

Universida\_deVigo

Celina Inés Borrajo Martone. TESE DE DOUTORAMENTO.  
*Estudio ecofisiológico de poblaciones de Elymus spp., en  
respuesta al estrés hídrico y salino. 2022.*

Universida\_deVigo

TESE DE DOUTORAMENTO

*Estudio ecofisiológico de poblaciones de Elymus spp.,  
en respuesta al estrés hídrico y salino.*

Celina Inés Borrajo Martone

2022

Universida\_deVigo

EIDO  
Escola Internacional  
de Doutoramento



Universidade de Vigo

Escola Internacional de Doutoramento

**Celina Inés Borrajo Martone**

TESE DE DOUTORAMENTO

**“Estudio ecofisiológico de poblaciones de *Elymus* spp.,  
en respuesta al estrés hídrico y salino”**

Dirixida por

Dr. Manuel J. Reigosa Roger

Dra. Adela M. Sánchez Moreiras

2022

Universidade de Vigo



# Universidade de Vigo

Escola Internacional de Doutoramento

A Dra. Adela M. Sánchez Moreiras e o Dr. Manuel J. Reigosa Roger

FAN CONSTAR que o presente traballo, titulado “**Estudio ecofisiológico de poblaciones de Elymus spp., en respuesta al estrés hídrico y salino**”, que presenta Celina Inés Borrajo Martone para a obtención do título de Doutora, foi elaborado baixo a súa dirección no programa de doutoramento “Ecosistemas Terrestres, Usos Sustentables e Implicacións Ambientais”.

Vigo, 25 de Agosto de 2022

Os Directores da tese de doutoramento



## **AGRADECIMIENTOS**

A mi gran familia Argentina y Española por estar siempre.

A Pachi por confiar en mí y por abrirme las puertas para estudiar en la Universidad de Vigo.

A Adela por su apoyo constante, pero sobre todo por su amistad.

A todos los abundantes y variados integrantes permanentes y transitorios del grupo de Ecofisiología vegetal, por su ayuda y por el tiempo compartido entre muestreos y clases. En especial a Raúl y a Carlos.



## ABREVIATURAS

<b>Sigla en castellano</b>	<b>Sigla en ingles</b>	<b>Variable o caracter registrado</b>
A	A	Tasa fotosintética neta
AFE	SLA	Área foliar específica
Altura	Height	Altura de planta
AnchoH	LWidth o LeafW	Ancho de la hoja
AreaH	LArea ó LeafA	Área de la hoja
BAL	BAL	Banco Activo de Germoplasma de la Est. Exp. Agropecuaria Balcarce, INTA Argentina.
BCA	BCA	Diseños en bloques completos al azar.
BHoja	LeafB	Biomasa verde de hoja
BMuerta	DeadB	Biomasa muerta o senescente
BTallo	StemB	Biomasa verde de tallo
BTotál	TotalB o DM	Biomasa aérea total como materia seca
BVerde	GreenB	Biomasa verde
CC	CC	Capacidad de campo de la maceta
CE	EC	Conductividad eléctrica del suelo
CH <sub>4</sub>	CH <sub>4</sub>	Metano
CHR	LWC o RWC	Contenido hídrico relativo foliar
Cl <sup>-</sup>	Cl <sup>-</sup>	Cloro
CO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
Densidad	Density	Número de macollos o hijuelos por planta o maceta.
DMS	LSD	Test de diferencia mínima significativa
ee	ee	Error estándar de la media.
EH	WS ó WL	Niveles de estrés hídrico o sequía
EH_35d	-	Ensayo de estrés hídrico de 35 días.
EHxES_90d	-	Ensayo de estrés hídrico y salino combinado de 90 días.
ES	SS ó Salt	Niveles de estrés salino
ES_40d	-	Ensayo de estrés salino de 40 días.
ES_85d	-	Ensayo de estrés salino de 85 días.
Espiga%	Spike% ó Flower %	Porcentaje de macollos espigados

ETA	ETAccu o ETA	Evapotranspiración acumulada
EUA	WUE	Eficiencia en el uso del agua
FAO	FAO	Food and Agriculture Organization / Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
GEI	-	Gases con efecto invernadero
GOGAT	GOGAT	Enzima glutamato sintasa
GS	GS	Enzima glutamina sintetasa
INTA	INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria de la República Argentina
IPCC	IPCC	Intergovernmental Panel on Climate Change/ Panel Intergubernamental sobre Cambio Climático
ISTA	ISTA	International Seed Testing Association/ Asociación Internacional de Análisis de Semillas
K <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Potasio
LargoH	LLength	Largo de la hoja
LHMac	LeafT	Longitud foliar verde por macollo
MF	FM	Biomasa aérea total como materia fresca
Muerta%	Dead%	Porcentaje de biomasa muerta
N	N	Nitrógeno
Na <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	Sodio
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>	Relación Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>
NHoja	LeafN	Número de hojas por macollo
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Amonio
NiR	NiR	Enzimas nitrito reductasa
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrato
N <sub>2</sub> O	N <sub>2</sub> O	Óxido nitroso
NR	NR	Enzimas nitrato reductasa
PMac	TillerW	Peso del macollo
pl	pl	Planta.
Pobla	Popu	Poblaciones de agropiro alargado
Prolina	Proline	Prolina libre
ProRel	ProRel	Contenido Relativo de Prolina
Proteína	Protein	Proteína soluble



TAH	LAR	Tasa de aparición de hojas
TEF	LER	Tasa de elongación, foliar
TSF	LSR	Tasa de senescencia foliar
VMF	-	Vida media foliar
$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	Isotopo estable de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$
$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{15}\text{N}$	Isotopo estable de $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$



# ÍNDICE

RESUMEN .....	13
INTRODUCCIÓN .....	19
HIPOTESIS Y OBJETIVOS .....	39
PLANIFICACIÓN DE ENSAYOS.....	43
ESTRÉS HÍDRICO .....	49
ESTRÉS SALINO .....	73
ESTRÉS HÍDRICO Y SALINO .....	95
VARIABLES QUE EXPLICAN LA TOLERANCIA AL ESTRÉS.....	131
CONCLUSIONES GENERALES.....	145
BIBLIOGRAFÍA .....	149
ANEXOS .....	161



## RESUMEN

*Elymus elongatus* (Host) Runemark subsp. *ponticus* (Podp.) Melderis [sinónimo de *Thinopyrum ponticum* (Podp.) Barkworth y D.R. Dewey] es una gramínea perenne C3, nativa de los hábitats secos o salinos del sudeste europeo, conocida con el nombre común de “Agropiro alargado” o en lengua inglesa “tall wheatgrass”. Agropiro alargado muestra una gran adaptación a suelos marginales con problemas de salinidad y/o alcalinidad en climas templado húmedos a semiáridos. Por ello, el principal uso es como forrajera en ambientes con limitaciones climato-edáficas, siendo la pastura más importante en los sistemas de cría de ganado vacuno que se realiza sobre suelos hidro-halomórficos de la Cuenca del Salado en Argentina. Además, agropiro alargado posee un gran potencial como fitorremediadora, biocombustible y, dado su parentesco con el trigo, como donadora de genes de tolerancia al estrés biótico y abiótico.

Los sistemas productivos agro-ganaderos se ven afectados por el cambio climático. El cambio climático trae aparejado déficit hídrico con mayor frecuencia e intensidad, así como un incremento en la salinización de tierras y la desertificación. El déficit hídrico, provocado tanto por sequía como por salinidad, ocasiona diferentes respuestas en la planta según la especie, el genotipo y el estado fenológico, las cuales pueden ser modificadas dependiendo de la intensidad y duración del estrés. En gramíneas, la primera fase del estrés por sequía o salinidad ocasiona estrés osmótico en la planta, la cual responde con el cierre de estomas, limitando la transpiración, el intercambio de gases y la fotosíntesis, causando una menor elongación y división celular que determina la reducción de la tasa de elongación foliar (TEF). En caso de que el estrés hídrico y/o salino persista, se registra una reducción más importante en el follaje a través de cambios en la anatomía celular, resultando en hojas más pequeñas y gruesas (menor área foliar específica, AFE), acompañadas por una reducción en la aparición de hojas (TAH) y macollos. Estas respuestas están asociadas a cambios en la relación hídrica de las células, y no a la toxicidad de las sales. Las plantas activan mecanismos para recuperar el equilibrio osmótico con solutos inorgánicos y orgánicos, así como para controlar el estrés oxidativo, lo que define su adaptación a las condiciones de sequía y salinidad. En algunas especies, la acumulación de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  secuestrados en la vacuola celular puede contribuir a restablecer el balance osmótico celular, junto con una acumulación de  $\text{K}^+$  y de solutos orgánicos en el citoplasma, como la prolina, que ayudan a equilibrar la presión osmótica de los iones en la vacuola y a incrementar el potencial osmótico celular.

En una segunda fase, cuando las altas concentraciones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  superan la capacidad de la célula para compartimentalizar estos iones en la vacuola, la salinidad puede producir desequilibrio nutricional y toxicidad en la planta. Ambos tipos de estrés, hídrico y salino, pueden inducir la senescencia prematura de las hojas adultas, incrementando la tasa de senescencia foliar (TSF), si bien este proceso se da de forma anticipada en caso de estrés salino, por ser en las hojas adultas donde la transpiración ha acumulado  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  durante más tiempo. Finalmente, si el estrés hídrico o salino se prolonga durante meses, puede verse afectado el estado reproductivo e incluso la supervivencia de la planta. La respuesta de la planta se traduce en cambios en el crecimiento, desarrollo, morfología, fisiología y adaptaciones celulares; siendo clave los mecanismos de ajuste osmótico para superar el estrés, con la prolina como principal soluto gracias a sus funciones de osmoprotección y de osmoregulación. El desequilibrio nutricional debido a las altas concentraciones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , se observa especialmente en la

absorción y/o asimilación de potasio y nitrógeno, siendo también importantes las relaciones entre nutrientes, como es el caso de la relación  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ .

En forrajeras perennes, la identificación de fenotipos tolerantes al estrés hídrico o salino en función de sus características agronómicas y fisiológicas sigue siendo una tarea compleja y costosa, que necesita ser evaluada a lo largo de varios años. Por ello, se siguen buscando caracteres indicadores más simples y con alta heredabilidad para valorar la tolerancia al estrés. En este contexto, la composición de los isótopos estables de carbono  $^{12}\text{C}$   $^{13}\text{C}$  ( $\delta^{13}\text{C}$ ) y de nitrógeno  $^{14}\text{N}$ ,  $^{15}\text{N}$  ( $\delta^{15}\text{N}$ ) aparecen como una posibilidad interesante, ya utilizada en cereales. El isótopo  $\delta^{13}\text{C}$  proporciona información sobre la eficiencia de la transpiración a largo plazo y se ha correlacionado con el rendimiento y la tolerancia al estrés hídrico y/o salino en gramíneas C3. Además, en diferentes estudios sobre cereales,  $\delta^{13}\text{C}$  ha demostrado ser un carácter altamente hereditario. Así mismo, la concentración de N puede verse reducida por el déficit hídrico del suelo, generado tanto por situaciones de sequía como de salinidad, debido a limitaciones en la absorción y la asimilación. El metabolismo del nitrógeno está directamente asociado con el isótopo de  $\delta^{15}\text{N}$ , y ha sido utilizado para diferenciar genotipos tolerantes y susceptibles a la sequía y/o la salinidad en gramíneas anuales.

El cambio climático, así como el aumento de la sequía, asociado o no al mismo, y la salinización de las tierras, imponen importantes limitaciones a los sistemas productivos agropecuarios. Por ello, los programas de mejoramiento de forrajes buscan urgentemente incrementar la producción de biomasa aérea, así como la tolerancia a la sequía y la salinidad. Las especies silvestres son recursos extremadamente ricos en variabilidad genética, que no están disponibles en el acervo genético cultivado, y que podrían ayudar a mejorar la productividad de los cultivos y la sostenibilidad ambiental, siendo importante estudiar el comportamiento de la especie y la variación intraespecífica existente para poder seleccionar de forma efectiva el mejor germoplasma en función de las limitaciones ambientales en las que será cultivado.

En consecuencia, en esta Tesis de Doctorado se ha propuesto la siguiente hipótesis de trabajo: “En poblaciones de agropiro alargado que provienen de orígenes ambientales que contrastan en sus características climato-edáficas, existen diferentes comportamientos en los caracteres morfológicos, fisiológicos, bioquímicos e isotópicos que determinan distintas estrategias de crecimiento y/o mecanismos fisiológicos para tolerar el estrés hídrico y salino”.

Para la validación de esta hipótesis se planteó el siguiente objetivo de estudio: Comprender el comportamiento de distintas poblaciones de agropiro alargado en respuesta al estrés hídrico, salino y combinado, para detectar características morfológicas, agronómicas, fisiológicas, bioquímicas y/o isotópicas que permitan seleccionar el germoplasma con mayor tolerancia al estrés hídrico y/o salino. En consecuencia, esta Tesis Doctoral puede aportar nuevos conocimientos sobre las estrategias de crecimiento y los mecanismos fisiológicos que determinan la tolerancia al estrés hídrico, salino y combinado en agropiro alargado, así como sobre las variables más efectivas para diferenciar el germoplasma más adaptado al estrés. Estos conocimientos podrían ayudar a seleccionar el germoplasma más adecuado para expandir la producción de cultivos según su uso en diferentes ambientes ante el cambio climático imperante.

Para dar respuesta a la hipótesis planteada en esta Tesis Doctoral se desarrollaron cuatro ensayos, uno evaluando la respuesta al estrés hídrico durante 35 días (SH\_35d), otros dos frente al estrés salino con diferente duración, 40 y 85 días (ES\_40d y ES\_85d); y uno más, combinando el estrés hídrico y salino durante 90 días (EHxES\_90d). En todos los ensayos fue utilizado un diseño en bloques completos al azar (BCA) con un arreglo factorial en los tratamientos. Los factores corresponden a las poblaciones de agropiro naturalizadas (Pobla), y a los tratamientos de estrés hídrico (EH) y/o de estrés salino (ES). En todos los casos se realizó un análisis de la varianza y una comparación de medias con la prueba de DMS, considerando una probabilidad de 0,05% y utilizando el paquete estadístico SAS. En la elección del germoplasma se tuvieron en cuenta los orígenes ambientales más extremos y la disponibilidad de semillas en el banco de germoplasma BAL-INTA, siendo seleccionadas para esta Tesis de Doctorado cuatro poblaciones naturalizadas denominadas Pobla: P3, P4, P5 y P9. Las poblaciones P3 y P9 provienen de ambientes con clima templado húmedo que difieren en el tipo de suelo, ya que P3 viene de un suelo no salino ni alcalino, mientras que P9 proviene de un suelo salino-alcalino. Las otras dos poblaciones, P4 y P5, provienen de ambientes con clima semiárido y diferente suelo, salino-alcalino en el caso de P4 y suelo no salino-ni alcalino para P5. Las plantas de agropiro alargado evaluadas fueron obtenidas a partir de semillas germinadas y trasplantadas a macetas en un invernadero del Campus Lagoas-Marcosende de la Universidade de Vigo (España), donde se desarrollaron los experimentos.

En el primer experimento de estrés hídrico (EH\_35d) fueron evaluadas características morfofisiológicas en las cuatro poblaciones (P3, P4, P5, P9) bajo tres condiciones de estrés hídrico: leve, moderado y severo (100% -50% -30% de la capacidad de campo de las macetas, respectivamente), en invernadero y con plantas en estado vegetativo (macollaje) durante 35 días, empleándose 3 repeticiones. Las variables registradas fueron la producción de materia seca (MS), los caracteres morfogénéticos y estructurales del canopeo, como largo, ancho y área de las hojas, área foliar específica (AFE), peso (Pmac) y número de macollos (densidad, en 4 tiempos de medida), evapotranspiración acumulada (ETA), eficiencia en el uso del agua (EUA), contenido hídrico relativo foliar (CHR), y concentración de prolina libre y de proteínas foliares. Los resultados mostraron interacción entre las poblaciones y las condiciones hídricas solo en la producción de materia seca y el número de macollos. Los cambios más relevantes en los parámetros morfofisiológicos comparando la intensidad del estrés hídrico fueron la reducción de la producción de materia seca, el menor tamaño de hojas y macollos, junto con un menor número de macollos, conjuntamente con un mayor contenido de prolina y proteína, una mayor eficiencia en el uso del agua y una ligera disminución en el contenido de agua foliar. Las poblaciones difirieron en las estrategias de crecimiento (ancho y área foliar, y Pmac) y mecanismos morfofisiológicos (CHR, EUA, prolina y proteína) para sobrevivir al estrés hídrico, lo que podría estar relacionado con su hábitat de origen. La población P3, destacó en situaciones de estrés leve a moderado, presentando mayor biomasa, con hojas y macollos de mayor tamaño, con un mayor CHR y una EUA intermedia, así como altos valores de proteínas foliares. Mientras, P5 presentó una alta densidad de macollos y la EUA más elevada, con valores intermedios de proteína foliar, produciendo más biomasa en estrés severo y moderado. El estudio muestra que la estabilidad en la producción de materia seca en los niveles de estrés hídrico, podría estar relacionada con mecanismos que logren altos valores de proteína foliar y EUA, además de mantener una alta densidad de macollos como estrategia de crecimiento.

El estrés salino fue analizado en el segundo y tercer experimento con diferente duración, 40 días otoñales y 85 días primaverales (ES\_40d y ES\_85d, respectivamente). En ambos ensayos, las poblaciones (P3, P4, P5, P9) fueron evaluadas frente a cinco niveles de salinidad, regando con soluciones salinas preparadas con diluciones de cloruro sódico en agua a concentraciones de 0; 0,1; 0,2; 0,3 y 0,4 M de NaCl. En ES\_40d fueron registradas variables morfogénicas, estructurales, productivas y fisiológicas en plantas en estado vegetativo, utilizando siete repeticiones; mientras que, en el experimento de mayor duración, ES\_85d, fueron registradas variables estructurales, productivas, fisiológicas, bioquímicas e isotópicas en las plantas en estado vegetativo-reproductivo con cinco repeticiones. En general, se observó que el incremento en salinidad redujo la tasa fotosintética neta, el crecimiento (menores valores de TEF, TAH, tamaño foliar, densidad y peso de macollos) y el desarrollo (reducción en el %floración), aumentando la senescencia (mayores valores de TSF, necromasa), conjuntamente con el incremento en la acumulación de iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y el aumento exponencial en el contenido de prolina. La prolina, el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{Cl}^-$  parecían funcionar sistemáticamente como agentes osmóticos, permitiendo el mantenimiento del agua en los tejidos para continuar la actividad fotosintética, con incrementos en  $\delta^{13}\text{C}$  y reducciones en  $\delta^{15}\text{N}$ . Las hojas aumentaron la concentración de N (ES\_85d) y proteína (ES\_40d), discriminando más  $\delta^{15}\text{N}$  a mayor salinidad, lo cual indicaría que el metabolismo del nitrógeno no es una limitante para el crecimiento. Las poblaciones mostraron un comportamiento diferente en las variables registradas. La población P5 mostró la mayor biomasa en el experimento de 85 días, presentando la mayor longitud foliar y densidad de macollos, conjuntamente con la mayor eficiencia en el uso del agua y valores de isótopo  $\delta^{13}\text{C}$ ; y la menor concentración de  $\text{Cl}^-$  y tasa de evapotranspiración. Sin embargo, P5 mostró la biomasa más baja en el experimento de 40 días, donde destacó la población P3, con el mayor ancho foliar y AFE. Estos comportamientos intraespecíficos sugieren que la duración del estrés es un aspecto importante a considerar al seleccionar el germoplasma para su tolerancia a la salinidad.

En el cuarto experimento de estrés hídrico y salino combinado (EHxES\_90d) fueron evaluadas las poblaciones (P3, P4, P5, P9) sometidas a tres condiciones de estrés hídrico: leve, moderado y severo (100% -50% -30% de la capacidad de campo de las macetas), y tres condiciones de estrés salino: ausente, moderado y severo (regando con soluciones acuosas de 0; 0,1; y 0,3 M NaCl). Para conocer la respuesta al estrés combinado entre las poblaciones se registraron caracteres estructurales, productivos, fisiológicos, bioquímicos e isotópicos en las plantas en estado vegetativo-reproductivo, con cinco repeticiones durante 90 días primaverales-estivales. La mayoría de las variables mostraron interacción entre el estrés hídrico y salino, y ausencia de interacción con las poblaciones. La tasa fotosintética neta se redujo con el tiempo y el estrés hídrico y salino. A mayor estrés hídrico y salino disminuyeron la biomasa total y del tallo, las espigas y la altura de planta, así como la evapotranspiración, mientras que la senescencia de tejidos, el  $\delta^{13}\text{C}$  y la prolina aumentaron, con registros extremos entre el control y el máximo estrés combinado. Por otro lado, la concentración de N y  $\text{K}^+$  foliar aumentaron ante el estrés hídrico en cada condición salina, determinando una disminución de la relación  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  a mayor estrés. Las variables estructurales como longitud foliar y densidad de macollos, así como la eficiencia en el uso del agua, presentaron valores superiores al control en algunas combinaciones de estrés hídrico y/o salino leve o moderado. En cambio, la biomasa foliar, AFE y CHR aumentaron con estrés hídrico o salino, pero sin presentar interacción, mientras que solo



se vieron afectados por el estrés salino la concentración foliar de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , que aumentaron, y el  $\delta^{15}\text{N}$ , que disminuyó a mayor salinidad. La estrategia para atenuar el estrés estaría relacionada con una menor evapotranspiración, cierre estomático (mayor  $\delta^{13}\text{C}$ ), mayor senescencia foliar y menor desarrollo reproductivo (menor biomasa de tallos, %espigas y altura de la planta). Los mecanismos para mantener el potencial osmótico celular frente al estrés estarían relacionados con el incremento en el K foliar, especialmente ante estrés hídrico, y el aumento en la concentración de foliar de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{Cl}^-$ , particularmente frente a estrés salino, en tanto el incremento exponencial en prolina funcionaria en ambos estreses como osmoregulator y osmoprotector. Las poblaciones mostraron diferencias en las variables estructurales del canopeo y la biomasa producida (total, verde, tallo y muerta), destacándose P3 y P9 por un mayor desarrollo reproductivo a través de una mayor biomasa de tallo, %espigas y altura de la planta, pero con menor densidad de macollos; contrariamente a P4 y P5. Las poblaciones P4 y P5, que provienen de ambientes con mayor estrés, presentaron la menor evapotranspiración, aunque tendrían diferentes estrategias para controlar la transpiración, ya que P4 mostró la mayor proporción de biomasa muerta limitando la biomasa foliar fotosintéticamente activa, mientras que P5 presentó el mayor  $\delta^{13}\text{C}$  y la más alta eficiencia en el uso del agua, con la mayor biomasa foliar y producción de materia seca total ante estrés hídrico y salino. La población P3 mostró valores intermedios de biomasa total y, notoriamente P5 y P3 que provienen de ambientes no salinos, mostraron la menor relación  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , pudiendo relacionarse con un mejor funcionamiento metabólico. La biomasa producida se relacionó positivamente con la EUA y la  $\delta^{13}\text{C}$ . Además,  $\delta^{13}\text{C}$  presentó una alta heredabilidad en sentido amplio, seguida de las variables estructurales del canopeo, mientras que la relación  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  fue intermedia. Por ello, el uso combinado de los caracteres  $\delta^{13}\text{C}$  y la relación  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , podría ser útil para la selección de germoplasma por mayor producción y tolerancia al estrés hídrico y salino. Además, consideramos que las variables estructurales del canopeo podrían ayudar a elegir el fenotipo ideal según el sistema productivo donde será utilizado, siendo para pastoreo más conveniente una planta con mayor desarrollo vegetativo que priorice el macollaje (ej: P5), mientras que para la producción de henos o fardos sería mejor una planta con mayor desarrollo reproductivo y más erecta (ej: P3).

Los caracteres registrados en cada experimento fueron analizados con regresión lineal múltiple para encontrar cuáles explicaban mejor la biomasa producida en cada situación de estrés hídrico y/o salino. Las comparaciones de los modelos de regresión obtenidos mostraron que la producción de biomasa aérea estaba determinada principalmente por caracteres relacionados con el estado hídrico de la planta (ETA, CHR, EUA), así como con los caracteres relacionados con la estructura del canopeo (tamaño y número de hojas y / o macollos), siendo más evidente en los ensayos de menor duración, tanto de estrés hídrico (EH\_35d) como de estrés salino (ES\_40d). Estos caracteres también fueron importantes para explicar la biomasa total frente a estrés hídrico y salino combinados (EHxES\_90d). Sin embargo, en los ensayos de mayor duración, tanto de estrés salino (ES\_85d) como de estrés combinado (EHxES\_90d), la concentración de prolina fue el principal carácter para explicar la biomasa producida, seguida de la tasa fotosintética neta registrada al final de ambos ensayos. Sin embargo, al comparar el germoplasma en los diferentes ensayos fue el isótopo de  $\delta^{13}\text{C}$  la variable más importante para detectar diferencias intraespecíficas en los ensayos de mayor duración de estrés salino y combinado hídrico y salino, además de la relación  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  en este último. Estas variables no fueron medidas en los ensayos

de menor duración (EH\_35d y ES\_40d), aunque fueron importantes las variables relacionadas con el estado hídrico de la planta, en especial la eficiencia del uso del agua, caracter con una fuerte relación con  $\delta^{13}\text{C}$  según indican la bibliografía y el presente estudio. Además, en todos los ensayos, las variables estructurales del canopeo fueron las más importantes registradas entre las variables morfométricas, las cuales permitieron diferenciar los fenotipos más tolerantes y productivos, siendo la densidad de macollos el caracter que mejor se relacionó con la estabilidad del rendimiento.

A partir de los experimentos realizados en esta Tesis Doctoral, consideramos que la diversidad y tolerancia del germoplasma de agropiro alargado al estrés hídrico y salino puede ser utilizado para expandir la producción de cultivos en diferentes ambientes ante el cambio climático imperante.

# **INTRODUCCIÓN**

## **INTRODUCCIÓN**

### **1 - CAMBIO CLIMÁTICO Y ESTRÉS EN PLANTAS.**

1.1 - Cambio climático, uso de la tierra y sistemas ganaderos.

1.2 - Dinámica del estrés en plantas.

1.3 - Estrés hídrico y salino.

### **2 - PARÁMETROS DIRECTOS E INDIRECTOS PARA MEDIR EL ESTRÉS.**

2.1 - Producción de biomasa, morfogénesis foliar y estructura del canopeo.

2.2 - Fotosíntesis, isótopos estables de carbono y eficiencia de uso del agua.

2.3 - Conductividad eléctrica, concentración de  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$  y relación  $Na^+/K^+$ .

2.4 - Nitrógeno e isótopo estable de nitrógeno.

2.5 - Prolina libre.

### **3 – ESPECIE EN ESTUDIO: “AGROPIRO ALARGADO”**

3.1 - Características de la especie.

3.2 - Introducción, dispersión y uso en Argentina.

3.3 - Antecedentes de estrés hídrico y/o salino en “Agropiro alargado”.

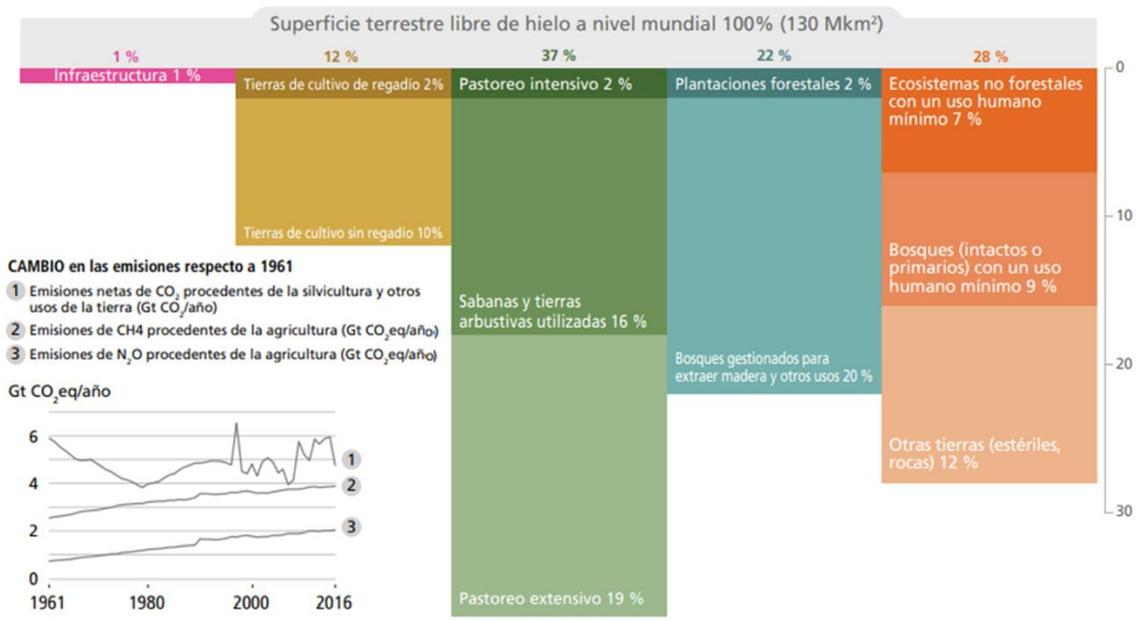
## **INTRODUCCIÓN**

### **1 - CAMBIO CLIMÁTICO Y ESTRÉS EN PLANTAS.**

#### **1.1 - Cambio climático, uso de la tierra y sistemas ganaderos.**

El sistema climático de la Tierra está alimentado por la radiación solar. La energía saliente de la Tierra es emitida principalmente en la fracción infrarroja del espectro, también conocida como radiación de onda larga o radiación térmica. La radiación de onda larga que emite la superficie de la Tierra es absorbida en gran parte por componentes atmosféricos como dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), metano (CH<sub>4</sub>), óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) y otros gases con efecto invernadero (GEI), sumado al vapor de agua y las nubes, que a su vez emiten radiación térmica en todas las direcciones. La radiación de onda larga dirigida hacia abajo suma calor a las capas inferiores de la atmósfera terrestre y a la superficie global tierra-océano provocando el “efecto invernadero” (IPCC, 2013). Determinadas acciones antrópicas aumentan directamente el efecto invernadero al emitir gases como CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, N<sub>2</sub>O y clorofluorocarbonos, e indirectamente al generar otros gases contaminantes (monóxido de carbono, compuestos orgánicos volátiles, los óxidos de nitrógeno y el dióxido de azufre), que alteran la abundancia de gases protectores de la atmósfera como el ozono (IPCC, 2013). El “cambio climático” se define pues como un cambio en el estado del clima que puede identificarse a través de cambios en la media y/o en la variabilidad de sus propiedades, y que persiste por una década o más (IPCC, 2013).

El calentamiento asociado a este fenómeno de cambio climático ha determinado una mayor frecuencia, intensidad y duración de las sequías. El aumento de la temperatura del aire y la evapotranspiración, y la disminución de las precipitaciones en interacción con la variabilidad climática y las actividades humanas, han contribuido a la desertificación (IPCC, 2019). La tierra proporciona la base del sustento y el bienestar humano, incluido el suministro de alimentos, agua dulce y servicios ecosistémicos, así como de la biodiversidad de la flora y la fauna (IPCC, 2019). Los ecosistemas terrestres retienen el carbono en la biomasa viva, en la materia orgánica en descomposición, y en el suelo. El carbono es intercambiado entre los ecosistemas y la atmósfera a través de procesos como la fotosíntesis, la respiración, la descomposición y la combustión. Las actividades humanas alteran el carbono almacenado en esos reservorios y los intercambios entre estos y la atmósfera, debido al uso de las tierras (IPCC, 2000), (Figura 1). Se estima que la agricultura, la silvicultura y otros usos de la tierra son fuente de aproximadamente un 23% de las emisiones antropogénicas de CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O (calculados como equivalentes de CO<sub>2</sub> en 2007-2016, IPCC, 2019).



**Figura 1:** Uso global de la tierra y cambio en las emisiones de gases con efecto invernadero. En el gráfico de barras, cada categoría de uso está ordenado a lo largo de un gradiente decreciente en la intensidad del uso (de izquierda a derecha). Los porcentajes indican la superficie ocupada del total terrestre por categoría. En el gráfico de líneas se muestra el cambio en las emisiones de gases con efecto invernadero en diferentes recursos (los valores están expresados en unidades de CO<sub>2</sub>-eq, N<sub>2</sub>O=265; CH<sub>4</sub> =28), (fuente IPCC, 2019).

Actualmente, el sector ganadero juega un papel clave en el suministro de alimentos y la seguridad alimentaria (Godde et al., 2021). La ganadería aporta el 40% del valor global de la producción agrícola y permite los medios de vida y la seguridad alimentaria de casi mil millones de personas (FAO 2009). El sector ganadero se ve afectado por la degradación de los ecosistemas y se enfrenta a una competencia creciente por los mismos recursos con otros sectores (Godde et al., 2021). Así mismo, el incorrecto manejo ganadero puede contribuir al agotamiento y la degradación de la tierra, del agua y de la biodiversidad, contaminando la atmósfera y contribuyendo al efecto invernadero (FAO 2009; IPCC, 2019; Kuraz et al 2021). La producción ganadera industrializada (confinamiento o “feedlot”) separada de la tierra utilizada para producir alimentos-piensos, da como resultado una gran concentración de residuos de desecho, incrementando los riesgos de contaminación ambiental (Kuraz et al 2021). En cambio, los sistemas ganaderos de pastoreo, o mixtos agrícola-ganadero, tienden a ser sistemas más estables, donde los residuos de un parte de la cadena productiva (estiércol, residuos de cultivos) son utilizados como recursos o insumos para la otra parte (FAO 2009). Los pastizales almacenan aproximadamente un tercio de las reservas mundiales de carbono terrestre y podrían funcionar como un importante sumidero de carbono del suelo dependiendo del manejo del pastoreo y la biodiversidad del suelo (Bai et al., 2022). En los pastizales áridos y semiáridos, donde se encuentra la mayoría de los pastizales del mundo, la variabilidad en los fenómenos climáticos extremos, como olas de calor, sequías, inundaciones o ciclones determinan una importante variabilidad en la disponibilidad de forraje (Godde et al., 2021), provocando un mayor riesgo de que el pastoreo animal ocasione sobrepastoreo, degradación de los recursos naturales, erosión

del suelo, sobreexplotación de las aguas subterráneas y salinización de las tierras (FAO 2009; IPCC, 2019).

Evitar, reducir y revertir la degradación y desertificación mejoraría la fertilidad del suelo, aumentaría la biomasa, beneficiando la productividad agrícola-ganadera y la seguridad alimentaria y al mismo tiempo incrementando el almacenamiento de carbono en los suelos (IPCC, 2019; Viglizzo et al., 2019; Bai et al., 2022). Las especies forrajeras juegan un rol central ante esta situación, dado que estimaciones recientes encontraron que los pastizales sudamericanos manejados en condiciones de pastoreo extensivo (baja carga animal), están secuestrando carbono como materia orgánica del suelo, y que este secuestro de carbono podría compensar las emisiones de gases de efecto invernadero de la producción ganadera (Viglizzo et al., 2019). El almacenamiento de carbono en el suelo de los pastizales es una estrategia alcanzable para eliminarlo de la atmósfera, y estimaciones recientes indican que el 80% de los pastizales europeos están por debajo de la saturación de almacenamiento de carbono, lo que indica un potencial insatisfecho en el secuestro de carbono (Bai et al., 2022). En síntesis, el estrés al que se están viendo sometidas las plantas debido al cambio climático, sumado a el estrés por pastoreo, es múltiple y muy cambiante, teniendo que responder a través de la puesta en marcha de múltiples estrategias de tolerancia y aclimatación que pueden repercutir en una alteración de su capacidad reproductiva, lo que determinará la selección natural y supervivencia de las más tolerantes.

## **1.2 - Dinámica del estrés en plantas.**

El estrés puede definirse como “cualquier factor ambiental potencialmente desfavorable para un organismo vivo” (Levitt, 1980). El estrés vegetal puede describirse a través de la respuesta de las plantas sometidas a condiciones ambientales desfavorables, ya sean causadas por factores antrópicos o por factores naturales, pudiendo estar estos últimos determinados por organismos (estrés biótico) o por factores físicos y/o químicos (estrés abiótico) (Levitt, 1980; Lichtenthaler, 2004). Sin embargo, la respuesta de la planta depende de la intensidad y/o severidad del agente estresante y del tiempo que este actúe (Lichtenthaler, 2004).

La dinámica del estrés en la planta puede dividirse en cuatro fases temporales (Lambers *et al.*, 1998; Lichtenthaler, 2004):

\* **Primera fase de respuesta inmediata o alarma:** cuando comienza el estrés determinando alteraciones en el funcionamiento normal de la planta. En el término de segundos a días, se producen variaciones en determinadas actividades fisiológicas, la desestabilización de estructuras, primando los procesos catabólicos y disminuyendo la vitalidad.

\* **Segunda fase de restitución y aclimatación:** el estrés continúa y la planta responde desplegando mecanismos de resistencia y aclimatación, produciendo la reparación del daño que determinará la reactivación y reajuste morfo-fisiológico para alcanzar la estabilidad, lo cual se produce en un periodo que puede durar desde días hasta meses.

\* **Tercera fase final o de agotamiento:** se produce cuando el estrés es demasiado intenso o prolongado y excede la capacidad de aclimatación. Por ello, la planta inicia procesos de senescencia, daño crónico y muerte celular.

\* **Cuarta fase de regeneración:** se produce la regeneración parcial o total del funcionamiento fisiológico si desaparece el agente estresante, se inhiben los procesos de senescencia y, si el daño no ha sido demasiado intenso, encontrándose nuevos estándares fisiológicos en la planta.

La **aclimatación** está relacionada con la plasticidad fenotípica de la población, y es el cambio fenotípico provocado por el medio ambiente en semanas, meses o años; donde no se modifican los genes que el individuo transmite a su descendencia, pero sí la expresión de dichos genes –*diferente expresión alélica o cambios en las interacciones entre loci*- (Lambers *et al.*, 1998; Pfennig *et al.*, 2010; Song y Chen, 2015).

Mientras que la **adaptación** de las plantas a nuevas condiciones ambientales es una respuesta evolutiva que implica cambios genéticos en las poblaciones y ocurre en una escala temporal mucho mayor que la aclimatación, después de numerosas generaciones de los individuos supervivientes (Lambers *et al.*, 1998).

En general, las plantas en la naturaleza rara vez crecen en “condiciones óptimas fisiológicas”, sino que se ven sometidas constantemente a diversos tipos de estrés en el tiempo y en el espacio, y con frecuencia a estrés simultáneo o estrés múltiple (Chaves y Pereira, 2004), lo que hace que se varíe su óptimo ecológico con respecto a su óptimo fisiológico. Por ejemplo, es frecuente que la salinidad del suelo se produzca junto con condiciones de exceso o déficit hídrico, siendo la respuesta de las plantas variable según la especie (Flowers y Colmer, 2008; Bennett, *et al.* 2009; Bhuiyan, *et al.* 2015; Ludwiczak *et al.* 2021).

### 1.3 - Estrés hídrico y salino

La sequía y la salinidad son los factores ambientales que más limitan la producción vegetal en los sistemas agropecuarios a nivel mundial (Medrano y Flexas, 2004; Willadino y Camara, 2004; Billah, 2021). Debido al cambio climático, se esperan periodos de sequía más largos o leves, pero con mayor frecuencia, los cuales se verán acompañados por un incremento en la salinización de tierras y la necesidad de lograr un uso más eficiente del agua (IPCC, 2013; IPCC, 2019).

El **estrés hídrico** es considerado en ecofisiología como cualquier limitación en el funcionamiento óptimo de las plantas determinado por una inadecuada disponibilidad de agua, lo cual provoca estrés osmótico en la planta (Medrano y Flexas, 2004). Mientras que el **estrés salino** está relacionado con cantidades excesivas de sales solubles en la zona de la raíz que inducen estrés osmótico, desequilibrio de nutrientes y toxicidad iónica en la planta en crecimiento (Munns y Tester, 2008; Flowers y Colmer, 2015).

La sequía y la salinidad comparten el estrés osmótico como factor en común (Bray, 1997; Billah *et al.*, 2021; Ludwiczak *et al.* 2021). En una primera fase, la salinidad del suelo produce estrés osmótico en la planta por el efecto de la sal en la proximidad de las raíces (Munns, 2002). Esto, al igual que en la sequía, determina en cuestión de minutos a horas, una pérdida de volumen y turgencia celular, además del cierre de estomas con la consecuente reducción en la



fotosíntesis y la tasa de elongación celular de hojas y raíces, viéndose alterado el metabolismo del carbono (Munns y Tester 2008; Chaves, et al 2009). La respuesta fotosintética a la sequía y la salinidad es compleja, dado que produce limitaciones a diferentes niveles (célula / hoja) y en diferentes escalas de tiempo según el desarrollo de la planta. La intensidad, duración y tasa de progresión del estrés determinará las respuestas de las plantas y la activación de mecanismos de mitigación relacionados con la aclimatación de las diferentes especies (Chaves et al., 2009; Billah et al., 2021; Ludwiczak et al 2021).

Si el estrés persiste durante varios días, se reduce la expansión y la división celular, determinando una menor tasa de elongación y aparición foliar (TEF y TAH) (van Loo, 1992; Thomas, et al., 1999; Munns, 2002; Taleisnik et al., 2009; Hessini, et al., 2009; Cyriac, et al., 2018; Ludwiczak et al 2021); viéndose el crecimiento aéreo más afectado que el radicular (Munns y Tester, 2008). Estas reacciones están asociadas a cambios en la relación hídrica de las células y no a la toxicidad de las sales (Munns, 2002; Hasegawa, 2013; Ludwiczak et al 2021). Las plantas activan mecanismos para recuperar el equilibrio osmótico con solutos inorgánicos y orgánicos, así como mecanismos para controlar el estrés oxidativo, lo que determina su adaptación a las condiciones de sequía y salinidad (Taleisnik et al., 2009; Hasegawa, 2013; Acosta Motos et al., 2017; Carrizo et al., 2021; Ghafar et al., 2021). La acumulación de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  secuestrados en la vacuola de hojas o raíces puede ayudar a restablecer el balance osmótico por ser solutos inorgánicos de bajo costo energético (Munns, 2002; Hasegawa, 2013), mientras que la acumulación de  $\text{K}^+$  y de solutos orgánicos, especialmente prolina y glicina-betaína, se conectarían en el citoplasma y los orgánulos, equilibrando la presión osmótica de los iones en la vacuola (Munns, 2002; Carillo et al., 2008; Szabados y Savoure, 2010; Acosta Motos et al., 2017; Ghafar et al., 2021). La prolina se acumula en respuesta a distintas situaciones de estrés ambiental y se ha asociado con funciones tanto de osmorregulación como de osmoprotección (Szabados y Savoure, 2010; Acosta Motos et al., 2017; Frimpong et al., 2021; Vasilakoglou et al., 2021; Álvarez et al., 2022).

En una segunda fase, la salinidad puede producir desequilibrio nutricional y toxicidad en la planta, cuando altas concentraciones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  superan la capacidad de la célula para compartimentalizar estos iones en la vacuola (Flowers y Colmer, 2015; Acosta Motos et al., 2017; Geilfus, 2018; Billah et al., 2021). Esto puede observarse al cabo de algunos días con la aparición de lesiones en las hojas adultas, por ser las hojas que han estado transpirando durante más tiempo y acumulan, en consecuencia, más  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  (Munns, 2002; Ondrasek et al., 2021).

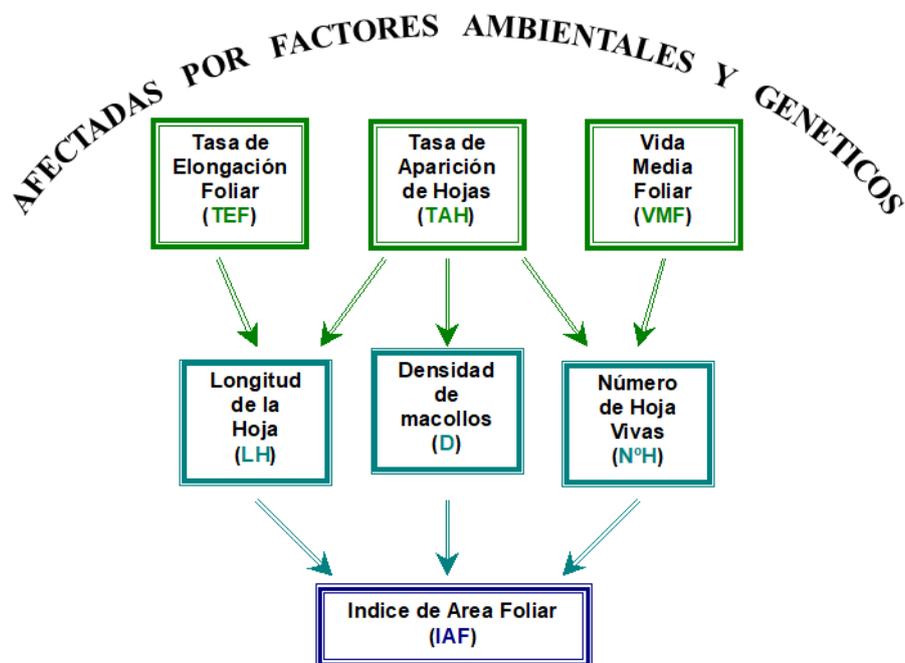
Si el estrés hídrico y salino persiste durante semanas, se registra una reducción en el follaje a través de cambios en la anatomía celular, resultando en hojas más pequeñas y gruesas (menor AFE), acompañado por un menor tamaño y densidad de macollos (van Loo, 1992; Durand, et al., 1997; Turner et al., 2012; Cyriac, et al., 2018; Carrizo et al., 2021). El estrés prolongado inhibe funciones enzimáticas, destruyendo el aparato fotosintético debido a la alta producción de especies reactivas de oxígeno en los fotosistemas, afectando severamente el crecimiento (Ghafar et al., 2021). Además, ambos tipos de estrés pueden inducir la senescencia prematura de hojas adultas, reduciendo la superficie transpirable y favoreciendo la movilización de nutrientes a nuevas hojas en crecimiento (Sade, et al 2018); si bien este proceso se da de forma anticipada frente a estrés salino, debido a que la acumulación de iones tóxicos determina la aparición más temprana de estrés oxidativo (Munns, 2002; Acosta Motos et al., 2017). En

consecuencia, si el estrés hídrico o salino se prolonga durante meses, la supervivencia en gramíneas perennes dependerá de la tasa de senescencia de hojas adultas y de la tasa de crecimiento de las nuevas hojas, dado que el estado reproductivo puede verse afectado, alterando la floración y la producción de semillas, y llegando a morir la planta antes de producir semillas (Munns, 2002; Sade et al., 2018).

## 2 - PARÁMETROS DIRECTOS E INDIRECTOS PARA MEDIR EL ESTRÉS

### 2.1 - Producción de biomasa, morfogénesis foliar y estructura del canopeo.

La tolerancia a la sequía y la salinidad pueden variar según la intensidad y la duración del estrés, así como según el genotipo y el estado fenológico de las plantas (Bray, 1997; Medrano y Flexas, 2004; Munns, 2002; Chaves et al., 2009; Acosta Motos et al., 2017; Ludwiczak et al 2021). Los programas de mejoramiento de forrajes buscan incrementar la producción de biomasa aérea, así como su tolerancia a la sequía y la salinidad. Para ello, es necesario conocer los procesos de crecimiento y desarrollo de gramíneas forrajeras perennes, los cuales pueden ser explicados a través de la morfogénesis foliar (Chapman y Lemaire, 1993; Agnusdei, et al.; 2015; Gastal y Lemaire, 2015; Chapman, 2016; Oliveira et al., 2020). Las características principales de la morfogénesis foliar pueden describirse mediante la tasa de elongación foliar (TEF), la tasa de aparición de hojas (TAH) y la longevidad o duración de vida media foliar (VMF). A su vez, la combinación de estas características morfogenéticas determina la estructura del canopeo, conformado por la densidad de macollos por planta, y el tamaño y número de hojas por macollo (Figura 2); estableciendo la superficie fotosintéticamente activa y con ello la capacidad de intercepción de la radiación, el índice de área foliar y el crecimiento del forraje (Chapman y Lemaire, 1993; Gastal y Lemaire, 2015; Chapman, 2016; Oliveira et al., 2020).



**Figura 2:** Variables morfogenéticas (TEF, TAH, VMF) y estructurales del canopeo (LH, D, N°H) determinantes del índice de área foliar y el crecimiento del forraje en gramíneas perennes (adaptado de Chapman y Lemaire, 1993; Gastal y Lemaire, 2015).

Las variables morfogenéticas se hallan genéticamente determinadas (Chapman y Lemaire, 1993), y se han encontrado diferencias intraespecíficas, así como diferencias debidas al estado de desarrollo de la planta (Borrajo, 1998; Gastal, Bélanger y Lemaire, 1992; Chapman, 2016; Oliveira et al., 2020; Ludwiczak et al 2021). Sin embargo, la expresión genética se ve modificada por factores ambientales como la temperatura, la disponibilidad de nutrientes (Gastal, Bélanger y Lemaire, 1992; Bélanger et al 1992; Chapman y Lemaire, 1993; Borrajo, 1998; Chapman, 2016; Errecart et al 2020), la sequía (van Loo, 1992; Thomas *et al.*, 1999; Cyriac, et al., 2018; Errecart et al 2020; Carrizo et al., 2021) o la salinidad (Munns, 2002; Taleisnik et al., 2009; Ludwiczak et al 2021) e incluso el manejo del forraje (Gastal y Lemaire, 2015; Chapman, 2016; Oliveira et al., 2020), limitando el tamaño foliar y el macollaje, y en consecuencia el crecimiento del forraje (Chapman y Lemaire, 1993; Taleisnik et al., 2009; Gastal y Lemaire, 2015; Chapman, 2016; Cyriac, et al., 2018; Errecart et al 2020; Carrizo et al., 2021).

## **2.2 – Fotosíntesis, isótopos estables de carbono y eficiencia de uso del agua.**

El estrés osmótico determina una menor conductancia estomática con cierre parcial o total de estomas, minimizando las pérdidas de agua por transpiración, y limitando el intercambio de gases y la fotosíntesis (Chaves et al., 2009). La respuesta fotosintética al estrés por sequía y salinidad es muy compleja y puede verse afectada por distintas causas, especialmente la duración e intensidad del mismo.

En general, en una primera instancia, se produce la restricción en la difusión de CO<sub>2</sub> hacia el cloroplasto a través de limitaciones en la apertura estomática y en el transporte de CO<sub>2</sub> del mesófilo, determinando una menor concentración de CO<sub>2</sub> del cloroplasto y la reducción de la tasa fotosintética (Medrano y Flexas, 2004; Chaves et al., 2009; Flexas et al., 2013; Morales et al., 2020; Ma et al., 2021). Si el estrés persiste, se producirán alteraciones en la capacidad fotoquímica de la hoja (tasa de transporte de electrones), en el metabolismo del carbono (actividad de las enzimas del ciclo de Calvin), y llevará a la aparición de especies reactivas de oxígeno (Medrano y Flexas, 2004; Chaves et al., 2009; Morales et al., 2020).

La composición de isótopos estables de carbono <sup>12</sup>C, <sup>13</sup>C ( $\delta^{13}\text{C}$ ) en la materia seca pueden ayudar a comprender mejor el metabolismo del carbono de las plantas bajo estrés abiótico (Mateo et al., 2004; Yousfi, et al., 2012; Araus, et al., 2013; Sadaqat Shah et al., 2020; Vasilakoglou, et al 2021). Las plantas discriminan contra el isótopo de carbono más pesado (<sup>13</sup>C) durante la fotosíntesis (C3-Rubisco), y la discriminación depende de la proporción de CO<sub>2</sub> intracelular a atmosférico en los órganos fotosintéticos, la cual varía con la conductancia estomática y la capacidad fotosintética intrínseca de la planta C3 (Farquhar et al 1989). La  $\delta^{13}\text{C}$  proporciona información sobre la eficiencia de uso del agua de la hoja a largo plazo (EUA<sub>i</sub> = A/E, fotosíntesis/tasa de transpiración), y  $\delta^{13}\text{C}$  se correlaciona con la EUA<sub>i</sub> y el rendimiento en el cultivo C3 (Farquhar et al 1989; Rebetzke et al., 2002; Condon et al., 2004; Araus, et al., 2013; Zhu et al., 2008; Vasilakoglou, et al 2021). Por ello, el uso de  $\delta^{13}\text{C}$  podría ser un indicador adecuado para seleccionar genotipos con mayor tolerancia al estrés en cultivos C3 (Rebetzke et al., 2002; Condon et al., 2004; Zhu et al., 2008; Yousfi, et al., 2012; Sadaqat Shah et al., 2020; Vasilakoglou, et al 2021). Además,  $\delta^{13}\text{C}$  tiene la ventaja de exhibir una mayor heredabilidad en sentido amplio que el rendimiento y/o la biomasa, por lo que puede resultar útil como

herramienta de selección de genotipos en los programas de mejoramiento (Rebetzke et al., 2002; Condon et al., 2004; Araus, et al., 2013).

La discriminación de isótopos de carbono proporciona un medio poderoso para mejorar la eficiencia de uso del agua intrínseca de la hoja ( $EUA_i = A/E$ , fotosíntesis/tasa de transpiración), pero la experiencia ha demostrado que no siempre se traduce en una mayor EUA de la biomasa ( $EUA = \text{biomasa total} / ETP$ ) o en una mayor EUA del rendimiento en grano ( $EUA_y = \text{rendimiento de grano} / ETP$ , donde está involucrada la partición al destino cosechado), ya que cada estimación de la EUA puede cambiar dependiendo de cómo varíe la disponibilidad de agua durante el ciclo de cultivo (Condon et al. 2004; Tambussi et al., 2007; Araus, et al., 2013). En cultivos creciendo en condiciones mediterráneas con estrés hídrico moderado o nulo (con precipitaciones durante su ciclo), se encuentra una correlación negativa entre el  $\delta^{13}C$  y el rendimiento de grano de gramíneas C3 anuales (Yousfi, et al., 2012; Araus, et al., 2013; Vasilakoglou, et al 2021), mientras que en cultivos creciendo en condiciones más estresantes, que dependen del agua almacenada en el suelo (como en algunas regiones de Australia), un alto  $\delta^{13}C$  se ha utilizado como un rasgo de selección para una mayor  $EUA_i$ , asociada a un mayor rendimiento de grano (Rebetzke et al. 2002; Condon et al. 2004; Zhu et al., 2008).

### **2.3 – Conductividad eléctrica, concentración de $K^+$ , $Na^+$ , $Cl^-$ y relación $Na^+/K^+$ .**

Las condiciones de salinidad pueden ser evaluadas a través de la conductividad eléctrica (CE), dado que la CE está directamente relacionada con la concentración de sales solubles tanto en el agua como en el suelo (Cobertera, 1993; Willadino y Camara, 2004). La sal más abundante en la tierra es el NaCl (Flowers y Colmer, 2015) y entre los iones tóxicos, el exceso de sodio ( $Na^+$ ) tiene los efectos más adversos sobre el suelo (desestabilización de la estructura, pérdida de porosidad e infiltración, saturación de la capacidad de intercambio catiónico, etc.), así como sobre el metabolismo de las plantas (Willadino y Camara, 2004; Ondrasek et al 2021).

Los iones  $Na^+$  y  $Cl^-$  son micronutrientes esenciales para el crecimiento de las plantas, y en condiciones salinas y dependiendo de las especies, la acumulación de  $Na^+$  y  $Cl^-$  secuestrados en la vacuola de hojas o raíces puede ayudar a mantener el balance osmótico por ser solutos inorgánicos de bajo costo energético (Munns, 2002; Hasegawa, 2013; Flowers y Colmer, 2015; Rosales et al., 2020). Sin embargo, cuando las concentraciones de  $Na^+$  y  $Cl^-$  superan la capacidad de la célula para compartimentalizar estos iones en la vacuola, se ve afectado el metabolismo celular, produciendo desequilibrio nutricional y toxicidad en la planta (Munns, 2002; Flowers y Colmer, 2015; Acosta Motos et al., 2017; Geilfus, 2018; Ondrasek et al., 2021).

En suelos salinos, la alta concentración de  $Cl^-$  en el suelo y la entrada pasiva de  $Cl^-$  en las células de la raíz, determinan una rápida acumulación en los brotes; donde el  $Cl^-$  es acumulado en la vacuola para mantener baja la concentración citosólica y evitar los niveles tóxicos que reducirán la capacidad fotosintética, el crecimiento y el rendimiento (Munns, 2002; Geilfus, 2018; Ondrasek et al 2021). Además, la falta de selectividad por el nitrato o el fosfato sobre el  $Cl^-$  puede conducir a una absorción reducida de nitrógeno o fósforo cuando las concentraciones externas de  $Cl^-$  son excesivas (Geilfus, 2018). Sin embargo, estudios recientes han encontrado que cuando el  $Cl^-$  se acumula a niveles de macronutrientes en los tejidos vegetales, en vez de perjudicar la nutrición de N, facilita la utilización de  $NO_3^-$  y mejora la eficiencia del uso del

nitrógeno en algunas especies, además de mejorar el equilibrio hídrico de los tejidos, el rendimiento fotosintético, y la eficiencia en el uso del agua (Rosales et al., 2020).

La salinidad excesiva de NaCl aumenta inicialmente la concentración de Na<sup>+</sup> en las raíces (Ondrasek et al 2021). A continuación, el sodio transportado por la corriente transpiratoria se acumula en las hojas a medida que el agua se evapora, y por ello, las hojas más viejas acumulan más Na<sup>+</sup> y son las que presentan los primeros síntomas de toxicidad (Munns, 2002; Munns y Tester 2008). En general, se sabe que concentraciones de Na<sup>+</sup> citoplasmático superiores a 100 mM empiezan a inhibir el funcionamiento de enzimas alterando el metabolismo de las plantas (Munns, 2002). A esto se suma el desbalance nutricional ocasionado por la sobreacumulación de Na<sup>+</sup> que puede inducir proporciones extremadamente bajas de K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> y algunos otros nutrientes (Ondrasek et al., 2021).

Mantener una baja relación Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> foliar en condiciones de estrés salino es fundamental para múltiples procesos relacionados con el rendimiento fotosintético, y en consecuencia mantener el crecimiento (Ondrasek et al., 2021). La absorción de potasio (K<sup>+</sup>) se ve negativamente afectada a altas concentraciones de Na<sup>+</sup> en el suelo, debido a sus propiedades fisicoquímicas similares, el Na<sup>+</sup> compite con el K<sup>+</sup> en la absorción por las plantas (transportadores de potasio de alta afinidad y en los canales de cationes no selectivos). Además, el Na<sup>+</sup> causa la despolarización de la membrana alterando el funcionamiento de los canales de entrada y salida de K<sup>+</sup> (Wakeel, 2013). La capacidad de mantener bajas concentraciones de Na<sup>+</sup> y altas concentraciones de K<sup>+</sup> en las hojas se correlaciona con la tolerancia a la sal en gramíneas y otras especies (Colmer et al., 2006; Ondrasek et al 2021). Una proporción óptima de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> es vital para activar las reacciones enzimáticas, dado que muchas enzimas requieren K<sup>+</sup> como cofactor, pudiendo verse afectados procesos fundamentales del crecimiento y desarrollo de las plantas (Hasegawa, 2013; Wakeel, 2013; Ondrasek et al., 2021). Por ello es importante conocer la concentración de K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> en las hojas, pero más importante parece ser estimar la relación Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> (Ondrasek et al., 2021).

#### **2.4 – Nitrógeno e isótopo estable de nitrógeno.**

El nitrógeno (N) es el macronutriente principal para la síntesis de ácidos nucleicos y aminoácidos. A su vez, los aminoácidos forman las proteínas y enzimas, esenciales en los procesos de fotosíntesis, crecimiento y desarrollo de las plantas. Las raíces absorben el nitrógeno del suelo en forma de amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) o mayoritariamente como nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), el cual puede ser reducido a NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en dos reacciones consecutivas catalizadas por las enzimas nitrato reductasa (NR, de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) y nitrito reductasa (NiR, de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> a NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). El nitrógeno en forma de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> es incorporado en los aminoácidos a través de las enzimas glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintasa (GOGAT) en las plantas (Lamsfus et al., 2004; Gonzalez-Dugo et al., 2010). La concentración de N puede verse reducida por el déficit hídrico del suelo, debido a que la corriente de transpiración afecta en gran medida la disponibilidad de N mineral en la rizosfera del suelo, además de la asimilación de N en la planta (Gonzalez-Dugo et al 2010). Esta reducción en la concentración de N en la planta está asociada a la actividad enzimática de NR, NiR, GS y GOGAT, la cual puede variar según la especie y su tolerancia a la sequía o salinidad (Mansour 2000; Yousfi et al., 2012; Sadaqat Shah et al., 2020).

