrastantes de Argentina. *Agriscientia*, 34: 69-81.
- Oldfield. J. E., Bahn. A. V., Bickoff, E. M., Kohler, G. O. (1966). Coumestrol in alfalfa as a factor in growth and Carcass Quality in Lambs. *J. Anim. Sci.* 25: 167-174.
- Pace, V., Contò, G., Carfi, F., Chiariotti, A., Catillo, G. (2011). Short- and long-term effects of low estrogenic subterranean clover on ewe reproductive performance. *Small Rumin. Res.* 97: 94-100.
- Pallas, V., Garcia, J. A. (2011). How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. *J. Gen. Virol.* 92: 2691-2705.
- Pettersson, H., Kiessling, K. (1984). Liquid chromatographic determination of the plant estrogens coumestrol and isoflavones in animal feed. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 67: 503-506.
- Pérez-Rivero, J. J., Aguilar-Setién. A., Martínez-Maya. J. J., Pérez-Martínez. M., Serrano. H. (2007). Fitoestrógenos y el efecto de su consumo en diferentes órganos y sistemas de animales domésticos en el Sitio Argentino de Producción Animal. 1-7. <http://www.produccion-animal.com.ar/> Consultado 20/02/2019.

- Pierik, R., Ballaré, L., Dicke, M. (2014). Ecology of plants volatiles: taking a plant community perspective. *Plant. Cell Environ.* 37: 1845-1853.
- Qiang, H., Chen, Z., Zhang, Z., Wang, X., Gao, H., Wang, Z. (2015). Molecular diversity and population structure of a worldwide collection of cultivated tetraploid alfalfa (*Medicago sativa subsp. sativa* L.) germplasm as revealed by microsatellite markers. *PLoS One* 10: 1-12.
- Rafinska, K., Pomastowska, P., Wronaa, O., Górecki, R., Buszewska, B. (2017). *Medicago sativa* as a source of secondary metabolites for agriculture and pharmaceutical industry. *Phytochem. Lett. J.*: 20: 520-539.
- Retana-Márquez, S., Hernández, H., Flores, J. A., Muñoz-Gutiérrez, M., Duarte, G., Fitz-Rodríguez, G., Vielma, J., Fitz-Rodríguez, G., Fernández, I. G., Keller, M., Delgadillo, J. A. (2012). Efectos de los fitoestrógenos en la fisiología reproductiva de los mamíferos. *Trop. Subtrop. Agroecosystems.* 15: 129-145.
- Reed, K. F. M. (2016). Fertility of Herbivores consuming phytoestrogen-containing *Medicago* and *Trifolium Spp.* *Agriculture* 6, 35: 1-29
- Rodríguez, F., Almeida, I., Sarmiento, B., Amaral, M. H., Oliveira, M. B. P. P. (2014). Study of the isoflavone content of different extracts of *Medicago spp.* as potential active ingredient. *Ind. Crops Prod.* 57: 110-115.
- Rodríguez, N., Spada, M. C. (2007). Morfología de la alfalfa. En: Basigalup. D. H. (Ed.) pp. 29-43. El cultivo de la alfalfa en la Argentina. Córdoba. Argentina. Ed. INTA.
- Rodríguez Sardiña, J., Novales Lafarga, J. (1973). Una virosis de alfalfa con producción de "Enations". *An. INIA/ Ser. Prot. Veg.* N°3.
- Romero-R., C. M., Tarrago Castellanos, Ma. Del R., Muñoz Mendoza, R., Reyes, A., Rosado García, A. (1997). Síndrome estrogénico en vacas lecheras por consumo de alfalfas con grandes cantidades de coumestrol. *Vet. Mex.* 28: 25-30.
- Roossinck, M. J. (2015). Review Plants, viruses and the environment: Ecology and mutualism. *Virology* 479-480: 271-277. Disponible en <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.041> Consultado el 21/5/2018.
- Roumagnac, P., Granier, M., Bernardo, P., Deshoux, M., Ferdinand, R., Galzi, S., Fernandez, E., Julian, C., Abt, I., Filloux, D., Mesléard, F., Varsani, A., Blanc, S., Martin, D. P., Peterschmitt, M. (2015). Alfalfa leaf lurl virus: an aphid-transmitted geminivirus. *J. Virol.* 89: 9683-9688.
- Ryalls, J. M. W, Riegler, M., Moore, B. D., Johnson, S. N. (2013). Review article; biology and trophic interactions of lucerne aphids. *Agric. Forest Entomol.* 15: 335-350.