El metabolismo del N está directamente asociado a la composición del isótopo estable de  $^{14}\text{N}$ ,  $^{15}\text{N}$  ( $\delta^{15}\text{N}$ ). En diferentes estudios sobre gramíneas anuales el  $\delta^{15}\text{N}$  se ha considerado un criterio clave para diferenciar entre los genotipos tolerantes y susceptibles a la sequía y/o la salinidad (Yousfi et al., 2012; Sadaqat Shah et al., 2020), mostrando  $\delta^{15}\text{N}$  una heredabilidad en sentido amplio mayor que el rendimiento (Araus, et al., 2013). Bajo dichos estreses, la menor actividad de las enzimas nitrato reductasa (NR) y glutamina sintetasa (GS) podrían ser los procesos más importantes que limiten la acumulación de N y del  $\delta^{15}\text{N}$  (Yousfi et al., 2012; Sadaqat Shah et al., 2020). Sin embargo, en algunas plantas expuestas al estrés por salinidad se han encontrado acumulaciones de compuestos que contienen nitrógeno, estando presentes en funciones relacionadas con el ajuste osmótico, la protección de macromoléculas celulares, la forma de almacenamiento de nitrógeno, el mantenimiento del pH celular, la detoxificación de las células, y la eliminación de radicales libres (Mansour 2000; Ghafar et al., 2021). En trigo, los principales compuestos protectores contra el estrés salino son los metabolitos prolina y glicina betaína. La prolina se encuentra especialmente en los tejidos más viejos desde el inicio del estrés y está asociada con nitrato reductasa (NR) con alto contenido de nitrato, mientras que la glicina betaína está asociada con glutamato sintasa (GOGAT) en las hojas más jóvenes de plantas ante estrés prolongado (Carillo et al., 2008).

## **2.5 – Prolina libre:**

La prolina es un aminoácido multifuncional que se acumula en diversas especies de plantas en respuesta al estrés ambiental, con funciones relacionadas con la presión osmótica, el estado energético, la disponibilidad de nutrientes y los cambios en el equilibrio redox (Szabados y Savoure, 2010; Bhaskara et al., 2015; Frimpong et al., 2021; Ghafar et al., 2021; Vasilakoglou et al., 2021; Álvarez et al., 2022). Los primeros estudios sugerían que la capacidad de acumular prolina estaría relacionada con el ajuste osmótico intracelular y la tolerancia a la sal, reportándose como el principal aminoácido en plantas halófitas (Stewart y Lee, 1974). En gramíneas, estudios posteriores mostraron que la prolina se puede acumular a altos niveles en plantas estresadas por sequía (Bhaskara et al., 2015; Ghafar et al., 2021) o salinidad (Vasilakoglou et al., 2021), y contribuir a aliviar los efectos de la deshidratación celular y tisular. Nuevos estudios remarcan la importancia del metabolismo, el recambio y el aumento de la tasa de biosíntesis de prolina, en lugar de tener en cuenta únicamente la acumulación de prolina como el factor más importante para la adaptación al estrés, con funciones en la estabilización del equilibrio redox y el mantenimiento de la homeostasis celular (Szabados y Savoure, 2010; Bhaskara et al 2015; Ghafar et al., 2021; Álvarez et al., 2022)

La prolina se sintetiza en el citosol a partir del glutamato por medio de las enzimas pirrolina-5-carboxilato sintetasa y pirrolina-5-carboxilato reductasa, y en condiciones de estrés se sintetiza principalmente en el cloroplasto (Szabados y Saviouré, 2010; Álvarez et al., 2022). La degradación de prolina ocurre en las mitocondrias, donde es oxidada a glutamato a través de la acción de la prolina deshidrogenasa y la pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa; aunque durante el estrés el catabolismo de prolina se suprime en el tejido fotosintético (Szabados y Saviouré, 2010; Zheng et al., 2021; Álvarez et al., 2022). Estudios en cebada, demuestran que el aumento de la concentración de prolina mejora la tolerancia a la sal regulando las enzimas protectoras del estrés y reduciendo la oxidación de las membranas lipídicas, además de su papel fundamental como osmorregulador (Vasilakoglou et al., 2021). Estudios en trigo creciendo en

condiciones salinas, con alto contenido de nitrato, atribuyen a la prolina más del 39% del ajuste osmótico citoplasmático de las hojas viejas; resaltando que la acumulación de prolina depende del nitrógeno disponible y puede ofrecer una ventaja importante porque puede ser metabolizada para permitir la reasignación de energía, carbono y nitrógeno desde las hojas más viejas a los tejidos más jóvenes (Carillo et al., 2008). Además, se ha encontrado en cereales sometidos a sequía, que la prolina se acumula más en espigas que en hojas permaneciendo más tiempo fotosintéticamente activas y manteniendo la eficiencia en el uso del agua, lo que mejora la etapa de llenado de grano y el rendimiento del cultivo (Frimpong et al., 2021). En síntesis, los estudios más recientes han demostrado que la prolina tiene funciones importantes en la regulación del equilibrio redox y el estado energético, donde la interconversión de prolina y glutamato transporta el poder reductor entre los compartimentos celulares, especialmente entre las mitocondrias y el citosol (Zheng et al., 2021).

La amplia variación natural en la acumulación de prolina indica que el nivel óptimo de acumulación de prolina depende de la especie y el genotipo (Szabados y Savouré, 2010; Bhaskara et al., 2015; Álvarez et al., 2022), lo que plantea la necesidad de evaluar prolina libre en el germoplasma de la especie de estudio ante la distinta duración y tipo de estrés ambiental al que se puede ver sometido.

### 3 – ESPECIE EN ESTUDIO: “AGROPIRO ALARGADO”.

#### 3.1 – Características de la especie.

*Elymus elongatus* (Host) Runemark subsp. *ponticus* (Podp.) Melderis es sinónimo de *Thinopyrum ponticum* (Podp.) Barkworth y D.R. Dewey, y ha sido mencionada anteriormente en la literatura como *Agropyron elongatum* (Host) P. Beauv., *Elytrigia elongata* (Host) Nevski, *Elytrigia elongata* subsp. *pontica* (Podp.) Gamisans, *Elytrigia pontica* (Podp) Holub, *Triticum elongatum* (Host) D.R. Dewey, *Lophopyrum elongatum* (Host) A. Löve, *Lophopyrum ponticum* (Podp.) A. Löve, y *Triticum ponticum* Podp. (Melderis, 1980; McGuire & Dvoák, 1981; Barkworth & Dewey, 1985; Darbyshire, 1997; Colmer et al., 2006; Arterburn et al., 2011). Es conocida con el nombre común en castellano de “agropiro alargado” y en lengua inglesa como “tall wheatgrass” o “decaploid wheatgrass”.

Agropiro alargado es una especie originaria de hábitats secos o salinos del sureste europeo (Melderis, 1980) y Asia Menor (Tiryaki, et al 2021). Pertenece a la familia de las Poaceae, subfamilia de las Festucoideae, tribu de las Triticeae, y se trata de una gramínea alógama, decaploide ( $2n = 10x = 70$ ), que se supone se formó por hibridación natural a partir de otras especies y después se autoduplicó, dando lugar a un auto-alopoliploide (Colmer et al., 2006; Arterburn et al., 2011).

El agropiro alargado es una gramínea perenne, cespitosa, con fotosistema C3, que ha sido identificada como una forrajera tolerante a la sal (McGuire y Dvoák, 1981; Mass, 1986; Colmer et al., 2006; Arterburn et al., 2011). Es por ello utilizada y muy valorada como forrajera en ambientes con limitaciones climato-edáficas en diversas partes del mundo, como Argentina (Mazzanti et al., 1992; Otondo, et al., 2019), EEUU y Canadá (Darbyshire, 1997; Scheinost, 2008), Nueva Zelanda y Australia (Smith, 1996; Bleby et al., 1997; Bennett et al., 2009), y algunas regiones del norte de Europa y Asia Central (Csete, et al., 2011). En los sistemas ganaderos es

utilizada para pastoreo directo por el ganado vacuno, o para corte y confección de reservas forrajeras como heno o silaje (Mazzanti et al., 1992; Smith, 1996; Scheinost, 2008; Otondo, et al., 2019).

Además, el agropiro alargado posee un gran potencial para ser utilizado como especie fitorremediadora de suelos salinos y/o sódicos (Bleby et al., 1997; Díaz y Grattan, 2009; Casas, 2018; Kopecký et al., 2021). Esta especie también presenta potencial para ser utilizada como productora de biomasa para hacer biocombustible en ambientes marginales (Csete et al., 2011; Falasca et al., 2017; Cira et al., 2020). Sin embargo, desde hace algunos años, ha cobrado mayor importancia su parentesco con el trigo y la posibilidad de ceder genes para mejorar la tolerancia a estrés abiótico, como la salinidad y la sequía, y frente a estrés biótico, como la resistencia a enfermedades, e incluso para mejorar la calidad del grano (McGuire y Dvoák, 1981; Li y Zhang, 2002; Colmer, et al., 2006; Li y Wang, 2009; Peng et al 2009; Ceoloni, et al., 2014; 2017; Klimushina, et al., 2020).

### **3.2 – Introducción, dispersión y uso en Argentina.**

El agropiro alargado fue introducido en Argentina en la década de los 50' a partir de germoplasma proveniente de los Estados Unidos de Norte América, como forrajera para la ganadería extensiva de regiones semiáridas (Covas, 1985) y templado húmedas con problemas de salinidad, alcalinidad, anegamiento invernal o sequías estivales (Mazzanti et al., 1992). Por su rusticidad y plasticidad se ha difundido como la principal forrajera perenne sembrada en un millón de hectáreas de suelos hidro-halomórficos de la Cuenca del Salado Pampeana, zona que mantiene el mayor rodeo de cría bovina del país, triplicando la producción de forraje en comparación con el pastizal natural (Otondo et al., 2019).

La utilización de praderas de agropiro alargado ha permitido disminuir la erosión y producir forraje, brindando una herramienta a productores de ambientes restrictivos, para conseguir un sistema ganadero sustentable. La siembra de agropiro en suelos salinizados de la Pampa Argentina ha logrado una recuperación parcial de los mismos, mejorando la calidad del suelo a través del aumento de la materia orgánica y la disminución de la conductividad eléctrica, el pH y el porcentaje de sodio intercambiable a una profundidad de 0-15 cm del suelo (Casas, 2018). Además, teniendo en cuenta las zonas agroclimáticas de Argentina podría ser cultivado en condiciones de seco como planta forrajera y/o biocombustible en un millón de km<sup>2</sup> de tierras marginales (Falasca et al., 2017).

En pasturas de gramíneas forrajeras es fundamental el manejo del pastoreo considerando la morfogénesis foliar y la inducción floral de cada especie para poder realizar un uso eficiente de los recursos (Chapman y Lemaire, 1993; Romera et al., 2012; Agnusdei, et al.; 2015; Gastal y Lemaire, 2015; Chapman, 2016; Oliveira et al., 2020). El estudio de la morfogénesis foliar a nivel intraespecífico en agropiro mostró diferencias en la TEF entre materiales genéticos (Borrajo y Alonso 2014a), y en valores de duración de vida foliar (VMF), que expresada en tiempo térmico fue de 450°C ±50°C/hoja (considerando una temperatura base de 4°C, Borrajo y Alonso 2014b). Estas variables morfogenéticas definen el número máximo de vivas por macollo, que fue similar entre materiales genéticos de agropiro (3,5 ±0,2 hojas/macollo, Borrajo y Alonso 2014b), y determina los tiempos de pastoreo, dado que antes de que la cuarta hoja se desarrolle completamente comienza la senescencia de la más vieja, de



manera que, para minimizar la senescencia foliar, y con ello la calidad de la pastura, el animal debe pastorear con una frecuencia de 3 hojas (Otondo et al., 2019). La tasa de aparición de hojas (TAH) determina el potencial de producción de macollos (“tiller site”), ya que cada hoja tiene en su axila una yema caulinar que podrá desarrollarse (“site filling”) dependiendo del genotipo y el ambiente (Borrajo y Alonso, 2015). Mantener una alta TAH y densidad de macollos es clave para lograr una pastura que crezca con calidad (Alonso et al., 2000; Romera et al., 2012) y para lograr la perennidad del recurso. En primavera, la inducción floral de algunos macollos por planta produce la dominancia apical de sus ápices en detrimento de los macollos vegetativos de menor tamaño, llegando a determinar la muerte de los mismos y la removilización de nutrientes a destinos reproductivos (Borrajo, 1998; Otondo et al., 2019). Además, en agropiro especialmente, los macollos florecidos forman tallos lignificados y poco digeribles que limitan el pastoreo y disminuyen la calidad de la pastura (Fernández, 2000; Borrajo et al., 2001). Por ello, el punto clave del manejo de agropiro es evitar la floración, lo cual se puede conseguir por corte o pastoreo de los ápices en elongación para eliminar el desarrollo reproductivo y mantener la pastura produciendo hojas y macollos con alta calidad nutritiva (Romera et al., 2012; Otondo et al., 2019).

La transferencia de germoplasma exótico a condiciones ambientales nuevas promueve la formación de ecotipos a través de la selección natural y la multiplicación del material sobreviviente (Rodríguez, 1983; Pfennig *et al.*, 2010). Los estudios de poliploides naturales sugieren que las modificaciones epigenéticas pueden alterar la expresión de genes homólogos y reprogramar los mecanismos que regulan la expresión de los genes, lo que permitiría que los poliploides establezcan nuevos citotipos, crezcan vigorosamente y promuevan la adaptación en entornos locales (Song y Chen, 2015). Es de esperar que esto haya sucedido con el agropiro alargado (auto-alodecaploide) en Argentina, dado que actualmente se encuentra naturalizado, creciendo espontáneamente en pastizales y banquinas en diferentes ambientes, desde templado-húmedos de la Depresión del Salado hasta semiáridos de la Patagonia Argentina (Alonso y Borrajo, 2007; BAL 2018, Figura 3).



**Figura 3:** Mapa con zonas climáticas de la República Argentina (INTA 1996) y sitios de colección de germoplasma de agropiro alargado (67 poblaciones). Datos del Banco de Germoplasma BAL de INTA, Argentina.

A diferencia del germoplasma domesticado, las poblaciones silvestres continúan evolucionando sujetas a la selección natural en respuesta a factores de estrés ambiental, herbivoría, ataque de patógenos, y competencia intraespecífica o interespecífica, para adaptarse y sobrevivir al entorno ante un clima cambiante (Renzi et al., 2022). El mejoramiento genético de una especie depende de la variación genética existente en el germoplasma disponible, y resulta más eficiente cuando se utilizan materiales adaptados al ambiente en el que se va a utilizar (Harlan, 1983). En el germoplasma recolectado en la Región Pampeana Argentina, los estudios de caracterización inicial en planta aislada indicaron la existencia de variabilidad entre poblaciones en caracteres de interés agronómico (Borrajo et al., 1997; Borrajo et al., 1998; Alonso y Borrajo, 2007; Pistorale et al., 2008). En dichos estudios, se encontraron altos valores de heredabilidad en sentido amplio ( $H^2$  o GDG: grado de determinación genética) en caracteres como peso de semilla ( $H^2$ : 0,86) y número de hojas por macollo ( $H^2$ : 0,84), valores intermedios en número de macollos ( $H^2$ : 0,55) y producción de biomasa ( $H^2$ : 0,55), y bajos en la longitud y ancho foliar ( $H^2$ : < 0,20), en germoplasma de agropiro proveniente de ambientes con diferente calidad del suelo y clima templado húmedos de la región pampeana (Alonso et al., 1997; Borrajo, 1999; Pistorale et al., 2008). Posteriormente, la evaluación en cultivo denso en

diferentes experiencias con agropiro, mostró variabilidad intra-específica en las estrategias de crecimiento determinadas por variables morfogénicas, estructurales y productivas (Borrajo, 1998; Borrajo y Alonso, 2002; 2004; 2014a; 2014b; 2015) en la composición de tejidos y la calidad nutritiva para diferentes estados fenológicos (Alonso et al., 2000; Fernández, 2000; Borrajo et al., 2001; Otondo et al., 2019), y en el rendimiento y dormición de semillas (Borrajo et al., 1998; Borrajo y Alonso, 2001; Cardoso et al., 2007). También se han encontrado diferencias en caracteres agronómicos (emergencia de plántulas, macollaje inicial, supervivencia de plántulas, tamaño foliar, densidad de macollos, producción de biomasa) al comparar el comportamiento de los materiales genéticos en la tolerancia a suelos salino-alcalinos frente a suelos agrícolas (Borrajo y Alonso, 2002; 2004), pero no se ha profundizado en los mecanismos fisiológicos, bioquímicos o isotópicos que determinan esas diferencias, ni en la heredabilidad de esos caracteres.

De hecho, en una situación en la que las condiciones climáticas son cada vez más extremas debido al cambio climático, y en las que la productividad agrícola se verá comprometida en un futuro relativamente cercano, son necesarios más estudios que arrojen luz sobre la capacidad de agropiro para adaptarse o aclimatarse a dichas condiciones.

### **3.3 – Antecedentes de estrés hídrico y/o salino en Agropiro alargado.**

A pesar de que el agropiro alargado se ha posicionado como una especie muy tolerante a la salinidad (McGuire y Dvoák, 1981; Maas, 1986), son escasos los estudios que evalúan la variabilidad intra-específica que pueda existir, así como los mecanismos que en ella actúan entre diferentes genotipos. Bhuiyan et al. (2017) demostraron que la tolerancia a la salinidad en agropiro alargado se correlacionaba negativamente con la concentración de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en el forraje. A su vez, se encontró que los mecanismos que actúan en agropiro ante la salinidad podrían estar asociados a incrementos de prolina y de azúcares solubles que contribuirían a la osmorregulación (Shannon et al., 1978), además de la restricción en la acumulación de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Cl}^-$  en brotes (Johnson, 1991; Bhuiyan et al., 2015). Esto concuerda con lo reportado por otros autores, que encontraron mayores valores de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  en raíces que en hojas (Bhuiyan et al., 2017), y destacaron una mayor capacidad de absorción y transporte selectivo de  $\text{K}^+$  sobre  $\text{Na}^+$  (Guo et al., 2015). La tolerancia a la sal también se ha relacionado con la alta eficiencia en el uso del agua y con mínimas diferencias en los isótopos estables de carbono entre distintos niveles salinos (Johnson, 1991). Sin embargo, en otras experiencias de mayor duración e intensidad de estrés salino se ha reportado que el fraccionamiento de isótopos estables de carbono foliar fue un buen indicador del estrés acumulado, aumentando  $\delta^{13}\text{C}$  cuanto mayor era la salinidad (Díaz y Grattan, 2009).

El agropiro alargado es una especie utilizada en tierras marginales de secano para producción de forraje y biocombustible por su alta eficiencia de uso del agua y producción de biomasa en comparación con otras especies (Cira et al., 2020). La tolerancia a la sequía se ha asociado a una reducción del crecimiento y el tamaño foliar, pero también a la acumulación de altas concentraciones de prolina y proteínas del estrés que le permiten tolerar el estrés hídrico, y al rehidratarse, recuperar su maquinaria fotosintética (Gazanchian et al., 2007). En la Tabla 1 se reúnen diversos estudios realizados hasta el día de hoy con el agropiro alargado creciendo en condiciones de estrés salino, hídrico, o en una combinación de ambos tipos de estrés.

**Tabla 1:** Respuestas al estrés hídrico (EH) y/o salino (ES) en agropiro alargado reportadas hasta la actualidad. Comparaciones interespecíficas e intraespecíficas.

Estrés	Condiciones	Caracteres en los que difieren	Cita
<b>- comparaciones interespecíficas -</b>			
ES	Plántulas, 500 mM y 750 mM NaCl, 26 días.	Mayor supervivencia entre especies	McGuire y Dvoák, 1981
ES	Plantas, umbral de tolerancia a la salinidad	Mayor supervivencia, soporta hasta 7,5 dS.m <sup>-1</sup> CE	Maas, 1986
ES	Plántulas-vegetativo, arena, irrigada con solución salina de -0,6 Mpa ClNa, 4 semanas	Mayor producción de forraje y turgencia foliar. Menor acumulación de Na <sup>+</sup> y Cl foliar y mayor de K <sup>+</sup> . Menor relación Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> y, en brotes Mínimas diferencias en isótopo de C y en CHR.	Johnson, 1991
EH y ES	Plántulas, macetas, invernadero, 2 meses Hídrico (100-90-75-60% cc) y salino (1.0-3.5-6.0 dSm <sup>-1</sup> ).	Concentración de Na <sup>+</sup> (+117% ES, +83% ES y EH). Concentración de Cl <sup>-</sup> (+41% SS, +1% ES y EH). Concentración de K <sup>+</sup> (-6% ES, +30% EH). CHR: 92%, no varió en EH ni ES. Fotosíntesis neta (A: -35% SS, +87% SH).	Bhuiyan et al., 2015
ES	Vegetativo, macetas, invernadero, 82 días.	Acumulación mayor de NaCl en raíz que en brotes. Reducción en altura y peso de brotes. Rendimiento fotosintético sin cambio por ES (contenido de clorofila, fotosíntesis, Fv/Fm, NPQ)	Bhuiyan et al., 2017

ES	Vegetativo, macetas, en invernadero durante 9 meses, irrigadas con solución salina de 0,5, 5, 10, 15 y 20 dS /m.	Reducción de biomasa forrajera, y aumentó $\delta^{13}\text{C}$ a mayor salinidad.	Díaz y Grattan, 2009
ES	Plántulas, cámara, solución nutritiva (25 a 200 mM NaCl), 7-14 días	Mayor tasa de crecimiento. Mayor selectividad de absorción y transporte de $\text{K}^+$ sobre $\text{Na}^+$	Guo et al., 2015
EH y ES	En campo, las 4 estaciones del año	Mayor eficiencia de evapotranspiración. Mayor desarrollo radicular en verano.	Bleby et al., 1997
ES y anegamiento	Pasturas a campo, varios ciclos de crecimiento.	Tolera moderada salinidad (rango 4-8 dS/m) y tolera moderado anegamiento.	Bennett et al., 2009
<b>- comparaciones intraespecíficas -</b>			
ES	Plántulas, 500 mM y 750 mM NaCl, 26 días.	Supervivencia entre accesiones.	McGuire y Dvoák, 1981
ES	Incremento ES hasta 765 mEq/L, en arena, en invernadero	Restricción de acumulación de $\text{Na}^+$ y $\text{Cl}^-$ en brotes. Incremento en prolina y azúcares solubles, sin diferencias entre líneas.	Shannon, 1978
ES	Germinación en cámara (1 mes). Emergencia e implantación en invernáculo y campo (3 y 5 meses). Suelo-sustrato alcalino-salino vs neutro.	Diferencias en velocidad de germinación, emergencia de plántulas, supervivencia, macollaje inicial, tamaño foliar, densidad de macollos, producción de biomasa.	Borrajo y Alonso, 2004
EH	Estado vegetativo 14 días EH (75-50-25%cc), y 14 días rehidratación.	Reducción en CHR% (-85%), biomasa (-67%) y ancho foliar (-79%). Incremento prolina (+ 20 veces comparado con el control).	Gazanchian et al., 2007

		Incremento de proteínas del estrés.	
EH	Tierras marginales de secano (mínimo 351 mm/año). Comparación de especies y cultivares.	Diferencias entre rendimientos de biomasa, eficiencia en el uso de las precipitaciones, cenizas y concentraciones de K <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup> y Si.	Cira et al., 2020

EH: estrés hídrico. ES: estrés salino. %cc: porcentaje de la capacidad de campo. CHR contenido hídrico relativo. A: tasa fotosintética neta. Fv/Fm: eficiencia máxima del Fotosistema II,  $\delta^{13}\text{C}$ : isótopo estable de carbono  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$

## **HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

## **HIPOTESIS y OBJETIVOS**

HIPÓTESIS

OBJETIVO PRINCIPAL

OBJETIVOS ESPECÍFICOS



## HIPOTESIS y OBJETIVOS

El cambio climático, así como la reducción de las reservas de agua y el aumento de las tierras salinizadas, plantean importantes limitaciones a los sistemas de producción agropecuarios (Billah et al., 2021). Las especies silvestres son recursos extremadamente ricos de genes útiles que no están disponibles en el acervo genético cultivado (Ceoloni et al., 2017). El agropiro alargado supera a la mayoría de las especies en tolerancia al estrés hídrico (Bleby et al., 1997; Cira et al., 2020) y al estrés salino (McGuire y Dvoák, 1981; Maas, 1986; Colmer et al., 2006; Bhuiyan et al., 2015; Guo et al., 2015). Por esta razón, se puede considerar al agropiro alargado como una especie muy prometedora para contribuir a expandir la producción de cultivos en tierras marginales y a mitigar las consecuencias del cambio climático en los sistemas agropecuarios, especialmente en ambientes con limitaciones por sequía y/o salinidad. El mejoramiento de una especie depende de la variación genética existente en el germoplasma disponible, y resulta más eficiente cuando se utilizan materiales adaptados al ambiente en el que se va a utilizar (Harlan, 1983).

Por lo anteriormente mencionado, se plantean en esta Tesis de Doctorado la siguiente hipótesis de trabajo:

### HIPÓTESIS:

En poblaciones de agropiro alargado que provienen de orígenes ambientales que contrastan en sus características climato-edáficas, existen diferentes comportamientos en caracteres morfológicos, fisiológicos, bioquímicos e isotópicos que determinan distintas estrategias de crecimiento y/o mecanismos fisiológicos para tolerar el estrés hídrico y salino.

Para la validación de esta hipótesis se planteó el siguiente objetivo principal:

### OBJETIVO PRINCIPAL:

Comprender el comportamiento de distintas poblaciones de agropiro alargado en respuesta al estrés hídrico, salino y combinado, para detectar características morfológicas, agronómicas, fisiológicas, bioquímicas y/o isotópicas que permitan seleccionar el germoplasma con mayor tolerancia al estrés hídrico y/o salino.

Para la consecución de este objetivo, se plantearon en esta Tesis de Doctorado, los siguientes objetivos específicos:

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Evaluar el comportamiento morfo-fisiológico de poblaciones de *Elymus elongatus* subsp. *ponticus* (Podp.) Melderis. Frente a tres niveles de estrés hídrico de distinta intensidad.
- Estudiar la respuesta morfológica, fisiológica, bioquímica, isotópica y productiva de poblaciones de agropiro alargado de distintos orígenes frente a cinco niveles de estrés salino y a periodos de estrés de diferente duración.

- Comparar las estrategias de crecimiento y los mecanismos fisiológicos bajo condiciones de sequía y salinidad en germoplasma de agropiro alargado.
- Estimar la heredabilidad en sentido amplio de cada carácter evaluado bajo condiciones de sequía y salinidad.
- Identificar los caracteres más efectivos para diferenciar el germoplasma más tolerante al estrés.

## **PLANIFICACIÓN DE ENSAYOS**

## **PLANIFICACIÓN DE ENSAYOS**

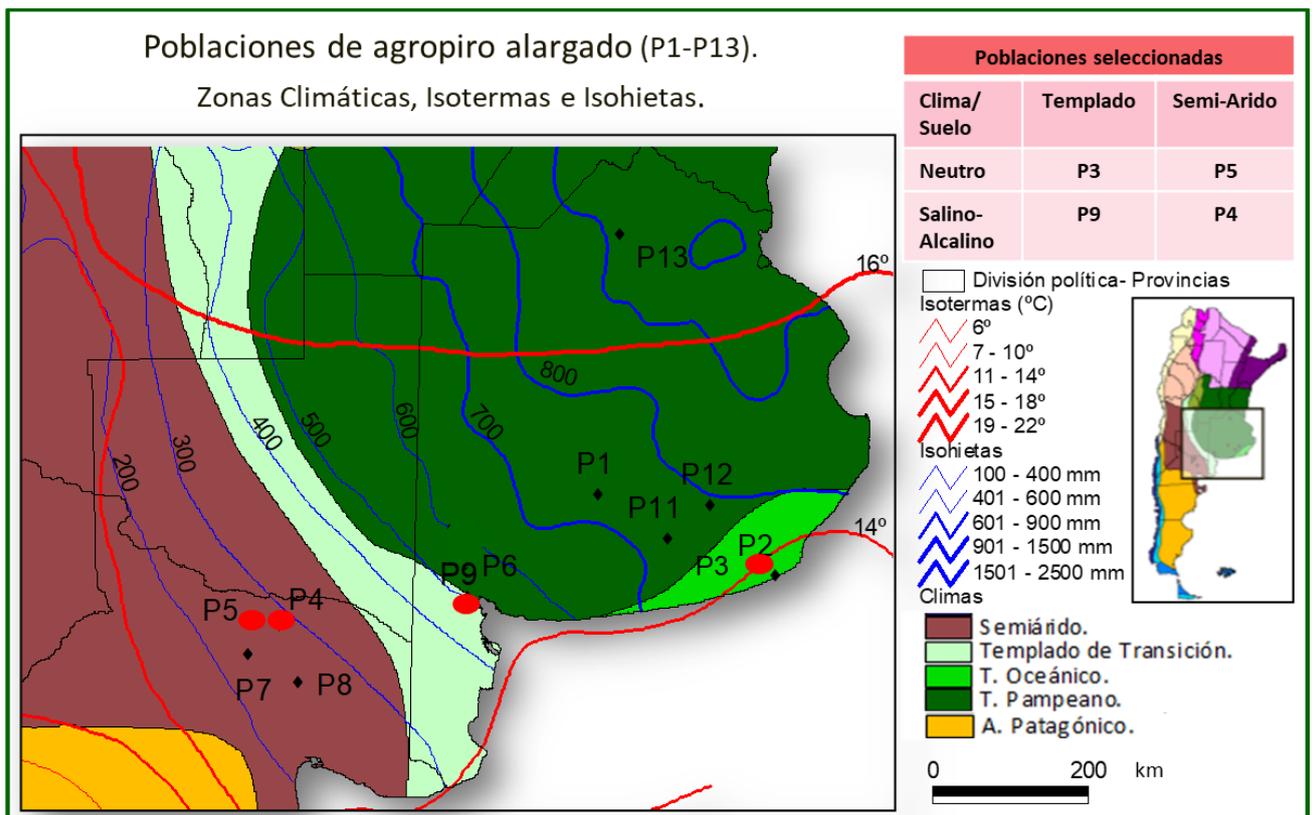
1 - MATERIAL EVALUADO

2 - DISEÑO DE EXPERIMENTOS, REGISTRO Y ANÁLISIS DE DATOS

## PLANIFICACIÓN DE ENSAYOS

### 1 - MATERIAL EVALUADO

Las accesiones evaluadas de *Elymus elongatus* (Host) Runemark subsp. *ponticus* (Podp.) Melderis [sinónimo de *Thinopyrum ponticum* (Podp.) Barkworth y D.R. Dewey] conocida con el nombre común de “agropiro alargado” ó en lengua inglesa “tall wheatgrass”, corresponden a poblaciones naturalizadas cedidas por el Banco de Germoplasma Activo de la Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, perteneciente al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de la República Argentina (BAL). Los registros de colecta del Banco de Germoplasma mencionan que cada población de agropiro alargado fue recolectada a partir de semillas de al menos 50 plantas, las cuales se encontraban aisladas de otras poblaciones a distancias mayores a 25 km, por condiciones topográficas y/o por cortinas arbóreas. El banco de germoplasma BAL cuenta con 67 accesiones de agropiro alargado (Figura 3). Considerando la disponibilidad de semillas y el hábitat de origen, se solicitaron 13 poblaciones naturalizadas para iniciar los estudios (Figura 4). Tras diversas evaluaciones preliminares de poder germinativo (Anexo I), y considerando la cantidad de semilla disponible y necesaria para los diferentes ensayos, se seleccionaron, para el desarrollo del presente trabajo, cuatro poblaciones naturalizadas provenientes de diferentes orígenes climato-edáficos (Figura 4; Tabla en Anexo II).



**Figura 4:** Mapa con zonas climáticas, isothermas, isohietas y sitios de colección de 13 poblaciones naturalizadas de agropiro alargado cedidas por el Banco de Germoplasma BAL de INTA, Argentina (BAL, 2018). Detalle de las poblaciones seleccionadas y estudiadas en esta Tesis de Doctorado (puntos rojos P3, P4, P5, P9 en la figura y tabla con clima/suelo del hábitat de origen).

Previo a cada ensayo, semillas de las cuatro poblaciones fueron germinadas en cámara de crecimiento (según las normas ISTA, 1999) y en estado de plántula trasplantadas a macetas en un invernadero del Campus Lagoas-Marcosende de la Universidade de Vigo, donde fueron mantenidas y seleccionadas por uniformidad (tres hojas desarrolladas) antes del inicio de la experiencia.

## 2 - DISEÑO DE EXPERIMENTOS, REGISTRO Y ANÁLISIS DE DATOS

Las cuatro poblaciones seleccionadas fueron evaluadas en cuatro ensayos, en macetas, en un invernadero del Campus Lagoas-Marcosende de la Universidade de Vigo, España. En todos los casos los ensayos se realizaron con un diseño completo al azar en bloques (BCA) y arreglo factorial en los tratamientos. Los factores corresponden a las poblaciones naturalizadas (Pobla. P3-P4-P5-P9), los tratamientos de estrés hídrico (EH) y/o de estrés salino (ES), (Tabla 2).

**Tabla 2:** Detalles de los ensayos indicando estado fenológico, duración, condiciones, unidad experimental (U.E.) y diseño estadístico utilizado (Pobla.: poblaciones, EH: estrés hídrico, ES: estrés salino, CC: capacidad de campo, pl: plantas; BCA: diseños en bloques completos al azar).

Estrés	Ensayo:	Diseño estadístico:
<b>Hídrico</b> (EH_35d)	- Estado vegetativo. - 35 días estivales (riego 2-3 días). - U.E. 3 pl/maceta.	BCA factorial 4x3 y 3 repeticiones. . Pobla: P3-P4-P5-P9 . EH: 30-50-100 %CC
<b>Salino I</b> (ES_40d)	- Estado vegetativo. - 40 días otoñales (riego semanal). - U.E. 1 pl/maceta.	BCA factorial 4x5 y 7 repeticiones. . Pobla: P3-P4-P5-P9 . ES: 0-0,1-0,2-0,3-0,4M [NaCl] en agua.
<b>Salino II</b> (ES_85d)	- Estado vegetativo-reproductivo. - 85 días primavera-estivales (riego semanal). - U.E. 1 pl/maceta.	BCA factorial 4x5 y 5 repeticiones. . Pobla: P3-P4-P5-P9 . ES: 0-0,1-0,2-0,3-0,4M [NaCl] en agua.
<b>Hídrico x Salino</b> (EhxES_90d)	- Estado vegetativo-reproductivo. - 90 días primavera-estivales (riego semanal). - U.E. 1 pl/maceta.	BCA factorial 4x3x3 y 5 repeticiones. . Pobla: P3-P4-P5-P9 . EH: 30-50-100 %CC . ES: 0-0,1-0,3M [NaCl] en agua.

En el primer ensayo de estrés hídrico, fue necesario estimar la capacidad de retención hídrica o capacidad de campo de las macetas (CC). Los valores de CC en cada maceta fueron calculados por método gravimétrico, como se muestra en el Anexo III. En base a la CC se establecieron tres niveles de disponibilidad hídrica para el desarrollo del ensayo (30%, 50% y 100% de CC). Para el segundo y tercer ensayo fueron evaluadas las poblaciones frente a cinco niveles de estrés salino, generados por el riego con solución salina preparada con diluciones de cloruro de sodio en agua a concentraciones de 0; 0,1; 0,2; 0,3 y 0,4 M de NaCl. En el cuarto

ensayo fue utilizado un diseño factorial de tres vías (Pobla x EH x ES) para conocer la respuesta al estrés combinado entre las poblaciones, los niveles hídricos (30%, 50% y 100% de CC) y los niveles salinos (riego con 0; 0,1; y 0,3 M NaCl).

Las variables registradas en los diferentes ensayos se resumen en la Tabla 3.

**Tabla 3:** Variables registradas y abreviaturas en castellano (entre paréntesis) y en inglés, utilizadas en los ensayos de estrés hídrico (EH\_35d), estrés salino con una duración de 40 días y 85 días (ES\_40d y ES\_85d), y de estrés hídrico y salino combinado (EHxES\_90d).

Caracteres registrados / Ensayo	EH_35d	ES_40d	ES_85d	EHxES_90d
<b>Variables Productivas</b>				
Biomasa aérea total como materia seca (BTotal)	DM	TotalB	TotalB	TotalB
Biomasa aérea total como materia fresca (MF)	FM	-	-	-
Biomasa muerta (BMuerta), biomasa verde (BVerde), biomasa verde de hoja (BHoja) y de tallo (BTallo).	-	DeadB, GreenB.	DeadB, GreenB.	DeadB, LeafB, StemB
Porcentaje de macollos espigados (Espiga%)	-	-	Flower %	Spike %
Altura de planta (altura)	-	-	-	Height
<b>Variables Morfogenéticas y estructurales del canopeo:</b>				
Tasa de elongación, senescencia y aparición de hojas (TEF, TSF y TAH)	-	LER, LSR, LAR	-	-
Largo, ancho y área/ hoja (LargoH, AnchoH y AreaH)	LLength, LWidth, LArea	LLength, LWidth, LArea	-	-
Área foliar específica (AFE)	SLA	SLA	SLA	SLA
Número de hojas /macollo (NHoja)	-	LeafN	-	-
Longitud foliar verde /macollo (LHMac)	-	-	LeafT	LeafT
Numero de macollos (Densidad)	Density <sup>‡</sup>	Density	Density	Density
Peso del macollo (PMac)	TillerW	-	-	-
<b>Variables Fisiológicas y bioquímicas:</b>				

Evapotranspiración acumulada (ETA)	ETAccu	-	ETA	ETA
Eficiencia en el uso del agua (EUA)	WUE	-	WUE	WUE
Contenido hídrico relativo (CHR)	LWC	RWC	RWC	RWC
Tasa fotosintética neta (A)	-	A <sup>2</sup>	A <sup>3</sup>	A <sup>4</sup>
Proteína	Protein	Protein	-	-
Prolina	Proline	Proline	Proline	Proline
Isotopo estable de <sup>13</sup> C/ <sup>12</sup> C ( $\delta^{13}C$ )	-	-	$\delta^{13}C$	$\delta^{13}C$
Isotopo estable de <sup>15</sup> N/ <sup>14</sup> N ( $\delta^{15}N$ )	-	-	$\delta^{15}N$	$\delta^{15}N$
Concentración de Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup> y N	-	-	Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup> , N.	Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup> , N.
Relación Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>	-	-	-	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>
<b>Variables edáficas</b>				
Capacidad de campo /maceta (CC)	CC	CC	CC	CC
Conductividad eléctrica del suelo (CE)	-	-	-	EC

Density<sup>‡</sup> fue registrado en forma semanal (Den1, Den2, Den3 y Den4) en EH\_35d.

A<sup>2</sup> fue registrado a los 19 y 35 días (A\_t<sub>1</sub> y A\_t<sub>2</sub>) en ES\_40d.

A<sup>3</sup> fue registrado a los 5, 45 y 80 días (A\_t<sub>1</sub>, A\_t<sub>2</sub> y A\_t<sub>3</sub>) en ES\_85d.

A<sup>4</sup> fue registrado a los 10, 45 y 85 días (A\_t<sub>1</sub>, A\_t<sub>2</sub> y A\_t<sub>3</sub>) en EhxES\_90d.

La metodología utilizada para el registro de cada variable fue descrita en detalle en las siguientes secciones.

En todos los ensayos se realizó análisis de la varianza y comparación de medias con las pruebas de diferencias mínimas significativas, considerando una probabilidad de 0,05% (Proc Mixed/lsmeans, SAS). Mas detalles son descriptos en cada sección. Además, los caracteres medidos fueron utilizados para realizar cuatro análisis de regresión lineal múltiple paso a paso (Proc Reg/STEPWISE, SAS) uno por ensayo, considerando como variable dependiente la biomasa aérea total (Y= BTotal) y como variables independientes los caracteres registrados en cada ensayo (Tabla 3). Las variables productivas como son las fracciones de la biomasa total (muerta, verde, hoja y tallo) no fueron consideradas para estos análisis.



## **ESTRÉS HÍDRICO**

### **Esta sección corresponde al trabajo publicado:**

Borrajo, C.I.; Sánchez-Moreiras, A.M.; Reigosa, M.J. 2018. Morpho-physiological responses of tall wheatgrass populations to different levels of water stress. PLoS ONE 13(12): e0209281. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209281>

## **ESTRÉS HÍDRICO**

### **Morpho-physiological responses of tall wheatgrass populations to different levels of water stress.**

ABSTRACT

INTRODUCTION

MATERIALS AND METHODS

Non-destructive measurements

Postharvest measurements

Statistical analyses

RESULTS

Dry matter production

Number and weight of tillers, and leaf size

Evapotranspiration and water use efficiency

Physiological parameters

DISCUSSION

Growth and water

Canopy morphology

Physiological parameters

Environment and genetic material

CONCLUSIONS

REFERENCES

RESEARCH ARTICLE

# Morpho-physiological responses of tall wheatgrass populations to different levels of water stress

Celina I. Borrajo <sup>1\*</sup>, Adela M. Sánchez-Moreiras, Manuel J. Reigosa

Department of Plant Biology and Soil Science, Faculty of Biology, University of Vigo, Vigo, Pontevedra, Spain

<sup>1</sup> Current address: Agricultural Experimental Station Cuenca del Salado, National Institute of Agricultural Technology, Rauch, Buenos Aires, Argentina.

\* [borrajo.celina@inta.gob.ar](mailto:borrajo.celina@inta.gob.ar)



 OPEN ACCESS

**Citation:** Borrajo CI, Sánchez-Moreiras AM, Reigosa MJ (2018) Morpho-physiological responses of tall wheatgrass populations to different levels of water stress. PLoS ONE 13(12): e0209281. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209281>

**Editor:** Adrien Sicard, Swedish University of Agricultural Sciences, SWEDEN

**Received:** August 6, 2018

**Accepted:** December 3, 2018

**Published:** December 17, 2018

**Copyright:** © 2018 Borrajo et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was financially supported by the Department of Plant Biology and Soil Science, Faculty of Biology, University of Vigo. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Abstract

Tall wheatgrass [*Elymus elongatus* subsp. *ponticus* (Podp.) Melderis] is a perennial forage grass cultivated in dry, saline or alkaline environments. The morpho-physiological characteristics of four populations of tall wheatgrass from different climatic-edaphic origins were evaluated under three conditions of water stress (100%-50%-30% of field capacity). The trial was analyzed with three replicates and two-factor ANOVA in pots within the greenhouse during 35 days. Only dry matter and tiller number showed interaction between populations and water conditions. The most relevant changes in morpho-physiological parameters under strong water stress were reduced dry matter production (48–32% differing among populations), smaller leaf and tiller size (46% and 28%), together with higher water use efficiency (74%), and increased proline and protein contents (144% and 71%), smaller tiller number (30–11% differing among populations) and a slight decrease in leaf water content (3%). The populations differed in growth strategies and morpho-physiological mechanisms to survive water stress, which could be related to their habitat background. The study shows the stability in dry matter production under all levels of water stress, which can be related to the higher tiller number. Due to this plasticity, tall wheatgrass should be studied as a species with great potential to adapt to drought stress.

## Introduction

Tall wheatgrass [*Elymus elongatus* (Host) Greuter subsp. *ponticus* (Podp.) Melderis syn. *Thinopyrum ponticum* (Podp.) Barkworth & D.R. Dewey (2n = 10x = 70)], is a C3 *Poaceae* species, original from dry or saline habitats of Southeastern Europe [1]. Tall wheatgrass is a perennial grass of high phenotypic plasticity used as fodder for livestock feeding in environments with climate-edaphic limitations of Australia [2], Argentina [3–4], Canada and USA [5]. Also, tall wheatgrass has become important due to its genetic relationship with wheat and its potential as gene source for resistance to diseases and tolerance to abiotic stress [6–8].

Tall wheatgrass was introduced in Argentina during the 1950s. It is cultivated in more than 500,000 ha of the Depressed Pampa of Buenos Aires, Argentina, in temperate-humid climate

under salinity, alkalinity, winter flooding, and summer drought conditions [3–4]. Currently, tall wheatgrass is naturalized in several environments in Argentina [4, 9], and displays agronomic variability among populations from different environments of the Pampa Region [10]. Due to this plasticity, tall wheatgrass should be studied as a species with great potential to adapt to climate change and may have great potential for increasing the forage production in saline and arid areas [3–4, 11].

Climate change will cause episodes of water deficit with greater frequency and intensity, reducing the productivity of agroecosystems. Water deficit in plants causes different responses depending on the intensity and duration of the stress, as well as variations according to species, genotype and phenological stages [12–13]. The response of the plant results in changes of growth, development, morphology, physiology, cell adaptations and osmotic adjustment mechanisms, such as the synthesis of solutes, as proline, or specific proteins, which are essential to overcome stress [14–16]. Water stress usually results in reduced protein content and increased proline in plants [17]. Some authors mention that proline accumulation could be a symptom of damage to the plant [17], but other authors link it to osmoregulation and osmoprotection mechanisms [12]. More recent reports show proline as a multifunctional amino acid essential for adapting to, recovering from and indicating environmental stress [16].

Grass breeding improvement programs seek to increase the aerial biomass production and drought tolerance. However, the main mechanism to moderate water use under drought stress is the reduction in the size of the plant, leaf area and tillering, which limit yield potential [15]. Germplasm evaluation of forage species for improvement purposes has been traditionally based on phenotypical characteristics, and the study of molecular, genomic or metabolomic resources has been limited [18–19]. More research on forage cultivars is needed to identify metabolic traits and pathways that confer drought tolerance, and this research should be integrated with plant physiology and genetics [14, 19]. These studies are not easily translated to perennial forage species as most of these metabolic analyses have been performed with cereals or annual species [19].

The evolution and genome composition of tall wheatgrass have been studied through comparisons of species relationships and hybridizations with wheat [7–8]. Nevertheless, the existence of intra-specific variability in water stress tolerance has not been widely explored for tall wheatgrass. Although, survival, morphology, production and quality parameters of tall wheatgrass genotype in saline, alkaline or neutral environments have been described [5–6, 10–11, 20–22], there are few research studies about the physiological mechanisms responsible for this behaviour [7, 23–25]. It is essential to evaluate the germplasm including the production and physiological perspectives, so that the characteristics of interest can be selected with greater precision. The knowledge of these responses in *Elymus elongatus* subsp. *ponticus* would provide new tools to discover the most adapted germplasm to water stress imposed by climate change. Therefore, the main objective of this work was to evaluate the impact of water stress on the morpho-physiological characteristics of *Elymus elongatus* subsp. *ponticus*, analyzing populations from different climatic-edaphic origins during 35 days.

## Materials and methods

The experiment was conducted in pots at the greenhouse located at the Campus Lagoas-Marcosende of the University of Vigo, Spain (42°10'0.38"N, 8°41'3.37"W), with natural light (15/9 h light/darkness) and an average air temperature of 22.7°C, with maximum temperatures of 30.0°C and minimum temperatures of 15.5°C (day/night). Water stress was established at different water levels, based upon the field water capacity for each pot. Field water capacity was estimated according to the definition of Soil Science Glossary Terms Committee [26] as the

content of water, on a mass or volume basis, remaining in the soil 2 or 3 days after having been wetted with water and after free drainage is negligible. Field capacity in pot was considered as the content of water of the soil humid portion, after the excess of water has been drained (waterlogging) and the loss speed has been reduced to a significant degree (100% water at field capacity). Three water levels (WL) were established in 100%, 50% and 30% of field capacity, simulating three levels of water stress: no stress, moderate, and severe stress (WL: 100<sub>WL</sub>, 50<sub>WL</sub>, 30<sub>WL</sub>, respectively). The water levels were maintained by weighting the pots every 2.5 days, and adding the amount of water lost by evapotranspiration (adapted from [27]).

The naturalized populations of tall wheatgrass [*Elymus elongatus* (Host) Greuter subsp. *ponticus* (Podp.) Melderis syn. *Thinopyrum ponticum* (Podp.) Barkworth & D.R. Dewey (2n = 10x = 70)] were provided by the Active Germplasm Bank of Balcarce Agricultural Experimental Station of the National Institute of Agricultural Technology, Argentina (BAL). In this work, four populations (labeled P3, P4, P5, P9 [Table 1]) were selected from a large seed collection, considering the habitat backgrounds and the availability of seeds from BAL. Populations were selected by contrasting clima-edaphic environments of the Argentine Pampa, from semi-arid to temperate oceanic climate, and alkaline and neutral soils. Seeds were germinated in chambers (30°/20°C and 8/16 h light/darkness), and the seedlings were grown in greenhouse in small pots with peat as substratum (Compo Sana Universal R peat), for 24-days prior to being transplanted to test pots.

The experiment was laid out as a randomized complete block design with three replicates and two factors. One factor was the four populations (Popu) and the other was the three water levels (WL). The experimental unit was a pot. Each pot (1 L) was filled up to three-quarters of its capacity with peat as substratum (Compo Sana Universal R peat), and transplanting three seedlings of one tiller per pot. The experiment was started with plants in the seedling stage and finished with the plants in vegetative state. The duration of the experiment was set at 35 days because the largest area of tall wheatgrass pastures, which is found in the Depressed Pampa [3–4], shows temporary droughts of less than one month.

### Non-destructive measurements

Two non-destructive variables were periodically measured. The number of tillers per plant (3 plant per pot) was recorded every week, totaling 4 records (time = 4). The tiller number was expressed in tillers pot<sup>-1</sup>.

**Table 1. Collection data of tall wheatgrass populations from Active Germplasm Bank of Balcarce Agricultural Experimental Station of the INTA, Argentina (BAL).**

Population	P3	P4	P5	P9
Collection BAL <sup>a</sup>	Nu+Alo338	CIB118	CIB117	CIB114
Nearest town, province.	Necochea, Buenos Aires.	Lamarque, Río Negro	Lamarque, Río Negro	Bahía Blanca, Buenos Aires.
Latitude	38°30'S	39°24'S	39°24'S	38°44'S
Longitude	58°45'W	65°36'W	65°36'W	62°33'W
Climate	Temperate oceanic	Semiarid	Semiarid	Temperate transitional
Soil <sup>b</sup> ,	<i>Argiudolls</i>	<i>Torrifluvents</i>	<i>Torrifluvents</i>	<i>Haplustolls</i>
pH.	Neutral, pH ≈ 7.0	Alkaline, pH: 9.0	Neutral, pH: 7.5	Alkaline, pH: 9.5
Precipitation	900 mm year <sup>-1</sup>	300 mm year <sup>-1</sup>	300 mm year <sup>-1</sup>	500 mm year <sup>-1</sup>
Environment	Roadside grassland.	Grassland, with <i>Distichlis spicata</i>	Roadside of irrigated fields, 450 mm year <sup>-1</sup>	Grassland, with <i>Distichlis spicata</i> .

<sup>a</sup> Collector's code (Nu, Alo, CIB) and entry number.

<sup>b</sup> Great Group, Soil Taxonomy.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209281.t001>

Evapotranspiration (ET) was calculated in each pot and was estimated using the equation:

$$ET = [(Irrigated\ pot\ weight) - (Postirrigated\ pot\ weight)]$$

ET was calculated as the difference between the weight of the newly irrigated pot and the weight of the pot 2.5 days later. ET was measured in  $g\ H_2O\ pot^{-1}$  and was expressed in  $mL_{H_2O}\ pot^{-1}$ . ET was recorded in 13 different times.

Accumulated evapotranspiration was then calculated as

$$ET_{Accu} = \sum_{ET=1}^{13} ET$$

### Postharvest measurements

Once the experiment was finished, the aboveground biomass was harvested and the following parameters were measured. The production of fresh and dry matter (FM and DM,  $g\ pot^{-1}$ ), where FM is the fresh weight of the forage and DM is the weight estimated after drying the forage at  $50^{\circ}C$  to constant weight. Leaf water content was estimated using the equation:

$$LWC\ (\%) = \frac{(FM - DM)}{FM} * 100$$

Water use efficiency was expressed in  $mg\ mL^{-1}_{H_2O}$  and was calculated using the equation:

$$WUE = \frac{DM}{ET_{Accu}}$$

Tiller weight was expressed in  $g\ tiller^{-1}$  and estimated using the equation:

$$Tiller\ weight = \frac{DM}{Density}$$

where Density is the tiller number per pot in the 4th week.

Leaf blade length (cm), width (cm) and area ( $cm^2$ ) were recorded from the last developed leaf of 3 tillers per pot (Llength, Lwidth, Larea, respectively); using the ImageJ program [28]. The specific leaf area, SLA ( $cm^2\ g^{-1}$ ) was estimated based on the ratio between area and dry mass of the leaves.

Two samples of leaves were also frozen at  $-80^{\circ}C$  to analyze the content of soluble protein (100 mg FM) and free proline (250 mg FM). Protein content quantification was determined by the Bradford method and expressed in  $mg\ g^{-1}_{DM}$  [29]. Free proline content was determined according to the Bates method and expressed in  $\mu mol\ g^{-1}_{DM}$  [30]. Furthermore, the relative proline content (Pro Rel) was calculated as the difference in the concentration of free proline between the stress treatment and the control, using the equation:

$$ProRel_{WLx} = \frac{([Proline]_{WLx} - [Proline]_{100WL})}{[Proline]_{100WL}} * 100$$

where [Proline] is the proline concentration, WLx is the stress treatment: moderate ( $50_{WL}$ ) or severe ( $30_{WL}$ ), and  $100_{WL}$  is the control (unstressed plants).

### Statistical analyses

Dry matter, accumulated evapotranspiration, water use efficiency, tiller weight, length, width and area of the leaf, leaf water content, specific leaf area, free proline and soluble protein were analyzed with two-factor ANOVA. Tillers were analyzed with two-factor ANOVA and

measures were repeated over time. Block was used as random effect. The comparisons of means were made with least significance difference (LSD) test (LSMEANS statement). In all cases a 5% probability level and Proc Mixed were used [31]. ET\_Accu, proline, protein and tiller number did not present variance homogeneity and normally distributed data, so they were logarithmically transformed to be analyzed. The Pearson correlation coefficient was calculated in some pairs of variables, using the corr procedure of SAS.

## Results

Water level was the variable that affected the physiological parameters measured in this study most, with significant differences in all of them ( $p < 0.05$ ). The four populations responded differently to water stress showing different values for dry matter, water use efficiency, tiller weight, leaf width and area, leaf water content, proline and protein contents and tillers ( $p < 0.05$ ), and similar values for accumulated evapotranspiration, leaf length and specific leaf area ( $p > 0.05$ ). Only dry matter and Tillers showed significant interaction between water levels and populations ( $p < 0.05$ , [S1 Table](#) and [S2 Table](#)). At the end of the experiment plants were in vegetative state developing leaves and tillers for all water levels and populations.

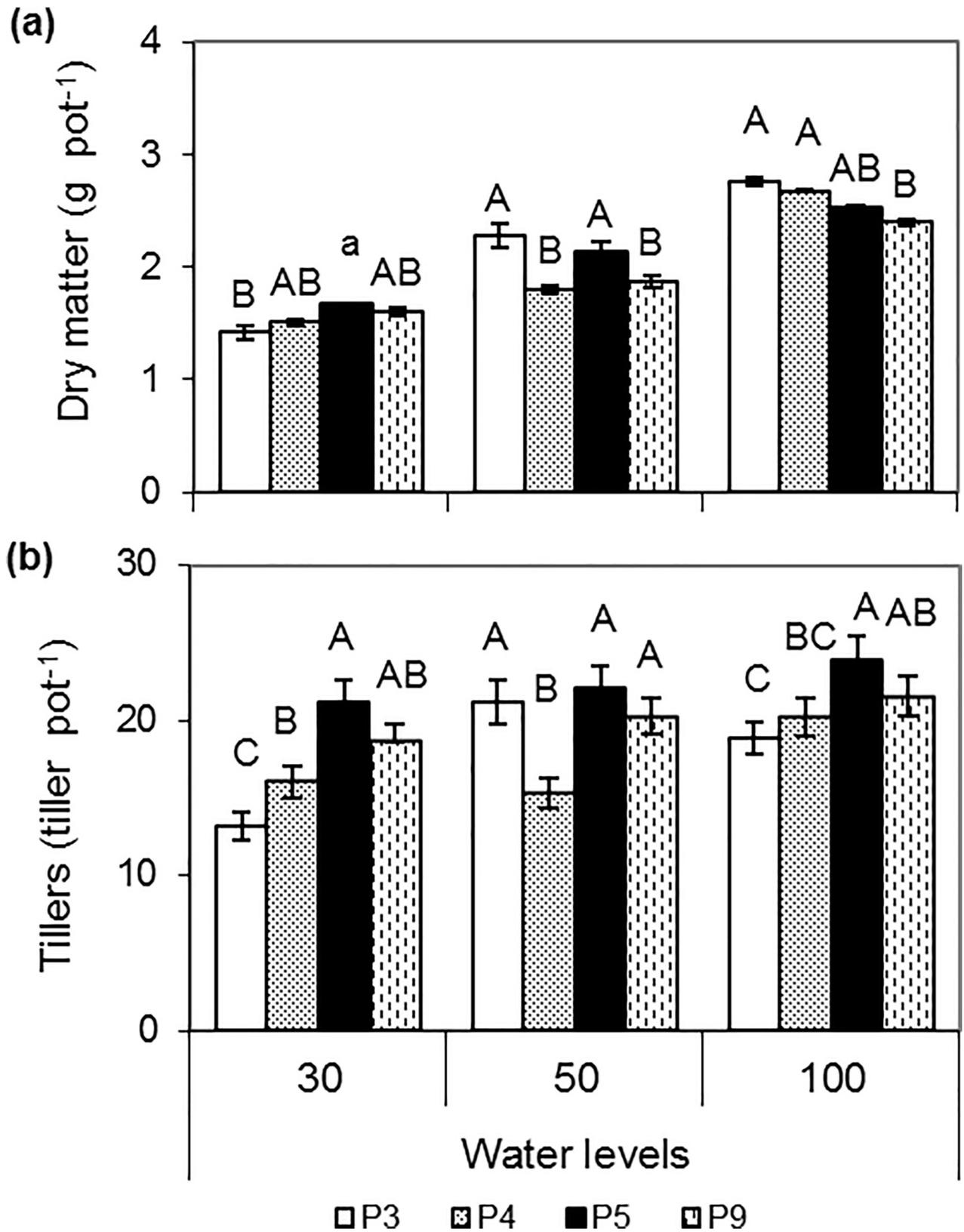
### Dry matter production

In general, dry matter values decreased due to the restriction of water levels, but populations responded differently to water levels (interaction WCxPopu  $p = 0.0003$ ). The interaction was examined by comparing the means among populations at each water level ([Fig 1A](#)). P3 was the population with the highest values of dry matter in no stress and moderate stress levels ( $100_{WL}$  and  $50_{WL}$ ), but with the lowest in values of severe stress ( $30_{WL}$ ). P5 was the population that grew most under severe stress, significantly differing from P3. However, no differences were found between P5 and P3 under moderate stress or optimal conditions (no stress). P4 and P9 were the populations with the lowest values of growth under moderate water stress, while showed intermediate values under severe stress. However, growth of these populations differed under optimal conditions as P4 showed low values and P9 high values of growth. Dry matter production under severe stress was reduced depending on the populations as follows: 48% in P3, 44% in P4, 34% in P5 and 32% in P9, compared to DM under no stress.

### Number and weight of tillers, and leaf size

Tiller number of each population responded differently to water levels (interaction WCxPopu  $p < 0.0001$ ). As showed by the means comparison among populations at each water level ([Fig 1B](#)). P5 developed more tillers per plant at all water levels, while P3 showed the lowest number, except for plants grown under moderate stress, where P3 did not differ significantly from P5. Tiller number under severe stress decreased depending on the population as follows: 30% in P3, 21% in P4, 14% in P9 and 11% in P5, compared to the tillers in no stress. In general, considering the significance in the interaction and the % reduction shown in the tiller number, P9 was more similar to P5, while P4 was closer to P3. The amount of tillers increased with the duration of the experiment, with significant differences among weeks ([S1 Fig](#)).

Tiller weight was significantly lower at higher water stress levels, decreasing 28% from  $100_{WL}$  to  $30_{WL}$ . P3 and P4 populations had tillers with greater weight than P9 and P5 ([Fig 2A](#)). Leaf length, width and area were positively related to water level. The control treatment ( $100_{WL}$ ) showed the highest values which did not differ significantly from moderate stress ( $50_{WL}$ ). However, under severe stress ( $30_{WL}$ ) leaf length, width and area decreased 40%, 23% and 46% respectively, compared to control ([Fig 2B](#), [2C](#) and [2D](#), respectively). P3 showed





**Fig 1. Variation of dry matter production (a) and tiller number (b) according to interaction between water levels and populations (P3, P4, P5, P9).** Bars with different letters show significant differences ( $P < 0.05$ ) among populations for each water level ( $n = 3$  in DM and  $n = 12$  in tillers). The vertical line above the bar indicates the mean standard deviation.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209281.g001>

significantly higher leaf width and area and leaf and tiller size, standing out among the populations, while P5 showed the highest tiller production at all water levels.

Considering the germplasm assessment, two groups could be established according to canopy morphological patterns: P3 and P4 with larger weight and lower number of tillers, and P5 and P9 with smaller weight and higher number of tillers (Fig 3).

### Evapotranspiration and water use efficiency

Accumulated evapotranspiration increased with water level (19, 33 and 57 mL day<sup>-1</sup> in 30<sub>WL</sub>, 50<sub>WL</sub> and 100<sub>WL</sub>, respectively), but no significant differences were found among populations (Fig 4A). Water use efficiency was negatively related to water availability, with maximum values in plants grown under severe stress (30<sub>WL</sub>). Among the populations, P5 showed the highest values but did not differ significantly from P3 (Fig 4B).

### Physiological parameters

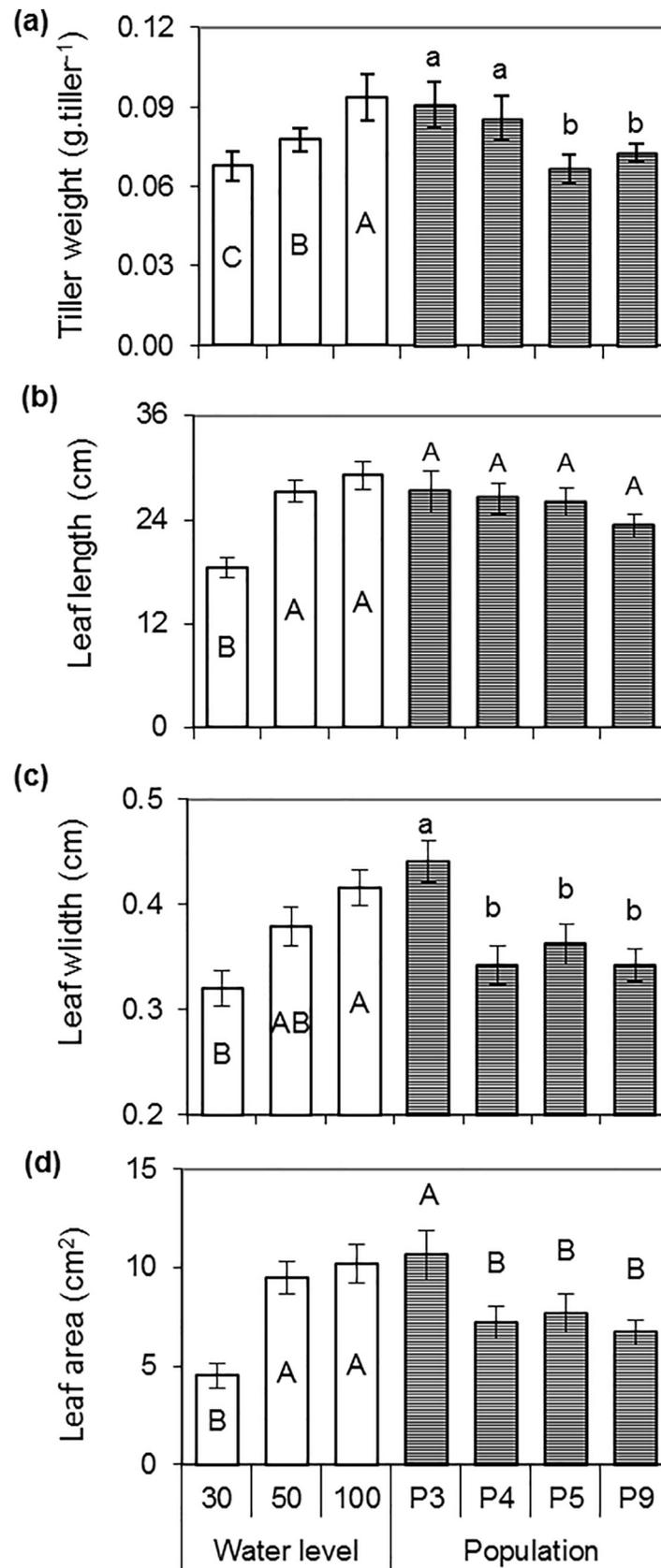
The specific leaf area was positively related to water level, with values that were significantly lower under stronger water stress. There were no differences among populations for this attribute (Fig 5A). Leaf water content (%) was significantly higher in plants under optimal conditions and under moderate stress, while the amount of water retained in the tissues under severe stress was significantly lower. P3 showed significantly more water in the tissues than the other populations (Fig 5B). Moreover, soluble protein concentration was 43% higher in the treatments with water stress (moderate and severe stress), compared to control (100<sub>WL</sub>), with P3 showing the highest protein contents, while P4 and P9 showed the lowest (Fig 5C).

Free proline content significantly increased up to 50% with water stress. The P9 population showed the highest content while P4 showed the lowest proline contents (Fig 5D). The correlation between dry matter and free proline was estimated with a coefficient of -0.58017 ( $p = 0.0003$ ,  $N = 36$ , S2 Fig). Our results also showed a better correlation between dry matter and relative proline content (ProRel), with a coefficient of -0.70797 ( $p = 0.0001$ ,  $N = 36$ , S3 Fig), which is not higher because P4 showed low values of proline at all water levels (S4 Fig).

## Discussion

### Growth and water

In general, the results showed a strong impact of water stress on tall wheatgrass populations. The interaction between water levels and populations revealed differences in dry matter production, with more stable populations, as P5, and less stable ones, as P3. The impact of water level resulted in a decrease in dry matter production, and a decrease in water loss by evapotranspiration with reduced water levels. This was related to increasing water use efficiency under severe stress. The decrease in dry matter was related to reduced leaf size, limiting water loss and photosynthesis, under water deficit [13, 15, 32]. Greater water use efficiency due to increasing stress was also reported for other perennial grasses from dry and/or saline soils [17, 33–34]. To achieve higher water use efficiency under severe water stress, smaller leaf areas and higher photosynthetic activity have been observed [17], maintaining RubisCO and chlorophyll content at healthy levels [33]. However, this advantage could not be maintained if water stress persists, according to Pedrol et al. [27], who found that the strong net photosynthetic rate, of



**Fig 2. Variation of tiller weight (a), leaf length (b), leaf width (c), leaf area (d) according to water levels and populations.** Bars with different letters show significant differences among means ( $P < 0.05$ ), populations ( $n = 9$ ) or water level ( $n = 12$ ). The vertical line above the bar indicates the mean standard deviation.

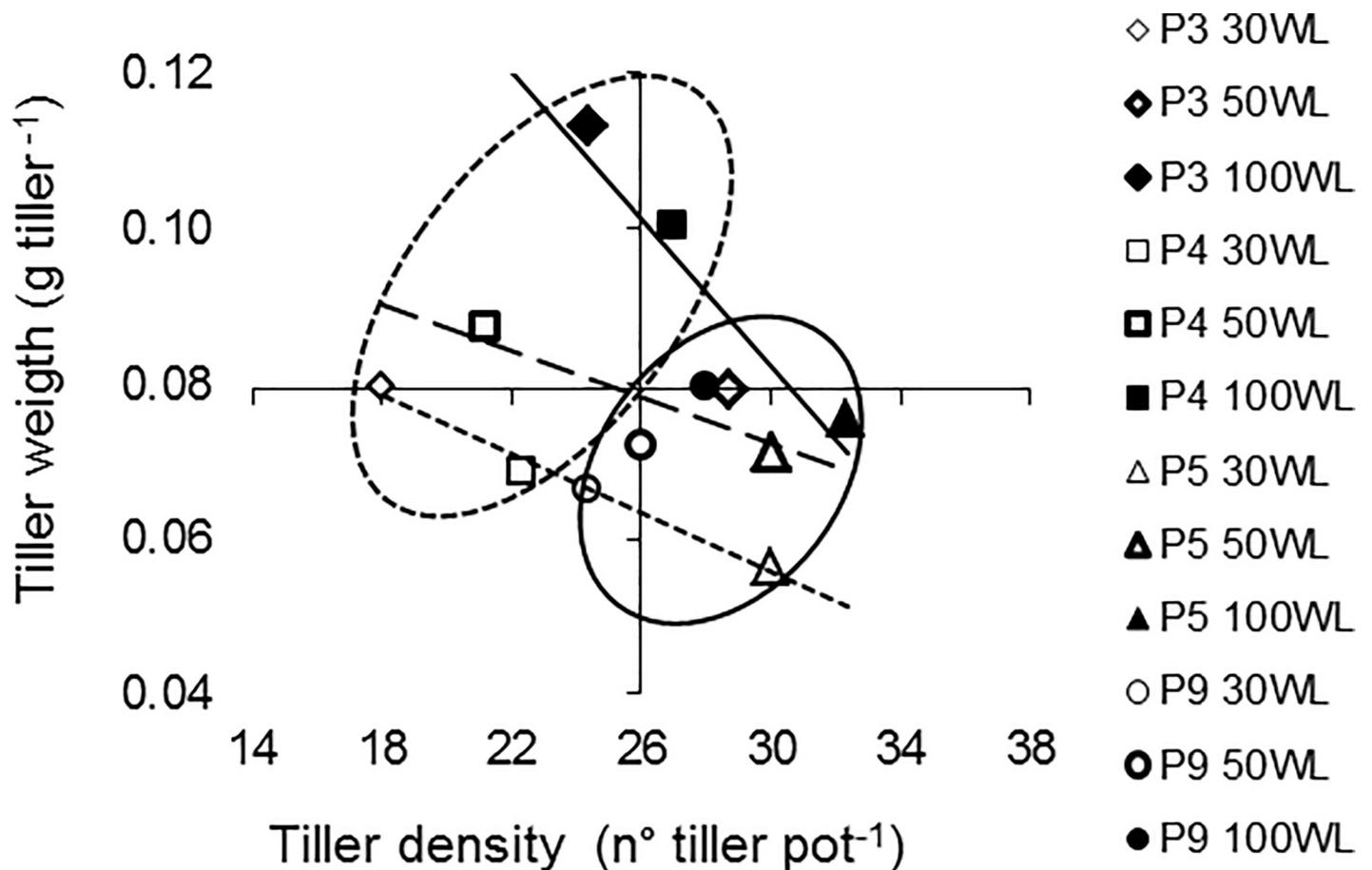
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209281.g002>

*Holcus lanatus L.* after 45 days of moderate to severe water stress, decreased when the stress persisted for 90 days. Therefore, monitoring photosynthetic rate during longer water stress periods could be of interest for tall wheatgrass under these same water levels.

The leaf water content results showed that *Elymus elongatus* subsp. *ponticus* is a species well adapted to drought conditions, retaining a similar proportion of water in its tissues when grown under optimal conditions or moderate water stress. Leaf water content slightly decreased when plants were grown under severe stress, similarly to what was reported for *Phragmites australis* [33]. As well, relative water content of *Elymus elongatum*, control plants was very stable but it considerably fell due to severe stress [25]. This was also found mentioned for other perennial grasses [17, 35].

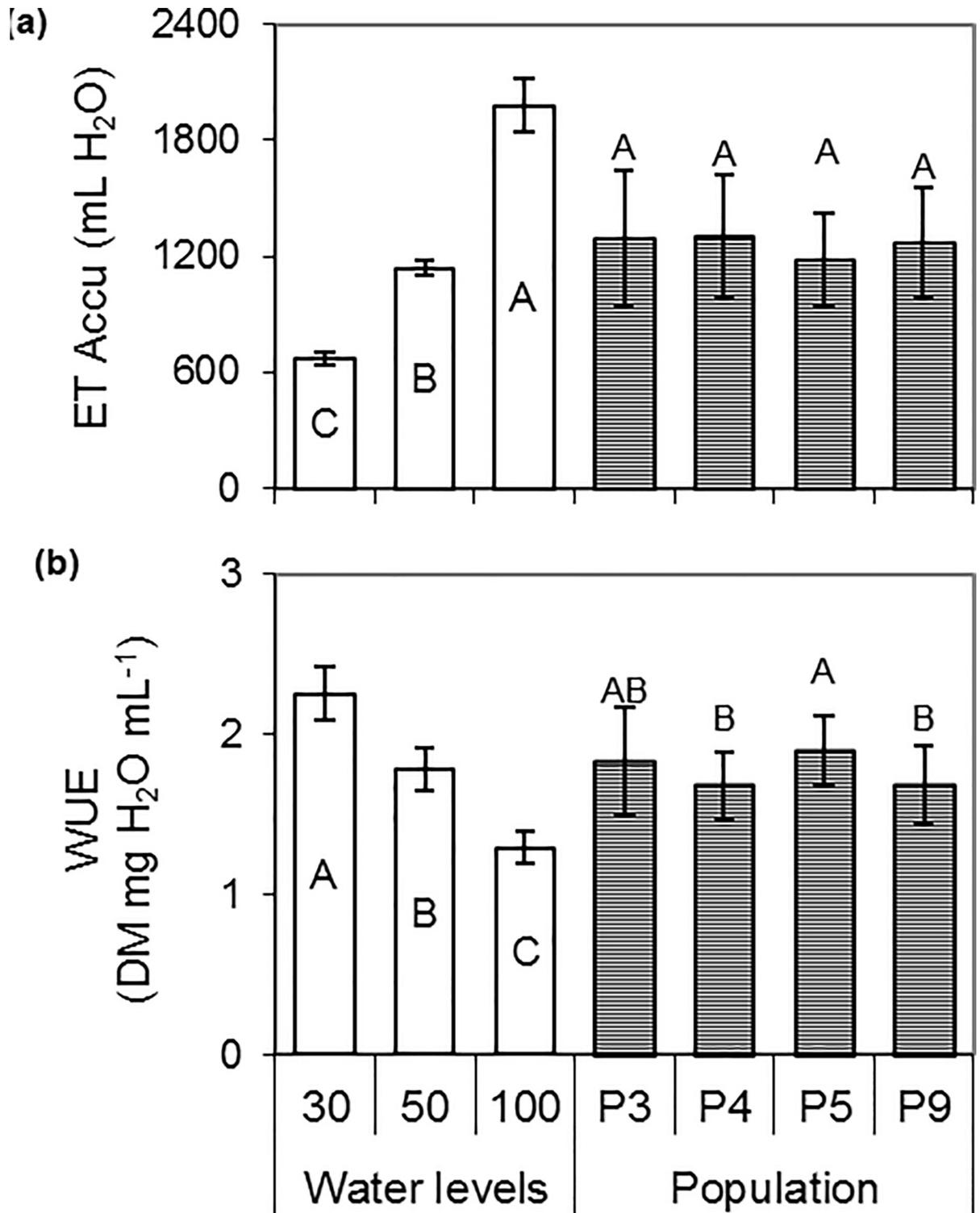
### Canopy morphology

The growth of grass in the vegetative can be measured in structural variables of the canopy including leaf size, number and weight of tillers [36]. Increases in water stress determined



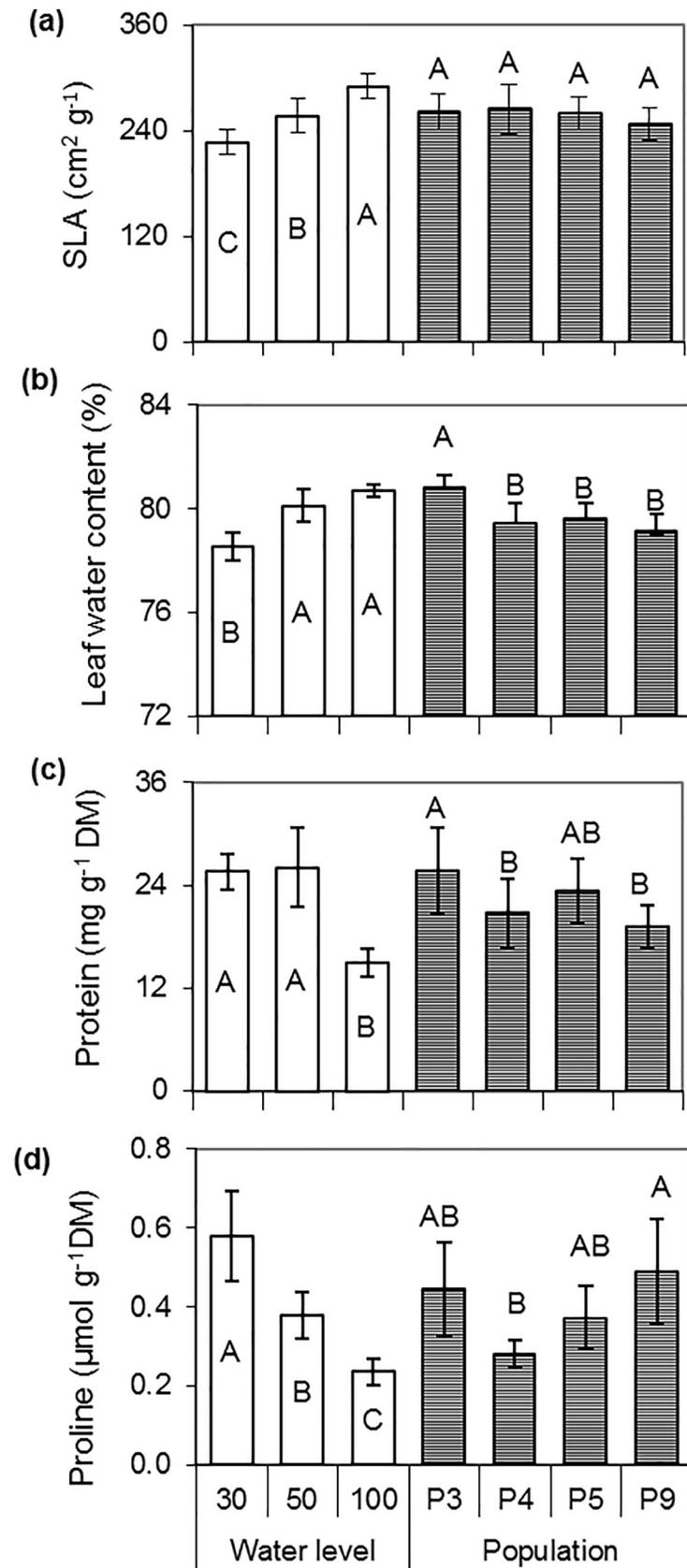
**Fig 3. Relationship between density and weight of tillers (axes in average values) for the populations (P3, P4, P5, P9) under different water levels (WL: 100, 50, 30).** Each symbol is the mean of  $n = 3$ . The circles enclose populations with similar canopy morphological pattern (cut line, P3 and P4 with bigger size and fewer tillers, and continuous line, P5 and P9 with smaller size and more tillers). The lines between density and weight of tillers show the response of populations watered with the same water level (100WL continuous line, 50WL cut line and 30WL dotted line).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209281.g003>



**Fig 4. Variation of accumulated evapotranspiration ET\_Accu (a) and water use efficiency WUE (b) according to water levels and populations.** Bars with different letters show significant differences among means ( $P < 0.05$ ) for populations ( $n = 9$ ) or water level ( $n = 12$ ). The vertical line above the bar indicates the mean standard deviation.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209281.g004>



**Fig 5. Variation of specific leaf area (SLA, a), leaf water content (b), soluble proteins (c), and free proline (d) according to water levels and populations.** Bars with different letters show significant differences among means ( $P < 0.05$ ) for populations ( $n = 9$ ) or water level ( $n = 12$ ). The vertical line above the bar indicates the mean standard deviation.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209281.g005>

restrictions to dry matter variables (number and weight of tillers, and length, width and area of leaves). The reduction of leaf size is an early response to water deficit, determined by a lower cell expansion rate [17, 32, 37–39]. In this study, leaf and tiller sizes diminished remarkably with the reduction of water levels, similarly to that reported for other grasses [27, 33–34, 40]. When comparing the values between optimal conditions and severe water stress, the reduction in dry matter and leaf width was lower in this study than for other studies previously reported for another wheatgrass, *Elymus elongatum* [25]. However, the number of tillers was only reduced for some populations under the most severe water stress conditions. This is similar to other perennial grasses, in which reduction of leaf expansion was more pronounced than tillering due to low water potentials [37, 41]. Therefore, the impact of water stress on the reduction of tillering was lower than on biomass production, in concordance with results reported by Durand et al. [38] for *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea*. The differential response among the structural variables under water stress suggests that plants give priority to generate individuals at the expense of diminishing their size or/and weight. Therefore, the population with the highest number of tillers would be the most stable in dry matter production.

However, in moderate or no stress conditions, the responses of P3 and P5 populations was very interesting, with similar aerial biomass production levels but different growth strategies, compensating size with tiller density. Similar results of dry matter production with different canopy morphological patterns were also found when comparing tall wheatgrass of different origins in field conditions [20, 22], and between cultivars of other forage species [36].

For these reasons, the interaction between populations and water levels for the production of dry matter cannot be explained with the same canopy morphological patterns. The present study shows that the more stable populations in dry matter production, P5 and P9, are also the populations with lower variations in tiller density in response to water stress, while P3 is the most variable.

To group populations according to the canopy structure would allow selecting materials for different purposes, i.e. the relatively large size of P3 and P4 can make them suitable for the manufacture of hay, while the greater tillering of P5 and P9 can be very useful for grazing pasture.

## Physiological parameters

Lower specific leaf area observed when increasing water stress, as found in our study, was also reported for other grasses [37]. This behaviour could be explained by the reduction of leaf area as a consequence of the inhibition of cell expansion determined by the loss of turgidity and/or elasticity of the cell wall [17, 32, 39]. Up to the first 45 days, smaller cells would be more able to maintain leaf turgidity and photosynthetic activity under severe water stress [27]. Osmotic adjustment is a key mechanism of plants to maintain water uptake and pressure of the cell wall under drought conditions, keeping the stomata open and maintaining photosynthetic rate, leaf expansion, and plant growth [13, 40]. According to that, higher contents of proline and soluble proteins were found in our study when increasing water stress, similarly to reported for other grasses [25, 27, 35, 42].

Water stress usually results in reductions of protein content associated with reduced photosynthetic activity [13, 43]. Therefore, an increase in this parameter suggests tolerance of tall wheatgrass to water stress. The increase of protein content has been associated in *Holcus*

*lanatus* with higher nitrogen reserves, overexpression of RubisCO and the capacity to maintain photosynthetic activity in severe water stress situations [27], while in *Elymus elongatum* it was linked to higher concentrations of heat shock proteins, chaperones and oxidative stress defense enzymes [25].

Proline has been also found to accumulate in many other plant species as a response to stress [12, 16]. Some authors have previously mentioned that proline could be in grasses a symptom of damage to the plant [17], while other authors link it to osmoregulation and osmoprotection [25, 35]. The increase in proline content found in our water stress treatments was not due to protein degradation, as protein levels also increased, which is similar to what was reported for other grasses [27, 42]. In this study, the populations with the highest proline concentrations were not always those with the highest dry matter production. In other close wheatgrass, a low relation between saline stress tolerance and free proline content at the intra-specific level was also found [23]. More recent studies suggest that the most important factor for stress protection is the increase in proline biosynthesis rate [16, 35]. This could explain the correlation between relative proline content and dry matter. These results suggest that increased proline accumulation can be an important component of the response of tall wheatgrass to water stress. However, this increase was not strong enough to explain the response to this stress on its own [17, 23], but it could be a variable to be studied to select water stress tolerant germplasm [16] in tall wheatgrass.

## Environment and genetic material

Grass breeding improvement programs seek to increase aerial biomass production and drought tolerance. However, the main mechanism to moderate water use under drought stress is the reduction of plant size, leaf area and tillering, and these mechanisms limit yield potential [15]. Dry matter production of the different populations of tall wheatgrass showed interaction between germplasm and water stress level, which could be related to the adaptation or acclimation of the populations to the original environments. The habitat background of the populations shows different intensity of water stress. Considering the climatic and edaphic environmental conditions such precipitation and irrigation (the latter just in P5), or the availability of water in the soil (higher alkalinity, greater osmotic potential, lower availability), they could be ordered from greater to lower exposure to water stress as follows  $P4 > P9 > P5 > P3$ .

P3, collected from humid temperate climates with short summer droughts, showed a great production of dry matter under no or moderate water stress. Its growth strategy was maintaining bigger leaves and tillers size, with high water use efficiency, and the highest levels of proline, protein, and leaf water content. However, P3 had the lowest dry matter and tiller density under severe water stress, suggesting that this population limits, more than other populations, aerial growth to survive under water stress conditions.

P5 was collected at a site close to P4, with semi-arid climate but neutral soil and availability of irrigation water. It showed high aerial biomass production with high water use efficiency at all water levels evaluated. Its growth strategy was maintaining a high tiller density whilst reducing leaf and tiller size, and increasing concentrations of proline and proteins. This suggests that P5 has morphological and physiological mechanisms adapted to grow in situations with and without water stress.

Finally, P4 and P9 were collected from climate-edaphic environments with strong water stress (semi-arid climate in P4 or temperate transitional climate in P9, and both in alkaline soils). These populations could have developed mechanisms to minimize evaporation through different growth strategies (size or density of tillers) and so reduce aerial biomass. This is in contrast to the lowest water use efficiency that we found for these plants. Finally, proline

contents were different in P4 and P9, with much higher values in P9 than in P4, suggesting different acclimation mechanisms. This could be due to the fact that P4 was collected in a climate of permanent water stress, while P9 came from an environment with alternating periods of stress. The increase in proline concentration as a strategic mechanism to tolerate stress would be secondary in P4, while in P9, as in the other populations, would be very important.

In summary, the stability in dry matter production in the different populations seems to be connected to the capacity to maintain tillering (high tiller density) under the different situations of water stress. Also, variability in tiller density was characteristic of each germplasm, irrespective of the intensity of water stress of the original environment of the populations.

## Conclusions

*Elymus elongatus* subsp. *ponticus* responded differently depending on the germplasm and the water stress conditions applied during 35 days. The most relevant changes under strong water stress are summarized in a lower aerial biomass production, smaller leaf and tiller sizes, together with a higher water use efficiency, and higher proline and protein contents, with a slight decrease in leaf water content and smaller tiller number in some populations. All these results can be seen as indicators of the tolerance of this species to water stress. However, dry matter and tiller number depended on the population and the level of water stress. At the intraspecific level, the populations differed in their growth strategies and their morpho-physiological mechanisms to survive water stress. This could be related to their habitat background, as every population shows different strategies of adaptation or acclimation to new environments. The study shows that greater stability in dry matter production can be related to higher tiller number.

## Supporting information

**S1 Table. Dry matter per pot, accumulated evapotranspiration (ET\_Accu), water use efficiency (WUE), tiller weight, length, width and area of the leaf (A), leaf water content (LWC), specific leaf area (SLA), proline and protein contents (B), results of two-factor ANOVA (N = 36).** Fixed effects: water levels (WL), populations of tall wheatgrass (Popu) and WLxPopu interaction. Probability values and significance are shown. ET\_Accu, proline and protein were transformed (logarithmically) to obtain variance homogeneity and normality. (PDF)

**S2 Table. Tiller number per pot, result of two-factor ANOVA with repeated measures (N = 144).** Probability values and significance are shown for water levels (WL), populations of tall wheatgrass (Popu), repeated measures over time (t) and their interactions. Data were transformed (logarithmically) to obtain homogeneity of variance. (PDF)

**S1 Fig. Tiller number per pot over time (n = 36). Bars with different letters indicate significant differences among weeks (P < 0.05).** The vertical line above the bar indicate the mean standard deviation. (TIF)

**S2 Fig. Proline accumulation as a function of dry matter per pot.** Symbols of different colors show different water levels (WL: 100, 50, 30). (TIF)

**S3 Fig. Relative proline content as a function of dry matter per pot.** Symbols of different colors show different water levels (WL: 100, 50, 30). (TIF)



**S4 Fig. Relative proline content as a function of proline accumulation of the control (100WL).** Means among populations (P3, P4, P5, P9) under different water levels (WL: 100, 50, 30) are shown (each symbol is the means of  $n = 3$ ). (TIF)

## Author Contributions

**Conceptualization:** Celina I. Borrajo, Manuel J. Reigosa.

**Data curation:** Celina I. Borrajo, Adela M. Sánchez-Moreiras, Manuel J. Reigosa.

**Formal analysis:** Celina I. Borrajo, Manuel J. Reigosa.

**Funding acquisition:** Adela M. Sánchez-Moreiras, Manuel J. Reigosa.

**Investigation:** Celina I. Borrajo.

**Methodology:** Celina I. Borrajo, Manuel J. Reigosa.

**Project administration:** Adela M. Sánchez-Moreiras, Manuel J. Reigosa.

**Resources:** Adela M. Sánchez-Moreiras, Manuel J. Reigosa.

**Visualization:** Celina I. Borrajo.

**Writing – original draft:** Celina I. Borrajo.

**Writing – review & editing:** Celina I. Borrajo, Adela M. Sánchez-Moreiras, Manuel J. Reigosa.

## References

1. Melderis A, Elymus L. In Tutin TG, Heywood VH, Burghes NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA (Eds.). *Flora Europea. V. Alismataceae to Orchidaceae (Monocotyledones)*. Cambridge (UK): Cambridge University Press; 1980. pp. 192–198.
2. Smith KF. Tall wheatgrass (*Thinopyrum ponticum* (Podp.) Z.W. Liu and R.R.C. Wang): A neglected resource in Australian pasture. *N Z J Agric Res.* 1996; 39: 623–627. <https://doi.org/10.1080/00288233.1996.9513222>.
3. Mazzanti A, Castaño J, Sevilla GH, Orbea JR. *Características agronómicas de especies y cultivares de gramíneas y leguminosas forrajeras adaptadas al sudeste de la provincia de Buenos Aires*. 1st ed. Balcarce (ARG): Centro Regional Buenos Aires Sur, INTA; 1992.
4. Maddaloni J, Ferrari L. *Forrajeras y pasturas del ecosistema templado húmedo de la Argentina*. 2nd ed. Argentina: INTA-Universidad Nacional Lomas de Zamora; 2001.
5. Scheinost P, Tilley D, Ogle D, Stannard M. Plant Guide for Tall Wheatgrass (*Thinopyrum ponticum*). In: Natural Resources Conservation Service, United States Department of Agriculture (Eds.). Aberdeen: USDA NRCS, IDPMC. 2008. Available from: [https://www.nrcs.usda.gov/wps/PA\\_NRCSCConsumption/download?cid=nrcseprd1375228&ext=pdf](https://www.nrcs.usda.gov/wps/PA_NRCSCConsumption/download?cid=nrcseprd1375228&ext=pdf).
6. McGuire PE, Dvoák J. High salt-tolerance potential in wheatgrass. *Crop Sci.* 1981; 21: 702–705. <https://doi.org/10.2135/cropsci1981.0011183X002100050018x>
7. Colmer TD, Flowers TJ, Munns R. Use of wild relatives to improve salt tolerance in wheat. *J Exp Bot.* 2006; 57: 1059–1078. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj124> PMID: 16513812
8. Ceoloni C, Kuzmanović L, Gennaro A, Forte P, Giorgi D, Grossi MR, et al. Genomes, chromosomes and genes of perennial Triticeae of the genus *Thinopyrum*: the value of their transfer into wheat for gains in cytogenomic knowledge and precision breeding. In: Tuberosa R., Graner A., Frison E. (Eds), *Advances in Genomics of Plant Genetic Resources*. Springer, Dordrecht (NL); 2014. pp. 333–358.
9. [BAL] Active Germplasm Bank of Balcarce. Agricultural Experimental Station of the National Institute of Agricultural Technology (INTA), Argentina; [accessed 2018, 1 March]. Available from: <https://inta.gob.ar/documentos/banco-activo-de-germoplasma-de-la-eea-balcarce>.
10. Alonso SI, Borrajo CI. Colecta y evaluación inicial de poblaciones de Agropiro alargado naturalizadas en la región pampeana Argentina. In: PROCISUR (Ed.) *Avances de investigaciones en recursos genéticos del Cono Sur II*, Montevideo, Uruguay; 2007. pp. 9–22. Available from: [repiica.iica.int/docs/B0515e/B0515e.pdf](http://repiica.iica.int/docs/B0515e/B0515e.pdf)

11. Roundy BA, Young JA and Evans RA. Germination of basin wildrye and tall wheatgrass in relation to osmotic and matric potential. *Agron. J.* 1985; 77: 129–135.
12. Bray EA. Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci.* 1997; 2: 48–54. [http://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)82562-9](http://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)82562-9)
13. Chaves MM, Flexas J, Pinheiro C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Ann Bot.* 2009; 103: 551–560. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn125> PMID: 18662937
14. Cattivelli L, Rizza F, Badeck FW, Mazzucotelli E, Mastrangelo AM, Francia E, et al. Drought tolerance improvement in crop plants: an integrated view from breeding to genomics. *Field Crops Res.* 2008; 105: 1–14. <http://doi.org/10.1016/j.fcr.2007.07.004>
15. Neumann PM. Coping mechanisms for crop plants in drought-prone environments. *Ann Bot.* 2008; 101: 901–907. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn018> PMID: 18252764
16. Szabados L, Savoure A. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci.* 2010; 15: 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.11.009> PMID: 20036181
17. Hessini K, Martínez JP, Gandour M, Albouchi A, Soltani A, Abdely C. Effect of water stress on growth, osmotic adjustment, cell wall elasticity and water-use efficiency in *Spartina alterniflora*. *Environ Exp Bot.* 2009; 67: 312–319. <http://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.06.010>
18. Zhang Y, Mian MAR and Bouton JH. Recent molecular and genomic studies on stress tolerance for forage and turf grasses. *Crop Sci.* 2006; 46: 497–511. <https://doi.org/10.2135/cropsci2004.0572>
19. Rasmussen S, Parsons AJ, Jones CS. Metabolomics of forage plants: a review. *Ann Botany.* 2012; 110(6): 1281–1290. <https://doi.org/10.1093/aob/mcs023> PMID: 22351485
20. Borrajo CI. Generación y expansión de los órganos foliares de agropiro alargado en función del material genético y disponibilidad de nitrógeno. M.Sc. Thesis.: Universidad Nacional de Mar del Plata, Balcarce, Argentina; 1998.
21. Vogel KP, Moore J. Forage yield and quality of tall wheatgrass accessions in the USDA germplasm collection. *Crop Sci.* 1998; 38: 509–512. <https://doi.org/10.2135/cropsci1998.0011183X003800020039x>
22. Borrajo CI, Alonso S. Germinación, emergencia e implantación de variedades experimentales de agropiro. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 2004; 24: 29–40. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/291345339\\_Germinacion\\_emergencia\\_e\\_implantacion\\_de\\_variedades\\_experimentales\\_de\\_agropiro](https://www.researchgate.net/publication/291345339_Germinacion_emergencia_e_implantacion_de_variedades_experimentales_de_agropiro)
23. Shannon MC. Testing salt tolerance variability among tall wheatgrass lines. *Agron. J.* 1978; 70: 719–722. <https://doi.org/10.2134/agronj1978.00021962007000050006x>
24. Johnson RC. Salinity resistance, water relations and salt content of crested and tall wheatgrass accessions. *Crop Sci.* 1991; 31: 730–734. <https://doi.org/10.2135/cropsci1991.0011183X003100030039x>
25. Gazanchian A, Hajheidari M, Sima NK, Salekdeh GH. Proteome response of *Elymus elongatum* to severe water stress and recovery. *J Exp Bot.* 2007; 58: 291–300. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl226> PMID: 17210992
26. Soil Science Glossary Terms Committee. Glossary of Soil Science Terms 2008. Madison: Soil Science Society of America, 2008.
27. Pedrol BN, Ramos TP, Reigosa MJ. Phenotypic plasticity and acclimation to water deficits in velvetgrass: a long-term greenhouse experiment. Changes in leaf morphology, photosynthesis and stress-induced metabolites. *J Plant Physiol.* 2000; 157: 383–393. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(00\)80023-1](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(00)80023-1).
28. Rasband WS; 2016. ImageJ 1.50i [Program file]. National Institutes of health, Bethesda, Maryland, USA, 1997–2016. [2016, 26 May]. Available from: <http://imagej.nih.gov/ij/>
29. Pedrol BN, Ramos TP. Protein content quantification by Bradford method. In: Reigosa Roger M.J. (Ed.) Handbook of Plant Ecophysiology Techniques. Netherlands (NL): Kluwer Academic Publishers; 2001. pp. 283–295.
30. Ramos TP, Pedrol BP. Free proline quantification. In: Reigosa Roger M.J. (Ed.) Handbook of Plant Ecophysiology Techniques. Netherlands (NL): Kluwer Academic Publishers; 2001. pp. 365–382.
31. SAS Institute. The SAS system for Windows. Release 9.1. SAS Inst., Cary, NC. 2002.
32. Neumann PM. The role of cell wall adjustments in plant resistance to water deficits. *Crop Sci.* 1995; 35: 1258–1266. <https://doi.org/10.2135/cropsci1995.0011183X003500050002x>
33. Pagter M, Bragato C, Brix H. Tolerance and physiological responses of *Phragmites australis* to water deficit. *Aquatic Bot.* 2005; 81: 285–299. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2005.01.002>
34. Hui D, Yu C-L, Deng Q, Dzantor EK, Zhou S, Dennis S, et al. Effects of precipitation changes on switchgrass photosynthesis, growth, and biomass: A mesocosm experiment. *PLoS ONE* 2018; 13(2): e0192555. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192555>. PMID: 29420600
35. Man D, Bao Y, Han L, Zhang X. Drought tolerance associated with proline and hormone metabolism in two tall fescue cultivars. *HortScience* 2011; 46:1027–1032.

36. Chapman DF, Lemaire G. Morphogenic and structural determinants of plant growth after defoliation. In: Baker MJ., Crush JR. & Humphreys LR. (Eds.) Proceedings of the XVII International Grassland Congress. Palmerston North (NZ): NZGA-TGS-NZSAP-ASAP-NZIAS; 1993; pp. 95–104.
37. van Loo EN. Tillering, leaf expansion and growth of plants of two cultivars of perennial ryegrass grown using hydroponics at two water potentials. *Ann Bot.* 1992; 70: 511–518. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a088511>
38. Durand JL, Gastal F, Etchebest S, Bonnet AC, Ghesquière M. Interspecific variability of plant water status and leaf morphogenesis in temperate forage grasses under summer water deficit. *Europ J Agron.* 1997; 7: 99–107. [https://doi.org/10.1016/S1161-0301\(97\)00021-X](https://doi.org/10.1016/S1161-0301(97)00021-X)
39. Thomas H, James AR, Humphreys MW. Effects of water stress on leaf growth in tall fescue, Italian ryegrass and their hybrid: rheological properties of expansion zones of leaves, measured on growing and killed tissue. *J Exp Bot.* 1999; 50: 221–231. <https://doi.org/10.1093/jxb/50.331.221>
40. Cyriac D, Hofmann RW, Stewart A, Sathish P, Winefield CS, Moot DJ. Intraspecific differences in long-term drought tolerance in perennial ryegrass. *PLoS ONE* 2018; 13(4): e0194977. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194977> PMID: 29617413
41. Turner LR, Holloway-Phillips MM, Rawnsley RP, Donaghy DJ, Pembleton KG. The morphological and physiological responses of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.), cocksfoot (*Dactylis glomerata* L.) and tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb., syn. *Schedonorus phoenix* Scop.) to variable water availability. *Grass Forage Sci.* 2012; 67: 507–518. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.2012.00866.x>
42. Fariaszewska A, Aper J, Van Huylbroeck J, Baert J, De Riek J, et al. Mild Drought Stress-Induced Changes in Yield, Physiological Processes and Chemical Composition in *Festuca*, *Lolium* and *Festulolium*. *J Agron Crop Sci.* 2017; 203: 103–116. <https://doi.org/10.1111/jac.12168>
43. Heckathorn SA, DeLucia EH, Zielinski RE. The contribution of drought-related decreases in foliar nitrogen concentration to decreases in photosynthetic capacity during and after drought in prairie grasses. *Physiol. Plant.* 1997; 101: 173–182. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb01834.x>

## **ESTRÉS HÍDRICO INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA**

A continuación, se presenta la INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA del trabajo:

Borrajo, C.I.; Sánchez-Moreiras, A.M.; Reigosa, M.J. 2018. Morpho-physiological responses of tall wheatgrass populations to different levels of water stress. PLoS ONE 13(12): e0209281. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209281>

### **Contiene las Tablas:**

S1 A) y B) Tabla

S2 Tabla

### **Contiene las Figuras:**

S1 Fig.

S2 Fig.

S3 Fig.

S4 Fig.

## SUPPLEMENTARY INFORMATION

**S1 Table. Dry matter per pot, accumulated evapotranspiration (ET\_Accu), water use efficiency (WUE), tiller weight, length, width and area of leaf (A), leaf water content (LWC), specific leaf area (SLA), proline and protein contents (B), results of two-factor ANOVA (N=36).** Fixed effects: water levels (WL), populations of tall wheatgrass (Popu) and WLxPopu interaction. Probability values and significance are shown. ET\_Accu, proline and protein were transformed (logarithmically) to obtain variance homogeneity and normality.

<b>A)</b> Variable Effect	Dry matter g plot <sup>-1</sup>	ET_Accu mL H <sub>2</sub> O	WUE DMmg H <sub>2</sub> O mL <sup>-1</sup>	Tiller weight g tiller <sup>-1</sup>	Length leaf cm	Width leaf cm	Leaf area cm <sup>2</sup>
WL	<0.0001 ***	<0.0001 ***	<0.0001 ***	<0.0001 ***	0.0018 **	0.0373 *	<0.0001 ***
Popu	0.0029 **	0.5845 ns	0.0342 *	<0.0001 ***	0.3010 ns	0.0358 *	0.0098 **
WLxPopu	0.0003 ***	0.0732 ns	0.1862 ns	0.1359 ns	0.8335 ns	0.4273 ns	0.6273 ns

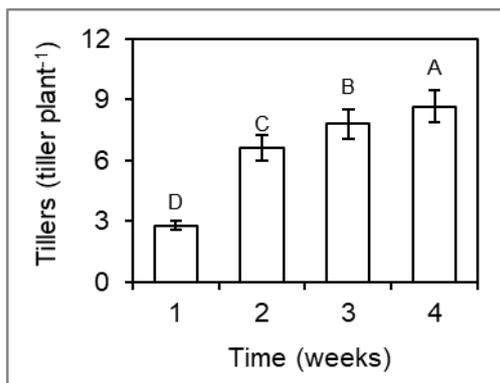
<b>B)</b> Variable Effect	LWC %	SLA cm <sup>2</sup> g <sup>-1</sup>	Proline μmol DMg <sup>-1</sup>	Protein mg DMg <sup>-1</sup>
WL	<0.0001 ***	0.0001 ***	<0.0001 ***	<0.0001 ***
Popu	0.0002 ***	0.6232 ns	0.0021 **	0.0249 *
WLxPopu	0.1314 ns	0.1521 ns	0.2818 ns	0.0903 ns

ns: non-significant  $P > 0,05$ , significant at \*  $P \leq 0.05$ ; \*\*  $P \leq 0.01$ ; \*\*\*  $P \leq 0.001$

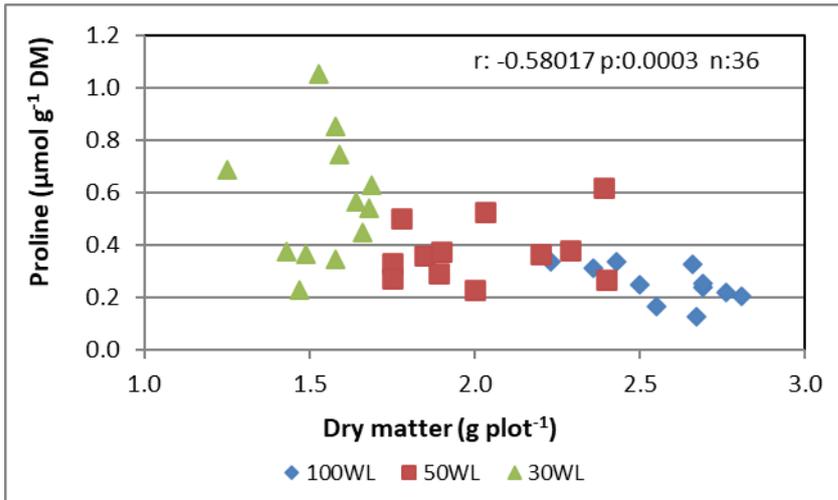
**S2 Table. Tiller number per pot, result of two-factor ANOVA with repeated measures (N=144).** Probability values and significance are shown for water levels (WL), populations of tall wheatgrass (Popu), repeated measures over time (t) and their interactions. Data were transformed (logarithmically) to obtain homogeneity of variance.

Variable/ Effect	Tillers tillers pot <sup>-1</sup>
WL	<0.0001 ***
Popu	<0.0001 ***
WLxPopu	<0.0001 ***
t	<0.0001 ***
WLxt	0.4961 ns
Popuxt	0.7221 ns
WLxPopuxt	0.9992 ns

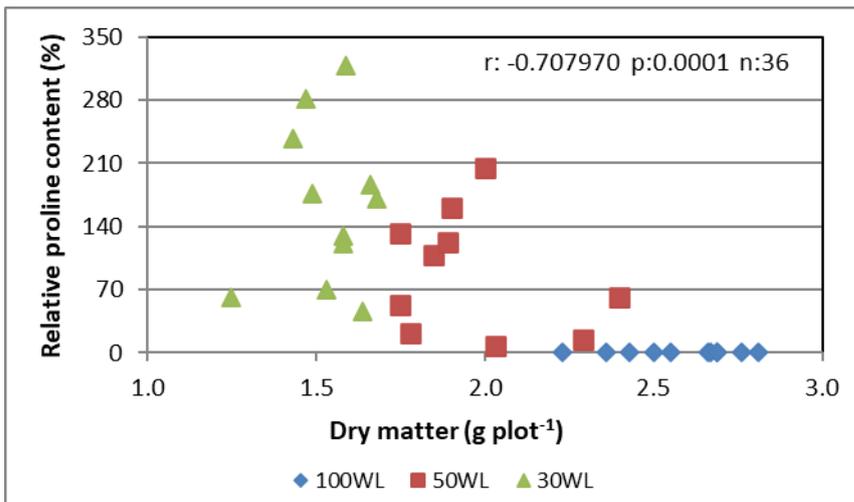
ns: non significant  $P > 0.05$ , significant at \*\*\*  $P \leq 0.001$



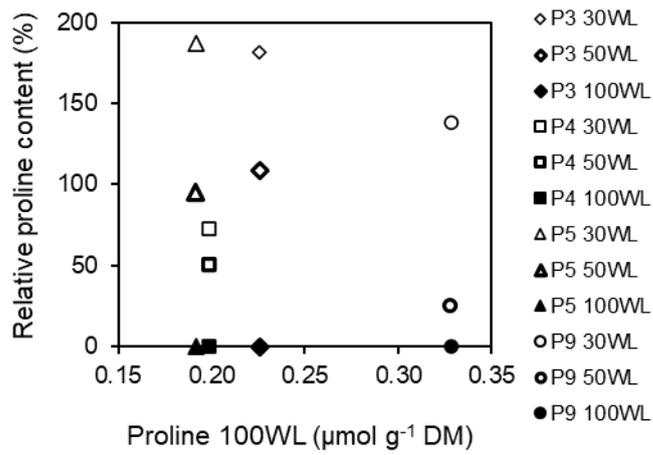
**S1 Fig. Tiller number per pot over time (n=36).** Bars with different letters indicate significant differences among weeks ( $P < 0.05$ ). The vertical line above the bar indicates the mean standard deviation.



**S2 Fig. Proline accumulation as a function of dry matter per pot.** Symbols of different colors show different water levels (WL: 100, 50, 30).



**S3 Fig. Relative proline content as a function of dry matter per pot.** Symbols of different colors show different water levels (WL: 100, 50, 30).



**S4 Fig. Relative proline content as a function of proline accumulation of the control (100WL).** Means among populations (P3, P4, P5, P9) under different water levels (WL: 100, 50, 30) are shown (each symbol is the means of n=3).



## **ESTRÉS SALINO**

**Esta sección corresponde al trabajo publicado:**

Borrajo, C.I.; Sánchez-Moreiras, A.M.; Reigosa, M.J. 2021. Morpho-physiological, biochemical and isotopic response of tall wheatgrass populations to salt stress. *J. Agron. Crop Sci.*, 207, 236–248.  
<http://doi.org/10.1111/jac.12461>

Copyright Wiley (license number: 5379360796227, Aug 31, 2022).

## **ESTRÉS SALINO**

### **Morpho-physiological, biochemical and isotopic response of tall wheatgrass populations to salt stress**

#### ABSTRACT

#### 1. INTRODUCTION

#### 2 MATERIALS AND METHODS

##### 2.1 Genetic material and growing conditions

##### 2.2 First experiment: 40-day

###### 2.2.1 Biomass and fractions

###### 2.2.2 Morphogenetic and structural variables

###### 2.2.3 Physiological variables

##### 2.3 Second experiment: 85-day

###### 2.3.1 Biomass, structural variables and phenology

###### 2.3.2 Physiological variables

###### 2.3.3 K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, N and C concentration

###### 2.3.4 Stable carbon and nitrogen isotopes

#### 2.4 Statistical Analysis

#### 3. RESULTS

##### 3.1. First experiment: 40-day

###### 3.1.1 Biomass and fractions

###### 3.1.2 Morphogenetic and structural variables

###### 3.1.3 Physiological variables

##### 3.2. Second experiment: 85-day

###### 3.2.1 Biomass, structural variables and phenology

###### 3.2.2 Physiological variables

###### 3.2.3 K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, and N concentration

###### 3.2.4. Stable carbon and nitrogen isotope

#### 4. DISCUSSION

#### 5. CONCLUSIONS

#### REFERENCES

# Morpho-physiological, biochemical and isotopic response of tall wheatgrass populations to salt stress

Celina I. Borrajo<sup>1,2</sup>  | Adela M. Sánchez-Moreiras<sup>2</sup>  | Manuel J. Reigosa<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Buenos Aires, Argentina

<sup>2</sup>Faculty of Biology, University of Vigo, Vigo, Spain

## Correspondence

Celina Borrajo, Agricultural Experimental Station Cuenca del Salado of INTA (National Institute of Agricultural Technology). Av. Belgrano 416, 7203 Rauch, Argentina. Email: borrajo.celina@inta.gob.ar

## Funding information

Department of Plant and Soil Sciences, Faculty of Biology, University of Vigo

## Abstract

Tall wheatgrass [*Elymus elongatus* subsp. *ponticus* (Podp.) Melderis] is a C3 grass native from dry or saline habitats in SE Europe. The aim of this study was to better understand response mechanisms of populations from different origins to salinity and to provide new tools to select germoplasm with high salinity tolerance. Four populations (P3-P4-P5-P9) were irrigated with five solutions of increasing salinity (Salt: 0–0.1–0.2–0.3–0.4 M NaCl) and evaluated in pots in a greenhouse. Two experiments were carried out, a short 40-day long experiment with vegetative plants, and a longer 85-day long one with plants that underwent vegetative-reproductive stage. No evidence was found of an interaction between population and salt. Morpho-physiological, biochemical, isotopic and productive variables were differently affected by increasing salinity and were also different among populations. Proline, Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> consistently appeared to function as osmotic agents. P5 showed the highest biomass in the 85-day experiment and had the highest leaf length, tiller density, water use efficiency and  $\delta^{13}\text{C}$  isotope; and the lowest Cl<sup>-</sup> concentration and evapotranspiration rate. However, P5 showed the lowest biomass in the 40-day experiment, suggesting that duration of the stress is an important aspect to consider when selecting germoplasm for tolerance to salinity. Differences among populations in growth strategies and physiological mechanisms could be related to their origin environment.

## KEYWORDS

decaploid wheatgrass, morphogenesis, physiological parameters, production, salinity

## 1 | INTRODUCTION

*Elymus elongatus* (Host) Greuter subsp. *ponticus* (Podp.) Melderis syn. *Thinopyrum ponticum* (Podp.) Barkworth & D.R. Dewey (2n = 10x = 70), known as 'tall wheatgrass' or 'decaploid wheatgrass', is a C3 perennial grass native from dry or saline habitats in SE Europe (Melderis, 1980). Tall wheatgrass is highly tolerant to salinity and has been used as a source of genes to breed improves wheat cultivars (Colmer et al., 2006; McGuire & Dvoák, 1981). In addition, it could help reduce the consequences of climate change on forage production, especially in dry and saline environments. Understanding

which mechanisms related underlie salt tolerance would be of benefit for breeding such crops and mitigating future food shortages (Wu, 2018).

In Argentina, tall wheatgrass has become self-naturalized in temperate-humid and semiarid environments, being the main forage species cultivated in the 1 million hectares of hydro-halomorphic soils of the Cuenca del Salado (Argentina), the region that maintains the largest livestock breeding herd in this country (Otondo et al., 2019). Further, it is a species likely to be cultivated in semiarid and saline areas, both as forage species and biofuel producer (Falasca et al., 2017). Tall wheatgrass germplasm collected in Argentina shows intraspecific

differences in morphogenetic and structural variables (Borrajo, 1998), in phenological development (Alonso & Borrajo, 2007; Borrajo & Alonso, 2004), and in tolerance to water stress (Borrajo et al., 2018).

In forage grasses, leaf morphogenesis (rate of leaf appearance, elongation and longevity), determines the canopy structure (leaf size, leaf number per tiller and tiller density per plant), defining radiation interception capability and forage growth (Chapman & Lemaire, 1993). These variables are genetically determined, but can be affected by environmental factors, such as salinity (Taleisnik et al., 2009). The response of those variables to salinity has been scarcely studied in tall wheatgrass (Borrajo & Alonso, 2004).

Salinity tolerance may vary depending on the plant phenological stage and genotype (Oyiga et al., 2016), as well as stress intensity and duration (Acosta-Motos et al., 2017; Chaves et al., 2009; Munns, 2002; Wu, 2018). A negative correlation was established between salinity tolerance in decaploid wheatgrass and  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  concentrations in fodder (Bhuiyan et al., 2017). Tall wheatgrass mechanisms in response to salinity have been linked to higher levels of proline and soluble sugars aimed at osmoregulation (Shannon, 1978), as well as to restricted accumulation of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Cl}^-$  in shoots (Bhuiyan et al., 2015; Johnson, 1991; Shannon, 1978). This matches the findings of other authors, who found higher levels of  $\text{Cl}^-$  and  $\text{Na}^+$  in roots than in leaves (Bhuiyan et al., 2017) and registered greater absorption capabilities and selective transport of  $\text{K}^+$  over  $\text{Na}^+$  (Guo et al., 2015).

Tolerance to salinity has been linked to the highest water use efficiency and invariant  $^{13}\text{C}$  discrimination (Johnson, 1991). Although tall wheatgrass is considered very salt-tolerant, few studies have assessed the intraspecific variability and the mechanisms involved in it (Borrajo & Alonso, 2004; McGuire & Dvoák, 1981; Shannon, 1978).

The aim of this study was to analyse the impact that different duration and intensity of salinity have in tall wheatgrass populations of different origins to provide morpho-physiological, biochemical and isotopic tools to understand the response mechanisms and better select germplasm adapted to salinity.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Genetic material and growing conditions

Four naturalized populations of tall wheatgrass [*Elymus elongatus* subsp. *ponticus* (Podp.) Melderis syn. *Thinopyrum ponticum*

(Podp.) Barkworth & D.R. Dewey ( $2n = 10x = 70$ )], provided by the Active Germplasm Bank of National Institute of Agricultural Technology in Balcarce, Argentina, were analysed. These populations (Popu) were selected by contrasting climate-edaphic environments in Argentina: P3 (900 mm/year,  $\text{pH} \cong 7.0$ ), P4 (300 mm/year,  $\text{pH} = 9.0$ ) P5 (300 mm/year,  $\text{pH} = 7.5$ ), P9 (500 mm/year,  $\text{pH} = 9.5$ ) (Table 1).

Greenhouse experiments were conducted in the Lagoas-Marcosende Campus of the University of Vigo, Spain ( $42^\circ 10' 0.38''\text{N}$ ,  $8^\circ 41' 3.37''\text{W}$ ). Four tall wheatgrass populations (Popu: P3-P4-P5-P9) irrigated with five salt solutions (Salt: 0–0.1–0.2–0.3–0.4 M NaCl) were evaluated. Two experiments were carried out, one during 40 autumnal days (40-day experiment) and the other during 85 spring-summer days (85-day experiment). The experimental unit was the pot (1 L), containing one plant with three tillers. A commercial mixture was used as substrate (Compo Sana Universal R. Compound of peat, perlite, lime and nutrients in mg/L:  $\text{N} = 325$ ,  $\text{P}_2\text{O}_5 = 350$ ,  $\text{K}_2\text{O} = 425$ .  $\text{PH} = 5.7$ ; salt content in g/L:  $<2.5$ ).

In order to understand the processes involved in salt tolerance, it is important to avoid treatments that induce cell plasmolysis (Munns, 2002). Therefore, pots were watered every 7 days with 0, 0.1, 0.2, 0.3 and 0.4 M NaCl solutions (Salt) dissolved in water (EC: 0.9, 8.1, 15.1, 20.9 and 26.6 dS/m, respectively). This would simulate irrigation with saline water and, as a consequence, soil salinity gradually increases with irrigation without causing osmotic shock to the plants.

### 2.2 | First experiment: 40-day

The 40-day experiment was carried out as a randomized complete block design, with a  $4 \times 5$  factorial arrangement (4 Population  $\times$  5 Salt) and seven blocks ( $n = 140$ ). The experience was developed in greenhouse during 40 autumnal days, with 9 hr 40 min ( $\pm 22$  min) of natural daylight, and an average daily temperature of  $16.1^\circ\text{C}$  ( $25.1^\circ\text{C}$  maximum,  $7.0^\circ\text{C}$  minimum). Plants in vegetative state were used.

#### 2.2.1 | Biomass and fractions

Aboveground biomass per pot was harvested after 40 days. Dead, green and total biomass dry weight (DeadB, GreenB, TotalB, in g DW/

**TABLE 1** Collection data of tall wheatgrass populations from Active Germplasm Bank of Balcarce of the INTA, Argentina (BAL) are shown

Population	P3	P4	P5	P9
Collection BAL	Nu + Alo 338	CIB 118	CIB 117	CIB 114
Latitude, longitude	$38^\circ 30'S$ , $58^\circ 45'W$	$39^\circ 24'S$ , $65^\circ 36'W$	$39^\circ 24'S$ , $65^\circ 36'W$	$38^\circ 44'S$ , $62^\circ 33'W$
Climate	Temperate oceanic	Semiarid	Semiarid	Temperate transitional
Precipitation	900 mm/year	300 mm/year	300 mm/year	500 mm/year
Soil, pH.	Argiudolls. Neutral, $\text{pH} \cong 7.0$	Torrifluvents. Alkaline, $\text{pH}$ : 9.0	Torrifluvents. Neutral, $\text{pH}$ : 7.5	Haplustolls. Alkaline, $\text{pH}$ : 9.5

pl) were estimated. Dry weight (DW) is the weight registered after drying the forage at 50°C to constant weight (Borrajo et al., 2018).

## 2.2.2 | Morphogenetic and structural variables

Green and senescent lengths of leaves were measured in three tillers per pot at 1 and 38 days (111–128 measurements from each Population in each Salt level). Then, leaf appearance (LAR in leaf tiller<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>), leaf elongation and leaf senescence (LER and LSR in mm tiller<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>) rates were calculated (Borrajo, 1998). Also, leaf area and leaf width were calculated (LeafA, cm<sup>2</sup>/leaf and LeafW, cm/leaf) using ImageJ software (Rasband, 2016). The number of leaves per tiller (LeafN: leaves/tiller), the total number of tillers per plant (Density, tiller/pl) and the specific leaf area (SLA = area/dry mass of leaf blade, cm<sup>2</sup>/g) were registered at 40 days (Borrajo et al., 2018).