- Ryalls, J. M. W., Moore, B. D., Riegler, M., Bromfield, L. M., Hall, Johnson, S. N. (2017). Climate and atmospheric change impacts on sap-feeding herbivores: a mechanistic explanation based on functional groups of primary metabolites *Funct Ecol.* 31: 161-171.
- Samarfard, S., Bejerman, N. E., Dietzgen, R F. (2018). Distribution and genetic variability of alfalfa dwarf virus, a cytorhabdovirus associated with alfalfa dwarf disease in Argentina. *Virus Genes.* 54: 612-615.
- Sardiña, C. (2018). Una mirada a la utilización del cultivo de alfalfa disponible en <https://www.forrateg.com.ar/manuales/pdfs/93-20160108152716-pdfEs.pdf>. Consultado el 21/5/2018.
- Sherwood, R. T., Olah, A. F., Oleson, W. H., Jones, E. E. (1970). Effect of disease and injury on accumulation of a flavonoid estrogen coumestrol in alfalfa. *Phytopathology.* 60: 684-688.
- Shi, S., Nan, L., Smith, K. F. (2017). The current status, problems, and prospects of alfalfa (*Medicago sativa* L.) breeding in china. *Agronomy* . 7, 1.
- Schreinemachers, P., Balasubramaniam, S., Boopathi, N.M., Ha, C.V., Kenyon, L., Praneetvatakul, S. (2015). Farmers' perceptions and management of plant viruses in vegetables and legumes in tropical and subtropical Asia. *Crop Protect.* 75: 115-123.
- Seguin, P., Zheng, W., Souleimanov, A. (2004). Alfalfa phytoestrogen content: Impact of plant maturity and herbage components. *J. Agr. Crop Sci.* 190: 211-217.
- Sepúlveda-Jiménez, G. (2004). La Participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Rev. Mex. Fitopatol.* 21: 355-363.
- Silva, L. R., Pereira, M J., Azevedo, J., Gonçalves, R F., Valentão, P., Guedes, De Pinho, P., Andrade, P B. (2013). *Glycine max* (L.) Merr., *Vigna radiata* L. and *Medicago sativa* L. sprouts : A natural source of bioactive compounds. *Food Res. Int.* 50: 167-175.
- Silva, E. C., Abhayawardhana, A. V., Lygin, C. L., Robertson, M., Liu, Z., Schneider, R. W. (2018). Coumestrol confers partial resistance in soybean plants against *Cercospora* leaf blight. *Phytopath.* 108: 935-947.
- Spada, M. D. C., Guzmán, C., Tablada, M. (2007). Desarrollo fenológico de cultivares de alfalfa creciendo bajo niveles contrastantes de humedad del suelo en Córdoba, Argentina. APPA - ALPA - Cusco, Perú en el Sitio Argentino de Producción Animal <http://www.produccion-animal.com.ar/> Consultado 20/02/2019
- Surh, J., Kim, M-J., Koh, E., Kim, Y-K. L., Kwon, H. (2006). Estimated intakes of isoflavones and coumestrol in Korean population. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 57: 325-344.
- Taujenis, L., Padaruskas, A., Cesevičienė, J., Lemežienė, N. Butkutė, B. (2016). Determination of coumestrol in lucerne by ultra-high pressure liquid chromatography – mass spectrometry. *Chemija* 27: 60-64.
- Traful PV INTA. (2011). Legajo de inscripción, RNC y RNPC. INASE, Argentina.

- Trucco, V. M., de Breuil, S., Bejerman, N., Lenardon, S., Giolitti, F. (2014). Complete nucleotide sequence of *Alfalfa mosaic virus* isolated from alfalfa (*Medicago sativa* L.) in Argentina. *Virus Genes* 48: 562-565.
- Trucco, V., de Breuil, S., Bejerman, N., Lenardon, S., Giolitti, F. (2016). *Bean leafroll virus* (BLRV) in Argentina: molecular characterization and detection in alfalfa fields. *Eur. J. Plant Pathol.* 1-6.
- Trucco, V.M. Bejerman, N., de Breuil, S., Lenardon, S., Giolitti, F. (2017). Efecto del achaparramiento y virus asociados en la producción de semillas de alfalfa. p394. 4° Congreso Argentino de Fitopatología. 19-21/04/17, Mendoza, Argentina.
- Trucco, V.M., Bejerman, N., de Breuil, S., Cabrera Mederos, D., Lenardon, S., Giolitti, F. (2018). *Alfalfa dwarf disease*, a viral complex affecting alfalfa crop in Argentina. p84-85. Second world alfalfa congress, 11-14/11/18, Córdoba, Argentina
- Urrets Zavalía, G. (2018) disponible en <https://todoalfalfa.com.ar/2018/05/07/los-rollos-seguiran-ocupando-un-papel-central-en-la-oferta-alfalfera-argentina/>. Consultado el 3/7/2018.
- Verveke, G., Molemberghs, G. (2000). Linear mixed models for longitudinal data Springer Verlag New York.
- Wang, C-C. (2002). Review of the methods used in the determination of phytoestrogens. *J. Chromatogr.* 777: 3-28.
- West, B., Welch, K., Galeky, A. (2007). Linear mixed models: A practical guide using statistical software, Chapman & Hall / CRC.
- Whitfield, A. E., Falk, B. W., Rotenberg, D. (2015). Insect vector-mediated transmission of plant viruses. *Virology* 479-480: 278-289. <http://dx.doi.org/10.1016/-j.virol.2015.03.026>
- Wink, M. (1988). Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theor. Appl. Genet.* 75: 225-233. Disponible en <https://doi.org/10.1007/BF00303957>.
- Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 64: 3-19.
- Wink, M. (2013). Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae). *South African J. Bot.* 89: 164-175.
- Wink, M. (2015). Modes of action of herbal medicines and plant secondary metabolites. *Medicines* 2: 251-286.
- Wink, M. (2018). Plant secondary metabolites modulate insect behavior-steps toward addiction ?. *Front. Physiol.* 9, 1-9.
- Yada, S. A. (1984). *Determination of some phytoestrogens in alfalfa sprouts*. Master of Science. The Faculty of Graduate Studies. The University of British Columbia. Pp: 100.