## 2.2.3 | Physiological variables

Net photosynthetic rate (A, μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) along with the photosynthetically active radiation, leaf and air temperature, air flows, CO<sub>2</sub> concentration and relative humidity (PAR, Temp\_A, Temp\_L, Flow, CO<sub>2</sub>, RH, respectively) were measured at 19 and 35 days, using a LI-6200 portable infrared gas analyzer (Li-cor) (Reigosa, 2001). Measurements were performed between 11:00 a.m. and 3:00 p.m., on the youngest fully expanded leaf of each plant (n = 5). The atmospheric CO<sub>2</sub> concentration ranged from 380 to 400 μmol/mol and air relative humidity between 30% and 40% during data collection.

Leaf relative water content was calculated as  $RWC = [(LFW - LDW)/(LTW - LDW)] \times 100$ , on the youngest developed leaf in each pot. The leaf was harvested, the basal and apical parts of the leaf were cut and discarded, and the leaf fresh mass was weighed (LFW). Then the leaf was transferred to a tube with distilled water (4°C, 24 hr, in dark) for re-hydration to measure the fully turgid fresh weight (LTW). The leaf dry mass (LDW) was obtained by oven-drying (70°C, 48 hr) (Reigosa, 2001).

Samples of leaves were frozen at -80°C to analyse the content of soluble protein and free proline (100 and 250 mg leaf fresh weight, respectively). Protein content quantification was analysed by the Bradford method (Protein, mg/g DW) and free proline content was determined according to the Bates method (Proline, μmol/g DW) (Reigosa, 2001).

## 2.3 | Second experiment: 85-day

The 85-day experiment was carried out as a randomized complete block design, with a 4 × 5 factorial arrangement (4 Population × 5 Salt) and five blocks (n = 100). It lasted for 85 days, between spring and summer, with plants from vegetative to reproductive state. Trials were performed with 14 hr 50 min (±27 min) of natural daylight and

an average daily temperature of 20.6°C (27.9°C maximum, 13.3°C minimum).

## 2.3.1 | Biomass, structural variables and phenology

Aboveground biomass per pot was harvested at 85 day. Green leaf length per tiller (LeafT, dm/tiller), total number of tillers (Density), specific leaf area (SLA) and total biomass dry weight (TotalB) were determined (idem 40-day experiment). Primary phenological stages of each plant were described and classified as vegetative, elongation, flowering and maturity (Moore & Moser, 1995), after 85 days. Then, the percentage of flowering tillers was calculated as Flower (%) = (flowering tillers number/Density) × 100.

## 2.3.2 | Physiological variables

Net photosynthetic rate was recorded at 5, 45 and 80 days (idem 40-day experiment). At 85 days, relative water content (RWC) and proline were determined (idem 40-day experiment).

Evapotranspiration (ET) was recorded in each pot weekly. ET was calculated as the difference between the weight of the just irrigated pot and the weight of the pot 7 days later (prior to next irrigation). Accumulated evapotranspiration (ETA) was calculated as the sum of ET (mL<sub>H<sub>2</sub>O</sub>/pot). Water use efficiency (WUE) was calculated using the equation:  $WUE = \text{Total B}/\text{ETA}$ , mg/mL<sub>H<sub>2</sub>O</sub> (Borrajo et al., 2018).

## 2.3.3 | K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, N and C concentration

Leaf samples were dried, ground and used for total C, N and H content determination (w/w, dry basis %) with an elemental CHN analyser (EA 1110 Automatic Elemental Analyzer, Fisons Instruments). Other elements, Cl<sup>-</sup>, K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup>, were analysed in a Perkin Elmer Optima 4300DV inductively coupled plasma-optical emission spectrometer (ICP-OES). These determinations were conducted in the CACTI Facility, University of Vigo, Spain.

## 2.3.4 | Stable carbon and nitrogen isotopes

Dry ground leaf material was weighed and filled in microcapsules (1,100–2,900 μg). These were combusted using an automated elemental analysis coupled to an Isotope Ratio Mass Spectrometer (Finnegan: Thermo Fisher Scientific, model MAT-253). Stable isotope compositions of carbon <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C (δ<sup>13</sup>C, ‰) and nitrogen <sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N (δ<sup>15</sup>N, ‰) were calculated as  $\delta (‰) = [(R_{\text{sample}}/R_{\text{standard}}) - 1] \times 1,000$ , where 'sample' refers to plant material and 'standard' is the standards used. Pee Dee Belemnite was the standard for carbon, and atmospheric N<sub>2</sub> was the standard for nitrogen. Carbon and nitrogen isotope compositions were analysed at CACTI Facility, University of Vigo, Spain.

## 2.4 | Statistical analysis

In both experiments, all the variables were analysed using two-way factorial ANOVA (4 Population, 5 Salt, Population  $\times$  Salt interaction); except for net photosynthetic rate (A), which was analysed with two-way factorial ANCOVA (PAR, Temp\_A, Temp\_L, Flow, CO<sub>2</sub> and RH covariates) with repeated measures by Date. Block was considered a random effect, whereas Population, Salt and their interactions were fixed effects. Means values were compared using the least significant difference test (LSD,  $p < .05$ ). Statistical significance was defined at the 95% confidence level. Analysis was conducted using the PROC MIXED/LSMEANS. Total biomass, proline, protein and ETA were logarithmically transformed to analyses them.

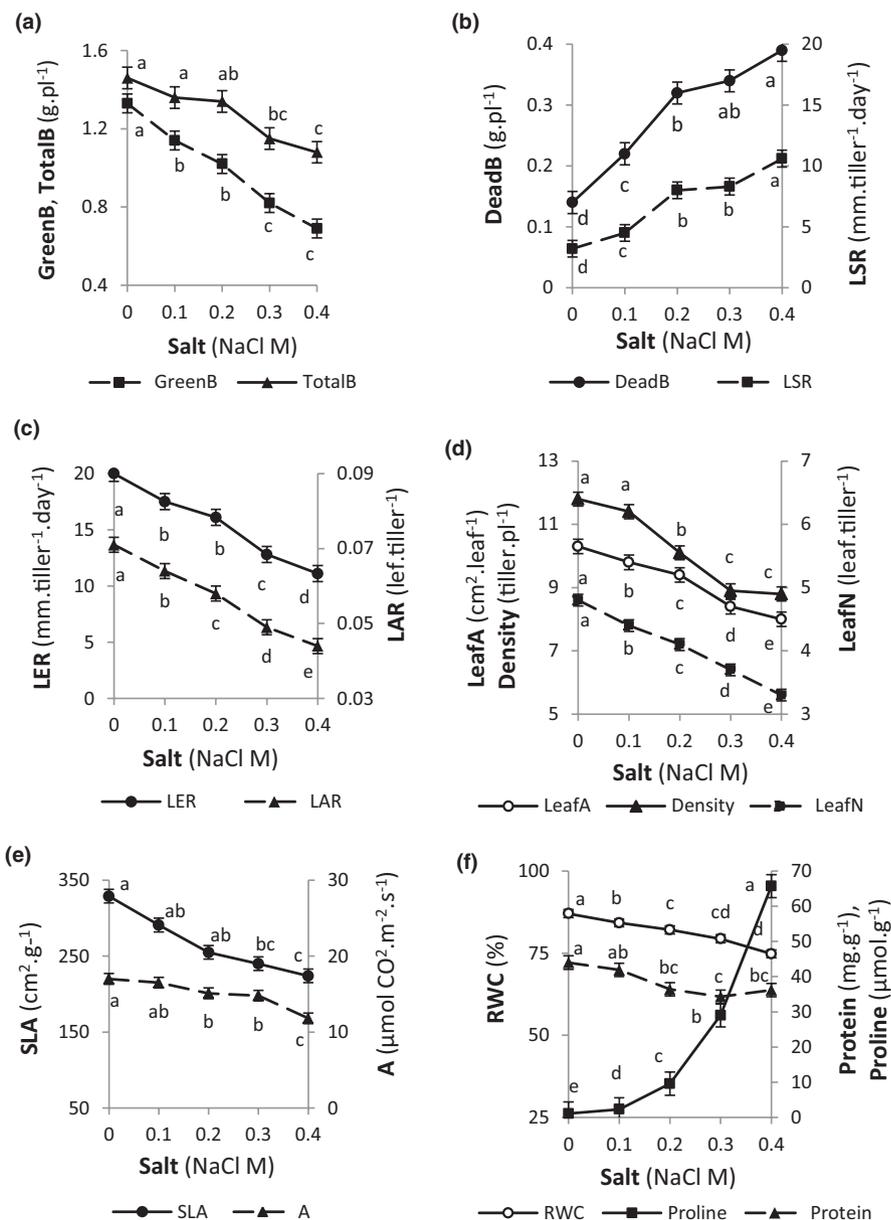
Linear regressions were calculated in some pairs of variables, using PROC REG (SAS, 2002).

## 3 | RESULTS

### 3.1 | First experiment: 40-day

#### 3.1.1 | Biomass and fractions

Total, green and senescence biomass was significantly affected ( $p < .05$ ) by Salt and Population effects (Table S1). Total and green biomass production decreased, while senescence increased significantly when Salt levels increased (Figure 1a,b). Maximum differences were recorded in plants treated with 0.4 M NaCl, with decreases of -26% and 48% in TotalB and GreenB, respectively, and increase of 179% in DeadB. Populations P3 and P4 showed the highest biomass production, P5 and P9 the lowest biomass production (TotalB, GreenB and DeadB, Table 2) in all salt level evaluated, most relevant in 0M NaCl (Figure 2a). However, there was not populations and salinity interaction for any variables ( $p > .05$ , Table S1).



**FIGURE 1** Salt effect for green and total aerial biomass (GreenB and TotalB, a); dead aerial biomass and leaf senescence rate (DeadB and LSR, b); leaf elongation and appearance rate (LER and LAR, c); density, area and number of leaves (LeafA and LeafN, d); specific leaf area and net photosynthetic rate (SLA and A, e); proline, protein and relative water content (RWC, f) in the 40-day experiment. Data are means ( $n = 28$ , except for An = 56). In each variable, different letters show significant differences ( $p < .05$ ) among salt levels (Salt: 0–0.1–0.2–0.3–0.4 M NaCl). The bar indicates the means standard error

### 3.1.2 | Morphogenetic and structural variables

There was not population and salinity interaction for morphogenetic variables ( $p > .05$ , Table S1). By contrast, salt induced significant change on morphogenetic variables ( $p < .05$ , Table S1). The greatest differences in morphogenetic variables were recorded in 0.4 M NaCl, when compared to the control, with increased leaf senescence rate (231% LSR, Figure 1b), and decreased elongation and leaf appearance rates (–45% and –38%, in LER and LAR) (Figure 1c). The populations showed significant differences in LER and LSR ( $p < .05$ ), but not in LAR ( $p = .8648$ , Table S1); P4 showed the highest values in LER and LSR, whereas P3 showed the lowest LER with intermediate values of LSR, and P5 showed high LER and the lowest LSR (Table 2). Those differences were more evident in 0M NaCl for LER (Figure 2b).

Again, there was not populations and salinity interaction for structural variables ( $p > .05$ , Table S1). Salt effects were significant for structural variables ( $p < .050$ ), except LeafW ( $p = .5038$ , Table S1). The variables decreased with the increase of salinity in the 0 to 0.4 M NaCl range (Figure 1d,e), with greater effects on LeafN (–31%) and SLA (–32%), than on density (–25%) or LeafA (–22%) in plants treated with 0.4 M.

The populations showed significant differences in density, LeafA, LeafW and SLA ( $p < .05$ ), but not in LeafN ( $p = .7611$ , Table S1). P5, P4 and P3 showed the highest values in LeafA, while only P3 showed the highest in LeafW (Table 2). Among populations, P5 presented the highest density and P4 the lowest (Table 2), with maximum differences in 0.2 M NaCl (Figure 2c). The population P3 showed the lowest SLA (Table 2, Figure 2d). Leaf elongation rate and Density showed a positive and linear relationship with the biomass produced, maintaining the differences among populations at all salt levels (Figures S1 and S2).

### 3.1.3 | Physiological variables

There was not populations and salinity interaction for any physiological variables ( $p > .05$ , Tables S1 and S2). The net photosynthetic rate was not significantly affected ( $p > .05$ ) by Populations, Date,

or double or triple interactions (Table S2). Net photosynthetic rate decreased slightly in time, but no significant differences between day 19 and 35 ( $15.2 \pm 0.6$  versus  $14.9 \pm 0.6 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , respectively) were found.

Salt effects were significant for physiological variables ( $p < .05$ , Tables S1 and S2). Among the physiological variables, the reduction was greater in the A (–31%) than in the RWC (–14%) in 0.4 M NaCl-treated plants when compared to the control; while in protein, the most important differences were recorded in 0.3 M NaCl-treated plants (–22%), (Figure 1e,f). Proline showed a huge exponential increase due to salinity (5,873% in 0–0.4 M, Figure 1f). As well, population effects were also significant for protein and proline ( $p < .050$ , Table S1), but populations did not differ in the RWC ( $p = .2164$ ). Meanwhile, P5 stood out because it presented the lowest Proline values and highest Protein, similar to those of P3. Conversely, P9 showed the highest proline and the lowest protein concentrations, similar to those of P4 (Table 2).

Among the registered variables, the greatest differences due to salinity were observed in proline. This metabolite showed an exponential and negative relationship with the biomass produced in all populations (Figure 3).

## 3.2 | Second experiment: 85-day

### 3.2.1 | Biomass, structural variables and phenology

As found for the 40-day experiment, there was not populations and salinity interaction for any variables ( $p > .05$ , Table S3).

Salt effects were significant for TotalB, LeafT, density, SLA and Flower ( $p < .05$ , Table S3), but with different intensity among salt levels (Figure 4a,b). Total biomass decreased significantly when salt levels increased (–87% in 0.4 M NaCl-treated plants, when compared to the control). However, LeafT and density presented the highest values in 0.2 M and the lowest in 0 and 0.4 M NaCl (LeafT –45% and density –26% in 0.2–0.4 M range) (Figure 4a). That behaviour was observed in all populations (Figure 5a–c). SLA showed the highest values in 0 M Salt, and decreased in all salt treatments, but no

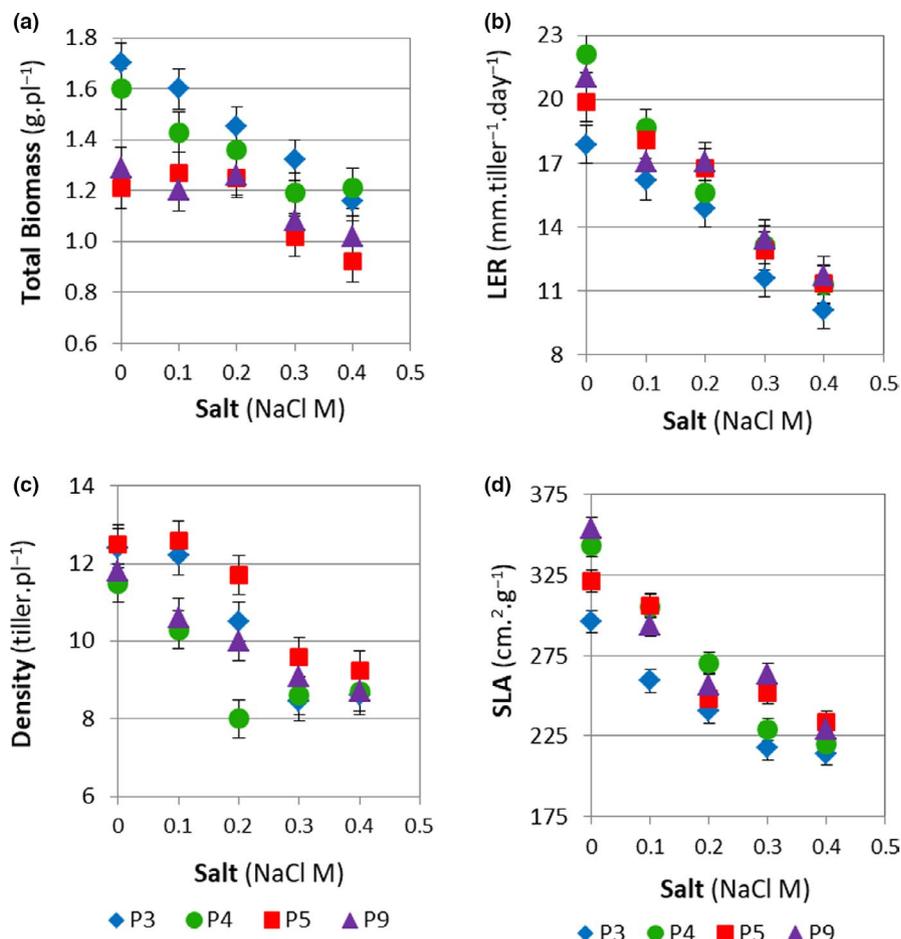
**TABLE 2** Population effect for total, green and senescence aerial biomass (TotalB, GreenB and DeadB); leaf elongation and senescence rate (LER and LSR), leaf area (LeafA); leaf width (LeafW); number of tillers (Density); specific leaf area (SLA); protein and in the 40-day experiment. Data are means ( $n = 35$ )

Popu	TotalB g/pl	GreenB	DeadB	LSR mm tiller <sup>-1</sup> day <sup>-1</sup>	LER	LeafA cm <sup>2</sup> /leaf	LeafW cm/leaf	Density tiller/pl	SLA cm <sup>2</sup> /g	Protein mg/g	Proline μmol/g
P3	1.45a	1.13a	0.32a	6.8ab	14.1b	9.6a	0.45a	10.4ab	248b	39.5ab	7.7b
P4	1.36a	1.05ab	0.31a	7.6a	16.1a	9.9a	0.41b	9.5b	272a	36.4bc	9.5.a
P5	1.14b	0.90b	0.24b	6.3b	15.6a	9.6a	0.39bc	10.9a	272a	43.4a	7.5b
P9	1.16b	0.91b	0.25b	6.9ab	16.0a	7.7b	0.37c	10.0ab	279a	34.7c	10.0a
ee	0.11	0.09	0.03	0.7	0.7	0.9	0.01	0.4	9	3.3	2.4

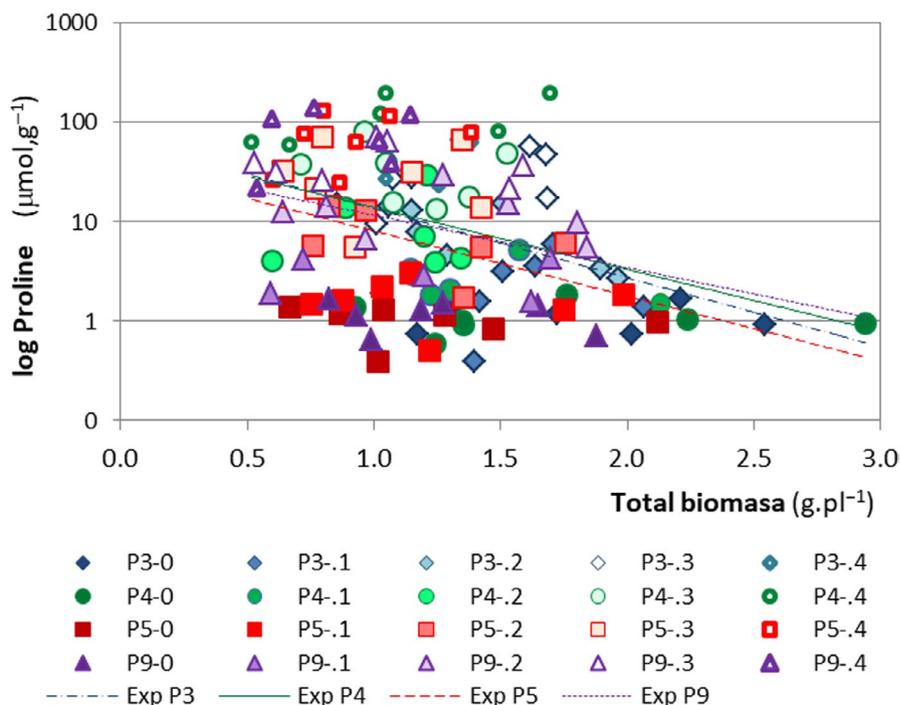
Note: In each variable, different letters show significant differences ( $p < .05$ ) among populations (Popu: P3, P4, P5, P9).

Abbreviation: ee, means standard error.

**FIGURE 2** Response of four populations (P3-P4-P5-P9) irrigated with five salt levels (Salt: 0–0.1–0.2–0.3–0.4 M NaCl) for total biomass (a), leaf elongation rate (LER, b), density (c) and specific leaf area (SLA, d) in the 40-day experiment. The vertical lines above the bar indicate the mean standard deviation [Colour figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]



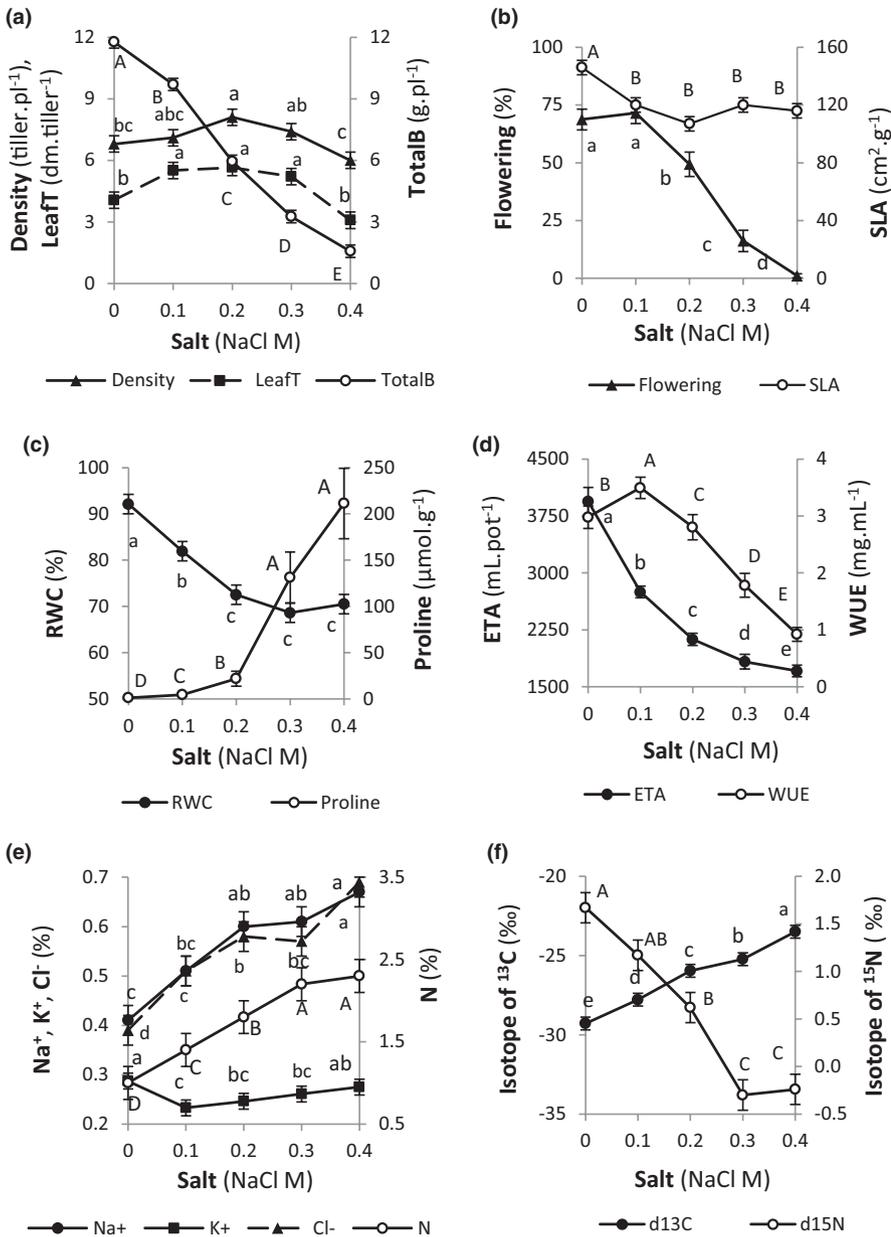
**FIGURE 3** Relationship between total biomass and proline of four populations (P3, P4, P5, P9) growing under five salt levels (Salt: 0–0.1–0.2–0.3–0.4 M NaCl) in the 40-day experiment. The coloured dots indicate the combination of a population with a salt concentration. The exponential lines (Exp) correspond to each population [Colour figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]



significant differences were registered among salt-treated plants (Figure 4b). Salinity limited the reproductive development of plants from 0.2 M (49% Flower), becoming almost null at 0.4 M NaCl (1% Flower) (Figure 4b). Flowering reached the highest values between

0 and 0.1 M NaCl (67%–71% Flower), but the control plants (0 M) presented a more advanced phenological development, with tillers ending flowering and close to the maturity phase (with senescent basal leaves). Population effects were significant for TotalB, LeafT





**FIGURE 4** Salt effect for tiller density, length leaf green and total aerial biomass (LeafT and TotalB, a); flowering and specific leaf area (SLA, b); proline and relative water content (RWC, c); accumulated evapotranspiration and water use efficiency (ETA and WUE, d); Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> and N content (e); stable isotopes of <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N ( $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$ , f) in the 85-day experiment. Data were means ( $n = 20$ ). In each variable, different letters showed significant differences ( $p < .05$ ) among salt levels (Salt: 0–0.1–0.2–0.3–0.4 M NaCl). The bar indicates the means standard error

and density ( $p < .05$ , Table S3). The populations showed a similar behaviour in SLA ( $p = .2582$ ) and in Flower ( $p = .6619$ , Table S3), while in total biomass, P5 showed the highest productions (Table 3, Figure 5a). The P5 population showed also the highest density and a high LeafT (Table 3, Figure 5b,c). Density presented the highest differences among populations in 0.2 M NaCl (Figure 5c).

### 3.2.2 | Physiological variables

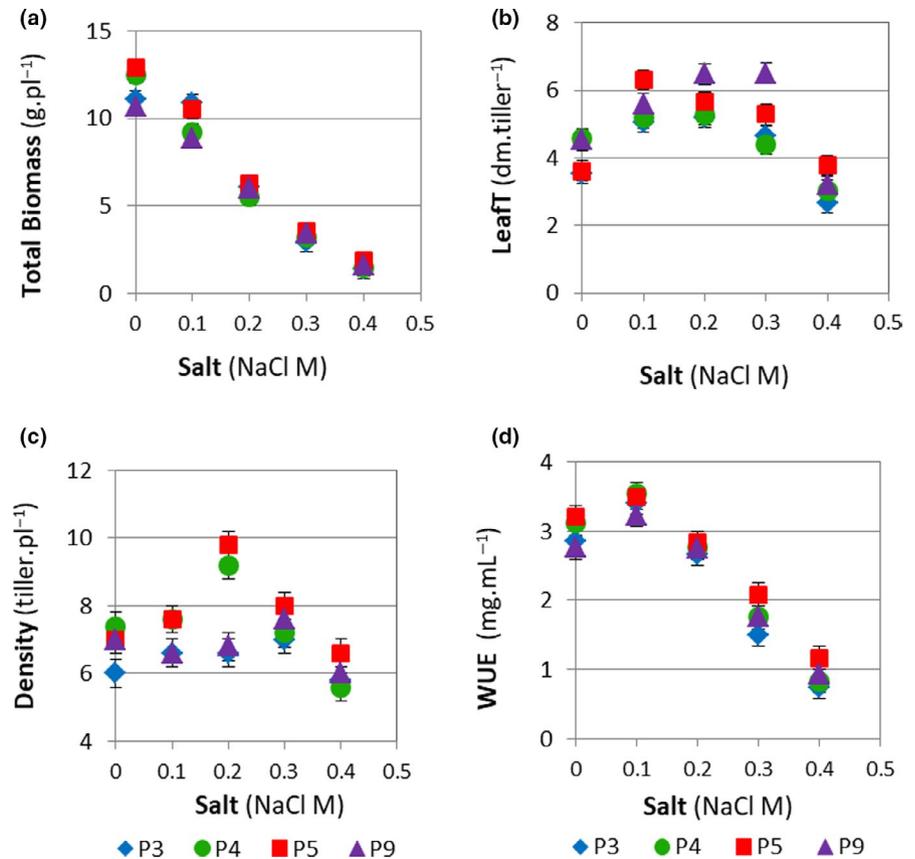
Net photosynthetic rate was significantly affected by Date, Salt and Date  $\times$  Salt interaction ( $p < .05$ ). No effects were registered in the remaining variation sources ( $p > .05$ , Table S2).

Net photosynthetic rate decreased when salt levels increased, at different magnitudes over time (Date  $\times$  Salt  $p < .0001$ , Table S2).

Means comparison of A in all Date showed the highest values in 0 M, and the lowest in 0.4 M NaCl, with decreases of -24%, -42% and -77% in 0.4M NaCl-treated plants, when compared to the control, at days 5, 45 and 80, respectively (Table 4).

There was not populations and salinity interaction for any physiological variables ( $p > .05$ , Tables S2 and S3). Salt effects were significant for ETA, WUE, RWC and proline ( $p < .05$ , Table S3), but with different intensity among the different salt levels. Relative water content decreased with salt treatment, but no significant differences were registered among 0.2–0.4 M range (Figure 4c). Proline levels increased exponentially with salt (Figure 4c). Accumulated evapotranspiration decreased significantly with increased salt (-57% in 0–0.4 M NaCl, Figure 4d), while WUE was similar, but WUE showed the highest values in 0.1 M NaCl (-74% in 0.1–0.4 M NaCl, Figure 4d).

**FIGURE 5** Response of four populations (P3-P4-P5-P9) irrigated with five salt levels (Salt: 0–0.1–0.2–0.3–0.4 M NaCl) for total biomass (a), green leaf length per tiller (LeafT, b), density (c) and water use efficiency (WUE, d) in the 85-day experiment. The vertical lines above the bar indicate the mean standard deviation [Colour figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]



**TABLE 3** Population effect for tiller density (Density), green leaf length (LeafT), total aerial biomass (TotalB), accumulated evapotranspiration (ETA), water use efficiency (WUE), chlorine (Cl<sup>-</sup>) and stable carbon isotope ( $\delta^{13}\text{C}$ ) in the 85-day experiment. Data are means ( $n = 25$ )

Popu	TotalB g.pl <sup>-1</sup>	LeafT dm. tiller <sup>-1</sup>	Density tiller.pl <sup>-1</sup>	ETA mL <sub>H<sub>2</sub>O</sub> pot <sup>-1</sup>	WUE mg/ mL <sub>H<sub>2</sub>O</sub>	Cl <sup>-</sup> %	$\delta^{13}\text{C}$ ‰
P3	6.44b	422b	6.4b	2,543a	2.30b	0.58a	-26.5b
P4	6.38b	450ab	7.4ab	2,426b	2.40ab	0.57a	-26.5b
P5	6.92a	493ab	7.8a	2,450b	2.58a	0.50b	-26.0a
P9	6.09b	517a	6.8ab	2,466ab	2.30b	0.55ab	-26.4ab
ee	0.27	30	0.4	57	0.07	0.02	0.2

Note: In each variable, different letters show significant differences ( $p < .05$ ) among populations (Popu: P3, P4, P5, P9).

Abbreviation: ee, means standard error.

Net photosynthetic rate, RWC and proline were no significantly different among populations ( $p > .050$ , Tables S2 and S3), but ETA and WUE presented significant differences depending on the population tested ( $p < .05$ , Table S3). In this way, P3 showed the highest ETA values, while P4 and P5 showed the lowest. For WUE, P5 showed the highest values and P4 was intermediate, with no significant differences with the other populations (Table 3, Figure 5d).

Proline showed the greatest changes due to salinity of all variables tested (17,500% in 0–0.4 M range) and it also showed an exponential and negative relationship with the biomass produced (Figure 6). Accumulated evapotranspiration and WUE showed a positive relationship with the biomass produced, lineal in ETA and

logarithmic in WUE (Figures S3 and S4). P3 presented the highest ETA per produced biomass unit and P5 the lowest.

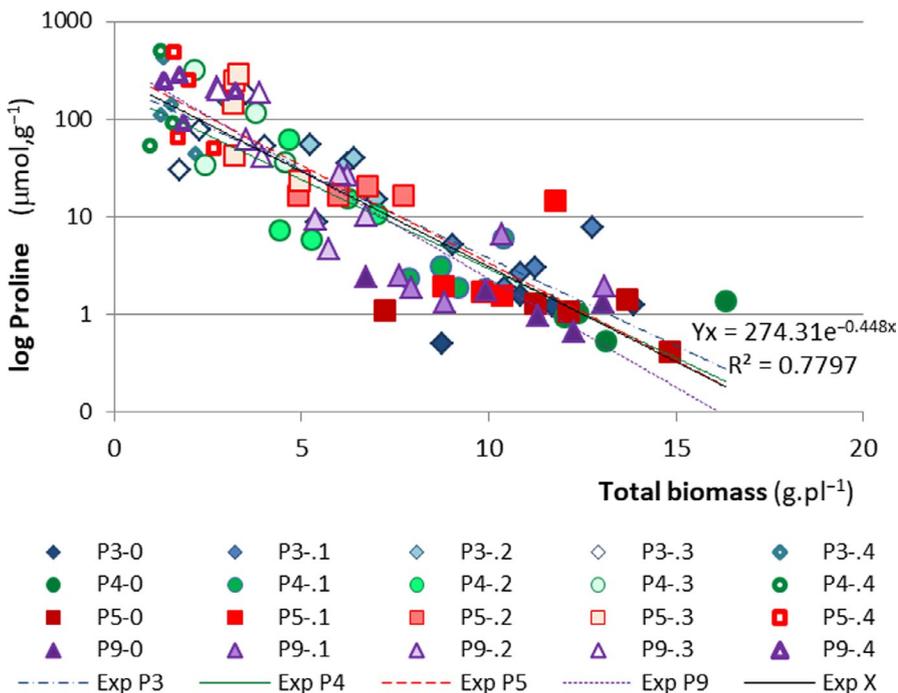
### 3.2.3 | K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> and N concentration

As for all the variables tested, there was not populations and salinity interaction for Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> and N ( $p > .05$ , Table S3). By contrast, salt effects were significant for Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> and N ( $p < .05$ , Table S3). Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> and N increased when Salt levels increased with greater intensity in N (130%) than in Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> (63% and 78%) in 0.4 M NaCl-treated plants, when compared to the control. The values were similar among 0.2 and 0.4 M for Na<sup>+</sup>, 0.2 and 0.3 M for Cl<sup>-</sup>, and 0.3 and 0.4 M for

Net photosynthetic rate ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )						
Date x Salt	0	0.1	0.2	0.3	0.4	ee
5	22.8A	21.1A	20.9A	19.9AB	17.3B	1.2
45	24.6A	22.2A	19.3B	16.3C	14.2C	1.2
80	25.7A	20.4B	16.7C	12.3D	5.8E	1.3

Note: In each Date (5, 45, 80 days), different letters show significant differences ( $p < .05$ ) among Salt levels (0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 M NaCl).

Abbreviation: ee, means standard error.



**TABLE 4** Salt  $\times$  Date interaction effect for net photosynthetic rate in the 85-day experiment. Data are means ( $n = 35$ )

**FIGURE 6** Relationship between total biomass and proline of four populations (P3, P4, P5, P9) growing under five salt levels (Salt: 0–0.1–0.2–0.3–0.4 M NaCl) in the 85-day experiment. The coloured dots indicate the combination of a population with a salt concentration. The exponential lines (Exp) correspond to each population and the population mean (X) [Colour figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

N (Figure 4e). Meanwhile,  $\text{K}^+$  registered the highest values at 0 and 0.4 M NaCl, and the lowest values at 0.1 M (Figure 4e), showing the greatest differences between 0 and 0.1 M (–23%). The populations presented the greatest difference among salt levels in 0.1 M NaCl for N,  $\text{Cl}^-$  and  $\text{Na}^+$  and, in 0.2 M NaCl for  $\text{K}^+$  (Figure 7a–d). However, only  $\text{Cl}^-$  showed significant differences among populations ( $p = .0363$ , Table S3). Populations P3 and P4 showed the highest  $\text{Cl}^-$  values, whereas P5 showed the lowest (Table 3).

### 3.2.4 | Stable carbon and nitrogen isotope

There was not populations and salinity interaction for  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  ( $p > .05$ , Table S3). Salt effects were significant for  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  isotope ( $p < .05$ , Table S3). The  $\delta^{13}\text{C}$  isotope values increased significantly with salt levels, whereas  $\delta^{15}\text{N}$  values decreased, reaching the greatest increase (20%) for  $\delta^{13}\text{C}$  in 0.4 M NaCl-treated plants and the greatest decrease (–114%) for  $\delta^{15}\text{N}$  in 0.3 M NaCl-treated plants, when compared to the control (Figure 4f). The  $\delta^{13}\text{C}$  isotope presented significant differences among populations ( $p = .0470$ , Table S3), with P5 showing the highest values, and P3 and P4 the

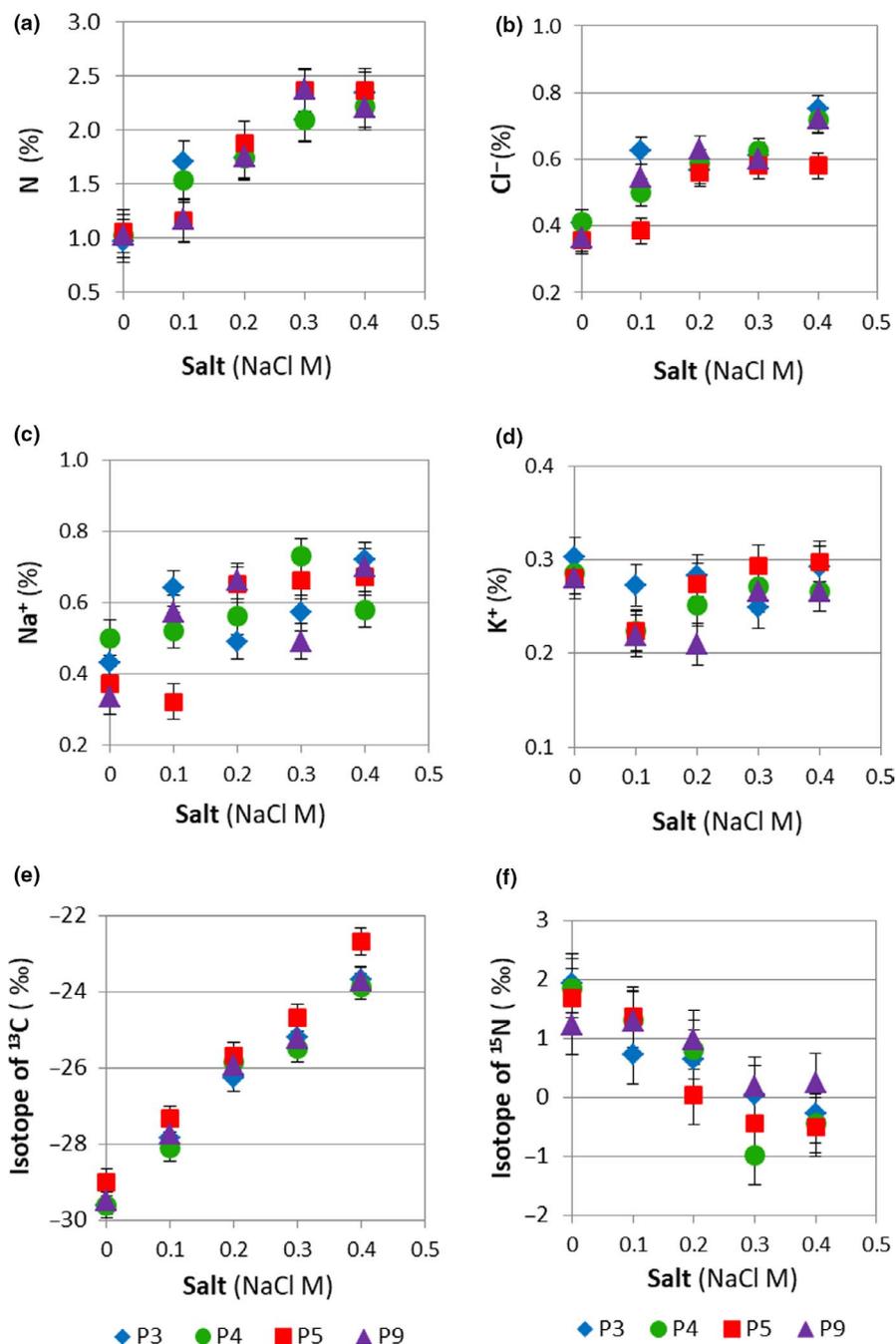
lowest (Table 3, Figure 7e). Meanwhile, the  $\delta^{15}\text{N}$  isotope registered a higher dispersion of data, without differences among the populations ( $p = .6455$ , Table S3, Figure 7f).

## 4 | DISCUSSION

Tall wheatgrass populations responded similarly to salinity on morpho-physiological, biochemical, isotopic and productive variables, and no interaction among salt and population was observed both in the vegetative and reproductive stages. For this reason, inter-population differences are discussed regardless of salt levels, and salt effects are discussed regardless of population origin.

Changes in morphogenetic and structural variables have been scarcely studied in tall wheatgrass under salinity (Borrajo & Alonso, 2004). The importance of these variables is evident both in the vegetative and reproductive stages. Increased salt levels resulted in decreased photosynthesis and leaf tissue production (lower LER and LAR), and earlier tissue death (increased LSR). This led to less leaf area expansion (lower LeafA, LeafN and Density), ultimately limiting biomass production. Studies in other grasses have reported

**FIGURE 7** Response of four populations (P3-P4-P5-P9) irrigated with five salt levels (Salt: 0–0.1–0.2–0.3–0.4 M NaCl) for N (a), Cl<sup>-</sup> (b), Na<sup>+</sup> (c), K<sup>+</sup> (d), stable isotopes of <sup>13</sup>C (e) and stable isotopes of <sup>15</sup>N (f) in the 85-day experiment. The vertical lines above the bar indicate the mean standard deviation [Colour figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]



similar responses (Taleisnik et al., 2009). Salt induces changes on the cell water balance (Hasegawa, 2013; Munns, 2002), with altered RWC, LeafA, LeafN and SLA, and smaller and thicker leaves (Acosta-Motos et al., 2017).

Increased and earlier senescence has been suggested as a salt stress tolerance strategy, in which water and nutrients are remobilized to younger photosynthesizing leaves (Sade et al., 2018), while the excess of toxic ions are sequestered in older leaves, causing early senescence (Munns, 2002). This strategy appeared to be more developed in P4, which originates from the most stressful environment, with low precipitation (300 mm/year) and saline soils (pH: 9).

Inter-population differences in protein content were not reflected in photosynthetic rates, probably because photosynthesis

was measured in the youngest leaf which is the leaf most buffered by the plant to continue growing (Chaves et al., 2009; Munns, 2002; Sade et al., 2018).

The decrease in morphogenetic, structural, physiological and productive variables depended on the intensity and duration of salt stress, as previously reported (Bhuiyan et al., 2015; Chaves et al., 2009). A delayed development of the reproductive phenological stage was also observed, as observed by Acosta-Motos et al. (2017). Since tall wheatgrass shows its highest growth potential during the reproductive stage (Borrajo, 1998; Otondo et al., 2019), delayed flowering under salt stress would have contributed to increase the differences in growth among different salt levels.

In the 40-day experiment, P3 and P4 showed the highest biomass production (TotalB, GreenB and DeadB), but with different combinations of morphogenetic, structural and physiological variables. While P4 showed the highest LER, P3 had the greatest LeafW, which determined high values LeafA in both populations. P4 showed the lowest density while P3 showed the highest weight per unit of leaf area (lowest SLA). On the other hand, P5 and P9 presented the lowest biomass production (TotalB, GreenB and DeadB) with high LER, but with the lowest LeafW and the highest SLA. Also, P9 presented the lowest LeafA, while P5 showed the highest density.

Notably, the ranking of populations changed, in the 85-day experiment that extended into the reproductive stage, P5 showed the highest forage production, determined by the highest density and high LeafT. In both experiment, it can be noted that populations with similar biomass production had contrasting morphologies (morphogenetic and structural), although these morphological characteristics would not be related to the environmental origin of the different populations.

Proline showed the largest differences due to salinity. Further, when comparing populations in the vegetative stage, proline and protein responses were related to the environmental origin of the studied population: P4 and P9, which come from the most saline environments (alkaline soils), showed the highest content of proline and lowest of protein; whereas P5 and P3, which are from environments without salinity (neutral soils), showed an opposite behaviour. This inter-population behaviour was also similar to that already reported under water stress (Borrajo et al., 2018), and could be attributed to different mechanisms to respond to both, osmotic and oxidative stress. Proline was not different among populations in the reproductive stage, when duration and intensity of salt stress were higher. Salt tolerance was related to the increase in proline, but it was not enough to allow an interspecific selection in tall wheatgrass (Shannon, 1978).

Increase in  $K^+$  may contribute to osmoregulation (Munns, 2002; Oyiga et al., 2016). However, it was not the main osmoregulation mechanism used by tall wheatgrass to tolerate salinity in the present study. In other studies, the  $K^+$  content in decaploid wheatgrass was reduced by increases in salinity (Bhuiyan et al., 2015; Guo et al., 2015).

The  $Na^+$  and  $Cl^-$  sequestered in the vacuole could function as low-energy osmotic agents (Acosta-Motos et al., 2017; Munns, 2002; Taleisnik et al., 2009; Wu, 2018). This may be an osmoregulatory mechanism used by tall wheatgrass that could explain the increase of leaf  $Na^+$  and  $Cl^-$  concentrations found in the present work (63%  $Na^+$  and 78%  $Cl^-$ ). In fact, similar results were found by other authors in decaploid wheatgrass (+83%  $Na^+$  and +41%  $Cl^-$ , Bhuiyan et al., 2015).

In the reproductive stage, P5 presented the lowest leaf  $Cl^-$  content, which suggests that this population could have a more developed exclusion mechanism than the others. This would be supported because P5 showed the highest WUE that would indicate a lower transpiration, which could favour the retention of toxic ions in roots, limiting their accumulation in the aerial biomass (Acosta-Motos

et al., 2017). This agrees with the findings of other authors, who found higher levels of  $Cl^-$  in roots than in leaves of *Thinopyrum ponticum* (Bhuiyan et al., 2017). Populations P3, P4 and P9 would show a different strategy from P5, with high  $Cl^-$  leaf content that could be compartmentalized in the cell vacuole, without inducing apparent damage (no inter-population differences in photosynthesis, RWC, SLA, proline, potassium and flowering, among others), but with higher energy expenditure, and for this reason, lower forage productions (TotalB). In wheat, it was also observed a negative relationship between  $Cl^-$  in shoot and growth depression (Salim, 1989).

The  $\delta^{15}N$  decreased when salt levels increased, which could suggest that plants discriminate more against  $^{15}N$  at higher salt levels. Studies in wheat have reported similar responses (Yousfi et al., 2012). As the amount of N available in the pots was the same for all the treatments, the greater availability of N per unit of tissue under severe salt stress would be directly related to discrimination of  $^{15}N$  during uptake. This is supported by the opposite behaviour observed between  $\delta^{15}N$  and leaf N concentrations.

In contrast  $\delta^{13}C$  increased in all populations when salinity increased, with P5 showing the highest values. This high  $\delta^{13}C$  values in P5 could be related to stomatal closure to avoid water loss (high RWC), limiting transpiration (lower ETA and WUE) and gas exchange. The higher  $\delta^{13}C$  can be an indirect indicator to select for high susceptibility to salt stress (Yousfi et al., 2012). In decaploid wheatgrass, small differences were found in  $\delta^{13}C$  at various saline levels (Johnson, 1991), but in the present work, the highest  $\delta^{13}C$  in P5 did correlate with high use of water efficiency, which would have contributed to produce more biomass (higher Btotal).

Increases in salt level (0–0.4 M NaCl) induced a lower ETA, possibly due to reductions in plant transpiration and soil evaporation; while WUE showed the highest value in 0.1 M NaCl, and then, it decreased with increasing salt levels. This demonstrates the salt tolerance of tall wheatgrass, which showed increases in foliar concentrations of  $Cl^-$  and  $Na^+$ ; along with increases in proline; reductions in ETA, photosynthesis, RWC, and growth; maintenance of flowering, and more efficiency in the use of water 0.1 M than in control treatment (0 M NaCl).

Evapotranspiration differed among populations, with P3 presenting the highest values and P4 and P5 the lowest; while WUE had a contrary trend in those populations. Therefore, those tested tall wheatgrass populations could be classified as water-spender (P3) and water-savers (P4 and P5) (Blum, 2015).

Again, such results could be related to the environmental origin of the populations: P3 comes from the most humid environment (temperate climate –900 mm/year—and *Argiudoll* soil), while P4 and P5 come from the driest environment (semiarid climate –300mm/year—and *Torrifluent* soil), although, P4 comes from a saline environment and P5 from a non-saline environment. For this reason, P4 and P5 would probably have different strategies to limit transpiration and continue growing (lower ETA and higher WUE) with increasing salinity. The P4 strategy would be related to restrict the excess of toxic ions to old transpiring leaves (higher  $Cl^-$ ) causing their early senescence (the highest LSR and DeadB), but limiting photosynthetic

surface. On the other hand, in P5, the strategy would be related to stomatal closure (the highest  $\delta^{13}\text{C}$ ), restricting transpiration, and consequently, limiting toxic ions concentration in the leaves (the lowest  $\text{Cl}^-$ , LSR and DeadB).

A water-saver population as P5 might have an advantage in the harshest environments, whereas a water-spender population as P3 will perform better under more moderate stress conditions (Blum, 2015). This classification could explain the opposite behaviour presented by P3 and P5 in the total biomass between the 40-day and 85-day experiments.

## 5 | CONCLUSIONS

The findings of this paper are important for furthering our understanding of how intensity and duration of salt stress determine differences in morphogenetic, structural, productive, physiological, biochemical and isotopic variables, which are characteristic of each tall wheatgrass population. Only in some characters, inter-population diversity in the responses could be linked to the environment of origin of each population. Our results show that populations that had similar biomass production, they did so with contrasting morphologies, both in morphogenetic and structural variables. Finally, although no evidence was found of an interaction between population and salt, we highlight P5 behaves better in the harshest environments, whereas P3 performs better under more moderate stress conditions, which suggests that duration of the stress is an important aspect to consider when selecting germoplasm for tolerance to salinity.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank the members of the laboratory of Plant Ecophysiology from the University of Vigo for their assistance in this work. This work was financially supported by the Department of Plant and Soil Sciences, Faculty of Biology, University of Vigo.

## ORCID

Celina I. Borrajo  <https://orcid.org/0000-0002-9827-1962>

Adela M. Sánchez-Moreiras  <https://orcid.org/0000-0002-0771-9259>

[org/0000-0002-0771-9259](https://orcid.org/0000-0002-0771-9259)

Manuel J. Reigosa  <https://orcid.org/0000-0003-0527-1849>

## REFERENCES

- Acosta-Motos, J. R., Ortuño, M. F., Bernal-Vicente, A., Diaz-Vivancos, P., Sanchez-Blanco, M. J., & Hernandez, J. A. (2017). Plant responses to salt stress: Adaptive mechanisms. *Agronomy*, 7, 18. <https://doi.org/10.3390/agronomy7010018>
- Alonso, S. I., & Borrajo, C. I. (2007). Colecta y evaluación inicial de poblaciones de Agropiro alargado naturalizadas en la región pampeana Argentina. In A. Clausen F. Condon & A. Benetta (Eds.), *Avances de investigaciones en recursos genéticos del Cono Sur II* (pp. 9–22). Montevideo, Uruguay: PROCISUR, REGENSUR.
- Bhuiyan, M. S. I., Raman, A., Hodgkins, D. S., Mitchell, D., & Nicol, H. I. (2015). Physiological response and ion accumulation in two grasses one legume, and one saltbush under soil water and salinity stress. *Ecophysiology*, 8, 1547–1559. <https://doi.org/10.1002/eco.1603>
- Bhuiyan, M. S. I., Raman, A., Hodgkins, D., Mitchell, D., & Nicol, H. I. (2017). Influence of high levels of  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  on ion concentration, growth, and photosynthetic performance of three salt-tolerant plants. *Flora*, 228, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2016.12.010>
- Blum, A. (2015). Towards a conceptual ABA ideotype in plant breeding for water limited environments. *Functional Plant Biology*, 42(6), 502–513. <https://doi.org/10.1071/FP14334>
- Borrajo, C. I. (1998). *Generación y expansión de los órganos foliares de agropiro alargado en función del material genético y la disponibilidad de nitrógeno*, Thesis M Sc. Universidad Nacional de Mar del Plata, Balcarce, Argentina. Retrieved from [https://www.researchgate.net/publication/303344481\\_Generacion\\_y\\_expansion\\_de\\_los\\_organos\\_foliares\\_de\\_agropiro\\_alargado\\_en\\_funcion\\_del\\_material\\_genetico\\_y\\_la\\_disponibilidad\\_de\\_nitrogeno-](https://www.researchgate.net/publication/303344481_Generacion_y_expansion_de_los_organos_foliares_de_agropiro_alargado_en_funcion_del_material_genetico_y_la_disponibilidad_de_nitrogeno-)
- Borrajo, C. I., & Alonso, S. (2004). Germinación, emergencia e implantación de variedades experimentales de agropiro. *Revista Argentina Produccion Animal*, 24, 29–40.
- Borrajo, C. I., Sánchez-Moreiras, A. M., & Reigosa, M. J. (2018). Morphophysiological response of tall wheatgrass populations to different levels of water stress. *PLoS One*, 13(12), e0209281. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209281>
- Chapman, D. F., & Lemaire, G. (1993). Morphogenic and structural determinants of plant growth after defoliation. In M. J. Baker, J. R. Crush, & L. R. Humphreys (Eds.), *Proceedings of the XVII International Grassland Congress* (pp. 95–104). Palmerston North, New Zealand.
- Chaves, M. M., Flexas, J., & Pinheiro, C. (2009). Photosynthesis under drought and salt stress: Regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*, 103, 551–560. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn125>
- Colmer, T. D., Flowers, T. J., & Munns, R. (2006). Use of wild relatives to improve salt tolerance in wheat. *Journal of Experimental Botany*, 57, 1059–1078. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj124>
- Falasca, S. L., Miranda, C., & Alvarez, S. P. (2017). April 10) Agro-ecological zoning for tall wheatgrass (*Thinopyrum ponticum*) as a potential energy and forage crop in salt-affected and dry lands of Argentina. *Archives Crop Science*, 1, 10–19. <https://doi.org/10.36959/718/597>
- Guo, Q., Meng, L., Mao, P. C., & Tian, X. X. (2015). Salt tolerance in two tall wheatgrass species is associated with selective capacity for  $\text{K}^+$  over  $\text{Na}^+$ . *Acta Physiologiae Plantarum*, 37, 1708. <https://doi.org/10.1007/s11738-014-1708-4>
- Hasegawa, P. M. (2013). Sodium ( $\text{Na}^+$ ) homeostasis and salt tolerance of plants. *Environmental and Experimental Botany*, 92, 19–31. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.03.001>
- Johnson, R. C. (1991). Salinity resistance, water relations and salt content of crested and tall wheatgrass accessions. *Crop Science*, 31, 730–734. <https://doi.org/10.2135/cropsci1991.0011183X003100030039x>
- McGuire, P. E., & Dvoák, J. (1981). High salt-tolerance potential in wheatgrass. *Crop Science*, 21, 702–705. <https://doi.org/10.2135/cropsci1981.0011183X002100050018x>
- Melderis, A. (1980). *Elymus L.* In T. G. Tutin, V. H. Heywood, N. A. Burghes, D. M. Moore, D. H. Valentin, S. M. Walters, & D. A. Webb (Eds.), *Flora Europea. V. Alismataceae to Orchidaceae (Monocotyledones)* (pp. 192–198). : Cambridge University Press.
- Moore, K. J., & Moser, L. E. (1995). Quantifying developmental morphology of perennial grasses. *Crop Science*, 35, 37–43. <https://doi.org/10.2135/cropsci1995.0011183X003500010007x>
- Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell & Environment*, 25, 239–250. <https://doi.org/10.1046/j.0016-8025.2001.00808.x>
- Otondo, J., Borrajo, C. I., & Bandera, R. (2019). Forrajeras templadas y subtropicales en suelos afectados por sales de regiones húmedas y subhúmedas de la Argentina. In R. Bandera (Ed.), *Suelos afectados por sales con énfasis en la Argentina* (pp. 139–167). Orientación Gráfica.
- Oyiga, B. C., Sharma, R. C., Shen, J., Baum, M., Ogbonnaya, F. C., Léon, J., & Ballvora, A. (2016). Identification and characterization of salt

- tolerance of wheat germplasm using a multivariable screening approach. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 202, 472–485. <https://doi.org/10.1111/jac.12178>
- Rasband, W. S. (2016). *ImageJ 1.50i [Program file]*. National Institutes of health, Bethesda, MD, 1997–2016. Retrieved from <http://imagej.nih.gov/ij/>
- Reigosa, M. J. (2001). *Handbook of plant ecophysiology techniques*. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Sade, N., Rubio-Wilhelmi, M., Umnajkitikorn, K., & Blumwald, E. (2018). Stress-induced senescence and plant tolerance to abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 69, 845–853. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx235>
- Salim, M. (1989). Salinity effects on growth and ionic relations of two triticale varieties differing in salt tolerance. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 162, 35–42. <https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.1989.tb00685.x>
- SAS (2002). *The SAS system for Windows. Release 9.1*. Cary, NC, USA: SAS Institute.
- Shannon, M. C. (1978). Testing salt tolerance variability among tall wheatgrass lines. *Agronomy Journal*, 70, 719–722. <https://doi.org/10.2134/agronj1978.00021962007000050006x>
- Taleisnik, E., Rodríguez, A. A., Bustos, D., Erdei, L., Ortega, L., & Senn, M. E. (2009). Leaf expansion in grasses under salt stress. *Journal of Plant Physiology*, 166, 1123–1140. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.03.015>
- Wu, H. (2018). Plant salt tolerance and Na<sup>+</sup> sensing and transport. *The Crop Journal*, 6, 215–225. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2018.01.003>
- Yousfi, S., Serret, M. D., Márquez, A. J., Voltas, J., & Araus, J. L. (2012). Combined use of  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  tracks nitrogen metabolism and genotypic adaptation of durum wheat to salinity and water deficit. *New Phytologist*, 194, 230–244. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.04036.x>

## SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

**How to cite this article:** Borrajo CI, Sánchez-Moreiras AM, Reigosa MJ. Morpho-physiological, biochemical and isotopic response of tall wheatgrass populations to salt stress. *J Agro Crop Sci*. 2021;207:236–248. <https://doi.org/10.1111/jac.12461>

## **ESTRÉS SALINO INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA**

A continuación, se presenta la INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA del trabajo:

Borrajo, C.I.; Sánchez-Moreiras, A.M.; Reigosa, M.J. 2021. Morpho-physiological, biochemical and isotopic response of tall wheatgrass populations to salt stress.

J. Agron. Crop Sci., 207, 236–248. <http://doi.org/10.1111/jac.12461>

### **CONTIENE LA INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA DE LAS TABLAS**

Table S1 pp1

Table S2 pp2

Table S3 pp3

### **CONTIENE LA INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA DE LAS FIGURAS**

FIGURE S1: pp. 1

FIGURE S2: pp. 2

FIGURE S3: pp. 3

FIGURE S4: pp. 4



**SUPPLEMENTARY INFORMATION - TABLES**

**Table S1.** Analysis of variance (*p*-values) for total, green and dead aerial biomass (TotalB, GreenB and DeadB); leaf elongation, senescence and appearance rate (LER, LSR and LAR); leaf area (leafA), leaf width (leafW), number of leaves per tiller (leafN), number of tillers (Density), and specific leaf area (SLA); protein, proline and relative water content (RWC) in 40-day experiment (n=140). Populations (Popu), salt levels (Salt), and their interaction were considered fixed effects.

Variables	Biomass			Morphogenetic			Structural					Physiological		
	TotalB	GreenB	DeadB	LER	LSR	LAR	LeafA	LeafW	LeafN	Density	SLA	RWC	Protein	Proline
Salt	0.0015 **	0.0001 ***	0.0001 ***	0.0001 ***	0.0001 ***	0.0001 ***	0.0089 **	0.5038 ns	0.0001 ***	0.0001 ***	0.0001 ***	0.0060 **	0.0484 *	0.0001 ***
Popu	0.0017 **	0.0129 *	0.0017 **	0.0112 *	0.0152 *	0.8648 ns	0.0041 **	0.0001 ***	0.7611 ns	0.0422 *	0.0021 **	0.2164 ns	0.0008 ***	0.0446 **
Salt x Popu	0.9858 ns	0.9462 ns	0.4632 ns	0.8316 ns	0.9812 ns	0.9322 ns	0.8454 ns	0.9826 ns	0.1160 ns	0.2977 ns	0.3610 ns	0.0948 ns	0.6402 ns	0.9411 ns

Probability values and significance were shown, ns: not significant  $p > 0.05$ . Significant at \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

**Table S2.** Analysis of covariance (*p*-values) for net photosynthetic rate in the 40-day experiment (2 Date) and 85-day experiment (3 Date). Populations (Popu), salt levels (Salt), registration dates (Date), their interactions, and covariates (PAR: photosynthetically active radiation, Temp\_A and Temp\_L: leaf and air temperature. Flow: air flows, CO<sub>2</sub> concentration. RH: relative humidity), were considered.

Variable	Net photosynthetic rate	
	40-day experiment	85-day experiment
Salt	0.0001 ***	0.0001 ***
Popu	0.6815 ns	0.9604 ns
Salt x Popu	0.3147 ns	0.8520 ns
Date	0.6720 ns	0.0028 **
Salt x Date	0.4561 ns	0.0001 ***
Popu x Date	0.4427 ns	0.9782 ns
Salt x Popu x Date	0.4892 ns	0.9660 ns
PAR	0.0001 ***	0.0004 ***
Temp_A	0.7156 ns	0.5286 ns
Temp_L	0.7163 ns	0.5272 ns
Flow	0.1967 ns	0.9175 ns
CO <sub>2</sub>	0.0026 **	0.7097 ns
RH	0.0001 ***	0.3404 ns

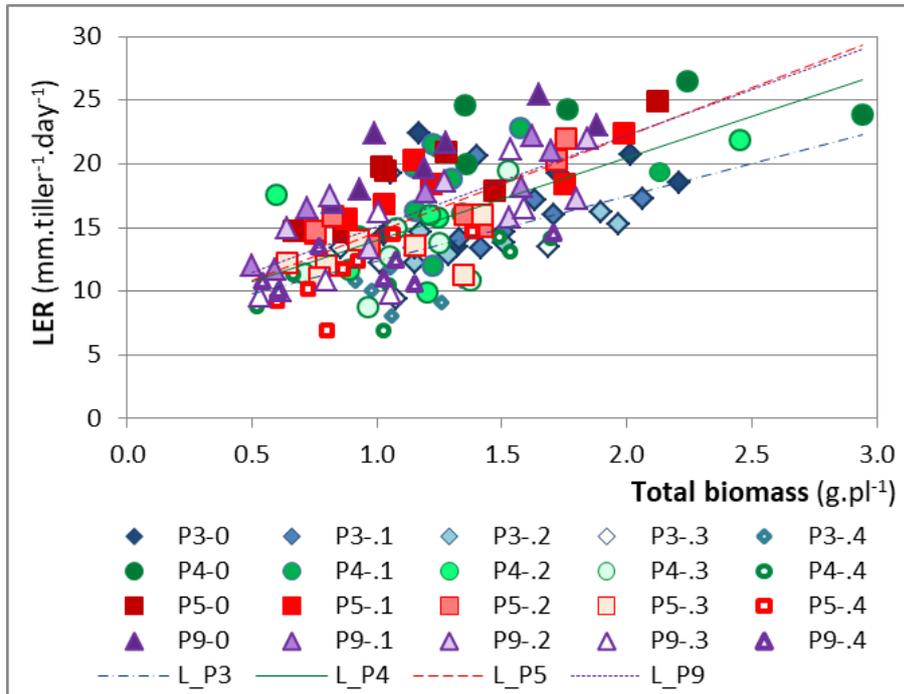
Probability values and significance were shown, ns: not significant  $p > 0.05$ . Significant at \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$

**Table S3.** Analysis of variance (*p*-values) for green leaf length per tiller (LeafT), number of tillers (Density), total aerial biomass (TotalB), flowering (Flower), and specific leaf area (SLA); relative water content (RWC), proline, accumulated evapotranspiration and water use efficiency (ETA, WUE); stable isotopes of <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N ( $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$ ); Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> and N contents in 85-day experiment (n=100). Populations (Popu), salt levels (Salt) and their interaction were fixed effects considered.

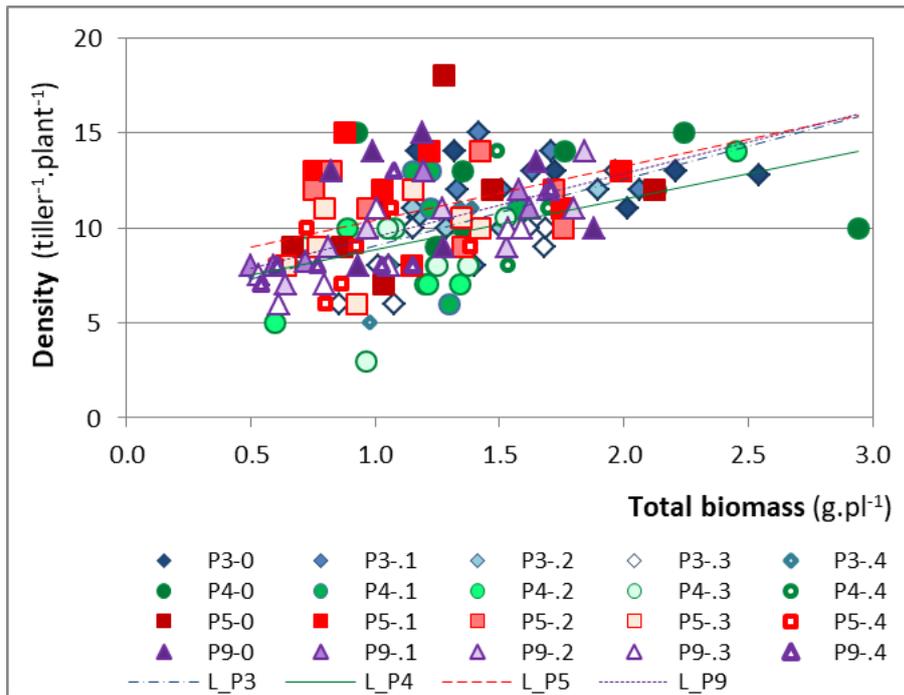
Variables	Structural and Productive					Physiological				Elemental analysis				Stable isotopes	
	TotalB	LeafT	Density	Flower	SLA	RWC	Proline	ETA	WUE	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>	N	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
Salt	0.0001	0.0006	0.0237	0.0001	0.0003	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0027	0.0096	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
	***	***	*	***	***	***	***	***	***	**	**	***	***	***	***
Popu	0.0344	0.0432	0.0432	0.6619	0.2582	0.7931	0.6437	0.0403	0.0314	0.8922	0.1810	0.0363	0.9070	0.0470	0.6455
	*	*	*	ns	ns	ns	ns	*	*	ns	ns	*	ns	*	ns
Salt x Popu	0.3921	0.5100	0.7038	0.9548	0.1699	0.7551	0.5256	0.3947	0.4309	0.3054	0.7332	0.1796	0.8038	0.8891	0.6954
	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Probability values and significance were shown, ns: not significant  $p > 0.05$ . Significant at \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$

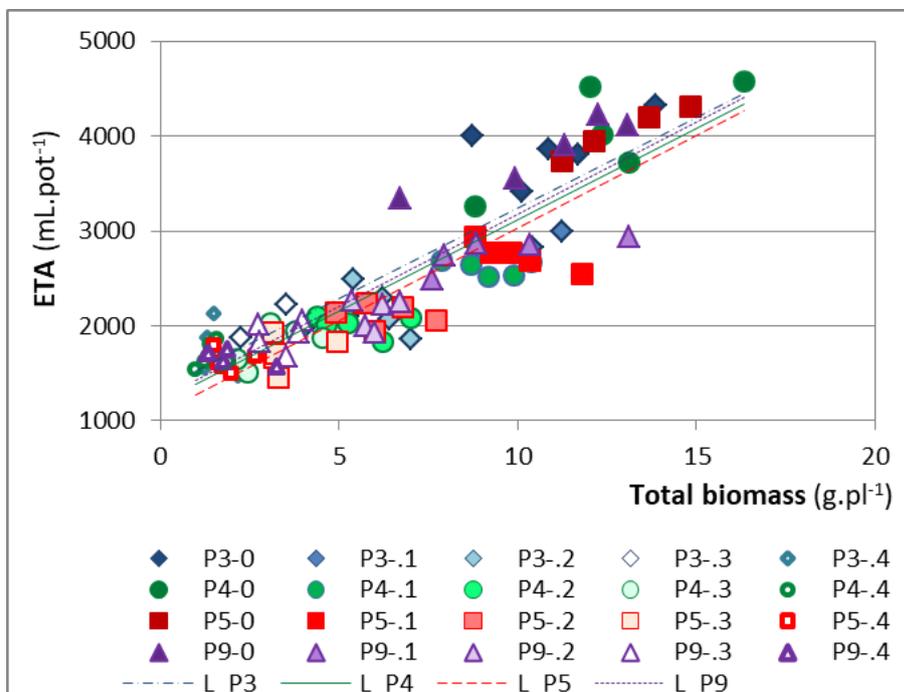
**SUPPLEMENTARY INFORMATION – FIGURES**



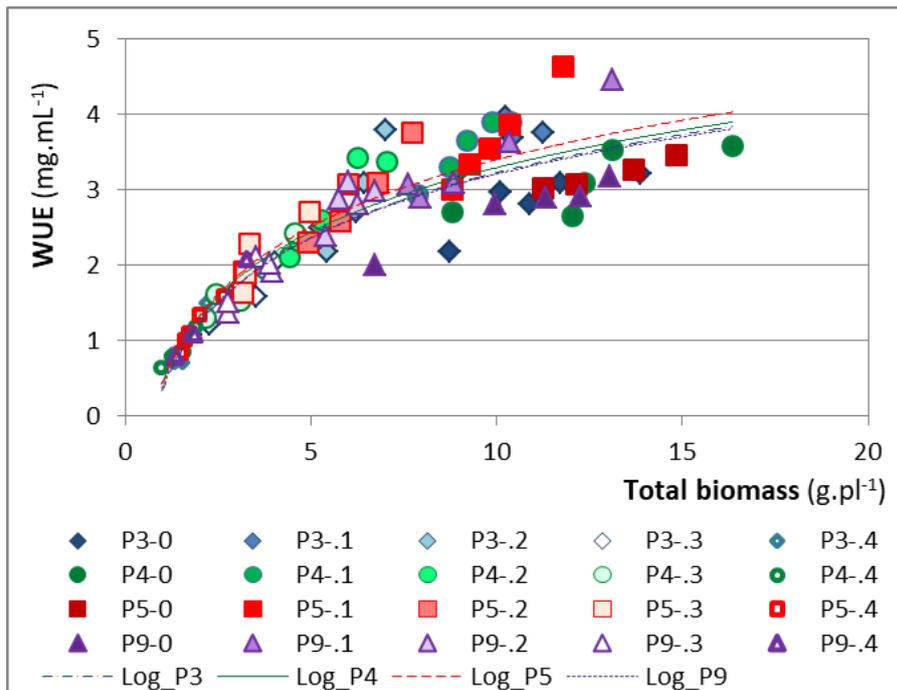
**FIGURE S1:** Relationship between total biomass and leaf elongation rate (LER) of four populations (P3, P4, P5, P9) growing under five salt levels (Salt: 0-0.1-0.2-0.3-0.4 M NaCl) in the 40-day experiment. The coloured dots indicate the combination of a population with a salt concentration. The lines (L) correspond to each population.



**FIGURE S2:** Relationship between total biomass and density of four populations (P3, P4, P5, P9) growing under five salt levels (Salt: 0-0.1-0.2-0.3-0.4 M NaCl) in the 40-day experiment. The coloured dots indicate the combination of a population with a salt concentration. The lines (L) correspond to each population.



**FIGURE S3:** Relationship between total biomass and accumulated evapotranspiration (ETA) of four populations (P3, P4, P5, P9) growing under five salt levels (Salt: 0-0.1-0.2-0.3-0.4 M NaCl) in the 85-day experiment. The coloured dots indicate the combination of a population with a salt concentration. Lines (L) correspond to each population.



**FIGURE S4:** Relationship between total biomass water use efficiency (WUE) of four populations (P3, P4, P5, P9) growing under five salt levels (Salt: 0-0.1-0.2-0.3-0.4 M NaCl) in the 85-day experiment. The coloured dots indicate the combination of a population with a salt concentration. Logarithmic lines (Log) correspond to each population.

## **ESTRÉS HÍDRICO Y SALINO**

**Esta sección corresponde al trabajo publicado:**

Borrajo, C.I.; Sánchez-Moreiras, A.M.; Reigosa, M.J. 2022. Ecophysiological responses of tall wheatgrass germplasm to drought and salinity. *Plants* 2022, Volume 11, Issue 12, 1548. <http://doi.org/10.3390/plants11121548>

## **ESTRÉS HÍDRICO Y SALINO**

### **Ecophysiological responses of tall wheatgrass germplasm to drought and salinity.**

Abstract

1. Introduction

2. Results

2.1. Morpho-agronomic variables

2.1.1. Drought and salinity effects

2.1.2. Accession effects

2.2. Physiological and isotopic variables

2.2.1 Drought and salinity effects

2.2.2. Accession effects

2.3. Broad-sense heritability

3. Discussion

3.1 Drought and salinity in tall wheatgrass

3.2 Accessions variability and heritability

4. Materials and Methods

4.1. Origin of the germplasms and experimental conditions

4.2. Morpho-agronomic variables

4.3 Physiological and isotopic variables

4.4. Soil electrical conductivity

4.5. Statistical Analyses

5. Conclusions

References



## Article

# Ecophysiological Responses of Tall Wheatgrass Germplasm to Drought and Salinity

Celina I. Borrajo <sup>1,2,\*</sup> , Adela M. Sánchez-Moreiras <sup>1</sup>  and Manuel J. Reigosa <sup>1</sup> 

<sup>1</sup> Departamento de Biología Vexetal e Ciencias do Solo, Facultade de Biología, Universidade de Vigo, Campus Lagoas Marcosende s/n, 36310 Vigo, Spain; adela@uvigo.es (A.M.S.-M.); mreigosa@uvigo.es (M.J.R.)

<sup>2</sup> Agricultural Experimental Station Cuenca del Salado of INTA (National Institute of Agricultural Technology), Av. Belgrano 416, Rauch 7203, Argentina

\* Correspondence: borrajo.celina@inta.gob.ar; Tel.: +54-9249-456-3530

**Abstract:** Tall wheatgrass (*Thinopyrum ponticum* (Podp.) Barkworth and D.R. Dewey) is an important, highly salt-tolerant C3 forage grass. The objective of this work was to learn about the ecophysiological responses of accessions from different environmental origins under drought and salinity conditions, to provide information for selecting superior germplasm under combined stress in tall wheatgrass. Four accessions (P3, P4, P5, P9) were irrigated using combinations of three salinity levels (0, 0.1, 0.3 M NaCl) and three drought levels (100%, 50%, 30% water capacity) over 90 days in a greenhouse. The control treatment showed the highest total biomass, but water-use efficiency (WUE),  $\delta^{13}\text{C}$ , proline, N concentration, leaf length, and tiller density were higher under moderate drought or/and salinity stress than under control conditions. In tall wheatgrass,  $\text{K}^+$  functions as an osmoregulator under drought, attenuated by salinity, and  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  function as osmoregulators under salinity and drought, while proline is an osmoprotector under both stresses. P3 and P9, from environments with mild/moderate stress, prioritized reproductive development, with high evapotranspiration and the lowest WUE and  $\delta^{13}\text{C}$  values. P4 and P5, from more stressful environments, prioritized vegetative development through tillering, showing the lowest evapotranspiration, the highest  $\delta^{13}\text{C}$  values, and different mechanisms for limiting transpiration. The  $\delta^{13}\text{C}$  value, leaf biomass, tiller density, and leaf length had high broad-sense heritability ( $H^2$ ), while the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ratio had medium  $H^2$ . In conclusion, the combined use of the  $\delta^{13}\text{C}$  value,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ratio, and canopy structural variables can help identify accessions that are well-adapted to drought and salinity, also considering the desirable plant characteristics. Tall wheatgrass stress tolerance could be used to expand forage production under a changing climate.



**Citation:** Borrajo, C.I.; Sánchez-Moreiras, A.M.; Reigosa, M.J. Ecophysiological Responses of Tall Wheatgrass Germplasm to Drought and Salinity. *Plants* **2022**, *11*, 1548. <https://doi.org/10.3390/plants11121548>

Academic Editors: Agustín A. Grimoldi and Carla E. Di Bella

Received: 19 May 2022

Accepted: 7 June 2022

Published: 10 June 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Keywords:** tiller density; leaf length; 13-carbon isotope; water-use efficiency;  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ratio; proline;  $\text{K}^+$  concentration;  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  concentration; combined stress; C3 grass

## 1. Introduction

Climate change, as well as the reduction in water reserves and the increase in salinized lands, poses major constraints to agricultural–livestock production systems [1,2]. Wild species are extremely rich resources of genetic variability for abiotic stress tolerances that are not available in cultivated species, which could help improve crop productivity and environmental sustainability [2,3]. This may be the case for tall wheatgrass (*Thinopyrum ponticum* (Podp.) Barkworth and D.R. Dewey) [3–5], which has been identified as a salt-tolerant forage grass [6–8] with potential as a soil phytoremediator [7] and energy crop [9,10]. Moreover, it has been used as a source of genes to improve tolerance to biotic and abiotic stress in wheat [3–6]. Tall wheatgrass outperforms most species in tolerance to drought [7,10] and salinity [3–6,11]. However, the physiological mechanisms responsible for the high tolerance to water and salt stress have been less extensively studied at the intraspecific level in tall wheatgrass [9,12–15].

Tall wheatgrass is mainly used as forage for direct grazing, hay, and silage in areas with salinity or alkalinity limitations in different parts of the world [6,7,9,12,16,17]. Forage grass improvement programs seek to increase its aerial biomass production and tolerance to drought and salinity. However, drought and salinity both cause an initial phase of osmotic stress, to which plants respond by minimizing water loss through stomatal closure, hence limiting transpiration, gas exchange, photosynthesis, and leaf growth [18,19]. The photosynthetic response to drought and salinity stress is very complex and is affected by both the restriction of CO<sub>2</sub> diffusion into the chloroplast, through limitations on stomatal opening and the mesophyll transport of CO<sub>2</sub>, and the alterations to leaf photochemistry and carbon metabolism [18,20]. When stress conditions persist, salt can cause a nutritional imbalance, toxicity, and endogenous oxidative stress, severely reducing growth and development [18,19,21–23]. Plants activate different mechanisms to overcome stress, limiting transpiration through processes including stomatal closure and premature leaf senescence [18–21]. They also activate mechanisms to recover an osmotic balance, namely the cellular accumulation of inorganic solutes such as K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, and Cl<sup>−</sup> [19,23,24] or organic solutes such as proline [14,25,26]. Proline can also act as an osmoprotective solute against oxidative stress [25,26].

Combined water and salt stress causes a severe burden and different responses among plant species [7,11,17,19,27]. The stable isotopes of carbon (<sup>12</sup>C, <sup>13</sup>C) and nitrogen (<sup>14</sup>N, <sup>15</sup>N) in dry matter can help us better understand the carbon and nitrogen metabolism of plants under abiotic stress [27,28]. Plants discriminate against the heavier carbon isotope (<sup>13</sup>C) during photosynthesis (C3-Rubisco), and this discrimination depends on the intercellular to atmospheric CO<sub>2</sub> ratio in the photosynthetic organs, which varies with the stomatal conductance and intrinsic photosynthetic capacity of the C3 plant [29]. The <sup>13</sup>C isotope composition (δ<sup>13</sup>C) provides information regarding the long-term transpiration efficiency (WUE<sub>i</sub> = A/E, photosynthesis/transpiration rate) and correlates with the WUE<sub>i</sub> and yield in C3 crops [26,29–33]. Furthermore, δ<sup>13</sup>C generally has a higher broad-sense heritability than yield and biomass [30–32,34]. The <sup>15</sup>N isotope composition (δ<sup>15</sup>N) is directly related to the N metabolism, and both are negatively affected by drought and salinity, which may be due to the decreased nitrate reductase and glutamate synthetase activity [27,28]. Therefore, δ<sup>13</sup>C and δ<sup>15</sup>N values may be adequate indicators for selecting genotypes tolerant to drought or/and salinity in C3 grass [27,28,32].

In Argentina, tall wheatgrass was introduced during the 1950s for cattle grazing due to its plasticity and producibility in environments with alkalinity, salinity, summer droughts, or winter floods; currently, tall wheatgrass is used for cattle grazing on 1 million hectares of hydro-halomorphic soils in the Salado River basin [16]. Tall wheatgrass became naturalized in semi-arid to temperate humid environments three decades ago in Argentina, and variations in certain characteristics have been detected that are of agronomic interest [35,36]. Studies have been conducted to explore tolerance to drought and/or salinity at the intraspecific level in tall wheatgrass, which is especially important due to the environment in which it is cultivated. In a previous study, wild populations from contrasting environmental origins showed different levels of biomass production when subjected to different intensities of drought (100%, 50%, and 30% field capacity) over 35 days [13]. The populations presented different growth strategies (size and number of leaves and tillers) as well as differences in morpho-physiological mechanisms (leaf water content, water use efficiency, and leaf proline and protein content) to tolerate stress due to drought. This study showed that a higher biomass production stability was related to a higher tiller density and water use efficiency (WUE) [13]. In another study, populations were evaluated in terms of their salinity tolerance using two trials of different durations (40 days and 85 days) and intensities (irrigation with five salt concentrations: 0, 0.1, 0.2, 0.3, and 0.4 M NaCl), and interpopulation differences were found in biomass production according to the duration of stress [8]. In the 40-day salt trial, the interpopulation differences were similar to those found in the drought trial (differences in morphogenetic and structural characteristics, specific leaf area, and leaf proline and protein content), and differences in dead biomass

were also detected. Meanwhile, in the 85-day salt trial, the interpopulation differences were attributed to differences in structural variables, leaf chlorine concentration, WUE, and  $^{13}\text{C}$  isotope level [8]. Experiments combining drought and salinity stress have not yet been carried out in this germplasm, but they are especially necessary because tall wheatgrass pastures are used for cattle grazing in environments with water and salt stress. Moreover, it is important to analyze the broad-sense heritability ( $H^2$ ) of each characteristic. The  $H^2$  is an estimate of the relative contributions of the differences due to genetic effects (genotypic variability) with respect to the measured phenotypic variability [30–32,34,37].

The aim of this study was to compare growth strategies and physiological mechanisms under drought and salinity conditions in tall wheatgrass germplasm, in order to extend our knowledge regarding tolerance to combined stress and the most effective variables for determining the germplasm that is most adapted to stress. Therefore, in this study, we examined the responses of the morpho-agronomic, physiological, and isotopic variables in four accessions of different environmental origins (P3 from a humid temperate climate and non-saline, non-alkaline soil; P4 from a semi-arid climate and saline–alkaline soil; P5 from a semi-arid climate and non-saline, non-alkaline soil; and P9 from a humid temperate climate and saline–alkaline soil) under combinations of three salinity levels and three drought levels over 90 days in a greenhouse. In addition, we estimated the broad-sense heritability of each characteristic. We tested the hypothesis that there are different physiological mechanisms and growth strategies for tolerance to drought and salinity stress in tall wheatgrass, and that the variation in these behaviors depends on the intensity of the drought and salinity and the origin of the germplasm. Consequently, this research provides a new understanding of tolerance to drought and salinity in forage species and the most effective characteristics for finding the tall wheatgrass germplasm that is most well-adapted to multiple stresses. This knowledge will help to expand tall wheatgrass culture in different environments, especially in drought and salinity conditions, which will become more typical in the near future due to climate change.

## 2. Results

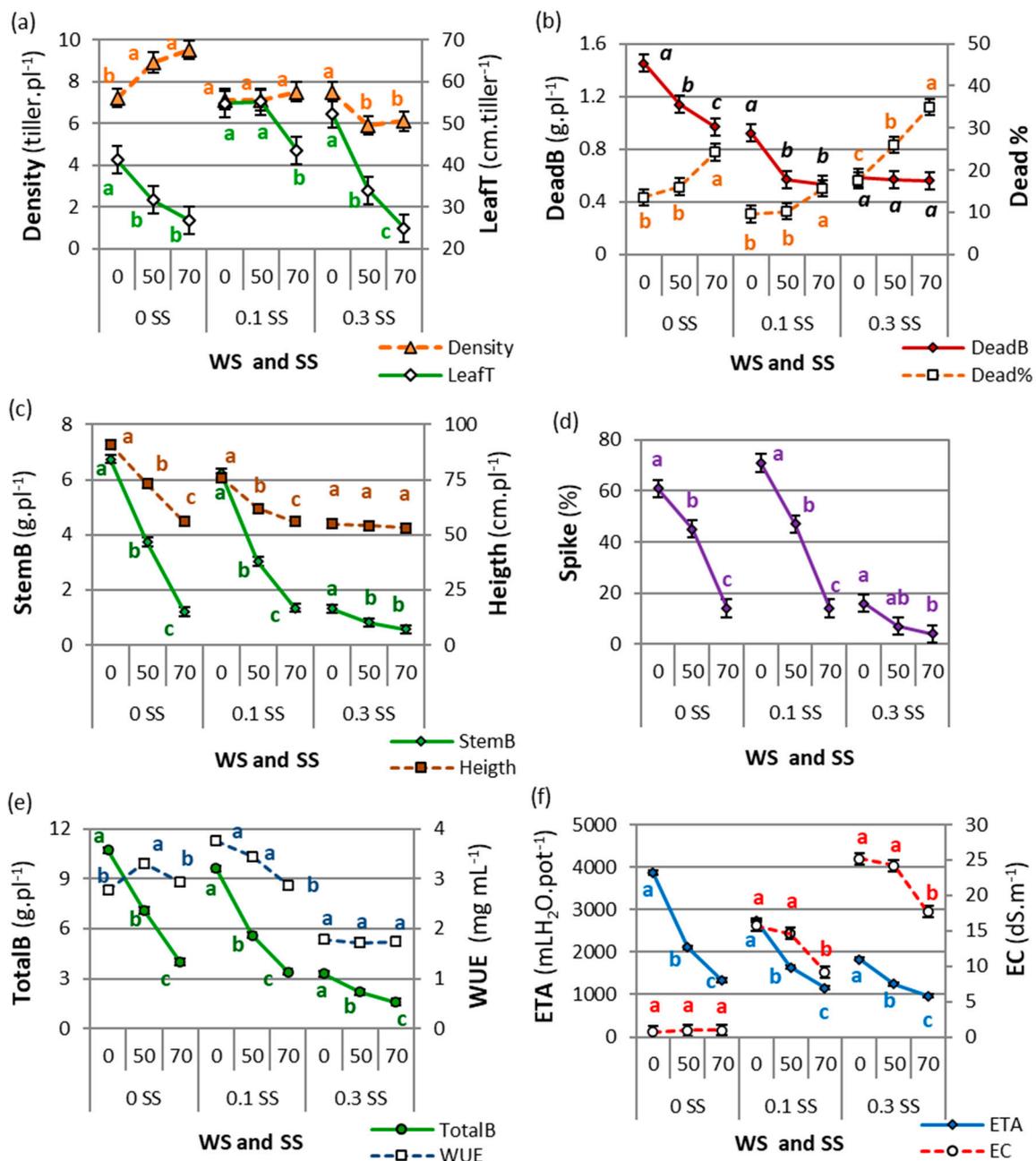
Total biomass, leaf and stem biomass, the proportion of spiked tillers, plant height, and photosynthesis were reduced with increasing drought and salinity. However, the tiller density, leaf length, and water-use efficiency in the moderate drought or/and salinity treatments exceeded the control. The physiological and isotopic parameters showed different behaviors under drought and salinity, especially the  $\delta^{13}\text{C}$  and the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ratio.

### 2.1. Morpho-Agronomic Variables

The results of the three-way factorial ANOVA (four accessions, three salinity levels, three drought levels, and their interactions) for the morpho-agronomic variables are presented in the Supplementary Materials (Table S1).

#### 2.1.1. Drought and Salinity Effects

There were drought and salinity interactions ( $\text{WS} \times \text{SS}$ ) for most of the morpho-agronomic variables ( $p < 0.05$ ), except for LeafB and SLA, which showed drought effects (WS) and salinity effects (SS) (Table S1). The morpho-agronomic variables showed an absence of accession  $\times$  salinity  $\times$  drought interactions ( $p > 0.05$ ). The  $\text{WS} \times \text{SS}$  interactions were analyzed by comparing the WS means for each SS level (Figure 1).

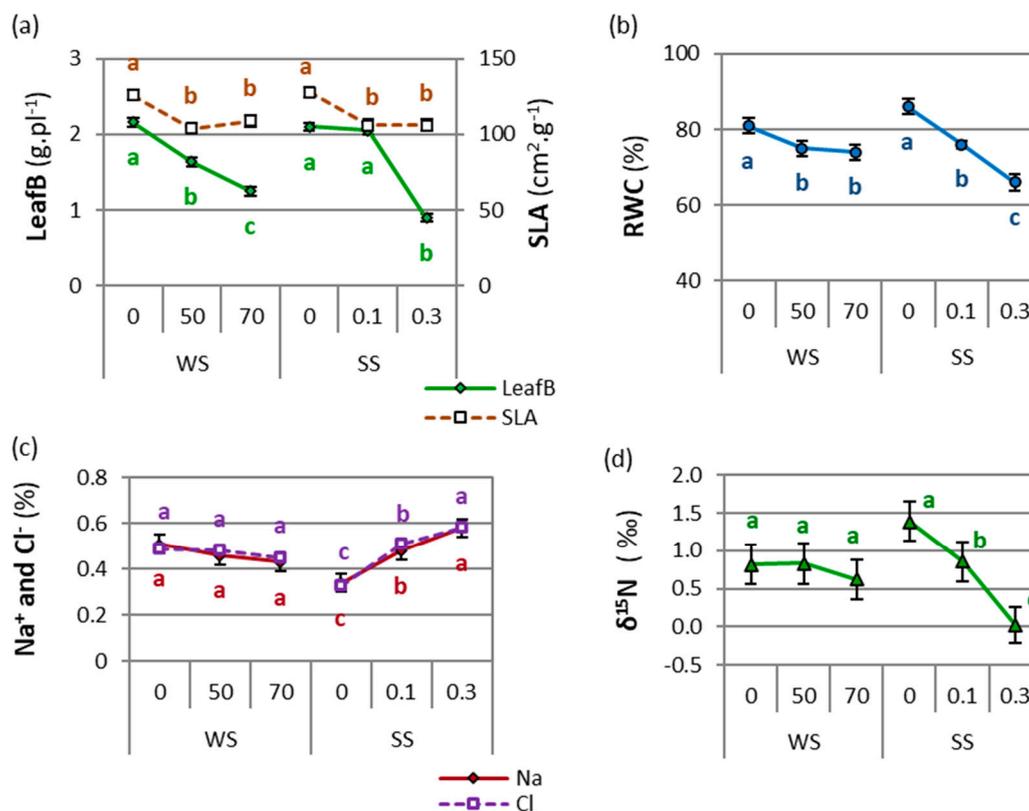


**Figure 1.** Drought and salinity interactions (WS and SS) for: tiller density and leaf length per tiller (LeafT) (a), dead biomass (DeadB) and percentage of dead biomass (Dead%) (b), stem biomass (StemB) and plant height (Height) (c), proportion of spiked tillers (Spike%) (d), total biomass (TotalB) and water-use efficiency (WUE) (e), and accumulated evapotranspiration (ETA) and electrical conductivity (EC) (f). For each variable, different letters indicate significant differences (LSD,  $p < 0.05$ ) between drought levels (WS: 0, 50, or 70, corresponding to 100%, 50%, or 30% water capacity, respectively) for each level of salinity (SS: 0, 0.1, or 0.3, corresponding to 0.0, 0.1, or 0.3 M NaCl, respectively). Points are means of 4 tall wheatgrass accessions and 5 blocks ( $n = 20$ ). Bars indicate the means standard error.

The canopy structure variables (LeafT and Density) showed the highest values under moderate salt or/and drought stress (LeafT in 0 WS–0.1 SS and 50 WS–0.1 SS, and Density in 0 WS–0.1 SS and 0 WS–0.3 SS). Tiller density showed different trends when drought increased for each SS level (Figure 1a). Tiller density increased with increased drought in the salt-free level, no differences were found between drought levels for moderate SS (0.1 SS), and decreased values were found in severe SS with increased WS. However, tiller

density did not differ between 50 and 70 WS in any SS level (Figure 1a). Green leaf length per tiller (LeafT) decreased when WS increased, but by a different magnitude for each SS level:  $-35\%$ ,  $-21\%$ , and  $-52\%$  between 0 and 70 WS for salt-free, moderate, and severe SS, respectively. The highest LeafT values were found in moderate SS combined with 0 or 50 WS (0 WS–0.1 SS and 50 WS–0.1 SS, Figure 1a).

Leaf biomass (LeafB) and specific leaf area (SLA) decreased under drought or salinity conditions, except for LeafB in moderate salinity. Leaf biomass decreased significantly (by  $-42\%$ ) when drought increased from 0 to 70 WS, though it did not differ between salt-free and moderate salinity and decreased significantly in severe salinity, with a  $-57\%$  reduction compared with 0 SS (Figure 2a). Specific leaf area showed the highest values in stress-free conditions for both WS and SS treatments, whereas similar values were noted between 50 WS and 30 WS and between 0.1 SS and 0.3 SS (Figure 2a).



**Figure 2.** Effect of drought level (WS) or salinity level (SS) on leaf biomass (LeafB) and specific leaf area (SLA) (a); relative water content (RWC) (b); Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> concentrations (c); and stable isotope of N ( $\delta^{15}\text{N}$ ) (d). For each variable, different letters indicate significant differences (LSD,  $p < 0.05$ ) between drought levels (WS: 0, 50, or 70, corresponding to 100%, 50%, or 30% water capacity, respectively) or salinity levels (SS: 0, 0.1, or 0.3, corresponding to 0.0, 0.1, or 0.3 M NaCl, respectively). Points are means of 4 tall wheatgrass accessions, 5 blocks, and three levels of salinity or drought ( $n = 60$ ). Bars indicate the means standard error.

Dead biomass (DeadB) increased with stress, while the inverse behavior was observed for the percentage of dead biomass (Dead%). The DeadB values were highest in the control treatment, decreased with drought in the salt-free treatment, were lower in the levels with drought (50 WS and 70 WS) under moderate salinity, and did not differ between drought levels in the severe salt level (Figure 1b). By contrast, the percentage of dead biomass over total biomass (Dead%) increased when drought increased, but by a different magnitude at each SS level (Figure 1b).

In general, reproductive development and biomass production showed the highest values in the control and decreased under drought and salinity conditions, although the values were similar to the control in the moderate-salt and mild-drought treatments. Plants reduced their green stem biomass (StemB) with increasing drought and salinity, with an important drop from 0 to 70 WS under 0 or moderate SS (Figure 1c). The proportion of spiked tillers (Spike%) showed similar behavior to StemB, with a notable reduction in the spikes at higher drought levels, especially in combination with severe salinity (less than 20% spiked tillers, Figure 1d). Meanwhile, plant height (Height) decreased with increased drought for 0 and 0.1 SS, but it did not differ among the 0.3 SS levels (Figure 1c). The highest total biomass (TotalB) was produced in the control (0 WS–0 SS), and growth was limited with increasing drought and salinity, though with less difference among the 0.3 SS levels (Figure 1e).

The highest accumulated evapotranspiration (ETA) occurred in the control, but the highest water-use efficiency (WUE) was found under moderate drought–salinity conditions. The ETA decreased under drought and salinity conditions (Figure 1f). Meanwhile, WUE showed the highest values at 50 WS for salt-free and 0 and 50 WS for moderate salinity conditions, with no differences found among the 0.3 SS levels (Figure 1e).

### 2.1.2. Accession Effects

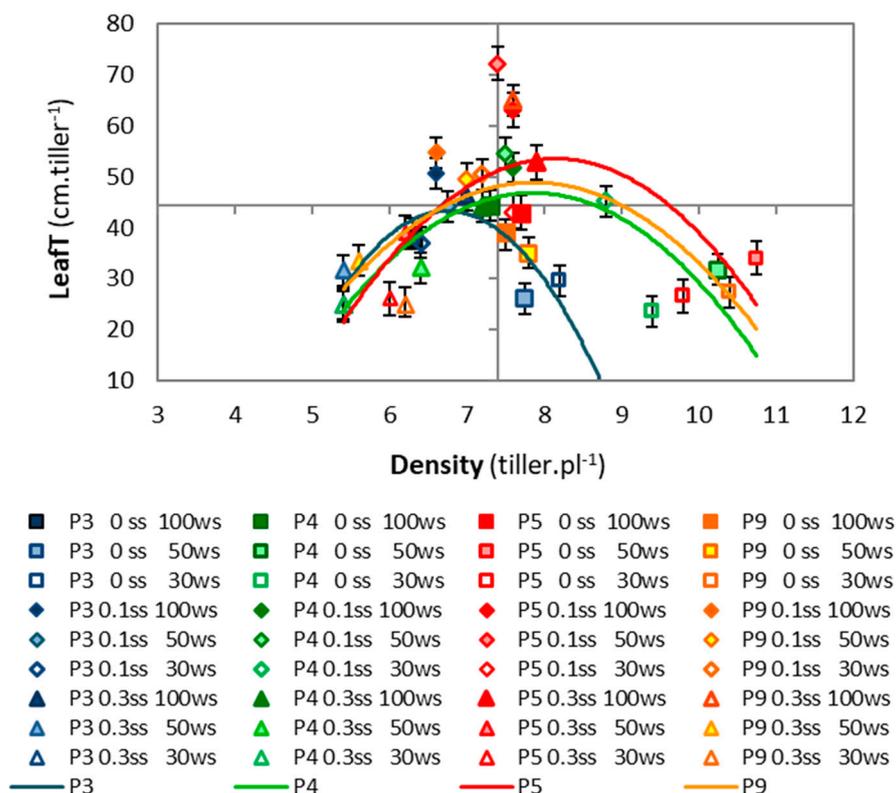
The morpho-agronomic variables showed different behaviors between tall wheatgrass accessions ( $p < 0.05$ , Table 1), except for the specific leaf area (SLA) and the dead biomass (DeadB) ( $p > 0.05$ ). The behavior of the accessions could be grouped according to their environmental origin: accessions originating from environments with greater stress, such as P4 (semi-arid climate and saline–alkaline soil) and P5 (semi-arid climate and non-saline, non-alkaline soil), and accessions originating from environments with mild to moderate stress, such as P3 (humid temperate climate and non-saline, non-alkaline soil) and P9 (humid temperate climate and saline–alkaline soil). Accessions showed no interactions between salinity or drought treatments for all morpho-agronomic variables ( $p > 0.05$ ), except for the proportion of spiked tillers (Spike%) (ANOVAs in Table S1).

In general, the accessions from environments with greater stress showed higher values in the canopy structural variables (Density and LeafT), which P5 showed the highest values and P3 the lowest. The differences among accessions were maintained under drought and salinity conditions. The number of tillers per plant (Density) showed the highest values in P5 and P4, and P3 showed the lowest values (Table 1); meanwhile, the leaf length per tiller (LeafT) was highest in P5 and P9 and lowest in P3 (Table 1). The accessions maintained their differences when we calculated the leaf length as a function of the tiller density, showing a quadratic trend. The treatments with different intensities of drought and moderate salinity were located at the top of the curves (with greater foliar lengths and intermediate densities, symbolized by diamonds in Figure 3). Extreme behaviors were observed in the curves of P3 and P5: P3 showed a curve displaced to the left and with less height due to its lower density and foliar length, while P5 showed a curve displaced to the right and with greater height due to its greater density and leaf length (the behavior of the density and foliar length was previously mentioned in Section 2.1.1, regarding the interaction of drought and salinity, Figure 1a).

**Table 1.** Tiller density, leaf length per tiller (LeafT), green leaf biomass (LeafB), green stem biomass (StemB), total biomass dry weight (TotalB), percentage of dead biomass (Dead%), plant height (Height), accumulated evapotranspiration (ETA), water-use efficiency (WUE), proportion of spiked tillers (Spike%), Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ratio (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>), and stable isotopes of C ( $\delta^{13}\text{C}$ ) of four tall wheatgrass accessions (P3, P4, P5, P9); Spike% values are given for the four accessions at each salinity level (0 SS, 0.1 SS, or 0.3 SS, corresponding to 0.0, 0.1, or 0.3 M NaCl, respectively).

Accession	Density	LeafT	LeafB	Dead%	StemB	TotalB	Height	ETA	WUE	Spike%			Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>	$\delta^{13}\text{C}$
	(tiller.pl <sup>-1</sup> )	(cm.tiller <sup>-1</sup> )	(g.pl <sup>-1</sup> )	(%)	(g.pl <sup>-1</sup> )	(g.pl <sup>-1</sup> )	(cm.pl <sup>-1</sup> )	(mLH <sub>2</sub> O pot <sup>-1</sup> )	mg.mL <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O	0 SS	0.1 SS	0.3 SS		(‰)
P3	6.8 b	36.4 b	1.57 b	19.5 ab	2.93 a	5.27ab	66.9 a	1893 ab	2.66 b	53 a	42 b	8 a	1.44 b	-26.55 b
P4	7.7 a	39.2 ab	1.64 b	20.0 a	2.61 b	5.09 b	63.2 ab	1849 b	2.63 b	30 b	46 b	10 a	1.70 a	-26.48 ab
P5	7.9 a	44.1 a	1.91 a	18.7 ab	2.73 ab	5.53a	61.8 b	1861 b	2.83 a	40 b	34 c	8 a	1.40 b	-26.21 a
P9	7.3 ab	42.2 a	1.62 b	16.8 b	2.91 a	5.21b	64.4 ab	1904 a	2.62 b	40 b	55 a	9 a	1.58 ab	-26.60 b
ee	0.3	2.5	0.07	1.4	0.12	0.13	1.6	42	0.06	4.1	4.0	3.6	0.09	0.16

Data are means of 3 drought levels, 3 salinity levels, and 5 blocks ( $n = 45$ ), except for Spike%, which is means of 3 drought levels and 5 blocks ( $n = 15$ ). Different letters in the same column indicate significant differences (LSD,  $p < 0.05$ ). ee, mean standard error; pl, plant.



**Figure 3.** Relationship between Density and leaf length (LeafT) of four accessions (P3, P4, P5, P9) grown under three drought levels (0 WS, 50 WS, or 70 WS, corresponding to 100%, 50%, or 30% water capacity, respectively) combined with three salinity levels (0 SS, 0.1 SS, or 0.3 SS, corresponding to 0.0, 0.1, or 0.3 M NaCl, respectively). Data are means of five blocks ( $n = 5$ ). Bars indicate the means standard error. Colored lines show the behavior of each accession. P3:  $y = -8.5x^2 + 114.4x - 342.6$ ,  $R^2 = 0.76$  \*; P4:  $y = -3.8x^2 + 59.9x - 188.3$ ,  $R^2 = 0.62$  \*; P5:  $y = -4.3x^2 + 69.1x - 227.98$ ,  $R^2 = 0.46$  ns; P9:  $y = -3.4x^2 + 54.3x - 164.8$ ,  $R^2 = 0.39$  ns (ns  $p > 0.0500$ , \*  $p < 0.0500$ ).

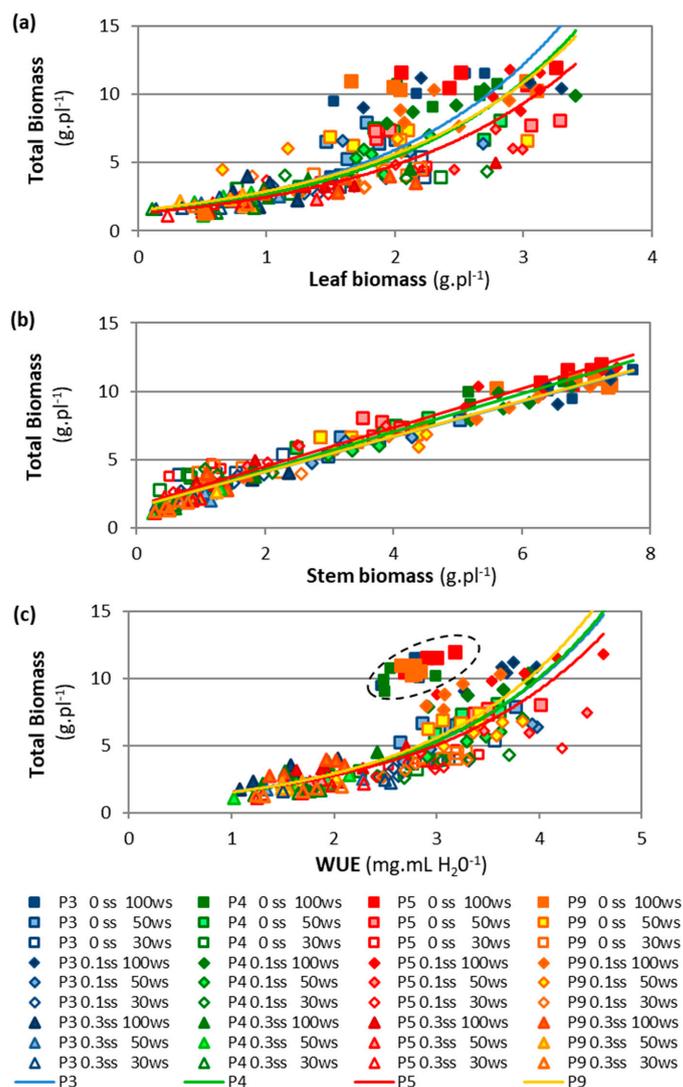
In the partitioning of assimilates (leaf:stem or vegetative:reproductive), grouping between accessions was also observed: P4 and P5, from more stressful environments, prioritized vegetative development, while P3 and P9, from environments with mild/moderate stress, prioritized reproductive development. Canopy structural variables (Density and LeafT) determined the highest green leaf biomass (LeafB) in P5 (Table 1, Figure S1). However, P3 and P9 presented the highest values for green stem biomass (StemB), while P5 was intermediate and P4 was the lowest (Table 1). The highest plant height (Height) was reached in P3, and P5 presented the lowest (Table 1). The proportion of spiked tillers (Spike%) showed different trends between accessions for each salinity level (Table S1,  $p = 0.0022$ ). In the salt-free level, P3 showed the highest Spike% (53%); under moderate salinity, P9 was the highest (55%) and P5 the lowest (34%); and in severe salinity conditions, the spike proportion decreased notably ( $\leq 10\%$ ), and no differences were found among accessions (Table 1).

The accession P4, which came from the most stressful environment, showed the highest percentage of senescent tissue. There were no significant differences in dead biomass between accessions (Table S1,  $p = 0.2076$ ); however, the percentage of dead biomass was different (Dead%  $p = 0.0482$ ), with P4 showing the highest values and P9 the lowest (Table 1).

The combination of foliar, stem, and dead biomass determined the total biomass (TotalB) value, which was highest in P5, intermediate in P3, and lowest in P4 and P9 (Table 1). In each accession, the relationship between total biomass and its fractions (LeafB, StemB, and DeadB) was notable under drought and salinity conditions. Total and leaf



biomass showed an exponential and positive relationship, maintaining their differences among accessions, though they were more attenuated with higher drought and salinity (Figure 4a). The exponential relationship showed that P3 presented the lowest and P5 the highest values of LeafB, although both accessions showed the same TotalB value. Meanwhile, total and stem biomass showed a strong positive and linear relationship in all accessions (Figure 4b). This figure shows that P3 and P9 had a higher percentage of stem for the same total biomass. These differences were smaller with increasing drought and salinity.



**Figure 4.** Relationship between total biomass and leaf biomass (a), stem biomass (b), or water-use efficiency (WUE) (c) of four accessions (P3, P4, P5, P9) grown under three drought levels (0 WS, 50 WS, or 70 WS, corresponding to 100%, 50%, or 30% water capacity, respectively) combined with three salinity levels (0 SS, 0.1 SS, or 0.3 SS, corresponding to 0.0, 0.1, or 0.3 M NaCl, respectively). Colored lines show the behavior of each accession. For leaf biomass, P3:  $y = 1.40e^{0.72x}$   $R^2 = 0.75$  \*\*\*, P4:  $y = 1.32e^{0.71x}$   $R^2 = 0.79$  \*\*\*, P5:  $y = 1.28e^{0.66x}$   $R^2 = 0.80$  \*\*\*, P9:  $y = 1.49e^{0.66x}$   $R^2 = 0.60$  \*\*\*; for stem biomass, P3:  $y = 1.29x + 1.50$   $R^2 = 0.97$  \*\*\*, P4:  $y = 1.40x + 1.44$   $R^2 = 0.96$  \*\*\*, P5:  $y = 1.43x + 1.63$   $R^2 = 0.96$  \*\*\*, P9:  $y = 1.30x + 1.51$   $R^2 = 0.95$  \*\*\*, and for WUE, P3:  $y = 0.83e^{0.62x}$   $R^2 = 0.60$  \*\*\*, P4:  $y = 0.78e^{0.64x}$   $R^2 = 0.62$  \*\*\*, P5:  $y = 0.84e^{0.60x}$   $R^2 = 0.62$  \*\*\*, P9:  $y = 0.79e^{0.65x}$   $R^2 = 0.60$  \*\*\*, (\*\*\*)  $p < 0.001$ ). The dotted parabola encloses the WUE behavior of each accession in the 0 and 0 SS treatments (d).

Accessions P4 and P5, from more stressful environments, showed lower ETA values, and P5 presented the highest WUE (Figure 4c). The ETA values were lowest in P4 and P5 and highest in P9 (Table 1). The TotalB and ETA variables showed a positive relationship, in which P5 presented the upper curve (Table 1, Figure S2). Total biomass and WUE showed an exponential and positive relationship, maintaining their differences among accessions, although their values were more attenuated with stronger drought and salinity (Figure 4c). However, in the control treatments (0 WS–0 SS), all accessions were found above the curves.

## 2.2. Physiological and Isotopic Variables

The results of the three-way factorial ANOVA (four accessions, three salinity levels, three drought levels, and their interactions) for physiological and isotopic variables are presented in the Supplementary Materials (Table S2).

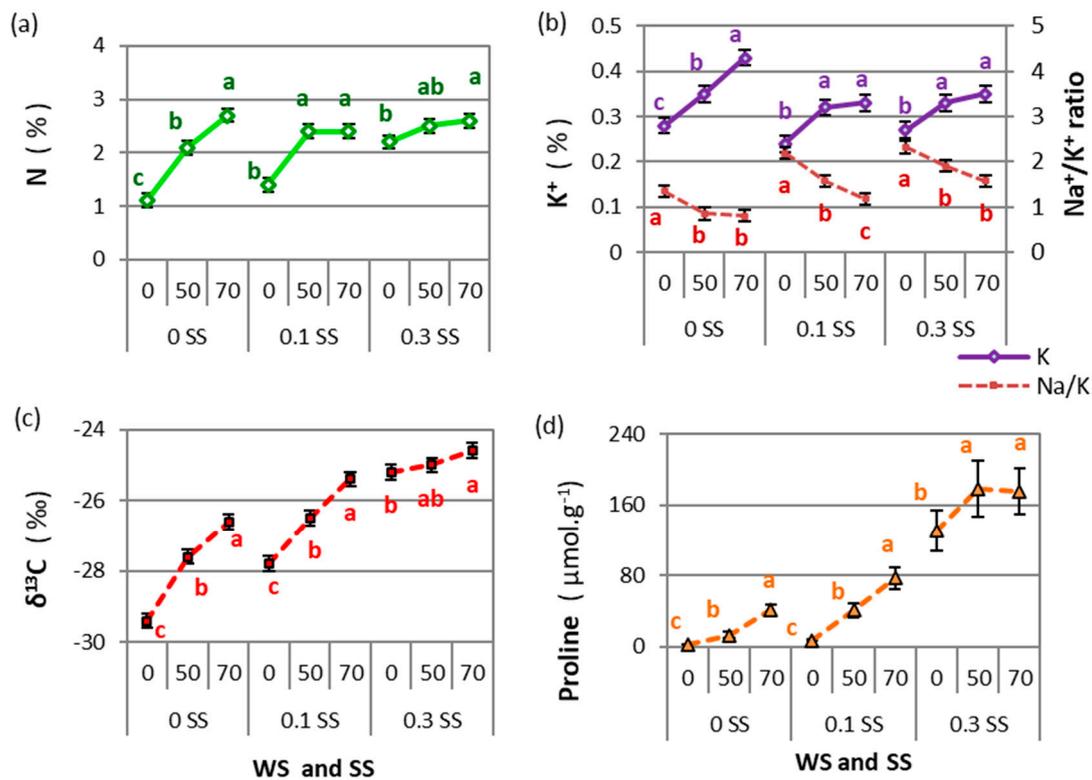
### 2.2.1. Drought and Salinity Effects

Relative water content decreased significantly with increasing salinity (−23% between 0 and 0.3 SS) and drought (−9% between 0 and 70 WS). However, RWC showed no differences between the 50 and 70 WS treatments (Figure 2b). Higher RWC values were related to a higher biomass (Figure S5). The RWC and  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , and  $\delta^{15}\text{N}$  concentrations were not significantly affected by interactions among WS, SS, and/or accession ( $p > 0.05$ , ANOVAs in Table S2). Physiological and isotopic variables showed no accession  $\times$  salinity  $\times$  drought interactions ( $p > 0.05$ ).

The stable isotope composition of nitrogen ( $\delta^{15}\text{N}$ ) and  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  concentrations only showed differences between salinity levels (ANOVAs in Table S2). When salinity increased,  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  increased significantly (71% in  $\text{Na}^+$  and 76% in  $\text{Cl}^-$  between 0 and 0.3 SS, Figure 2c), while  $\delta^{15}\text{N}$  significantly decreased (−99% between 0 and 0.3 SS, Figure 2d). This behavior was also observed when relating TotalB to  $\delta^{15}\text{N}$ , where a grouping by saline treatments was noted, without a unique trend (Figure S3a).

The foliar nitrogen concentration increased with drought and salinity, with 145%, 71%, and 18% increases between 0 and 70 WS in the salt-free, moderate, and severe salinity treatments, respectively (Figure 5a). In general, higher values of N were observed when the biomass was lower, which occurred with the increase in drought and salinity (Figure S3b). The N and  $\text{K}^+$  concentrations,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ratio,  $\delta^{13}\text{C}$ , and free proline content presented significant interaction only in WS  $\times$  SS ( $p < 0.05$ , ANOVAs in Table S2). The WS  $\times$  SS interactions were analyzed by comparing the WS means for each SS level ( $p < 0.05$ ).

The  $\text{K}^+$  concentration and the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ratio showed opposite responses to higher stress. The  $\text{K}^+$  increased with drought but by a different magnitude at each SS level (0 SS: 54%, 0.1 SS: 38%, and 0.3 SS: 30% between 0 and 70 WS), while for moderate and severe salinity there were no differences between 50 and 70 WS (Figure 5b). On the contrary, the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ratio was reduced under drought and salinity conditions. At each SS level, the highest values were found when water availability was higher (0 WS–0 SS: 1.35, 0 WS–0.1 SS: 2.19, and 0 WS–0.3 SS: 2.32, Figure 5b).



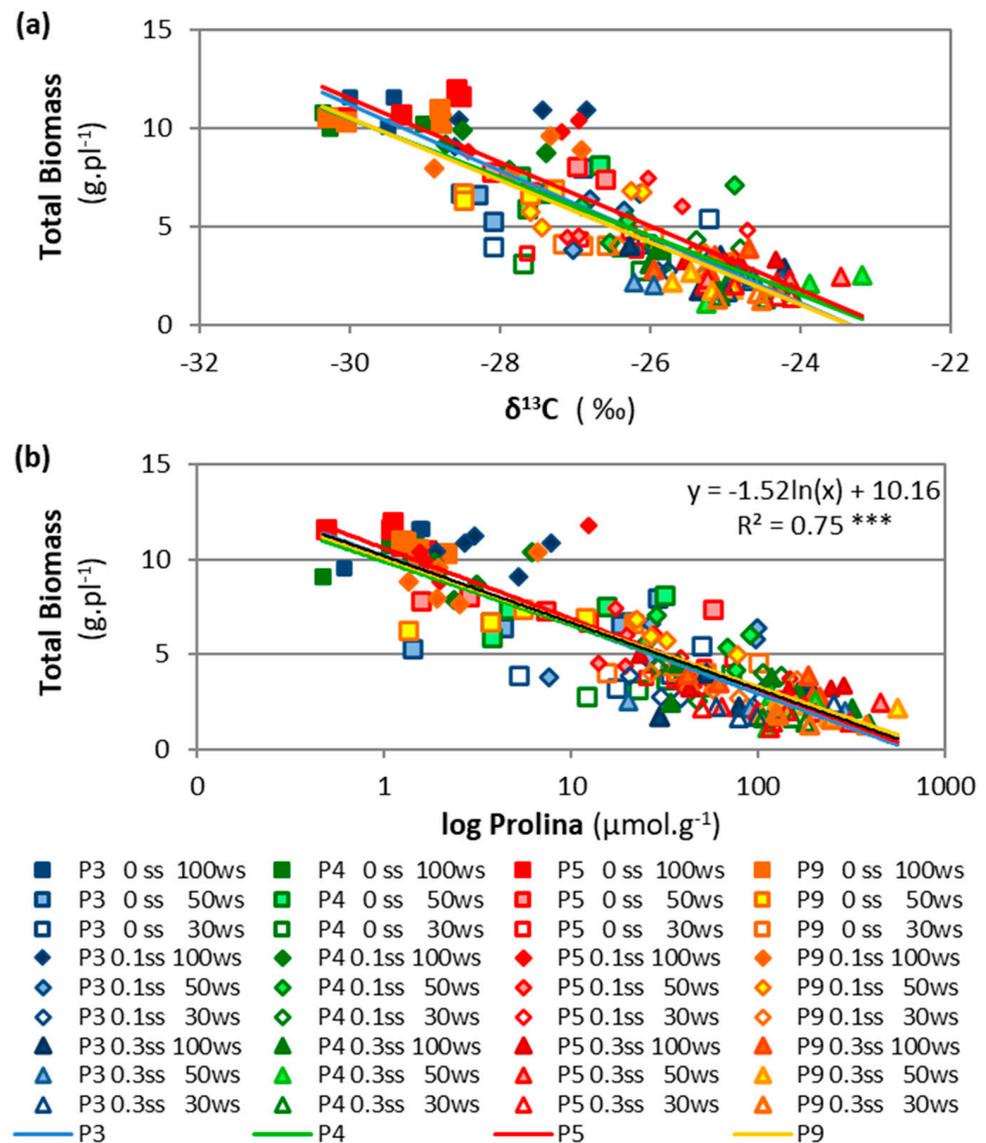
**Figure 5.** Drought and salinity interactions (WS and SS) for N concentration (a), K<sup>+</sup> concentration and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ratio (b), stable isotopes of C ( $\delta^{13}\text{C}$ ) (c), and free proline (d). For each variable, different letters show significant differences (LSD,  $p < 0.05$ ) among drought levels (WS: 0, 50, or 70, corresponding to 100%, 50%, or 30% water capacity, respectively) for each salinity level (SS: 0, 0.1, or 0.3, corresponding to 0.0, 0.1, or 0.3 M NaCl, respectively). Points are means of 4 tall wheatgrass accessions and 5 blocks ( $n = 20$ ). Bars indicate the means standard error.

The stable isotope composition of carbon ( $\delta^{13}\text{C}$ ) increased significantly with increased drought and salinity. Total biomass showed a negative linear regression with the  $^{13}\text{C}$  isotope ( $\delta^{13}\text{C}$ ) as drought and salinity increased (Figure 6a). The control treatment presented the lowest  $\delta^{13}\text{C}$  values, and the highest  $\delta^{13}\text{C}$  values were reached in severe salinity combined with moderate and severe drought. Drought determined greater differences between the salt-free (9.5% between 0 SS  $\times$  0 WS and 0 SS  $\times$  70 WS) and moderate-salinity treatments (8.6% between 1 SS  $\times$  0 WS and 1 SS  $\times$  70 WS) than in the severe salinity treatment (2.4% between 3 SS  $\times$  0 WS and 3 SS  $\times$  70 WS) (Figure 5c).

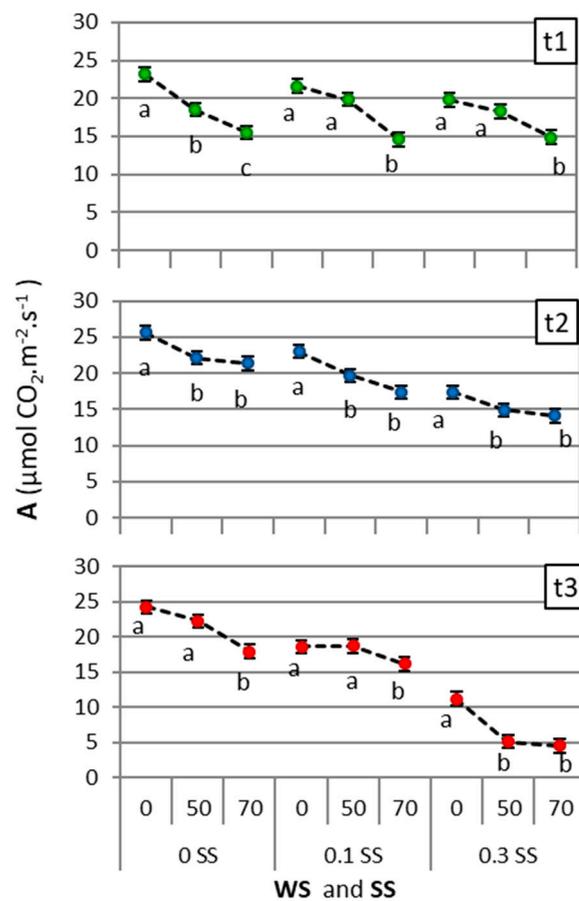
Proline content showed an exponential increase with drought and salinity (5733% increase between 0 WS–0 SS and 70 WS–0.3 SS), presenting the highest values in the severe salt treatment, though the 50 and 70 WS treatments were similar for this salinity level (0.3 SS) (178–175  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  DW, Figure 5d). This variable showed a logarithmic relationship with TotalB, presenting a similar trend for all accessions (Figure 6b).

The net photosynthetic rate (A) decreased when the drought and salinity increased, by a greater magnitude over time ( $t = 3$ , Figure 7). A was affected by both WS  $\times$  SS  $\times$  t interaction ( $p = 0.0130$ ) and RH covariate ( $p = 0.0102$ ). The three-way factorial ANCOVA results (four accessions, three salinity levels, three drought levels, and their interactions) with covariates and repeated measures by time ( $t = 3$ ) for the net photosynthetic rate are presented in the Supplementary Materials (Table S3). The WS  $\times$  SS  $\times$  t interaction was analyzed by comparing the means for each time point ( $t = 3$ ) among WS for each SS level. Only the control (0 WS–0 SS) maintained similar values of A (23.2, 25.6, and 24.2  $\mu\text{mol CO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , for t1, t2, and t3, respectively; Figure 7). The net photosynthetic

rate decreased notably for the last recorded time point (t3) under severe salinity at 50 and 70 WS (5.1 and 4.5  $\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , respectively).



**Figure 6.** Relationship between total biomass and stable isotope of carbon ( $\delta^{13}\text{C}$ ) (a) or free proline (b) for four accessions (P3, P4, P5, P9) grown under three drought levels (0 WS, 50 WS, or 70 WS, corresponding to 100%, 50%, or 30% water capacity, respectively) combined with three salinity levels (0 SS, 0.1 SS, or 0.3 SS, corresponding to 0.0, 0.1, or 0.3 M NaCl, respectively). Colored lines show the behavior of each accession. For  $\delta^{13}\text{C}$ , P3:  $y = -1.75x - 41.30$   $R^2 = 0.69$  \*\*\*, P4:  $y = -1.61x - 37.64$   $R^2 = 0.76$  \*\*\*, P5:  $y = -1.76x - 40.60$   $R^2 = 0.70$  \*\*\*, P9:  $y = -1.66x - 38.74$   $R^2 = 0.78$  \*\*\*; for proline, P3:  $y = 1.57\ln(x) + 10.17$   $R^2 = 0.63$  \*\*\*, P4:  $y = 1.45\ln(x) + 9.88$   $R^2 = 0.77$  \*\*\*, P5:  $y = 1.6157\ln(x) + 10.57$   $R^2 = 0.80$  \*\*\*, P9:  $y = 1.47x + 10.06$   $R^2 = 0.84$  \*\*\* (\*\*\*)  $p < 0.001$ ). The black line shows the accession mean presented in Figure 6b.



**Figure 7.** Effect of WS  $\times$  SS  $\times$  t interaction on net photosynthetic rate (A) for each time point (t1, t2, and t3, corresponding to 10, 45, and 85 days, respectively). Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between drought levels (WS: 0, 50, or 70, corresponding to 100%, 50%, or 30% water capacity, respectively) for each salinity level (SS: 0, 0.1, or 0.3, corresponding to 0.0, 0.1, or 0.3 M NaCl, respectively). Points are means of 4 tall wheatgrass accessions and 4 blocks ( $n = 16$ ). Bars indicate the means standard error.

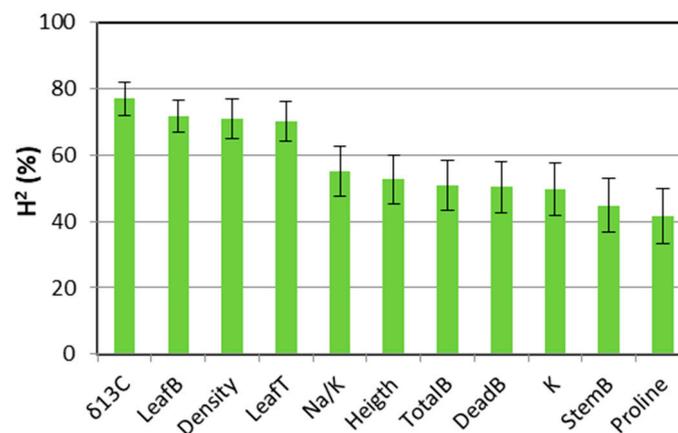
### 2.2.2. Accession Effects

Accessions P5 and P4, from more stressful environments, showed higher values of stable isotope of carbon ( $\delta^{13}\text{C}$ ), and P5 showed the highest relation between  $\delta^{13}\text{C}$  and biomass. The accession P5 presented the highest values  $\delta^{13}\text{C}$ , while P4 was intermediate, and P9 and P3 were the lowest (Table 1). Total biomass and  $\delta^{13}\text{C}$  showed a linear and negative relationship in all accessions and at all stress levels (Figure 6a), with P5 presenting the highest  $\delta^{13}\text{C}$  compared to other accessions with the same TotalB value. LeafB and  $\delta^{13}\text{C}$  showed similar behavior but greater differences among accessions (Figure S4). Only the stable isotope of carbon ( $\delta^{13}\text{C}$ ) and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ratio showed differences among accessions ( $p < 0.05$ , Table S2). The physiological variables showed no accession effect and no interactions between accession, salinity, or drought treatments ( $p > 0.05$ , ANOVA in Table S2).

The accessions from the most stressful environments showed the highest values for the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ratio: P4, which came from an environment with a high alkalinity/salinity, showed the highest  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ratio, and P5, which came from non-saline and non-alkaline soil, showed the lowest value. Additionally, accessions P3 and P9 showed a high  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ratio, with a high level of soil salinity–alkalinity in their environment of origin. The  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ratio varied between accessions ( $p: 0.0493$ ), though we only noted trends in the  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  foliar concentrations ( $p > 0.05$ , Table S2). P4 had the highest  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ratio, while P3 and P5 had the lowest (Table 1).

### 2.3. Broad-Sense Heritability

The variables  $\delta^{13}\text{C}$ , leaf biomass (LeafB), tiller density, and leaf length (LeafT) showed a high broad-sense heritability ( $H^2$ : 76.9%, 71.6%, 70.8%, and 70.1%, respectively), much higher than the rest of the variables. Meanwhile, with medium heritability values, the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ratio ( $H^2$ : 55.0%) stood out among the other variables, such as  $\text{K}^+$ , proline, and those related to biomass (Height, TotalB, StemB, and DeadB, Figure 8). The rest of the variables showed a low heritability ( $H^2 < 38.0\%$ ), (Table S4).



**Figure 8.** Broad-sense heritability ( $H^2$ ) and standard errors (bars) for morpho-agronomic, physiological, and isotopic variables: stable isotopes of C ( $\delta^{13}\text{C}$ ); tiller density (Density); leaf length per tiller (LeafT); leaf (LeafB), stem (StemB), dead (DeadB), and total (TotalB) biomass dry weight;  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ratio (Na/K); plant height (Height); and  $\text{K}^+$  concentration (K).

## 3. Discussion

### 3.1. Drought and Salinity in Tall Wheatgrass

The intensity, duration, and rate of progression of stress conditions influence plant responses under drought and salinity [18,19]. Tall wheatgrass under higher drought and salinity showed lower photosynthesis rates (A, Figure 7) and smaller and thicker leaves (lower SLA); this translated to a lower leaf biomass, but the largest reduction was in total biomass and reproductive development (compared to StemB, Spike%, and Height). Strategies to restrict water loss (lower ETP and higher WUE) and preserve RWC were recorded through osmotic adjustment mechanisms such as the increase in proline, which maintained the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ratio despite the foliar increase in  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$ . However, canopy structural variables (Density and LeafT), WUE, senescent biomass (DeadB), and foliar N and  $\text{K}^+$  showed particular behaviors in certain moderate-stress conditions that are explained below.

Drought and/or salinity can induce osmotic stress, leading to stomatal closure, which limits transpiration, photosynthesis, and gas exchange ( $\text{CO}_2$ ); increases the  $\delta^{13}\text{C}$  in dry matter; and, consequently, reduces the WUEi and yield in C3 cereals under Mediterranean conditions [26,32,38]. These relationships were also found in the present study, in which biomass production was inversely related to  $\delta^{13}\text{C}$  and directly related to ETP and WUE (except for the control WUE) under drought and salinity conditions (Figure 4c, Figure 6a, Figures S2 and S4); similar relationships have been reported for other forage grasses under drought [39] and salinity [28].

The control plants showed the highest photosynthesis (A) and biomass, as well as the lowest  $\delta^{13}\text{C}$  and the highest water loss (ETP), which led to a lower WUE (due to water-wasting behavior [40]) than the plants under mild/moderate stress (water-saving plants). Therefore, the WUE values of the control treatments were plotted separately and above of the curve (Figure 4c). This means that tall wheatgrass can behave as a water-wasting or water-saving plant [40] depending on the environmental stress level. A high leaf WUE ( $\text{WUE}_i = A/E$ , photosynthesis/transpiration rate) may not always translate into

a higher biomass WUE (WUE = ETP/total biomass, as recorded in this study) or yield WUE (WUE<sub>yield</sub> = grain yield/ETP), since each can change depending on the variability of water availability during the crop cycle [31,32,38]. The highest WUEs in the experiment were found under moderate salinity and different drought intensities (Figure 1e); even the WUE under moderate drought and salt-free conditions (50 WS–0 SS) was higher than that of the control (0WS–0SS). This may be due to a small decrease in stomatal conductance that has protective effects against stress by allowing the plant to save water and improve its WUE [18], which is consistent with our observation of a higher  $\delta^{13}\text{C}$  compared to the control (Figure 5c).

The leaf length per tiller was highest in this experiment under conditions combining salinity and higher water availability (0 WS–0.1 SS, 50 WS–0.1 SS, and 0 WS–0.3 SS), surpassing the control (Figures 1a and 3). Salinity may modify the duration of leaf growth [23], with a longer period spent in the blade expansion phase compared to control plants [41]. This could have caused the longest leaf length and the lowest dead biomass under moderate salinity found in tall wheatgrass in this experiment. The highest tiller density was recorded in the treatments combining drought and salt-free conditions (50 WS–0 SS and 70 WS–0 SS), surpassing the control treatment. In addition, the tiller density was higher and did not decrease with increasing drought and moderate salinity, and it was also higher with mild drought and severe salinity, showing similar values to the control plants (0 WS–0 SS) in all these treatments (0 WS–0.1 SS, 50 WS–0.1 SS, 70 WS–0.1 SS, and 0 WS–0.3 SS). It is especially noteworthy that the mild drought treatments with moderate or severe salinity achieved the highest soil salinity values (EC, Figure 1f) and the lowest restrictions in the structural and growth variables. This behavior could have occurred because the  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  sequestered in the vacuole functioned as osmotic agents, improving osmotic balance and cell function [19,23] (as mentioned below).

In the severe salinity treatments, as drought increased (0 WS–0.3 SS, 50 WS–0.3 SS, and 70 WS–0.3 SS), similar WUE values and a lower total biomass were found. Tall wheatgrass controls water loss very efficiently by transpiration, which is reflected through a low ETP, a high  $\delta^{13}\text{C}$ , and, especially, an increase in the percentage of senescent biomass (Dead%), which was more noticeable in the treatments with severe drought and salinity. In these treatments, the highest Dead% may have been due to the excessive increase in  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  in the older leaves, causing toxicity and premature senescence [19,22] (as mentioned below).

Tall wheatgrass growth strategies under drought and salinity conditions included limiting reproductive development (lower Spike% and StemB, Figure 4b) and prioritizing the allocation of photo-assimilates to leaf and tiller growth (higher Density, LeafT, and LeafB) (Figure 1). Tall wheatgrass pasture management is based on maintaining the vegetative canopy by generating leaves and tillers to achieve good quality, production, and persistence; therefore, it is essential to avoid reproductive development that produces lignified plants and persistent inflorescences, which negatively affect cattle grazing [16,36]. Therefore, tall wheatgrass growth strategies under drought and salinity would facilitate the management of tall wheatgrass pastures.

Tall wheatgrass continued to grow even under severe stress due to various mechanisms of osmotic adjustment and nutrient balance that helped maintain cell functions. Proline has been mentioned as an organic solute whose accumulation is aimed at osmoregulation and osmoprotection in tall wheatgrass under both drought [13,25] and salt stress [8,14]. In the present study, the proline concentration increased together with a reduction in total biomass and an increase in drought, but the increase was exponential when drought and salinity were combined (Figure 6b). This increase has never been cited in other species, so it is probably evidence of the superior capacity of tall wheatgrass for osmotic adjustment mechanisms and protection against oxidative stress [26].

$\text{K}^+$  has a prominent role in the photosynthetic process, osmotic adjustment, and stomatal movement [18,24]. The cellular  $\text{K}^+$  concentration and maintenance of a low  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ratio are essential for plant growth and tolerance to drought and salinity [24]. An increase

in the  $K^+$  concentration may be the main inorganic osmoregulation mechanism used by tall wheatgrass under drought, as it was registered in the present experiment, though the increase in  $K^+$  was lower under drought and salinity (Figure 5b). In other experiments with tall wheatgrass, the leaf  $K^+$  concentration also increased under drought [11] but decreased with mild to moderate salinity [8,11,14,15].

In tall wheatgrass, salt tolerance is associated with the restricted accumulation of  $Na^+$  and  $Cl^-$  and the maintenance of a low  $Na^+/K^+$  ratio in shoots [14,15]. However, the  $Na^+$  and  $Cl^-$  sequestered in the vacuole could function as low-energy osmotic agents [19,23]. We assume that this is the main inorganic osmoregulation mechanism used by tall wheatgrass when under a combination of salinity and drought conditions. The  $Na^+/K^+$  ratio decreased under salinity and drought conditions (Figure 5b), restricting growth and development (with lower photosynthesis, LeafB, StemB, and TotalB and higher  $\delta^{13}C$ , Dead%, and Spike%) despite the high salinity of the substrate in the moderate- and severe-salinity treatments ( $>9.0$  dS.m $^{-1}$  EC, Figure 1f). Nevertheless, if stress persists over time, and excessive amounts of salt enter the leaf, the vacuole is filled, and the  $Na^+$  or  $Cl^-$  content in the oldest leaves increases to toxic levels, causing premature senescence [19,22], reducing transpiration and photosynthesis, and consequently limiting growth and flowering [8,19]. This may happen in tall wheatgrass under the combined conditions of severe salinity and moderate/severe drought.

Although it is known that a water deficit substantially limits N uptake and assimilation [27,28,42], the behavior of  $\delta^{15}N$  and the increase in foliar N and nitrogenous compounds such as proline in our experiment indicate that nitrogen was not a limiting factor in the growth of the tall wheatgrass under different combinations of drought and salinity, even under conditions of strong stress (Figure S3). This may be in part because the plant can recycle large amounts of previously assimilated N from senescent leaves [22,42]. Previous studies in tall wheatgrass reported similar responses under salinity [8], while under drought, an increase in proteins was recorded [13,25]. This was contrary to the reports for annual grasses regarding the limitation in N metabolism with a lower foliar concentration due to the lower nitrate reductase (NR) and glutamate synthetase (GS) activity under drought and salinity [27,28]. However, the enzymatic activity of NR and GS may vary according to the species and its tolerance to salinity [43].

### 3.2. Accession Variability and Heritability

Phenotypic differences in total biomass were the product of differences in leaf, stem, and dead biomass; water-use efficiency; and physiological mechanisms such as the  $\delta^{13}C$  and the  $Na^+/K^+$  ratio (Figures 4 and 6a). These may be due to different intraspecific strategies for the allocation of photo-assimilates and different morpho-physiological mechanisms for the absorption of water and nutrients [18,19,21,22], which are discussed below.

Forage grass improvement programs seek to increase aerial biomass production and tolerance to drought and salinity. In the present study, accession P5 showed the highest aerial biomass production (TotalB), and accession P3 was intermediate in all drought and salinity treatments, though the photosynthetic rate and RWC were similar among all accessions (P3, P4, P5, P9). This was probably because they were measured in the youngest leaves, whose continued growth is always prioritized by the plant [18,19,22]. There were also no differences among accessions in leaf proline, despite the exponential increase in proline concentration between control and maximum stress treatments (Figure 6b). Our results are consistent with other studies under salt stress, which found that differences in proline were not sufficient to determine an intraspecific selection for salinity tolerance in tall wheatgrass [8,14], contrary to reports for other species [26].

Accession P5 originated from an environment with intense drought but non-saline conditions (Table 2), and its strategy was to prioritize the allocation of photo-assimilates to leaf and tiller growth (the highest Density, LeafT, and LeafB) and limit reproductive development (lower Spike% and Height, intermediate StemB) compared to the other accessions (Figure 4a,b). In addition, P5 showed the highest biomass and WUE (Figure 4c),



the lowest ETA (Figure S2), and the highest  $\delta^{13}\text{C}$  signature (Figure 6a and Figure S4). This may have been due to an increase in leaf WUE caused by partial stomatal closure [18,38], and/or an increase in mesophyll conductance to  $\text{CO}_2$  [20]. Unfortunately, neither stomatal nor mesophyll conductance were recorded in this work. In wheat, landraces exhibited higher  $\delta^{13}\text{C}$  values than modern cultivars, which might have been a consequence of a lower stomatal conductance; these differences in  $\delta^{13}\text{C}$  were recorded in grains [32] and in weight dry matter per plant at anthesis and biomass at maturity [33]. This behavior is similar to that found in P5, for which a higher  $\delta^{13}\text{C}$  indicates a greater tolerance to stress [30,33].

**Table 2.** Tall wheatgrass accessions. Collection data from Active Germplasm Bank of Estación Experimental Agropecuaria Balcarce of the INTA, Argentina (BAL).

Accession	P3	P4	P5	P9
Latitude, longitude	38°30' S, 58°45' W	39°24' S, 65°36' W	39°24' S, 65°36' W	38°44' S, 62°33' W
Nearest town, province	Necochea, Buenos Aires	Lamarque, Río Negro	Lamarque, Río Negro	Bahía Blanca, Buenos Aires
Köppen <sup>§</sup>	Cfb	BSk	BSk	Cfa
Climate	Temperate oceanic	Semiarid	Semiarid	Temperate transitional
Precipitation	840 mm year <sup>-1</sup>	266 mm year <sup>-1</sup>	266 mm year <sup>-1</sup>	583 mm year <sup>-1</sup>
Great Group Soil	<i>Argiudolls.</i>	<i>Torrifluvents.</i>	<i>Torrifluvents.</i>	<i>Haplustolls.</i>
Soil type, pH <sup>#</sup>	Non-saline/non-alkaline soil, pH $\cong$ 7.0	Saline-alkaline soil, pH: 9.0	Non-saline/non-alkaline soil, pH: 7.5	Saline alkaline soil, pH: 9.5
Environment	Roadside grassland	Grassland, with <i>Distichlis spicata</i>	Roadside grassland of irrigated fields	Natural grasslands, with <i>Distichlis spicata</i>
Collection BAL <sup>†</sup>	Nu + Alo 338	CIB 118	CIB 117	CIB 114

<sup>§</sup> Köppen climate classification. <sup>#</sup> Soil PH content corresponding to the 0–100 mm depth layer. <sup>†</sup> Collector's code (Nu, Alo, CIB) and entry number.

Meanwhile, the accession P4, which originated from the most stressful environment, with saline-alkaline soil (Table 2), showed the lowest leaf biomass production but presented similar behavior in terms of structural variables (Density and LeafT) when compared to P5. The behavior presented by P4 may have been the result of a salinity and drought tolerance strategy that caused the accumulation of toxic ions and early senescence in old leaves (the highest  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ratio and Dead%), reducing transpiration (the lowest ETA) and maintaining the water status and photosynthesis in younger leaves but reducing the radiation interception capability and growth of the plant (high Density with lower ETP, LeafB, StemB, and TotalB).

On the contrary, accessions P3 and P9, which originated from environments with mild or moderate stress (Table 2), showed higher reproductive development (the highest StemB, intermediate Height, and high %Spike), together with a high ETP and the lowest WUE and  $\delta^{13}\text{C}$  values. Therefore, accessions P3 and P9 likely prioritized reproductive development and seed production as a growth strategy for their self-perpetuation. In contrast, accessions P5 and P4, which originated from more stressful environments, likely prioritized vegetative development through increased tillering and a lower proportion of spiked tillers as a growth strategy to maintain perenniality, though with different mechanisms for controlling transpiration, leaf senescence, and the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ratio.

Salt tolerance in tall wheatgrass is associated with the maintenance of low  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ratios in the shoots of tolerant lines compared to the shoots of sensitive lines [14,15]. In the present study, the accession P5, which originated from a non-saline and non-alkaline

environment, showed the lowest values for the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ratio and the highest in total biomass, while accession P4, which originated from an environment with saline–alkaline soil, showed the contrary behavior. These findings were opposite to what was expected considering the environmental origin of the accessions, but it was important to differentiate the accessions with higher biomass production. In addition, the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ratio presented medium heritability ( $H^2$  55.0%) and could be a useful characteristic to take into account for the selection of accessions with greater tolerance to stress.

In all drought/salinity combinations tested, tall wheatgrass showed that the highest values of  $\delta^{13}\text{C}$  may be adequate indicators for the selection of accessions with a greater tolerance to drought and salinity, as has been found in other grasses [30,31,33]. In the present work, the regressions between  $\delta^{13}\text{C}$  and total biomass (Figure 6a) or leaf biomass (Figure S4) clearly showed the differences among accessions. Therefore, it was important to estimate the broad-sense heritability ( $H^2$ ) for each characteristic to analyze what proportion of the measured phenotypic variation was due to genetic effects rather than environmental effects or genotype  $\times$  environment interaction [30–32,34,37]. A high  $H^2$  indicates the high repeatability of the characteristic and the greater reproducibility of the genetic differences, as has been cited for  $\delta^{13}\text{C}$  in the literature [34]. In the present study,  $\delta^{13}\text{C}$  presented the highest heritability compared to the other characteristics, similar to what has been found in other grasses [30–32,34]. Furthermore, the  $\delta^{13}\text{C}$  value is easier to measure than other physiological variables [27,31]. The heritability of leaf biomass, density, and leaf length were also high ( $H^2 > 70.0\%$ ), which is significant, as the canopy structure in forage species gains relevance according to the purpose of pasture use.

Finally, the absence of an interaction between drought, salinity, and accessions for most of the variables; the morpho-agronomic, physiological, and biochemical responses among accessions consistent with previous studies [8,13]; and the broad-sense heritability of each characteristic allow us to conclude that the combined use of the  $\delta^{13}\text{C}$  signature, the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ratio, and the canopy structural variables (leaf length and tiller density) are useful for identifying accessions which are better adapted to drought and salinity, also considering, the desirable characteristics of grass. In this study, the accessions showed different strategies and physiological mechanisms for coping with drought and salinity, which should continue to be investigated, taking into account their use in the field. Accession P5 should continue to be evaluated with a view to its use as cattle grazing forage, as it generated shorter plants with lots of tillers and the highest biomass production, prioritizing vegetative development. Meanwhile, accession P3 should be harvested for hay or biofuel production, as it generated taller plants and achieved higher biomass production, prioritizing stem development. On the other hand, for genetic improvement regarding resistance to biotic and abiotic stresses in wheat, wheatgrass germplasm has been implemented through intraspecific crosses, chromosomal segments, or genes/QTL with successful results [3–5]. Nevertheless, to improve tolerance to drought and salinity in wheat with the genetic basis of the tall wheatgrass germplasm evaluated herein, we should integrate physiological and biochemical mechanisms through proteomic studies, as well as the detection of the genes/alleles/QTL associated with these responses [1], which are still being studied [3–6] and transcend the present work.

#### 4. Materials and Methods

##### 4.1. Origin of the Germplasm and Experimental Conditions

Accessions of naturalized populations of tall wheatgrass (*Thinopyrum ponticum* (Podp.) Barkworth and D.R.Dewey) ( $2n = 10x = 70$ ) were provided by the Active Germplasm Bank of the National Institute of Agricultural Technology in Balcarce, Argentina. Four accessions (P3, P4, P5, P9) were selected from contrasting climate/edaphic environments: P3 from a humid temperate climate with non-saline and non-alkaline soil, P4 from a semi-arid climate with saline–alkaline soil, P5 from a semi-arid climate with non-saline and non-alkaline soil, and P9 from a humid temperate climate with saline–alkaline soil (Table 2). Seeds were germinated in chambers ( $30^\circ/20^\circ\text{C}$  and 8/16 h light/darkness), and seedlings

were transplanted into small pots with a substrate (Compo Sana Universal R) in a greenhouse. After 45 days, plants with three tillers were selected and transplanted into test pots ( $17.7 \pm 2.4$  °C.day<sup>-1</sup> and 12 h 35 min daylight).

The experiment was carried out in pots in a glasshouse at the Lagoas-Marcosende Campus of the Universidade de Vigo, Spain (42°10′0.38″ N, 8°41′3.37″ W). The experiment was took place over 90 spring/summer days, with 14 h 50 min ( $\pm 25$  min) of natural daylight. During the experiment, the daily temperatures in the greenhouse were recorded, reaching a mean temperature of 20.9 °C, a maximum temperature of 28.0 °C, and a minimum temperature of 13.7 °C (Figure S6). The experimental unit was the pot containing one plant with three tillers (1 plant.pot<sup>-1</sup>). Plants began the experiment in the vegetative stage and ended in the reproductive stage, with some of their tillers in the phase of stem elongation. A commercial mixture was used as substrate (Compo Sana Universal R; nutrient composition in mg. L<sup>-1</sup>: N = 325, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> = 350, K<sub>2</sub>O = 425; pH = 5.7; salt concentration in g. L<sup>-1</sup>: <2.5).

Salinity treatments comprised irrigating the pots weekly with three salt treatments consisting of 0, 0.1, and 0.3 M NaCl solutions dissolved in water (EC: 0.9, 8.1, and 20.9 dS.m<sup>-1</sup>, respectively), simulating salt-free, moderate, and severe salt stress levels (0 SS, 0.1 SS, or 0.3 SS, respectively). Soil salinity was gradually increased through irrigation without causing osmotic shock in the plants, which was important to avoid cell plasmolysis [19]. Drought treatments were established with three levels of irrigation at 100%, 50%, or 30% water retention capacity of the pot, simulating mild, moderate, or severe drought stress level (0 WS, 50 WS, or 70 WS, respectively). Treatments were maintained by weighting the pots weekly and adding the amount of water or salt solution lost by evapotranspiration [13]. The experiment was carried out as a randomized complete block design with a 3 WS  $\times$  3 SS  $\times$  4 accession factorial arrangement (three drought levels, three salinity levels, four accessions) and five repetitions (N = 180). In total, four accessions of different origins (P3, P4, P5, P9) were subjected to nine combined treatments of drought and salinity.

#### 4.2. Morpho-Agronomic Variables

Evapotranspiration (ET) was estimated as the water loss in each pot weekly. ET was calculated as the difference between the pot weight immediately after irrigation and its weight 7 days later. This was repeated over 12 weeks. ET was measured in g<sub>H<sub>2</sub>O</sub> pot<sup>-1</sup> and expressed in mL<sub>H<sub>2</sub>O</sub> pot<sup>-1</sup>. Accumulated evapotranspiration (ETA, mL<sub>H<sub>2</sub>O</sub> pot<sup>-1</sup>) was calculated as the sum of ET ( $n = 12$ ) in each pot [13].

Plant height was recorded in three tillers per plant from the soil base to the highest point (Height, cm. plant<sup>-1</sup>) on day 87. Total aerial biomass (TotalB) of plants in each pot was measured on day 90 and divided into green and senescent biomass of leaf blades, pseudostem, and stems. Senescent biomass was considered dead biomass (DeadB). Green leaf blades were considered foliar biomass (LeafB), and green pseudostem and stem as stem biomass (StemB). For each biomass, dry weight (DW) was estimated after drying the forage at 50 °C until reaching a constant weight and was expressed in g DW. plant<sup>-1</sup>. Additionally, the percentage of dead biomass over total biomass (Dead% = DeadB/TotalB  $\times$  100) was calculated. Water-use efficiency (WUE) was calculated using the equation: WUE = TotalB/ETA, mg mL<sup>-1</sup>H<sub>2</sub>O [13]. Specific leaf area (SLA, cm<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup>), as area/dry mass of leaf blade area, was estimated using the youngest fully expanded leaf of the main tiller of each plant [44]. Leaf blade area was calculated with ImageJ software [45]. We also measured total green leaf length per tiller (LeafT, cm. tiller<sup>-1</sup>) in three tillers per plant and total number of spikes and tillers per plant (Spike, spike. plant<sup>-1</sup> and Density, tiller.plant<sup>-1</sup>, respectively) [8]. Then, the proportion of spiked tillers was calculated as Spike% = (Spike/Density)  $\times$  100.

#### 4.3. Physiological and Isotopic Variables

The net photosynthetic rate ( $A$ ,  $\mu\text{mol CO}_2\text{.m}^{-2}\text{.s}^{-1}$ ), leaf and air temperature, air flows, CO<sub>2</sub> concentration, and relative humidity (PAR, Temp\_A, Temp\_L, PAR, Flow, CO<sub>2</sub>,

RH, respectively) were measured at 10, 45, and 85 days ( $t = 3$ ), using a LI-6200 portable infrared gas analyzer (Li-cor, Lincoln, NE, USA) [44]. Measurements were registered between 11:00 am and 3:00 pm using the youngest fully expanded leaf of each plant, in four repetitions (144 records each day, 432 total observations). Atmospheric CO<sub>2</sub> concentration ranged from 380 to 400  $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ , and air relative humidity between 30% and 40% during data collection in the IRGA measurement chamber. Relative water content (RWC, %) was measured using the youngest fully expanded leaf of each plant per pot [44]. Leaf biomass samples were analyzed by the Bates method to determine free proline (proline,  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  DW) [44]. Leaf biomass samples were used for total C and N concentration determination ( $w/w$ , dry basis%) with an elemental CHN analyzer (EA 1110 Automatic Elemental Analyzer, Fisons Instruments). Additionally, Cl<sup>-</sup>, K<sup>+</sup>, and Na<sup>+</sup> contents were analyzed in a Perkin Elmer Optima 4300DV inductively coupled plasma-optical emission spectrometer (ICP-OES), and the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ratio was calculated. Furthermore, the stable isotope compositions of carbon <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C ( $\delta^{13}\text{C}$ , ‰) and nitrogen <sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N ( $\delta^{15}\text{N}$ , ‰) were analyzed using automated elemental analysis coupled to an Isotope Ratio Mass Spectrometer (Thermo Finnigan MAT252, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany).

#### 4.4. Soil Electrical Conductivity

Finally, the pot soil was analyzed to measure electrical conductivity (EC,  $\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$ ). In the soil, the electrical conductivity (EC) revealed the severity of the saline conditions increased by drought that the tall wheatgrass endured throughout the nine treatments (Figure 1f). All drought levels without added salt presented similar EC values at the beginning and end of the experiment (0 WS–0 SS, 50 WS–0 SS, and 70 WS–0 SS), and they were classified as non-saline substrates ( $<1 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$ ). Meanwhile, the EC increased notably with increasing saline irrigation, exceeding the value of  $4 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$ , which classifies a soil as high-salinity soil [17], in all levels of drought with moderate and severe salinity, with extreme values between 9.2 and  $25 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$  in 70 WS–0.1 SS and 0 WS–0.3 SS, respectively. This value was three times higher than that reported as the highest for tall wheatgrass in the tolerance threshold to EC [7,12], which is very important considering that tall wheatgrass is a C3 perennial forage grass used in hydro-halomorphic environments.

#### 4.5. Statistical Analyses

All variables were analyzed using three-way factorial ANOVA (four accessions, three salinity levels, three drought levels, and their interactions) and five blocks (180 total observations), except for net photosynthetic rate (A), which was analyzed with three-way factorial ANCOVA (PAR, Temp\_A, Temp\_L, Flow, CO<sub>2</sub> and RH covariates) with repeated measures by time ( $t = 3$ ) and four blocks (432 total observations). Accession, salinity, and drought were fixed effects, whereas block was considered a random effect. Means were compared using least significant difference test (LSD,  $p < 0.05$ ). Statistical significance was defined at the 95% confidence level. Analysis was conducted using PROC MIXED/LSMEANS [46]. Proline, Dead%, Spike%, EC, and ETA were logarithmically transformed before analysis. Regressions were estimated in pairs of variables for each accession or accession mean using PROC REG and PROC RSREG [46], with the intention of showing the behavior of total biomass as a function of different variables.

The broad-sense heritability ( $H^2$ ) of all variables was determined by the estimation of variance components using Proc Mixed ratio covtest in SAS (REML) [46], considering four accessions, nine environments (resulting from the combinations of drought and salinity stress), and their interactions with five repetitions (or four, in the case of A). The  $H^2$  was not estimated for the ETP and WUE variables, since they were registered on the soil-plant system (being the fraction of water evaporation exclusively from the soil). The broad-sense heritability ( $H^2$ ) and its standard errors ( $\text{SE } H^2$ ) were estimated using variance ratios considering the following equations [37] on a population mean basis:  $H^2 = \{\sigma^2 \text{ g}/(\sigma^2 \text{ g} + \sigma^2 \text{ ge}/e + \sigma^2/\text{re})\} \times 100$  and  $\text{SE } H^2 = \text{SE}\sigma^2 \text{ g}/(\sigma^2 \text{ g} + \sigma^2 \text{ ge}/e + \sigma^2/\text{re})$ , in which  $\sigma^2 \text{ g}$  = genotypic variance (accessions),  $\sigma^2 \text{ ge}$  = variance due to genotype by environment

interaction,  $\sigma^2$  = residual variance,  $\sigma^2 p$  = phenotypic variance,  $r$  = number of replicates, and  $e$  = number of environments. Heritability estimates were categorized as low (0–40%), medium (40–59%), high (60–79%), and very high (>80%) [47].

## 5. Conclusions

Our results show that tall wheatgrass prioritizes vegetative growth instead of reproductive development by increasing tiller density and leaf length as a plant strategy to remain perennial and increase survival in environments with strong drought and salinity. This strategy is beneficial to pasture management, since tall wheatgrass achieves higher quality, production, and persistence by maintaining a greater vegetative canopy.

The highest values for canopy structural variables (leaf length and tiller density) and WUE under moderate salinity–drought were attained by active inorganic osmoregulation mechanisms involving an increase in the  $K^+$ ,  $Na^+$ , and  $Cl^-$  content in the vacuoles but a decrease in the  $Na^+/K^+$  ratio. Additionally, we observed organic osmoregulation through an increase in proline, which functions as an important osmoregulatory and osmoprotective solute in both drought and salinity conditions. This is essential considering that wheatgrass is a C3 forage grass used in hydro-halomorphic environments.

Evidence of interactions between accessions and stress was only found in certain variables. Phenotypic variability among accessions was due to differential growth strategies and physiological mechanisms under drought and salinity conditions. The P3 and P9 accessions, belonging to environments with mild/moderate stress, prioritized reproductive development, with higher evapotranspiration and the lowest WUE and  $\delta^{13}C$  signature. Meanwhile, accessions P4 and P5, belonging to more stressful environments, prioritized vegetative development through tillering, with the lowest evapotranspiration; the highest  $\delta^{13}C$  signature; and different mechanisms to limit transpiration, leaf senescence, and the  $Na^+/K^+$  ratio. Finally, considering the differences among accessions and the  $H^2$  of the characteristics, we concluded that the combined use of the  $\delta^{13}C$  value, the  $Na^+/K^+$  ratio, and the canopy structural variables can help to identify accessions that are well-adapted to drought and salinity conditions also considering the desirable characteristics of grass. Tall wheatgrass germplasm could be used to expand the production of forages, biofuels, and crops in the face of climate change.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/plants11121548/s1>: Figure S1: Density (a), green leaf length (LeafT) (b), and leaf biomass (LeafB) (c) of four accessions (P3, P4, P5, P9) grown under three drought levels (0 WS, 50 WS, or 70 WS, corresponding to 100%, 50%, 30% water capacity, respectively) combined with three salinity levels (0 SS, 0.1 SS, or 0.3 SS, corresponding to 0.0, 0.1, 0.3 M NaCl, respectively), Figure S2: Relationship between total biomass and accumulated evapotranspiration (ETA) of four accessions (P3, P4, P5, P9) grown under three drought levels (0 WS, 50 WS, or 70 WS, corresponding to 100%, 50%, 30% water capacity, respectively) combined with three salinity levels (0 SS, 0.1 SS, or 0.3 SS, corresponding to 0.0, 0.1, 0.3 M NaCl, respectively), Figure S3: Relationship between total biomass and stable isotope of nitrogen ( $\delta^{15}N$ ) (a) or N concentration (b) of four accessions (P3, P4, P5, P9) grown under three drought levels (0 WS, 50 WS, or 70 WS, corresponding to 100%, 50%, 30% water capacity, respectively) combined with three salinity levels (0 SS, 0.1 SS, or 0.3 SS, corresponding to 0.0, 0.1, 0.3 M NaCl, respectively), Figure S4: Relationship between leaf biomass and stable isotope of carbon ( $\delta^{13}C$ ) of four accessions (P3, P4, P5, P9) grown under three drought levels (0 WS, 50 WS, or 70 WS, corresponding to 100%, 50%, 30% water capacity, respectively) combined with three salinity levels (0 SS, 0.1 SS, or 0.3 SS, corresponding to 0.0, 0.1, 0.3 M NaCl, respectively), Figure S5: Relationship between total biomass and relative water content (RWC) of four accessions (P3, P4, P5, P9) grown under three drought levels (0 WS, 50 WS, or 70 WS, corresponding to 100%, 50%, 30% water capacity, respectively) combined with three salinity levels (0 SS, 0.1 SS, or 0.3 SS, corresponding to 0.0, 0.1, 0.3 M NaCl, respectively), Figure S6: Mean, maximum, and minimum daily temperatures recorded in the greenhouse and hours of daily light (daylight) during the experiment; X indicates beginning (April 28) and end (July 26) of the experiment, and blue dots indicate irrigation days, Table S1: Results of three-way facto-

rial ANOVA (four accessions, three salinity levels, three drought levels, and their interactions) with five blocks for the morpho-agronomic variables ( $p$ -values are considered significant when  $p < 0.05$ ), Table S2: Results of three-way factorial ANOVA (four accessions, three salinity levels, three drought levels, and their interactions) with five blocks for physiological and isotopic variables ( $p$ -values are considered significant when  $p < 0.05$ ), Table S3: Results of three-way factorial ANOVA (four accessions, three salinity levels, three drought levels, and their interactions) with covariates and repeated measures by time ( $t = 3$ ) and four blocks for net photosynthetic rate (A) ( $p$ -values are considered significant when  $p < 0.05$ ), Table S4: Broad-sense heritability ( $H^2\%$ ) and standard errors (SE  $H^2$ ) for morpho-agronomic, physiological, and isotopic characteristics.

**Author Contributions:** Conceptualization, C.I.B. and M.J.R.; methodology, M.J.R., A.M.S.-M. and C.I.B.; software, C.I.B.; validation, M.J.R., A.M.S.-M. and C.I.B.; formal analysis, C.I.B.; investigation, C.I.B.; resources, M.J.R., A.M.S.-M. and C.I.B.; data curation, C.I.B.; writing—original draft preparation, C.I.B. and A.M.S.-M.; writing—review and editing, C.I.B. and A.M.S.-M.; visualization, M.J.R. and A.M.S.-M.; supervision, M.J.R.; project administration, M.J.R. and A.M.S.-M.; funding acquisition, M.J.R. and A.M.S.-M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was financially supported by the Xunta de Galicia, grant number ED431C 2019/20, for the project ‘Consolidación e estruturación de unidades de investigación competitivas do Sistema Universitario de Galicia. Grupos de referencia competitiva’.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Data are contained within the article or Supplementary Material. Raw data are available by contacting the corresponding author.

**Acknowledgments:** The authors give special thanks to the Centro de Apoio Científico e Tecnolóxico á Investigación (CACTI) for their excellent technical assistance on all the isotopic analyses and the members of the laboratory of Ecofisioloxía Vexetal for their help in the experiments, both from the Universidade de Vigo, Galicia, Spain.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Billah, M.; Aktar, S.; Brestic, M.; Zivcak, M.; Khaldun, A.B.M.; Uddin, M.S.; Bagum, S.A.; Yang, X.; Skalicky, M.; Mehari, T.G.; et al. Progressive genomic approaches to explore drought- and salt-induced oxidative stress responses in plants under changing climate. *Plants* **2021**, *10*, 1910. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Redden, R. New Approaches for Crop Genetic Adaptation to the Abiotic Stresses Predicted with Climate Change. *Agronomy* **2013**, *3*, 419–432. [[CrossRef](#)]
3. Ceoloni, C.; Kuzmanović, L.; Ruggeri, R.; Rossini, F.; Forte, P.; Cucurullo, A.; Bitti, A. Harnessing genetic diversity of wild gene pools to enhance wheat crop production and sustainability: Challenges and opportunities. *Diversity* **2017**, *9*, 55. [[CrossRef](#)]
4. Peng, Z.; Wang, M.; Li, F.; Lv, H.; Li, C.; Xia, G. A Proteomic Study of the Response to Salinity and Drought Stress in an Introgression Strain of Bread Wheat. *Mol. Cell. Proteom.* **2009**, *8*, 2676–2686. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Colmer, T.D.; Flowers, T.J.; Munns, R. Use of wild relatives to improve salt tolerance in wheat. *J. Exp. Bot.* **2006**, *57*, 1059–1078. [[CrossRef](#)]
6. McGuire, P.E.; Dvoák, J. High salt-tolerance potential in wheatgrass. *Crop Sci.* **1981**, *21*, 702–705. [[CrossRef](#)]
7. Mass, E.V. Salt tolerance of plants. *Appl. Agric. Res.* **1986**, *1*, 12–26.
8. Borrajo, C.I.; Sanchez-Moreiras, A.M.; Reigosa, M.J. Morpho-physiological, biochemical and isotopic response of tall wheatgrass populations to salt stress. *J. Agron. Crop Sci.* **2021**, *207*, 236–248. [[CrossRef](#)]
9. Falasca, S.L.; Miranda, C.; Alvarez, S.P. Agro-ecological zoning for tall wheatgrass (*Thinopyrum ponticum*) as a potential energy and forage crop in salt-affected and dry lands of Argentina. *Arch. Crop Sci.* **2017**, *1*, 10–19. [[CrossRef](#)]
10. Ciria, C.S.; Barro, R.; Sanz, M.; Ciria, P. Long-term yield and quality performance of perennial energy grasses (*Agropyron* spp.) on marginal land. *Agronomy* **2020**, *10*, 1051. [[CrossRef](#)]
11. Bhuiyan, M.S.I.; Raman, A.; Hodgkins, D.S.; Mitchell, D.; Nicol, H.I. Physiological response and ion accumulation in two grasses one legume, and one saltbush under soil water and salinity stress. *Ecohydrology* **2015**, *8*, 1547–1559. [[CrossRef](#)]
12. Vogel, K.P.; Moore, J. Forage yield and quality of tall wheatgrass accessions in the USDA germplasm collection. *Crop Sci.* **1998**, *38*, 509–512. [[CrossRef](#)]
13. Borrajo, C.I.; Sanchez-Moreiras, A.M.; Reigosa, M.J. Morpho-physiological responses of tall wheatgrass populations to different levels of water stress. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0209281. [[CrossRef](#)]
14. Shannon, M.C. Testing salt tolerance variability among tall wheatgrass lines. *Agron. J.* **1978**, *70*, 719–722. [[CrossRef](#)]

15. Guo, Q.; Meng, L.; Mao, P.C.; Tian, X.X. Salt tolerance in two tall wheatgrass species is associated with selective capacity for K<sup>+</sup> over Na<sup>+</sup>. *Acta Physiol. Plant.* **2015**, *37*, 1708. [[CrossRef](#)]
16. Otondo, J.; Borrajo, C.I.; Bandera, R. Forrajeras templadas y subtropicales en suelos afectados por sales de regiones húmedas y subhúmedas de la Argentina. In *Suelos Afectados Por Sales Con Énfasis En La Argentina*; Bandera, R., Ed.; Orientación Gráfica: Buenos Aires, Argentina, 2019; pp. 139–167.
17. Bennett, S.J.; Barrett-Lennard, E.G.; Colmer, T.D. Salinity and waterlogging as constraints to saltland pasture production: A review. *Agric. Ecosyst. Environ.* **2009**, *129*, 349–360. [[CrossRef](#)]
18. Chaves, M.M.; Flexas, J.; Pinheiro, C. Photosynthesis under drought and salt stress: Regulation mechanisms from whole plant to cell. *Ann. Bot.* **2009**, *103*, 551–560. [[CrossRef](#)]
19. Munns, R. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.* **2002**, *25*, 239–250. [[CrossRef](#)]
20. Flexas, J.; Niinemets, U.; Gallé, A.; Barbour, M.M.; Centritto, M.; Diaz-Espejo, A.; Douthe, C.; Galmés, J.; Ribas-Carbo, M.; Rodríguez, P.L.; et al. Diffusional conductances to CO<sub>2</sub> as a target for increasing photosynthesis and photosynthetic water-use efficiency. *Photosynth. Res.* **2013**, *117*, 45–59. [[CrossRef](#)]
21. Acosta-Motos, J.R.; Ortuño, M.F.; Bernal-Vicente, A.; Diaz-Vivancos, P.; Sanchez-Blanco, M.J.; Hernandez, J.A. Plant responses to salt stress: Adaptive mechanisms. *Agronomy* **2017**, *7*, 18. [[CrossRef](#)]
22. Sade, N.; Rubio-Wilhelmi, M.; Umnajkitikorn, K.; Blumwald, E. Stress-induced senescence and plant tolerance to abiotic stress. *J. Exp. Bot.* **2018**, *69*, 845–853. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Taleisnik, E.; Rodríguez, A.A.; Bustos, D.; Erdei, L.; Ortega, L.; Senn, M.E. Leaf expansion in grasses under salt stress. *J. Plant Physiol.* **2009**, *166*, 1123–1140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Hasanuzzaman, M.; Bhuyan, M.H.M.B.; Nahar, K.; Hossain, M.S.; Mahmud, J.A.; Hossen, M.S.; Masud, A.A.C.; Moumita; Fujita, M. Potassium: A Vital Regulator of plant responses and tolerance to abiotic stresses. *Agronomy* **2018**, *8*, 31. [[CrossRef](#)]
25. Gazanchian, A.; Hajheidari, M.; Sima, N.K.; Salekdeh, G.H. Proteome response of *Elymus elongatum* to severe water stress and recovery. *J. Exp. Bot.* **2007**, *58*, 291–300. [[CrossRef](#)]
26. Vasilakoglou, I.; Dhima, K.; Giannakoula, A.; Dordas, C.; Skiada, V.; Papadopoulou, K. Carbon assimilation, isotope discrimination, proline and lipid peroxidation contribution to barley (*Hordeum vulgare*) salinity tolerance. *Plants* **2021**, *10*, 299. [[CrossRef](#)]
27. Yousfi, S.; Serret, M.D.; Márquez, A.J.; Voltas, J.; Araus, J.L. Combined use of  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  tracks nitrogen metabolism and genotypic adaptation of durum wheat to salinity and water deficit. *New Phytol.* **2012**, *194*, 230–244. [[CrossRef](#)]
28. Sadaqat Shah, S.; Li, Z.; Yan, H.; Shi, L.; Zhou, B. Comparative study of the effects of salinity on growth, gas exchange, n accumulation and stable isotope signatures of forage oat (*Avena sativa* L.) genotypes. *Plants* **2020**, *9*, 1025. [[CrossRef](#)]
29. Farquhar, G.D.; Ehleringer, J.R.; Hubick, K.T. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **1989**, *40*, 503–537. [[CrossRef](#)]
30. Rebetzke, G.J.; Condon, A.G.; Richards, R.A.; Farquhar, G.D. Selection for reduced carbon-isotope discrimination increases aerial biomass and grain yield of rainfed bread wheat. *Crop Sci.* **2002**, *42*, 739–745. [[CrossRef](#)]
31. Condon, A.G.; Richards, R.A.; Rebetzke, G.J.; Farquhar, G.D. Breeding for high water-use efficiency. *J. Exp. Bot.* **2004**, *55*, 2447–2460. [[CrossRef](#)]
32. Araus, J.L.; Cabrera-Bosquet, L.; Serret, M.D.; Bort, J.; Nieto-Taladriz, M.T. Comparative performance of  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  for phenotyping durum wheat adaptation to a dryland environment. *Funct. Plant Biol.* **2013**, *40*, 595–608. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Zhu, L.; Liang, Z.S.; Xu, X.; Li, S.H.; Jing, J.H.; Monneveux, P. Monneveux E Relationships between carbon isotope discrimination and leaf morphophysiological traits in spring-planted spring wheat under drought and salinity stress in Northern China. *Aust. J. Agric. Res.* **2008**, *59*, 941–949. [[CrossRef](#)]
34. Condon, A.G.; Richards, R.A. Broad sense heritability and genotype x environment interaction for carbon isotope discrimination in field-grown wheat. *Aust. J. Agric. Res.* **1992**, *43*, 921–934. [[CrossRef](#)]
35. Alonso, S.I.; Borrajo, C.I. Colecta y evaluación inicial de poblaciones de Agropiro alargado naturalizadas en la región pampeana Argentina. In *Avances De Investigaciones En Recursos Genéticos En El Cono Sur*; Clausen, A., Condón, F., Berretta, A., Eds.; Procisur: Montevideo, Uruguay, 2007; Volume 2, pp. 9–22.
36. Borrajo, C.I. Generación Y Expansión De Los Órganos Foliares De Agropiro Alargado En Función Del Material Genético Y La Disponibilidad De Nitrógeno. Master's Thesis, Universidad Nacional de Mar del Plata, Balcarce, Argentina, 1998; p. 75.
37. Hallauer, A.R.; Carena, M.J.; Miranda Filho, J.B. *Quantitative Genetics in Maize Breeding*; Springer Science+Business Media LCC: New York, NY, USA, 2010. [[CrossRef](#)]
38. Tambussi, E.; Bort, J.; Araus, J. Water use efficiency in C3 cereals under Mediterranean conditions: A review of physiological aspects. *Ann. Appl. Biol.* **2007**, *150*, 307–321. [[CrossRef](#)]
39. Johnson, R.C.; Bassett, L.M. Carbon isotope discrimination and water use efficiency in four cool-season grasses. *Crop Sci.* **1991**, *31*, 157–162. [[CrossRef](#)]
40. Blum, A. Towards a conceptual ABA ideotype in plant breeding for water limited environments. *Funct. Plant Biol.* **2015**, *42*, 502–513. [[CrossRef](#)]
41. Ortega, L.; Taleisnik, E. Elongation growth in leaf blades of *Chloris gayana* under saline conditions. *J. Plant Physiol.* **2003**, *167*, 517–522. [[CrossRef](#)]

42. Gonzalez-Dugo, V.; Durand, J.L.; Gastal, F. Water deficit and nitrogen nutrition of crops. A review. *Agron. Sustain. Dev.* **2010**, *30*, 529–544. [[CrossRef](#)]
43. Mansour, M. Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. *Biol. Plant.* **2003**, *43*, 491–500. [[CrossRef](#)]
44. Reigosa, M.J. *Handbook of Plant Ecophysiology Techniques*; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, 2001; Available online: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/0-306-48057-3.pdf> (accessed on 20 January 2020).
45. Rasband, W.S. *ImageJ 1.50i [Program File]*; National Institutes of Health: Bethesda, MD, USA, 1997–2016. Available online: <http://imagej.nih.gov/ij/> (accessed on 12 July 2020).
46. SAS. *The SAS System for Windows. Release 9.1*; SAS Institute: Cary, NC, USA, 2002.
47. Singh, B.D. *Plant Breeding Principles and Methods*; Kalyani Publishers: Ludhiana, India, 2001.



## **ESTRÉS HÍDRICO Y SALINO INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA**

A continuación, se presenta el MATERIAL SUPLEMENTARIO del trabajo:

Borrajo, C.I.; Sánchez-Moreiras, A.M.; Reigosa, M.J. 2022. Ecophysiological responses of tall wheatgrass germplasm to drought and salinity. *Plants* 2022, Volume 11, Issue 12, 1548. <http://doi.org/10.3390/plants11121548>

### **CONTIENE EL MATERIAL SUPLEMENTARIO DE LAS TABLAS**

Table S1

Table S2

Table S3

Table S4.

### **CONTIENE EL MATERIAL SUPLEMENTARIO DE LAS FIGURAS**

FIGURE S1:

FIGURE S2:

FIGURE S3:

FIGURE S4:

FIGURE S5:

FIGURE S6.

## SUPPLEMENTARY MATERIALS – TABLES

**Table S1.** Results of three-way factorial ANOVAs (four accessions, three salinity levels, three drought levels, and their interactions) with five blocks for the morphoagronomic variables, p-values are considered significant when  $p < 0.05$ .

ANOVA	Density	LeafT	SLA	LeafB	StemB	DeadB	Dead%	TotalB	Height	Spike%	ETA	WUE	EC
Drought (WS)	0.3284	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Salinity (SS)	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Accession	0.0261	0.0244	0.8892	0.0010	0.0261	0.2076	0.0482	0.0325	0.0456	0.0419	0.0074	0.0331	0.9539
WS × SS	0.0002	0.0093	0.2562	0.1327	<0.0001	0.0002	0.0232	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
WS × Accession	0.7031	0.4508	0.9004	0.2260	0.1044	0.1139	0.1656	0.1361	0.5352	0.4154	0.5246	0.4175	0.3280
SS × Accession	0.4645	0.5536	0.8263	0.3202	0.3557	0.1302	0.5248	0.8000	0.0662	0.0022	0.4525	0.6744	0.9194
WS × SS × Accession	0.7492	0.4801	0.3099	0.2362	0.1365	0.7990	0.3120	0.0900	0.5137	0.5251	0.7888	0.1401	0.9589

Density: tiller density; LeafT: length leaf per tiller; SLA: specific leaf area; LeafB, StemB, DeadB and TotalB: green-leaf, green-stem, dead and total biomass; Dead%: percentage of dead biomass; Height: plant height; Spike%: proportion of spiked tillers; ETA: accumulated evapotranspiration; WUE: water use efficiency; EC: electrical conductivity.

**Table S2.** Results of three-way factorial ANOVAs (four accession, three salinity levels, three drought levels, and their interactions) with five blocks for physiological and isotopic variables, p-values are considered significant when  $p < 0.05$ .

ANOVA	RWC	Proline	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ratio	N	δ <sup>13</sup> C	δ <sup>15</sup> N
Drought (WS)	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.1147	0.2091	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.5121
Salinity (SS)	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Accessions	0.8082	0.5201	0.1454	0.7747	0.5658	0.0493	0.3991	0.0476	0.2823
WS × SS	0.3888	<0.0001	0.0110	0.5448	0.1905	0.0354	<0.0001	<0.0001	0.2848
WS × Accession	0.8060	0.7166	0.8249	0.7070	0.1183	0.4286	0.7237	0.4631	0.3451
SS × Accession	0.1066	0.6207	0.2750	0.6612	0.6047	0.2856	0.8440	0.9700	0.7090
WS × SS × Accession	0.5318	0.8353	0.6076	0.5087	0.4561	0.5114	0.7450	0.9805	0.7726

RWC: relative water content; δ<sup>13</sup>C: stable isotope of carbon; δ<sup>15</sup>N: stable isotope of nitrogen.

**Table S3.** Results of three-way factorial ANCOVA: four accessions (Pobla), three salinity levels (SS), three drought levels (WS), and their interactions, with covariates and repeated measures by time (t = 3) and four blocks for net photosynthetic rate (A), p-values are considered significant when  $p < 0.05$ .

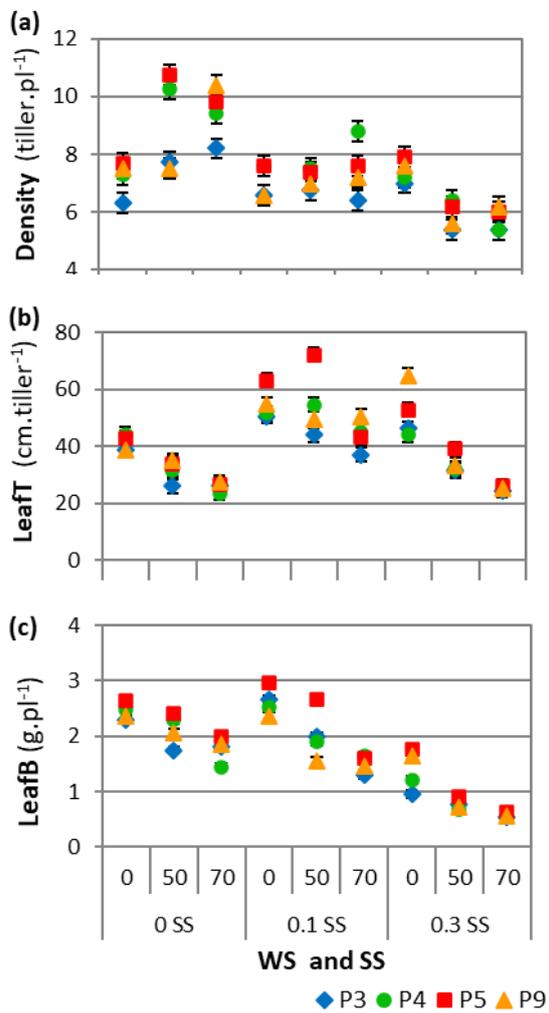
ANOVA	A
t	<0.0001
WS	<0.0001
SS	<0.0001
Accession	0.6504
t × WS	0.0889
t × SS	<0.0001
t × Accession	0.9977
WS × SS	0.1986
WS × Pobla	0.7954
SS × Pobla	0.6466
t × WS × SS	0.0130
t × WS × Accession	0.9988
t × SS × Accession	0.9455
WS × SS × Accession	0.8493
t × WS × SS × Accession	0.9776
PAR	0.8230
T_air	0.5590
T_leaf	0.5557
CO <sub>2</sub>	0.1798
Flow	0.3615
RH	0.0102

The covariates were photosynthetically active radiation (PAR), air and leaf temperature (Temp\_A and Temp\_L), CO<sub>2</sub> concentration, air flows (Flow) and relative humidity (RH).

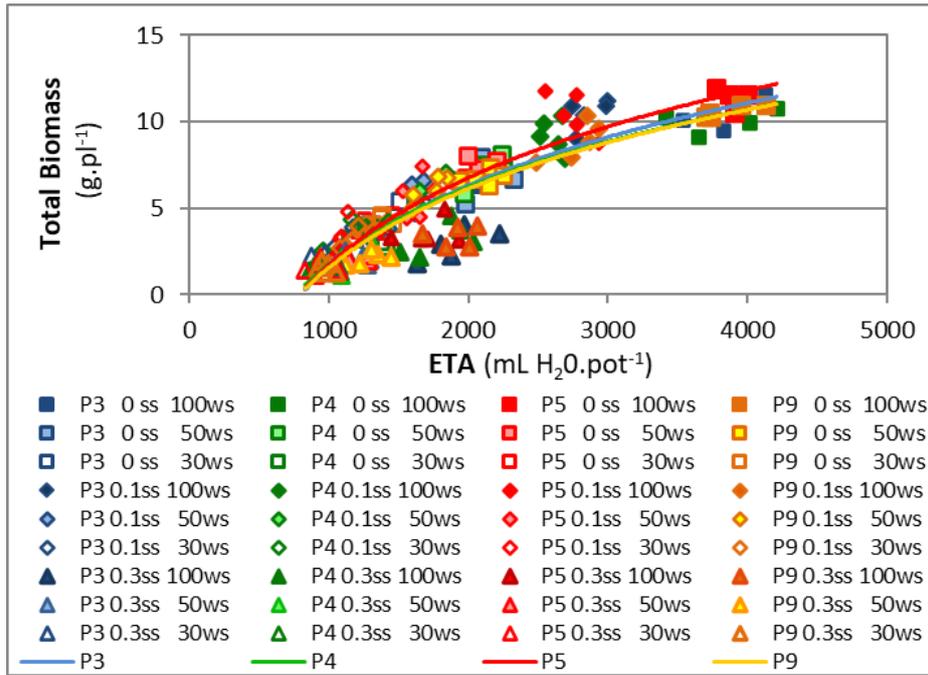
**Table S4:** Broad-sense heritability ( $H^2$  %) and standard errors (SE  $H^2$ ) for morpho-agronomic, physiological, and isotopic characters. Classification of heritability in low (< 40%), medium (40-59%) and high (60-79%) [Singh, 2001].

<b>Characters</b>	<b>Abbreviation</b>	<b><math>H^2</math></b>	<b>SE <math>H^2</math></b>
Stable isotopes of $^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	76.9	10.0
Leaf biomass	LeafB	71.6	9.7
Tiller density	Density	70.8	11.8
Leaf length per tiller	LeafT	70.1	12.0
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ratio	Na/K	55.0	15.2
Plant height	Height	52.6	14.8
Total biomass	TotalB	50.9	15.2
Dead biomass	DeadB	50.3	15.3
K <sup>+</sup> concentration	K	49.6	15.9
Stem biomass	StemB	44.8	16.3
Free proline	Proline	41.7	16.4
Stable isotopes of $^{15}\text{N}$	$\delta^{15}\text{N}$	37.4	16.5
Net photosynthetic rate at 85 days	A_t3	36.2	16.5
N concentration	N	34.3	16.5
Proportion of spiked tillers	Spike	30.8	16.3
Percentage of dead biomass	%Dead	26.8	16.0
Cl <sup>-</sup> concentration	Cl	5.8	2.3
Specific leaf area	SLA	1.0	1.9
Relative water content	RWC	0.0	1.6
Na <sup>+</sup> concentration	Na	0.0	1.6
Net photosynthetic rate at 10 days	A_t1	0.0	1.6
Net photosynthetic rate at 45 days	A_t2	0.0	1.6

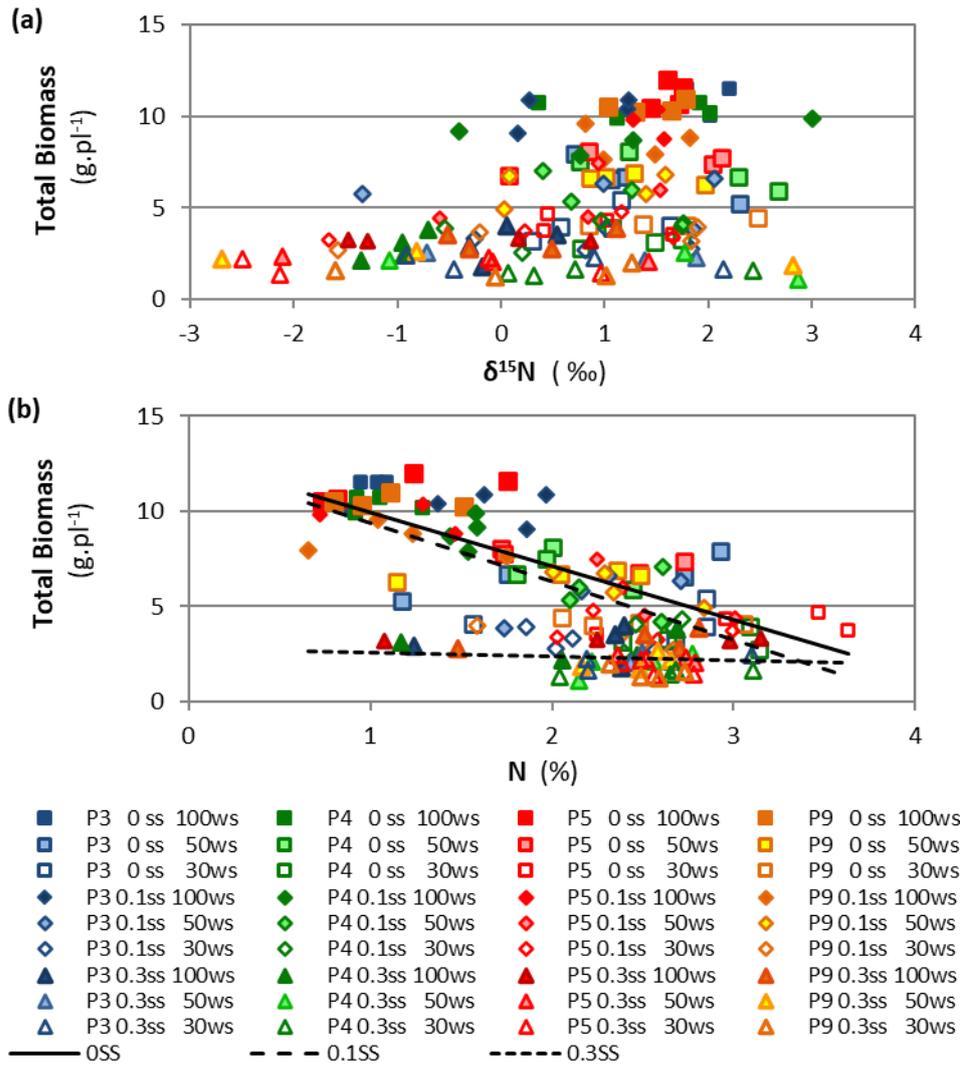
## SUPPLEMENTARY MATERIALS – FIGURES



**Figure S1.** Density (a), green leaf length (LeafT, b), and leaf biomass (LeafB, c) of four accessions (P3, P4, P5, P9) grown under three drought levels (0WS, 50WS or 70WS, corresponding to 100%, 50%, 30% of water capacity, respectively) combined with three salinity levels (0SS, 0.1SS or 0.3SS, corresponding to 0.0, 0.1, 0.3 M NaCl, respectively)

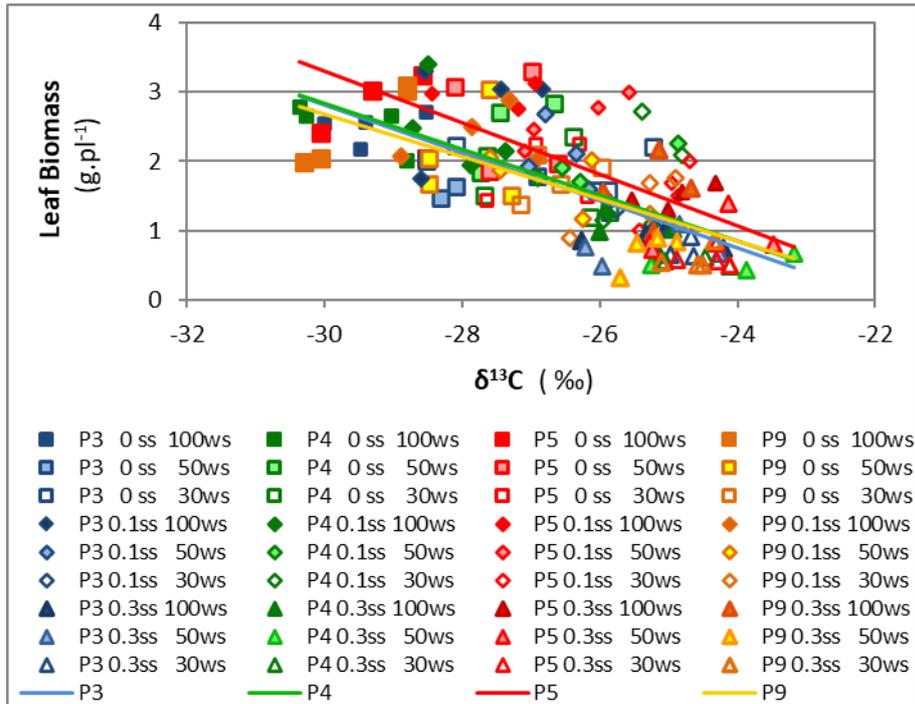


**Figure S2.** Relationship between total biomass and accumulated evapotranspiration (ETA) of four accessions (P3, P4, P5, P9) grown under three drought levels (0WS, 50WS or 70WS, corresponding to 100%, 50%, 30% of water capacity, respectively) combined with three salinity levels (0SS, 0.1SS or 0.3SS, corresponding to 0.0, 0.1, 0.3 M NaCl, respectively). Color lines show the behavior of each accession, P3:  $y = 6.9\ln(x) - 45.8$ ,  $R^2 = 0.82^{***}$ , P4:  $y = 6.5\ln(x) - 42.9$ ,  $R^2 = 0.84^{***}$ , P5:  $y = 7.3\ln(x) - 48.6$ ,  $R^2 = 0.86^{***}$ , P9:  $y = 6.6\ln(x) - 44.0$ ,  $R^2 = 0.86^{***}$ , (\*\*\*)  $p < 0.001$ .

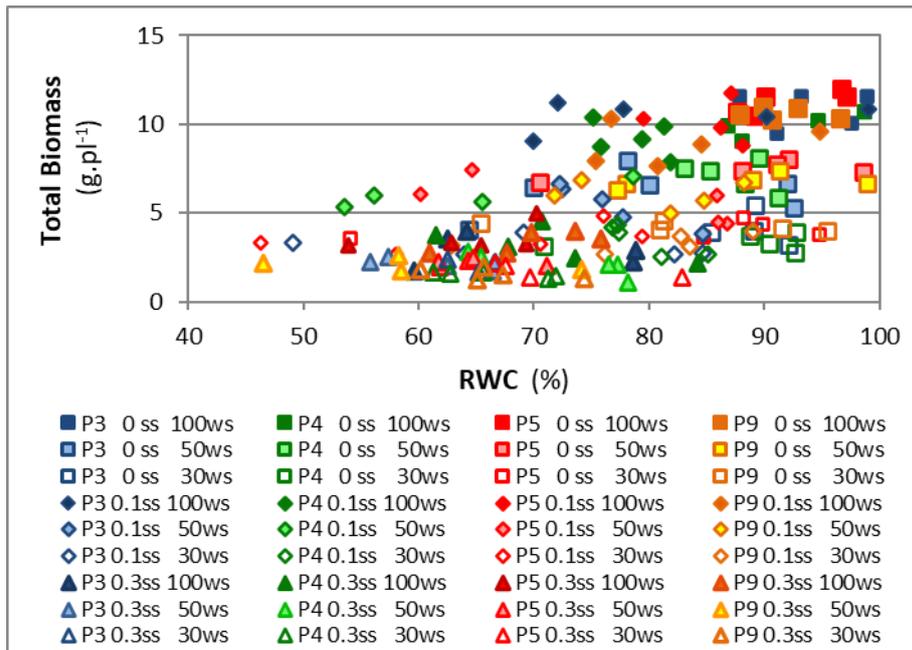


**Figure S3.** Relationship between total biomass and stable isotope of nitrogen ( $\delta^{15}\text{N}$ , a) or N concentration (b) of four accessions (P3, P4, P5, P9) grown under three drought levels (0WS, 50WS or 70WS, corresponding to 100%, 50%, 30% of water capacity, respectively) combined with three salinity levels (0SS, 0.1SS or 0.3SS, corresponding to 0.0, 0.1, 0.3 M NaCl, respectively). Black lines of different sections show the behavior of the three salinity levels for N%, 0SS:  $y=2.82x+12.7$   $R^2=0.62^{***}$ , 1SS:  $y=-3.07x+12.45$   $R^2=0.46^*$ , 3SS:  $y=-0.20x+2.80$   $R^2=0.02\text{ns}$ , (ns  $p > 0.0500$ , \*  $p < 0.0500$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ ).

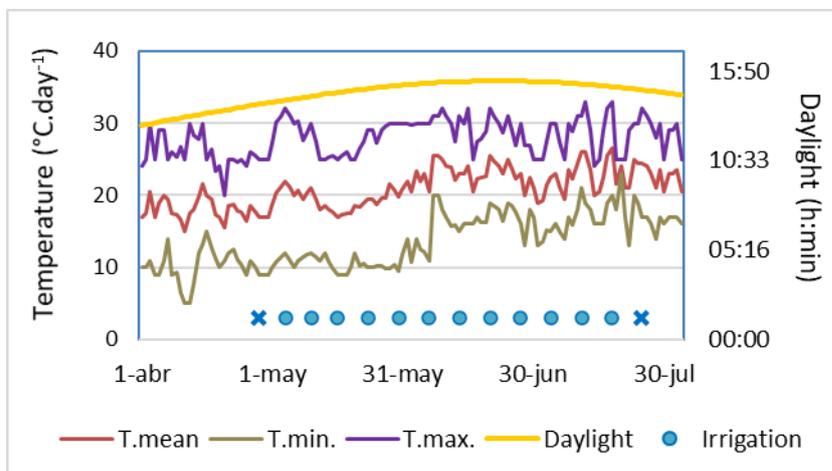




**Figure S4.** Relationship between leaf biomass and stable isotope of carbon ( $\delta^{13}\text{C}$ ) of four accessions (P3, P4, P5, P9) grown under three drought levels (0WS, 50WS or 70WS, corresponding to 100%, 50%, 30% of water capacity, respectively) combined with three salinity levels (0SS, 0.1SS or 0.3SS, corresponding to 0.0, 0.1, 0.3 M NaCl, respectively). Color lines show the behavior of each population, P3:  $y = -0.34x - 7.54$ ,  $R^2 = 0.50^*$ , P4:  $y = -0.33x - 7.12$ ,  $R^2 = 0.48\text{ns}$ , P5:  $y = -0.37x - 7.85$ ,  $R^2 = 0.50^*$ , P9:  $y = -0.30x - 6.44$ ,  $R^2 = 0.43\text{ns}$ , (ns  $p > 0.0500$ , \*  $p < 0.0500$ ).



**Figure S5.** Relationship between total biomass and relative water content (RWC) of four accessions (P3, P4, P5, P9) grown under three drought levels (0WS, 50WS or 70WS, corresponding to 100%, 50%, 30% of water capacity, respectively) combined with three salinity levels (0SS, 0.1SS or 0.3SS, corresponding to 0.0, 0.1, 0.3 M NaCl, respectively).



**Figure S6.** Mean, maximum, and minimum daily temperatures recorded in the greenhouse and hours of daily light (daylight) during the experience. The beginning (April 28) and end (July 26) of the experiment (symbol X), and irrigation days (blue dots) were indicated.

# **VARIABLES QUE EXPLICAN LA TOLERANCIA AL ESTRÉS**

**Esta sección fue parcialmente presentada y publicada en los  
Congresos:**

Borrajo, C.I.; Sánchez-Moreiras, A.M.; Reigosa, M.J. 2020. Determinants of tall wheatgrass biomass under water and salt stress. En: Sixth Young Researchers Workshop, Vigo- Spain.

Borrajo, C.I.; Sánchez-Moreiras, A.M.; Reigosa, M.J. 2021. Tall wheatgrass plasticity to tolerate water, salt and combined stress. Seventh Young Researchers Workshop. December 16-17, 2021. Vigo- Spain.

## **VARIABLES QUE EXPLICAN LA TOLERANCIA AL ESTRÉS**

INTRODUCCION

MATERIALES Y MÉTODOS

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

*Variables determinantes de la producción de biomasa ante diferentes situaciones de estrés.*

*Variables que determinan diferencias entre poblaciones ante diferentes situaciones de estrés.*

CONCLUSIONES DEL ESTUDIO COMPARATIVO

## **VARIABLES QUE EXPLICAN LA TOLERANCIA AL ESTRÉS**

### **INTRODUCCION**

Los programas de mejoramiento de especies forrajeras se han basado en la selección fenotípica y las pruebas de progenie posterior, seguidas por la reelección, teniendo en cuenta como principal carácter la producción de biomasa aérea total o estacional y la persistencia (McGuire y Dvoák, 1981; Rodríguez, 1983; Rasmussen et al., 2012; Rognli et al., 2021; Schrauf et al., 2021). La medición de producción de biomasa se efectúa en diferentes rebrotes por temporada en diferentes años, lo que significa una tarea laboriosa que requiere un gran tiempo y costo (Rasmussen et al., 2012; Rognli et al., 2021); todo ello sumado a que, en forrajeras perennes, para poder sostener que un ecotipo, población o material genético es superior a otro es necesario realizar evaluaciones durante 3 o 4 años (Díaz et al., 2004; Schrauf et al., 2021). Además, las evaluaciones en diferentes sitios pueden mostrar importantes interacciones genotipo x ambiente, lo que hace que la determinación fenotípica precisa sea muy importante para seleccionar materiales genéticos superiores (Rognli et al., 2021).

El cambio climático plantea un importante y urgente desafío para el mejoramiento de las forrajeras perennes, donde prima la búsqueda de tolerancia al estrés por sequía y salinidad. Sin embargo, la tolerancia al estrés salino puede estar asociada negativamente con la producción del forraje, por lo que la evaluación es aún más compleja (Schrauf et al., 2021). Considerando que el éxito de la mejora genética se basa en encontrar diversidad interespecifica analizando un gran número de individuos y progenies, es necesario encontrar criterios de fácil medición que permitan predecir el comportamiento en campo, e implementar nuevos métodos de mejoramiento para acelerar la selección de genotipos y el desarrollo de nuevos cultivares (Rasmussen et al., 2012; Rognli et al., 2021; Schrauf et al., 2021).

La sequía y la salinidad pueden modificar las respuestas de las plantas según la intensidad y la duración del estrés, así como en función del genotipo y el estado fenológico de las plantas (Bray, 1997; Munns, 2002; Medrano y Flexas, 2004; Chaves et al., 2009; Flexas et al., 2013; Acosta Motos et al., 2017; Schrauf et al., 2021), como se registró en las secciones anteriores entre poblaciones en los ensayos de estrés hídrico, salino y combinado. Por esta razón, en la presente sección se plantea seleccionar qué caracteres son determinantes para producir mayor biomasa bajo diferentes condiciones de estrés, así como definir qué caracteres pueden permitir identificar genotipos con diferente tolerancia al estrés hídrico y/o salino. En consecuencia, el objetivo de la presente sección fue analizar la tolerancia al estrés hídrico, salino y combinado, identificando los principales caracteres morfológicos, fisiológicos, bioquímicos e isotópicos que determinan la producción de biomasa y las diferencias entre poblaciones de agropiro alargado.

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

Los datos registrados en las variables morfogenéticas, estructurales, fisiológicas e isotópicas sobre cuatro poblaciones de diferente origen ambiental (P3 de clima templado húmedo y suelo no salino o alcalino, P4 de clima semiárido y suelo salino-alcalino, P5 de clima

semiárido y suelo no salino o alcalino, y P9 de clima templado húmedo y suelo salino-alcalino, Anexo II), fueron obtenidos de las cuatro experiencias descritas en las secciones anteriores. En la primera experiencia fue evaluado el estrés hídrico (EH\_35d) con tres niveles (100% -50% -30% de capacidad de campo en maceta), en plantas vegetativas durante 35 días. En la segunda y tercera experiencias, fue evaluado el estrés salino con cinco niveles (0-0,1-0,2-0,3-0,4 M NaCl) de diferente duración, uno de 40 días con plantas en estado vegetativo (ES\_40d) y otro de 85 días con plantas en estado vegetativo y reproductivo (ES\_85d). En la cuarta experiencia, se evaluó el estrés hídrico y salino combinado (EHxES\_90d), con tres niveles de salinidad (0-0,1-0,3 M NaCl) combinados con tres niveles hídricos (100-50-30% de capacidad de campo en maceta), con plantas en estado vegetativo y reproductivo durante 90 días. Detalles del diseño de los ensayos y los caracteres registrados se encuentran en la sección Planificación de Ensayos (Tabla 2 y Tabla 3 de dicha sección).

Los caracteres medidos fueron utilizados para realizar cuatro análisis de regresión lineal múltiple, con la finalidad de encontrar los caracteres que explicaban mejor la biomasa producida en cada experiencia (Proc reg / Stepwise-SAS). En el análisis fue utilizado el modelo de regresión lineal múltiple paso a paso (Stepwise), considerando como variable dependiente la biomasa aérea total (Y= BTotal) y como variables independientes (Xn) los caracteres registrados en cada ensayo (Tabla 3 de la sección Planificación de Ensayos), como se muestra en la Tabla 4. Las variables productivas, como son las fracciones de la biomasa total (muerta, verde, hoja y tallo), no fueron consideradas para estos análisis. El modelo fue analizado con el procedimiento Proc Reg/STEPWISE del paquete estadístico SAS.

**Tabla 4:** Modelo de regresión lineal múltiple con todas las variables independientes posibles para la determinación de la biomasa total (Y) en los ensayos de estrés hídrico (EH\_35d), estrés salino con una duración de 40 días y 85 días (ES\_40d y ES\_85d), y de estrés hídrico y salino combinado (EHxES\_90d).

Ensayo	Modelo con las variables independientes a seleccionar
EH_35d	Y = AreaH LargoH AnchoH Den1 Den2 Den3 Den4 PMac AFE ETA EUA CHR Prolina Proteína
ES_40d	Y = TEF TSF TAH NHoja AreaH Densidad AFE CHR Prolina Proteína A <sub>t1</sub> A <sub>t2</sub>
ES_85d	Y = LHMac Densidad AFE CHR Prolina ETA EUA A <sub>t1</sub> A <sub>t2</sub> A <sub>t3</sub> K Cl Na N $\delta^{13}C$ $\delta^{15}N$
EHxES_90d	Y = LHMac Densidad AFE CHR Prolina ETA EUA A <sub>t1</sub> A <sub>t2</sub> A <sub>t3</sub> K Cl Na N Na/K $\delta^{13}C$ $\delta^{15}N$ CE

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### ***Variables determinantes de la producción de biomasa ante diferentes situaciones de estrés***

Los modelos de regresión lineal múltiple paso a paso obtenidos mostraron diferente selección de caracteres según el ensayo (Tabla 5, Anexo IV). El carácter que mejor explicó en un inicio la biomasa producida (Y) cuando las poblaciones fueron sometidas a estrés hídrico fue la

evapotranspiración acumulada (ETA). El área foliar fue el segundo carácter introducido al modelo y luego eliminado, al ser introducidas las variables densidad de macollos en la 4ª semana (Den4) y peso de los macollos (PMac), finalizando el modelo con tres caracteres que fueron los determinantes para explicar mejor en conjunto la biomasa producida (Y) cuando las poblaciones fueron sometidas a diferentes niveles de estrés hídrico durante 35 días (SH\_35d), (Tabla 5, más detalles en la Tabla II del Anexo IV).

**Tabla 5:** Modelo de regresión lineal múltiple presentando la combinación de variables que mejor explica la biomasa total (Y) en los ensayos de estrés hídrico (EH\_35d), estrés salino con duración de 40 días y 85 días (ES\_40d y ES\_85d), y estrés hídrico y salino combinado (EHxES\_90d).

Ensayos	Modelos obtenidos/Stepwise	R <sup>2</sup>	p
EH_35d	Y = -1,500 +19,629 PMac +0,067 Den4 +0,0002 ETA	0,98	<0,0001.
ES_40d	Y = -0,717 +0,012 CHR -0,004 AFE +0,324 NHoja +0,080 AreaH	0,85	<0,0001
ES_85d	Y = 7,531 -1,310 Prolina +0,180A_t <sub>3</sub>	0,97	<0,0001
EHxES_90d	Y = -34,315 -0,293 Prolina +1,512 EUA -0,082 Densidad -0,001 LHMac -0,028A_t <sub>3</sub> +5,097 ETA	0,97	<0,0001

PMac: peso de los macollos, Den4: densidad de macollos en la 4ta semana, ETA: evapotranspiración acumulada, CHR: contenido hídrico relativo, AFE: área foliar específica, NHoja: número de hojas /macollo, AreaH: área/ hoja, Prolina: prolina libre, A\_t<sub>3</sub>: tasa fotosintética neta a los 80 días para ES\_85d y a los 85 días para EHxES\_90d, EUA: eficiencia en el uso del agua, Densidad: número de macollos, LHMac: Longitud foliar verde /macollo.

Los resultados en la selección de variables en los modelos de regresión lineal múltiple STEPWISE fueron bastante diferentes entre los dos ensayos de salinidad, según la duración del estrés (Tabla 5). En el ensayo de estrés salino de 40 días (ES\_40d), las variables que mejor explicaron la biomasa total (Y) fueron variables estructurales del canopeo como el área foliar (AreaH), el número de hojas por macollo (NHoja) y el peso específico de las hojas (AFE), en conjunto con variables relacionadas con el estado hídrico de la planta como el contenido hídrico relativo (CHR) (más detalles en la Tabla III del Anexo IV). Mientras que al someter estas poblaciones a un estrés salino de 85 días de duración (ES\_85d), las variables independientes que mejor explicaron la biomasa total (Y) fueron la concentración de prolina y la tasa fotosintética neta a los 80 días (A\_t<sub>3</sub>), (más detalles en la Tabla IV del Anexo IV).

En el modelo de regresión lineal múltiple obtenido en el ensayo de estrés hídrico y salino combinado con una duración de 90 días, los caracteres que mejor explicaron la producción de biomasa aérea (Y) fueron los relacionados con el uso del agua como la evapotranspiración acumulada (ETA) y la eficiencia en el uso del agua (EUA). Luego, la concentración de prolina fue un factor muy importante y la tasa fotosintética neta registrada a fines de la experiencia, a los 85 días (A\_t<sub>3</sub>). Posteriormente las variables de estructura del canopeo la longitud foliar por macollo (LHMac) y el número de macollos por planta, fueron las últimas en ser introducidas para explicar la biomasa total (más detalles en Tabla V del Anexo IV).

A pesar de que no todas las variables se registraron en todos los ensayos, al comparar los modelos de regresión lineal múltiple generados por el proceso STEPWISE, se observó que la

producción de biomasa aérea era explicada especialmente por caracteres relacionadas con el estado hídrico de la planta (ETA, CHR, EUA), así como con los caracteres relacionados con la estructura del canopeo, tamaño y número de hojas y / o macollos. Esto fue evidente en los ensayos de menor duración, tanto de estrés hídrico (EH\_35d) como de estrés salino (ES\_40d). Esos caracteres también estuvieron presentes y fueron importantes para explicar la biomasa total en el ensayo de mayor duración que combinaba estrés hídrico y salino (EHxES\_90d). Sin embargo, en los ensayos de mayor duración, tanto en el de estrés salino de 85 días como en el de estrés combinado hídrico y salino de 90 días, la concentración de prolina fue el principal carácter para explicar la biomasa producida, seguida de la tasa fotosintética neta registrada al final de ambos ensayos. En los modelos fue notoria la ausencia de caracteres relacionados con la concentración de nutrientes y/o sales, así como la de isótopos estables entre las variables importantes para explicar la biomasa producida (estos caracteres fueron registrados sólo en los ensayos de mayor duración).

Ese comportamiento puede deberse a que los procesos de crecimiento y desarrollo de gramíneas forrajeras perennes pueden ser explicados por la morfogénesis que define el tamaño y el número de hojas y macollos determinando la estructura del canopeo (Chapman y Lemaire, 1993; Gastal y Lemaire, 2015; Chapman, 2016; Oliveira et al., 2020). Estos caracteres se ven afectados desde el inicio del estrés hídrico o salino, etapa dominada por el estrés osmótico, a través de una restricción en la tasa de elongación y aparición foliar, determinando hojas más pequeñas y gruesas (menor AFE), acompañado por un menor macollaje (van Loo, 1992; Thomas et al., 1999; Durand et al., 1997; Munns, 2002; Taleisnik et al., 2009; Hessini et al., 2009; Turner et al., 2012; Cyriac, et al., 2018; Ludwiczak et al., 2021; Carrizo et al., 2021). Estas reacciones están asociadas a cambios en la relación hídrica de las células y no a la toxicidad de las sales (Munns, 2002; Hasegawa, 2013; Ludwiczak et al., 2021), lo que justifica que los caracteres relacionados con el estado hídrico de la planta (ETA, CHR y/o EUA) se encuentren en los modelos que definen la biomasa en los experimentos de estrés hídrico y/o salino, ya sean estos de corta o larga duración.

Cuando el estrés perdura, las plantas activan mecanismos para recuperar el equilibrio osmótico, así como mecanismos para controlar el estrés oxidativo, lo que determina su adaptación a las condiciones de sequía y salinidad (Taleisnik et al., 2009; Hasegawa, 2013; Acosta Motos et al., 2017; Carrizo et al., 2021). La prolina se acumula en respuesta a distintas situaciones de estrés ambiental y se ha asociado con funciones tanto de osmorregulación como de osmoprotección (Szabados y Savoure, 2010; Bhaskara et al., 2015; Acosta Motos et al., 2017; Frimpong et al., 2021; Ghafar et al., 2021; Vasilakoglou et al., 2021), y de hecho fue la prolina la variable que mayor incremento mostró ante situaciones de estrés en todos los ensayos realizados en esta Tesis de Doctorado (como puede verse en las secciones anteriores).

La respuesta fotosintética a la sequía y la salinidad se produce desde el inicio del estrés hídrico y/o salino (Munns, 2002; Medrano y Flexas, 2004; Chaves et al., 2009; Flexas et al., 2013; Morales et al., 2020). Sin embargo, la presencia de esta variable en los modelos de los ensayos de mayor duración, y solo en las últimas mediciones registradas ( $A_{t_3}$ ), podría deberse a que la tasa fotosintética neta fue registrada en la última hoja desarrollada, que es la que prioriza la planta para poder seguir creciendo y recién fue severamente afectada luego de los estreses más prolongados. El estrés prolongado habría inhibido en gran medida las funciones enzimáticas y



del aparato fotosintético debido a la alta producción de especies reactivas de oxígeno en los fotosistemas, como se registró en otras gramíneas perennes halófitas bajo estrés por sequía prolongada (Ghafar et al., 2021).

Teniendo en cuenta los modelos obtenidos en los distintos ensayos podríamos pensar que estamos cerca de identificar qué variables son útiles para diferenciar las poblaciones con mayor producción de biomasa aérea. Sin embargo, las variables que definen las estrategias estructurales y los mecanismos fisiológicos en respuesta al estrés hídrico y/o salino, determinantes de la mayor biomasa total, no necesariamente mostraron diferencias entre poblaciones, por lo que se plantea el estudio comparativo intraespecífico llevado a cabo en el siguiente apartado.

### ***Variables que determinan diferencias entre poblaciones ante diferentes situaciones de estrés***

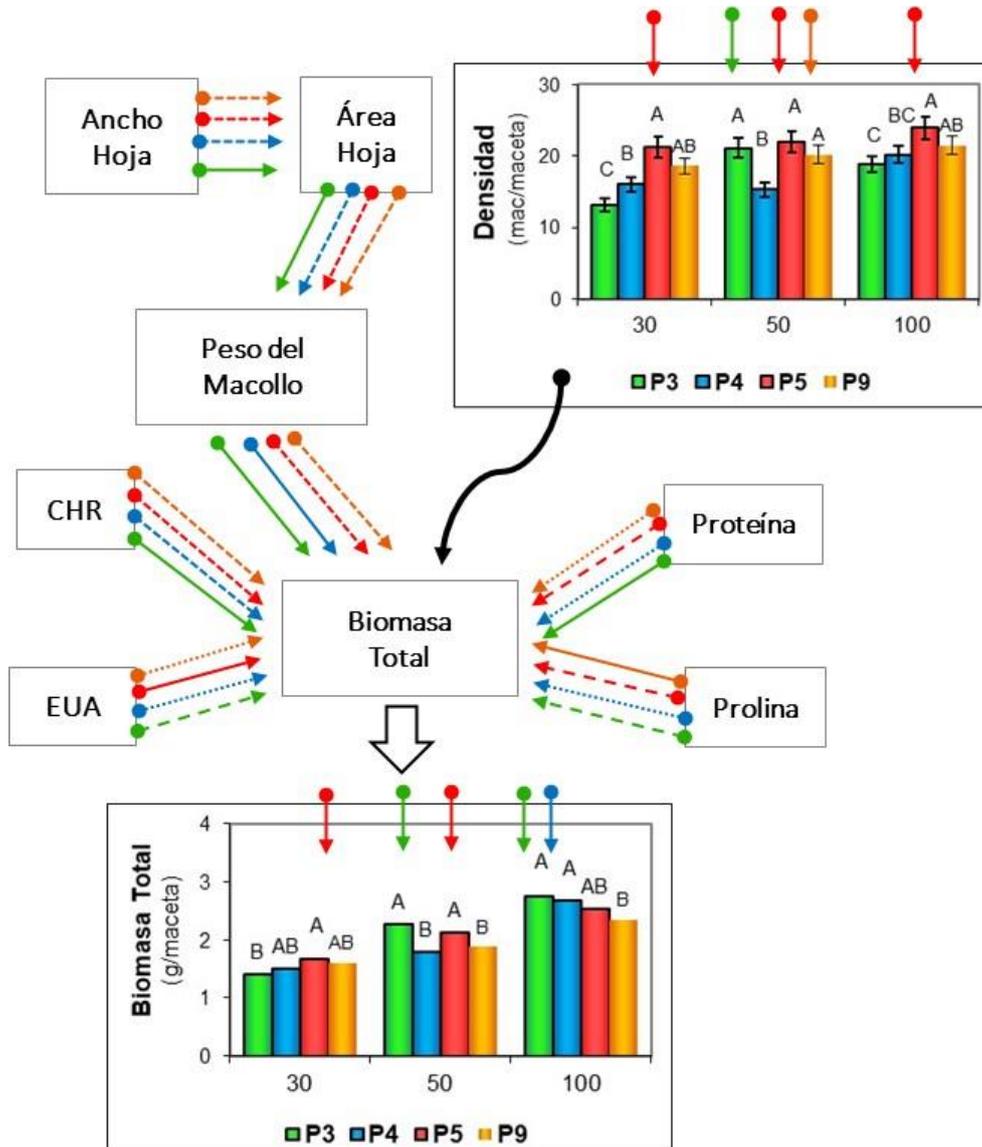
En base a los resultados de los análisis estadísticos de los ensayos presentados anteriormente sobre estrés hídrico, salino y combinado (EH\_35d, ES\_40d, ES\_85d y EHxES\_90d), se plantea realizar una síntesis comparativa con las variables que mostraron diferencias significativas entre poblaciones en cada ensayo, para comparar las respuestas al estrés e identificar las variables que permitan seleccionar diferencias intraespecíficas.

En la primera experiencia fue evaluado el estrés hídrico (EH\_35d) con tres niveles (100% -50% -30% de capacidad hídrica en maceta), en plantas en estado vegetativo durante 35 días, con cuatro poblaciones de diferente origen edafo-climático (P3 de clima templado húmedo y suelo no salino o alcalino, P4 de clima semiárido y suelo salino-alcalino, P5 de clima semiárido y suelo no salino o alcalino, y P9 de clima templado húmedo y suelo salino-alcalino). Las variables estructurales del canopeo, como el ancho y el área foliar (AnchoH y AreaH), mostraron diferencias significativas entre poblaciones y fueron superiores en P3. Estas variables en conjunto determinan el peso del macollo (PMac), mayor en P3. El número de macollos (Densidad) mostró diferente comportamiento entre las poblaciones según el estrés hídrico (interacción Pobl x SH), donde destaca P5 con valores altos en todos los niveles de estrés (Figura 5).

También hubo diferencias en las variables relacionadas con el estado hídrico de la planta, encontrando los mayores valores de contenido hídrico relativo (CHR) en P3 y las mayores eficiencias en el uso del agua (EUA) en P5 e intermedia en P3. Además, se registraron diferencias en los mecanismos de respuesta al estrés a través de los distintos contenidos proteicos con mayores valores en P3, seguida de P5; y en prolina con los registros más altos en P9 y P4, que son las poblaciones provenientes de entornos salino-alcalinos.

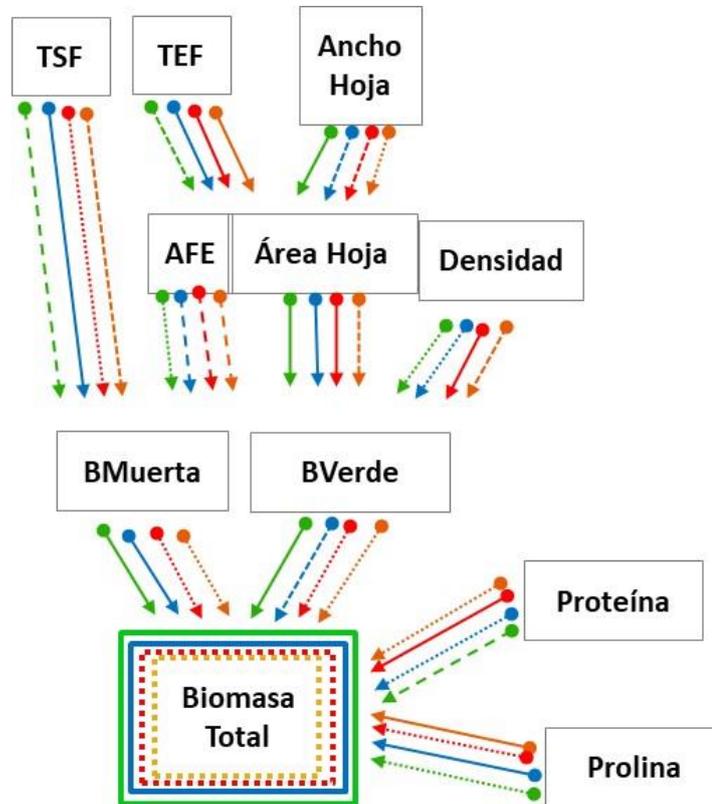
La combinación de variables estructurales, hídricas y fisiológicas determinó diferencias entre poblaciones en la biomasa aérea producida (BTot), destacándose las poblaciones que provenían de entornos no salinos ni alcalinos (P3 y P5). La población P3 (provenientes de ambientes con mínimos estrés hídrico) en los niveles con estrés hídrico leve a moderado y la P5 (provenientes de ambientes con alto estrés hídrico) en presencia de estrés moderado a severo., lo cual lleva a plantear la importancia de la densidad de macollos en la definición de la

estabilidad en la producción forrajera, a pesar de su menor tamaño foliar. El estudio muestra que la producción de materia seca en los diferentes niveles de estrés hídrico, podría estar relacionado con mecanismos que logren altos valores de proteína foliar y EUA, además de mantener una alta densidad de macollos como estrategia de crecimiento para lograr mayor estabilidad en la producción de forraje, a pesar del menor tamaño foliar.



**Figura 5:** Síntesis del ensayo de estrés hídrico comparando cuatro poblaciones de agropiro alargado (Pobla: P3, P4, P5, P9) con 3 niveles de estrés hídrico (30, 50 y 100 % de capacidad de campo de las macetas) durante 35 días. Valores relativos: alto (línea continua), medio (línea discontinua), bajo (línea punteada), mostrando la relación entre variables que mostraron diferencias interpopulacionales: ancho y área de las hojas, peso del macollo, número de macollos (Densidad, con interacción Pobla x SH), contenido hídrico relativo (CHR), eficiencias en el uso del agua (EUA), proteína y prolina, y la biomasa aérea total producida (con interacción Pobla x SH). En las interacciones, letras distintas indican diferencias significativas entre poblaciones para cada condición hídrica, donde las flechas de colores muestran las Poblaciones superiores en cada condición hídrica.

En la segunda experiencia se compararon las mismas cuatro poblaciones de agropiro alargado (P3, P4, P5, P9) creciendo ante 5 niveles de salinidad (riego con 0; 0,1; 0,2; 0,3 y 0,4 M NaCl) durante 40 días, encontrando diferencias significativas entre poblaciones en las variables morfológicas y estructurales, además de las variables fisiológicas como el contenido de proteína y de prolina (Figura 6).

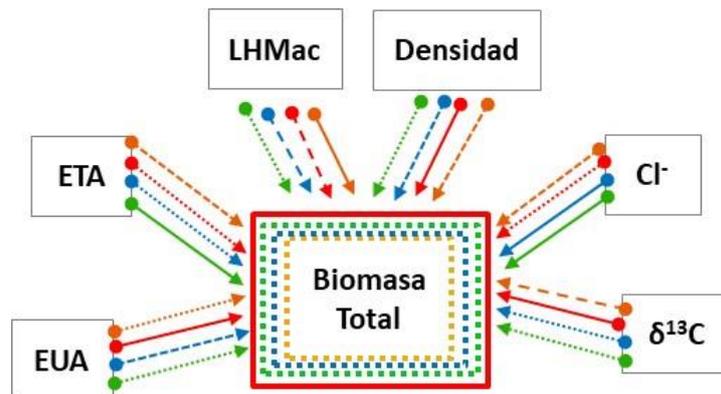


**Figura 6:** Síntesis del ensayo de estrés salino comparando cuatro poblaciones de agropiro alargado (Pobla: P3, P4, P5, P9) con 5 niveles de salinidad (riego con 0; 0,1; 0,2; 0,3 y 0,4 M NaCl) durante 40 días. Valores relativos: alto (línea continua), medio (línea discontinua), y bajo (línea punteada), mostrando la relación entre variables que mostraron diferencias interpoblacionales: tasa de senescencia foliar (TSF), tasa de elongación foliar (TEF), ancho y área foliar, número de macollos (Densidad), biomasa muerta y verde (BMuerta y BVerde), contenidos de proteína y prolina, y la biomasa aérea total.

En las poblaciones P4 y P5, la mayor tasa de elongación foliar (TEF) combinada con el menor ancho foliar (AnchoH) determinaron áreas foliares altas, y similares a P3, que presento el comportamiento opuesto (bajo TEF y alto AnchoH). Mientras que la mayor biomasa muerta (BMuerta) de P4 y P3, estuvo determinada por la mayor tasa de senescencia foliar (TSF) en P4 e intermedia en P3, asociada también a altos valores de área foliar (AreaH) y, en el caso de P3 junto con un mayor peso de la hoja (menor AFE). Estas dos últimas variables también fueron determinantes de la mayor biomasa verde (BVerde), siendo especialmente importante en P3 el AFE. La población P5 destacó en densidad de macollos y en la concentración de proteína foliar, aunque no alcanzó altos niveles de biomasa verde y total. La prolina fue mayor en P4 y P9, resultando similar al ensayo anterior, reiterando la respuesta de las poblaciones de hábitat salinos como las de mayor prolina.

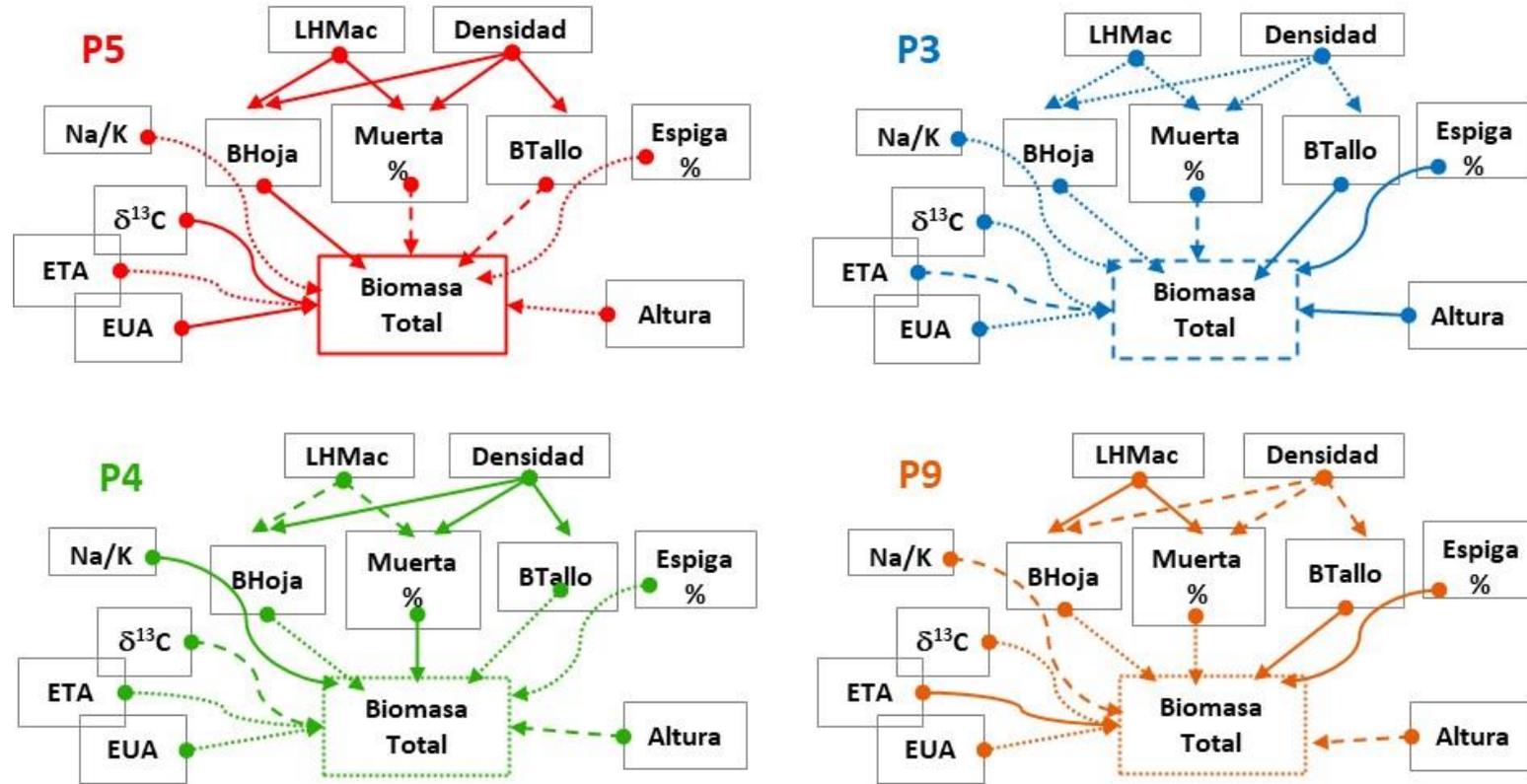
La mayor biomasa total (BTotal) se obtuvo en P3 y P4, poblaciones que también presentaron la mayor biomasa muerta (BMuerta), este comportamiento podría ser explicado por una senescencia foliar anticipada debido a la acumulación de iones tóxicos en las hojas adultas, y desde donde se habría producido la removilización de nutrientes a hojas más jóvenes en crecimiento, donde probablemente la prolina jugaría un papel importante observado a través de los mayores valores de P4, aunque no fueron observados en P3 (Figura 6).

En la tercera experiencia se compararon poblaciones de agropiro alargado (P3, P4, P5, P9) bajo 5 niveles de salinidad (riego con 0; 0,1; 0,2; 0,3 y 0,4 M NaCl) durante 85 días, encontrando diferencias significativas entre poblaciones en las variables estructurales, como la longitud foliar por macollo (LHMac) y el número de macollos (Densidad), en las variables relacionadas con el estado hídrico de la planta, como la evapotranspiración acumulada (ETA), la eficiencia en el uso del agua (EUA), y asociada a estas últimas el isótopo estable de C ( $\delta^{13}\text{C}$ ). Además de encontrar diferencias en la concentración de cloro foliar ( $\text{Cl}^-$ ) (Figura 7). La mayor producción de biomasa aérea fue alcanzada por P5, que presentó una alta densidad de macollos con hojas de longitud intermedias (LHMac), una baja evapotranspiración acumulada (ETA) y una mayor eficiencia en el uso del agua (EUA), relacionado con un bajo isótopo de carbono  $\delta^{13}\text{C}$ , sumado a la menor concentración de cloro foliar, lo que determinaría un mejor funcionamiento metabólico comparado con las restantes poblaciones.



**Figura 7:** Síntesis del ensayo de estrés salino comparando cuatro poblaciones de agropiro alargado (Pobla: P3, P4, P5, P9) con 5 niveles de salinidad (riego con 0, 0,1, 0,2, 0,3 y 0,4 M NaCl) durante 85 días. Valores relativos: alto (línea continua), medio (línea discontinua), y bajo (línea punteada), mostrando la relación entre variables que mostraron diferencias interpoblacionales: longitud foliar por macollo (LHMac), número de macollos (Densidad), evapotranspiración acumulada (ETA), eficiencia en el uso del agua (EUA), concentración de cloro foliar ( $\text{Cl}^-$ ), isótopo estable de C ( $\delta^{13}\text{C}$ ) y la biomasa aérea total.

En la cuarta experiencia, en la que se comparó el comportamiento de las poblaciones (P3, P4, P5, P9) con el estrés hídrico y salino combinado durante 85 días, fueron encontradas diferencias significativas entre poblaciones en las variables estructurales, longitud foliar por macollo (LHMac) y número de macollos (Densidad), en las variables relacionadas con el estado hídrico de la planta como la evapotranspiración acumulada (ETA), la eficiencia en el uso del agua (EUA), y asociada a estas el isótopo estable de C ( $\delta^{13}\text{C}$ ), además de detectar diferencias en la relación  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , las que en conjunto determinaron diferencias en las variables productivas y sus fracciones (Figura 8).



**Figura 8:** Síntesis del ensayo de estrés hídrico y salino combinado, comparando poblaciones de agropiro alargado (Pobla: P3, P4, P5, P9) con 3 niveles de estrés hídrico (30, 50 y 100% de apacidad de campo de las macetas) y 3 niveles de estrés salino (riego con 0; 0,1; 0,3 M NaCl) durante 85 días. Valores relativos: alto (línea continua), medio (línea discontinua), y bajo (línea punteada), con la relación entre variables que mostraron diferencias interpoblacionales: densidad de macollos, longitud de hojas por macollos (LHMMac), biomasa de hojas verdes (BHoja), biomasa de tallos verdes (BTallo), porcentaje de biomasa muerta (Muerto%), altura de la planta, evapotranspiración acumulada (ETA), eficiencia en el uso del agua (EUA), proporción de macollos con espigas (Espiga%), isótopos de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta^{13}\text{C}$ ), y la biomasa aérea total.

La mayor biomasa total fue producida por la población P5, presentando los mayores valores de longitud foliar y densidad de macollos que determinaron las mayores biomásas foliares verdes y, en consecuencia, la mayor superficie fotosintética. Además, P5 mostró la menor ETA con una alta EUA, la cual estuvo relacionada con menores valores de isótopos de carbono  $\delta^{13}\text{C}$ , y de la relación  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , lo que podría ser explicado por un mejor funcionamiento fotosintético comparado con otras poblaciones. La P4 también mostro una baja ETA, sin embargo, fue acompañada por altos valores de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , lo que podría determinar la mayor senescencia de las hojas adultas (mayor proporción de tejido muerto, Muerto%), posiblemente como una estrategia para minimizar las pérdidas de agua y acumular iones tóxicos, pero a costa de la reducción del área fotosintética. Por esto, P4 habría mostrado una baja cantidad de biomasa foliar verde y una baja EUA, redundando en una menor biomasa total.

Por otro lado, la estrategia de las poblaciones para sobrevivir al estrés pareciera ser diferente y podría estar asociada con el hábitat de origen del germoplasma. Las poblaciones P3 y P9, que provenían de hábitat de climas templados con mayores precipitaciones y menor estrés ambiental, presentaron un mayor desarrollo reproductivo, con plantas de mayor altura debido al desarrollo de espigas y, en consecuencia, más biomasa de tallos (mayor BTallo, Espiga% y Altura), posiblemente para propagarse a través de semillas en vez de mantenerse en estado vegetativo frente al estrés. Esta última parece ser la estrategia de P5 y P4, que muestran altas densidad de macollos con hojas largas a intermedias, y que provenían de hábitat con clima semiárido y escasas precipitaciones.

## **CONCLUSIONES DEL ESTUDIO COMPARATIVO**

En base a los modelos obtenidos para predecir la biomasa aérea, podríamos decir que, en poblaciones de agropiro alargado evaluadas ante estrés hídrico y salino, la respuesta de la planta se vio más alterada debido a la duración del estrés que al tipo de estrés. Las variables estructurales del canopy como el tamaño y número de hojas y/o macollos, sumado a variables relacionadas con el estado hídrico de la planta (ETA y CHR) fueron las más importantes en limitar el crecimiento ante estreses con duración de 1 mes, sean hídricos o salinos; mientras que si el estrés se prolongaba 3 meses aparecieron como más importantes las variables relacionadas con la concentración de prolina y la fotosíntesis en la última hoja desarrollada.

Considerando las diferencias entre poblaciones sometidas a los distintos tipos de estrés concluimos que hay diferentes estrategias de crecimiento y diferentes mecanismos fisiológicos entre poblaciones, que se ponen en evidencia especialmente con la duración del estrés. De hecho, si bien es destacable la importancia de las diferencias entre variables morfogénicas y de estructura del canopy, estas varían con la duración del estrés entre poblaciones, siendo la densidad de macollos la más estable en todas las experiencias. La eficiencia de uso del agua también fue muy importante en todas las situaciones de estrés donde fue registrada (EH\_35d, ES\_85d, EHxES\_90d), presentando una alta asociación con la biomasa producida. En forma similar a lo que se encontró en el isótopo de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta^{13}\text{C}$ ), que además de presentar una alta heredabilidad, mostró una fuerte correlación con la producción de biomasa en los ensayos de mayor duración (ES\_85d, EHxES\_90d). Por otro lado, los contenidos de prolina y proteínas fueron importantes para diferenciar germoplasma en los experimentos de estrés de menor

duración (EH\_35d, ES\_40d). Mientras que, a mayor duración, además de las variables asociadas a la eficiencia del uso del agua en la planta (EUA y  $\delta^{13}\text{C}$ ), cobraron mayor importancia las variables relacionadas con la concentración de iones “tóxicos” como la concentración de  $\text{Cl}^-$  (aunque presentó diferencias intrapoblacionales en ES\_85d, y no en EHxES\_90d) o la relación  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (que sólo fue estimada para EHxES\_90d, pero presentó una heredabilidad interesante de considerar). Todos los caracteres mencionados fueron útiles para identificar las poblaciones con mayor producción de biomasa, es decir, más tolerante al estrés hídrico y salino.

Finalmente, futuros estudios en el germoplasma de agropiro alargado deberían continuarse integrando las técnicas “ómicas” (genómica, transcriptómica, proteómica, metabolómica y/o fenómica) con el objetivo de identificar los genes/alelos y/o QTL involucrados en los mecanismos fisiológicos que determinan la tolerancia al estrés hídrico y salino, lo cual permitiría avanzar más rápida y eficientemente en el mejoramiento forrajero, además de disponer de la información necesaria para ceder genes de tolerancia a otras especies emparentadas, como trigo.

*“Estudio ecofisiológico de poblaciones de Elymus spp., en respuesta al estrés hídrico y salino.”*



## **CONCLUSIONES GENERALES**

*“Estudio ecofisiológico de poblaciones de Elymus spp., en respuesta al estrés hídrico y salino.”*

## CONCLUSIONES GENERALES

1 - En las poblaciones de *Elymus elongatus* subsp. *ponticus* (Podp.) Melderis. analizadas fueron encontrados diferentes comportamientos en los caracteres morfológicos, fisiológicos, bioquímicos e isotópicos, que determinaron distintas estrategias de crecimiento y/o mecanismos fisiológicos entre poblaciones para tolerar el estrés hídrico y salino, donde prima especialmente la duración del estrés. Estas diferencias pudieron asociarse con el origen ambiental de las poblaciones en algunos caracteres.

2 - El comportamiento morfo-fisiológico de poblaciones de creciendo con tres niveles de estrés hídrico durante 35 días, mostró diferencias interpoblacionales en la biomasa producida según el nivel de estrés, siendo los caracteres que más influyen en la diferencia de su respuesta la estructura del canopeo, como tamaño foliar y densidad de los macollos, pero especialmente la eficiencia del uso del agua, y los contenidos de prolina y proteínas.

3 - La respuesta interpoblacional de agropiro alargado fue diferente según la duración del estrés salino. Mientras que en el experimento de 1 mes de duración se registró diferencias especialmente en el área y la senescencia foliar, y en los contenidos de prolina y proteína; en el experimento de estrés salino de 3 meses de duración los caracteres más importantes están relacionados con la densidad de macollos, pero fundamentalmente con la eficiencia de uso del agua asociada con el isótopo de carbono  $\delta^{13}\text{C}$ , sumado a la concentración de  $\text{Cl}^-$  foliar, lo que estaría afectando al funcionamiento metabólico.

4 - La mayor tolerancia al estrés asociada con la mayor biomasa total en condiciones de sequía y salinidad en germoplasma de agropiro alargado durante 90 días, se registró a través de una alta densidad de macollos como estrategia de crecimiento, teniendo en cuenta, entre los mecanismos fisiológicos, la alta eficiencia del uso del agua asociada con un bajo valor de isótopo de carbono  $\delta^{13}\text{C}$  y una menor relación  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . Estos últimos dos caracteres, simples de registrar, podrían ser especialmente útiles a la hora de seleccionar materiales tolerantes al estrés hídrico y/o salino de larga duración (3 meses).

5 - Teniendo en cuenta los resultados de esta Tesis Doctoral, se ha podido comprobar que agropiro alargado posee una gran tolerancia al estrés hídrico y salino, la cual se basa en mecanismo de ajuste osmótico donde actúan con funciones de osmorregulación solutos inorgánicos como el  $\text{K}^+$ , especialmente en situación de estrés por sequía, y  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  ante estrés salino particularmente, a los que se suman solutos orgánicos como prolina con funciones de osmorregulación y osmoprotección en ambos estreses. Todos estos mecanismos fisiológicos ayudan a mantener la fotosíntesis y el balance de agua en la planta, determinado por una alta eficiencia en el uso del agua, favoreciendo el crecimiento y la producción de forraje a expensas de limitar el desarrollo reproductivo ante estreses muy severos. Estos mecanismos fisiológicos y estrategias de crecimiento están presentes en la especie para adaptarse al estrés hídrico y salino. Sin embargo, para poder realizar una selección intraespecífica, el carácter más consistente para diferenciar el germoplasma superior fue la eficiencia del uso del agua, el cual podría registrarse a través del isótopo de  $\delta^{13}\text{C}$ , dada su alta heredabilidad, pudiendo considerarse también la relación  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . A estas características fisiológicas debemos sumar las

variables estructurales del canopeo, relacionadas con el fenotipo adecuado al sistema productivo en que será utilizado. En conclusión, consideramos que el germoplasma de agropiro alargado posee una gran diversidad y tolerancia al estrés hídrico y salino, la cual puede ser utilizada para expandir la producción de cultivos según su uso en diferentes ambientes ante el cambio climático imperante.

## **BIBLIOGRAFÍA**

*“Estudio ecofisiológico de poblaciones de Elymus spp., en respuesta al estrés hídrico y salino.”*

## BIBLIOGRAFÍA

- Acosta- 2017 Plant responses to salt stress: Adaptive mechanisms. *Agronomy* 7, 18. <https://doi.org/10.3390/agronomy7010018>.
- Agnusdei M.G., Marino M.A. y Errecart P. 2015. Buenas prácticas de manejo de pasturas. En: Pasturas. Claves para Producir más y mejor. Ed. Unidad integrada Balcarce FCA/UNMDP-EEA Balcarce/INTA, pp. 39-55.
- Alonso S.I., Borrajo C.I., Strada R., Rivarola J. y Suárez J.C. 1997. Variabilidad y efecto genético-ambiental en poblaciones de agropiro alargado. 1º Congreso Binacional de Producción Animal, Rev. Arg. Prod. Anim. 17 (sup.1): 169-170.
- Alonso S.I., Fernández J., Borrajo C.I., Echeverría H. 2000. Cambios en la producción y calidad del forraje otoño-invernal por el agregado de nitrógeno en materiales de agropiro. *Ciencias del Suelo* 18(2): 115-124.
- Alonso S.I. y Borrajo C.I. 2007. Colecta y evaluación inicial de poblaciones de Agropiro alargado naturalizadas en la región pampeana Argentina. En: Avances de investigaciones en recursos genéticos en el Cono Sur. Eds: Clausen A., Condón F., Berretta A. (pp. 9–22) Procisur: Montevideo, Uruguay, 2007; Volume 2.
- Álvarez ME, Savouré A, Szabados L. 2022. Proline metabolism as regulatory hub. *Trends Plant Sci.* 2022 Jan;27(1):39-55. doi: 10.1016/j.tplants.2021.07.009. Epub 2021 Aug 5. PMID: 34366236.
- Araus J.L., Cabrera-Bosquet L., Serret M.D., Bort J., Nieto-Taladriz M.T. 2013. Comparative performance of  $\delta^{13}C$ ,  $\delta^{18}O$  and  $\delta^{15}N$  for phenotyping durum wheat adaptation to a dryland environment. *Funct. Plant Biol.* 40, 595–608. <https://doi.org/10.1071/FP12254>.
- Arterburn M., Kleinhofs A., Murray T, Jones S. 2011. Polymorphic nuclear gene sequences indicate a novel genome donor in the polyploid genus *Thinopyrum*. *Hereditas* 148(1):8-27. doi: 10.1111/j.1601-5223.2010.02084.x.
- Bai Y. and Cotrufo, M.F. 2022 Grassland soil carbon sequestration: Current understanding, challenges, and solutions. *Science*, 377: 603 – 608. DOI: 10.1126/science.abo2380
- BAL 2018. Banco de Germoplasma Activo de la Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, perteneciente al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de la República Argentina; [consultado el 1 de marzo de 2018]. Disponible en: <https://inta.gob.ar/documentos/banco-activo-de-germoplasma-de-la-eea-balcarce>.
- Barkworth M.E. and Dewey D.R. 1985 Genomically based genera in the perennial Triticeae of North America: identification and membership. *Amer. J. Bot.* 72(5): 767-776. [doi.org/10.1002/j.1537-2197.1985.tb08337.x](https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1985.tb08337.x)
- Bélangier G., Gastal F., Warembourg F.R. 1992. The effects of nitrogen fertilization and the growing season on carbon partitioning in a sward of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb) *Annals of Botany* 70: 239-244
- Bennett S.J., Barrett-Lennard E.G., Colmer T.D. 2009. Salinity and waterlogging as constraints to saltland pasture production: a review. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 129, 349–360. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2008.10.013>

- Bhaskara G.B., Yang T-H. and Verslues P.E. 2015. Dynamic proline metabolism: importance and regulation in water limited environments. *Front. Plant Sci.* 6:484. doi: 10.3389/fpls.2015.00484
- Bhuiyan M.S.I., Raman A., Hodgkins D., Mitchell D. and Nicol, H.I. 2017. Influence of high levels of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> on ion concentration, growth, and photosynthetic performance of three salt-tolerant plants. *Flora* 228, 1-9. doi: 10.1016/j.flora.2016.12.010
- Bhuiyan M.S.I., Raman A., Hodgkins D.S., Mitchell D., Nicol H.I. 2015. Physiological response and ion accumulation in two grasses one legume, and one saltbush under soil water and salinity stress. *Ecohydrology* 8, 1547–1559. <http://doi.org/10.1002/eco.1603>.
- Billah M., Aktar S., Brestic M., Zivcak M., Khaldun A.B.M., Uddin M.S., Bagum S.A., Yang X., Skalicky M., Mehari T.G., Maitra S., Hossain A. 2021. Progressive genomic approaches to explore drought- and salt-induced oxidative stress responses in plants under changing climate. *Plants* 10, 1910. <https://doi.org/10.3390/plants10091910>
- Bleby T.M., Aucote M., Kennett-Smith A.K., Walker G.R., Schachtman D.P. 1997. Seasonal water use characteristics of tall wheatgrass [*Agropyron elongatum* (Host) Beauv.] in a saline environment. *Plant, Cell & Environment* 20, 1361-1371.
- Borrajo C.I. y Alonso S.I. 2001. Caracterización de materiales de agropiro alargado en estado reproductivo. XXVIII Jornadas Argentinas de Botánica, Sociedad Argentina de Botánica. Actas 36 (I) pp. 129.
- Borrajo C.I. y Alonso S.I. 2002. Producción de forraje de materiales de agropiro alargado en diferentes ambientes. *Rev. Arg. Prod. Animal*, 22 (sup.1): 182-183.
- Borrajo C.I., Alonso S., Echeverría H. 2001. Materiales genéticos de agropiro: producción y calidad del forraje acumulado de primavera. *Rev. Arg. Prod. Animal* 21(3-4): 159-170.
- Borrajo C.I., Alonso S., Mazzanti A. y Monterubbianesi G. 1998 Caracterización de poblaciones naturalizadas de agropiro. 2. Macollaje y caracteres reproductivos. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 18(3-4): 183-192.
- Borrajo C.I., Alonso S.I. y Monterubbianesi G. 1997 Caracterización de poblaciones naturalizadas de agropiro. 1. Porte, color y altura. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 17(4): 395-403.
- Borrajo C.I. 1999. Evaluación de poblaciones y materiales genéticos de agropiro alargado: Grado de determinación Genética. Trabajo final en Genética Cuantitativa, Posgrado Master's Universidad Nacional de Mar del Plata, Balcarce, Argentina 15p.
- Borrajo, C.I. 1998. Generación y expansión de los órganos foliares de agropiro alargado en función del material genético y la disponibilidad de nitrógeno. Master's Thesis, Universidad Nacional de Mar del Plata, Balcarce, Argentina pág. 75.
- Borrajo C.I. y Alonso S.I. 2014a. Tasa de elongación foliar en materiales de agropiro alargado: efecto de la fenología y el agregado de nitrógeno. *Rev. Arg. Prod. Animal*, 34 (sup.1): 132.
- Borrajo C.I. y Alonso S.I. 2014b. Vida foliar y número de hojas por macollo en materiales de agropiro: efecto de la fenología, temperatura y nitrógeno. *Rev. Arg. Prod. Animal*, 34 (sup.1): 133.
- Borrajo C.I. y Alonso S.I. 2015. Tasa de aparición de hojas y macollos en *Thinopyrum ponticum*, efecto del ambiente y el material genético. *Arg. Prod. Animal*, 35 (sup.1): 184.
- Borrajo C.I. y Alonso S.I. 2004. Germinación, emergencia e implantación de variedades experimentales de agropiro alargado. *Rev. Arg. Prod. Animal*, 24: 29-40.



- Bray E.A. 1997. Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci.* 2: 48-54.  
[http://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)82562-9](http://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)82562-9)
- Cardoso M.L., Alonso S.I., Clausen A.M. y Castaño J. 2007. Dormición y germinación de semillas de agropiro alargado recientemente cosechadas. *Rev. Arg. Prod. Animal* 27 (3): 159-167.
- Carillo P.; Mastrodonato G.; Nacca F.; Parisi D.; Verlotta A.; Fuggi A. 2008. Nitrogen metabolism in durum wheat under salinity: Accumulation of proline and glycine betaine. *Funct. Plant Biol.* 35, 412–426. <https://doi.org/10.1071/FP08108>
- Carrizo I.M., López Colomba E., Tommasino E., Carloni E., Bollati G., Grunberg K. 2021. Contrasting adaptive responses to cope with drought stress and recovery in *Cenchrus ciliaris* L. and their implications for tissue lignification. *Physiologia Plantarum.* 172: 762– 779. <https://doi.org/10.1111/ppl.13274>
- Casas R.R. 2018. Fitorremediación de suelos salinos. En: Biorremediación de los recursos naturales. Eds. Brutti L.N., Beltran M.J., de Salamone I.G. Ediciones INTA, Buenos Aires, pp. 458-466. ISBN 978-987-521-911-3
- Ceoloni C, Kuzmanović L, Gennaro A, Forte P, Giorgi D, Grossi MR, Bitti A. 2014. Genomes, chromosomes and genes of perennial Triticeae of the genus *Thinopyrum*: the value of their transfer into wheat for gains in cytogenomic knowledge and ‘precision’ breeding. En: *Advances in genomics of plant genetic resources*. Eds. Tuberosa R, Graner A, Frison E. Springer, Dordrech, pp 333–358
- Ceoloni C., Kuzmanović L., Ruggeri R., Rossini F., Forte P., Cuccurullo A., Bitti A. 2017. Harnessing genetic diversity of wild gene pools to enhance wheat crop production and sustainability: Challenges and opportunities. *Diversity* 9, 55.  
<https://doi.org/10.3390/d9040055>.
- Chapman, D.F. 2016. Using ecophysiology to improve farm efficiency: application in temperate dairy grazing systems. *Agriculture* 6, 17. <https://doi.org/10.3390/agriculture6020017>
- Chapman D.F. and Lemaire G. 1993. Morphogenic and structural determinants of plant growth after defoliation. En: *Proceedings of the XVII International Grassland Congress*. Eds. Baker M.J., Crush J.R. and Humphreys L.R. Palmerston North, New Zealand. pp. 95-104.
- Chaves M.M., Flexas J., Pinheiro, C. 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: Regulation mechanisms from whole plant to cell. *Ann. Bot.* 103, 551–560.  
<https://doi.org/10.1093/aob/mcn125>.
- Chaves M.M. y Pereira J.S. 2004. Respuestas de las plantas al estrés múltiple y la habilidad de enfrentarse a un ambiente cambiante. En: *La ecofisiología vegetal, una ciencia de síntesis*. Eds. Reigosa Roger M.J., Pedrol Bonjoch N., Sánchez Moreiras A. Paranimfo, S.A., Madrid, España 59-112
- Ciria C.S., Barro R., Sanz M., Ciria P. 2020. Long-term yield and quality performance of perennial energy grasses (*Agropyron* spp.) on marginal land. *Agronomy* 10, 1051.  
<https://doi.org/10.3390/agronomy10071051>.
- Cobertera E. 1993. Edafología aplicada: suelos, producción agraria, planificación territorial e impactos ambientales. Cátedra D.L. Madrid, España pp. 327.
- Colmer T.D., Flowers T.J., Munns R. 2006. Use of wild relatives to improve salt tolerance in wheat. *J. Exp. Bot.* 57, 1059–1078. <http://doi.org/10.1093/jxb/erj124>.

- Condon A.G., Richards R.A. 1992. Broad sense heritability and genotype x environment interaction for carbon isotope discrimination in field-grown wheat. *Aust. J. Agric. Res.*, 43, 921–934.
- Condon A.G., Richards R.A., Rebetzke G.J., Farquhar G.D. 2004. Breeding for high water-use efficiency, *J. Exp. Bot.* 55, 2447–2460. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh277>.
- Covas G. 1985. El género *Elytrigia* (= *Agropyron* s. lat.) en La Pampa. *Apuntes para la Flora de La Pampa*. INTA Anguil. pp. 398-404.
- Csete S., Stranczinger S., Szalontai B., Farkas A., Pal R. 2011. Tall wheatgrass cultivar Szarvasi-1 (*Elymus elongatus* subsp. *ponticus* cv. Szarvasi-1) as a potential energy crop for semi-arid lands of eastern Europe. En: *Sustainable growth and applications in renewable energy sources*. Ed. Nayeripour M. Pub InTech, Hungary, pp 269–294
- Cyriac D., Hofmann R.W., Stewart A., Sathish P., Winefield C.S., Moot D.J. 2018 Intraspecific differences in long-term drought tolerance in perennial ryegrass. *PLoS ONE*; 13(4): e0194977. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194977>
- Darbyshire S.J. 1997. Tall wheatgrass, *Elymus elongatus* subsp. *ponticus*, in Nova Scotia. *Rhodora* 99 (898): 161–165.
- Díaz F.J. and Grattan S.R. 2009. Performance of tall wheatgrass (*Thinopyrum ponticum*, cv. ‘Jose’) irrigated with saline-high boron drainage water: Implications on ruminant mineral nutrition. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 131: 128-136. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2009.01.003>.
- Díaz M.L., Echenique C.V., Schrauf G., Cardone S., Lutz E.E., Spangenberg G. 2004. Biotecnología y mejoramiento genético de especies forrajeras. *RIA* 33(3):77–104
- Durand J.L., Gastal F., Etchebest S., Bonnet A.C., Ghesquière M. 1997. Interspecific variability of plant water status and leaf morphogenesis in temperate forage grasses under summer water deficit. *Europ J Agron.* 7: 99-107. [https://doi.org/10.1016/S1161-0301\(97\)00021-X](https://doi.org/10.1016/S1161-0301(97)00021-X)
- Errecart P.M., Marino M.A., Agnusdei M.G., Lattanzi F.A., Durand J-L. 2020. The intensity of water stress dictates whether the N status of temperate-type perennial grass swards is affected by drought, *Field Crops Research*, 10.1016/j.fcr.2020.107928, 257, (107928).
- Falasca S.L., Miranda C., Alvarez S.P. 2017. Agro-ecological zoning for tall wheatgrass (*Thinopyrum ponticum*) as a potential energy and forage crop in salt-affected and dry lands of Argentina. *Arch. Crop Sci.* 1, 10–19. <http://doi.org/10.36959/718/597>.
- FAO 2009. The state of food and agriculture 2009. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. 180 pág. <http://www.fao.org/docrep/012/i0680e/i0680e.pdf>
- Farquhar, G.D.; Ehleringer, J.R.; Hubick, K.T. 1989. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 40, 503–537.
- Fernandez, J.A. 2000. Relación entre la calidad del forraje y las características fenológicas, morfológicas y anatómicas en materiales genéticos de agropiro alargado Master’s Thesis, Universidad Nacional de Mar del Plata, Balcarce, Argentina pág. 91p.
- Flexas J., Niinemets U., Gallé A., Barbour M.M., Centritto M., Diaz-Espejo A., Douthe C., Galmés J., Ribas-Carbo M., Rodriguez .P.L., Rosselló F., Soolanayakanahally R., Tomas M., Wright I.J., Farquhar G.D., Medrano H. 2013. Diffusional conductances to CO<sub>2</sub> as a target for increasing photosynthesis and photosynthetic water-use efficiency. *Photosynth Res.* 117(1-3): 45-59. doi: 10.1007/s11120-013-9844-z

- Flowers T.J. and Colmer T.D. 2008. Salinity tolerance in halophytes. *New Phytologist*, 179: 945-963. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02531.x>
- Flowers T.J. y Colmer T.D. 2015. Plant salt tolerance: adaptations in halophytes *Annals of Botany* 115: 327–331. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu267>
- Frimpong F., Windt C.W., van Dusschoten D., Naz A.A., Frei M. and Fiorani F. 2021. A wild allele of pyrroline-5-carboxylate synthase1 leads to proline accumulation in spikes and leaves of barley contributing to improved performance under reduced water availability. *Front. Plant Sci.* 12:633448. doi: 10.3389/fpls.2021.633448
- Gastal F., Bélanger G., Lemaire G. 1992. A model of the leaf extension rate of tall fescue in response to nitrogen and temperature. *Annals of Botany* 70: 437-442.
- Gastal F. and Lemaire G. 2015. Defoliation, shoot plasticity, sward structure and herbage utilization in pasture: review of the underlying ecophysiological processes. *Agriculture* 5: 1146-1171. <https://doi.org/10.3390/agriculture5041146>
- Gazanchian A., Hajheidari M., Sima N.K., Salekdeh G.H. 2007. Proteome response of *Elymus elongatum* to severe water stress and recovery. *J. Exp. Bot.* 58, 291–300. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl226>.
- Geilfus C.M. 2018. Chloride: from nutrient to toxicant. *Plant Cell Physiol.* 59, 877–886. doi: 10.1093/pcp/pcy071
- Ghafar M.A., Akram N.A., Saleem M.H., Wang J., Wijaya L., Alyemini M.N. 2021. Ecotypic morphological and physio-biochemical responses of two differentially adapted forage grasses, *Cenchrus ciliaris* L. and *Cyperus arenarius* Retz. to drought stress. *Sustainability* 13, 8069. <https://doi.org/10.3390/su13148069>
- Godde C.M., Mason-D'Croz, D., Mayberry, D.E., Thornton, P.K., Herrero, M. 2021. Impacts of climate change on the livestock food supply chain; a review of the evidence. *Global Food Security*, 28, art. no. 100488. // *Glob Food Sec.* 2021 Mar;28:100488. doi: 10.1016/j.gfs.2020.100488
- Gonzalez-Dugo V., Durand J.L., Gastal F. 2010. Water deficit and nitrogen nutrition of crops. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 30: 529–544. <https://doi.org/10.1051/agro/2009059>.
- Guo Q., Meng L., Mao P.C., Tian X.X. 2015. Salt tolerance in two tall wheatgrass species is associated with selective capacity for K<sup>+</sup> over Na<sup>+</sup>. *Acta Physiol. Plant.* 37:, 1708. <http://doi.org/10.1007/s11738-014-1708-4>.
- Harlan J.R. 1983. The scope for collection and improvement of forages plants. En: *Genetic Resources of forage plants*. Eds. Mc Ivor J. G. and Bray R.A. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, East Melbourne, CSIRO Australia pp. 3-14
- Hasanuzzaman M., Bhuyan M.H.M.B., Nahar K., Hossain M.S., Mahmud J.A., Hossen M.S., Masud A.A.C., Moumita, Fujita M. 2018. Potassium: a vital regulator of plant responses and tolerance to abiotic stresses. *Agronomy* 8, 31 <https://doi.org/10.3390/agronomy8030031>.
- Hasegawa P.M. 2013. Sodium (Na<sup>+</sup>) homeostasis and salt tolerance of plants. *Environmental and Experimental Botany* 92: 19-31 <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.03.001>
- Hessini K., Martínez J.P., Gandour M., Albouchi A., Soltani A., Abdelly C. 2009 Effect of water stress on growth, osmotic adjustment, cell wall elasticity and water-use efficiency in *Spartina alterniflora*. *Environ Exp Bot.* 67: 312-319. <http://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.06.010>

- Borrajo, C.I. y Alonso, S.I. 2002. Producción de forraje de materiales de agropiro alargado en diferentes ambientes. Rev. Arg. Prod. Animal, 22 (1): 182-183.
- INTA 1996. Atlas de suelos de la República Argentina. SAGyP-INTA. Proyecto PNUD Argentina 85/019. Cartografía digital. Instituto de Suelos-CIRN. Castelar, Buenos Aires
- IPCC 2013: Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change Eds. Stocker T.F., Qin D., Plattner G.-K., Tignor M., Allen S.K., Boschung J., Nauels A., Xia Y., Bex V. and Midgley P.M. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 1535p.
- IPCC 2019. Climate Change and Land. An IPCC Special Report on climate change, desertification, land degradation, sustainable land management, food security, and greenhouse gas fluxes in terrestrial ecosystems. Eds. Shukla P.R., Skea J., Calvo Buendia E., Masson -Delmotte V., Pörtner H.- O., Roberts D.C., Zhai P., Slade R., Connors S., van Diemen R., Ferrat M., Haughey E., Luz S., Neogi S., Pathak M., Petzold J., Portugal Pereira J., Vyas P., Huntley E., Kissick K., Belkacemi M., Malley J. In press. 40p.
- ISTA 1999. International rules for seed testing. International Seed Testing Association (Ed.). Seed Science and Technology. Zürich, Switzerland
- Johnson, R.C., and L. M. Bassett. 1991. Carbon isotope discrimination and water use efficiency in four cool-season grasses. Crop Sci. 31, 157-162.
- Klimushina, M.V., Kroupi, P.Y., Bazheno, M.S., Karlo, G.I., Divashu M.G. 2020. Waxy gene-orthologs in wheat × *Thinopyrum* amphidiploids. Agronomy 10, 963. <https://doi.org/10.3390/agronomy10070963>
- Kopecký M., Mráz P., Kolář L., Váchalová R., Bernas J., Konvalina P., Perná K., Murindangabo Y., Menšík L. 2021. Effect of fertilization on the energy profit of tall wheatgrass and reed canary grass. Agronomy. 2021; 11(3):445. <https://doi.org/10.3390/agronomy11030445>
- Kuraz B., Tesfaye M., Mekonnen S. 2021. Climate change impacts on animal production and contribution of animal production sector to global climate change: A Review. Agricultural Science Digest, 41 (4) D-344, pp. 523-530. DOI: 10.18805/ag.D-344
- Lambers H., Chapin III F.S. and Pons T.L. 1998. Plant Physiological Ecology. Springer-Verlag, New York. 533p
- Lamsfus C, Lasa N., Aparicio Tejo P.M. e Irigoyen I. 2004; Implicaciones ecofisiológicas y agronómicas de la nutrición nitrogenada. Eds. Reigosa Roger M.J., Pedrol Bonjoch N., Sánchez Moreiras A. Paraninfo, S.A., Madrid, España 361-386.
- Levitt J. 1980. Responses of plant to environmental stress. Vol. 2 Water, Radiation, Salt and Other Stresses. Academic Press, New York, 365 p.
- Li D. and Zhang X. 2002. Physical localization of the 18S-5·8S-26S rDNA and sequence analysis of ITS regions in *Thinopyrum ponticum* (Poaceae: Triticeae): Implications for concerted eEvolution. Annals of Botany 90 (4): 445–452 <https://doi.org/10.1093/aob/mcf213>
- Li W., Wang X. 2009. *Thinopyrum ponticum* and *T. intermedium*: the promising source of resistance to fungal and viral diseases of wheat. J Genet Genom 36:557–565
- Lichtenthaler H.K., 2004. El estrés y la medida del estrés en plantas. En: La ecofisiología vegetal, una ciencia de síntesis. Eds. Reigosa Roger M.J., Pedrol Bonjoch N., Sánchez Moreiras A. Paraninfo, S.A., Madrid, España 59-112

- Ludwiczak, A.; Osiak, M.; Cárdenas-Pérez, S.; Lubińska-Mielińska, S.; Piernik, A. 2021. Osmotic Stress or Ionic Composition: Which Affects the Early Growth of Crop Species More?. *Agronomy* 2021, 11, 435. <https://doi.org/10.3390/agronomy11030435>
- Ma W.T.; Tcherkez G.; Wang X.M.; Schäufele R.; Schnyder H.; Yang Y.; Gong X.Y. 2021. Accounting for mesophyll conductance substantially improves 13C-based estimates of intrinsic water-use efficiency. *New Phytologist*, 229(3), 1326– 1338. <https://doi.org/10.1111/nph.16958>
- Mansour M. 2000. Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. *Biol. Plant.* 43, 491–500. <https://doi.org/10.1023/A:1002873531707>.
- Mass E.V. 1986. Salt tolerance of plants. *Appl. Agric. Res.* 1, 12–26.
- Mateo M.A., Ferrio J.P., Araus J.L. 2004 Isótopos estables en fisiología vegetal. En: La ecofisiología vegetal, una ciencia de síntesis. Eds. Reigosa Roger M.J., Pedrol Bonjoch N., Sánchez Moreiras A. Paranimfo, S.A., Madrid, España 113-160.
- Mazzanti A., Castaño J., Sevilla G.H., Orbea J.R. 1992. Agropiro Alargado. En: Características agronómicas de especies y cultivares de gramíneas y leguminosas forrajeras adaptadas al sudeste de la provincia de Buenos Aires. Manual de Descripción, pp. 32-33. Centro Regional Buenos Aires Sur, Instituto Nacional Tecnología Agropecuaria, Argentina.
- McGuire P.E.; Dvoák J. 1981. High salt-tolerance potential in wheatgrass. *Crop Sci.* 21, 702–705. <http://doi.org/10.2135/cropsci1981.0011183X002100050018x>.
- Medrano H. y Flexas J. 2004. Respuestas de las plantas al estrés hídrico. En: La ecofisiología vegetal, una ciencia de síntesis. Eds. Reigosa Roger M.J., Pedrol Bonjoch N., Sánchez Moreiras A. Paranimfo, S.A., Madrid, España 253-286.
- Melderis A. 1980. *Elymus L.* En: Flora Europea. V. Alismataceae to Orchidaceae (Monocotyledones). Eds. Tutin T.G., Heywood V.H., Burghes N.A., Moore D.M., Valentin D.H., Walters S.M. y Webb D.A. (Eds.), Cambridge University Press, Cambridge (UK), pp. 192–198.
- Morales F.; Ancín M.; Fakhet D.; González-Torrallba J.; Gámez A.L.; Seminario A.; Soba D.; Ben Mariem S.; Garriga M.; Aranjuelo I. 2020. Photosynthetic metabolism under stressful growth conditions as a bases for crop breeding and yield improvement. *Plants* 9, 88. <https://doi.org/10.3390/plants9010088>
- Munns R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.* 25, 239–250. <http://doi.org/10.1046/j.0016-8025.2001.00808.x>.
- Munns R. and Tester M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual review of plant biology*, 59: 651-681.
- Oliveira J.K.S.d.; Corrêa D.C.d.C.; Cunha A.M.Q.; Rêgo A.C.d.; Faturi C.; Silva W.L.d.; Domingues F.N. 2020. Effect of Nitrogen Fertilization on Production, Chemical Composition and Morphogenesis of Guinea Grass in the Humid Tropics. *Agronomy* 10, 1840. <https://doi.org/10.3390/agronomy10111840>
- Ondrasek G, Rengel Z, Maurović N, Kondres N, Filipović V, Savić R, Blagojević B, Tanaskovik V, Gergichevich CM, Romić D. 2021. Growth and Element Uptake by Salt-Sensitive Crops under Combined NaCl and Cd Stresses. *Plants (Basel)* Jun 12;10(6):1202. doi: 10.3390/plants10061202.
- Otondo J., Borrajo C.I., Bandera R. 2019. Forrajeras templadas y subtropicales en suelos afectados por sales de regiones húmedas y subhúmedas de la Argentina. En: Suelos

- afectados por sales con énfasis en la Argentina. Ed: Bandera R. (pp. 139–167)  
Orientación Gráfica: Buenos Aires, Argentina
- Peng Z., Wang M., Li F., Lv H., Li C., Xia G. 2009. A proteomic study of the response to salinity and drought stress in an introgression strain of bread wheat. *Mol. Cell. Proteom.* 8, 2676–2686. <http://doi.org/10.1074/mcp.M900052-MCP200>.
- Pfennig D.W., Wund M.A., Snell-Rood E.C., Cruickshank T., Schlichting C.D., Moczek A.P. 2010. Phenotypic plasticity's impacts on diversification and speciation. *Trends in Ecology & Evolution* 25: 459-467 <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.05.006>.
- Pistorale S.M., Abbott, L.A. y Andrés, A. 2008. Diversidad genética y heredabilidad en sentido amplio en agropiro alargado, *Thinopyrum ponticum*. *Ciencia e investigación agraria*, 35(3), 259-264. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-16202008000300003>
- Rasmussen S., Parsons A.J., Jones C.S. 2012. Metabolomics of forage plants: a review. *Annals of Botany*. 110(6):1281-1290. doi:10.1093/aob/mcs023.
- Rebetzke G.J., Condon A.G., Richards R.A., Farquhar G.D. 2002. Selection for reduced carbon-isotope discrimination increases aerial biomass and grain yield of rainfed bread wheat. *Crop Sci.* 42, 739–745. <https://doi.org/10.2135/cropsci2002.7390>.
- Redden R. New Approaches for Crop Genetic Adaptation to the Abiotic Stresses Predicted with Climate Change. *Agronomy* 2013, 3, 419–432. <https://doi.org/10.3390/agronomy3020419>.
- Renzi J.P., Coyne C.J., Berger J., von Wettberg E., Nelson M., Ureta S., Hernández F., Smýkal P. and Brus, J. 2022. How could the use of crop wild relatives in breeding increase the adaptation of crops to marginal environments? *Front. Plant Sci.* 13:886162. doi: 10.3389/fpls.2022.886162
- Rodríguez J.A. 1983. Conceptos para el mejoramiento de especies forrajeras. INTA EERA Anguil. La Pampa. Publicación miscelánea Nº 8, 19 p.
- Rognli O.A., Pecetti L., Kovi M.R., Annicchiarico P. 2021. Grass and legume breeding matching the future needs of European grassland farming. *Grass Forage Sci.* 76: 175– 185. <https://doi.org/10.1111/gfs.12535>
- Romera A.J., Burges J.C., Gregorini P., Agnusdei M.G. 2012; Morphological components of *Thinopyrum ponticum* tillers and their contribution to the diet of cattle grazing at contrasting herbage allowances. *Livestock Science* 150(s 1–3): 284–292. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2012.09.013>
- Rosales M.A., Franco-Navarro J.D., Peinado-Torrubia P., Díaz-Rueda P., Álvarez R. and Colmenero-Flores J.M. 2020. Chloride Improves Nitrate Utilization and NUE in Plants. *Front. Plant Sci.* 11:442. doi: 10.3389/fpls.2020.00442
- Sadaqat Shah S., Li Z., Yan H., Shi L., Zhou B. 2020. Comparative study of the effects of salinity on growth, gas exchange, accumulation and stable isotope signatures of forage oat (*Avena sativa* L.) genotypes. *Plants* 9, 1025. <https://doi.org/10.3390/plants9081025>.
- Sade N., Rubio-Wilhelmi M., Umnajkitikorn K., Blumwald E. 2018. Stress-induced senescence and plant tolerance to abiotic stress. *J. Exp. Bot.* 69, 845–853 <http://doi.org/10.1093/jxb/erx235>.
- SAS. 2002. The SAS system for Windows. Release 9.1. Cary, NC, USA: SAS Institute.
- Scheinost P., Tilley D., Ogle D., Stannard M. 2008. Plant Guide for Tall Wheatgrass (*Thinopyrum ponticum*). En: Natural Resources Conservation Service, United States Department of Agriculture (Eds.). Aberdeen: USDA NRCS, IDPMC. Available from:

- [https://www.nrcs.usda.gov/wps/PA\\_NRCSCConsumption/download?cid=nrcseprd1375228&ext=pdf](https://www.nrcs.usda.gov/wps/PA_NRCSCConsumption/download?cid=nrcseprd1375228&ext=pdf)
- Schrauf G.E., Alonso Nogara F., Rush P., Peralta Roa P., Musacchio E., Ghio S., Couso L., Ramos E., Schrauf M.F., Voda L., Giordano A., Giavedoni J., Pensiero J.F., Tomas P., Zabala J.M., and Spangenberg G. 2021. Genetic improvement of perennial forages plants for salt tolerance. En: Saline and alkaline soils in Latin America. Eds. Taleisnik E., Lavado R.S. (pp 399–414). Springer Nature Switzerland AG [https://doi.org/10.1007/978-3-030-52592-7\\_20](https://doi.org/10.1007/978-3-030-52592-7_20)
- Shannon M.C. 1978. Testing salt tolerance variability among tall wheatgrass lines. *Agron. J.* 70, 719–722. <http://doi.org/10.2134/agronj1978.00021962007000050006x>.
- Singh B.D. 2001. *Plant Breeding: Principles and Methods*. Kalyani Publishers, New Delhi-Ludhiana, India.
- Smith K.F. 1996. Tall wheatgrass (*Thinopyrum ponticum* (Podp.) Z.W. Liu and R.R.C. Wang): A neglected resource in Australian pasture. *N Z J Agric Res.* 39: 623-627. <https://doi.org/10.1080/00288233.1996.9513222>.
- Song Q., Chen Z.J. 2015. Epigenetic and developmental regulation in plant polyploids. *Curr Opin Plant Biol.* 24: 101-9. doi: 10.1016/j.pbi.2015.02.007.
- Stewart G.R., Lee J.A. 1974. The role of proline accumulation in halophytes. *Planta* 120, 279–289. <https://doi.org/10.1007/BF00390296>
- Szabados L. and Savouré A. 2010. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci.* 15, 89–97. doi: 10.1016/j.tplants.2009.11.009
- Taleisnik E., Rodríguez A.A., Bustos D., Erdei L., Ortega L., Senn M.E. 2009. Leaf expansion in grasses under salt stress. *J. Plant Physiol.* 166, 1123–1140 <http://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.03.015>.
- Tambussi E., Bort J., Araus J. 2007. Water use efficiency in C3 cereals under Mediterranean conditions: A review of physiological aspects. *Ann. Appl. Biol.* 150, 307–321. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2007.00143.x>.
- Thomas H., James A.R., Humphreys M.W. 1999. Effects of water stress on leaf growth in tall fescue, Italian ryegrass and their hybrid: rheological properties of expansion zones of leaves, measured on growing and killed tissue. *J Exp Bot.* 50: 221-231. <https://doi.org/10.1093/jxb/50.331.221>
- Tiryaki I., Karaoğlu G.B., Yücel G., Tuna M. 2021 Assessment of *Thinopyrum ponticum* (Podp.) Barkworth & D. R. Dewey accessions using universal rice primers and molecular cytogenetics. *Genet Resour Crop Evol* [doi.org/10.1007/s10722-020-01101-4](https://doi.org/10.1007/s10722-020-01101-4)
- Turner L.R., Holloway-Phillips M.M., Rawnsley R.P., Donaghy D.J., Pembleton K.G. 2012 The morphological and physiological responses of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.), cocksfoot (*Dactylis glomerata* L.) and tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb., syn. *Schedonorus phoenix* Scop.) to variable water availability. *Grass Forage Sci.* 67: 507-518. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.2012.00866.x>
- van Loo E.N. 1992. Tillering, leaf expansion and growth of plants of two cultivars of perennial ryegrass grown using hydroponics at two water potentials. *Ann Bot.* 70: 511-518. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a088511>
- Vasilakoglou I., Dhima K., Giannakoula A., Dordas C., Skiada V., Papadopoulou K. 2021. Carbon assimilation, isotope discrimination, proline and lipid peroxidation contribution to

- barley (*Hordeum vulgare*) salinity tolerance. *Plants* 10, 299.  
<https://doi.org/10.3390/plants10020299>.
- Viglizzo E.F., Ricard M.F., Taboada M.A., Vázquez-Amábile G. 2019. Reassessing the role of grazing lands in carbon-balance estimations: meta-analysis and review *Sci. Total Environm.*, 661 (2019), pp. 531-542
- Vogel K.P. and Moore J. Forage yield and quality of tall wheatgrass accessions in the USDA germplasm collection. *Crop Sci.* 1998, 38, 509–512.  
<https://doi.org/10.2135/cropsci1998.0011183X003800020039x>.
- Wakeel A. 2013. Potassium-sodium interactions in soil and plant under saline-sodic conditions. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 176 (3), 344– 354.  
<https://doi.org/10.1002/jpln.201200417>
- Willadino L. y Camara T. 2004. Origen y naturaleza de los ambientes salinos. En: La ecofisiología vegetal, una ciencia de síntesis. Eds. Reigosa Roger M.J., Pedrol Bonjoch N., Sánchez Moreiras A. Paraninfo, S.A., Madrid, España 303-330.
- Yousfi S., Serret M.D., Márquez A.J., Voltas J., Araus J.L. 2012. Combined use of  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  tracks nitrogen metabolism and genotypic adaptation of durum wheat to salinity and water deficit. *New Phytol.* 194, 230–244. <http://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.04036.x>.
- Zheng Y., Cabassa-Hourton C., Planchais S., Lebreton S. and Savoure A. 2021. The proline cycle as a eukaryotic redox valve. *J. Exp. Bot.* 72, 6856–6866. doi: 10.1093/jxb/erab361
- Zhu L., Liang Z.S., Xu X., Li S.H., Jing J.H., Monneveux P. 2008. Relationships between carbon isotope discrimination and leaf morphophysiological traits in spring-planted spring wheat under drought and salinity stress in Northern China. *Aust. J. Agric. Res.* 59, 941–949. <https://doi.org/10.1071/AR07476>.



## **ANEXOS**

## **ANEXOS**

### **Anexo I**

Evaluación del poder germinativo de 13 poblaciones de agropiro alargado (Anexo I)

### **Anexo II**

Datos de colección de las 4 poblaciones naturalizadas utilizadas en los ensayos (Tabla II Anexo II).

### **Anexo III**

Determinaciones de la Capacidad de Campo de las macetas (Anexo III ¿).

### **Anexo IV**

Resultados del modelo de regresión lineal múltiple paso a paso con datos registrados en los ensayos.

# Anexo I

## **EVALUACIÓN DEL PODER GERMINATIVO DE 13 POBLACIONES DE AGROPIRO ALARGADO**

### **Introducción**

La germinación es un proceso crucial para la implantación de las especies forrajeras, en particular para agropiro alargado que es sembrado en ambientes ganaderos con limitaciones climato-edáficas especialmente por estrés hídrico y/o salino (Borrajo y Alonso, 2004; Otondo et al., 2019). Además, estudios sobre la germinación de semillas de agropiro alargado, han reportado que postcosecha pueden producirse bajos porcentajes de germinación debido a la dormición innata en algunas variedades, aunque, si la semilla es almacenada en ambiente aireado la dormición desaparece paulatinamente con los meses (Cardoso et al., 2007).

Por ello, el objetivo de este ensayo fue evaluar la germinación de una muestra representativa de semillas de cada población naturalizada de agropiro alargado (P1 a P13), con la finalidad de poder estimar la cantidad de semillas potencialmente germinables disponibles en cada población para futuras evaluaciones.

### **Material y Métodos:**

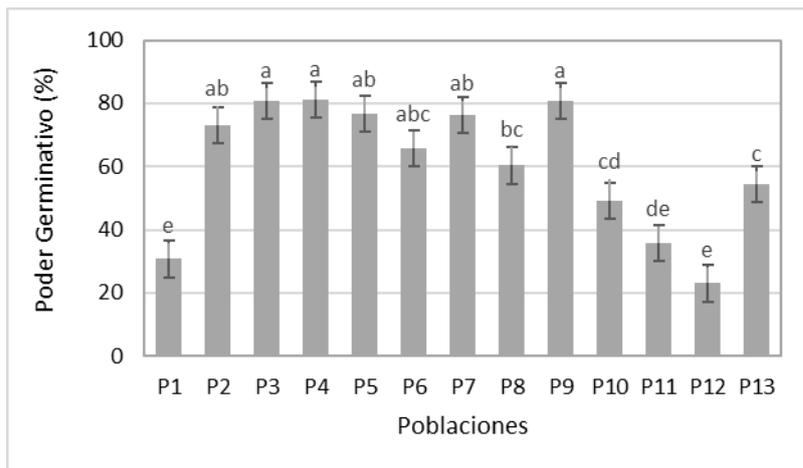
Semillas de 13 poblaciones naturalizadas cedidas por el Banco de Germoplasma de Balcarce (BAL, 2018) fueron evaluadas con el test de germinación según las normas internacionales (ISTA, 1999). Las semillas fueron sometidas a un tratamiento de esterilización y pregerminado previo al test de germinación. La esterilización de las semillas fue para eliminar posibles patógenos y consistió en sumergirlas por 1 minuto en una solución al 2% (2gs/100ml) de hipoclorito de sodio y enjuagarlas con abundante agua destilada. Luego, se realizó el tratamiento de pregerminado, el cual consistió en colocar las semillas embebidas en agua destilada durante 2 días a 0°C. Con estas semillas se realizó el test de germinación utilizando un diseño en bloques completos aleatorizados con 3 repeticiones, donde los tratamientos fueron las 13 poblaciones.

Para cada repetición se colocaron 25 semillas/población en bandejas de germinación con papel de filtro humedecido en agua, y se colocaron en una cámara de germinación con una temperatura de 15/25°C y fotoperiodo de 8/16 hs, durante 21 días. Se registro la emergencia de raíz y hoja, considerando el número de semillas germinadas cuando al cabo de 21 días presentaba una plántula con raíz mayor a 2 mm de longitud y la primera hoja desplegada (ISTA, 1999). Con esos datos se calculó el % de poder germinativo (%PG) para cada población. Luego, las plántulas obtenidas fueron trasplantadas en macetas pequeñas y trasladadas a invernadero con turba como sustrato (turba Compo Sana Universal R), para ser utilizadas en futuros ensayos.

Los datos de germinación se analizaron con ANOVA considerando una probabilidad de 0,05 y la comparación de medias entre poblaciones fue realizada con el test de DMS y una probabilidad de 0,05 (SAS, 2002).

### Resultados y Discusión:

Las poblaciones difirieron en el porcentaje de germinación que alcanzaron luego de 21 días (Figura I). El análisis de la varianza mostró valores superiores en las poblaciones P3, P4 y P9 (superiores al 80%PG), las cuales no difirieron de P2, P5 y P7 (superiores al 75%PG), ni de P6 que resulto la menor de este grupo con valores de 65% de PG.



**Figura I:** Poder germinativo (%) de poblaciones naturalizadas de agropyro alargado (P1 a P13). Letras distintas indican diferencias significativas entre poblaciones ( $p < 0,05$ ). Las barras indican el desvío estándar de la media.

### Conclusiones:

Las poblaciones con valores de germinación superiores al 75% podrían ser adecuadas para ser consideradas en futuros ensayos (P2, P3, P4, P5, P7 y P9).

### Bibliografía:

- BAL 2018. Banco de Germoplasma Activo de la Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Argentina; [consultado el 1 de marzo de 2018]. Disponible: <https://inta.gob.ar/documentos/banco-activo-de-germoplasma-de-la-eea-balcarce>.
- Borrajo C.I. y Alonso S.I. 2004. Germinación, emergencia e implantación de variedades experimentales de agropyro alargado. Rev. Arg. Prod. Anim. 24 (1-2): 29-40.
- Cardoso M.L., Alonso S.I., Clausen A.M. y Castaño J. 2007. Dormición y germinación de semillas de agropyro alargado recientemente cosechadas. Rev. Arg. Prod. Anim. 27(3): 159-167.
- ISTA 1999. International rules for seed testing. International Seed Testing Association (Ed.). Seed Science and Technology. Zürich, Switzerland.
- Otondo J., Borrajo C.I., Bandera R. 2019. Forrajeras templadas y subtropicales en suelos afectados por sales de regiones húmedas y subhúmedas de la Argentina. In Suelos afectados por sales con énfasis en la Argentina; Bandera, R., Ed.; Orientación Gráfica: Bs As. Argentina, pp. 139–167.
- SAS 2002. Statistical analysis system. Version: 9.1. Cary, NC, USA: SAS Institute Inc.

## Anexo II

**Tabla I:** Datos de colección de las 4 poblaciones utilizadas en los ensayos. Datos cedidos por el Banco de Germoplasma de Balcarce, INTA Argentina (BAL).

Población	P3	P4	P5	P9
Latitud y Longitud	38°30' S y 58°45' O	39°24' S y 65°36' O	39°24' S y 65°36' O	38°44' S y 62°33' O
Altitud (m s.n.m.)	25 m	120 m	120 m	7 m
Localidad cercana	Necochea	Lamarque	Lamarque	Bahía Blanca
Provincia	Buenos Aires	Río Negro	Río Negro	Buenos Aires
Clima	Templado oceánico	Semiárido	Semiárido	Templado de transición
Temperatura media, (máxima/mínima)	14,2°C/día (25°C enero/5°C julio)	15,5°C/día (32°C enero/1°C julio)	15,5°C/día (32°C enero/1°C julio)	15,8°C/día (31°C enero/4°C julio)
Precipitación anual	840 mm	266 mm	266 mm	583 mm
Köppen §	Cfb	BSk	BSk	Cfa
Suelo ®	<i>Argiudolls.</i>	<i>Torrifluvents.</i>	<i>Torrifluvents.</i>	<i>Haplustolls.</i>
Tipo de suelo, pH #	No salino, ni alcalino, pH $\cong$ 7,0	Salino-alcalino, pH: 9,0	No salino, ni alcalino, pH: 7,5	Salino-alcalino, pH: 9,5
Ambiente y flora acompañante.	Pastizal en banquina.	Pastizal con <i>Distichlis spicata.</i>	Pastizal lindante a tierras de regadío.	Pastizal natural con <i>Distichlis spicata.</i>
Código BAL©	Nu + Alo 338	CIB 118	CIB 117	CIB 114

§ Clasificación climática de Köppen.

® Clasificación Taxonómica de Suelo correspondiente a Grandes Grupos.

# PH del suelo correspondiente a la capa de 0–10 cm de profundidad.

© Código de coleccionista (Nu, Alo, CIB) y número de entrada, según las libretas de colección del BAL.

## Anexo III

### DETERMINACIONES DE LA CAPACIDAD DE CAMPO EN MACETAS

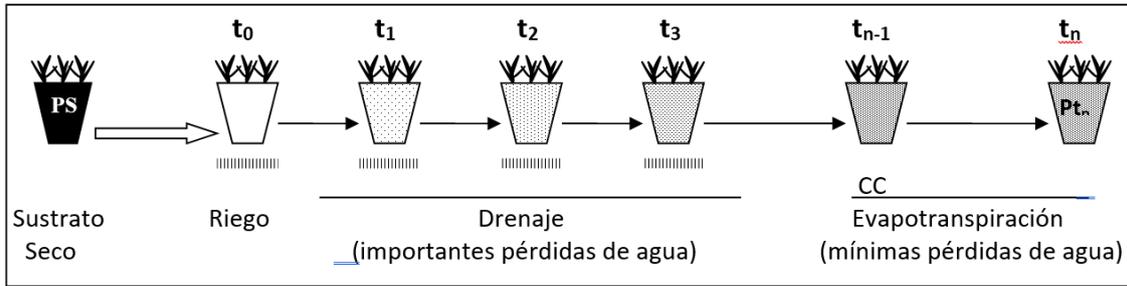
#### Introducción

La capacidad de campo de un suelo es el contenido de agua del suelo, en masa o volumen, 2 o 3 días posterior a una lluvia cuando el exceso de agua ha drenado libremente y es despreciable (SSSA, 2008), en ese momento la velocidad de pérdida de agua ha disminuido en un grado considerable atribuyendo las pérdidas de agua del suelo a la evapotranspiración (Israelson y West, 1922). En experiencias donde se desea simular diferentes niveles de sequía o estrés hídrico, es importante poder determinar la capacidad de campo de las macetas para luego calcular diferentes niveles de disponibilidad hídrica y de esta forma generar diferente intensidad de estrés hídrico en la planta.

Para lograr la estimación de la capacidad de campo en una maceta, se ha planteado la siguiente experiencia, adaptando técnicas mencionadas en otras experiencias (Marks y Strain, 1989; Pedrol et al., 2000). Además, una vez conocida la cantidad de agua en cada maceta según el nivel hídrico deseado, se pueden mantener por diferencia de peso de las macetas y agregando el agua faltante, asumiendo que 1g = 1ml de H<sub>2</sub>O. El objetivo de la presente experiencia fue ajustar la técnica para establecer la capacidad de retención hídrica (capacidad de campo) de las macetas, con la finalidad de poder generar niveles contrastantes de estrés hídrico en las macetas.

#### Material y Métodos:

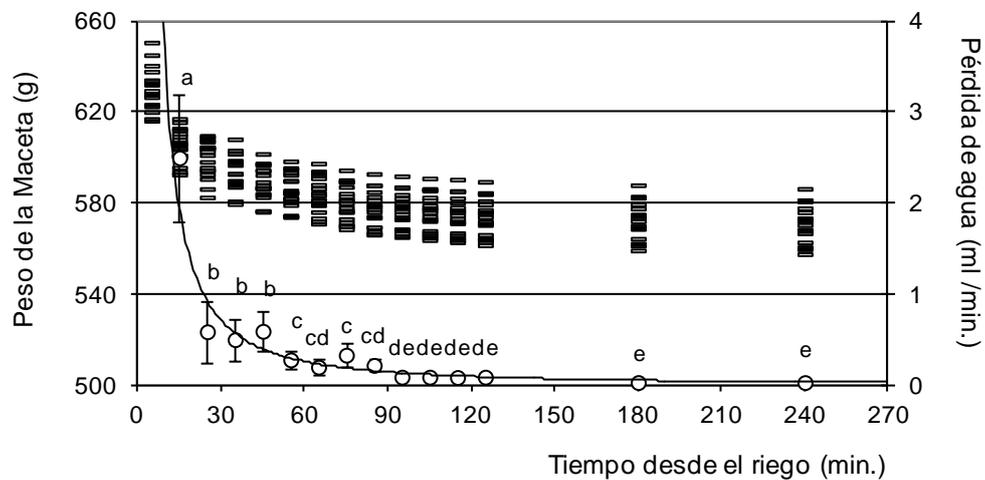
El ensayo se diagramó con un diseño completo al azar con medidas repetidas en el tiempo y 2 repeticiones. Los tratamientos fueron 9 macetas ( $m_{n=9}$ ), considerando que podía haber diferencias entre ellas. Cada maceta (1lt) fue cargada hasta  $\frac{3}{4}$  de su capacidad utilizando turba como sustrato (turba Compo Sana Universal R) y fueron trasplantadas 3 plántulas. La variable registrada fue el peso de las macetas (M) en diferentes condiciones: secas y post-riego a medida que transcurría el tiempo (Esquema I). Los tiempos de registro fueron considerados como:  $t_0$  al momento del riego y se pesaron las macetas a los 5 minutos de regadas ( $t_1$ ) y luego con una frecuencia de 10 minutos durante las primeras 2 hs y posteriormente cada 60' durante las siguientes 6hs. ( $t_{n=17}$ ). El riego se repitió luego de 6 días, y se registró nuevamente la pérdida de agua por maceta. Se calculó y analizó la pérdida agua (PA) por diferencia de pesadas en función del tiempo (t), expresada en ml/minuto (asumiendo que 1g es 1ml de H<sub>2</sub>O),  $PA_{t_n} = [(Mt_{n-1} - Mt_n) / (t_n - t_{n-1})]$ . Un análisis de varianza fue realizado sobre la variable pérdida de agua (PA), la cual fue transformada logarítmicamente previo al análisis (Proc mixed/SAS). La comparación de medias se realizó con el test t a través de DMS, utilizando una probabilidad de 0,05 (SAS, 2002).



**Esquema I:** Esquema del procedimiento para determinar la capacidad de campo de las macetas (CC). Peso seco inicial (PS = Peso de maceta + turba seca + planta), Peso post-riego ( $Pt_n$  = Peso de maceta + turba + planta + agua),  $t_0$ : momento del riego a saturación,  $t_1$  a  $t_{17}$ : momentos post-riego.

**Resultados y Discusión:**

El peso de las macetas post-riego disminuyó con el tiempo (Figura 1). El análisis de la varianza de pérdida agua (PA) mostró ausencia de efectos debido a la maceta, siendo significativo únicamente el tiempo de registro. Se registraron las mayores pérdidas de agua en los primeros 30 minutos, para disminuir hasta hacerse constante a los 95 minutos, ya que a partir de ese momento la pérdida agua no difieren significativamente de los registros posteriores (Figura II, se muestra las primeras 4hs, dado que posteriormente se registró un comportamiento constante y no significativo en las pérdidas de agua de las macetas).



**Figura II:** Peso de la maceta (raya) y pérdida agua post-riego (PA, círculo) en función del tiempo. Letras distintas indican diferencias significativas entre tiempos ( $p < 0,05$ ). Las barras indican el desvío estándar de la media.

La capacidad de campo en maceta se consideró como el contenido de agua de la porción húmeda del suelo, después de que se ha drenado el exceso de agua (encharcamiento) y se ha reducido significativamente la velocidad de pérdida (100% agua a capacidad de campo). En base a la magnitud de la pérdida agua registrada en función del tiempo, se estableció que las pérdidas de agua se atribuyen principalmente al drenaje en los primeros 85

minutos, y a partir de 95 minutos se consideran debidas a la evapotranspiración, dado que las pérdidas de agua fueron mínimas pudiendo considerar que el drenaje cesó (Israelson y West, 1922).

**Conclusiones:**

En consecuencia, para el desarrollo de las siguientes experiencias se establece como capacidad de campo al agua retenida hasta los 95 minutos post-riego (ml agua/maceta), y en base a esa cantidad considerada el 100%, se calculará la cantidad de agua necesaria para alcanzar la capacidad hídrica del 50% y 30% en cada maceta. Sin embargo, en futuros ensayos se realizarán las estimaciones en forma individual en cada maceta a utilizar, para estimar que valores en peso corresponde a la capacidad de campo de cada maceta (100%CC).

**Bibliografía:**

- Israelson, O.W. and West, F.L. 1922. "Water holding capacity of irrigated soils". Utah State Agricultural Experiment Station Bull 183: 1–24.
- Marks S., Strain B.R. 1989. Effect of drought and CO<sub>2</sub> enrichment on competition between two old field perennials. *New Phytology* 111: 181-186.
- Pedrol N., Ramos P., Reigosa M.J. 2000. Phenotypic plasticity and acclimation to water deficits in velvet-grass: a long-term greenhouse experiment. Changes in leaf morphology, photosynthesis and stress-induced metabolites. *J. Plant Physiology*, 157: 383–393.
- SAS 2002. Statistical analysis system. Version: 9.1. Cary, NC, USA: SAS Institute Inc.
- SSSA 2008. Soil Science Glossary Terms Committee. Glossary of Soil Science Terms 2008. Madison: Soil Science Society of America.



## Anexo IV

### RESULTADOS DE LOS MODELOS DE REGRESIÓN LINEAL MÚLTIPLE PASO A PASO CON LOS DATOS DE LOS DIFERENTES ENSAYOS (Proc mixed/Stepwise/SAS).

**Tabla II:** Resultados del modelo de regresión lineal múltiple con datos registrados en el ensayo de estrés hídrico (SH\_35d) con la selección paso a paso de las variables más importantes en la determinación de la biomasa total (Y).

Ensayo	Modelo con variables a seleccionar							
SH_35d	Y = AreaH LargoH AnchoH Den1 Den2 Den3 Den4 PMac AFE ETA EUA CHR Prolina Proteína							
<b>Resumen de Selección Stepwise</b>								
	Step	Variable Entered	Variable Removed	Number Vars In	Parcial R <sup>2</sup>	Modelo R <sup>2</sup>	F-Valor	Pr > F
Paso 1	1	ETA		1	0.8831	0.8831	75.58	<.0001
Paso 2	2	AreaH		2	0.0663	0.9495	11.81	0.0074
Paso 3	3	Den4		3	0.0224	0.9719	6.37	0.0356
Paso 4	4	PMac		4	0.0175	0.9894	11.49	0.0116
Paso 5	5		AreaH	3	0.0004	0.9889	0.28	0.6130
<b>Modelo con R<sup>2</sup> = 0.9889, p &lt;.0001</b>								
		Variable	Parameter Estimate	Standard Error	Type III SS	F-Valor	Pr > F	
		Término	-1.50001	0.32496	0.07067	21.31	0.0017	
		<b>PMac</b>	19.62859	2.99538	0.14242	42.94	<b>0.0002</b>	
		<b>Den4</b>	0.06732	0.00776	0.24976	75.31	<b>&lt;.0001</b>	
		<b>ETA</b>	0.00019748	0.00008245	0.01902	5.74	<b>0.0435</b>	
SH_35d	Y = -1.500 + 19.629PMac + 0.067Den4 + 0.0002ETA							

**Tabla III:** Resultados del modelo de regresión lineal múltiple paso a paso con datos registrados en el ensayo de estrés salino con duración de 40 días (ES\_40d) con la selección de las variables más importantes en la determinación de la biomasa total (Y).

Ensayo	Modelo con variables a seleccionar							
ES_40d	Y = TEF TSF TAH NHoja AreaH Densidad AFE CHR Prolina Proteína A <sub>t1</sub> A <sub>t2</sub>							
	<b>Resumen de Selección Stepwise</b>							
	Step	Variable Entered	Variable Removed	Number Vars In	Parcial R <sup>2</sup>	Modelo R <sup>2</sup>	F-Valor	Pr > F
Paso 1	1	AreaH		1	0.5470	0.5470	21.73	0.0002
Paso 2	2	NHoja		2	0.1492	0.6961	8.35	0.0102
Paso 3	3	AFE		3	0.1084	0.8046	8.88	0.0088
Paso 4	4	CHR		4	0.0523	0.8569	5.48	0.0335
	<b>Modelo con R<sup>2</sup> = 0.8569, p &lt;.0001</b>							
		<b>Parameter</b>		<b>Standard</b>				
		<b>Variable</b>	<b>Estimate</b>	<b>Error</b>	<b>Type II SS</b>	<b>F-Valor</b>	<b>Pr &gt; F</b>	
		Término	-0.71705	0.31188	0.04691	5.29	0.0363	
		<b>CHR</b>	0.01212	0.00518	0.04862	5.48	<b>0.0335</b>	
		<b>AFE</b>	-0.00398	0.00104	0.13086	14.75	<b>0.0016</b>	
		<b>NHoja</b>	0.32369	0.08293	0.13522	15.24	<b>0.0014</b>	
		<b>AreaH</b>	0.08028	0.01876	0.16261	18.32	<b>0.0007</b>	
ES_40d	Y = -0.717 + 0.012CHR -0.004AFE + 0.324NHoja + 0.080AFE							

**Tabla IV:** Resultados del modelo de regresión lineal múltiple paso a paso con datos registrados en el ensayo de estrés salino con duración de 85 días (ES\_85d) con la selección de las variables más importantes en la determinación de la biomasa total (Y).

Ensayo	Modelo con variables a seleccionar							
ES_85d	Y = LHMac Densidad AFE CHR Prolina ETA EUA A <sub>t1</sub> A <sub>t2</sub> A <sub>t3</sub> K Cl Na N δ <sup>13</sup> C δ <sup>15</sup> N							
	<b>Resumen de Selección Stepwise</b>							
	Step	Variable Entered	Variable Removed	Number Vars In	Parcial R <sup>2</sup>	Modelo R <sup>2</sup>	F-Valor	Pr > F
Paso 1	1	Prolina		1	0.9593	0.9593	7624.16	<.0001
Paso 2	2	A <sub>t3</sub>		2	0.0089	0.9682	5950.40	0.0431
	<b>Modelo con R<sup>2</sup> = 0.9682, p &lt;.0001</b>							
		<b>Parameter</b>		<b>Standard</b>				
		<b>Variable</b>	<b>Estimate</b>	<b>Error</b>	<b>Type II SS</b>	<b>F-Valor</b>	<b>Pr &gt; F</b>	
		Término i	7.53065	2.09575	7.21675	12.91	0.0022	
		<b>Prolina</b>	-1.30952	0.28796	11.55914	20.68	<b>0.0003</b>	
		<b>A<sub>t3</sub></b>	0.18017	0.08244	2.66962	4.78	<b>0.0431</b>	
ES_85d	Y = 7.531 -1.310Prolina +0.180A <sub>t3</sub>							

**Tabla V:** Resultados del modelo de regresión lineal múltiple paso a paso con datos registrados en el ensayo de estrés hídrico y salino combinado con duración de 90 días (EHxES\_90d) con la selección de las variables más importantes en la determinación de la biomasa total (Y).

Ensayo	Modelo con variables a seleccionar							
EHxES_90d	Y = LHMMac Densidad AFE CHR Prolina ETA EUA A_t <sub>1</sub> A_t <sub>2</sub> A_t <sub>3</sub> K Cl Na N NaK δ <sup>13</sup> C δ <sup>15</sup> N EC							
	<b>Resumen de Selección Stepwise</b>							
	Step	Variable Entered	Variable Removed	Number Vars In	Parcial R <sup>2</sup>	Modelo R <sup>2</sup>	F-Valor	Pr > F
Paso 1	1	ETA		1	0.8384	0.8384	923.48	<.0001
Paso 2	2	WUE		2	0.1135	0.9519	418.03	<.0001
Paso 3	3	Proline		3	0.0079	0.9598	34.67	<.0001
Paso 4	4	A_t <sub>3</sub>		4	0.0024	0.9623	11.21	0.0010
Paso 5	5	LeafT		5	0.0015	0.9638	7.39	0.0072
Paso 6	6	Density		6	0.0024	0.9662	12.15	0.0006
	<b>Modelo con R<sup>2</sup> = 0.9662, p &lt;.0001</b>							
		<b>Variable</b>	<b>Parameter Estimate</b>	<b>Standard Error</b>	<b>Type II SS</b>	<b>F-Valor</b>	<b>Pr &gt; F</b>	
		Término	-34.31482	1.54872	172.92828	490.93	<.0001	
		<b>Proline</b>	-0.29280	0.04868	12.74184	36.17	<b>&lt;.0001</b>	
		<b>WUE</b>	1.51213	0.08057	124.08206	352.26	<b>&lt;.0001</b>	
		<b>Density</b>	-0.08187	0.02349	4.27822	12.15	<b>0.0006</b>	
		<b>LeafT</b>	-0.00103	0.00028621	4.56145	12.95	<b>0.0004</b>	
		<b>A_t<sub>3</sub></b>	-0.02827	0.00923	3.30668	9.39	<b>0.0025</b>	
		<b>ETA</b>	5.09728	0.19165	249.18197	707.40	<.0001	
EHxES_90d	Y = -34.315 -0,293Prolina +1,512EUA -0,082Densidad -0,001LHMMac -0,028A_t <sub>3</sub> +5,097ETA							

